

VI МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

**ПОСТГЕНОМ'2024**

XI РОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ

**БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ**

РОССИЙСКО-КИТАЙСКИЙ КОНГРЕСС

**RUSSIAN-CHINESE  
LIFE SCIENCES CONGRESS**



# **СБОРНИК ТЕЗИСОВ ДОКЛАДОВ**

Под редакцией В.М. Говоруна и А.Г. Габибова



29 октября — 2 ноября 2024

## ОРГАНИЗАТОРЫ



Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор)



Российская академия наук (РАН)



Министерство науки и высшего образования Российской Федерации



Российское общество биохимиков и молекулярных биологов (РБО)



Национальная генетическая инициатива «100 000+Я»



Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины Роспотребнадзора (НИИ СБМ)



ГНЦ РФ Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ГНЦ ИБХ РАН)

ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ОПЕРАТОР ФОРУМА



VI МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ  
**ПОСТГЕНОМ'2024**  
XI РОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ  
**БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ**  
РОССИЙСКО-КИТАЙСКИЙ КОНГРЕСС  
**RUSSIAN-CHINESE**  
**LIFE SCIENCES CONGRESS**



# **СБОРНИК ТЕЗИСОВ ДОКЛАДОВ**

Под редакцией В.М. Говоруна и А.Г. Габибова

29 октября — 2 ноября 2024

УДК 57  
ББК 28я43  
Ш51

*Под редакцией В.М. Говоруна и А.Г. Габиева*

Ш51 **VI Международная конференция ПОСТГЕНОМ'2024**  
**XI Российский симпозиум БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ**  
**Российско-китайский конгресс в области наук о жизни**  
**(ПСБ «Патриот», 29 октября – 2 ноября 2024).**  
**Сборник тезисов докладов.** – М.: Издательство «Перо», 2024. – 7,2 Мб  
[Электронное издание]

ISBN 978-5-00258-142-9

---

Сборник тезисов научных докладов включает материалы пленарных лекций и пленарных докладов, симпозиальных докладов, выступлений на заседаниях круглых столов и стендовых докладов, представленных на объединенном форуме, включавшем VI Международную конференцию ПОСТГЕНОМ'2024, XI Российский симпозиум БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ и Российско-китайский конгресс в области наук о жизни. Тематика представленных докладов охватывает актуальные разделы системной и синтетической биологии, структурной биологии, биоорганической химии, биотехнологии и биологии растений, молекулярной биологии и смежных дисциплин. Большое внимание уделено геномным и мультиомиксным технологиям, технологиям поддержания оптимального здоровья, проблемам антибиотикорезистентности, цифровым технологиям в биомедицине, современным методам создания лекарств. Блок докладов, представленных в рамках симпозиума БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ охватывает различные аспекты поиска, выделения и синтеза новых природных пептидов и белков. Подробно рассмотрены биологические функции и механизмы действия пептидов и белков, физико-химические методы их исследования, химия и биология ферментов, биоинженерия пептидов и белков, лекарственные средства на основе пептидов и белков и другие вопросы.

Книга рассчитана не только на специалистов, работающих в разных областях биомедицинских наук, но и на студентов, аспирантов, преподавателей и научных работников, интересующихся проблемами наук о жизни.

---

ISBN 978-5-00258-142-9

УДК 57  
ББК 28я43

© НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, 2024  
© ГНЦ ИБХ РАН, 2024  
© Российское общество биохимиков и молекулярных биологов, 2024  
© Коллектив авторов, 2024

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>Тезисы пленарных лекций и докладов</b>	5
<b>Тезисы докладов VI Международной конференции ПОСТГЕНОМ'2024</b>	
Синтетическая и системная биология. Большие генетические данные	15
Современные методы создания лекарств	39
Цифровые технологии в биомедицине. Биоинформатика, молекулярное моделирование, искусственный интеллект, машинное обучение	67
Геномные и мультиомиксные технологии	87
Технологии поддержания оптимального здоровья. Норма, биохакинг и ускоренное старение	173
Инфекции. Антибиотикорезистентность	188
Онкология. Аутоиммунитет. Иммунология	218
<b>Тезисы докладов XI Российского симпозиума БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ</b>	
Поиск, выделение и синтез новых природных пептидов и белков	245
Биологические функции и механизмы действия пептидов и белков	261
Биоинженерия белков и пептидов	305
Физико-химические методы исследования структуры пептидов и белков. Взаимосвязь “структура – функция”	322
Химия и биология ферментов	339
Лекарственные средства на основе пептидов и белков	356
<b>Тезисы докладов Российско-китайского конгресса в области наук о жизни</b>	
Нейронауки	381
Структурная биология	389
Стволовые клетки	395
Биология растений	399
<b>Авторский указатель</b>	410

## ПРЕЗИДЕНТ КОНГРЕССА



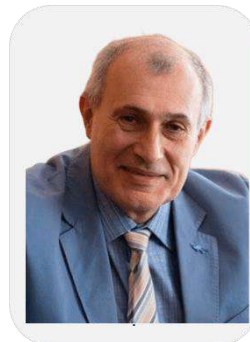
**Анна Юрьевна Попова**

Руководитель Федеральной службы по надзору  
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

## СОПРЕДСЕДАТЕЛИ ПРОГРАММНОГО КОМИТЕТА



**Вадим Маркович Говорун**  
академик РАН, профессор, д.б.н.



**Александр Габибович Габибов**  
академик РАН, профессор, д.х.н.

## ЧЛЕНЫ ПРОГРАММНОГО КОМИТЕТА

К.В. Балакин  
А.А. Белогуров  
А.А. Василевский  
А.В. Головин  
Д.А. Долгих  
Р.Г. Ефремов  
Р.А. Иванов  
А.А. Иващенко  
Е.Н. Ильина  
Е.Н. Имянитов  
И.Е. Кашеверов  
Р.С. Козлов

Н.А. Колчанов  
А.Л. Коневега  
В.В. Кутырев  
О.И. Лаврик  
Д.Ю. Логунов  
А.А. Москалев  
Н.Ф. Мясоедов  
Е.Л. Насонов  
М.П. Никитин  
Е.Н. Николаев  
Т.В. Овчинникова  
В.А. Олейников

В.В. Поройков  
А.Г. Румянцев  
К.В. Северинов  
П.В. Сергиев  
И.В. Смирнов  
О.Н. Ткачева  
Е.А. Трошина  
А.Н. Федоров  
А.В. Финкельштейн  
М.Г. Хренова  
Д.М. Чудаков  
И.В. Ямпольский

Ответственный секретарь программного комитета  
М.В. Третьяк

## **ЭВОЛЮЦИЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА В ЭПОХУ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ**

**Е.Н. Имянитов**

*НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова, Санкт-Петербург*

Внедрение молекулярной диагностики в онкологическую практику привело к значительному видоизменению повседневной практики врача-онколога. Диагностика целого ряда заболеваний, например, некоторых разновидностей лейкозов, сарком, опухолей мозга, почти полностью базируется на выявлении специфических молекулярно-генетических маркеров. Прогресс в изучении наследственных опухолевых синдромов создал основы для научно обоснованного формирования групп повышенного риска с последующей организацией соответствующих мероприятий по ранней диагностике и профилактике онкологических заболеваний для носителей мутаций. Наиболее впечатляющие успехи достигнуты в отношении тестов, позволяющих анализировать спектр лекарственной чувствительности опухолей и индивидуально подбирать эффективную терапию. В рамках развития трансляционной онкологии появилось новое понятие – т.н. «жидкостная биопсия» – совокупность методов, позволяющих детектировать фрагменты опухоли в различных средах организма. Жидкостная биопсия может выявлять пациентов, которые полностью излечились от онкологического заболевания посредством хирургической операции и, следовательно, не нуждаются в проведении адъювантной терапии. В предстоящие годы почти наверняка получат практическое применение молекулярные тесты, предназначенные для ранней диагностики и скрининга рака. Наиболее значимым направлением развития трансляционной онкологии является интеграция усилий специалистов различного профиля, предусматривающая постоянное взаимодействие хирургов, терапевтов, радиологов, морфологов и молекулярных генетиков по вопросам персонализации лечения онкологических пациентов.

## **CANCER TREATMENT IN THE ERA OF MOLECULAR DIAGNOSTICS**

**E.N. Imyanitov**

*Petrov National Medicine Research Center of Oncology, St Petersburg*

The invention of molecular diagnostics in clinical oncology led to significant changes in daily activities of practicing doctors. The diagnosis of a number of tumor types, including several varieties of leukemia, sarcomas, brain tumors, etc., is almost entirely based on the detection of specific genetic markers. Breakthrough in the studies of hereditary cancer syndromes has created the basis for the identification of persons-at-risk, who may strongly benefit from early cancer detection and prevention. The most remarkable progress is achieved in the development of tests, which are capable to reveal molecular tumor targets and, thus, to guide the choice of cancer therapy. There is a new avenue in translational oncology, i.e., so-called “liquid biopsy” – the detection of tumor fragments in body tissues and fluids. Liquid biopsy permits the identification of patients, who are cured by surgery and may abstain from adjuvant therapy. Molecular genetic tests will very likely to become an integral part of cancer screening in the next few years. The development of translational oncology requires tight interaction of surgeons, medical oncologists, radiologists, morphologists and molecular geneticists.

## ИННОВАЦИОННЫЕ ПОДХОДЫ К ЭФФЕКТИВНОМУ ЛЕЧЕНИЮ ОПУХОЛЕЙ

С.М. Деев

ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; НИЦ «Курчатовский институт», Москва; НИЦ «Онкоотерастика», Томск

Селективность доставки терапевтического агента к опухоли важна для снижения общей токсической нагрузки на организм. Нами предложен ряд подходов, основанных на сочетании высокоселективных компонентов для распознавания опухолевых клеток и соединений для точной диагностики и эффективной терапии рака. Мы продемонстрировали синергетический эффект комбинированной адресной иммуно/химиотерапии, при которой к различным сайтам одного или разных онкомаркеров доставлялись противораковые соединения разного механизма действия.

Мы разработали концепцию ФДТ, основанную на генетически кодируемой биолуминесцентной резонансной передаче энергии (BRET), которая сочетает в себе внутренний источник света и фотосенсибилизатор в единой генетической конструкции. Эта конструкция может быть адресно доставлена в глубоко залегающие опухоли, что позволяет избирательно воздействовать на них.

Для улучшения фармакокинетики, продления циркуляции в крови и снижения накопления агентов в почках предложено соединение нацеливающего белка-скаффолда с альбуминсвязывающим доменом (ABD).

Микроокружение опухоли затрудняет интратуморальный транспорт наночастиц, что препятствует эффективному лечению солидных опухолей и метастатических узлов. Нами предложена концепция доставки препаратов, которая является альтернативой существующим подходам, основанным на усилении эффекта проницаемости и удержания (EPR). Наш подход основан на повышенном накоплении наночастиц с лекарственным средством в сосудах опухоли с последующим быстрым высвобождением инкапсулированного лекарства. Это приводит к градиентному проникновению препарата в ткань-мишень и существенному увеличению терапевтического эффекта.

*Исследования поддержаны Министерством науки и высшего образования РФ, № 075-15-2024-536.*

1. Zelepukin IV, Shevchenko KG, Deyev SM. *Nat Commun.* 2024, 15: 4366.
2. Larkina M, Varvashenya R, Deyev S. et al. *Mol Pharm.* 2024, 21(4): 1919–1932.
3. Deyev SM, Oroujeni M, Garousi J et al. *Int J Mol Sci.* 2024, 25(8): 4246.
4. Belyaev I.B., Zelepukin I.V., Kotelnikova P.A., et al. *Adv. Sci.* 2024, doi: 10.1002/advs.202307060
5. Alekseeva L.G., Ovsyanikova O.V., Schulga A.A., et al. *Cells.* 2024, 13(4): 317.

## INNOVATIVE APPROACHES TO FACILITATE TUMOR TREATMENT

S. Deyev

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow; National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow; Research Center "Oncotheranostics", Tomsk

The selectivity of therapeutic agent delivery to target cells is important in order to reduce the overall toxic load on the body. We have proposed a number of approaches based on multifunctional structures that combine highly selective elements for recognizing tumor cells and agents for accurate diagnosis and effective cancer therapy. We demonstrate a synergistic strategy of combination immuno/chemotherapy implying vectoring of oncomarkers sites with compounds having a different mechanism of action.

We introduce the concept of genetically encoded bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-activated PDT, which combines an internal light source and a photosensitizer in a single genetic construct, which can be delivered to tumors seated at virtually unlimited depth and then triggered their treatment.

To improve the pharmacokinetics, extend blood residence and reduce renal uptake of small targeting agents we suggested the fusion of targeting protein with an albumin-binding domain (ABD). It prevents rapid renal excretion and high renal reabsorption resulting in better tumour targeting.

Tumour microenvironment hinders nanoparticle transport deep into the tissue precluding thorough treatment of solid tumours and metastatic nodes. We introduce an anticancer drug delivery concept which represents alternative to the existing approaches based on enhanced permeability and retention (EPR) effect. This approach relies on enhanced drug-loaded nanocarrier accumulation in vessels of the target tumour or metastasised organ, followed by a rapid release of encapsulated drug. It leads to a gradient-driven permeation of the drug to the target tissue.

*The study is supported by Ministry of Science and Higher Education of RF #075-15-2024-536*

1. Zelepukin IV, Shevchenko KG, Deyev SM. *Nat Commun.* 2024, 15: 4366.
2. Larkina M, Varvashenya R, Deyev S. et al. *Mol Pharm.* 2024, 21(4): 1919–1932.
3. Deyev SM, Oroujeni M, Garousi J et al. *Int J Mol Sci.* 2024, 25(8): 4246.
4. Belyaev I.B., Zelepukin I.V., Kotelnikova P.A., et al. *Adv. Sci.* 2024, doi: 10.1002/advs.202307060
5. Alekseeva L.G., Ovsyanikova O.V., Schulga A.A., et al. *Cells.* 2024, 13(4): 317.



#### КАНОНИЧЕСКИЕ И НЕКАНОНИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ КОМПОНЕНТОВ ТЕЛОМЕРАЗЫ

О.А. Донцова<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова; <sup>2</sup>ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; <sup>3</sup>Сколковский институт науки и технологии, Москва

Теломераза – РНК-белковый комплекс – является ключевым элементом системы поддержания длины теломер в большинстве эукариотических клеток. В докладе будет рассмотрена структура теломеразного комплекса, особенности регуляции поддержания длины теломер и значимости этого процесса для клетки и организма. Особое внимание будет уделено регуляции экспрессии теломеразной РНК, в особенности ее процессинга и экспорта в цитоплазму, где теломеразная РНК может служить матрицей для синтеза белка hTERP, вовлеченного в регуляцию аутофагии; а также воздействие различных метаболических процессов на экспрессию hTERP, аутофагию и регуляцию пролиферации.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФ, проект 21-64-00006.*

#### CANONICAL AND NONCANONICAL FUNCTIONS OF TELOMERASE COMPONENTS

О.А. Dontsova<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Lomonosov Moscow State University, Chemistry department and A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology; <sup>2</sup>Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences; <sup>3</sup>Skoltech, Moscow

Telomerase – RNA-protein complex – is the major participant of the telomere length maintaining in the majority of eukaryotic cells. Here we will discuss the structure of telomerase complex, features of regulation of telomere length maintenance and the importance of this process for the cell and the organism. Particular attention will be paid to the regulation of telomerase RNA expression, especially its processing and export to the cytoplasm, where telomerase RNA can serve as a template for the synthesis of the hTERP protein involved in the regulation of autophagy; as well as the impact of various metabolic processes on hTERP expression, autophagy and the regulation of proliferation.

*The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation, project 21-64-00006.*

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РЕМОДЕЛИРУЮЩЕГО КОМПЛЕКСА PBAF С ХРОМАТИНОМ В ПРОЛИФЕРИРУЮЩИХ ПРЕДШЕСТВЕННИКАХ И ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ НЕЙРОНАХ: БЕЛОК PHF10 И ЕГО ФУНКЦИИ. РОЛЬ БЕЛКА PHF10 В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ХРОМАТИН РЕМОДЕЛИРУЮЩЕГО КОМПЛЕКСА PBAF**

**С. Георгиева, Н. Сошникова**

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

Хроматин является одним из ключевых игроков в регуляции транскрипции, и его структура определяет множественные транскрипционные события в клетке. У эукариот были идентифицированы четыре высококонсервативных семейства хроматин-ремоделеров, каждое из которых имеет свою специфическую функцию в транслокации нуклеосом. Помимо основного АТФазного «мотора», схожего у всех ремоделеров, они содержат разнообразное количество субъединиц, которые определяют взаимодействие ремоделера с хроматином. Хотя механизм действия основного АТФазного ядра был хорошо изучен, функция других субъединиц остается неясной. Здесь мы обсуждаем роль PHF10, специфической субъединицы комплекса ремоделирования хроматина семейства PBAF (SWI/SNF). Мы показываем роль PHF10 в активации транскрипции, взаимодействии с модификациями гистонов и его роль в спецификации функционирования PBAF. Мы также демонстрируем, что определенный тип комплекса PBAF контролирует структуру хроматина в дифференцированных клетках млекопитающих.

**INTERACTION OF THE PBAF REMODELING COMPLEX WITH CHROMATIN IN NEURONAL PROGENITORS AND DIFFERENTIATED NEURONS: PHF10 PROTEIN AND ITS FUNCTIONS. THE ROLE OF THE PHF10 PROTEIN IN THE FUNCTIONING OF THE CHROMATIN REMODELING COMPLEX PBAF**

**S. Georgieva, N. Soshnikova**

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow*

Chromatin is one of the key players in transcriptional regulation, and chromatin structure determines multiple transcriptional events in the cell. Four highly conserved families of chromatin remodelers have been identified in eukaryotes, each with a specific function in nucleosome translocation. In addition to a core ATPase motor similar in all remodelers, they contain a diverse number of subunits that determine remodeler targeting and interaction with chromatin. Although the mechanism of action of the ATPase core has been well studied, the function of most other subunits remains unclear. Here, we discuss the role of PHF10, a specific subunit of the PBAF (SWI/SNF) family chromatin remodeling complex. We show the role of PHF10 in transcriptional activation, interaction with histone modifications, and its role in specifying PBAF function. We also demonstrate that a particular type of PBAF controls chromatin structure in differentiated mammalian cells.

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

**И.В. Ямпольский**

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

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

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

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект 22-44-02024.*

1. Shakhova ES et al. An improved pathway for autonomous bioluminescence imaging in eukaryotes. *Nat Met.* 2024, 21: 406.
2. Palkina KA et al. A hybrid pathway for self-sustained luminescence. *Sci Adv.* 2024, 10: eadk1992.
3. Mitiouchkina T et al. Plants with genetically encoded autoluminescence. *Nat Biotech.* 2020: 944.
4. Kotlobay AA et al. Bioluminescence chemistry of fireworm *Odontosyllis*. *PNAS USA* 2019, 18911.
5. Kotlobay A.A. et al. Genetically encodable bioluminescent system from fungi. *PNAS USA* 2018, 12728.
6. Kaskova ZM et al. Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence. *Sci Adv.* 2017, 3: e1602847.
7. Kaskova ZM et al. 1001 lights: Luciferins, Luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine. *Chem Soc Rev.* 2016, 6048.
8. Purto KV et al. The chemical basis of fungal bioluminescence. *Angew Chem Int Ed.* 2015, 8124.

#### МЕТИЛИРОВАНИЕ МАЛЫХ ЯДЕРНЫХ РНК И ЕГО РОЛЬ В СПЛАЙСИНГЕ

А.К. Болихова<sup>1,2</sup>, О.А. Аверина<sup>2,3</sup>, А.И. Буян<sup>4</sup>, О.А. Пермяков<sup>3</sup>, С.С. Марьясина<sup>2,5</sup>, М.А. Емельянова<sup>1</sup>, В.Н. Манских<sup>2</sup>, А.Р. Иззи<sup>6</sup>, А.Ю. Руденко<sup>2</sup>, М.А. Хохлова<sup>6</sup>, А.М. Мазур<sup>7</sup>, Е.Б. Прохорчук<sup>7</sup>, О.А. Донцова<sup>1,2,5,8</sup>, П.В. Сергиев<sup>1,2,3,5</sup>

<sup>1</sup>Центр молекулярной и клеточной биологии Сколковского института науки и технологий, Сколково; <sup>2</sup>НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; <sup>3</sup>Институт функциональной геномики МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; <sup>4</sup>Институт белка РАН, Пушкино; <sup>5</sup>Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; <sup>6</sup>Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; <sup>7</sup>ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; <sup>8</sup>ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Ферментативное метилирование это процесс, которому подвержены практически все функциональные РНК. Модифицированные нуклеотиды встречаются в мяРНК компонентах сплайсосомы. Мы выявили, что РНК метилтрансферазы METTL4 и THUMP2 отвечают за модификацию U2 и U6 мяРНК и нокаутировали соответствующие гены у клеточных линий и мышей. Выяснили, что модификации, вносимые этими ферментами, необходимы для оптимальной скорости и точности сплайсинга. При этом наиболее всего замедляется вырезание интронов, которые и у клеток дикого типа вырезаются медленно. Инактивация генов METTL4 и THUMP2 приводит к изменению экспрессии генов, связанных с воспалением. Мыши с нокаутом гена THUMP2 демонстрируют некоторые признаки диабета 2 типа и повышенное количество макрофагов в печени.

*Исследование было поддержано грантом РФФ № 24-14-00048.*

#### METHYLATION OF SMALL NUCLEAR RNAs AND ITS ROLE IN SPLICING

A.K. Bolikhova<sup>1,2</sup>, O.A. Averina<sup>2,3</sup>, A.I. Buyan<sup>4</sup>, O.A. Permyakov<sup>2,3</sup>, S.S. Mariasina<sup>2,5</sup>, M.A. Emelianova<sup>1</sup>, V.N. Mansikh<sup>2</sup>, A.R. Izzi<sup>6</sup>, A.Yu. Rudenko<sup>2</sup>, M.A. Khokhlova<sup>6</sup>, A.M. Mazur<sup>7</sup>, E.B. Prokhortchouk<sup>7</sup>, O.A. Dontsova<sup>1,2,5,8</sup>, P.V. Sergiev<sup>1,2,3,5</sup>

<sup>1</sup>Skolkovo Institute of Science and Technology, Center for Molecular and Cell Biology, Skolkovo; <sup>2</sup>A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow; <sup>3</sup>Institute of Functional Genomics, Lomonosov Moscow State University, Moscow; <sup>4</sup>Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino; <sup>5</sup>Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow; <sup>6</sup>Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, Moscow; <sup>7</sup>Federal Research Center "Fundamental Bases of Biotechnology", Russian Academy of Sciences, Moscow; <sup>8</sup>M.M. Shemyakin & Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences Moscow

Enzymatic methylation is a process that affects almost all functional RNAs. Modified nucleotides are found in snRNA components of the spliceosome. We have identified that the RNA methyltransferases METTL4 and THUMP2 are responsible for the modification of U2 and U6 snRNA and knocked out the corresponding genes in cell lines and mice. We found that the modifications introduced by these enzymes are necessary for optimal splicing speed and accuracy. Specifically, the excision of introns, which are already slowly excised in wild-type cells, is most significantly slowed down. Inactivation of the METTL4 and THUMP2 genes leads to changes in the expression of inflammation-related genes. Mice with a THUMP2 gene knockout exhibit some signs of type 2 diabetes and an increased number of macrophages in the liver.

*The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 24-14-00048.*

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ КОММУТАЦИЯ ДНК: ПРИВЛЕЧЕНИЕ НОВЫХ ФИЗИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

**М.П. Никитин**

*Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), МФТИ, Москва;  
Научно-технологический университет Сириус; ООО «Абисенс», Сириус*

Феномен молекулярной коммутации (МК) на основе низкоаффинных взаимодействий представляет собой новый фундаментальный механизм хранения и обработки информации в биомолекулах, в т.ч. ДНК/РНК [Nikitin, Nat Chem, 2023]. В числе прочего, данное открытие дает новые возможности для снижения побочных эффектов генотерапевтических препаратов и исследований в области нейро-, онко- и других заболеваний. Кроме того, оно создает возможности получения биокomпьютерных устройств беспрецедентно высокой сложности, что особенно интересно, учитывая, что на данный момент ДНК – является самым надежным и емким хранилищем информации, известным человечеству (способно хранить информацию тысячелетиями при емкости более 1 ЭБ/грамм).

В рамках данного выступления будет рассказано о нашем прогрессе в разработке данного феномена, в частности, за счет разработки новых методов, кардинально ускоряющих исследования и повышающих их чувствительность. Будут представлены результаты исследований, полученных с помощью оригинальной российской системы оптической биовизуализации LumoTrace (Abisense, Россия), позволяющей проводить высокопроизводительные измерения аффинностей молекул за счет специальных планшетных модулей. Уже сейчас, используя как новые термодинамические модели, так и нейронные сети, нам удалось разработать систему предсказания взаимных аффинностей ДНК с точностью, значительно превосходящей основную мировую сервис NUPACK. Кроме того, уникальный модуль дозирования системы позволил проводить кинетические измерения биомолекулярных реакций, кардинально опережая возможности современных планшетных ридеров и, таким образом, преодолеть их ограничения в производительности для исследования феномена МК в кинетическом режиме. Помимо этого, в докладе будут освещены результаты по дальнейшему расширению теории МК и исследованию аспектов ее реализации в условиях, близким к таковым в живых системах, в том числе за счет использования новой российской сверхчувствительной чувствительной камеры Abisense HICCD.

*Благодарность. Части данной работы выполнены при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение 075-03-2024-117, проект FSMG-2023-0017.*

## MOLECULAR COMMUTATION OF DNA: ENGAGING NOVEL PHYSICAL METHODS

**M.P. Nikitin**

*Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow; Sirius University of Science and Technology; Abisense LLC, Sirius*

The phenomenon of molecular commutation (MC) based on low-affinity interactions is a new fundamental mechanism for storing and processing information in biomolecules, including DNA/RNA [Nikitin, Nat Chem, 2023]. Among other things, this discovery provides exciting opportunities for reducing side effects of gene therapy and opens up new possibilities for research in the field of neuro-, onco- and other diseases. In addition, it offers means for developing biocomputing devices of unprecedented complexity, which is especially interesting given that DNA is arguably the most reliable and capacious storage of information known to mankind (it can store information for millennia with a capacity of more than 1 EB/gram).

This talk will discuss our progress in the further investigation of this phenomenon, in particular, through the development of new methods that dramatically accelerate research and increase measurement sensitivity. In particular, we performed high-throughput measurements of mutual affinities for numerous ssDNA pairs using special 96- and 384-well plate modules of the original optical biovisualization system LumoTrace (Abisense, Russia). Using novel thermodynamic models as well as neural networks, we have managed to develop a system for predicting affinities between DNA strands with an accuracy significantly exceeding well-known NUPACK service. In addition, the unique dosing module of the system made it possible to carry out high-throughput kinetic measurements of biomolecular interaction, significantly outpacing the capabilities of modern plate readers and, thus, overcoming their limitations in productivity for studying the MC phenomenon in kinetic mode. In addition, the report will highlight the results of further development of the MC theory and study of aspects of its performance under conditions close to those in living systems, including through the use of the new ultra-sensitive Abisense HICCD camera.

*Acknowledgments. Parts of this work were supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, agreement 075-03-2024-117, project FSMG-2023-0017.*

## ПОДХОДЫ AI/ML К ОЦЕНКЕ *IN SILICO* БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ: ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ

**В.В. Поройков**

*Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва*

Экспериментальное тестирование миллионов лекарственно-подобных соединений на тысячи видов биологической активности для оценки их безопасности и эффективности экономически нецелесообразно и практически нереализуемо. Для определения приоритетных направлений исследований широко применяются методы машинного обучения. Они основаны на построении моделей зависимостей «структура–активность» для гетерогенных обучающих выборок, содержащих сведения о структуре биологически активных веществ из различных химических классов, проявляющих множество видов активности. Формирование обучающих выборок осуществляется путем извлечения наиболее надежных данных из литературы с применением методов интеллектуального анализа текстов и дополнительной фильтрацией для обеспечения однородности при максимально возможном охвате отобранной информации. Агрегированные в информационных массивах сведения характеризуют взаимосвязи «болезнь – мишень – биологический процесс – лиганд».

Way2Drug (<https://www.way2drug.com/>) – быстрорастущий веб-портал, ориентированный на интеграцию востребованных «инструментов» для поиска и конструирования фармакологических веществ *in silico*. Way2Drug в настоящее время предоставляет веб-сервисы по прогнозу биологической активности (PHARMA), токсичности (TOX), метаболизма (META) и физико-химических характеристик (ADME) лекарственно-подобных соединений. Все веб-сервисы могут свободно использоваться для некоммерческих академических исследований, а локальные версии компьютерных программ – на основе лицензий фармацевтической индустрии.

Наряду с прогностическими веб-сервисами, на портале Way2Drug представлены информационные ресурсы, включая базы данных по лекарственным препаратам WWAD (<https://www.way2drug.com/wwad/>), фитоконпонентам официальных лекарственных растений РФ Phyto4Health (<https://www.way2drug.com/p4h/>), метаболизму ксенобиотиков микробиотой кишечника HGMMX (<https://www.way2drug.com/hgmmx/>). В докладе обсуждаются фундаментальные и прикладные аспекты разработки и практического применения подходов AI/ML к оценке биологической активности фармакологических веществ *in silico*.

*Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122022800499-5).*

## AI/ML APPROACHES TO ASSESSMENT OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF PHARMACEUTICAL AGENTS *IN SILICO*: FROM BASIC RESEARCH TO APPLICATIONS

**V. Poroikov**

*Institute of Biomedical Chemistry, Moscow*

Experimental testing of millions of drug-like compounds for thousands biological activities to evaluate their safety and effectiveness is neither economically nor practically feasible. Machine learning methods are widely used to determine priority areas of research. They are based on the development of structure-activity relationship models for heterogeneous training sets containing information about the structure of biologically active substances from various chemical classes exhibiting many types of activity. The preparation of training sets is carried out by extracting the most reliable data from the literature using text mining methods and additional filtering to ensure homogeneity with the maximum possible coverage of the selected information. Information aggregated in the appropriate arrays characterizes the “disease – target – biological process – ligand” relationships.

Way2Drug (<https://www.way2drug.com/>) is a fast-growing web portal focused on integrating various “tools” for finding and optimization of pharmacological substances *in silico*. Way2Drug currently provides web services for predicting biological activity (PHARMA), toxicity (TOX), metabolism (META) and physicochemical characterization (ADME) of drug-like compounds. All web services can be freely used for non-commercial academic research, and local versions of computer programs are subject to licenses by the pharmaceutical industry.

Along with predictive web services, the Way2Drug portal presents information resources, including databases on medicinal products WWAD (<https://www.way2drug.com/wwad/>), phytocomponents of Pharmacopeia medicinal plants of the Russian Federation Phyto4Health (<https://www.way2drug.com/p4h/>), metabolism of xenobiotics by the intestinal microbiota HGMMX (<https://www.way2drug.com/hgmmx/>). We will discuss the fundamental and applied aspects of the development and practical application of AI/ML approaches to evaluating the biological activity of pharmacological substances *in silico*.

*The study was performed in the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021-2030) (No. 122030100170-5).*

## ООО «Компания Хеликон» – один из ведущих российских поставщиков лабораторного оборудования, реагентов и расходных материалов с 1997 года.

Компания оказывает комплекс услуг и сопровождает Клиентов на всех этапах — помогает в проектировании лабораторий, подбирает и доставляет необходимую продукцию, проводит пуско-наладку оборудования, обучает персонал на местах, обеспечивает квалифицированное сервисное обслуживание.

20 000+

наименований  
продукции

60+

производителей



Развитая логистическая  
и складская сеть



доставка  
в кратчайшие сроки

### Направления деятельности:

- Молекулярная и клеточная биология.
- Клиническая диагностика.
- Ветеринария.
- Пищевая безопасность.
- Агрогеномика.
- Биоиндустрия.
- Криминалистика.



**Для своих ключевых клиентов Компания предоставляет возможность тестирования продукции до принятия решения о покупке.**

«Компания Хеликон» также имеет собственную производственную базу и выпускает лабораторное оборудование, расходные материалы и мебель под торговой маркой Helicon.

Региональные представительства Компании находятся в Санкт-Петербурге, Новосибирске, Казани, Ростове-на-Дону, Владивостоке и Екатеринбурге.

**helicon**

ЛУЧШИЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ ЛАБОРАТОРИИ

Единый телефон

**8 800 770 71 21**

бесплатный звонок по России

Адрес: 121374, Москва,  
Кутузовский проспект, д. 88

E-mail: [mail@helicon.ru](mailto:mail@helicon.ru)

Сайт: [www.helicon.ru](http://www.helicon.ru)



## Собственные производственные площадки

Компания Хеликон –  
производитель  
лабораторного оборудования  
для молекулярной биологии  
с 25-летней историей



## Лабораторная мебель

- Устойчивая к химическим воздействиям
- Под тяжёлое оборудование
- Антивибрационная
- Широкая линейка модификаций
- Индивидуальные размеры и кастомизация под клиента



Посмотрите видео  
Криминалистический стол  
«Эксперт»



## Реагенты

130+ наименований реагентов  
выпускается под маркой HELICON



Посмотрите видео  
о линейке магнитных  
штативов HELICON

## Лабораторное оборудование

- Камеры для электрофореза вертикального и горизонтального
- Системы гель-документирования и трансиллюминаторы
- Аспиратор лабораторный
- Микроцентрифуга-вортекс
- Магнитные штативы
- Штативы для хранения
- Септы (покровные маты) для генетических анализаторов
- Криоштативы



## ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ИССЛЕДОВАНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПЕПТИДНЫХ АГЕНТОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА С ЕГО МИКРОБИОТОЙ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В КРОВОТОКЕ

Г.П. Арапиди<sup>1,2</sup>, В.А. Косс<sup>1</sup>, А.К. Воронина<sup>1</sup>, А.С. Урбан<sup>1,2</sup>, В.О. Шендер<sup>1,2</sup>, О.М. Иванова<sup>1</sup>, В.А. Веселовский<sup>1</sup>, Е.И. Олехнович<sup>1</sup>, К.М. Климина<sup>1</sup>, В.М. Говорун<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России; <sup>2</sup>ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; <sup>3</sup>НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва

Воздействие комменсальной микробиоты на организм человека исследуется все более полно с использованием инструментов омикс-технологий. В результате, в качестве терапии некоторых заболеваний, для которых показана связь с микробиотой кишечника, активно используется трансплантация фекальной микробиоты. Обнаружение действующих молекул, агентов взаимодействия, между организмом человека и его микробиотой, может стать важным шагом на пути к выяснению механизмов симбиоза для создания грамотной и эффективной терапии различных заболеваний.

Принимая во внимание повсеместное участие пептидов в биомолекулярных взаимодействиях и регуляторных процессах, мы провели поиск пептидных фрагментов белков микробиоты человека, циркулирующих в кровотоке. Был проведен LC-MS/MS анализ 123 образцов плазмы крови доноров, среди которых треть составили здоровые доноры, а остальные имели язвенный колит, болезнь Крона, синдром раздраженного кишечника или колоректальный рак. Анализ пептидов, выделенных из плазмы по ранее описанной методике, был проведен на масс-спектрометре Q Exactive HF-X Hybrid Quadrupole-Orbitrap и соотнесен с базой данных аннотированных белков микробиоты человека, согласно Human Microbiome Project. Абсолютное количественное определение с помощью масс-спектрометрического метода мониторинга множественных реакций подтвердило наличие бактериальных пептидов в кровотоке здоровых доноров в диапазоне от 0,1 нМоль/л до 1 мкМоль/л. Большинство пептидов коррелируют с бактериальным составом тонкой кишки и, вероятно, получены путем гидролиза мембранных белков бактерий трипсином, химотрипсином и пепсином – основными протеазами желудочно-кишечного тракта.

Среди пептидов, специфически идентифицированных у групп пациентов, оказались последовательности, ассоциированные, по литературным данным, с соответствующей патологией. Например, в крови пациентов с колоректальными раками были идентифицированы фрагменты FAD-зависимой оксидоредуктазы бактерии *Delftia acidovorans*, опубликованного ранее, потенциально нового онкомаркера. При сопоставлении результатов LC-MS/MS идентификации пептидов кровотока и анализа метагенома по данным секвенирования гена 16S рРНК, было показано совпадение по нескольким уникальным группам бактерий, ранее ассоциированным с патогенезом соответствующих заболеваний ЖКТ.

## IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CIRCULATING IN THE BLOODSTREAM POTENTIAL PEPTIDE AGENTS OF INTERACTION BETWEEN THE HUMAN BODY AND ITS MICROBIOTA

G.P. Arapidi<sup>1,2</sup>, V.A. Koss<sup>1</sup>, A.K. Voronina<sup>1</sup>, A.S. Urban<sup>1,2</sup>, V.O. Shender<sup>1,2</sup>, O.M. Ivanova<sup>1</sup>, V.A. Veselovsky<sup>1</sup>, E.I. Olekhovich<sup>1</sup>, K.M. Klimina<sup>1</sup>, V.M. Govorun<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency;

<sup>2</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences; <sup>3</sup>Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow

The impact of commensal microbiota on the human body is increasingly being studied using omics. As a result, fecal microbiota transplantation is actively used as a therapy for some diseases for which a connection with the intestinal microbiota has been shown. The discovery of active molecules, agents of interaction, between the human body and its microbiota, can be an important step towards elucidating the mechanisms of symbiosis for the creation of competent and effective therapy for various diseases.

Taking into account the ubiquitous participation of peptides in biomolecular interactions and regulatory processes, we searched for peptide fragments of human microbiota proteins circulating in the bloodstream. LC-MS/MS analysis was performed on 123 donor plasma samples, one third of which were healthy donors, and the rest had ulcerative colitis, Crohn's disease, irritable bowel syndrome or colorectal cancer. Peptides isolated from plasma using the previously described method were analyzed using a Q Exactive HF-X Hybrid Quadrupole-Orbitrap mass spectrometer and compared with the Human Microbiome Project annotated bacterial protein database. Absolute quantification using multiple reaction monitoring mass spectrometry confirmed the presence of bacterial peptides in the bloodstream of healthy donors in the range from 0.1 nmol/L to 1 μmol/L. Most peptides correlate with the bacterial composition of the small intestine and are likely to be obtained by hydrolysis of bacterial membrane proteins with trypsin, chymotrypsin, and pepsin – the main proteases of the gastrointestinal tract.

Among the peptides specifically identified in patient groups were sequences associated, according to literature data, with the corresponding pathology. For example, in the blood of patients with colorectal cancer, fragments of FAD-dependent oxidoreductase of the bacterium *Delftia acidovorans* were identified, a previously published potential new marker for colorectal cancer. When comparing the results of LC-MS/MS identification of bloodstream peptides and metagenome analysis based on 16S rRNA gene sequencing data, a match was shown for several unique groups of bacteria previously associated with the pathogenesis of the corresponding gastrointestinal diseases.

## МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ И МЕТОДЫ СИСТЕМНОЙ ИММУНОЛОГИИ

Г.А. Боcharов, Д.С. Гребенников, Р.С. Савинков

*Институт вычислительной математики им. Г.И. Марчука РАН, Сеченовский университет, Москва*

Применение математических моделей и методов в задачах системной иммунологии обусловлено, прежде всего, сложностью процессов иммунного реагирования, высокой размерностью компонент системы их сетевой структурой и нелинейной регуляцией [1, 2]. Критерием плодотворности математического моделирования в иммунологии является добавленное знание в понимании механизмов и закономерностей функционирования иммунной системы [3, 4]. На фоне развития разнообразных измерительных технологий изучения иммунной системы на различных уровнях регуляции открытой остается задача количественного описания и интеграции данных наблюдений в механизменные модели динамики инфекционных процессов. Нами разрабатываются элементы многомасштабного мульти-физического моделирования противовирусного иммунного ответа при инфекциях человека (SARS-CoV-2, HIV-1, вирусного гепатита) и экспериментальных животных (LCMV). Построены модели внутриклеточного жизненного цикла вирусов, пространственно-временной динамики иммунных процессов, структуры лимфатической системы. С помощью методов анализа чувствительности определены потенциальные мишени для терапии хронических вирусных инфекций на клеточном и системном уровнях [5].

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-11-00116.*

1. Bocharov G, Grebennikov D, Savinkov R. Multiphysics modelling of immune processes using distributed parameter systems. *Rus J Numer Anal Math Modelling* 2023, 38(5): 279-292/.
2. Grossman Z, Meyerhans A, Bocharov G. An integrative systems biology view of host-pathogen interactions: The regulation of immunity and homeostasis is concomitant, flexible, and smart. *Front Immunol.* 2023, 13:1061290.
3. Bocharov G, Casella V, Argilaguet J, Grebennikov D, Güerri-Fernandez R, Ludewig B, Meyerhans A. Numbers game and immune geography as determinants of coronavirus pathogenicity. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020, 10: 559209.
4. Bocharov G, Grebennikov D, Argilaguet J, Meyerhans A. Examining the cooperativity mode of antibody and CD8+ T cell immune responses for vaccinology. *Trends Immunol.* 2021, 42(10): 852-855.
5. Bocharov G, Grebennikov D, Cebollada Rica P, Domenjo-Vila E, Casella V., Meyerhans A. Functional cure of a chronic virus infection by shifting the virus–host equilibrium state. *Front Immunol.* 2022, 13: 904342.

## MATHEMATICAL MODELS AND METHODS FOR SYSTEMS IMMUNOLOGY

G.A. Bocharov, D.S. Grebennikov, R.S. Savinkov

*Marchuk Institute of Numerical Mathematics of the RAS, Sechenov University, Moscow*

Application of mathematical models and methods in systemic immunology is needed due to the complexity of the immune response processes, high dimensionality of the system components, their network structure and nonlinear regulation [1,2]. The fruitfulness of mathematical modelling in immunology is related to an added knowledge in understanding the regulatory mechanisms underlying the immune system functioning [3,4]. In spite of successful development of measuring technologies for studying the immune system at various resolution levels, the quantitative description and integration of observational data into mechanistic models of the dynamics of infectious processes remains a challenge. We develop elements of a multiscale multiphysical modelling of the antiviral immune response in human infections (SARS-CoV-2, HIV-1, viral hepatitis) and experimental animals (LCMV). These include models of the intracellular life cycle of viruses, the spatio-temporal dynamics of immune processes, and the lymphatic system. Potential targets for multimodal treatment of chronic viral infections at the cellular and systemic levels have been identified using sensitivity analysis methods [5].

*The study was funded by the Russian Science Foundation grant No. 23-11-00116.*

1. Bocharov G, Grebennikov D, Savinkov R. Multiphysics modelling of immune processes using distributed parameter systems. *Rus J Numer Anal Math Modelling* 2023, 38(5): 279-292/.
2. Grossman Z, Meyerhans A, Bocharov G. An integrative systems biology view of host-pathogen interactions: The regulation of immunity and homeostasis is concomitant, flexible, and smart. *Front Immunol.* 2023, 13:1061290.
3. Bocharov G, Casella V, Argilaguet J, Grebennikov D, Güerri-Fernandez R, Ludewig B, Meyerhans A. Numbers game and immune geography as determinants of coronavirus pathogenicity. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020, 10: 559209.
4. Bocharov G, Grebennikov D, Argilaguet J, Meyerhans A. Examining the cooperativity mode of antibody and CD8+ T cell immune responses for vaccinology. *Trends Immunol.* 2021, 42(10): 852-855.
5. Bocharov G, Grebennikov D, Cebollada Rica P, Domenjo-Vila E, Casella V., Meyerhans A. Functional cure of a chronic virus infection by shifting the virus–host equilibrium state. *Front Immunol.* 2022, 13: 904342.

## ЭВОЛЮЦИОННЫЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ В ТКАНЯХ КАРЦИНОМ РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЙ

**Р.А. Иванов, Д.А. Афонников, Ю.Г. Матушкин, С.А. Лашин**

*Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*

Карциномы – один из самых распространенных видов рака, поражающих различные органы. Понимание их эволюционного происхождения и связи с функциональной ролью генов, связанных с этими заболеваниями, важно для разработки новых методов диагностики и лечения. В нашем исследовании мы рассчитали эволюционные индексы транскриптома для изучения активного эволюционного возраста генов на разных патологических стадиях карцином человека при помощи филогенетики. Этот метод направлен на определение эволюционного происхождения генов путем анализа присутствия их гомологов у различных видов и позволяет выявить ключевые моменты в эволюции генома, в которых наблюдался резкий рост числа новых генов, отражающий его в филогенетических индексах возраста (PAI). Расчет эволюционных индексов транскриптома (TAI) объединяет данные об эволюционном происхождении генов, полученные с помощью филогенетики и данными об уровне экспрессии генов. Это позволяет исследовать взаимосвязь между давностью возникновения генов и изменениями в их активности в контексте прогрессии карцином.

В данном исследовании мы проводили анализ данных по экспрессии генов в тканях 9 типов карцином и соответствующих им образцов здоровых тканей из базы данных TCGA. В каждом из исследуемых типов раковых тканей были выделены опухоли 4 патологических стадий. Филогенетический анализ, проведенный с помощью инструмента OrthoWeb, выявил два пика представленности дифференциально экспрессирующихся генов: на ранних этапах возникновения многоклеточности и на этапе возникновения позвоночных (PAI = 3 и 6). Анализ эволюционных индексов транскриптома показал изменения в возрасте транскриптома на разных стадиях развития некоторых опухолей. Было отмечено повышение возраста транскриптома в ранних и поздних стадиях развития карцином, и его понижение в промежуточных, с особыми отличиями в аденокарциномах кишечника, где наблюдается противоположная картина. Также было обнаружено, что здоровые ткани демонстрируют более высокий возраст транскриптома по сравнению с раковыми, что может свидетельствовать о повышенной активации древних генов при онкологических заболеваниях.

*Финансирование: Исследование выполнено при поддержке бюджетного проекта FWNR-2022-0006.*

## EVOLUTIONARY APPROACH TO THE STUDY OF DIFFERENTIAL EXPRESSION IN TISSUES OF CARCINOMAS OF VARIOUS STAGES

**R. Ivanov, D. Afonnikov, Y. Matushkin, S. Lashin**

*Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk*

Carcinomas are among the most common types of cancer affecting various human organs. Understanding their evolutionary origins and the functional roles of genes associated with these diseases is crucial for the development of new diagnostic and therapeutic methods. In our study, we calculated evolutionary transcriptome indices to investigate the active evolutionary age of genes at different pathological stages of human carcinomas using the phylostratigraphy. This method aims to determine the evolutionary origin of genes by analyzing the presence of their homologs in different species, which allows identifying key moments in genome evolution marked by a sharp increase in the number of new genes, reflected in phylostratigraphic age indices (PAI). The calculation of transcriptome evolutionary indices (TAI) combines data on the evolutionary origin of genes obtained through phylostratigraphy with gene expression level data. This allows the investigation of the relationship between the age of gene emergence and changes in their activity in the context of carcinoma progression. In this study, we analyzed gene expression data in tissues from 9 types of carcinomas and corresponding healthy tissues from the TCGA database. Tumors from each type of cancer tissue were categorized into 4 pathological stages as the tumor progressed. Phylostratigraphic analysis conducted using the OrthoWeb tool revealed two peaks in the representation of differentially expressed genes: during the early stages of multicellularity and at the emergence of vertebrates (PAI=3 and 6). Analysis of evolutionary indices of the transcriptome revealed changes in transcriptome age at different stages of tumor development. An increase in transcriptome age was noted in the early and late stages of carcinoma development, with a decrease in intermediate stages, showing particular distinctions in intestinal adenocarcinomas, where an opposite pattern was observed. Additionally, it was discovered that healthy tissues demonstrate a higher transcriptome age compared to cancerous ones, which may indicate increased activation of ancient genes in oncological diseases.

*Funding: The study was supported by the Budget Project FWNR-2022-0006 of the Ministry of Science and Higher Education of The Russian Federation.*

## ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ КАК ИСТОЧНИК ДИАГНОСТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ОНКОЗАБОЛЕВАНИЙ

**В.Г. Згода, Н.А. Соловьева, С.Е. Новикова, Т.Е. Фарафонова, О.В. Тихонова**

*НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва*

Внеклеточные везикулы (ВнВ) опухолевого происхождения, включая экзосомы, нагружены белками, которые являются «зеркальным отражением» протеома клетки-продуцента. ВнВ обнаруживаются в различных биологических жидкостях, в том числе в плазме крови. Исследование белкового состава ВнВ представляет большой интерес для поиска новых диагностических, предиктивных и прогностических маркеров. Колоректальный рак (КРР) и рак легких (РЛ) лидируют по распространенности и смертности в мире.

Используя клеточные линии РЛ и КРР в качестве модели, мы выполнили масс-спектрометрическое профилирование без использования стабильных изотопных меток для 850 белков ВнВ. На основании этих данных была разработана методика мониторинга выбранных реакций с использованием стабильных изотопно-меченых пептидных стандартов (SRM/SIS) для 36 протеотипических пептидов, картируемых на 28 ВнВ-ассоциированных белков, в том числе и на общепринятые маркеры ВнВ (CD82, CD81, CD9, CD63 и HSPA8).

По результатам SRM/SIS анализа в плазме крови, полученной от 34 пациентов с РЛ и от 23 здоровых добровольцев, были обнаружены 7 белков (FN1, HSPA8, TLN1, ITGB3, TUBA4A, PACSIN2 и TSG101), содержание которых различалось в образцах плазмы крови больных РЛ и здоровых людей. Анализ SRM/SIS, осуществленный в образцах ВнВ, выделенных из плазмы крови, полученной от 11 пациентов с КРР и от 20 здоровых добровольцев, позволил определить 10 белков FN1, TLN1, ITGB3, HSPA8, TUBA4A, CD9, CD63, HSPG2, ITGB1 и GNAI2, позволяющих отличить образцы больных с КРР от здорового контроля.

Полученные результаты указывают на значимость протеомного груза ВнВ как источника потенциальных биомаркеров. В дальнейшем планируется расширение SRM/SIS панели для повышения специфичности, а также валидация на больших когортах пациентов.

Масс-спектрометрический анализ и хранение данных проводили на оборудовании Центра «Протеом человека» (ИБМХ).

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

## EXTRACELLULAR VESICLES AS A SOURCE OF CANCER DIAGNOSTIC MARKERS

**V.G. Zgoda, N.A. Solovyeva, S.E. Novikova, T.E. Farafonova, O.V. Tikhonova**

*Institute of Biomedical Chemistry, Moscow*

Tumor-derived extracellular vesicles (EVs), including exosomes, are packed with proteins that are a "mirror image" of the producing cell's proteome. EVs are found in various biological fluids, including blood plasma. The investigation of the protein composition of EVs is of great interest in the search for novel diagnostic, predictive, and prognostic markers. Lung cancer (LC) and colorectal cancer (CRC) are the two most common and leading causes of cancer death worldwide.

Using the LC and CRC cell lines as a model, we performed mass spectrometric profiling without stable isotope labelling for 850 EVs proteins. Based on the data obtained, we have developed a method for monitoring selected reactions using stable isotope-labeled peptide standards (SRM/SIS) for 36 proteotypic peptides mapped on 28 EVs-associated proteins, including the generally accepted markers of EVs (CD82, CD81, CD9, CD63 and HSPA8).

Seven proteins (FN1, HSPA8, TLN1, ITGB3, TUBA4A, PACSIN2, and TSG101) were identified in blood plasma samples from 34 patients with lung cancer and 23 healthy volunteers, based on the results of SRM/SIS analysis. The contents of these proteins varied between the two groups of blood plasma samples. Ten proteins - FN1, TLN1, ITGB3, HSPA8, TUBA4A, CD9, CD63, HSPG2, ITGB1, and GNAI2 - were identified through the SRM/SIS analysis performed on the extracellular vesicles (EVs) isolated from blood plasma of 11 patients with colorectal cancer (CRC) and 20 healthy volunteers. This allowed us to differentiate between samples from CRC patients and those from healthy controls.

The results obtained highlight the importance of EVs' proteome load as a possible source of biomarkers. The SRM/SIS panel will be expanded in the future to improve specificity and validate on sizable patient cohorts.

Data storage and mass spectrometric analysis were carried out using the Human Proteome Center's (IBMC) equipment.

*The work is done in the framework of the Russian Federation's long-term (2021–2030) fundamental scientific research program (No. 122030100168-2).*

### ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ МЕЖКЛЕТОЧНОЙ КОММУНИКАЦИИ В РАЗВИТИИ ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ЯИЧНИКА

В.О. Шендер<sup>1,2</sup>, П.В. Шнайдер<sup>1</sup>, К.С. Ануфриева<sup>1</sup>, Г.П. Арапиди<sup>1,2</sup>, О.М. Иванова<sup>1</sup>, М.С. Павлюков<sup>1,2</sup>, М.А. Лагарькова<sup>1</sup>, В.М. Говорун<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России; <sup>2</sup>ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; <sup>3</sup>НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва

Рак яичника часто развивает резистентность к традиционной химиотерапии, что снижает ее эффективность. Используя парные асциты от пациентов с аденокарциномой яичника, полученные до и после химиотерапии, и секретомы, индуцированные терапией *in vitro* (TIS), мы показали, что молекулы, секретируемые погибающими опухолевыми клетками во время терапии, способствуют резистентности к цисплатину и усиливают восстановление повреждений ДНК в реципиентных опухолевых клетках. Даже кратковременная инкубация опухолевых клеток с TIS приводит к схожим эффектам, которые мы наблюдали в первичных культурах резистентных опухолевых клеток, полученных от пациентов после нескольких курсов химиотерапии.

Используя омиксные технологии, мы обнаружили, что как *ex vivo*, так и *in vitro* TIS обогащены сплайсосомными компонентами, которые перемещаются из ядра в цитоплазму и затем во внеклеточные везикулы во время индукции апоптоза. Было показано, что эти молекулы воспроизводят фенотипические эффекты секретомов, индуцированных терапией. Сверхэкспрессия сплайсосомных белков (SNU13, SYNCRIP) способствует резистентности к терапии, в то время как мяРНК U12 и U6atac стимулируют рост опухоли. Эти результаты демонстрируют значимость межклеточной коммуникации во время терапии и дополнительно подчеркивают, что внеклеточная сигнализация может быть ключевым фактором, способствующим возникновению резистентности к терапии опухолей.

*Работа поддержана грантом РФФ 22-15-00462.*

### THERAPY-INDUCED INTERCELLULAR COMMUNICATION: ROLE IN CHEMORESISTANCE FORMATION OF OVARIAN CANCER CELLS

V.O. Shender<sup>1,2</sup>, P.V. Shneider<sup>1</sup>, K.S. Anufrieva<sup>1</sup>, G.P. Arapidi<sup>1,2</sup>, O.M. Ivanova<sup>1</sup>, M.S. Pavlukov<sup>1,2</sup>, M.A. Lagarkova<sup>1</sup>, V.M. Govorun<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical and Biological Agency; <sup>2</sup>Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences; <sup>3</sup>Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow

Ovarian cancer (OC) often develops resistance to conventional therapy, hampering its effectiveness. Here, using paired OC ascites obtained before and after chemotherapy and *in vitro* therapy-induced secretomes (TIS), we show that molecules secreted by OC cells upon therapy promote cisplatin resistance and enhance DNA damage repair in recipient cancer cells.

Using omics techniques, we find that both *ex vivo* and *in vitro* TIS are enriched with spliceosomal components, which relocate from the nucleus to the cytoplasm and subsequently into extracellular vesicles upon apoptosis induction. We demonstrate that these molecules substantially contribute to the phenotypic effects of TIS. Overexpression of spliceosomal proteins (SNU13, SYNCRIP) promote therapy resistance, while U12 and U6atac snRNAs stimulate tumor growth. These findings demonstrate the significance of intercellular communication during therapy and further highlight that extracellular signaling might be a key factor contributing to the emergence of OC therapy resistance.

*The work was supported by the RSF grant 22-15-00462.*

## ИНЖЕНЕРИЯ ЛИГАНД-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ ПРИ ПОМОЩИ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ

**А.С. Николаев, Я.А. Орлов, Д.А. Лунегова, Н.С. Случанко, И.Ю. Гущин**

*Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный*

Недавние достижения в области методов машинного обучения привели к разработке множества новых подходов для инженерии и дизайна белков. Один из таких подходов, ProteinMPNN, предсказывает аминокислотную последовательность, которая наиболее вероятно сложится в заданную пользователем структуру белка. Этот алгоритм может быть применен для поиска новых аминокислотных последовательностей – как для уже существующих в природе белковых конформаций (реинжиниринг), так и для тех, которые были созданы искусственно (*de novo* белковый дизайн). Особо интригующим остаётся вопрос, можно ли использовать ProteinMPNN для получения термостабильных, растворимых и легко экспрессируемых аналогов природных лиганд-связывающих белков посредством реинжиниринга.

Для этого мы применили ProteinMPNN для реинжиниринга трех разных лиганд-связывающих белков - растворимого, периферического и трансмембранного. Во-первых, нам удалось получить три аналога флавин-связывающего флуоресцентного белка CagFbFP. Несмотря на то, что они были лишь на 55–66% идентичны исходному белку, они были функциональны, показали высокую термостабильность и имели фотофизические свойства, аналогичные оригинальному белку. Во-вторых, нам удалось создать растворимый аналог мембранного ретиналь-связывающего белка бактериородопсина, который связывает ретиналь и имеет характерный спектр поглощения, аналогичный исходному белку. Наконец мы обнаружили, что ProteinMPNN имеет ограниченную применимость для белков, структуры которых были определены с помощью метода ЯМР. Чтобы устранить это ограничение, мы разработали специальный протокол применения ProteinMPNN к таким структурам и протестировали его на примере белка AstaPo1, участвующего в транспорте каротиноидов. Один из полученных нами аналогов был на 51 аминокислоту короче и имел всего лишь 38% идентичности исходному белку. Тем не менее, данный аналог был способен извлекать каротиноиды из мембраны и переносить их к другим растворимым белкам-реципиентам, подобно исходному белку.

Наши результаты показывают, что ProteinMPNN может быть использован для создания разнообразных функциональных аналогов природных лиганд-связывающих белков с высокой вероятностью успеха, а также демонстрируют возможность применения ProteinMPNN к белкам, структура которых получена с помощью ЯМР-спектроскопии.

*Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 21-64-00018.*

## NEURAL NETWORK-BASED ENGINEERING OF LIGAND-BINDING PROTEINS

**A.S. Nikolaev, Ya.A. Orlov, D.A. Lunegova, N.N. Sluchanko, I.Yu. Gushchin**

*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*

Recent advances in machine learning techniques have led to development of numerous new approaches to protein design and engineering. One such approach, ProteinMPNN, predicts the amino acid sequence most likely to fold into a user-defined protein structure. This neural network can be applied to find novel amino acid sequences for protein folds that already exist in nature (reengineering) or for those generated artificially (*de novo* protein design). A particularly intriguing question is whether ProteinMPNN can be utilized to produce thermostable, soluble, and easily expressed analogs of natural ligand-binding proteins through reengineering.

To explore this question, we used ProteinMPNN to reengineer several proteins with varying functions and solubility. First, we successfully obtained three analogs of the soluble flavin-binding protein CagFbFP. Although these analogs were only 55%-66% identical to the original protein, they were functional (fluorescent), demonstrated high thermostability, and exhibited photophysical properties similar to those of the original. Second, we managed to create a soluble analog of a membrane retinal-binding protein bacteriorhodopsin, which binds retinal and displays a characteristic absorption spectrum. Finally, we observed that ProteinMPNN has limited applicability for proteins whose structures were determined by NMR spectroscopy. To address this limitation, we developed a specialized protocol for applying ProteinMPNN to NMR-derived structures. We validated this new protocol using the AstaPo1 protein, which is involved in carotenoid transport. One of the AstaPo1 analogs we obtained was 51 amino acids shorter and exhibited only 38% identity to the original protein. Nevertheless, this variant was capable of extracting carotenoids from the membrane and transporting them to other soluble proteins, similar to the original AstaPo1 protein.

Our results demonstrate that ProteinMPNN can be used to generate diverse functional variants of ligand-binding proteins with high success rate and pave the way for MPNN-based modification of proteins based on NMR-derived structures.

*The study was supported by the Russian Science Foundation, grant number 21-64-00018.*

## РОЛЬ E3-УБИКВИТИНЛИГАЗЫ TRIM29 В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ TP63-ЗАВИСИМЫХ ГЕНОВ

Р.И. Султанов<sup>1</sup>, А.С. Суздальенко<sup>2</sup>, А.С. Мулюкина<sup>2</sup>, О.А. Зубкова<sup>2</sup>, К.С. Климина<sup>1</sup>, А.Н. Богомазова<sup>2</sup>, М.А. Лагарькова<sup>1</sup>, Г.П. Арапиди<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России; <sup>2</sup>ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России;

<sup>3</sup>ГНЦ РФ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Регуляция развития базального эпителия – сложный процесс, который находится под контролем многих транскрипционных факторов. Хорошо известно, что TP63 – один из членов белкового семейства p53, играет ключевую роль в регуляции экспрессии генов базального фенотипа. Несмотря на длительную историю исследований TP63, его функции остаются не до конца изученными. В отличие от TP53, TP63 обладает меньшей аффинностью к своему мотиву связывания с ДНК. Необходимая специфичность связывания с регуляторными элементами обеспечивается большим количеством белков-партнеров TP63. Часто, именно белки-партнеры определяют транскрипционную программу TP63.

На основе анализа данных секвенирования РНК, метилирования ДНК и больших геномных перестроек мы предсказали, что E3-убиквитинлигаза TRIM29 может являться одним из ключевых регуляторов транскрипционной программы TP63. С использованием клеточных моделей мы показали, что TRIM29 изменяет транскрипционную программу TP63. Сверхэкспрессия TRIM29 не приводит к увеличению представленности TP63 в клетке, однако TRIM29 связывается с TP63 напрямую и увеличивает стабильность TP63 при генотоксических стрессах, препятствуя его протеосомальной деградации. Более того было показано, что TRIM29 ко-локализуется с TP63 на хроматине, и локусы совместного связывания TP63 и TRIM29 обогащены генами, специфичными для базального эпителия. Таким образом, можно сделать вывод, что TRIM29 стабилизирует TP63 непосредственно на хроматине.

В этой работе на основе открытых данных мы предсказали новый ко-регулятор TP63 – E3-убиквитинлигазу TRIM29 и попробовали объяснить молекулярный механизм, благодаря которому TRIM29 регулирует активность TP63. Мы экспериментально показали, что TRIM29 стабилизирует TP63 и блокирует его протеосомальную деградацию. Также мы показали, что TRIM29 связывается с TP63 непосредственно на хроматине и регулирует экспрессию TP63-зависимых генов. Однако стабилизация TP63 не объясняет все эффекты, которые наблюдаются при экспрессии TRIM29, что оставляет пространство для дальнейшего исследования взаимодействия этих белков.

*Работа была поддержана грантом Министерства науки и высшего образования 075-15-2019-1669.*

## E3-UBIQUITIN LIGASE TRIM29 REGULATES EXPRESSION OF TP63-DEPENDENT GENES

R. Sultanov<sup>1</sup>, A. Suzdalenko<sup>2</sup>, A. Mulyukina<sup>2</sup>, O. Zubkova<sup>2</sup>, K. Klimina<sup>1</sup>, A. Bogomazova<sup>2</sup>, M. Lagarkova<sup>1</sup>, G. Arapidi<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Lopukhin FRCC of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical-Biological Agency; <sup>2</sup>Lopukhin FRCC of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical-Biological Agency; <sup>3</sup>Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

The regulation of basal epithelial development is a complex process governed by numerous transcription factors. It is well established that TP63, a member of the p53 protein family, plays a pivotal role in regulating the expression of basal phenotype genes. Despite the extensive history of TP63 research, its functions remain incompletely understood. Unlike TP53, TP63 exhibits a lower affinity for its DNA binding motif. The necessary specificity of binding to regulatory elements is facilitated by a multitude of TP63 partner proteins, which often determine the transcriptional program of TP63.

Through the analysis of RNA sequencing data, DNA methylation patterns, and large genomic rearrangements, we predicted that the E3 ubiquitin ligase TRIM29 may serve as a key regulator of the TP63 transcriptional program. Using cellular models, we demonstrated that TRIM29 modulates the transcriptional program of TP63. Notably, TRIM29 overexpression does not increase TP63 abundance within the cell; rather, TRIM29 directly binds to TP63 and enhances its stability under genotoxic stress by preventing proteasomal degradation. Furthermore, TRIM29 was found to colocalize with TP63 on chromatin, and loci co-bound by TP63 and TRIM29 were enriched with genes specific to the basal epithelium. Consequently, it can be concluded that TRIM29 directly stabilizes TP63 on chromatin.

In this study, based on publicly available data, we identified a novel TP63 co-regulator, the E3 ubiquitin ligase TRIM29, and sought to elucidate the molecular mechanism through which TRIM29 regulates TP63 activity. Our experimental results demonstrate that TRIM29 stabilizes TP63 and inhibits its proteasomal degradation. We also showed that TRIM29 binds directly to TP63 on chromatin and regulates the expression of TP63-dependent genes. However, the stabilization of TP63 does not account for all observed effects following TRIM29 expression, indicating the need for further investigation into the interaction between these proteins.

*The work was supported by the grant of the Ministry of Science and Higher Education 075-15-2019-1669*

## ПОЛУЧЕНИЕ НОВЫХ ВАРИАНТОВ ТЕРМИНАЛЬНОЙ ДЕОКСИНУКЛЕОТИДИЛ ТРАНСФЕРАЗЫ ДЛЯ ЭНЗИМАТИЧЕСКОГО ОЛИГОНУКЛЕОТИДНОГО СИНТЕЗА

**И.А. Никитеев<sup>1</sup>, Ю.Е. Кузьмина<sup>1</sup>, К.Ф. Зайнуллин<sup>1</sup>, О.Г. Максименко<sup>2</sup>, М.П. Шевелева<sup>3</sup>, А.А. Вологжанникова<sup>3</sup>,  
О.В. Федоров<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва; <sup>2</sup>Институт биологии гена РАН, Москва; <sup>3</sup>Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН, обособленное подразделение ФИЦ "Пушчинский научный центр биологических исследований РАН", Пушкино*

Терминальная деоксинуклеотидил трансфераза (TdT), катализирующая реакцию присоединения нуклеотидтрифосфатов к одноцепочечной ДНК, привлекает внимание исследователей как наиболее перспективный фермент для разработки на его основе технологического решения по энзиматическому синтезу олигонуклеотидов. Посредством насыщающего итеративного мутагенеза нами были получены новые, более стабильные варианты терминальной деоксинуклеотидил трансферазы. Выбор положений последовательности для получения библиотек мутантных вариантов происходил посредством анализа и сопоставления нескольких метрик и эвристик, таких как B-factor, расчетных данных по энергиям Гиббса, а также метрик, реализованных в программном пакете FoldIT. Предложена методика скрининга термостабильности в лизатах, и с ее помощью были изучены библиотеки мутантных вариантов TdT. Прирост термостабильности наиболее удачных вариантов подтвержден методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) и дифференциальной сканирующей флуориметрии (Tycho). Реализован подход включающий рациональный структурный дизайн более протяженных фрагментов последовательности исходного белка дикого типа. Был получен вариант TdT без петли Loop 2, подтверждена его активность на одноцепочечном ДНК-субстрате, а также измерена его термостабильность методами ДСК и Tycho.

## NEW ENGINEERED VARIANTS OF TERMINAL DEOXYNUCLEOTIDYL TRANSFERASE FOR APPLICATIONS IN ENZYMAIC OLIGOSYNTHESIS.

**I.A. Nikiteev<sup>1</sup>, Yu.E. Kuzmina<sup>1</sup>, K.F. Zaynullin<sup>1</sup>, O.G. Maksimenko<sup>2</sup>, M.P. Shevelyova<sup>3</sup>, A.A. Vologzhannikova<sup>3</sup>, O.V. Fedorov<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow; <sup>2</sup>Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow; <sup>3</sup>Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, Institute for Biological Instrumentation, Pushchino*

Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) is an enzyme, that catalyzes addition of nucleotide triphosphates to single strand DNA in template independent manner, which renders it as a perspective enzyme to be used in hypothetical enzymatic oligonucleotide synthesizer prototype. Iterative Saturation Mutagenesis methodology was used to identify new stable variants of TdT. The exact positions of amino acid sequence were chosen for screening, based on analysis of several metrics, such as B-factor and estimated Gibbs energy of mutated variants. We developed a method of screening TdT activity in cell lysates, and applied it for screening of libraries of mutant TdT variants. Rise in thermostability was validated by differential scanning calorimetry (DSC) and differential scanning fluorometry (Tycho). In our deletion analysis we prepared a mutant TdT with excised Loop 2 moiety, tested it DNA independent DNA polymerase activity and measured its thermostability by DSC and DSF (Tycho).



## ВИРТУАЛЬНАЯ КЛЕТКА

**Ф.А. Колпаков, И.Р. Акбердин, И.Н. Киселев, С.К. Колмыков, П.Ю. Кондрахин, М.А. Куляшов, Е.О. Кутумова, С.Н. Новиков**

*Университет "Сириус", г.т. Сириус, Россия*

В данном проекте предлагается новый подход, который можно представить в виде пирамиды (по убыванию объема данных):

1. исходные омиксные данные;
2. их анализ и интеграция данных;
3. мета-анализ;
4. математическая модель (виртуальная клетка).

В идеале построенная модель виртуальной клетки должна с достаточной точностью воспроизводить полученные экспериментальные омиксные данные для заданного типа клетки (клеточной линии) человека: – уровень экспрессии генов (транскриптомика); – количество белков (протеомика); – количество метаболитов (метаболомика).

Разработанная модель виртуальной клетки, верифицированная на таком разнообразии омиксных данных, послужит основой для проведения экспериментов *in silico*, направленных на создание современной рациональной стратегии по фундаментальному пониманию и улучшению целевых свойств исследуемых культур клеток и даже целых организмов.

Создаваемая компьютерная модель – виртуальная клетка – разрабатывается с использованием следующих подходов, реализованных в платформе BioUML:

(1) модульный подход – подсистемы описываются отдельными подмоделями (блоками). Взаимодействие блоков моделируется связями между переменными модулей, которые указывают на пути передачи сигналов между ними. Модули представляют собой математические модели различных подсистем, также они могут содержать целые модульные модели, составляя иерархическую структуру. Данный подход позволяет сочетать в одной модели несколько уровней описания биологических систем и исследовать взаимодействие как различных подсистем, так и уровней организации системы, модели которых могут быть разработаны отдельно различными группами исследователей;

(2) визуальное моделирование – математическая модель создается и редактируется как графическая диаграмма. Разрабатываемая модель включает в себя следующие основные модули: – модуль транскрипции; – модуль трансляции; – модуль деградации белков; – модуль метаболизма (представлен в виде потоковых моделей) + модули гликолиза, цикла Кребса, глюконеогенеза (в виде систем обыкновенных дифференциальных уравнений); – отдельные сигнальные пути.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-14-20031, <https://rscf.ru/project/24-14-2>.*

## THE VIRTUAL CELL

**F.A. Kolpakov, I.R. Akberdin, I.N. Kiselev, S.K. Kolmykov, P.Yu. Kondrakhin, M.A. Kulyashov, E.O. Kutumova, S.N. Novikov**  
*Sirius University of Science and Technology, Sirius, Russia*

This project proposes a new approach that can be represented as a pyramid (in descending order of data volume):

1. initial omics data;
2. their analysis and data integration;
3. meta-analysis;
4. mathematical model (virtual cell).

Ideally, the constructed virtual cell model should accurately reproduce the obtained experimental omics data for a given human cell type (cell line): – level of gene expression (transcriptomics); – amount of proteins (proteomics); – amount of metabolites (metabolomics).

The developed virtual cell will be verified on a variety of omics data and will serve as the basis for conducting *in silico* experiments aimed at creating a modern rational strategy for fundamental understanding and improvement of properties of the studied cell cultures and even entire organisms.

This computer model is being developed using the following approaches implemented in the BioUML platform:

(1) modular approach – subsystems are described by separate submodels (blocks). The interaction of blocks is modelled by links between the variables of modules, which indicate the paths of signal transmission between them. Modules represent mathematical models of various subsystems, and they can also contain entire module models, forming a hierarchical structure. This approach allows combining in one model several levels of description of biological systems and studying the interaction of both different subsystems and levels of system organisation, the models of which can be developed separately by different groups of researchers.

(2) visual modelling – a mathematical model is created and edited as a graphical diagram. The developed model includes the following main modules: – transcription module; – translation module; – module of protein degradation; – metabolism module (represented in the form of flow models) + modules of glycolysis, Krebs cycle, gluconeogenesis (in the form of systems of ordinary differential equations); – individual signalling pathways.

*The study was financially supported by the Russian Science Foundation (project No 24-14-20031, <https://www.rscf.ru/en/project/24-14-20031/>).*

## СОВМЕЩЕННЫЕ МОДЕЛИ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ, ЭКОНОМИЧЕСКИХ И СОЦИАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ: ИТ-ПЛАТФОРМА И БОЛЬШИЕ ДАННЫЕ

**О.И. Криворотко, С.И. Кабанихин, Н.Ю. Зятьков, Г.Д. Каминский**

*Институт математики им. С.Л. Соболева СО РАН, Новосибирск, Россия*

Математическое моделирование и прогнозирование эпидемий инфекционных заболеваний (COVID-19, туберкулез, ВИЧ и др.) требует использование информации о связанных социально-экономических процессах [1]. В докладе предлагаются совмещенные модели эпидемиологических, экономических и социальных процессов, основанные на регрессионном анализе ((S)ARIMA, главных компонент), машинного обучения (полносвязные, генеративно-состязательные, физически-информированные нейронные сети) [2], дифференциальных (SIR-модели) [1], агентно-ориентированных моделях [3] и оптимальном управлении (игры среднего поля) [4]. Алгоритмы построения совмещенных моделей основываются на методах обработки больших данных (в основном, временных рядов), решения обратных задач [1] и анализе чувствительности.

Разработанные алгоритмы и математические модели лежат в основе ИТ-платформы по сбору и обработке данных, моделированию и построению сценариев распространения инфекционных заболеваний (COVID-19, туберкулез, ВИЧ) в регионах РФ и странах СНГ. Пользователь, используя предлагаемые модели, временные интервалы и данные, может выбрать оптимальную комбинацию для изучения динамики распространения инфекционного заболевания в регионе и разработке оптимального сценария действий населения и органов власти.

*Работа выполнена в рамках государственного задания Института математики им. С.Л. Соболева СО РАН, проект FWNF-2024-0002 «Обратные некорректные задачи и машинное обучение в биологических, социально-экономических и экологических процессах».*

1. Krivorotko O, Kabanikhin S. Artificial intelligence for COVID-19 spread modeling. *J Inverse Ill-Posed Probl.* 2024, 32(2): 297-332.
2. Криворотко О.И., Зятьков Н.Ю., Кабанихин С.И. Моделирование эпидемий: нейросеть на основе данных и SIR-модели. *Журнал вычислительной математики и математической физики* 2023, 63(10): 1733-1746.
3. Krivorotko O, Sosnovskaia M, Vashchenko I, Kerr C, Lesnic D. Agent-based modeling of COVID-19 outbreaks for New York state and UK: parameter identification algorithm. *Inf Dis Modelling* 2022, 7: 30-44.
4. Petrakova V, Krivorotko O. Mean field game for modeling of COVID-19 spread. *J Math Anal Appl.* 2022, 514: 126271.

## COMBINED MODELS OF EPIDEMIOLOGICAL, ECONOMIC AND SOCIAL PROCESSES: IT PLATFORM AND BIG DATA

**O.I. Krivorotko, S.I. Kabanikhin, N.Yu. Zyatkov, G.D. Kaminskiy**

*Sobolev Institute of Mathematics SB RAS, Novosibirsk, Russia*

Mathematical modeling and forecasting of infectious disease epidemics (COVID-19, tuberculosis, HIV, etc.) requires the use of information on related socio-economic processes [1]. The report proposes combined models of epidemiological, economic and social processes based on regression analysis ((S)ARIMA, principal component analysis), machine learning (fully connected, generative adversarial, physically-informed neural networks) [2], differential (SIR models) [1], agent-based models [3] and optimal control (mean field games) [4]. Algorithms for constructing combined models are based on methods of processing big data (mainly time series), solving inverse problems [1] and sensitivity-based identifiability analysis.

The developed algorithms and mathematical models form the basis of the IT platform for collecting and processing data, modeling and constructing scenarios for the spread of infectious diseases (COVID-19, tuberculosis, HIV) in the regions of the Russian Federation and other countries. Using the proposed models, time intervals and data, the user can choose the optimal combination to study the dynamics of the spread of an infectious disease in the region and develop an optimal scenario for the actions of the population and authorities.

*The work was carried out within the framework of the state assignment of the Sobolev Institute of Mathematics SB RAS, project FWNF-2024-0002 "Inverse ill-posed problems and machine learning in biological, socio-economic and environmental processes".*

1. Krivorotko O, Kabanikhin S. Artificial intelligence for COVID-19 spread modeling. *J Inverse Ill-Posed Probl.* 2024, 32(2): 297-332.
2. Криворотко О.И., Зятьков Н.Ю., Кабанихин С.И. Моделирование эпидемий: нейросеть на основе данных и SIR-модели. *Журнал вычислительной математики и математической физики* 2023, 63(10): 1733-1746.
3. Krivorotko O, Sosnovskaia M, Vashchenko I, Kerr C, Lesnic D. Agent-based modeling of COVID-19 outbreaks for New York state and UK: parameter identification algorithm. *Inf Dis Modelling* 2022, 7: 30-44.
4. Petrakova V, Krivorotko O. Mean field game for modeling of COVID-19 spread. *J Math Anal Appl.* 2022, 514: 126271.

#### МИНИМАЛЬНАЯ КЛЕТКА: РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА ЗА СЧЕТ ИЗМЕНЕНИЯ РАЗМЕРОВ

Д.С. Матюшкина<sup>1</sup>, А.А. Лазарева<sup>1</sup>, Е.А. Васильева<sup>1</sup>, П.В. Башкиров<sup>1</sup>, Т.С. Сапега<sup>1</sup>, С.В. Сизова<sup>1,2</sup>, А.В. Залыгин<sup>2</sup>, И.О. Бутенко<sup>1</sup>, В.М. Говорун<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора; <sup>2</sup>ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Основным движущим процессом в клетке является ее метаболизм, и его тонкая настройка обеспечивает максимальные адаптивные возможности. В таких редуцированных бактериях как микоплазмы, представляющих собой модель минимальной клетки, метаболизм представлен примерно 280 метаболическими реакциями, а количество транскрипционных регуляторов на порядок меньше, чем в *E. coli*, но несмотря на это, данные бактерии способны выживать в большом диапазоне стрессовых воздействий, что дает повод предположить о существовании в этих простых клетках более универсального механизма быстрой подстройки метаболизма для реакции на окружающие условия.

В ходе исследования на модели взаимодействия *Mycoplasma gallisepticum* S6 с клеткой-хозяином (линия HD3) с помощью электронной микроскопии (Zeiss Merlin) мы наблюдали уменьшение размера клеток в 1,2–1,5 раза по сравнению с контролем, а также потерю tip-органеллы, структуру которой в основном составляют VlhA антигены. Падение уровня VlhA подтверждает и проведенный протеомный анализ (OrbiTrap Exploris 480, Thermo). Кроме того, микоплазма, изолированная из эукариотических клеток, росла медленнее, чем до заражения. Проведенный ВЭЖХ-МС метаболомный анализ (Shimadzu, Япония) показал в таких клетках накопление фосфоенолпирувата, а количество АТФ почти в 2,5 раза падало.

Для анализа универсальности такой реакции размеры клеток микоплазмы были проанализированы в других стрессовых воздействиях: осмотический, перекисный и тепловой шоки, длительное голодание. Измерение размеров осуществлялось методом динамического рассеяния света (ДРС) (Brookhaven Instrument 90Plus Particle Size Analyzer) и детекцией скачков электрического сопротивления в микрофлюидном канале. Во всех случаях мы наблюдали вариабельность в размерах клеток в стрессе относительно контроля и в основном в сторону их уменьшения. На протеомном уровне мы также наблюдали падение уровня VlhA антигенов.

Таким образом, можно предположить, что микоплазма способна реагировать и адаптировать свой метаболизм к стрессовым воздействиям с помощью вариации клеточного размера. Важную роль в этом играют поверхностные VlhA антигены.

Данная работа выполнена при поддержке службы Роспотребнадзора ГЗ №1022040800170-3-1.6.23 «Создание искусственных клеточных систем».

#### MINIMAL CELL – REGULATION OF METABOLISM BY SIZE VARIATION

D.S. Matyushkina<sup>1</sup>, A.A. Lazareva<sup>1</sup>, E.A. Vasilyeva<sup>1</sup>, P.V. Bashkirov<sup>1</sup>, T.S. Sapega<sup>1</sup>, S.V. Sizova<sup>1,2</sup>, A.V. Zalygin<sup>2</sup>, I.O. Butenko<sup>1</sup>, V.M. Govorun<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Scientific Research Institute for Systems Biology and Medicine; <sup>2</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow

The main driving force in the cell is its metabolism, and its fine tuning provides maximum adaptive capabilities. In such reduced bacteria as mycoplasmas, which are a model of a minimal cell, metabolism is represented by approximately 280 metabolic reactions, and the number of transcriptional regulators is an order of magnitude less than in *E. coli*, but despite this, these bacteria are able to survive in a wide range of stress effects, which gives reason to assume the existence of a more universal mechanism for rapid adjustment of metabolism in response to environmental conditions in these reduced cells.

Using a model of interaction between *Mycoplasma gallisepticum* S6 and a host cell (line HD3) by electron microscopy (Zeiss Merlin) we observed a decrease in the cell size by 1.2-1.5 times compared to the control, as well as a loss of the tip organelle, the structure of which is mainly composed of VlhA antigens. A decrease in the VlhA level is also confirmed by proteomic analysis (OrbiTrap Exploris 480, Thermo). In addition, mycoplasma isolated from eukaryotic cells grew more slowly than before infection. HPLC-MS metabolomic analysis (Shimadzu, Japan) showed accumulation of phosphoenolpyruvate in such cells, and the amount of ATP decreased by almost 2.5 times.

To analyze the universality of such a reaction, the sizes of mycoplasma cells were analyzed in other stress effects: osmotic, peroxide and heat shocks, prolonged starvation. The sizes were measured by dynamic light scattering (DLS) (Brookhaven Instrument 90Plus Particle Size Analyzer) and Microfluidic Resistive Pulse Sensing. In all cases, we observed variability in the sizes of cells under stress relative to the control and mainly towards their decrease. At the proteomic level, we also observed a decrease in the level of VlhA antigens.

Thus, it can be assumed that mycoplasma is able to respond and adapt its metabolism to stress effects by varying the cell size. Surface VlhA antigens play an important role in this.

This work was supported by by Rosпотребнадзор service state task № 1022040800170-3-1.6.23 “Creation of Artificial Cellular Systems”.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ТРЕХМЕРНОЙ УКЛАДКИ ХРОМАТИНА НА НЕСТАНДАРТНЫХ МОДЕЛЯХ: ИСКЛЮЧЕНИЯ, КОТОРЫЕ ОПРЕДЕЛЯЮТ ПРАВИЛА

В. Фишман<sup>1,2,4</sup>, М. Гридина<sup>1,2</sup>, Т. Лагунов<sup>1,2</sup>, А. Нурисламов<sup>1,2</sup>, А. Попов<sup>1,2</sup>, В. Константинов<sup>1,2</sup>, Т. Куликова<sup>3</sup>, А. Красикова<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск; <sup>2</sup>Новосибирский государственный университет, Новосибирск;

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург; <sup>4</sup>Научно-технологический университет «Сириус»

В этом году исполняется 15 лет с момента публикации, которая впервые представила технологию исследования контактов хроматина Hi-C, заложив фундамент в области 3D-геномики. За прошедшие годы был достигнут значительный прогресс в понимании того, какую роль организация хроматина играет в регуляции различных геномных процессов. Мы начали понимать основные принципы, определяющие архитектуру хроматина. Большая часть этих принципов была обнаружена благодаря исследованиям на стандартных модельных организмах. Однако ценные открытия также могут быть сделаны при изучении немодельных организмов, редких типов клеток и специфических физиологических условий, которые бросают вызов существующим парадигмам.

В своем докладе я представлю несколько примеров, где исследования на немодельных организмах и в нестандартных клеточных контекстах внесли важный вклад в наше понимание архитектуры хроматина. Используя комаров рода *Anopheles* в качестве примера, я продемонстрирую, как контакты хроматина могут соединять геномные регионы, расположенные на расстоянии миллионов нуклеотидов друг от друга. В наших исследованиях клеток курицы мы показали, что экструзия петель — ключевой принцип организации хроматина — является эволюционно консервативным механизмом у всех позвоночных. Однако наши данные свидетельствуют о том, что этот механизм может быть избирательно отключён в определённых типах клеток, таких как эритроциты, где доминируют альтернативные принципы укладки ядра.

Расширяя эту работу на другие виды, мы обнаружили что появление механизма останковки экструзии белком CTCF совпадает с эволюционным переходом от хордовых к позвоночным животным, что проливает свет на то, как архитектура хроматина эволюционирует параллельно с усложнением генома. Наконец, наше исследование хромосом типа ламповых щеток в ооцитах домашней курицы показало, что транскрипционная активность может напрямую влиять на структуру хроматина, модулируя процессы экструзии. Более того, для хромосом типа ламповых щеток транскрипция становится доминирующим фактором, формирующим архитектуру генома, превосходя по значимости другие механизмы, которые традиционно считались основными регуляторами геномной укладки.

Полученные нами результаты подчеркивают важность изучения нетипичных систем для выявления исключений, которые уточняют общие правила организации хроматина. Они показывают, как эволюционные изменения и клеточные контексты вносят вклад в организацию ядра и, в конечном итоге, улучшают наше понимание принципов укладки хроматина.

*Эта работа была частично поддержана грантом ФТ Сириус (номер договора № 26-03, 27/09/2024).*

## EXPLORING CHROMATIN ARCHITECTURE IN NON-MODEL SYSTEMS: EXCEPTIONS THAT DEFINE THE RULES

V. Fishman<sup>1,2,4</sup>, M. Gridina<sup>1,2</sup>, T. Lagunov<sup>1,2</sup>, A. Nurislamov<sup>1,2</sup>, A. Popov<sup>1,2</sup>, V. Konstantinov<sup>1,2</sup>, T. Kulikova<sup>3</sup>, A. Krasikova<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk; <sup>2</sup>Novosibirsk State University, Novosibirsk; <sup>3</sup>St Petersburg State University, St Petersburg; <sup>4</sup>Sirius University of Science and Technology

This year marks the 15th anniversary of the pioneering study that introduced genome-wide chromosome conformation capture techniques, setting a new standard in 3D genomics research. Over these years, significant progress has been made in understanding how chromatin organization plays a critical role in regulating various genomic processes. We have begun to uncover fundamental principles that govern chromatin architecture, largely through studies in well-established model organisms. However, valuable insights can also be obtained by investigating non-model systems, rare cell types, and specific physiological conditions that challenge the existing paradigms.

In this talk, I will present several examples where studies in non-model organisms and atypical cellular contexts have yielded critical contributions to our understanding of chromatin architecture. Using the *Anopheles* mosquito as a case study, I will highlight how long-range chromatin interactions bridge genomic regions located megabases apart, offering new perspectives on the spatial organization of the genome. In our research on chicken cells, we demonstrate that loop extrusion, a key chromatin organizing principle, is an evolutionarily conserved mechanism across vertebrates. Remarkably, our findings show that this mechanism can be selectively switched off in certain cell types, such as erythrocytes, where alternative architectural principles may dominate.

Expanding this work to additional species, we identify the emergence of extruder-blocking mechanisms that align with the evolutionary transition from chordates to vertebrates, shedding light on how chromatin architecture evolves in parallel with genomic complexity. Lastly, our investigation into lampbrush chromosomes reveals that transcriptional activity can directly influence chromatin structure by modulating extrusion processes. In some cell types, transcription emerges as the dominant factor shaping genome architecture, overriding other mechanisms traditionally considered as primary organizers.

These findings collectively underscore the importance of studying non-model systems to uncover exceptions that refine the general rules of chromatin organization. They reveal how diverse evolutionary strategies and cellular contexts contribute to the dynamic and multifaceted nature of genome architecture, ultimately enhancing our understanding of 3D genomics across species and conditions.

*This work was partially supported by the grant of the state program of the «Sirius» Federal Territory «Scientific and technological development of the «Sirius» Federal Territory» (Agreement No 26-03, 27/09/2024).*

### L-ФОРМЫ *ESCHERICHIA COLI* КАК МОДЕЛЬ КОНДЕНСИРОВАННОГО СОСТОЯНИЯ ЦИТОПЛАЗМЫ

О.В. Щербакова, Д.С. Матюшкина, А.А. Лазарева, Е.А. Васильева, И.О. Бутенко, В.М. Говорун

НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва

Концентрация макромолекул в цитоплазме клеток очень высока, в *E. coli* она составляет порядка 300–400 мг/мл. Такое конденсированное состояние цитоплазмы приводит к образованию немембранных компартментов за счёт разделения фаз, определяет характер взаимодействия и состав макромолекулярных комплексов, влияет на активность ферментов, скорость протекаемых химических реакций и диффузии. За последние 5 лет количество публикаций, посвященных биологическим конденсатам, выросло на порядок. Большинство из них выполнены на моделях *in vitro* с применением искусственных или природных полимеров. Однако такие подходы не дают понимания того, является ли такое конденсированное состояние неотъемлемым для живой клетки, и в каких рамках возможны изменения степени конденсации. Чтобы ответить на эти вопросы, мы провели "деконденсацию" живой клетки *E. coli*, лишив её клеточной стенки.

Клеточная стенка бактерии, состоящая из пептидогликана, создаёт внешний каркас и таким образом ограничивает размер клетки. Кроме того, она задействована в синхронизации репликации и деления клетки. Лишив клетку внешнего ограничения, и нарушив процесс синхронизации, мы получили клетки различных объёмов, превышающих изначальный до 500 раз, но содержащих некратно количество компонентов. Мы применили два подхода: 1) выращивали *E. coli* в присутствии пенициллина, который ингибирует синтез клеточной стенки; 2) обработали *E. coli* цефалексином, ингибитором транспептидазы межклеточной перегородки FtsI, и получили филаменты, а затем лизоцимом разрушили клеточную стенку, что привело к образованию гигантских протопластов. L-формы разного размера и контрольные клетки, а также филаменты были подвергнуты сравнительному анализу белкового состава (ВЭЖХ/МС), количества геномов на клетку (ПЦР-РВ), размеров с помощью микроскопии (дифференциальный интерференционный контраст), выживаемости (КОЕ) и метаболической активности.

Выявлены закономерности между объёмом клетки, степенью деконденсации материи и выживаемостью. С помощью голографической микроскопии было проведено прижизненное наблюдение способности к реверсии L-форм различной плотности в состоянии палочки и показано, что плотность цитоплазмы является одним из ключевых факторов жизнеспособности клетки.

### L-FORMS OF *ESCHERICHIA COLI* AS A MODEL OF SOFT CONDENSED MATTER

O.V. Shcherbakova, D.S. Matyushkina, A.A. Lazareva, E.A. Vasileva, I.O. Butenko, V.M. Govorun

Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow

High cytoplasmic concentrations of macromolecules (300–400 mg/ml) are present in the cytosol of *E. coli*. Macromolecular crowding can promote formation of biomolecular condensates by colloidal phase separation, orchestrate macromolecular complexes composition and function, affect the activity of enzymes, chemical reaction rates and diffusion. For the last 5 years the number of publications on biomolecular condensates has increased tenfold. Most of them employed *in vitro* models with synthetic or biological polymers. However, *in vitro* approach does not give the answer on acceptable limits of condensation, or whether the condensed state of the cytosol is necessary for a living cell at all. To address these questions, we "decondensed" a living *E. coli* cell, taking away its cell wall.

Bacterial cell wall made of peptidoglycane, serves as an outer skeleton setting bounds to the cell size. It also plays a role in synchronization of replication and cell division. Taking away its external corset and disrupting synchronization process we have generated cells of different volumes up to 500-fold greater than original with nonequimolar as compared to original cell composition. We employed two approaches: 1) cultivation in the presence of penicillin, which inhibits cell wall formation; 2) cephalixin treatment, which inhibits FtsI a transpeptidase that introduces peptide cross-linking into the peptidoglycan cell wall in the division septum, followed by lysozyme digestion of a cell wall, leading to giant protoplast formation. L-forms of different size, control rod cells and filaments were analyzed by following parameters: proteome composition (LC-MS), genome equivalents per cell (RT-PCR), size and shape (differential interference-contrast microscopy), viability (CFU) and metabolic activity (MTT-test).

We revealed the trends between the cell volume, decondensation extent and viability. With the aid of live-cell imaging holographic microscopy we observed reversion of L-forms characterized by different condensation state to rods and we demonstrated that the cell density is one of the key conditions in cell viability.

## ПСЕВДОТИПИРОВАННЫЕ ВИРУСНЫЕ ЧАСТИЦЫ КАК ИНСТРУМЕНТ ОЦЕНКИ ТРОПНОСТИ ВНОВЬ ВЫЯВЛЯЕМЫХ ВИРУСОВ К КЛЕТКАМ ЧЕЛОВЕКА.

А.С. Долгова<sup>1</sup>, Ш.А. Хасанов<sup>1</sup>, А.В. Шабалина<sup>1</sup>, А.С. Сперанская<sup>2</sup>, В.Г. Дедков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург; <sup>2</sup>НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва

Бурное развитие технологий NGS привело к их широкому применению в различных областях биологии и медицины. Например, исследования метавиромов различных животных, резервуаров как уже известных патогенов, так и потенциальных возбудителей заболеваний человека, стали главным источником информации о новых вирусах, что привело к революции нашего представления об их многообразии. К сожалению, большинство вновь открываемых вирусов не исследуется классическими вирусологическими методами, что связано с трудоемкостью работ по изоляции и культивированию, а также необходимостью наличия условий для работы с патогенными микроорганизмами. В этой связи невозможно оценить значимость подобных находок с точки зрения их возможной патогенности для человека. Биоинформатическими методами можно моделировать взаимодействие вируса с рецепторами клеток потенциального хозяина, однако, очевидно, что для реального решения существующей проблемы этого недостаточно.

Одним из методов оценки патогенности вирусов, имеющих липидную оболочку, является методика псевдотипированных вирусных частиц. Примером успешного применения данной методики является исследование тропности нового  $\beta$ -коронавируса MOW-BatCoV/15-22, геном которого был секвенирован из образцов фекалий *P. nathusii*, собранных в Московской области (Speranskaya et al., 2023). Филогенетическим анализом установлено, что ближайшим родственным вирусом является MERS-CoV, а S-белок наиболее близок к таковым у коронавирусов, выявляемых у ежей. Методами молекулярного докинга была показана высокая вероятность связывания S-белка с рецепторами DPP4 *M. brandtii* и *E. europaeus* и с меньшей (но значительной) вероятностью с DPP4 человека.

Однако анализ взаимодействия псевдотипированных частиц, несущих S-белок MOW-BatCoV/15-22, с клеточными линиями H1299, гиперэкспрессирующими рецепторы человека DPP4 и ACE2, показал высокую способность связывания с рецептором ACE2, а не с DPP4.

Таким образом, методами синтетической биологии, используя собранный *de novo* ген, не имея на руках даже генетического материала, нами показана тропность нового вируса к тканям человека, реализуемая через взаимодействие с рецептором ACE2, что опровергает результаты расчетов методом молекулярного докинга.

1. Speranskaya AS. et al. *Int J Environ Res Public Health*. 2023, 20(4): 3702/

## PSEUDOTYPED VIRAL PARTICLES AS A TOOL FOR STUDYING TISSUE TROPISM OF NEWLY DISCOVERED VIRUSES.

A.S. Dolgova<sup>1</sup>, S.A. Khasanov<sup>1</sup>, A.V. Shabalina<sup>1</sup>, A.S. Speranskaya<sup>2</sup>, V.G. Dedkov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Saint Petersburg Pasteur Institute, St Petersburg; <sup>2</sup>Scientific Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow

The rapid development of NGS technologies has led to their wide application in various fields of biology and medicine. For example, studies of metaviromes of different animals, reservoirs of both known and potential pathogens of human diseases, have become the main source of information on new viruses and has led to a revolution in our understanding of their diversity. Unfortunately, most newly discovered viruses are not studied by classical virological methods. It is associated with the laboriousness of isolation and cultivation work, as well as the need for required biosafety level. In this regard, it is impossible to assess the significance of such findings in terms of their possible pathogenicity for humans. Bioinformatic methods can be used to model virus-receptor interactions, however, it is obvious that this is not enough to solve the existing problem.

A powerful tool for studying pathogenicity of lipid enveloped viruses is the pseudotyped viral particle technique. An example of the successful application of this it is the study of the tropism of the new  $\beta$ -coronavirus MOW-BatCoV/15-22. Its genome was sequenced from *P. nathusii* fecal samples collected in the Moscow region (Speranskaya et al., 2023). Phylogenetic analysis has established that the closest related virus is MERS-CoV, and the S protein is closest to coronaviruses detected in hedgehogs. Molecular docking methods showed a high probability of S protein binding to the DPP4 receptors of *M. brandtii* and *E. europaeus* and with a lower probability (but still significant) to human DPP4.

However, interaction studies of MOW-BatCoV/15-22 S protein pseudotyped particles with H1299 cell lines overexpressing human DPP4 and ACE2 showed a high binding ability to the ACE2 receptor, but not to DPP4.

Thus, using synthetic biology methods and a *de novo* assembled gene, even without genetic material, we have shown the tropism of the new virus to human tissues, realized through interaction with the ACE2 receptor, which refutes the molecular docking data.

1. Speranskaya AS. et al. *Int J Environ Res Public Health*. 2023, 20(4): 3702/

#### ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ СИНТЕЗА ВИРУСНЫХ ГЕНОМОВ

Г.Ю. Фисунов, Т.А. Семашко, Д.В. Евсютина, Е.А. Цой, Д.Р. Харрасов, В.М. Говорун

НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва

Синтетические вирусы и бактериофаги востребованы в различных отраслях биологии и медицины: создание вакцин, редактирование геномов многоклеточных организмов, профилактика и лечение бактериальных инфекций. В настоящей работе создана платформа для получения синтетических геномов размером до нескольких десятков тысяч пар оснований. Синтетическая ДНК такого размера покрывает значительную часть диапазона геномов практически значимых вирусов и бактериофагов.

В рамках работы было разработано программное обеспечение для дизайна геномов и разбиения их на олигонуклеотиды (BAC-browser). Была разработана линейка ферментов для синтетической биологии включая высокоточную ДНК-полимеразу, экзонуклеазы для сшивки по гомологичным концам *in vitro* и эндонуклеаза для коррекции ошибок. Были разработаны сборки ДНК *in vivo* методом гомологичной рекомбинации в клетках *E. coli* и *S. cerevisiae*. В качестве модели для демонстрации работоспособности платформы был проведён синтез генома бактериофага против *Vibrio cholerae* – вибриофага N4 с размером генома 40 тысяч пар оснований. Геном вибриофага N4 был разбит на генные блоки размером 1,5-2 тысячи пар оснований. Генные блоки были разбиты на олигонуклеотиды размером порядка 60 нт. Затем олигонуклеотиды были синтезированы в высокопроизводительном формате на колоночном синтезаторе. Генные блоки были собраны из олигонуклеотидов методом полимеразной цепной сборки. Затем полный геном вибриофага N4 был собран методом гомологичной рекомбинации в дрожжах. Полученный синтетический геном был доставлен в клетки *V. cholerae*. В результате были получены литические бляшки. Наличие синтетического вибриофага в бляшках подтверждено секвенированием.

Работа финансировалась по заданию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в рамках темы «Создание искусственных клеточных систем» № 122030900107-3

#### TECHNOLOGICAL PLATFORM FOR THE SYNTHESIS OF VIRAL GENOMES

G.Y. Fisunov, T.A. Semashko, D.V. Evsyutina, E.A. Tsoy, D.R. Kharrasov, V.M. Govorun

Scientific Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow

Synthetic viruses and bacteriophages are in demand in various areas of biology and medicine: vaccines, genome editing of multicellular organisms, prevention and treatment of bacterial infections. In the current work we demonstrate a platform for genome synthesis up to several tens of thousands of base pairs in size. Synthetic DNA of this size covers a significant range of genome sizes of practically significant viruses and bacteriophages.

The developed platform includes the software for genome design and splitting into oligonucleotides (BAC-browser), the set of enzymes including high-fidelity DNA-polymerase, exonucleases for *in vitro* gene blocks assembly and endonuclease for error correction and the method for DNA construct assembly by homologous recombination in *E. coli* and *S. cerevisiae*. The synthesis of genome of bacteriophage against *Vibrio cholerae* – vibriophage N4 of 40 Kb has been carried out as a proof of principle demonstration. Vibriophage N4 genome has been split into gene blocks of 1.5-2 Kb in size. Then the gene blocks were split into oligonucleotides about 60 b.p. The oligonucleotides were synthesized using high-throughput column synthesizer. Gene blocks were obtained using polymerase chain assembly. Complete vibriophage N4 genome was assembled by homologous recombination in yeast. The synthetic genome was electroporated into *V. cholerae* cells. The lytic plaques were obtained and the presence of vibriophage N4 was confirmed by sequencing.

The work was funded by Federal Service for Surveillance on Consumer Right Protection and Human Wellbeing "Construction of artificial cellular systems" No 122030900107-3.

### ОПТИМИЗАЦИЯ РЕПОРТЕРНОЙ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ГРИБОВ В ЭУКАРИОТАХ

Е.С. Шахова<sup>1,2</sup>, Т.А. Каратаева<sup>1,2</sup>, Н.М. Маркина<sup>1,2</sup>, Т. Митюшкина<sup>1,2</sup>, К.А. Палкина<sup>1,2</sup>, М.М. Перфилов<sup>1,2</sup>,  
И.В. Ямпольский<sup>1,2,3,4</sup>, К.С. Саркисян<sup>1,2,4,5,6</sup>, А.С. Мишин<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ООО «Планта», Москва; <sup>2</sup>ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва;  
<sup>3</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия; <sup>4</sup>Light Bio Inc, Ketchum, Айдахо, США; <sup>5</sup>Synthetic Biology Group, MRC London Institute of Medical Sciences, Лондон, Великобритания; <sup>6</sup>Institute of Clinical Sciences, Медицинский факультет, Имперский колледж Лондона, Великобритания

Автономные биолюминесцентные системы обладают рядом преимуществ по сравнению с люциферазами: отсутствие необходимости добавления субстрата, его проникновение в клетки и распространение по тканям; постоянство свечения; возможность неинвазивного имажинга и др. К автономной биолюминесцентной системе относится биолюминесцентная система грибов, гены которой были открыты у гриба *Neonothopanus nambi* совсем недавно в лаборатории химии метаболических путей ИБХ РАН. Ферменты дикого типа не всегда обладают высокой функциональностью в гетерологических хозяевах. Для оптимизации работы биолюминесцентной системы грибов, мы сравнили ортологи гиспидин-синтаз из разных светящихся грибов и выявили наиболее функциональный вариант, которым оказалась гиспидин-синтаза из *Mycena citricolor*.

Мы показали необходимость конститутивной экспрессии фосфопантетеинилтрансферазы для посттрансляционной модификации гиспидинсинтазы. В сочетании с использованием мутантных форм люциферазы nnLuz и гиспидин-3-гидроксилазы nnH3H, полученными в ходе направленного и случайного мутагенеза, нам удалось добиться увеличения яркости на 1-2 порядка в клетках дрожжей и млекопитающих. Также мы создали стабильные линии растений – как широко используемые в растительной биологии: арабидопсис *Arabidopsis thaliana*, табаки *Nicotiana benthamina* и *tabacum*, быстрорастущее дерево тополь *Populus canadensis*, так и декоративные растения петунья *Petunia hybrida* и хризантема *Chrysanthemum morifolium*.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-44-02024, <https://rscf.ru/project/22-44-02024/>.

### OPTIMIZATION OF A REPORTER SYSTEM BASED ON FUNGAL BIOLUMINESCENCE IN EUKARYOTES

E.S. Shakhova<sup>1,2</sup>, T.A. Karataeva<sup>1,2</sup>, N.M. Markina<sup>1,2</sup>, T. Mitouchkina<sup>1,2</sup>, K.A. Palkina<sup>1,2</sup>, M.M. Perfilov<sup>1,2</sup>, I.V. Yampolsky<sup>1,2,3,4</sup>,  
K.S. Sarkisyan<sup>1,2,4,5,6</sup>, A.S. Mishin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Planta LLC, Moscow, Russia; <sup>2</sup>Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; <sup>3</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia; <sup>4</sup>Light Bio Inc, Ketchum, Idaho, USA; <sup>5</sup>Synthetic Biology Group, MRC London Institute of Medical Sciences, London, UK; <sup>6</sup>Institute of Clinical Sciences, Faculty of Medicine, Imperial College London, London, UK

Autonomous bioluminescent systems possess several advantages over luciferases, such as eliminating the need for substrate addition, its cellular penetration, and tissue distribution; sustained luminescence; and the potential for non-invasive imaging, among others. The bioluminescent system of fungi, which genes were recently discovered in the fungus *Neonothopanus nambi* in the laboratory of I.V. Yampolsky, is one such autonomous system. Wild-type enzymes do not always exhibit optimal functional activity for use in heterologous hosts. To optimize the functioning of the fungal bioluminescent system, we compared hispidin-synthases orthologs from different bioluminescent fungi—the most functional variant proved to be the hispidin synthase from *Mycena citricolor*.

We demonstrated the necessity for constitutive expression of phosphopantetheinyl transferase, required for the post-translational modification of hispidin synthase. Combined with mutants of luciferase nnLuz and hispidin-3-hydroxylase nnH3H, obtained through directed and random mutagenesis, we managed to achieve a brightness increase of 1-2 orders of magnitude in organisms such as yeast cells, mammalian cell cultures, as well as creating stable lines of plants—widely used in plant biology such as *Arabidopsis thaliana*, tobacco *Nicotiana benthamiana* and *tabacum*, the fast-growing tree *Populus canadensis*, and ornamental plants *Petunia hybrida* and *Chrysanthemum morifolium*.

The reported study was funded by RSF, project number 22-44-02024, <https://rscf.ru/project/22-44-02024/>.



**ФАКТОРЫ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ КОСТОЧКОВЫХ КУЛЬТУР – ОРГАНИЗАЦИЯ, РОЛЬ В РАЗВИТИИ ПОТИВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ И СОЗДАНИИ УСТОЙЧИВЫХ ФОРМ.**

**Л.Ю. Мурунец, Т.Н. Сидорова, В.Р. Тимербаев, Е.А. Водясова, А.С. Пушин, С.В. Долгов**

*Филиал ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино*

Шарка – самое серьезное вирусное заболевание для всех видов Prunus, вызывающее тяжелые экономические потери в производстве плодов косточковых культур во всем мире. Так как отсутствие естественных генетических источников устойчивости плодовых деревьев к PPV и трудности с переносом этих генов с помощью традиционных методов селекции, сорта, устойчивые к Шарке, могут быть созданы в настоящее время только методами биоинженерии. РНК вирусы растений для трансляции собственной РНК в растительных клетках рекрутируют факторы трансляции своих хозяев. Создание дефицита определенных факторов инициации трансляции, является одним из способов защиты растений от вирусной инфекции. Получены транскриптомы ряда косточковых культур (абрикоса, сливы, вишни, алычи и терна) и их анализ показал наличие полноразмерных транскриптов гомологов генов инициации транскрипции eIF4E в том числе ранее не опубликованных. Анализ последовательностей генов резистентных и чувствительных форм с дальнейшим двухгибридным скринингом взаимодействия с Vpg белком потивирусов позволил выделить изоформы рекрутируемые в жизненный цикл потивируса. Интерференционное замалчивание выявленных мишеней позволило получить устойчивые формы вишни, демонстрирующие устойчивость в течение трех вегетационных сезонов. В результате проведенных анализов транскриптомов основных косточковых культур выделены гомологи генов фактора инициации трансляции eIF4E и методом двухгибридного скрининга определены изоформы используемые в жизненном цикле потивирусов. Показана эффективность интерференционного замалчивания выделенных форм в индукции вирусной устойчивости.

**THE FACTORS FOR INITIATING THE TRANSLATION OF STONE FRUIT CULTURES - ORGANIZATION, ROLE IN THE DEVELOPMENT OF POTIVIRUS INFECTION AND CREATION OF RESISTANT FORMS**

**L. Mourenets, T. Sidorova, V. Timerbaev, E. Vodjasova, A. Pushin, S. Dolgov**

*Branch of Shemjakina and Ovcinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences*

Sharka is the most serious viral disease of all Prunus species, causing severe economic losses in stone fruit production worldwide. Since there are no natural genetic sources of resistance in fruit trees to PPV and difficulties in transferring these genes using traditional breeding methods, Sharika-resistant varieties can currently only be created by bioengineering methods. Plant RNA viruses recruit translation factors of their hosts to translate their own RNA in plant cells. Creating a deficiency of certain translation initiation factors is one of the ways to protect plants from viral infection. Transcriptomes of a number of stone fruit crops (apricot, plum, cherry, cherry plum and sloe) were obtained and their analysis showed the presence of full-length transcripts of homologues of the eIF4E transcription initiation genes, including previously unpublished ones. Sequence analysis of resistant and sensitive forms with subsequent two-hybrid screening of interaction with the Vpg protein of potyviruses allowed us to isolate isoforms recruited into the potyvirus life cycle. Interference silencing of the identified targets allowed us to obtain resistant cherry forms demonstrating resistance during three growing seasons. As a result of the conducted transcriptome analyses of the main stone fruit crops, homologues of the eIF4E transcription initiation factor genes were isolated and isoforms used in the potyvirus life cycle were determined by the two-hybrid screening method. The effectiveness of interference silencing of the isolated forms in inducing viral resistance was shown.

## ИССЛЕДОВАНИЕ КОРРЕЛЯЦИОННЫХ ЗАВИСИМОСТЕЙ В МИКРООРГАНИЗМЕННЫХ ПРОТЕОМАХ

А.А. Лазарева, Д.С. Матюшкина, В.М. Говорун

НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва

В 1665 году появилась «Микрография» Роберта Гука – книга, где впервые были изображены клетки. С тех пор научное сообщество исследовало множество деталей строения и функционирования клетки, а также накопило колоссальный объем данных для различных биологических объектов. Однако комплексное понимание принципов жизни на текущий момент так и не было достигнуто. Тщательный вторичный анализ уже накопленных массивов знаний позволяет обнаружить ранее незамеченные тонкости и принципы. Поэтому в нашей работе была поставлена следующая цель: выявление и анализ закономерностей белкового «кора» живой клетки, основываясь на накопленных протеомных данных.

Системный подход к исследованию включает в себя несколько ключевых «омиксных» технологий: геномика, транскриптомика, метаболомика и протеомика, позволяющих делать выводы об организации живой материи. Наиболее изученными с помощью такого подхода объектами являются модельные микроорганизмы [1–3] и минимальные клетки [4, 5]. В ходе данного исследования были отобраны и проанализированы протеомные данные для *Mycoplasma gallisepticum* S6, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* и *Saccharomyces cerevisiae* в различных естественных и стрессовых условиях. Для этих данных были рассчитаны матрицы корреляций, применены методы кластеризации t-SNE, K-means и DBSCAN и метод PCA.

Анализ протеомных корреляций позволил обнаружить двудольную кластеризацию белков во всех исследованных бактериальных протеомах. При этом наложение метаболических путей или данных о белковых комплексах не позволило объяснить подобную кластеризацию. Для эукариот *S. cerevisiae* подобная организация протеома не была обнаружена.

Для *M. gallisepticum* S6 были дополнительно подготовлены протеомные данные для культур в различных условиях. В каждом из наборов данных проведен корреляционный анализ, показавший динамику изменения соотношений в протеомах при стрессовых воздействиях. Исследование поддержано Роспотребнадзором в рамках ГЗ №1022040800170-3-1.6.23 «Создание искусственных клеточных систем».

1. Mori Matteo et al. *Mol Syst Biol.* 2021, 17(5): e9536.
2. Shi L et al. *Front Microbiol.* 2016, 7: 533.
3. Ho Brandon et al. *Cell Syst.* 2018, 6(2):192-205.
4. Butenko I et al. *Data Brief.* 2017, 16: 700-704.
5. Hutchison C et al. *Science.* 2016, 351(6280): aad6253.

## INVESTIGATION OF CORRELATION DEPENDENCIES IN MICROBIAL PROTEOMES

A. Lazareva, D. Matyushkina, V. Govorun

Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow

In 1665, Robert Hooke published his book "Micrographia", which was the first to depict cells. Since then, scientists have investigated many aspects of the structure and function of cells, as well as collected a huge amount of data on various biological entities. However, at this point, there has not yet been a comprehensive understanding of the fundamental principles of life. A thorough re-examination of the existing knowledge allows us to discover previously overlooked details and principles.

Therefore, our work aims to identify and analyze patterns in the protein "core" of a living cell based on the proteomic data that has already been collected.

The systematic approach to research involves the use of several key "omics" technologies, including genomics, transcriptomics, metabolomics, and proteomics. These technologies allow us to gain insight into the organization of living matter and draw conclusions about it. Model microorganisms and minimal cells are the most commonly studied subjects using this approach. In this study, we selected and analyzed proteomic data from *Mycoplasma gallisepticum* S6, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Saccharomyces cerevisiae* under various natural and stress conditions. We used correlation matrices, t-SNE, k-means, DBSCAN clustering, and PCA methods to analyze the data. The analysis revealed a bipartite clustering of proteins in the proteomes of all studied bacteria. However, the overlap of metabolic pathways and data on protein complexes could not explain this clustering. A similar organization was not found in the proteome of *S. cerevisiae*, a eukaryote.

Proteomic data for cultures under various conditions was additionally prepared for *M. gallisepticum* S6. Correlation analysis was performed on each data set, which revealed the dynamics of changes in proteome ratios under stress.

The study is supported by Rosпотребнадзор service state task №1022040800170-3-1.6.23

1. Mori Matteo et al. *Mol Syst Biol.* 2021, 17(5): e9536.
2. Shi L et al. *Front Microbiol.* 2016, 7: 533.
3. Ho Brandon et al. *Cell Syst.* 2018, 6(2):192-205.
4. Butenko I et al. *Data Brief.* 2017, 16: 700-704.
5. Hutchison C et al. *Science.* 2016, 351(6280): aad6253.

## НАЛИЧИЕ НЕРИБОСОМНЫХ ПЕПТИДОВ ОПРЕДЕЛЯЕТ ОПТИМИЗАЦИОННЫЕ СТРАТЕГИИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭЛОНГАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ В БАКТЕРИЯХ

Ю.Г. Матушкин<sup>1</sup>, А.И. Клименко<sup>1,2</sup>, С.А. Лашин<sup>1,2</sup>, Н.А. Колчанов<sup>1,2</sup>, Д.А. Афонников<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН; <sup>2</sup>Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск

Нерибосомные пептиды играют важную роль в жизнедеятельности бактерий и имеют экстремально широкую область биологической активности. В частности, они действуют как антибиотики, токсины, поверхностно-активные вещества, сидерофоры, также выполняют ряд других специфических функций. Биосинтез этих молекул происходит не на рибосомах, а за счет специальных ферментов, образующих кластеры в бактериальных геномах. Мы предположили, что наличие путей синтеза нерибосомных пептидов является специфической особенностью метаболизма бактерий, которая может затрагивать и другие метаболические процессы клетки, в том числе и трансляционные.

Мы провели биоинформационный анализ кластеров биосинтетических генов нерибосомных пептидов (NRP BGCs), полученных из ANTISMASH-DB [1], используя целногеномные последовательности бактериальных геномов, доступные в NCBI Genbank. В основе анализа лежит метод прогнозирования эффективности элонгации трансляции генов, реализованный в программе EloE [2]. Скрипты статистического и биоинформационного анализа были разработаны на языке Python с использованием программной библиотеки Biopython.

У организмов, геномы которых содержат кластеры биосинтеза нерибосомных пептидов существенно меньшая часть генов регулируется количеством локальных инвертированных повторов, большая часть генов регулируется за счет усреднённой энергии шпилек инвертированных повторов и дополнительно за счет кодонного состава [3].

В работе впервые показана связь между механизмом регуляции трансляции белок-кодирующих генов в бактериях, который в значительной степени определяется эффективностью элонгации трансляции, и наличием в геномах кластеров генов биосинтеза нерибосомных пептидов. Полученные нами результаты позволяют предположить, что наличие биосинтетических путей нерибосомных пептидов в геномах может оказывать влияние на структуру общего метаболизма бактерий, что выражается и в специфике механизмов рибосомного биосинтеза генов.

Финансирование: Исследование поддержано бюджетным проектом № FWR-2022-0020.

1. Blin K, Shaw S, Kautsar SA, Medema MH, Weber T. The antiSMASH database version 3: increased taxonomic coverage and new query features for modular enzymes. *Nucl Acids Res.* 2021, 49(D1): D639-D643.
2. Sokolov V, Zuraev B, Lashin S, Matushkin Y. Web application for automatic prediction of gene translation elongation efficiency. *J Integr Bioinform.* 2015, 12, 256. <https://doi.org/doi:10.2390/biecoll-jib-2015-256>.
3. Клименко А.И., Лашин С.А., Колчанов Н.А., Афонников Д.А., Матушкин Ю.Г. Молекулярные механизмы оптимизации элонгации трансляции существенно различаются у бактерий, имеющих и не имеющих кластеры генов биосинтеза нерибосомных пептидов. *Мол. биол.* 2023; 57(2): 155–165.

## THE PRESENCE OF NON-RIBOSOMAL PEPTIDES DETERMINES OPTIMIZATION STRATEGIES FOR TRANSLATION ELONGATION EFFICIENCY IN BACTERIA

Yu.G. Matushkin<sup>1</sup>, A.I. Klimenko<sup>1,2</sup>, S.A. Lashin<sup>1,2</sup>, N.A. Kolchanov<sup>1,2</sup>, D.A. Afonnikov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Cytology and Genetics, SB RAS; <sup>2</sup>Kurchatov Genomic Center of the Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk

Non-ribosomal peptides play an important role in bacterial viability and have an extremely wide range of biological activities. In particular, they act as antibiotics, toxins, surfactants, siderophores, and also perform a number of other specific functions. The biosynthesis of these molecules does not occur on ribosomes, but through special enzymes that form clusters in bacterial genomes. We hypothesized that the presence of non-ribosomal peptide synthesis pathways is a specific feature of bacterial metabolism that may affect other metabolic processes of the cell, including translational ones.

We performed bioinformatics analysis of non-ribosomal peptide biosynthetic gene clusters (NRP BGCs) derived from ANTISMASH-DB [1] using whole-genome sequences of bacterial genomes available at NCBI Genbank. The analysis is based on the method of predicting gene translation elongation efficiency implemented in the EloE program [2]. Statistical and bioinformatics analysis scripts were developed in Python using the Biopython program library.

In organisms whose genomes contain clusters of non-ribosomal peptide biosynthesis, a significantly smaller proportion of genes are regulated by the number of local inverted repeats, while the majority of genes are regulated by the average energy of hairpin inverted repeats and additionally by codon composition [3].

This work shows for the first time the relationship between the mechanism of translation regulation of protein-coding genes in bacteria, which is largely determined by the efficiency of translation elongation, and the presence of non-ribosomal peptide biosynthesis gene clusters in genomes. Our results suggest that the presence of non-ribosomal peptide biosynthetic pathways in genomes may influence the structure of the general metabolism of bacteria, which is also expressed in the specificity of the mechanisms of ribosomal gene biosynthesis.

Funding: The study is supported by project (No. FWR-2022-0020).

1. Blin K, Shaw S, Kautsar SA, Medema MH, Weber T. The antiSMASH database version 3: increased taxonomic coverage and new query features for modular enzymes. *Nucl Acids Res.* 2021, 49(D1): D639-D643.
2. Sokolov V, Zuraev B, Lashin S, Matushkin Y. Web application for automatic prediction of gene translation elongation efficiency. *J Integr Bioinform.* 2015, 12, 256. <https://doi.org/doi:10.2390/biecoll-jib-2015-256>.
3. Klimenko AI, Lashin SA, Kolchanov NA, Afonnikov DA, Matushkin YuG. Molecular mechanisms to optimize gene translation elongation differ significantly in bacteria with and without nonribosomal peptides *Molekulyarnaya Biologiya* 2023, 57(2): 155–165 (in Russian).

## ПОДХОД ДЛЯ АНАЛИЗА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ МАРКЕРОВ В ФОСФАТИДИЛСЕРИН-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ТРОМБОЦИТАХ

**Е.О. Артеменко, С.И. Обыденный, М.А. Пантелеев**

*Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН; НМИЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва*

Фосфатидилсерин (ФС) – положительные тромбоциты играют важную роль в тромбозе и гемостазе. Они имеют высокую прокоагулянтную активность, способность к везикуляции и могут агрегировать с активированными ФС-отрицательными тромбоцитами. Они обнаруживаются в растущем тромбе *in vitro*, однако остается ряд загадок, связанных с ними. В частности, внутриклеточная сигнализация и реорганизация цитоскелета в этих тромбоцитах исследованы очень слабо, поскольку они имеют способность размываться при пермеабиллизации, которая необходима для проникновения антител к внутриклеточным маркерам внутрь фиксированных клеток. В данной работе мы предлагаем подход, который позволяет анализировать внутриклеточные маркеры в фиксированных ФС-положительных тромбоцитах с помощью проточной цитометрии или конфокальной микроскопии. Мы использовали наиболее мягкую пермеабиллизацию фиксированных ФС-положительных тромбоцитов с помощью сапонина и показали, что такая пермеабиллизация позволяет в значительной мере сохранить ФС-положительные тромбоциты. Для примера мы проанализировали состояние полимеризованной формы актина в ФС-положительных тромбоцитах и показали, что несмотря на значительную перестройку цитоскелета, происходящую при активации в таких тромбоцитах, актин в них частично представлен в полимеризованной форме.

## APPROACH FOR ANALYSIS OF INTRACELLULAR MARKERS IN PHOSPHATIDYLSERINE-POSITIVE PLATELETS

**E.O. Artemenko, S.I. Obydennyi, M.A. Panteleev**

*Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology; National Scientific and Practical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow*

Phosphatidylserine (PS) – positive platelets play an important role in thrombosis and hemostasis. They have high procoagulant activity, the ability to vesiculate, and can aggregate with activated PS-negative platelets. They are found in growing thrombus *in vitro*, but a number of mysteries remain regarding them. In particular, intracellular signaling and cytoskeletal reorganization in these platelets is very poorly studied, since they have the ability to be destroyed by permeabilization, which is necessary for the penetration of antibodies to intracellular markers into the fixed cells. In this work, we propose an approach that allows the analysis of intracellular signaling in fixed PS-positive platelets using flow cytometry or confocal microscopy. We used the mildest permeabilization of fixed PS-positive platelets using saponin and showed that such permeabilization allows us to significantly preserve PS-positive platelets. As an example, we analyzed the state of the polymerized form of actin in PS-positive platelets and showed that, despite the significant rearrangement of the cytoskeleton that occurs upon activation in such platelets, actin in them is partially presented in a polymerized form.

## ОСОБЕННОСТИ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ФЕРМЕНТОВ ГЛИКОЛИЗА *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* КАК ВОЗМОЖНЫЙ БАЗИС РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА ВСЕЙ БАКТЕРИИ

А.Н. Миков<sup>1</sup>, А.С. Полякова<sup>1</sup>, Е.Е. Шарапова<sup>1</sup>, Г.П. Арапиди<sup>2,3,4</sup>, П.Р. Подлесный<sup>2,3</sup>, Я.В. Бершадский<sup>3,4</sup>, Э.В. Бочаров<sup>3,4</sup>, О.М. Алёхина<sup>1</sup>, В.М. Говорун<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва; <sup>2</sup>ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва; <sup>3</sup>Московский физико-технический институт (НИУ), Долгопрудный; <sup>4</sup>ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

*Mycoplasma gallisepticum* – небольшая бактерия, линейные размеры которой варьируют в пределах 0,4-0,7 мкм; размер генома порядка 996 400 п.о., в котором всего 742 предполагаемых кодирующих генов. Бактерии рода *Mycoplasma* могут служить модельными объектами системной и синтетической биологии, поскольку фактически являются живыми примерами минимальной клетки, в которой формальная редукция генов и функций доведена до максимума.

Центральной цепочкой биохимического функционирования *M. gallisepticum* является гликолиз. Особенности гликолиза таких бактерий как *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* относительно неплохо изучены, однако про микоплазмы в этом контексте известно мало. Интересно разобраться, как меняются особенности регуляции гликолиза при переходе от «условно-сложных» бактерий типа *Escherichia coli* к таким минимальным клеткам как *M. gallisepticum*.

Все ферменты гликолитической цепочки бактерии *M. gallisepticum* были получены в гетерологической системе экспрессии в *E. coli* BL-21 с помощью плазмид на основе вектора pET-15b и очищены с помощью металл-хелатной FPLC хроматографии. Были проведены кинетические исследования реакций, катализируемых ферментами гликолиза *M. gallisepticum*. Реакции, в которых не выделяется и не расходуется АТФ, а также не образуется НАДН, были исследованы методом ядерного магнитного резонанса. Реакция глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (ГАПД) отслеживалась по накоплению НАДН (флуоресценция). Реакции с участием АТФ исследовались с использованием комбинации остановки процесса ДМСО и последующего проведения люциферазной реакции.

Помимо заурядного факта замедления роста скорости реакции по закону Михаэлиса–Ментен, было показано явление ингибирования реакций ферментов ГАПД и пируваткиназы (ПиК) их собственными субстратами. Значения констант ингибирования оказались необычно близкими к константам Михаэлиса. Подобное ингибирование не характерно для бактериальных ГАПД и ПиК. Это может быть случайным любопытным фактом, а может быть важным регуляторным рычагом в биохимических процессах *M. gallisepticum*. Эти аспекты исследований минимальных клеток и предлагается обсудить возле постера.

Данная работа выполнена при поддержке службы Роспотребнадзора ГЗ №1022040800170-3-1.6.23 «Создание искусственных клеточных систем»

## PECULIARITIES OF KINETIC PARAMETERS OF *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* GLYCOLYTIC ENZYMES AS A POTENTIAL BASIS FOR METABOLISM REGULATION OF THE WHOLE BACTERIUM

A.N. Mikov<sup>1</sup>, A.S. Polyakova<sup>1</sup>, E.E. Sharapova<sup>1</sup>, G.P. Arapidi<sup>2,3,4</sup>, P.R. Podlesnyi<sup>2,3</sup>, Ya.V. Bershatsky<sup>3,4</sup>, E.V. Bocharov<sup>3,4</sup>, O.M. Alekhina<sup>1</sup>, V.M. Govorun<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow; <sup>2</sup>Lopukhin Federal Research and Clinical Centre of Physical-Chemical Medicine, Moscow; <sup>3</sup>Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny; <sup>4</sup>Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

*Mycoplasma gallisepticum* is a small bacterium, the linear dimensions of which vary within 0.4-0.7 μm; the genome size is about 996,400 bp, in which there are only 742 putative coding genes. Bacteria of the genus *Mycoplasma* can serve as model objects of systems and synthetic biology, since they are, in fact, living examples of a minimal cell in which the formal reduction of genes and functions is brought to a maximum.

The central chain of biochemical functioning of *M. gallisepticum* is glycolysis. The features of glycolysis of such bacteria as *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* are relatively well studied, but little is known about *Mycoplasmas* in this context. It is interesting to understand how the features of glycolysis regulation change during the transition from "conditionally complex" bacteria like *Escherichia coli* to such minimal cells as *M. gallisepticum*.

All enzymes of the glycolytic chain of *M. gallisepticum* bacteria were obtained in a heterologous expression system in *E. coli* BL-21 using plasmids based on the pET-15b vector and purified by metal-chelate FPLC chromatography. Kinetic studies of reactions catalyzed by the enzymes of glycolysis of *M. gallisepticum* were carried out. Reactions in which ATP is not released or consumed, and NADH is not formed, were studied by nuclear magnetic resonance. The reaction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPD) was monitored by the accumulation of NADH (fluorescence). Reactions involving ATP were studied using a combination of stopping the process with DMSO and subsequent luciferase reaction.

In addition to the ordinary fact of the slowdown in the growth of the reaction rate according to the Michaelis-Menten law, the phenomenon of inhibition of the reactions of the enzymes GAPD and pyruvate kinase (PiK) by their own substrates was shown. The values of the inhibition constants turned out to be unusually close to the Michaelis constants. Such inhibition is not typical for bacterial GAPD and PiK. This may be an accidental curious fact, or it may be an important regulatory lever in the biochemical processes of *M. gallisepticum*. These aspects of minimal cell research are proposed to be discussed nearby the poster.

The study is supported by Rosпотребнадзор service state task No1022040800170-3-1.6.23

## СОЗДАНИЕ МУЛЬТИФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ, ИММОБИЛИЗОВАННОЙ НА ПОВЕРХНОСТЬ МИКРОЧАСТИЦ АГАРОЗЫ

A.S. Полякова, А.Н. Миков, Е.Е. Шарапова, В.М. Говорун

НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва

Одной из актуальных задач синтетической биологии является моделирование процессов, происходящих в живых системах, например, реакции гликолиза. Данный процесс является основополагающим метаболическим процессом в микроорганизмах рода *Mycoplasma*, которые можно рассматривать как минимальную клетку. Большой интерес представляет создание гликосомы – системы, состоящей из искусственно сконденсированных ферментов гликолиза рассматриваемого микроорганизма. Такие гликосомы можно использовать для моделирования кинетических режимов протекания гликолиза *in vitro*, а также в качестве элемента для создания искусственного прототипа живой клетки.

Ферменты гликолиза *Mycoplasma gallisepticum*, используемые в работе, были получены в рекомбинантном виде гетерологической ИПТГ-индуцированной экспрессией в клетках *E. coli* BL-21 с использованием векторов на основе плазмиды pET-15b. Полученные ферменты имели N-концевой 6-His-тэг, удаленный от активного центра, и очищались с помощью метал-хелатной хроматографии. В качестве носителя для ферментов предложено использовать микрочастицы агарозы размером 1–5 мкм, поверхность которых функционализирована нитрилтриуксусной кислотой (NTA) и ионами Ni<sup>2+</sup> (Abisense, Россия). Ферменты иммобилизуются на поверхности таких частиц путём образования комплексов 6-His-тэга с Ni-NTA-агарозой. С помощью данного способа достигается практически полная иммобилизация одновременно нескольких ферментов с заданной стехиометрией из раствора.

Были получены микрочастицы Ni-NTA-агарозы, на которые иммобилизованы как отдельные ферменты, так и группы ферментов гликолиза. Показана возможность протекания цепочек гликолитических реакций, например, превращения глюкозо-6-фосфата в 1,3-бисфосфоглицерат, 3-фосфоглицерата в лактат, а также полного гликолиза. Скорость реакций с иммобилизованными ферментами ниже, чем скорость аналогичных реакций с ферментами, находящимися в свободном виде. Одной из причин уменьшения скорости являются диффузные ограничения за счёт плотной упаковки ферментов на поверхности частиц. Однако сконденсированные таким образом мультиферментные системы можно считать аналогом плотно упакованных белковых систем внутри живых клеток.

Работа выполнена при поддержке службы Роспотребнадзора ГЗ №1022040800170-3-1.6.23 «Создание искусственных клеточных систем».

## CREATION OF A MULTI-ENZYME SYSTEM IMMOBILISED ON THE SURFACE OF AGAROSE MICROPARTICLES

A.S. Polyakova, A.N. Mikov, E.E. Sharapova, V.M. Govorun

Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow

One of the urgent tasks of synthetic biology is the modeling of processes occurring in living systems, for example, glycolysis reactions. This process is a fundamental metabolic process in microorganisms of the genus *Mycoplasma*, which can be considered as a minimal cell. It is of great interest to create an artificial "glycosome" - a system consisting of artificially condensed glycolytic enzymes of a given microorganism. Such glycosomes can be used for modelling the kinetic modes of glycolysis *in vitro* and as an element for creating an artificial prototype of a living cell.

All glycolytic enzymes of *Mycoplasma gallisepticum* used in this work were obtained in recombinant form by heterologous IPTG-induced expression in *E. coli* BL-21 cells using vectors based on plasmid pET-15b. The resulting enzymes had an N-terminal 6-His-tag outlined from the active center, and were purified by metal-chelate chromatography. Agarose microparticles of 1-5 μm in size, the surface of which is functionalized with nitrilotriacetic acid (NTA) and Ni<sup>2+</sup> ions (Abisense, Russia), were proposed as a carrier for enzymes. Enzymes are immobilized on the surface of such particles by formation of 6-His-tag complexes with Ni-NTA-agarose. With this method, almost complete immobilization of several enzymes with a given stoichiometry from solution is achieved simultaneously.

Pools of Ni-NTA-agarose microparticles were obtained on which both individual enzymes and groups of *Mycoplasma* glycolytic enzymes were immobilized. The possibility of glycolytic chain reactions, such as conversion of glucose-6-phosphate into 1,3-bisphosphoglycerate, 3-phosphoglycerate into lactate, as well as complete glycolysis was shown. It is worth to note that the reaction rate with immobilized enzymes is lower than the rate of similar reactions with non-immobilized enzymes. One of the reasons for the reduced rate is diffusion limitations due to the dense packing of enzymes on the particle surface. However, multienzyme systems condensed in this way can be considered as an analogue of densely packed protein systems inside living cells.

The study is supported by Rosпотребнадзор service state task No1022040800170-3-1.6.2316:36.

## РЕКОНСТРУКЦИЯ МАТЕМАТИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ В *ESCHERICHIA COLI* K-12 ШТАММА В-6195

Т.Н. Лахова<sup>1</sup>, Ф.В. Казанцев<sup>1,2</sup>, А.М. Мухин<sup>1</sup>, Д.Ю. Ощепков<sup>1</sup>, С.А. Лашин<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Курчатовский геномный центр Института цитологии и генетики СО РАН; <sup>2</sup>Новосибирский государственный университет, Новосибирск

На сегодняшний день *Escherichia coli* является самым изучаемым модельным организмом, используя различные омикные технологии. Однако до сих пор не полностью решена задача о полном описании генетической регуляции. Более подробное описание позволит выявить не прямые связи влияния тех или иных факторов на протекания процессов в бактерии, а также появится дополнительно понимание для последующих модификаций в бактерии.

В рамках работы для демонстрации метода был выбран штамм В-6195 из базы данных Курчатовского геномного центра ИЦиГ СО РАН. Для него в базе данных предоставлена сборка и первичная аннотация генома. Данный геном относится к бактерии *Escherichia coli* K-12 по результатам таксономического поиска по БД Silva. Идея метода заключается в том, чтобы, имея только геномную информацию о бактерии, построить транскрипционную регуляторную сеть (ТРС), на основе которой сгенерировать фреймовые математические модели, описывающие регуляцию. Первоначально анализируемый геном дополнительно размечался транскрипционными факторами (ТФ) и их сайтами связывания (ССТФ), затем из найденной и предсказанной информации составлялась ТРС бактерии в виде графа. Далее на основе сети генерируются фреймовые математические модели. Каждая модель соответствует описанию регуляции с одного оперона. Таким образом мы имеем список наиболее возможных ТФ, ТРС бактерии, а также фреймовые модели на каждый оперон.

Для штамма В-6195 было найдено 28 уникальных ТФ с  $e$ -value ниже, чем  $7 \cdot [10^{-50}]$ , и процентом совпавших аминокислот более 79. Было предсказано 2194 оперона, для которых были отобраны промоторные области для предсказания ССТФ. На основе этой информации в Cytoscape визуализирована ТРС В-6195, где вершинами являются найденные и предсказанные ТФ, опероны, гены-мишени, а рёбрами – процессы (синтез, регуляция). Данная сеть была редуцирована до сети, в которой остаются только опероны, на которые приходится регуляция ТФ. На основе такой сети были сгенерированы фреймовые математические модели.

*Работа выполнена за счет финансирования Курчатовского геномного центра ИЦиГ СО РАН № 075-15-2019-1662.*

## RECONSTRUCTION OF MATHEMATICAL MODELS OF TRANSCRIPTION REGULATION IN *ESCHERICHIA COLI* K-12 STRAIN В-6195

T.N. Lakhova<sup>1</sup>, F.V. Kazantsev<sup>1,2</sup>, A.M. Mukhin<sup>1</sup>, D.Yu. Oshchepkov<sup>1</sup>, S.A. Lashin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Kurchatov Genomic Center of the Institute of Cytology and Genetics, SB RAS; <sup>2</sup>Novosibirsk State University, Novosibirsk

To date, *Escherichia coli* is the most studied model organism using various omics technologies. However, the task of a complete description of genetic regulation has not yet been completely solved. A more detailed description will reveal indirect relationships of the influence of certain factors on the processes in the bacterium, as well as provide additional grounds for subsequent modifications of the bacterium.

In the study, strain В-6195 from the database of the Kurchatov Genomic Center of the Institute of Genomics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences was selected to demonstrate the method. Genome assembly and primary genome annotation were provided for it in the database. This genome belongs to the bacterium *Escherichia coli* K-12 according to the results of a taxonomic search of the Silva database. The idea of the method is to construct a transcriptional regulatory network (TRN) with only genomic information about the bacterium, from which to generate frame-based mathematical models describing regulation.

Initially, the analyzed genome was additionally labeled with transcription factors (TFs) and their binding sites (TFBSs), then the bacterial TRN in the form of a graph was compiled from the found and predicted information. Further, frame-based mathematical models are generated based on the network. Each model corresponds to the description of regulation from one operon. Thus, we have a list of the most possible TFs, bacterial TRN, and frame models for each operon.

For strain В-6195, 28 unique TFs were found with  $e$ -values lower than  $7 \cdot [10^{(-50)}]$  and a percentage of matched amino acids greater than 79. A total of 2194 operons were predicted, for which promoter regions were selected for TFBSs prediction. Based on this information, the В-6195 TRN was visualized in Cytoscape, where the vertices are the found and predicted TFs, operons, and target genes, and the edges are the processes (synthesis, regulation). This network was reduced to a network in which only operons that are responsible for TF regulation remain. Frame-based mathematical models were generated on the basis of such a network. *The study is supported by the Kurchatov Genomic Center of the Institute of Cytology and Genetics SB RAS No. 075-15-2019-1662.*

## ИЗУЧЕНИЕ ГЛИКОЛИЗА БАКТЕРИИ *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* ПРИ ПОМОЩИ МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

П.Р. Подлесный<sup>1</sup>, Г.П. Арапиди<sup>1</sup>, А.Н. Миков<sup>2</sup>, В.М. Говорун<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА; <sup>2</sup>НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва

Математическое моделирование играет важную роль в изучении метаболизма отдельной клетки. Объединяя экспериментальные данные с теоретическими знаниями о метаболизме, вычислительная модель позволяет получить не только качественное, но и часто количественное представление о метаболических реакциях и механизмах их регуляции. В данной работе нами была поставлена цель реализовать математическую модель гликолиза бактерии *Mycoplasma gallisepticum*. Сперва требовалось выбрать метод математического моделирования, наиболее подходящий для нашей задачи. После анализа литературы мы остановились на кинетическом подходе, т.е. описании моделируемой системы в терминах обыкновенных дифференциальных уравнений. *Ab initio* модель была реализована в среде MATLAB SimBiology (MathWorks) с поддержкой формата SBML. Имея функционирующую модель, мы были заинтересованы в том, чтобы проверить ее способность симулировать различные режимы гликолиза. Получение осцилляций представляло особый интерес, поскольку гликолитические колебания наблюдали экспериментально как в эукариотических, так и в прокариотических клетках.

На основе анализа энзимологической базы данных BRENDA для каждого параметра модели (константы Михаэлиса и числа оборотов ферментов) был получен биологически реалистичный диапазон значений. Внутри найденных границ с помощью стохастического алгоритма глобальной оптимизации, particle swarm optimization, осуществили поиск параметров, обуславливающих возникновение колебаний. В результате нам удалось получить набор биологически правдоподобных параметров, при которых мы наблюдали устойчивые колебания, что демонстрирует способность нашей модели симулировать сложные метаболические процессы.

Тем самым мы показали, что выбранный метод моделирования пригоден для решения поставленной задачи. Следующим этапом исследования стало использование экспериментальных данных о кинетике ферментов гликолиза *Mycoplasma gallisepticum*. На основании полученных экспериментальных данных мы уточнили кинетику отдельных реакций в нашей модели с тем, чтобы добиться наилучшего приближения моделируемой динамики к экспериментальным данным. Мы собрали отъюстированные реакции в единую модель, пригодную для дальнейшего изучения метаболизма *Mycoplasma gallisepticum*.

## STUDY OF GLYCOLYSIS IN THE BACTERIUM *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* USING MATHEMATICAL MODELLING

P. Podlesnyi<sup>1</sup>, G. Arapidi<sup>1</sup>, A. Mikov<sup>2</sup>, V. Govorun<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency; <sup>2</sup>Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow

Mathematical modelling plays an important role in studying metabolism of an individual cell. Combining experimental data with theoretical knowledge, a computational model allows to get qualitative and often quantitative representation of metabolic processes and underlying regulation mechanisms. In this work, we set a goal to create a mathematical model of glycolysis in the bacterium *Mycoplasma gallisepticum*. First, we had to choose a mathematical modelling method – the most suitable for our goal. Having conducted literature analysis, we picked out the kinetic approach, i.e., we described the simulated system in terms of ordinary differential equations. The *ab initio* model was implemented in the MATLAB SimBiology (MathWorks) environment with SBML format support. With the functioning model at hand, we were interested in testing its ability to simulate various regimes of glycolysis. An oscillatory regime was of particular interest, because glycolytic oscillations were observed experimentally in both eukaryotic and prokaryotic cells.

Based on the analysis of the BRENDA enzymological database, a biologically realistic range of values was obtained for each parameter of the model (the Michaelis constants for metabolites and turnover numbers for enzymes). Inside the found boundaries we searched for parameters that can bring the occurrence of oscillations. We used a stochastic global optimization algorithm, particle swarm optimization, to accomplish this task.

As a result, we were able to obtain a set of biologically plausible parameters under which stable oscillations emerged in the modelled system. So, we have demonstrated the ability of our model to simulate complex metabolic processes and also have shown that the chosen modelling method is suitable for our task. For the next stage of the study, we used experimental data on the kinetics of *Mycoplasma gallisepticum* glycolysis enzymes. Based on obtained experimental data, we refined the kinetics of individual reactions in our model in order to achieve the best approximation of the simulated dynamics to the experimental data. We have unified the studied reactions into a single model suitable for further study of *Mycoplasma gallisepticum* metabolism.



## ЛЕКАРСТВО БУДУЩЕГО ЗАЛОЖЕНО В ГЕНАХ: НЕВИРУСНАЯ ДОСТАВКА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

**С.А. Кондратьева, О.А. Безбородова, Е.Д. Сverdlov, И.В. Алексеенко**

*ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*

Генная терапия – быстрорастущая область медицины со значительными достижениями в последнее десятилетие. В настоящее время одобрено 22 препарата на основе генной терапии регуляторами США, Европейского союза, Китая и Российской Федерации. Сегодня, примерно в 70% клинических испытаний генной терапии используются вирусные векторы. Однако, вирусные векторы обладают рядом ограничений, включающими низкую пакующую емкость, низкую безопасность и иммуногенность. Например, несмотря на успех препаратов на основе аденоассоциированных вирусов, в настоящее время до 50% пациентов исключены из лечения из-за иммунитета к вирусным капсидам. Невирусные векторы, напротив, имеют высокую пакующую емкость и низкую иммуногенность. Таким образом, невирусные векторы имеют высокий потенциал для клинической разработки и применения.

Невирусный генотерапевтический препарат АнтионкоРАН-М (стимотимаген кополимерплазмид) представляет собой комплекс невирусного полимерного носителя и плазмидной ДНК, несущей гены тимидинкиназы вируса простого герпеса и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека. В настоящее время завершены клинические испытания (КИ) I фазы, где была оценена безопасность, переносимость и фармакокинетика АнтионкоРАН-М у пациентов с солидными опухолями, у которых были исчерпаны все методы традиционного лечения. В результате проведенного исследования не было отмечено ни одного случая дозо-лимитирующей токсичности (ДЛТ). У 7 (58,3%) пациентов были отмечены нежелательные явления (НЯ), потенциально связанные с терапией АнтионкоРАН-М, ни одно НЯ не привело к прекращению терапии. Несмотря на то, что I фаза КИ направлена на оценку безопасности (первичная цель исследования), в исследовании было оценено терапевтическое действие препарата АнтионкоРАН-М (вторичные цели исследования). На 90 день после введения препарата при оценке общего ответа у 2 (16,7%) пациентов отмечены частичные ответы, у 3 (25%) стабилизации процесса, у 5 (41,6%) пациентов прогрессирование, 1 пациент завершил участие в исследовании досрочно, 1 потерял для наблюдения. При этом у 8 (66,7%) против 2 (16,7%) пациентов на день 90 не отмечено возникновение новых очагов.

## FUTURE MEDICINE IS IN IN GENES: NON-VIRAL DELIVERY OF NUCLEIC ACIDS

**S.A. Kondratieva, O.A. Bezborodova, E.D. Sverdlov, I.V. Alekseenko**

*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow*

Gene therapy is a rapidly growing field of medicine with significant advances in the last decade. Currently, 22 gene therapy drugs have been approved by regulators in the United States, the European Union, China, and the Russian Federation. Today, approximately 70% of gene therapy clinical trials use viral vectors. However, viral vectors have several limitations, including low packaging capacity, poor safety, and immunogenicity. For example, despite the success of adeno-associated virus-based drugs, up to 50% of patients are currently excluded from treatment due to immunity to viral capsids. In contrast, non-viral vectors have high packaging capacity and low immunogenicity. Thus, non-viral vectors have high potential for clinical development and application. The non-viral gene therapy drug AntionkoRAN-M (stimotimagen copolymerplasmid) is a complex of a non-viral polymer carrier and plasmid DNA carrying the genes of the herpes simplex virus thymidine kinase and human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.

Currently, phase I clinical trials (CT) have been completed, where the safety, tolerability and pharmacokinetics of AntionkoRAN-M were assessed in patients with solid tumors who had exhausted all traditional treatment methods. As a result of the study, no cases of dose-limiting toxicity (DLT) were noted. Adverse events (AE) potentially associated with AntionkoRAN-M therapy were noted in 7 (58.3%) patients; none of the AEs led to discontinuation of therapy. Despite the fact that the phase I clinical trial is aimed at assessing safety (the primary objective of the study), the study assessed the therapeutic effect of AntionkoRAN-M (secondary objectives of the study). On day 90 after the administration of the drug, when assessing the overall response, 2 (16.7%) patients showed partial responses, 3 (25%) showed stabilization of the process, 5 (41.6%) patients showed progression, 1 patient completed the study early, and 1 was lost to follow-up. At the same time, no new lesions were observed on day 90 in 8 (66.7%) versus 2 (16.7%) patients.

## ВЫЯВЛЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ МИШЕНЕЙ ДЛЯ БЛОКИРОВКИ АКТИВНОСТИ ZFTA-СЛИЯНИЙ, ДЕЙСТВУЮЩИХ В КАЧЕСТВЕ ДВИЖУЩИХ СИЛ РАЗВИТИЯ СУПРАТЕНТОРИАЛЬНЫХ ЭПЕНДИМОМ

**К.В. Оконечников**

*Детский онкологический центр Хоппа, Гейдельберг, Германия*

Эпендимомы, нейроэпителиальные злокачественные опухоли центральной нервной системы, демонстрируют противоречивые ассоциации между гистологической классификацией и исходом заболевания, но недавние геномные исследования позволили разделить их на молекулярные группы супратенториальные, задней черепной ямки и спинного мозга с четкими клиническими и прогностическими свойствами. Супратенториальные эпендимомы классифицируются на молекулярные группы на основании наличия генов слияния ZFTA-RELA, YAP1-связанных или их отсутствия. Благодаря анализу расширенных данных метилирования и экспрессии генов в обширной когорте пациентов с супратенториальными эпендимомами были выявлены отдельные новые подгруппы со специфичными эпендимальными и другими гистологическими особенностями. В этих подгруппах были выявлены альтернативные транслокации, все из которых имели ZFTA в качестве партнера по слиянию. Функциональные эксперименты на мышинных моделях показали, что соматическая сверхэкспрессия новых идентифицированных генов слияния, связанных с ZFTA, в развивающейся коре головного мозга вызывает образование опухолей *in vivo*. Межвидовой сравнительный биоинформатический анализ подтвердил соответствие моделей реальным опухолям и идентифицировал GLI2 как ключевой регулятор нисходящего потока в этих опухолях. Таргетинг GLI2 с помощью триоксида мышьяка значительно увеличил выживаемость в опухолевых моделях животных, что указывает на потенциальную терапевтическую уязвимость в этих опухолях.

## DETECTION OF POTENTIAL TREATMENT TARGETS TO BLOCK THE ACTIVITY OF ZFTA-FUSIONS ACTING AS THE DRIVERS IN THE DEVELOPMENT OF SUPRATENTORIAL EPENDYMOMAS

**K. Okonechnikov**

*KiTZ, Heidelberg, Germany*

Ependymomas, neuroepithelial malignancies of the central nervous system, have shown inconsistent associations between histologic grading and patient outcomes, but recent genomic studies have enabled the subdivision of supratentorial, posterior fossa and spinal into molecularly distinct groups with clear clinical and prognostic differences. Supratentorial ependymoma brain tumors are typically classified into molecular groups based on the presence of ZFTA-RELA, YAP1-related gene fusions, or fusion-negative subependymomas. Through an unbiased computational analysis of methylation and gene expression data in an extensive patient data cohort of supratentorial ependymomas, distinct novel clusters comprising tumors with ependymal and other histologic features were identified. These clusters harbored alternative translocations, all sharing ZFTA as a fusion partner. Functional experiments in mouse models revealed that somatic overexpression of novel identified ZFTA-related fusion genes in the developing cerebral cortex induces tumor formation *in vivo*. Cross-species comparative bioinformatics analysis verified correspondence of the models to real tumors and identified GLI2 as a key downstream regulator in these tumors. Targeting GLI2 with arsenic trioxide significantly extended survival in tumor-bearing animal models, suggesting a novel therapeutic vulnerability in ZFTA fusion-positive tumors.

## ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ НАНОБИОТЕХНОЛОГИЙ В ОБЛАСТИ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ В.О. Шипунова

*Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный*

Стремительное развитие нанобиотехнологий открывает новые горизонты в биомедицине, особенно в области лечения онкологических заболеваний. Развитие данной области позволило разработать множество систем, которые могут эффективно доставлять терапевтические соединения к опухолям, минимизируя при этом системную токсичность традиционных химиотерапевтических препаратов. На сегодняшний день уже существует множество наноформуляций, которые активно применяются в клинической практике для диагностики и лечения различных заболеваний.

Однако, несмотря на все достижения, потенциал адресной доставки препаратов к целевым тканям ещё не реализован в полной мере. На данный момент не существует ни одной допущенной адресной наноформуляции для терапевтических применений, что вызывает определенный скепсис среди исследователей и врачей. Исследования показывают, что эффективность адресной доставки может быть ограничена, особенно для медленно растущих опухолей у человека, где так называемый EPR-эффект (эффект повышенной проницаемости и удержания сосудов опухоли) практически не проявляется.

В настоящем докладе будет представлен цикл исследований, направленных на улучшение методов диагностики и лечения онкологических заболеваний с использованием нанобиотехнологий. Основная часть исследований направлена на то, чтобы максимизировать эффективность наноструктур, включая адресные наноформуляции, и минимизировать побочные эффекты традиционных методов онкотерапии. Особое внимание уделяется разработке полимерных наноформуляций, которые могут стать "магической пулей" – идеальным средством, способным селективно воздействовать на опухолевые ткани, не вызывая при этом нежелательных эффектов. Данные исследования могут в значительной степени повлиять на развитие подходов к онкотерапии, сделав их более безопасными и эффективными для пациентов.

*Исследование выполнено при поддержке Минобрнауки РФ, соглашение № 075-03-2024-117, проект FSMG-2023-0015.*

## ADVANCEMENTS AND FUTURE DIRECTIONS IN NANOBIO TECHNOLOGY FOR TARGETED DRUG DELIVERY

**V.O. Shipunova**

*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*

The rapid development of nanobiotechnology is paving the way for new possibilities in biomedicine, particularly in cancer treatment. This field has facilitated the creation of numerous systems designed to effectively deliver therapeutic agents directly to tumors while minimizing the systemic toxicity associated with conventional chemotherapeutic drugs. Currently, various nanoformulations are actively employed in clinical practice for the diagnosis and treatment of a range of diseases.

However, despite these significant achievements, the full potential of targeted drug delivery to specific tissues remains unrealized. At present, there is not a single approved targeted nanoformulation for therapeutic applications, which has led to some skepticism among researchers and clinicians. Studies indicate that the effectiveness of targeted delivery may be limited, particularly for slow-growing human tumors, where the so-called enhanced permeability and retention (EPR) effect is often negligible.

This report will present a series of studies focused on enhancing the methods of cancer diagnosis and treatment through nanobiotechnology. The majority of the research aims to optimize the efficacy of nanostructures, including targeted nanoformulations, while minimizing the side effects associated with traditional cancer therapies. Special emphasis is placed on the development of polymer-based nanoformulations that have the potential to serve as a "magic bullet"—an ideal solution capable of selectively targeting tumor tissues without eliciting adverse effects. These studies could significantly influence the evolution of cancer treatment strategies, rendering them safer and more effective for patients.

*Different parts of this study were supported by MSHE of RF, agreement 075-03-2024-117, project FSMG-2023-0015.*

## АНАЛИЗ ПРОРЫВНЫХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, ОДОБРЕННЫХ ЗА РУБЕЖАМИ РОССИИ В 2022–2024 ГОДАХ

**К.В. Балакин**

*Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный*

Особенностью настоящего момента является фактическое прекращение ведущими мировыми разработчиками, в частности, компаниями Большой Фармы, с начала 2022 года клинических исследований фазы III своих инновационных лекарственных препаратов в Российской Федерации. В соответствии со статистическими данными, все лекарственные препараты, зарегистрированные в США, ЕС, Японии и других недружественных России странах после начала 2022 года, с высокой вероятностью уже не будут доступны для здравоохранения РФ. Эта ситуация несет в себе высокие риски, связанные с нарастающим дефицитом в РФ инновационных средств терапии последних поколений.

В работе систематизированы и проанализированы сведения о низкомолекулярных лекарственных препаратах для терапии социально значимых заболеваний, зарегистрированных в указанных странах в период с 2019 по 2024 годы, которые не были впоследствии зарегистрированы в РФ, с фокусом на высокоинновационных препаратах прорывного характера. Исследование основано на официальных данных Государственного реестра лекарственных средств РФ, Государственного реестра разрешений на проведение клинических исследований лекарственных средств, а также ведущих зарубежных национальных регуляторов США, ЕС и Японии. Проанализированы особенности медицинско-химического дизайна, аспекты инновационности, ключевые биомишени и основные терапевтические индикации новых препаратов. Исследование характеризует зоны потенциального риска для отечественного здравоохранения в связи с резко обострившейся военно-политической ситуацией. В частности, обращает внимание преобладание в проанализированной выборке средств терапии онкологических заболеваний, в том числе их резистентных форм, устойчивых к лекарственным средствам терапии предшествующих поколений. Обсуждаются способы действий в данной непростой ситуации, которые позволят обеспечить технологический суверенитет нашей страны в сфере лекарственного обеспечения. Спектр потенциальных возможностей простирается от введения процедуры принудительного лицензирования на необходимые для здравоохранения РФ лекарственные препараты с организацией их производства на территории РФ до запуска в университетах и академических институтах страны систематического цикла разработки инновационных патентоспособных аналогов прорывных зарубежных препаратов.

## ANALYSIS OF BREAKTHROUGH SMALL MOLECULE DRUGS APPROVED OUTSIDE RUSSIA IN 2022-2024

**K.V. Balakin**

*Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny, Russian Federation*

The peculiarity of the present moment is the actual termination by the world's leading pharmaceutical developers, in particular, Big Pharma companies, from the beginning of 2022 of Phase III clinical trials of their innovative medicines in the Russian Federation. According to statistical data, all drugs registered in the USA, EU, Japan and other countries unfriendly to Russia after the beginning of 2022 will most likely no longer be available to the Russian healthcare system. This situation carries high risks associated with the growing shortage of innovative therapies of the latest generations in the Russian Federation.

The paper systematizes and analyzes data on small molecule drugs for the therapy of socially significant diseases registered in the above countries in the period from 2019 to 2024, which were not subsequently registered in the Russian Federation, with a focus on highly innovative breakthrough drugs. The study is based on official data from the State Register of Medicinal Products of the Russian Federation, the State Register of Authorizations for Clinical Trials of Medicinal Products, as well as official data from leading foreign national regulators in the US, EU and Japan. The features of medchem design, aspects of innovation, key biotargets and main therapeutic indications of new drugs are discussed. The study characterizes the areas of potential risk for domestic healthcare in connection with the sharply aggravated military and political situation. In particular, it draws attention to the prevalence of cancer therapeutics in the analyzed sample, including their resistant forms, resistant to drug therapies of previous generations. The ways of action in this difficult situation are discussed, which will allow to ensure the technological sovereignty of our country in the field of drug supply. The range of potential opportunities extends from the introduction of a compulsory licensing procedure for medicines necessary for the Russian health care with the organization of their production on the territory of the Russian Federation to the launch of a systematic cycle of development of innovative patentable analogues of breakthrough drugs in the national universities and academic institutions.

## ИННОВАЦИОННЫЙ ЛЕКАРСТВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПСИХИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ

**Е.В. Якубова, А.В. Иващенко, А.А. Иващенко**

*Группа компаний ХимРар, Химки*

В 2023 году на рынок выведен препарат АВИАНДР® (МНН: Маритупирдин) для лечения генерализованного тревожного расстройства и расстройств адаптации, в том числе вызванных перенесенным COVID-19. Полный цикл разработки, начиная с синтеза молекулы, а также клинические исследования и производство препарата осуществлялись на территории Российской Федерации.

АВИАНДР® обладает мультитаргетной активностью: ингибирует адренергические, дофаминовые, серотониновые и гистаминовые рецепторы, что обуславливает наличие анксиолитических, антидепрессивных, антиастенических и прокогнитивных свойств препарата.

Эффективность и безопасность АВИАНДР® были доказаны при генерализованном тревожном расстройстве в двойном слепом плацебоконтролируемом рандомизированном исследовании, в котором через 8 недель лечения отмечено значимое преимущество АВИАНДР® над плацебо. Психические компоненты тревоги снижались с первого дня на протяжении всего периода лечения (наблюдалось снижение уровня тревоги на 42% через 8 недель и на 69% после 24 недель терапии) и после отмены препарата. АВИАНДР® в суточной дозе 40 мг уменьшал сонливость по сравнению с исходным уровнем, являлся безопасным, хорошо переносимым препаратом, не вызывающим серьезных нежелательных явлений, привыкания или признаков синдрома отмены после завершения лечения. При приеме препарата в дозе 40 мг/сут нежелательные явления встречались не чаще чем при плацебо. При генерализованном тревожном расстройстве оптимально использование АВИАНДР® в дозе 40 мг/сут в течение не менее чем 12 недель. Проведенное клиническое исследование АВИАНДР® у 219 пациентов с расстройством адаптации показало его эффективность у 83% пациентов в отношении снижения интенсивности тревоги на 50% и более уже после 4-недельной терапии. Во всех клинических исследованиях были продемонстрированы анксиолитический, антиастенический, антидепрессивный и прокогнитивный эффекты, повышение социальной активности пациентов, а также благоприятный профиль безопасности, отсутствие привыкания и синдрома отмены.

Полученные результаты позволяют рекомендовать препарат АВИАНДР® при генерализованном тревожном расстройстве, тревожном синдроме и нарушении адаптации, а также в комплексной терапии стресс-ассоциированных расстройств.

## INNOVATIVE NEW GENERATION DRUG FOR THE TREATMENT OF MENTAL DISORDERS

**E.V. Yakubova, A.V. Ivaschenko, A.A. Ivaschenko**

*Chemrar Group, Chimki*

In 2023 the medicine AVIANDR® (INN: Maritupirdine) for the treatment of generalized anxiety disorder and adaptation disorders, including caused by COVID-19. The full cycle of development: active pharmaceutical substance, finished drug product, non-clinical trials and clinical trials were carried out in the Russian Federation.

AVIANDR® has multitarget activity: it inhibits adrenergic, dopamine, serotonin and histamine receptors, which determines anxiolytic, antidepressant, antiasthenic and procognitive effects.

The efficacy and safety of AVIANDR® were proved in generalized anxiety disorder in a double-blind placebo-controlled randomized trial, in which a significant advantage of AVIANDR® over placebo was observed after 8 weeks of treatment. Mental components of anxiety were reduced from day one throughout the treatment period (there was a 42% reduction in anxiety levels after 8 weeks and a 69% reduction after 24 weeks of therapy) and after ending of therapy. AVIANDR® at a daily dose of 40 mg reduced somnolence compared to baseline, was a safe, well tolerated medicine that did not cause serious adverse events, addiction or withdrawal syndrome after completion of therapy. When the medicine was administered at a dose of 40 mg/day, adverse events frequency was comparable with placebo. So, in generalized anxiety disorder recommended dose of AVIANDR® is 40 mg/day for at least 12 weeks. There was efficacy in 83% of patients in reducing anxiety level by 50% or more after 4 weeks of therapy in clinical trial of AVIANDR® within 219 patients. Anxiolytic, anti-asthenic, antidepressant and procognitive effects, increased social activity of patients, as well as a favorable safety profile, absence of addiction and withdrawal syndrome were demonstrated in all clinical trials.

The results obtained allow to recommend AVIANDR® in generalized anxiety disorder, anxiety syndrome and adaptation disorder, as well as in the complex therapy of stress-associated disorders

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ НОВЫХ АГЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМ МЕХАНИЗМОМ ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

**В.С. Покровский**

*НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина МЗ РФ; Российский университет дружбы народов, Москва*

На моделях рака предстательной железы проведены исследования соединений различного механизма действия: (1) конъюгаты с ПСМА-специфичными лигандами абиратерона, доцетаксела, монометилауристатина Е (синтезированы на Химическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова); (2) стероидные ингибиторы СYP17A1 алсевирон (синтезированы в ИБМХ им. В.Н. Ореховича) а также его аналог абиратерон; (3) фармакологические пары метионин-гамма-лиаза *C. novyi* C115H, конъюгированная с дайдзеином, + сульфоксиды (получены в ИМБ РАН им. В.А. Энгельгардта). Оценена цитотоксическая (МТТ-тест, IC50) и противоопухолевая активность (по торможению роста подкожных ксенографтов, ТРО%), проведена оценка способности ингибиторов снижать активность ферментов и изменять активность экспрессии генов ферментов стероидогенеза, оценено влияние на клеточный цикл и апоптоз. Конъюгаты цитостатиков с ПСМА-специфичными лигандами обладают эффективностью на моделях DU-145 и 22Rv1 *in vivo*: ТРО конъюгата ПСМА-ММАЕ составляет 63-67%, конъюгата ПСМА-доцетаксел 59-66%, конъюгата ПСМА-абиратерон 65%. В концентрациях 5  $\mu\text{M}$  и 20  $\mu\text{M}$  алсевирон и абиратерон достоверно снижают активность СYP17A1. Продемонстрирована возможность снижения уровня тестостерона в плазме крови мышей под действием многократного введения алсевирона и абиратерона. На культурах клеток LNCaP, 22Rv1, DU145, PC3 продемонстрировано наличие цитотоксической активности алсевирона. IC50 при этом составили 35,9  $\mu\text{M}$ , 23,8  $\mu\text{M}$ , 22,9  $\mu\text{M}$  и 82  $\mu\text{M}$  для клеточных линий LNCaP, 22Rv1, DU145, PC3, соответственно. На ксенографтах DU-145 ТРО алсевирона составило 45% против 26% у абиратерона, на ксенографтах 22rv1 – 60% против 33%. Направленная доставка C115H МГЛ в составе фармакологической пары непосредственно к поверхности опухолевых клеток повышает цитотоксичность на культуре клеток предстательной железы 22Rv1 с IC50 (5,4 $\pm$ 0,2  $\mu\text{M}$ ) по сравнению с дипропилтиосульфатом, полученным при использовании неконъюгированной с дайдзеином пары C115H МГЛ + пропиин *in vitro* (IC50=66,4 $\pm$ 2,6  $\mu\text{M}$ ). Конъюгаты C115H МГЛ-Dz при введении пропиина катализируют реакцию  $\beta$ -элиминирования с образованием цитотоксического дипропилтиосульфата непосредственно на поверхности клеток 22Rv1. На модели ксенографтов 22Rv1 наиболее эффективной оказалась пара C115H МГЛ-Dz + пропиин: ТРО=70%;  $p=0,043$ .

*Исследования поддержаны Министерством науки и высшего образования Российской Федерации № 075-01551-23-00 (FSSF-2023-0006).*

## EXPERIMENTAL EVALUATION OF NEW AGENTS WITH DIFFERENT MECHANISMS OF ACTION FOR PROSTATE CANCER TREATMENT

**V.S. Pokrovsky**

*N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, People's Friendship University, Moscow, Russia*

A number of new compounds with diverse mechanisms of action have been studied in prostate cancer models: (1) conjugates of abiraterone, docetaxel, MMAE with PSMA-specific ligands (synthesized at the Chemistry Faculty of M.V. Lomonosov Moscow State University); (2) steroid CYP17A1 inhibitor alsevirone (synthesized in V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry); (3) pharmacological pairs methionine-gamma lyase *C. novyi* C115H, conjugated with daidzein, + sulfoxides (obtained in V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology). Cytotoxic (MTT-test, IC50) and anticancer activity (growth inhibition of subcutaneous xenografts) were evaluated, the ability of inhibitors to reduce enzyme activity and change the expression of genes of steroidogenesis, effects on the cell cycle and apoptosis were evaluated. Cytostatic conjugates with PSMA-specific ligands were effective against DU-145 and 22Rv1 models *in vivo*: TGI of conjugate of PSMA-MMAE is 63-67%, PSMA-docetaxel conjugate 59-66%, PSMA-Abiraterone conjugate 65%. Alsevirone and abiraterone are able to reduce CYP17A1 activity in concentrations of 5  $\mu\text{M}$  and 20  $\mu\text{M}$ . The reduction of testosterone in plasma of mice after multiple administration of alsevirone and abiraterone was demonstrated. Alsevirone cytotoxic activity was demonstrated in cell cultures LNCaP, 22Rv1, DU145, PC3. IC50 was 35.9  $\mu\text{M}$ , 23.8  $\mu\text{M}$ , 22.9  $\mu\text{M}$  and 82  $\mu\text{M}$  for the cell lines LNCaP, 22Rv1, DU145, PC3, respectively. In the DU-145 xenografts, alsevirone TGI was 45% versus 26% for abiraterone, and in the 22rv1 xenograft – 60% versus 33%. Targeted delivery of C115H MGL as a component of pharmacological pair directly to the surface of cancer cells increases cytotoxicity against prostate cancer cells 22Rv1 with IC50 (5.4 $\pm$ 0.2  $\mu\text{M}$ ) compared to dipropylthiosulfinate, obtained when using an unconjugated C115H MGL + propiin *in vitro* (IC50 = 66.4 $\pm$ 2.6  $\mu\text{M}$ ) with daidzein. C115H MGL-Dz conjugates catalyze the  $\beta$ -elimination reaction with formation of cytotoxic dipropylthiosulfinate directly on the 22Rv1 cells surface. The most effective pair C115H MGL-Dz + propiin reached TGI=70%;  $p=0.043$  on the 22Rv1 xenograft models.

*Experiments were supported by the Ministry of Science and Higher Education of Russia no. 075-01551-23-00 (FSSF-2023-0006).*

**РАЗРАБОТКА ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫХ И БЕЗОПАСНЫХ НПВС НА ОСНОВЕ ПИРИДОКСИНОВОГО СКАФФОЛДА**  
**М.Н. Агафонова, М.В. Пугачев, О.С. Васильева, Р.С. Павельев, Е.М. Фафанова, Н.В. Штырлин, С.В. Сапожников, Ю.Г. Штырлин**

*Казанский (Приволжский) федеральный университет, Научно-образовательный центр фармации, Казань*

Нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) являются одним из наиболее употребляемых во всем мире типом лекарственных средств, обладающих противовоспалительным, анальгезирующим и жаропонижающим действием. Однако, лечебное действие этих препаратов сопряжено со множеством побочных эффектов, самым серьезным из которых является поражение слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки. В этой связи разработка высокоэффективных и безопасных НПВС является актуальной задачей современного здравоохранения. Ранее в НОЦ фармации КФУ на основе пиридоксина было разработано бифармакофорное противовоспалительное средство KFU-01, содержащее в своей структуре четыре фрагмента известного НПВС – напроксена.

В ходе проведения официальных доклинических исследований в рамках ФЦП «Фарма 2020» было показано, что благодаря синергетическому действию пиридоксина и напроксена KFU-01 обладает существенно более высокой безопасностью (при пероральном приеме у крыс индекс ulcerогенности  $UD_{50} > 2000$  мг/кг,  $LD_{50} > 5000$  мг/кг) по сравнению с напроксеном ( $UD_{50} = 49$  мг/кг,  $LD_{50} = 620$  мг/кг). При этом по противовоспалительной активности KFU-01 не уступает напроксену.

Успешно зарекомендовавшая себя в рамках ФЦП «Фарма 2020» медицинско-химическая концепция разработки инновационных НПВС на основе пиридоксина и напроксена [1] получила свое дальнейшее развитие в последующей работе: синтезированы и исследованы биологические свойства бифармакофорных противовоспалительных лекарственных средств на основе пиридоксина и широко применяемого в медицинской практике кеторолака, который является самым эффективным неопиоидным анальгетиком.

Согласно результатам исследований *in vitro* и *in vivo* полученные трис- и тетракиспроизводные пиридоксина и кеторолака не уступают кеторолаку трометамину по анальгетической активности, но при этом значительно более безопасны ( $LD_{50}$  более 2000 мг/кг, тогда как  $LD_{50}$  кеторолака составляет 189 мг/кг).

*Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности № FZSM-2023-0010 и за счет гранта Российского научного фонда № 24-23-00350 (<https://rscf.ru/project/24-23-00350/>).*

1. Shtyrilin YG et al. *Russ. Chem. Bull.* 2019, 68(5): 911-945.

**DEVELOPMENT OF HIGHLY EFFECTIVE AND SAFE NSAIDS BASED ON PYRIDOXINE SCAFFOLD**

**M.N. Agafonova, M.V. Pugachev, O.S. Vasilyeva, R.S. Pavelyev, E.M. Fafanova, N.V. Shtyrilin, S.V. Sapozhnikov, Y.G. Shtyrilin**  
*Scientific and Educational Center of Pharmaceutics, Kazan (Volga region) Federal University, Kazan*

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are one of the most commonly used types of drugs worldwide with anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects. However, the therapeutic effect of these drugs is associated with many side effects. The most serious is damage to the mucous membrane of the stomach and duodenum. In this regard, the development of highly effective and safe NSAIDs is an urgent task of modern healthcare. Previously at the Scientific and Educational Center of Pharmaceutics Kazan Federal University a bipharmacophore anti-inflammatory drug (KFU-01) based on pyridoxine and four fragments of the well-known NSAID – naproxen was developed.

During official preclinical studies within the framework of the Federal Targeted Program «Pharma 2020» it was shown that due to the synergistic effect of pyridoxine and naproxen KFU-01 has significantly higher safety (orally administered to rats, the ulcerogenicity index  $UD_{50} > 2000$  mg/kg,  $LD_{50} > 5000$  mg/kg) compared to naproxen ( $UD_{50} = 49$  mg/kg,  $LD_{50} = 620$  mg/kg). At the same time KFU-01 is not inferior to naproxen in terms of anti-inflammatory activity.

The medicinal-chemical concept of developing innovative NSAIDs based on a pyridoxine scaffold, which has successfully proven itself within the framework of the Federal Target Program «Pharma 2020» [1], was developed in subsequent work. The biological properties of bipharmacophore anti-inflammatory drugs based on pyridoxine and widely used in medical practice were synthesized and studied ketorolac, which is the most effective non-opioid analgesic.

According to the results of *in vitro* and *in vivo* studies, the resulting tris- and tetraakis derivatives of pyridoxine and ketorolac are not inferior to ketorolac tromethamine in analgesic activity, but are much safer ( $LD_{50}$  more than 2000 mg/kg, while the  $LD_{50}$  of ketorolac is 189 mg/kg).

*The study was carried out with financial support from a subsidy allocated to Kazan Federal University for the state assignment in the sphere of scientific activities (project number FZSM-2022-0018) and Russian Science Foundation (RSF) supported 24-23-00350 (<https://rscf.ru/project/24-23-00350/>).*

1. Shtyrilin YG et al. *Russ. Chem. Bull.* 2019, 68(5): 911-945.

## НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА ИНГИБИТОРЫ ДВУХ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В КАЧЕСТВЕ УСОВЕРШЕНСТВОВАННЫХ СРЕДСТВ ТЕРАПИИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

И.В. Зуева, К.А. Петров, В.Э. Семенов

*Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова, ФИЦ Казанский научный центр РАН, Казань*

Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее распространенным многофакторным нейродегенеративным заболеванием, характеризующимся когнитивными нарушениями. Согласно «холинергической гипотезе» БА, заболевание характеризуется снижением уровня ацетилхолина в головном мозге. Однако, общепринятая на сегодняшний день стратегия лечения БА ингибиторами холинэстераз (ХЭ), не способна замедлить прогрессирование заболевания. Кроме холинергического дефицита, для БА характерно увеличение продукции  $\beta$ -амилоидного пептида (А $\beta$ ), который проявляет широкий спектр нейротоксических эффектов, усугубляя прогрессирование заболевания. При этом ацетилхолинэстераза (АХЭ) способствует образованию А $\beta$  фибрилл, связываясь с пептидом в области периферического анионного сайта (ПАС).

Целью данного исследования является расширение представлений о взаимодействии ХЭ и А $\beta$ , а так же целенаправленный поиск молекул, способных предотвратить образование комплекса ХЭ с А $\beta$ . Было показано, что А $\beta$  может действовать как положительный аллостерический модулятор каталитической активности ХЭ. Так, *in vitro* добавление 10 мкМ А $\beta$ 1-40 увеличивало каталитическую активность АХЭ и бутирилхолинэстеразы в 7,7 и 1,5 раза соответственно. Таким образом, активация ХЭ А $\beta$  пептидом может являться фактором, который способен дополнительно усиливать холинергический дефицит при БА. Можно предположить, что ингибиторы двух сайтов связывания, способные взаимодействовать как с ПАС так и с активным сайтом АХЭ, могут оказывать модифицирующие заболевание эффект, одновременно улучшая когнитивные функции и уменьшая патологии, вызванные взаимодействием АХЭ и А $\beta$ . Так, новый ингибитор двух сайтов связывания АХЭ на основе производных 6-метилурацила (соединение 3d) проявил ингибирующую активность в отношении индуцированной АХЭ агрегации А $\beta$ . После долгосрочного введения и последующей отмены 3d, была показана лучшая способность трансгенных мышей генотипа APP/PS1 к обучению в Т-лабиринте по сравнению с традиционным ингибитором донепезилом. Кроме того, 3d частично восстановил потерю синапсов, уменьшил количество А $\beta$  отложений в энторинальной коре и гиппокампе.

Таким образом, ингибиторы двух сайтов связывания АХЭ способны оказывать модифицирующее БА действие.

*Работа поддержана грантом Российского научного фонда №24-75-10086.*

## NEW INSIGHTS INTO DUAL BINDING SITE INHIBITORS OF ACETYLCHOLINESTERASE AS ENHANCED THERAPEUTICS FOR ALZHEIMER'S DISEASE

I.V. Zueva, K.A. Petrov, V.E. Semenov

*Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan*

Alzheimer's disease (AD) is the most common multifactorial neurodegenerative disease characterized by cognitive impairment. According to the "cholinergic hypothesis" of AD, the disease is characterized by a decreased level of acetylcholine in the brain. However, the currently accepted strategy of treating AD with cholinesterase (ChE) inhibitors is not able to slow the progression of the disease. In addition to cholinergic deficiency, AD is characterized by an increase in the production of  $\beta$ -amyloid peptide (A $\beta$ ), which exhibits a wide range of neurotoxic effects, exacerbating the disease's progression. It has been shown that acetylcholinesterase (AChE) promotes the formation of A $\beta$  fibrils by binding to the AChE peripheral anion site (PAS).

The aim of this study was to expand understanding of the interaction between ChE and A $\beta$  as a targeted search for new molecules that can prevent the formation of the ChE complex with A $\beta$ . It was shown that the A $\beta$  can act as a positive allosteric modulator of the catalytic activity of ChE. The 10  $\mu$ M A $\beta$ 1-40 increased the catalytic activity of AChE and butyrylcholinesterase *in vitro* by 7.7 and 1.5 times, respectively. Thus, activation of ChE by the A $\beta$  peptide can be the factor that enhances cholinergic deficiency in AD. It can be hypothesized that dual binding site inhibitors, capable of interacting with both PAS and the active site of AChE, may have disease-modifying effects, simultaneously improving cognition and reducing pathologies caused by the interaction of A $\beta$  and AChE. A new dual binding site inhibitor of AChE based on 6-methyluracil derivatives (compound 3d) exhibited an inhibitory activity toward AChE-induced A $\beta$  aggregation. It was shown that after long-term administration and subsequent withdrawal of 3d, transgenic APP/PS1 mice have better ability to learn in the T-maze, compared to the traditional inhibitor donepezil. Additionally, 3d partially reversed synapse loss, decreased the number of A $\beta$  deposits in the entorhinal cortex and hippocampus.

Thus, dual binding site inhibitor of AChE demonstrated a disease-modifying effect in animal model of AD.

*This work was supported by Russian Science Foundation grant № 24-75-10086.*



## РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОТИВОСУДОРОЖНЫХ ПРЕПАРАТОВ В РЯДУ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗОИЛПИРИДИНОВ, ГЕКСАГИДРОДИБЕНЗОФУРАНА И 4-ФЕНИЛПИРРОЛИДОНА

Г.В. Мокров, С.А. Литвинова, Е.А. Иванова, Т.А. Гудашева, Т.А. Воронина, В.Л. Дорофеев

*ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий, Москва*

По оценкам ВОЗ около 70 млн человек во всем мире страдают эпилепсией. В России в среднем регистрируется 3,4 случая эпилепсии на 1000 человек; при этом в нашей стране до сих пор отсутствуют собственные оригинальные противоэпилептические препараты (ПЭП). Часто эпилепсия сопровождается психическими и когнитивными расстройствами. Многие из применяемых ПЭП имеют серьезные побочные эффекты, такие как протривоожный потенциал, нарушение когнитивных функций, канцерогенные свойства. От 30 до 70% пациентов, страдающих эпилепсией, не отвечают на используемую терапию. В связи с этим актуальным является создание новых ПЭП, как превосходящих по эффективности известные, так и сочетающих противосудорожную активность с прокогнитивными, нейропротекторными и анксиолитическими эффектами.

Для конструирования новых молекул с противосудорожной активностью и дополнительными протекторными свойствами нами использовалась стратегия фармакофорного моделирования. В качестве фармакофорных единиц в дизайне были применены компоненты структур следующих классов соединений, обладающих антиэпилептическими свойствами: селективные ингибиторы обратного захвата серотонина; лиганды ГАМКА-,  $\sigma$ 1- и SV2A-рецепторов; GAT1-ингибиторы; блокаторы  $\text{Na}^+$ - и  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов; антагонисты АМРА-рецепторов; рацетамы и некоторые другие. В результате дизайна нами были предложены 3 новые фармакофорные модели потенциальных ПЭП, на основе которых были сконструированы новые группы соединений в ряду оксимов бензоилпиридинов, оксимов гексагидродибензофурана и 4 фенилпирролидона. В каждой группе было получено до 15 представителей. В стандартных фармакологических моделях на грызунах был осуществлен анализ противосудорожной, ноотропной, нейропротекторной, анальгетической, антиишемической и анксиолитической активности новых веществ. В результате были отобраны лидерные молекулы: производное 4 бензоилпиридина ГИЖ-298, эффективное в нескольких моделях эпилепсии и обладающее анксиолитической и анальгетической активностью; производное 4 фенилпирролидона ГИЖ 290, сочетающее противосудорожное и прокогнитивное действие; производное гексагидродибензофурана ГИЖ-272, сочетающее противосудорожные, нейропротекторные и антиишемические свойства. Эти соединения в настоящее время проходят расширенные фармакологические исследования.

## DEVELOPMENT OF NEW POTENTIAL ANTICONVULSANT DRUGS IN THE SERIES OF BENZOYLPIRIDINE DERIVATIVES, HEXAHYDRODIBENZOFURAN AND 4-PHENYLPYRROLIDONE

G.V. Mokrov, S.A. Litvinova, E.A. Ivanova, T.A. Gudasheva, T.A. Voronina, V.L. Dorofeev

*Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow*

According to WHO estimates, about 70 million people worldwide suffer from epilepsy. In Russia, on average, 3.4 cases of epilepsy per 1000 people are registered; however, our country still does not have its own original antiepileptic drugs (AEDs). Epilepsy is often accompanied by mental and cognitive disorders. Many of the AEDs used have serious side effects, such as anxiety potential, cognitive impairment, and carcinogenic properties. From 30 to 70% of patients suffering from epilepsy do not respond to the therapy used. In this regard, the creation of new AEDs is actual, both superior in effectiveness to the known ones and combining anticonvulsant activity with procognitive, neuroprotective and anxiolytic effects. To design new molecules with anticonvulsant activity and additional protective properties, we used the pharmacophoric modeling strategy. The following classes of compounds with antiepileptic properties were used as pharmacophoric units in the design: selective serotonin reuptake inhibitors; GABAA-,  $\sigma$ 1-, and SV2A-receptor ligands; GAT1-inhibitors;  $\text{Na}^+$ - and  $\text{Ca}^{2+}$ -channel blockers; AMPA receptor antagonists; racetams, and some others. As a result of the design, we proposed 3 new pharmacophoric models of potential AEDs, based on which new groups of compounds were constructed in the series of benzoylpyridine oximes, hexahydrodibenzofuran oximes, and 4 phenylpyrrolidone. Up to 15 representatives were obtained in each group. Anticonvulsant, nootropic, neuroprotective, analgesic, anti-ischemic and anxiolytic activity of new substances was analyzed in standard pharmacological rodent models. As a result, the leading molecules were selected: 4-benzoylpyridine derivative GIZH-298, effective in several epilepsy models and possessing anxiolytic and analgesic activity; 4-phenylpyrrolidone derivative GIZH-290, combining anticonvulsant and procognitive action; hexahydrodibenzofuran derivative GIZH-272, combining anticonvulsant, neuroprotective and anti-ischemic properties. These compounds are currently undergoing extensive pharmacological studies.

## ТАРГЕТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ГЛЮКОЦЕРЕБРОЗИДАЗЫ ПРИ ЛЕЧЕНИИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

А.К. Емельянов<sup>1,2</sup>, Т.С. Усенко<sup>1,2</sup>, А.И. Безрукова<sup>1</sup>, К.С. Башарова<sup>1</sup>, А.Э. Копытова<sup>1,2</sup>, С.Н. Пчелина<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина;

<sup>2</sup>Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург

Мутации в гене GBA1, ассоциированные со снижением активности лизосомного фермента глюкоцереброзидазы (GCase), являются фактором высокого риска распространенного нейродегенеративного заболевания, болезни Паркинсона (БП). БП, ассоциированная с мутациями в гене GBA1 (GBA1-БП), а также БП, ассоциированная с мутациями в гене киназы LRRK2 являются наиболее распространенной формой БП с известной этиологией для которых в настоящее время проходят 2-ую фазу клинических исследований, соответственно, фармакологические шапероны (ФС) GCase и киназной активности LRRK2. Последние данные позволяют предположить, что ингибиторы LRRK2 также приводят к восстановлению активности GCase. Цель. Сопоставить эффективность в восстановлении активности GCase в первичной культуре макрофагов, полученной от пациентов с GBA1-БП, при воздействии ФС GCase и ингибитора LRRK2 в зависимости от типа мутаций.

Проверка эффективности восстановления активности GCase проводилась на первичной культуре макрофагов от пациентов GBA1-БП с мутацией L444P (тяжелая) и N370S (мягкая). Культивирование клеток проводилось в стандартных условиях (5% CO<sub>2</sub>, 37°C). Уровень активности GCase и концентрации HexSph оценивался методом ВЭЖХ-МС/МС.

Нами показано повышение активности GCase как при воздействии предложенного нами ранее ФС GCase N2, так и ингибитора LRRK2 MLi-2. Однако ФС GCase приводили к повышению активности при наличии мутации N370S (мягкая), в то время как ингибирование LRRK2 приводило к повышению активности GCase при наличии мутации L444P (тяжелая).

Показано, что таргетные препараты, разрабатываемые в настоящее время для лечения GBA1-БП могут проявлять эффективность в зависимости от типа мутации.

*Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект №24-15-00177).*

## TARGETED DRUGS FOR RESTORING GLUCOCEREBROSIDASE ACTIVITY IN THE TREATMENT OF PARKINSON'S DISEASE

A.K. Emelyanov<sup>1,2</sup>, T.S. Usenko<sup>1,2</sup>, A.I. Bezrukova<sup>1</sup>, K.S. Basharova<sup>1</sup>, A.E. Kopytova<sup>1,2</sup>, S.N. Pchelina<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>B.P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, NRC «Kurchatov Institute», Gatchina; <sup>2</sup>Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint-Petersburg

Introduction. Mutations in the GBA1 gene associated with decreased activity of the lysosomal enzyme glucocerebrosidase (GCase) are the cause of high risk of a common neurodegenerative disease, Parkinson's disease (PD). PD associated with mutations in the GBA1 gene (GBA1-PD), as well as PD associated with mutations in the LRRK2 kinase gene, are the most common form of PD with a widespread etiology, for which pharmacological chaperones (PS) of GCase and LRRK2 kinase activity are currently undergoing phase 2 medical trials, respectively. Recent data suggest that LRRK2 inhibitors also lead to the restoration of GCase activity. Objective. To compare the efficiency of GCase activity restoration in the primary culture of macrophages obtained from patients with GBA1-PD when cells are exposed to PS of GCase and LRRK2 inhibitor depending on the type of mutation.

The restoration of GCase activity was tested on a primary culture of macrophages from GBA1-PD patients with L444P (severe) and N370S (mild) mutations. Cells were cultured under standard conditions (5% CO<sub>2</sub>, 37°C). The level of GCase activity and HexSph cells was measured by HPLC-MS/MS.

We have shown an increase in GCase activity under the influence of both the previously proposed FS of GCase (N2) and the LRRK2 inhibitor MLi-2. However, FS of GCase led to an increase in activity in the presence of the N370S (mild) mutation, while LRRK2 inhibition led to an increase in GCase activity in the presence of the L444P (severe) mutation.

Targeted drugs currently produced for the treatment of GBA1-PD could regulate their effectiveness depending on the type of mutation. *The study was supported by a grant from the Russian Science Foundation (project No. 24-15-00177).*

## ХИМИЧЕСКОЕ ПРОСТРАНСТВО КОММЕРЧЕСКИ ДОСТУПНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В РФ

**Д.И. Осолодкин, В.И. Уварова, А.Д. Фомина**

*ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва*

Виртуальный скрининг каталогов поставщиков низкомолекулярных органических соединений с последующей экспериментальной проверкой результатов -- стандартный способ нахождения соединений-лидеров в рамках академической медицинской химии. Хотя база данных ZINC предлагает широкий выбор химических соединений от различных поставщиков, многие из них недоступны для закупки в Российской Федерации. В результате российские исследователи сталкиваются с ограничениями в доступе к разнообразным соединениям для изучения новых и актуальных хемотипов. Ранее мы провели несколько кампаний по поиску потенциальных противовирусных соединений, используя каталоги различных российских поставщиков. Выявленные хиты затем были исследованы в фенотипических и мишень-ориентированных экспериментах. Мы наблюдали заметные различия в эффективности виртуального скрининга в этих библиотеках: доля подтверждённых хитов составила около 30% для активности против флавивирусов и всего около 1% для ингибирования ферментов. Ретроспективная валидация наших методов виртуального скрининга подтверждала их релевантность, что привело нас к гипотезе о том, что различия в эффективности скрининга могут быть связаны с молекулярным пространством каталогов, так как эффективные хиты не могли присутствовать в каталогах, не содержащих молекулы с требуемой структурой. Мы провели анализ химических свойств и химического пространства, покрываемого каталогами российских поставщиков. При сравнении этих данных с нашими обучающими выборками и другими базами данных, такими как ChEMBL и каталоги допущенных к применению лекарственных препаратов, были выявлены определённые различия в молекулярном разнообразии коммерчески доступных соединений в различных каталогах. Также продемонстрировано ограниченное покрытие лекарственно-подобного химического пространства каталогами российских поставщиков.

## CHEMICAL SPACE OF COMMERCIALY AVAILABLE COMPOUNDS IN RUSSIA

**D.I. Osolodkin, V.I. Uvarova, A.D. Fomina**

*Chumakov FSC R&D IBP RAS (Institute of Poliomyelitis), Moscow*

The practice of virtual screening of supplier catalogs, followed by experimental validation of promising candidates, is a standard approach in academic medicinal chemistry for lead discovery. While the ZINC database offers a broad selection of chemical compounds from various suppliers, many of these substances are not available for large-scale purchase within the Russian Federation. Consequently, Russian researchers face limitations in accessing a diverse range of vendors to explore new and relevant chemotypes. In our research, we performed several virtual screenings targeting potential antiviral agents using catalogs from various Russian vendors. The hits identified were then subjected to phenotypic and target-based experimental assays. We observed notable differences in hit rates across these assays, with around 30% for anti-flavivirus activity and only about 1% for protease inhibition. The methodology and retrospective validation of our virtual screens indicated their potential relevance, leading us to hypothesize that the differences in hit rates might stem from the specific compositions of the catalogs, as effective hits could not be present in catalogs lacking pertinent molecules. This study presents an analysis based on chemical properties and the chemical space of the catalogs from Russian vendors. We compare these with our training sets and other databases, such as ChEMBL and those containing approved drugs. Significant differences in the molecular diversity of commercially available compounds were identified across various catalogs. Additionally, the catalogs of Russian suppliers demonstrated insufficient coverage of drug-like chemical space.

## ПОСЛЕДНИЕ ДОСТИЖЕНИЯ В РАЗРАБОТКЕ ПРЯМЫХ ПАНСПЕЦИФИЧНЫХ ИНГИБИТОРОВ KRAS

**Д.О. Шкиль, К.В. Балакин**

*Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Российская Федерация*

В последние годы разработка ингибиторов KRAS, известного как ключевой драйвер онкогенных процессов в различных типах рака, вышла на новый уровень благодаря успехам в создании прямых ингибиторов. Долгое время KRAS считался "нетаргетируемым" из-за отсутствия пригодного для связывания кармана и высокой аффинности к природным лигандам, что ограничивало возможности разработки эффективных ингибиторов. Однако последние исследования показали значительный прогресс в создании молекул, способных нацеливаться на различные мутации KRAS, включая наиболее распространенные формы, такие как G12C и G12D, что открывает новые перспективы в терапии резистентных форм рака. Данное исследование посвящено изучению прогресса в создании панспецифичных ингибиторов, которые способны эффективно действовать против различных мутаций KRAS, что играет ключевую роль в преодолении терапевтической резистентности, вызванной мутационной гетерогенностью опухолей. В работе анализируются важнейшие молекулярные взаимодействия, возникающие при связывании ингибиторов с различными сайтами KRAS, включая карманы Switch-I и Switch-II. Особое внимание уделено химическим мотивам и разнообразию классов соединений, обеспечивающих панселективность ингибиторов. Также рассматриваются перспективы дальнейшего развития панспецифичных ингибиторов, оценена успешность применяемых подходов.

Таким образом, последние достижения в ингибировании KRAS открывают новые возможности для разработки эффективных стратегий лечения KRAS-зависимых онкологических заболеваний.

## RECENT ADVANCES IN THE DEVELOPMENT OF DIRECT PAN-SPECIFIC KRAS INHIBITORS

**D.O. Shkil, K.V. Balakin**

*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*

In recent years, the development of inhibitors of KRAS, known as a key driver of oncogenic processes in various types of cancer, has reached a new level due to advances in the creation of direct inhibitors. For a long time, KRAS was considered "non-targetable" due to the lack of a suitable binding pocket and high affinity for natural ligands, which limited the possibilities of developing effective inhibitors. However, recent studies have shown significant progress in creating molecules capable of targeting various KRAS mutations, including the most common forms such as G12C and G12D, which opens up new prospects for the treatment of resistant forms of cancer. This study is devoted to the study of progress in the creation of pan-specific inhibitors that can effectively act against various KRAS mutations, which plays a key role in overcoming therapeutic resistance caused by mutational heterogeneity of tumors. The work analyzes the most important molecular interactions that occur when inhibitors bind to various KRAS sites, including the Switch-I and Switch-II pockets. Particular attention is paid to the chemical motifs and diversity of compound classes that provide pan-selectivity of inhibitors. Prospects for further development of pan-specific inhibitors are also considered, and the success of the approaches used is assessed.

Thus, recent advances in KRAS inhibition open up new opportunities for the development of effective strategies for the treatment of KRAS-dependent oncological diseases.

## ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ С МОДИФИЦИРОВАННЫМИ ФОСФАТНЫМИ ГРУППАМИ И ПРОБЛЕМА ДОСТАВКИ

Е.А. Буракова, К.В. Клабенкова, С.Н. Бизязев, Д.Э. Патрушев, А.А. Фокина, Д.А. Стеценко

*Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*

Терапевтические олигонуклеотиды, направленные на модулирование экспрессии индивидуальных генов, представляют собой инновационную платформу для создания лекарственных средств. При этом 95% всех препаратов на основе нуклеиновых кислот, вышедших к настоящему времени на фармацевтический рынок США, Европы и Японии, содержат те или иные химические модификации, обеспечивающие повышенную ферментативную устойчивость, низкую токсичность и улучшенные фармакокинетику и фармакодинамику. Большинство из них включает модификации фосфатной группы, в наибольшей степени отвечающие требованиям, предъявляемым к перспективным лекарствам.

За истекшее десятилетие мы убедительно продемонстрировали, что реакция Штаудингера межнуклеотидного фосфиттриэфира с органическими азидами непосредственно в процессе автоматизированного твердофазного синтеза по стандартной фосфитамидной схеме выступает удобным способом получения широкого спектра новых аналогов ДНК и РНК с модифицированными фосфатными группами. В качестве азидов могут быть использованы как простые алифатические и ароматические азиды, так и, более успешно, электронодефицитные азиды, а именно, гетероциклические, имидоил и сульфонилазиды и т.п.

Некоторые полученные с помощью реакции Штаудингера аналоги ДНК и РНК – такие как электронейтральные фосфорилгуанидины и сохраняющие отрицательный заряд сульфонилфосфорамиды – были исследованы как антисмысловые агенты, и проявили широкий спектр биологической активности, включая противовирусную, антибактериальную, противоопухолевую, сплайсинг-корректирующую и иммуномодулирующую. Антисмысловые олигонуклеотиды с фосфорилгуанидиновыми группами проходят в настоящее время клинические испытания против ряда генетических заболеваний и как средства редактирования РНК.

В настоящее время основные усилия сосредоточены на преодолении трудностей доставки терапевтических нуклеиновых кислот – антисмысловых олигонуклеотидов, малых интерферирующих РНК, аптамеров и иммуномодулирующих олигонуклеотидов – в целевые клетки, ткани и органы человека, что позволит успешно разрабатывать препараты против целого ряда социально-значимых заболеваний, в том числе не только моногенных генетических болезней, но и онкологических заболеваний, а также вирусных и бактериальных инфекций.

*Работа поддержана грантом РФФ 22-13-00212.*

## OLIGONUCLEOTIDE THERAPEUTICS WITH MODIFIED PHOSPHATE GROUPS AND THE DELIVERY PROBLEM

Е.А. Burakova, K.V. Klabenkova, S.N. Bizyaev, D.E. Patrushev, A.A. Fokina, D.A. Stetsenko

*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk*

Therapeutic oligonucleotides able to modulate the expression of individual genes represent an innovative platform for creating drugs. At the same time, 95% of all nucleic acid drugs that entered the pharmaceutical market of the USA, Europe and Japan to-date contain some chemical modifications that provide increased enzymatic stability, low toxicity and improved pharmacokinetics and pharmacodynamics. Most of the above include modifications of the phosphate group, which best meet the requirements for promising therapeutics.

Over the past decade, we have convincingly demonstrated that the Staudinger reaction of an internucleotidic phosphite triester with organic azides in the process of automated solid-phase synthesis according to the standard phosphoramidite scheme is a convenient way to obtain a wide range of novel DNA and RNA analogues with modified phosphate groups. Azides can be either simple aliphatic and aromatic azides or, more preferably, electron-deficient azides such as heterocyclic, imidoyl and sulfonyl azides, etc.

Some of the DNA and RNA analogues obtained via Staudinger reaction such as charge-neutral phosphoryl guanidines and negatively charged sulfonyl phosphoramidates have been investigated as potential antisense agents, and have exhibited a wide range of biological activities, including antiviral, antibacterial, antitumor, splice-correcting, and immunomodulatory effects. Antisense oligonucleotides containing phosphoryl guanidine groups are currently undergoing clinical trials against some genetic diseases, and as RNA editing agents.

Currently, the main efforts are focused on overcoming the problem of difficult delivery of therapeutic nucleic acids, namely, antisense oligonucleotides, small interfering RNA, aptamers and immunomodulatory oligonucleotides to target cells, tissues and organs, which will permit the successful development of pharmaceuticals against a number of human diseases, including not only monogenic genetic diseases but also cancers as well as viral and bacterial infections.

*This work was supported by RSF (grant No. 22-13-00212).*

## ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ НАСЛЕДСТВЕННЫХ И ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ: ОТ ЗАМЕЩЕНИЯ ГЕНОВ К ТЕХНОЛОГИЯМ ТОЧНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА

**А.В. Карабельский**

*Научно-технологический университет «Сириус», Федеральная территория «Сириус», РФ*

В настоящее время разработка высокотехнологичных продуктов передовой терапии является одним из самых востребованных направлений в биомедицине. В мире проходят сотни клинических испытаний, в рамках которых оцениваются безопасность и эффективность генотерапевтических продуктов для лечения тяжелых наследственных заболеваний – таких как гемофилия, спинальная мышечная атрофия, миодистрофия Дюшенна, различные нарушения зрения, болезни накопления и др. Несколько препаратов уже вышли на рынок, а десятки продуктов демонстрируют феноменальную эффективность в лечении заболеваний, которые ранее считались либо неизлечимыми, либо трудно поддавались лечению. Развитие генетических и информационных технологий привело к революционным изменениям в биомедицинских исследованиях и фармацевтике. Пандемия COVID-19 показала высокий потенциал новых классов лекарственных препаратов – таких как мРНК вакцины, а также дала мощный толчок к развитию невирусных систем доставки генов, в том числе инструментов для генетического редактирования.

## GENE THERAPY OF HEREDITARY AND ONCOLOGICAL DISEASES: FROM GENE TRANSFER TO PRECISION GENOME EDITING TECHNOLOGIES

**A. Karabelsky**

*Sirius University, Sirius Federal Territory*

The development of high-tech advanced therapy products is one of the most popular areas in biomedicine. Hundreds of clinical trials are being conducted around the world to evaluate the safety and effectiveness of gene therapy products for the treatment of severe hereditary diseases such as hemophilia, spinal muscular atrophy, Duchenne muscular dystrophy, various visual impairments, storage diseases, etc. Several drugs have already entered the market, and dozens of products demonstrate phenomenal effectiveness in treating diseases that were previously considered either incurable or difficult to treat. The development of genetic and information technologies has led to revolutionary changes in biomedical research and pharmaceuticals. The COVID-19 pandemic has shown the high potential of new classes of drugs, such as mRNA vaccines, and has also given a powerful impetus to the development of non-viral gene delivery systems, including tools for gene editing.

## ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ИЗОТОПНОГО МЕЧЕНИЯ ПРИ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОМ ИССЛЕДОВАНИИ МЕТАБОЛИЗМА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

**Б.С. Туперцев, С.В. Осипенко, А.В. Еремеев, Е.Н. Николаев, Ю.И. Костюкевич**

*Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный; Сколковский институт науки и технологий, Москва*

Хромато-масс-спектрометрический (ХМС) метод анализа является золотым стандартом при сопровождении доклинических и клинических исследований. Несмотря на прогресс в методах пробоподготовки, разнообразие подвижных и неподвижных хроматографических фаз, а также совершенствование приборов, ХМС анализ метаболизма лекарственных средств (ЛС) остается сложной задачей. Неполнота ХМС баз данных, сложность биологических образцов и сопутствующие матричные эффекты – все это мешает как качественным, так и количественным ХМС исследованиям. Одним из возможных способов решения описанных проблем является использование стабильных изотопных меток. В работе предложены способы получения изотопно-меченных соединений с использованием микросомальной фракции печени (МП), газообразного кислорода-18, а также тяжелой воды: как  $H_2^{18}O$ , так и  $D_2O$ . При параллельной инкубации МП с ЛС (тамоксифен, варфарин и бупивакаин) в присутствии избытка кислорода-18 и без него, было обнаружено, что данный подход, с одной стороны, позволяет получать стабильные изотопно-меченные метаболиты ЛС, а с другой – достоверно отличать метаболиты от других соединений в сложных биологических образцах. На примере инкубации прогестогенов в тяжелой воде, где исходный фосфатно-солевой буферный раствор был подготовлен с использованием  $H_2^{18}O$  и  $D_2O$ , было обнаружено, что МП катализируют реакции изотопного обмена  $^{16}O/^{18}O$  и H/D. При этом обмен  $^{16}O/^{18}O$  протекал до 30 раз активнее по сравнению с контрольным образцом (ЛС в избытке  $H_2^{18}O$  без микросом). Обмен протекал селективно в карбонильных, карбоксильных и гидроксильных группах в аллильном положении. В случае с инкубацией в  $D_2O$ , были получены стабильные изотопно-меченные прогестогены, однако в контрольных образцах ЛС, инкубированных в избытке  $D_2O$  без микросом, H/D обмен не наблюдался.

## ENZYMATIC ISOTOPE LABELING FOR THE CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY DRUG METABOLISM STUDIES

**B.S. Tupertsev, S.V. Osipenko, A.V. Ereemeev, E.N. Nikolaev, Y.I. Kostyukevich**

*Moscow Institute of Physics and Technology (NRU), Dolgoprudny; Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow*

The chromatography-mass spectrometry (HMS) analysis is the gold standard in the preclinical and clinical studies. Despite the progress in sample preparation methods, the variety of mobile and stationary chromatographic phases, as well as the improvement of HMS systems, the HMS analysis in drug metabolism studies is still a difficult task. The incompleteness of HMS databases, the complexity of biological samples and the matrix effects are interfere with both qualitative and quantitative HMS research. One of the possible ways to solve the described problems is to use stable isotope labelling. The paper proposes methods for obtaining isotopically labeled compounds using liver microsomes (LM), gaseous oxygen-18, as well as heavy water: both  $H_2^{18}O$  and  $D_2O$ . During parallel incubation of LM with drugs (tamoxifen, warfarin and bupivacaine) in the presence of an excess of oxygen-18 and without it, it has been found that this approach, on the one hand, allows to obtain stable isotope-labeled metabolites of drugs. On the other hand, makes it possible to reliably distinguish metabolites from other compounds in complex biological samples. Incubation of progestogens in heavy water, where the phosphate buffer saline was prepared using  $H_2^{18}O$  and  $D_2O$ , it was found that LM catalyze the isotope exchange reactions  $^{16}O/^{18}O$  and H/D. At the same time, the  $^{16}O/^{18}O$  exchange proceeded up to 30 times more actively compared with the control sample (drugs in excess of heavy water, but without LM). The exchange proceed in carbonyl, carboxyl and hydroxyl groups in the allyl position. In case of  $D_2O$  incubation, it was found that isotopically labeled progestogens were stable. Nevertheless, it was determined that in control samples, H/D exchange in the compounds were not observed.

## НЕЙРОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕПТИДОВ ГУМАНИНА И ГУМАНИНА S14G В КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

**В.Н. Бабаков, Н.Ю. Роговская, Е.А. Кампе-Немм, Алексей А. Колобов, Александр А. Колобов, А.С. Радилев**  
*НИИ ГПЭЧ ФМБА России, Санкт-Петербург*

Клеточная линия нейробластомы человека SH-SY5Y широко используется при исследовании нейропротекторных соединений, в частности в клеточной модели болезни Паркинсона. В этой модели используется 1-метил-4-фенилпиридиний (MPP<sup>+</sup>), вызывающее гибель дофаминергических нейронов. Проведена оценка нейропротекторной активности пептида гуманина и пептида с заменой в 14 положении S14G в клеточной модели болезни Паркинсона. Оценивали жизнеспособность клеток, активные формы белков системы апоптоза и секрецию в кондиционную среду маркеров повреждения нейронов при действии гуманина и HS14G на фоне токсического действия MPP<sup>+</sup>. Анализ активированных фосфорилированных или протеолитически фрагментированных белков – маркеров апоптоза проводили с использованием многопараметрической иммунофлуоресцентной технологии Luminex xMAP. Для оценки цитопротекторной активности пептидов к клеткам добавляли среду до конечной концентрации 1 мкМ пептидов и их комбинации с 500 мкМ MPP<sup>+</sup>. Мониторинг клеточного индекса проводили в течение 3 суток после добавления изучаемых соединений.

Для оценки нейропротекторной активности пептида гуманина использовали концентрацию 500 мкМ MPP<sup>+</sup>. Обе формы гуманина в концентрации 1 мкМ повышают жизнеспособность клеток на фоне токсического действия MPP<sup>+</sup>. На фоне токсического действия MPP<sup>+</sup> происходит накопление фосфорилированной по Ser473 формы киназы Akt1. Пептиды гуманин и HS14G дополнительно усиливают активацию киназы Akt1, индуцированную MPP<sup>+</sup>. Дополнительная активация киназы Akt1 может снижать активацию системы апоптоза, вызванную MPP<sup>+</sup> и обеспечивать выживание клетки. MPP<sup>+</sup> вызывает накопление в клетках активной формы белка Bad, киназы JNK, активной формы каспазы-9. Добавление пептида гуманина и HS14G статистически значимо снижало содержание этих белков в лизатах клеток, индуцированное MPP<sup>+</sup>. При действии MPP<sup>+</sup> происходило накопление белков трансглутаминазы 2, кислого фибриллярного глиального белка, карбокситерминальной гидролазы убиквитина изофермент L1, белка болезни Паркинсона 7 (DJ1), нейронспецифической енолазы в кондиционных средах клеток. Обе формы гуманина в концентрации 1 мкМ снижали секрецию в кондиционную среду этих белков на фоне токсического действия MPP<sup>+</sup>, для пептида HS14G цитопротекторное действие в такой же концентрации выражено сильнее.

## NEUROPROTECTIVE ACTIVITY OF PEPTIDES HUMANIN AND HUMANIN S14G IN THE CELL MODEL OF PARKINSON'S DISEASE

**V.N. Babakov, N.Yu. Rogovskaya, E.A. Kampe-Nemm, Aleksei A. Kolobov, Aleksandr A. Kolobov, A.S. Radilov**  
*RIHOPHE, St Petersburg*

The neuroblastoma cell line SH-SY5Y is widely used in the study of neuroprotective compounds, particularly in the cell model of Parkinson's disease. This model uses 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) to induce the death of dopaminergic neurons. We evaluated the neuroprotective activity of humanin peptide and the peptide with a substitution at position 14 of S14G in the cell model of Parkinson's disease. Cell viability, active forms of apoptosis system proteins and secretion into conditioned medium of neuronal damage markers under the action of humanin and HS14G with MPP<sup>+</sup> toxic treatment were evaluated. The analysis of apoptosis markers was performed using multiplex technology Luminex xMAP.

To assess the cytoprotective activity of peptides, medium was added to cells to a final concentration of 1 μM peptides and their combination with 500 μM MPP<sup>+</sup>. The cell index was monitored for 3 days after the addition of the studied compounds. A concentration of 500 μM MPP<sup>+</sup> was used to evaluate the neuroprotective activity of the peptide humanin. Both forms of humanin at a concentration of 1 μM increased cell viability after MPP<sup>+</sup> treatment. The phosphorylated Ser473 form of Akt1 kinase accumulates in the cells after MPP<sup>+</sup> treatment. Peptides humanin and HS14G do not affect the level of this kinase, but additionally increase the activation of Akt1 kinase induced by MPP<sup>+</sup>. Additional activation of Akt1 kinase may reduce MPP<sup>+</sup>-induced activation of the apoptosis system and ensure cell survival. MPP<sup>+</sup> causes accumulation of the active form of Bad protein, JNK kinase, and the active form of caspase-9 in cells. Addition of peptide humanin and HS14G statistically significantly reduced the MPP<sup>+</sup>-induced level of these proteins in cell lysates. MPP<sup>+</sup> action caused accumulation of transglutaminase 2, acidic fibrillar glial protein, carboxyterminal ubiquitin hydrolase isoenzyme L1, Parkinson's disease protein 7 (DJ1), and neuron-specific enolase proteins in conditioned media of cells. Both forms of humanin at a concentration of 1 μM reduced the secretion of these proteins into the conditioned medium against the background of the toxic effect of MPP<sup>+</sup>; the cytoprotective effect of the HS14G peptide at the same concentration was more expressed.



**ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ «СВОБОДНОЙ» И ИНКАПСУЛИРОВАННОЙ В ПОЛИМЕРСОМЫ ФЛУОРЕСЦЕНТНО-МЕЧЕНОЙ IRD800CW-БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ВНУТРИВЕННОМ ВВЕДЕНИИ МЫШАМ**

**Т.Н. Паширова, З.М. Шайхутдинова, Д.А. Татаринов, А.А.Титова, О.С. Васильева, А.Г. Маланьева, П. Массон**  
*Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет; Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ Казанский научный центр РАН, Казань*

Известно, что бутирилхолинэстераза человека (БХЭ) проявляет эффективность в качестве «биоловушки» или «bioscavengers» в отношении токсичных веществ. Настоящая работа направлена на применение альтернативного нанотехнологического подхода для создания наноконтейнерных форм БХЭ – полимерсом с целью изменения распределения и обеспечения пролонгированности действия БХЭ в организме. Объектом исследования является высокоочищенная БХЭ, ковалентно связанная с флуоресцентным маркером IRDye800CW. БХЭ-IRDye800CW была инкапсулирована в полимерсомные нанореакторы на основе полиэтиленгликоля и пропиленсульфида (PEG-PPS) со следующими характеристиками: диаметр около 140 нм,  $\xi=-6$  мВ,  $PDI\leq 0,2$ , сферической морфологии и хорошей стабильностью (1 год). Установлено, что в процессе инкапсулирования активность фермента и каталитические параметры не изменяются. Для мониторинга фармакокинетики растворы «свободной» и инкапсулированной в полимерсомы БХЭ (однократная доза фермента 1,5 мг/кг) вводили внутривенно мышам CD-1 и проводили анализ в течение 8 дней с использованием системы визуализации IVIS *in vivo*. Установлено, что фармакокинетическая  $\alpha$ -фаза распределения инкапсулированной БХЭ ( $t_{1/2}=17,6$  ч) была длиннее, чем для «свободного» фермента ( $t_{1/2}=6,6$  ч). Среднее время полувыведения  $\beta$ -фазы было в 2 раза длиннее для инкапсулированного фермента, чем для «свободного» фермента (150 и 72 ч, соответственно). Мониторинг флуоресценции в органах показал, что БХЭ выводится печенью.

Настоящая работа по исследованию фармакокинетики и судьбы БХЭ, инкапсулированной в полимерсомы является пионерской.

*Работа выполнена за счет средств гранта РФФ проект № 20-14-00155.*

**PHARMACOKINETIC MONITORING OF FREE AND ENCAPSULATED IRD800CW-LABELLED HUMAN BChE INTRAVENOUSLY ADMINISTERED IN MICE**

**T.N. Pashirova, Z.M. Shaihutdinova, D.A. Tatarinov, A.A. Titova, A.G. Malanyeva, O.S. Vasileva, Patrick Masson**  
*Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University; Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan*

Human butyrylcholinesterase (BChE) is an efficient bioscavenger of toxicants. We are developing a method for sustained delivery of BChE. Highly purified BChE was labelled with the near infrared fluorescent IRDye 800CW. The goal was to determine the pharmacokinetics and fate of labelled enzyme in mice. BChE-IRDye800CW was encapsulated in polyethylene glycol–polypropylene sulfide-based polymersome nanoreactors with the following characteristics: about 140 nm diameter,  $\xi=-6$  mV,  $PDI\leq 0.2$ , spherical morphology, good stability (1 year). Encapsulation did not alter the functional properties of the enzyme. Free and encapsulated enzyme were injected intravenously to CD-1 mice (single dose of enzyme 1.5 mg/kg and PEG-PPS polymersomes 25 mg/kg) and were analyzed for 8 days using an *in vivo* imaging system. Results showed that the pharmacokinetic distribution  $\alpha$ -phase of encapsulated BChE ( $t_{1/2}=17.6$  h) was longer than for free enzyme ( $t_{1/2}=6.6$  h). The mean half-time for elimination  $\beta$ -phase was 2-time longer for encapsulated enzyme than for free enzyme (150 vs 72 h). Transient changes in near infrared fluorescence in organs showed that BChE is eliminated from liver. However, free and encapsulated enzymes were cleared via different pathways.

This is the first study of the pharmacokinetics and fate of BChE encapsulated in polymersomes.

*This work was supported by the Russian Science Foundation grant #20-14-00155.*

## РАЦИОНАЛЬНЫЙ ДИЗАЙН ИНГИБИТОРОВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСЛЯЦИИ НА ОСНОВЕ АНТИБИОТИКОВ И АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ

**Н.В. Сумбатян, А.Г. Терещенков, А.А. Богданов**

*МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва*

В связи с растущей устойчивостью бактерий к большинству антибиотиков, применяемых в настоящее время на практике, разработка новых антибактериальных соединений является насущной задачей. Одним из возможных путей решения этой проблемы может стать рациональный дизайн новых антимикробных соединений на основе имеющихся данных о механизмах действия известных антибактериальных веществ и их взаимодействии с молекулярными мишенями в бактериальных клетках. Большинство известных антибиотиков нацелены на бактериальную рибосому, и многие из них блокируют процесс бактериальной трансляции, связываясь в пептидилтрансферазном центре и рибосомном туннеле. В последние годы показано, что механизм антибактериального действия ряда антимикробных пептидов (АМП), обогащенных пролином и аргинином, также связан с взаимодействием с бактериальными рибосомами и ингибированием трансляции.

В настоящей работе осуществлены дизайн и синтез ряда новых ингибиторов трансляции на основе фармакофоров антибиотиков и антимикробных пептидов, молекулярной мишенью которых в бактериальной клетке является рибосома (хлорамфеникол, десмикозин, онкоцин (Onc112), бактенецин (Bac7) и апидецин (Api137)). При конструировании ингибиторов фрагменты антибиотиков и АМП сочетались между собой либо с гидрофобными катионами (трифенилфосфоний, берберин) в рамках одной молекулы. Взаимодействие химерных молекул с рибосомой моделировали методами молекулярного докинга и молекулярной динамики. Свойства синтезированных соединений определяли биохимическими и микробиологическими методами; комплексы отдельных соединений с бактериальными рибосомами исследовались методом рентгеноструктурного анализа. Получен ряд ингибиторов, способных действовать на устойчивые штаммы бактерий. Найдены структурно-функциональные закономерности, которые могут быть использованы для создания потенциальных антимикробных средств.

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-00247).*

## RATIONAL DESIGN OF BACTERIAL TRANSLATION INHIBITORS BASED ON ANTIBIOTICS AND ANTIMICROBIAL PEPTIDES

**N.V. Sumbatyan, A.G. Tereshchenkov, A.A. Bogdanov**

*Lomonosov Moscow State University, Moscow*

Due to the increasing resistance of bacteria towards most antibiotics currently used in practice, the development of novel antimicrobial compounds has become an urgent task. One possible solution to this problem could be the rational design of new antimicrobial compounds, based on the available data on the mechanisms of action of existing antibacterial substances and their interactions with molecular targets within bacterial cells. Most antibiotics target the bacterial ribosome, many of them inhibit the process of bacterial translation by binding to the peptidyltransferase center and the nascent peptide exit tunnel. In recent years, it has been shown that the mechanism of antibacterial action of a number of antimicrobial peptides (AMP) enriched with proline and arginine is also associated with interaction with bacterial ribosomes leading to inhibition of translation.

In this work, a number of novel translation inhibitors based on pharmacophores from antibiotics and antimicrobial peptides, the molecular target of which in a bacterial cell is the ribosome (chloramphenicol, desmycosin, oncocin (Onc112), bactenecin (Bac7) and apidecin (Api137) have been designed and synthesized. When designing inhibitors, fragments of antibiotics and AMP were combined with each other or with hydrophobic cations (triphenylphosphonium, berberine) within a single molecule. The properties of the synthesized compounds were determined using biochemical and microbiological methods, and the complexes of individual compounds with bacterial ribosomes were analyzed using X-ray diffraction analysis. Inhibitors capable of acting on resistant bacterial strains have been obtained. Structural and functional patterns have been found that can be used to create potential antimicrobial agents.

*This research was funded by the Russian Science Foundation [project No. 23-24-00247].*

## ТЕРМОПРОФИЛИРОВАНИЕ ПРОТЕОМА ДЛЯ ПОИСКА МИШЕНЕЙ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ПРИМЕРЕ ИНГИБИТОРА СПЛАЙСИНГА

А.О. Гончаров<sup>1,2</sup>, М.М. Лукина<sup>1</sup>, Е.А. Свирина<sup>1</sup>, П.Р. Подлесный<sup>1</sup>, Г.П. Арапиди<sup>1,3</sup>, К.С. Климина<sup>1</sup>, И.П. Смирнов<sup>1</sup>, В.О. Шендер<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России; <sup>2</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России; <sup>3</sup>ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Современные методы анализа термической стабильности белков в живых клетках, объединенные с протеомным профилированием, позволяют объективно и на уровне всего протеома идентифицировать белковые мишени низкомолекулярных соединений. В сочетании с методами количественной протеомики и транскриптомного анализа данный подход делает возможным более глубокое и точное изучение механизмов действия огромного числа лекарственных препаратов. Это помогает идентифицировать не только прямые взаимодействия лекарства с мишенями, но и клеточный ответ на такое взаимодействие, а также предсказывать неэффективность или избыточную токсичность новых препаратов за счет выявления взаимодействий с нецелевыми белками, что открывает новые перспективы для исследований и разработок в фармацевтической отрасли.

Низкомолекулярные модуляторы сплайсинга – это перспективный класс противоопухолевых препаратов, некоторые представители которого в данный момент проходят клинические испытания. Однако, механизм их цитотоксического действия на опухолевые клетки до сих пор не известен. Для более глубокого понимания механизма действия низкомолекулярного модулятора сплайсинга пладиенолида Б мы применили метод термопрофилирования протеома на клеточных линиях аденокарциномы яичника SKOV3 и нормального эпителия фаллопиевых труб hTERT FT282. В клетках SKOV3 нам удалось идентифицировать известную основную мишень пладиенолида Б – сплайсинговый фактор SF3B1, а также белки, находящиеся с ним в комплексе. Кроме того, в качестве потенциальных мишеней пладиенолида Б были идентифицированы белки-мишени сигнального пути Hippo-YAP1/TAZ. Примечательно, что для одного из этих белков – CTGF, кодируемого геном CCN2, обнаружено более значимое изменение представленности, даже по сравнению с основной мишенью – SF3B1, что может указывать на то, что цитотоксичность ингибитора сплайсинга может быть опосредована угнетением этого каскада. В клетках нормального эпителия FT282 нам не удалось обнаружить изменение представленности SF3B1. Однако мы обнаружили в качестве потенциальной мишени белок ABCB1, который обеспечивает транспорт большого количества соединений из клетки, включая чужеродные.

Мы предполагаем, что ABCB1 может связываться и с пладиенолидом Б и выводить его из клеток, снижая эффективную концентрацию.

## PROTEOME THERMAL PROFILING FOR SMALL MOLECULE DRUG TARGET DISCOVERY USING A SPLICING INHIBITOR

A.O. Goncharov<sup>1,2</sup>, M.M. Lukina<sup>1</sup>, E.A. Svirina<sup>1</sup>, P.R. Podlesny<sup>1</sup>, G.P. Arapidi<sup>1,3</sup>, K.S. Klimina<sup>1</sup>, I.P. Smirnov<sup>1</sup>, V. Shender<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency; <sup>2</sup>Pirogov Russian National Research Medical University; <sup>3</sup>Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

Modern methods of analyzing the thermal stability of proteins in living cells, combined with proteomic profiling, allow for the objective and proteome-wide identification of protein targets of low-molecular-weight compounds. When coupled with quantitative proteomics and transcriptome analysis, this approach enables a more comprehensive and accurate study of the mechanisms of action of a wide range of drugs. It facilitates the identification of direct drug-protein interactions and the cellular responses to these interactions, as well as the prediction of inefficiency or excessive toxicity of new drugs through interactions with non-target proteins. This opens new prospects for research and development in the pharmaceutical industry.

Small-molecule splicing modulators are a promising class of antitumor drugs, with some currently undergoing clinical trials. However, the precise mechanisms underlying their cytotoxic effects on tumor cells remain unclear. To better understand the mechanism of action of the small-molecule splicing modulator pladienolide B, we applied the proteome thermal profiling method to the ovarian adenocarcinoma cell line SKOV3 and normal fallopian tube epithelial cells hTERT FT282. In SKOV3 cells, we identified the known primary target of pladienolide B, the splicing factor SF3B1, along with proteins in complex with it. Additionally, proteins from the Hippo-YAP1/TAZ signaling pathway emerged as potential targets of pladienolide B. Notably, CTGF, encoded by the CCN2 gene, exhibited a more significant change in abundance than SF3B1, suggesting that the cytotoxicity of the splicing inhibitor may be mediated by inhibition of this pathway. In normal FT282 epithelial cells, no changes in SF3B1 levels were detected. However, the ABCB1 protein was identified as a potential target, which is responsible for transporting various compounds, including exogenous substances, out of the cell.

We hypothesize that ABCB1 might also bind to pladienolide B, facilitating its removal from cells and thereby reducing its effective concentration.

#### РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕХИОМЕТРИИ ГИБРИДОВ НА ОСНОВЕ ФЕРРИТИНА ИЗ *H. PYLORI*

Ю.Л. Рижиков, В.В. Сударев, М.С. Гетте, С.В. Баженов, О.М. Тилинова, И.В. Манухов, А.И. Куклин, А.В. Власов

Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний, Московский физико-технический институт, Долгопрудный

Ферритин — это уникальный самособирающийся глобулярный белок, присутствующий в большинстве живых организмов. Одна глобула ферритина состоит из 24 идентичных субъединиц. Благодаря своим уникальным структурным и функциональным характеристикам ферритин широко используется в нанотехнологиях в качестве носителя для лекарственных препаратов [1]. В частности, лекарство может быть загружено непосредственно внутрь глобулы, или сама глобула может быть использована как носитель препарата или антигена. Новый подход к созданию биотехнологических продуктов на основе ферритина заключается в комбинировании различных субъединиц в одной глобулярной наночастице. В последние пять лет этот метод значительно продвинулся, о чем свидетельствует большое количество новых исследований [2]. Однако до сих пор остаются пробелы в знаниях о процессе формирования глобул и окончательном составе полидисперсной системы.

В этом исследовании мы получили химерные глобулярные наночастицы на основе ферритина из *H. pylori* путем коэкспрессии в клетках *E. coli*. Формирование гибридных глобул было проверено с помощью электронной микроскопии с отрицательным контрастированием, малоуглового рентгеновского рассеяния (SAXS) и BN-PAGE. С использованием 1D-профиля BN-PAGE мы показали формирование гибридного димера и оценили распределение стехиометрии гибридных глобул. Мы предложили модель самосборки гибридных глобул, которая точно описывает экспериментальные данные.

Результаты предоставляют полезные знания о процессах самосборки гибридов на основе ферритина и совершенствуют уже существующие платформы, использующие ферритин из *H. pylori*, что открывает путь к быстрому созданию новейшего поколения рекомбинантных вакцин и систем доставки лекарств.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение 075-03-2024-117, проект FSMG-2021-0002).*

1. Sudarev VV et al. Ferritin self-assembly, structure, function, and biotechnological applications. *Int J Biol Macromol.* 2023, 224: 319-343.
2. Reutovich AA et al. Ferritin nanocages as efficient nanocarriers and promising platforms for COVID-19 and other vaccines development. *BBA-General Subjects* 2023, 1867(3): 130288.

#### *H. PYLORI* FERRITIN-BASED HYBRIDS STOICHIOMETRY DISTRIBUTION

Yu.L. Ryzhykau, V.V. Sudarev, M.S. Gette, S.V. Bazhenov, O.M. Tilinova, I.V. Manukhov, A.I. Kuklin, A.V. Vlasov

Research Center for Mechanisms of Aging and Age-Related Diseases, Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny

Ferritin is a unique self-assembling globular protein, which is present in the majority of living organisms. One ferritin globule consists of 24 identical subunits. Due to its unique structural and functional features ferritin is widely used in nanotechnology as a drug carrier [1]. In particular, the drug can be loaded directly inside the globule, or the globule itself could be used as a carrier of a drug or antigen. A novel approach for obtaining ferritin-based biotechnological products is a combination of diverse subunits within one globular nanoparticle. Recently, this methodology has gained significant advance, evidenced by numerous emerging studies in last five years [2]. However, there are still gaps in knowledge about the process of globule formation and the final composition of polydisperse system.

In this study, we obtained chimeric globular nanoparticles based on ferritin from *H. pylori* by coexpression in *E. coli* cells. We checked the formation of hybrid globules by negative staining electron microscopy, small-angle X-ray scattering, and BN-PAGE. Using BN-PAGE 1D-profile we showed the formation of a hybrid dimer and evaluated stoichiometry distribution of hybrid globules. We proposed a model for hybrid globules self-assembly, which accurately describes experimental distribution.

The results provide useful insights into self-assembly processes of ferritin-based hybrids and enhance already existing platforms, utilizing ferritin from *H. pylori*, paving the way for rapid development of latest generation of recombinant vaccines and drug delivery systems.

*We acknowledge the support from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement 075-03-2024-117, project FSMG-2021-0002).*

1. Sudarev VV et al. Ferritin self-assembly, structure, function, and biotechnological applications. *Int J Biol Macromol.* 2023, 224: 319-343.
2. Reutovich AA et al. Ferritin nanocages as efficient nanocarriers and promising platforms for COVID-19 and other vaccines development. *BBA-General Subjects* 2023, 1867(3): 130288.

#### ТАРГЕТИРОВАННАЯ ФОТОИНАКТИВАЦИЯ МИКОБАКТЕРИЙ С ПОМОЩЬЮ БЛИЖНЕГО ИНФРАКРАСНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И КОНЪЮГАТА ТРИКАРБОЦИАНИНА С ТРЕГАЛОЗОЙ

М.О. Шлеева<sup>1</sup>, Н.В. Козобкова<sup>1</sup>, А.П. Луговский<sup>2</sup>, Н.В. Белько<sup>2</sup>, Д.С. Тарасов<sup>2</sup>, А.С. Капрельянц<sup>1</sup>, А.П. Савицкий<sup>1</sup>, М.П. Самцов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия; <sup>2</sup>Институт прикладных физических проблем им. А.Н. Савченко Белорусского государственного университета, Минск, Белоруссия

Распространение лекарственно-устойчивых штаммов микобактерий требует разработки новых подходов к борьбе с заболеваниями, вызываемыми этими патогенами. Одним из таких перспективных подходов является фотодинамическая инактивация (ФДИ). В данном исследовании впервые был использован трикарбоцианин (ТСС) в качестве фотосенсибилизатора, активируемого ближним инфракрасным излучением (740 нм), для фотодинамической инактивации микобактерий с более глубоким проникновением света. Для улучшения таргетирования был разработан новый трикарбоцианиновый краситель, функционализированный двумя молекулами трегалозы (ТСС2Тре).

Эксперименты продемонстрировали, что ТСС2Тре вызывает более эффективное уничтожение микобактерий, включая *Mycobacterium tuberculosis*, по сравнению с фотосенсибилизатором без конъюгации с трегалозой. Данный краситель обладает специфическим фотодинамическим эффектом и успешно инактивирует как вегетативные клетки, так и покоящиеся формы микобактерий. Более того, микобактерии, обработанные ТСС2Тре, оказались более чувствительны к свету с длиной волны 740 нм, чем другие бактерии, такие как грамположительные *Micrococcus luteus* и грамотрицательные *Escherichia coli*. В целом, результаты исследования демонстрируют принципиальную возможность *in vitro* селективной фотодинамической инактивации микобактерий с использованием фотосенсибилизаторов, конъюгированных с трегалозой.

Эти результаты могут послужить основой для разработки новых эффективных методов борьбы с микобактериальными инфекциями и создания альтернативной антибактериальной терапии.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 24-15-00221).*

#### TARGETED PHOTOINACTIVATION OF MYCOBACTERIA WITH NEAR-INFRARED LIGHT AND TREHALOSE-MODIFIED TRICARBOCYANINE

М.О. Shleeva<sup>1</sup>, N.V. Kozobkova<sup>1</sup>, A.P. Lugovski<sup>2</sup>, N.V. Bel'ko<sup>2</sup>, D.S. Tarasov<sup>2</sup>, A.S. Kaprelyants<sup>1</sup>, A.P. Savitsky<sup>1</sup>, M.P. Samtsov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre 'Fundamentals of Biotechnology', Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; <sup>2</sup>A.N. Sevchenko Institute of Applied Physical Problems, Belarusian State University, Minsk, Belarus

The spread of drug-resistant strains of mycobacteria requires the development of new approaches to combat diseases caused by these pathogens. One promising approach is photodynamic inactivation (PDI). In this study, tricarbocyanine (TCC) was used for the first time as a photosensitizer activated by near-infrared radiation (740 nm) for photodynamic inactivation of mycobacteria with deeper light penetration. To improve targeting, a new tricarbocyanine dye functionalized with two molecules of trehalose (TCC2Tre) was developed.

Experiments demonstrated that TCC2Tre causes more effective destruction of mycobacteria, including *Mycobacterium tuberculosis*, compared to the photosensitizer without conjugation with trehalose. This dye exhibits a specific photodynamic effect and effectively inactivates both vegetative cells and dormant forms of mycobacteria. Furthermore, mycobacteria treated with TCC2Tre were more sensitive to light with a wavelength of 740 nm than other bacteria such as gram-positive *Micrococcus luteus* and gram-negative *Escherichia coli*. Overall, the study results demonstrate the feasibility of *in vitro* selective photodynamic inactivation of mycobacteria using photosensitizers conjugated with trehalose.

These findings may serve as a basis for the development of new effective methods to combat mycobacterial infections and create alternative antibacterial therapy.

*The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (project No. 24-15-00221).*

### ШАПЕРОН HSP70 В СОСТАВЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ВЕЗИКУЛ АКТИВИРУЕТ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ В КЛЕТОЧНЫХ И ЖИВОТНЫХ МОДЕЛЯХ МЕЛАНОМЫ И КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

Т.А. Штам<sup>1,2,3</sup>, Л.А. Гараева<sup>1</sup>, Е.Ю. Комарова<sup>2</sup>, С.С. Емельянова<sup>1</sup>, А.Л. Конева<sup>1,3,4</sup>, Б.А. Маргулис<sup>2</sup>, И.В. Гузова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина; <sup>2</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

<sup>3</sup>НИЦ «Курчатовский институт», Москва; <sup>4</sup>Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург

Растительные везикулы – наноразмерные частицы, все чаще рассматривают в качестве доставщиков терапевтических биомолекул, в том числе и для лечения опухолевых заболеваний. Одним из перспективных методов терапии злокачественных новообразований является активация противоопухолевого иммунитета на основе шаперона HSP70, который при доставке в опухолевые клетки способен спровоцировать активацию врожденного и адаптивного иммунного ответа.

Эффективная доставка HSP70 к опухолевым клеткам потенциально могла бы быть осуществлена при помощи растительных везикул. Апробацию потенциала экстраклеточных везикул грейпфрута (GEVs) для доставки терапевтического белка проводили на двух моделях опухолей, CT-26 (аденокарцинома кишечника мыши) и B16 (меланома мыши). В экспериментах *in vitro* было показано, что экзогенный HSP70 в свободной форме и в составе GEVs увеличивает чувствительность клеток CT-26 и B16 к цитотоксическим лимфоцитам и натуральным киллерам. Для проверки активации противоопухолевого ответа *in vivo* использовали два способа воздействия рекомбинантного HSP70 в составе GEVs на прогрессию опухолей. Так, для формирования опухолевого узла, клетки CT-26 прививали подкожно мышам BALB/c совместно с GEVs, предварительно нагруженными белком HSP70. Для формирования модели меланомы клетки B16 были привиты подкожно мышам BALB/c и спустя 5 дней после инъекции опухолевое новообразование наружно обрабатывали гидрогелем с нагруженными белком HSP70 GEVs каждые 3 дня.

Для целевой группы мышей с привитыми клетками CT-26 было показано увеличение продолжительности жизни животных и уменьшение размера опухоли в 3 раза, а также снижение уровня факторов TGFβ1, IL-10 в плазме крови по сравнению с группами контроля. Для модели меланомы B16 было показано уменьшения массы опухолевого новообразования в 20 раз и значительное увеличение продолжительности жизни для данной группы животных относительно групп сравнения. Как для опухолей CT-26, так и B16 было продемонстрировано вовлеченность CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов в наблюдаемые на животных моделях противоопухолевые эффекты. На основе полученных данных можно заключить, что GEVs, нагруженные HSP70, способствуют активации противоопухолевого иммунитета *in vivo*.

*Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 19-74-20146-н).*

### PLANT-DERIVED VESICLES LOADED WITH RECOMBINANT HSP70 CHAPERONE ACTIVATES ANTITUMOR IMMUNE RESPONSES IN CELL AND ANIMAL MODELS OF MELANOMA AND COLORECTAL CANCER

T. Shtam<sup>1,2,3</sup>, L. Garaeva<sup>1</sup>, E. Komarova<sup>2</sup>, S. Emelyanova<sup>1</sup>, E. Putevich<sup>1,4</sup>, A. Konevega<sup>1,3,4</sup>, B. Margulis<sup>2</sup>, I. Guzhova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>B.P. Konstantinov St Petersburg Nuclear Physics Institute, National Research Centre «Kurchatov Institute», Gatchina; <sup>2</sup>Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg; <sup>3</sup>National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow;

<sup>4</sup>Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia

Plant vesicles – nanosized particles, are increasingly considered as carriers of therapeutic biomolecules, including for the treatment of tumor diseases. One of the promising methods of treating malignant neoplasms is the activation of antitumor immunity based on the chaperone HSP70, which, when delivered to tumor cells, is capable of provoking the activation of the innate and adaptive immune response. Effective delivery of HSP70 to tumor cells could potentially be accomplished using plant vesicles.

To enhance the antigen-presenting activity and stability of pure Hsp70 we suggest here its incorporation in nanometer vesicles made of plant juice. Earlier we found such packing in grapefruit-derived vesicles (GEVs) was able to store big mass of the protein with no loss of its major function, chaperonic activity. To check whether GEVs can elicit immune response we purified the vesicles, loaded them with recombinant human Hsp70 and after characterization of the protein quantity and activity injected in Balb mice with growing CT-26 colon carcinoma tumor. The injections were found to reduce the tumor growth rate by 40 % and expand the life span by 50 %, lowering of TGF-β1 and IL-10 in blood; this is comparable to the effect of soluble protein with a concentration 25 times higher than that of GEVs. Then tested the hypothesis that GEV-Hsp70 could be a therapeutic agent for skin cancer and incorporated GEV-Hsp70, GEV-BSA and Hsp70 into a hydrogel that was applied to subcutaneous B16 melanoma tumors twice a week.

The course of Hsp70-loaded GEV administrations resulted in the reduction of tumor growth rate by 96%, significant extension of life span. The data of cell index analysis performed with the aid of xCELLigence technique show that anti-tumor response in GEV-Hsp70-treated mice was associated with the accumulation of CD8<sup>+</sup> cells. These results demonstrate high feasibility and efficacy of novel Hsp70-based technique in activation of the specific response to tumors belonging to two strictly different types.

*The study was funded by the Russian Science Foundation project 19-74-20146-p.*

## ПОЛИСАХАРИДНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕМОЗОЛОМИДА ДЛЯ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Ф.О. Трухин<sup>1</sup>, А.А. Патлай<sup>1</sup>, А.С. Белоусов<sup>1</sup>, М.Е. Шмелёв<sup>1,2</sup>, В.В. Кумейко<sup>1,2</sup>, В.Е. Силантьев<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Дальневосточный федеральный университет, Школа медицины и наук о жизни; <sup>2</sup>Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН; <sup>3</sup>Институт химии ДВО РАН, Владивосток

Эффективные способы «доставки» лекарств через кровотоки, клинически применяемые при заболеваниях головного мозга, в настоящее время практически отсутствуют. Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) затрудняет прохождение препаратов, например, при онкологических и нейродегенеративных видах терапии. Предположительно полимерные и неорганические наночастицы с размерами до 200 нм и положительным поверхностным зарядом способны преодолевать ГЭБ [1]. Сорбция наночастицами лекарственных средств не снижает степени их воздействия на клетки-мишени, из-за чего они проявляют высокую токсичность для здоровых клеток. Таргетность «доставки» может быть достигнута поверхностной модификацией частиц антителами и контролируемой десорбцией препаратов.

Полиэлектролитные комплексы из противоположно заряженных полисахаридов пектина и хитозана были получены методом ионного гелирования в данной работе [2]. Настройка стехиометрического соотношения компонентов позволила создать наночастицы с регулируемым размером, формой и поверхностными свойствами. Углеводный состав, схожий с внеклеточным матриксом головного мозга, в дальнейшем должен увеличить биосовместимость. Морфология наноматериалов охарактеризована просвечивающей электронной и атомно-силовой микроскопией (АСМ). Были оценены модуль Юнга, адгезия, размер и поверхностный заряд наночастиц. Структурные особенности материалов и эффективность сорбции химиопрепарата темозоломида исследованы спектральными методами. Поглощение частиц клетками линии U87-MG глиобластомы – наиболее злокачественной опухоли головного мозга – было проанализировано АСМ.

Размеры наночастиц увеличивались с повышением концентрации хитозана от 60 до 400 нм, зета-потенциал от –29 до +74 мВ, адгезия от –3,6 до –0,3 пН. Модуль Юнга материалов возрастал от 58 до 235 кПа с увеличением концентрации пектина. Эффективность сорбции и десорбции темозоломида для разных составов и pH среды составили 35–75% и 7–70%, соответственно. По результатам исследования было предположено, что клеточное поглощение наночастиц осуществляется преимущественно путём эндоцитоза.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ (соглашение № 22–73–10172 от 29.07.2022 г.).*

1. Silant'ev VE et.al. How to develop drug delivery system based on carbohydrate nanoparticles targeted to brain tumors. *Polymers* 2023 15(11): 2516.
2. Silant'ev VE et.al. Rational design of pectin-chitosan polyelectrolyte nanoparticles for enhanced temozolomide delivery in brain tumor therapy. *Biomedicines* 12(7): 1393.

## POLYSACCHARIDE COMPLEXES FOR INCREASING OF TEMOZOLOMIDE EFFECTIVENESS FOR BRAIN TUMORS TREATMENT

F.O. Trukhin<sup>1</sup>, A.A. Patlay<sup>1</sup>, A.S. Belousov<sup>1</sup>, M.E. Shmelev<sup>1,2</sup>, V.V. Kumeiko<sup>1,2</sup>, V.E. Silant'ev<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Far Eastern Federal University, School of Medicine and Life Sciences; <sup>2</sup>A.V. Zhirmunsky National Scientific Center for Marine Biology, FEB RAS; <sup>3</sup>Institute of Chemistry, FEB RAS, Vladivostok

Effective methods of drugs «delivery» through the bloodstream, which are clinically used in brain diseases, are currently practically absent. The blood-brain barrier (BBB) makes it difficult for the drugs passing, for example, in oncological and neurodegenerative therapies. Polymer and inorganic nanoparticles with size up to 200 nm and positive surface charge are supposed to be able to overcome the BBB [1]. Sorption of drugs by nanoparticles does not reduce their exposure to target cells, causing them to exhibit high toxicity to normal cells. Targeted “delivery” can be achieved by surface modification of particles with antibodies and controlled drug desorption.

Polyelectrolyte complexes of oppositely charged polysaccharides pectin and chitosan were prepared by ion gelation in this work [2]. The customization of the stoichiometric ratio of the components made it possible to create nanoparticles with adjustable size, shape and surface properties. A carbohydrate composition similar to the brain extracellular matrix should further increase biocompatibility. The morphology of nanomaterials is characterized by transmission electron and atomic force microscopy (AFM). The Young's modulus, adhesion, size and surface charge of the nanoparticles were evaluated. The structural features of the materials and the sorption efficiency of the temozolomide drug were investigated by spectral methods. The cellular uptake of particles by cells U87-MG line of the most malignant brain tumor glioblastoma was analyzed by AFM.

Nanoparticle sizes increased with higher chitosan concentration from 60 to 400 nm, zeta potential from –29 to +74 mV and adhesion from –3.6 to –0.3 pN. The Young's modulus of the materials increased from 58 to 235 kPa with raising of pectin concentration. The efficiency of sorption and desorption of temozolomide for different compositions and pH was 35–75% and 7–70% respectively. It was assumed that the cellular uptake of nanoparticles is carried out mainly by endocytosis according to the results of the study.

*This work was supported by the Russian Science Foundation (Agreement № 22-73-10172 dated 29.07.2022).*

1. Silant'ev VE et.al. How to develop drug delivery system based on carbohydrate nanoparticles targeted to brain tumors. *Polymers* 2023 15(11): 2516.
2. Silant'ev VE et.al. Rational design of pectin-chitosan polyelectrolyte nanoparticles for enhanced temozolomide delivery in brain tumor therapy. *Biomedicines* 12(7): 1393.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА РАДИОФАРМПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ, СПЕЦИФИЧЕСКИХ К ОПУХОЛЕВЫМ МАРКЕРАМ, ГАЛОГЕНИРОВАННЫХ <sup>124</sup>I**

**Н.А. Верлов, В.С. Бурдаков, И.А. Кулаков, Т.А. Штам, Л.А. Гараева, А.С. Спицына, Е.Д. Путевич, С.С. Емельянова, А.В. Волницкий, А.А. Грачев, О.А. Толичева, А.Л. Конева**

*НИЦ "Курчатовский институт" – ПИЯФ, Гатчина*

Разработка противоопухолевых радиофармпрепаратов на основе изотопа <sup>124</sup>I имеет важное значение для повышения эффективности диагностики и лечения онкологических заболеваний. Использование <sup>124</sup>I позволяет проводить высокоточные позитронно-эмиссионные томографические (ПЭТ) исследования, что способствует раннему и точному определению локализации и степени распространенности опухолей. Кроме того, радиофармпрепараты на основе <sup>124</sup>I обладают перспективой использования в радионуклидной терапии. Галогенирование биологических молекул радиоактивными изотопами йода имеет большую историю и является технически достаточно совершенным и универсальным методом.

В нашем исследовании мы оценили эффективность противоопухолевой терапии антител галогенированных радиоактивным изотопом <sup>124</sup>I. В предварительных экспериментах было показано накопление моноклональных антител (мкАт) к VEGFR и stabilin-1 в тканях опухоли (12,3 и 14,5 %ID, соответственно), исследование проводили на мышах Balb/C с перевитой опухолью CT26. Процедура галогенирования <sup>124</sup>I была отработана как на холодном йоде, так и на <sup>125</sup>I, радиохимическая чистота препарата меченных антител составляла не менее 98,5%. При внутривенном введении препаратов антител мышам через трое суток после трансплантации опухолевых клеток (CT26, 5×10<sup>5</sup> кл/мышь) оценивали динамику роста опухолевого узла и выживаемость в исследуемых группах животных.

Торможение роста опухолевого узла в экспериментальных группах составило не менее 25% на 10е сутки после трансплантации опухолевого узла. Медиана выживаемости животных составила 30 и 35 суток (в сравнении с контрольными группами – 26 суток), выживаемость животных получавших терапию мкАТ VEGFR+<sup>124</sup>I (10 мБк/мышь) и мкАТ stabilin1+<sup>124</sup>I (10 мБк/мышь) достоверно выросла, HR=0,28 (p<0,05) и HR=0,22 (p<0,05), соответственно). В экспериментах на животных было получено экспериментальное подтверждение эффективности применения <sup>124</sup>I для противоопухолевой терапии.

**INVESTIGATION OF THE ANTITUMOR THERAPEUTIC EFFECT OF RADIOPHARMACEUTICALS BASED ON MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC TO TUMOR MARKERS HALOGENATED WITH <sup>124</sup>I**

**N.A. Verlov, V.S. Burdakov, I.A. Kulakov, T.A. Shtam, L.A. Garayeva, A.S. Spitsyna, E.D. Putevich, S.S. Emelyanova, A.V. Volnitsky, A.A. Grachev, O.A. Tolicheva, A.L. Konevega**

*NRC «Kurchatov Institute» – PNPI, Gatchina*

The development of antitumor radiopharmaceuticals based on the isotope <sup>124</sup>I is of great importance for enhancing the effectiveness of cancer diagnosis and treatment. The use of <sup>124</sup>I enables highly accurate positron emission tomography (PET) imaging, which facilitates the early and precise determination of the localization and extent of tumor spread. Additionally, radiopharmaceuticals based on <sup>124</sup>I hold promise for use in radionuclide therapy. Halogenation of biological molecules with radioactive iodine isotopes has a long history and is a technically advanced and versatile method.

In our study, we evaluated the effectiveness of antitumor therapy using antibodies halogenated with the radioactive isotope <sup>124</sup>I. Preliminary experiments demonstrated the accumulation of monoclonal antibodies (mAbs) against VEGFR and stabilin-1 in tumor tissues (12.3%ID and 14.5%ID, respectively). These experiments were conducted on Balb/C mice with transplanted CT26 tumors. The halogenation procedure with <sup>124</sup>I was optimized using both cold iodine and <sup>125</sup>I, and the radiochemical purity of the labeled antibody preparations was at least 98.5%. Following intravenous administration of antibody preparations to mice three days after tumor cell transplantation (CT26, 5×10<sup>5</sup> cells per mouse), we assessed tumor growth dynamics and survival in the studied animal groups.

Tumor growth inhibition in the experimental groups was at least 25% on the 10th day post-tumor transplantation. The median survival of the animals was 30 and 35 days (compared to 26 days in the control groups). The survival rates of the animals treated with mAb VEGFR+<sup>124</sup>I (10 MBq/mouse) and mAb stabilin1+<sup>124</sup>I (10 MBq/mouse) significantly increased, with hazard ratios (HR) of 0.28 (p<0.05) and 0.22 (p<0.05), respectively.

These animal experiments provided experimental evidence supporting the effectiveness of using <sup>124</sup>I for antitumor therapy.



## ВИЗУАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ХИМИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ

П.В. Погодин<sup>1</sup>, Г.С. Малахов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича; <sup>2</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Работа с библиотеками химических соединений прочно вошла в практику современного исследователя в области поиска и разработки в качестве лекарств биологически активных химических соединений. Важная характеристика любой библиотеки или выборки химических соединений – разнообразие представленных в ней структур. Соответственно, актуальной научной проблемой является оценка и представление этого разнообразия в понятном человеку виде.

В нашей работе мы предлагаем визуальный подход к решению этой проблемы. Взяв за основу метод анализа текста посредством построения облака слов/тэгов, мы адаптируем его для оценки химического разнообразия библиотек химических соединений: 1) выделяем все скаффолды (Bemis & Murcko, 1996) структур в библиотеке химических соединений; 2) подсчитываем частоту их встречаемости; 3) графически отображаем скаффолды химических соединений таким образом, чтобы длина С-С связи в них была пропорциональна частоте встречаемости скаффолда. Нами вручную была построена диаграмма разнообразия выборки 1155 одобренных для клинического применения лекарств (Malakhov & Pogodin, 2024), которая демонстрирует высокое разнообразие на уровне скаффолдов, а также показана применимость диаграммы в качестве элемента графического интерфейса базы данных химических структур и их свойств (<https://rsf-23-73-01058.github.io/scaffolds-of-the-known-drugs/>).

На текущий момент мы реализовали алгоритм автоматического построения диаграммы для визуальной оценки химического разнообразия ([https://rsf-23-73-01058.github.io/test\\_structs-placement/](https://rsf-23-73-01058.github.io/test_structs-placement/)), который ляжет в основу свободно доступного в сети Интернет веб-приложения.

*Финансирование.* Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 23-73-01058, <https://rscf.ru/project/23-73-01058>.

1. Bemis GW, Murcko MA. The properties of known drugs. 1. Molecular frameworks. *J Med Chem* 1996, 39(15): 2887-2893.
2. Malakhov G, Pogodin P. Dataset of drugs, their molecular scaffolds and medical indications with interactive visualization. *Data in Brief* 2024, 54: 110417.

## VISUAL ASSESSMENT OF CHEMICAL DIVERSITY

P.V.Pogodin<sup>1</sup>, G.S. Malakhov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Chemistry; <sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow

Chemical libraries are integral part of the modern researchers' practice in the field of discovery and development of novel biologically active compounds. And chemical diversity is the important characteristic of any chemical library. Thus, assessment and representation of chemical diversity is the relevant scientific problem: there is a need to provide the researchers with the simple and intuitive representation of diversity.

Our goal is to develop the visual approach to this problem. We are adapting the method of word cloud building from the field of text analysis: we identify each scaffold (Bemis & Murcko, 1996) present in the set of chemical compounds, calculate frequency of occurrence and depict it in such a way that the length of C-C bond is proportional to the scaffold's frequency of occurrence. We manually build the diversity diagram for the set of 1155 known drugs (Malakhov & Pogodin, 2024), which demonstrate the high diversity of this set on the level of scaffolds and may be used as an element of user interface (<https://rsf-23-73-01058.github.io/scaffolds-of-the-known-drugs/>).

At the moment we finished the implementation of an algorithm for the automatic construction of the diversity diagram ([https://rsf-23-73-01058.github.io/test\\_structs-placement/](https://rsf-23-73-01058.github.io/test_structs-placement/)), which will be the basis of the web application for visual assessment of chemical diversity.

*Funding:* The study was supported by a Russian Science Foundation, grant No 23-73-01058 <https://rscf.ru/en/project/23-73-01058/>

1. Bemis GW, Murcko MA. The properties of known drugs. 1. Molecular frameworks. *J Med Chem* 1996, 39(15): 2887-2893.
2. Malakhov G, Pogodin P. Dataset of drugs, their molecular scaffolds and medical indications with interactive visualization. *Data in Brief* 2024, 54: 110417.

### **ЭКЗОСОМЫ МОЛОКА ЛОШАДИ – СРЕДСТВА ДОСТАВКИ ПРЕПАРАТОВ ДНК- И мРНК-ВАКЦИН**

**С.Е. Седых, А.М. Тимофеева, Д.Н. Антропов, Г.А. Степанов, Г.А. Невинский**

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; Новосибирский государственный университет, Новосибирск*

К настоящему времени не предложено универсальное средство для доставки ДНК- и мРНК вакцин в организм лабораторных животных. Искусственно получаемые липосомы имеют ряд общеизвестных недостатков и нежелательных побочных эффектов. Целью данной работы была разработка методики «загрузки» ДНК- и мРНК-вакцин (получаемых на основе плазмиды pVAX1), содержащих ген RBD, с помощью экзосом молока и вспомогательных соединений. Для выделения экзосом из препаратов молока лошади использовали ранее разработанную нами методику, включающую стадии центрифугирования, ультрафильтрации и ультрацентрифугирования и дополнительной очистки от совыделяющихся примесей при помощи гель-фильтрации. Полученные препараты «загружали» ДНК- и мРНК-вакцинами, загруженными препаратами иммунизировали лабораторных мышей линии CD1 и других. Вакцину вводили дважды, с интервалом две недели, через две недели после второй иммунизации животных забивали и проводили анализ содержания антител против RBD.

Показано, что препараты ДНК- и мРНК-вакцин эффективно загружаются в экзосомы молока. У лабораторных животных наблюдали статистически достоверное повышение титров антител к RBD, сопоставимое с таковым при иммунизации препаратом RBD

Полученные результаты указывают на то, что экзосомы молока могут быть использованы в качестве перспективного средства доставки препаратов ДНК- и мРНК-вакцин.

### **HORSE MILK EXOSOMES AS DELIVERY VEHICLES FOR DNA AND mRNA VACCINES**

**S.E. Sedykh, A.M. Timofeeva, D.N. Antropov, G.A. Stepanov, G.A. Nevinsky**

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; Novosibirsk State University, Novosibirsk*

A universal vehicle for the delivery of DNA and mRNA vaccines to laboratory animals has not yet been proposed. Synthetic liposomes have a number of known disadvantages and undesirable side effects. The aim of this work was to develop a method of “loading” DNA and mRNA vaccines (derived from the pVAX1 plasmid) containing the RBD gene using milk exosomes and auxiliary compounds. To isolate exosomes from horse milk preparations, we used a previously developed method that included centrifugation, ultrafiltration, ultracentrifugation and additional purification from co-isolating impurities by gel filtration. The resulting preparations were “loaded” with DNA and mRNA vaccines, and laboratory mice of the CD1 and other lines were immunized with the “loaded” exosome preparations. Two weeks after the second immunization, the animals were slaughtered and the levels of antibodies against RBD were analyzed.

It was shown that DNA and mRNA vaccine preparations are effectively loaded into milk exosomes. A statistically significant increase in RBD antibody titers was observed in experimental animals, comparable to that observed after immunization with the RBD preparation.

The results obtained indicate that milk exosomes can be used as a promising vehicle for the delivery of preparations of DNA and mRNA vaccines.

# 100000+Я

## ООО «Биотек кампус»

Крупнейший и самый производительный в России Центр полногеномного секвенирования.

Центр реализует Национальную генетическую Инициативу «100 000 + Я», целью которой является создание уникальной научной базы данных полногеномных последовательностей граждан РФ.



## Направления работы ООО «Биотек кампус»

- «Вторичные находки» в российской популяции
- Российский платиновый геном. Стандартизация лабораторных процедур и биоинформатических алгоритмов в РФ
- Фармакогенетика
- Валидация генетических находок. Функциональный анализ новых генетических вариантов. Разработка генотерапевтических препаратов.



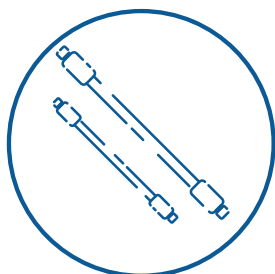
Хотите вместе с нами развивать геномные исследования в РФ?  
Пишите на [info@biotc.ru](mailto:info@biotc.ru) с пометкой «Сотрудничество».

Сайт Национальной генетической Инициативы «100 000 + Я»  
[biotechcampus.ru](http://biotechcampus.ru)





## КОМПЛЕКСНОЕ ОСНАЩЕНИЕ ЛАБОРАТОРИЙ



Хроматографические  
колонки



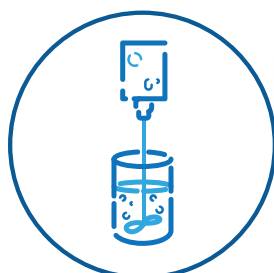
Стандартные  
образцы



Растворители для  
ВЭЖХ / ОСЧ



Аналитические  
приборы



Лабораторное  
оборудование



Оборудование  
Life Sciences



Микробиология



Химические  
реактивы



Биохимические  
реактивы

[chimmed.ru](http://chimmed.ru)



**Более 20 тысяч позиций в наличии на складе в Москве!**

ООО «ТД «ХИММЕД»

Москва, 115230, Каширское шоссе, дом 3, корпус 2, строение 4, этаж 6

Тел.: +7 495 640 4192, [mail@chimmed.ru](mailto:mail@chimmed.ru)

## МЕТОДЫ ИСКУССТВЕННОГО ИНТЕЛЛЕКТА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ РАБОТЫ МЕДИЦИНСКИ ЗНАЧИМЫХ БЕЛКОВ С АТОМАРНЫМ РАЗРЕШЕНИЕМ

М.Г. Хренова, А.В. Кривицкая, А.М. Егоров

МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Современные исследования механизмов ферментативных реакций зачастую включают анализ молекулярно-динамических траекторий, рассчитанных как с классическими, так и с комбинированными квантовыми и классическими (КМ/ММ) потенциалами. Это порождает большой набор данных, для анализа которых требуются специализированные подходы. Применение методов искусственного интеллекта позволяет справиться с этой задачей, а также получить более детализированную информацию и найти неочевидные взаимосвязи рассчитываемых микропараметров с наблюдаемыми свойствами. В рамках доклада будут представлены результаты, полученные для бактериальных ферментов бета-лактамаз и пенициллин-связывающих белков, играющих определяющую роль в резистентности бактерий к бета-лактамам антибиотикам, а также по флуоресцентным белкам, используемым в качестве биомаркеров в тканях и клетках. В качестве больших данных в представленных задачах используются геометрические параметры белковой глобулы и ключевые расстояния в активных центрах в фермент-субстратных комплексах. Такие данные используются для определения конформационной подвижности, эффективности связывания, а также кинетических параметров ферментативных реакций и энергий электронных переходов. В качестве более чувствительной характеристики анализируются карты лапласиана электронной плотности в реакционной области с помощью нейросетевого подхода.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Научно-образовательной школы МГУ «Мозг, когнитивные системы, искусственный интеллект» (проект 23-Ш03-04) с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ им. М.В. Ломоносова.*

## ARTIFICIAL INTELLIGENCE FOR STUDYING MECHANISMS IN MEDICALLY IMPORTANT PROTEINS WITH ATOMIC RESOLUTION

M.G. Khrenova, A.V. Krivitskaya, A.M. Egorov

Lomonosov Moscow State University, Moscow

Modern studies of the mechanisms of enzymatic reactions often include analysis of molecular dynamic trajectories calculated with either classical or combined quantum and classical (QM/MM) potentials. This generates big data that requires specialized approaches to analyze. The use of artificial intelligence methods makes it possible to cope with this task, as well as to obtain more detailed information and find non-obvious relationships between the calculated microparameters and the observed properties. The report will present the results obtained for bacterial enzymes beta-lactamases and penicillin-binding proteins, which play a decisive role in bacterial resistance to beta-lactam antibiotics, as well as for fluorescent proteins used as biomarkers in tissues and cells. Geometry parameters of the protein globule and key distances at active sites in enzyme-substrate complexes are used as big data in the presented tasks. It allows one to determine flexibility, binding efficiency, as well as kinetic parameters of enzymatic reactions and energies of electronic transitions. As a more sensitive characteristic, the Laplacian of the electron density maps in the reaction region are analyzed using a neural network approach.

*This work was supported by Interdisciplinary Scientific and Educational School of Moscow State University "Brain, cognitive systems, artificial intelligence" (#23-Sh03-04). The research is carried out using the equipment of the shared research facilities of HPC computing resources at Lomonosov Moscow State University.*

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НЕЖЕЛАТЕЛЬНОГО СВЯЗЫВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННО-ПОДОБНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ И ДИПЕПТИДОВ С ГЛОБУЛЯРНЫМИ БЕЛКАМИ

Н. Борущко<sup>1</sup>, С. Панасенко<sup>1,2</sup>, М. Петухов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Петербургский институт ядерной физики, НИЦ "Курчатовский институт, Гатчина;

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург

В клетках человека функционирует большое количество ультракоротких биологически активных пептидов длиной 2–4 аминокислотных остатка (УКП), которые продуцируются протеасомами, эндо- и экзо-пептидазами. Хотя большинство этих пептидов быстро метаболизируются, другие достаточно стабильны, обладают широким спектром биологической активности и поэтому являются интересными объектами исследований. Кроме того, многие УКП являются лекарственно-подобными соединениями, нетоксичны и поэтому имеют большое практическое значение при разработке новых лекарств.

В этой работе с помощью молекулярного моделирования и докинга лигандов было исследовано связывание 136 органических лекарственно-подобных лигандов из репрезентативного набора белковых комплексов из базы данных PDBbind и 400 дипептидов со свободными N- и C-концами, включая все возможные комбинации из 20 стандартных аминокислот с глобулярными белками. Сравнительный анализ показал, что вероятность нежелательного связывания дипептидов и органических лекарственно-подобных соединений со случайными белками-рецепторными примерно одинакова (в среднем ~2%) и может варьироваться в широком диапазоне от 0 до 11%. Было показано, что ~77% дипептидов и ~64% органических лекарственно-подобных соединений обладают способностью связываться со случайными глобулярными белками. Аффинность и селективность дипептидов зависят от аминокислотного состава и не зависят от положения аминокислот в дипептидах. Аминокислотные остатки Glu, Asp, Arg, His, Asn, Gln, Ser, Thr, Gly и Tyr в среднем имеют некоторую тенденцию стабилизировать комплексы глобулярных белков с дипептидами, в которые они входят, а Val, Phe, Leu, Ile и Lys - дестабилизировать. В целом, при связывании с глобулярными белками дипептиды с отрицательно заряженными аминокислотными остатками проявляют относительно низкую селективность по сравнению с неполярными аминокислотными остатками

## COMPARATIVE ANALYSIS OF SIDE-BINDING OF DRUG-LIKE ORGANIC COMPOUNDS AND DIPEPTIDES WITH GLOBULAR PROTEINS

N. Borushko<sup>1</sup>, S. Panasenko<sup>1,2</sup>, M. Petukhov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>St Petersburg Institute of Nuclear Physics, Kurchatov Institute, Gatchina; <sup>2</sup>Peter the Great St Petersburg Polytechnic University, St Petersburg

A large number of ultrashort biologically active peptides with a length of 2–4 amino acid residues (USP), which are produced by proteasomes, endo- and exopeptidases, function in human cells. Although most of these peptides are rapidly metabolized, others are quite stable and have a wide range of biological activities and therefore are interesting objects of research. In addition, many USP are drug-like, non-toxic and of great practical importance in the development of new drugs.

In this work, the binding of 136 drug-like organic ligands from a representative set of protein complexes from the PDBbind database and 400 dipeptides with free N- and C-ends, including all possible combinations of 20 standard amino acids, were investigated using molecular modeling and ligand docking with globular proteins. Comparative analysis showed that the probability of side binding of the dipeptides and the drug-like organic compounds with random receptor proteins is approximately the same (on average ~2%) and can vary in a wide range from 0 to 11%. It has been shown that ~77% of dipeptides and ~64% of drug-like organic compounds have the ability to bind to random globular proteins. The affinity and selectivity of dipeptides depends on the amino acid composition and do not depend on the position of amino acids in dipeptides. Amino acid residues Glu, Asp, Arg, His, Asn, Gln, Ser, Thr, Gly and Tyr on average have some tendency to stabilize complexes of globular proteins with dipeptides into which they are included, and Val, Phe, Leu, Ile and Lys to destabilize. In general, when binding to globular proteins, dipeptides with negatively charged amino acid residues exhibit relatively low selectivity compared to nonpolar amino acid residues.

## КОМПЬЮТЕРНЫЙ ПОИСК НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, НАПРАВЛЕННЫХ НА ВИРУСНЫЕ БЕЛКИ С НЕИЗВЕСТНЫМ СПЕКТРОМ ЛИГАНДОВ

Д.А. Карасев, Б.Н. Соболев, С. Каримова, Д.А. Филимонов, О.А. Тарасова

НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

Поиск соединений активных против вновь выявленных вирусов востребован, когда сведения о патогене на первых порах ограничены его геномом и транслируемыми белками. Ясно, что на этом этапе мы не располагаем сведениями о лигандах этих белков. Методы машинного обучения с использованием данных по известным взаимодействиям белок–лиганд позволяют спрогнозировать соединения активные против новых белков. Мы разработали метод для прогноза противовирусной активности химических соединений на основе комбинированных дескрипторов, представляющих пары белок–лиганд. Подобные пары вместе с экспериментально установленными показателями аффинности составили обучающую выборку. Наш подход позволяет прогнозировать взаимодействия для потенциальных мишеней с неизвестным спектром лигандов – в отношении соединений как с известным, так и с неустановленным набором лигандов.

Мы апробировали наш метод на данных, представляющих протеазы структурного надсемейства химотрипсина и их ингибиторы. Данные о соответствующих взаимодействиях были извлечены с помощью оригинальной процедуры из базы данных ChEMBL. Множественное выравнивание белков было построено на основе попарных трехмерных выравниваний. В отсутствие трехмерных структур для данного белка использовались данные по структуре его ближайшего гомолога. Это позволило преодолеть ограничения, связанные со значительной дивергенцией вирусных протеаз на уровне последовательностей. Дескрипторы белков были рассчитаны на основе выровненных участков. Дескрипторы лигандов были рассчитаны по их химическим структурам.

Прогностические модели были валидированы согласно строгой процедуре с исключением всех пар, содержащих один из компонентов тестовой пары. Так мы воспроизвели ситуацию с прогнозом для нового лиганда и новой мишени. При этом были получены высокие оценки качества прогнозирования, что указывает на перспективность предложенного метода при поиске лекарственных средств, а также при выявлении нежелательных взаимодействий с белками человека.

*Исследование выполнено при поддержке программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021 - 2030 годы) (№ 124050800018-9).*

## COMPUTATIONAL SEARCH FOR SMALL MOLECULE COMPOUNDS TARGETING VIRAL PROTEINS WITH UNKNOWN LIGAND SPECTRA

D.A. Karasev, B.N. Sobolev, S. Karimova, D.A. Filimonov, O.A. Tarasova

Institute of Biomedical Chemistry, Moscow

The search for compounds active against newly identified viruses is in demand when information about the pathogen is initially limited to its genome and translated proteins. At this stage, we cannot know anything about the ligands of these proteins. Machine learning methods trained on known protein-ligand interactions are used to predict compounds that are active against new proteins.

We developed a method for predicting the antiviral activity of chemical compounds based on combined descriptors representing protein-ligand pairs. Such pairs, together with experimentally established affinities, formed a training set. Our approach allows us to predict interactions for potential targets with an unknown ligand spectrum – for compounds with both known and unknown sets of ligands. We tested our method on data representing proteases of the chymotrypsin structural superfamily and their inhibitors. Data on the corresponding interactions were extracted using an original procedure from the ChEMBL database. Multiple protein alignment was based on pairwise three-dimensional alignments. In the absence of three-dimensional structures for a given protein, data on the structure of its closest homolog were used. This allowed us to overcome the limitations associated with significant divergence of viral proteases at the sequence level. Protein descriptors from proteins were calculated based on aligned regions. Ligand descriptors were calculated based on their chemical structures.

The predictive models were validated using a rigorous procedure, with the exclusion of all pairs containing one of the components of the test pair. In this way, we simulated the situation with the predictive model for a new ligand and a new target. According to this scenario, high prediction quality scores were obtained, indicating the potential of the suggested method in drug discovery and detection of adverse interactions with human proteins.

*The study was performed in the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021–2030) (№ 124050800018-9).*

## ПРОГНОЗИРОВАНИЕ МЕДИЦИНСКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ АНАЛИЗОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БОЛЬШИХ ЯЗЫКОВЫХ МОДЕЛЕЙ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ СКРИНИНГА ДЕПРЕССИИ

К.Д. Балбек<sup>1,2</sup>, А.В. Мелерзанов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва; <sup>2</sup>Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный

В данном исследовании изучается применение моделей на основе архитектуры Transformers, в частности DistilBERT и ELECTRA, для интеграции электронных медицинских записей (EHR) с целью комплексного скрининга депрессии. Используя набор данных NHANES, большие языковые модели были дообучены для вывода симптомов, связанных с депрессией, путем анализа как ответов на опросник здоровья пациента (PHQ), так и лабораторных данных с достаточным уровнем корреляции. В отличие от традиционных подходов, которые преимущественно заточены на анализе либо текстовых, либо числовых данных, представленная мультимодальная методология эффективно сочетает оба типа данных, демонстрируя перспективное направление для улучшенной предикции в области здравоохранения.

DistilBERT, упрощенная версия BERT, обеспечивает эффективную обработку с минимальной вычислительной нагрузкой, в то время как ELECTRA использует механизм обнаружения замененных токенов с целью оптимизации. Обе модели были адаптированы для обработки мультимодальных данных благодаря построению дополнительных слоев нейронных сетей. Также были выявлены ограничения, особенно в обработке числовых данных. Дообученные модели показали значительные улучшения результатов, особенно в задачах, связанных с определением РПП, но все еще сталкивались с трудностями при более сложной симптоматике, такой как нарушения сна и усталость, что подчеркивает необходимость дальнейшего совершенствования моделей.

Будущие исследования будут сосредоточены на интеграции более продвинутых архитектур, таких как механизмы перекрестного внимания, и использовании передовых моделей для лучшего понимания и интерпретации медицинских данных. Кроме того, включение внешних медицинских онтологий и баз знаний может помочь в разработке более точных, надежных и клинически полезных инструментов ИИ для применения в здравоохранении.

## INFERENCE OF MEDICAL LABORATORY TESTS USING LARGE LANGUAGE MODELS FOR IMPROVED DEPRESSION SCREENING

K. Balbek<sup>1,2</sup>, A. Melerzanov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow; <sup>2</sup>Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny

This study investigates the application of transformer-based models, specifically DistilBERT and ELECTRA, in integrating Electronic Health Records (EHRs) for comprehensive depression screening. Utilizing the NHANES dataset, these models were fine-tuned to infer depression-related symptoms by analyzing both Patient Health Questionnaire (PHQ) responses and correlated laboratory data. Unlike traditional approaches that predominantly analyze either text or numerical data, this dual-model methodology effectively combines both modalities, demonstrating a promising direction for improved predictive analytics in healthcare.

DistilBERT, a distilled version of BERT, offers efficient processing with minimal computational overhead, while ELECTRA employs a replaced token detection mechanism, optimizing it for token-level tasks. Both models were adapted to handle multi-modal data due to completed feature engineering and custom neural network layers construction. Nevertheless, limitations were identified, particularly in processing numerical data. The fine-tuned models showed significant improvements, especially for tasks involving appetite and nutrition indicators, but still struggled with more complex symptomatology like sleep disturbances and fatigue, highlighting areas for further refinement.

The findings point to potential biases within the dataset and the computational challenges associated with fine-tuning large models. Future work will focus on integrating more advanced architectures, such as cross-attention mechanisms, and leveraging state-of-the-art models to better understand and interpret medical data. Additionally, incorporating external medical ontologies and knowledge bases may help in developing more accurate, reliable, and clinically useful AI tools for healthcare applications.



### **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОТЕОМИКИ РАКА ЯИЧНИКА**

**Е.В. Ильгисонис, А.А. Ключникова, А.С. Козлова, Е.В. Сарыгина, Е.А. Пономаренко**

*НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва*

Появление протеомики произвело революцию в исследованиях рака, предоставив глубокое понимание молекулярных основ онкогенеза. В этом исследовании мы повторно анализировали набор протеомных данных рака яичников, используя передовые методы машинного обучения (ML) для выявления биомаркерных паттернов. Мы использовали набор данных из 189 протеомных датасетов из базы данных PRIDE, включая образцы серозного рака яичников, нераковых тканей и плазмы. Данные были разделены на 80% для обучения и 20% для проверки. Контролируемые модели машинного обучения, включая сети глубокого обучения, достигают впечатляющей точности 94% в прогнозировании и диагностике рака яичников, значительно превосходя традиционные методы. Методы отбора признаков определяют ранжированный список из 50 ключевых белков, который мы используем для анализа путей. Этот анализ подчеркивает дерегуляцию сигнальных путей PI3K/AKT и MAPK, которые играют важную роль в патогенезе рака яичников. Наш анализ также выявил «коровый» протеом, характеризующий образцы рака яичников со специфическими паттернами экспрессии, включая активацию ферментов, участвующих в гликолизе, и подавление митохондриальных белков, что позволяет предположить метаболическое перепрограммирование в раковых клетках. Наши результаты демонстрируют возможности ML в преобразовании данных протеомики в практические биологические идеи, открывая путь к улучшению доклинического скрининга рака и персонализированному лечению рака яичников.

### **MACHINE LEARNING UNLOCKS NEW INSIGHTS IN OVARIAN CANCER PROTEOMICS**

**E.V. Ilgisonis, A.A. Kliuchnikova, A.S. Kozlova, E.V. Sarygina, E.A. Ponomarenko**

*Institute of Biomedical Chemistry, Moscow*

The advent of proteomics has revolutionized cancer research, offering profound insights into the molecular underpinnings of oncogenesis. In this study, we reanalyzed an ovarian cancer proteomics dataset using advanced machine learning (ML) techniques to uncover novel biomarker patterns. The dataset, comprising 189 proteomic profiles from the PRIDE database, includes samples from serous ovarian cancer, non-cancerous tissues, and plasma. Data were split into 80% for training and 20% for validation. Supervised ML models, including deep learning networks, achieve an impressive 94% accuracy in predicting and diagnosing ovarian cancer, significantly outperforming traditional methods. Feature selection techniques identify a ranked list of 50 key proteins, which we use for pathway analysis. This analysis highlights the deregulation of the PI3K/AKT and MAPK signaling pathways, known to play crucial roles in ovarian cancer pathogenesis. Our analysis also reveals a core proteome characterizing ovarian cancer samples with specific expression patterns, including upregulation of enzymes involved in glycolysis and downregulation of mitochondrial proteins, suggesting metabolic reprogramming in cancer cells. This reanalysis not only provides a comprehensive proteomic profile of ovarian cancer but also underscores the potential of deep learning models for early prediction and diagnosis. Our findings demonstrate the power of ML in transforming proteomics data into actionable biological insights, paving the way for improved preclinical cancer screening and personalized management of ovarian cancer.

## КОЛЬЦЕВЫЕ РНК В ПАТОГЕНЕЗЕ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА, АССОЦИИРОВАННОЙ С МУТАЦИЯМИ В ГЕНЕ GBA1 НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ТРАНСКРИПТОМА ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ МАРОФАГОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Т.С. Усенко

НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина

Мутации в гене GBA1 являются фактором высокого риска распространенного нейродегенеративного заболевания, болезни Паркинсона (БП). Молекулярные механизмы, а также биомаркеры БП, ассоциированной с мутациями в гене GBA1 (GBA1-БП) неизвестны. Более того, не у всех носителей развивается БП в течение жизни (GBA1-носители). Недавние данные указывают на возможную роль кольцевых РНК (circRNA) в патогенезе БП.

Цель: провести сравнительный анализ представленности кольцевых РНК (circRNA) в первичной культуре макрофагов периферической крови (макрофаги) пациентов с GBA1-БП, GBA1-носителей и контроля.

Было проведено секвенирование тотальной РНК с последующим анализом с использованием CIRCEplorer2 и DESeq макрофагов 3 пациентов с GBA1-БП, 4 GBA1-носителей и 6 индивидуумов контрольной группы.

В макрофагах исследуемых групп было идентифицировано 96 circRNA. 25 circRNA дифференциально экспрессировались в группе пациентов с GBA1-БП по сравнению с контролем (6 – down, 19 – up), 40 circRNA в группе GBA1-носителей по сравнению с контролем (10-down, 30-up) и 44 circRNA в группе пациентов с GBA1-БП по сравнению с GBA1-носителями (23 - down, 21-up). Также было выявлено 17 circRNA дифференциально экспрессирующихся в группе пациентов с GBA1-БП как по сравнению с контролем, так и GBA1-носителями, представляя тем самым наибольший интерес для дальнейших исследований, так как могут быть рассмотрены в качестве потенциальных биомаркеров БП (circGPNMB, circRIPOR1, circUBAP2L, circP2RX4, circIQGAP1, circNFX1, circLOC124900275, circUBE2F-SCLY, circFBH1, circCHD7, circRPS6KA1, circVAMP7, circTBXAS1, circFAM50A, circCTBP1-DT, circNFE2L1, circITGAL). Также было выявлено 6 circRNA представленных у всех носителей мутаций в гене GBA1 независимо от статуса БП по сравнению с контролем (circSTAB1, circMALAT1, circITPA, circIMPACT, circTTC31, circMYL6), что может быть связано со вкладом мутаций в гене GBA1.

Наши результаты подтверждают и расширяют, представления о роли circRNA в патогенезе БП, а также о возможности их использования в качестве биомаркера БП, в частности для GBA1-БП.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема №1023031500037-7-1.6.8;1.6.1;1.6.2;1.6.3).

## CIRCULAR RNAs IN THE PATHOGENESIS OF PARKINSON'S DISEASE ASSOCIATED WITH MUTATIONS IN THE GBA1 GENE BASED ON TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF PRIMARY CULTURE OF PERIPHERAL BLOOD MACROPHAGES

T.S. Usenko

NRC «Kurchatov Institute» – PNPI, Gatchina

Mutations in the GBA1 gene are a great risk factor for the common neurodegenerative disorder, Parkinson's disease (PD). The molecular mechanisms and biomarkers of PD associated with mutations in the GBA1 gene (GBA1-PD) remain unknown. Furthermore, not all carriers of GBA1 mutations develop PD during their lifetime (GBA1-carriers). Recent studies suggest a potential role for circular RNAs (circRNAs) in PD pathogenesis.

The aim was to conduct a comparative analysis of differentially expressed circular RNAs (circRNAs) in primary cultures of peripheral blood macrophages (macrophages) from patients with GBA1-PD, GBA1 carriers, and control individuals.

Total RNA sequencing followed by analysis using CIRCEplorer2 and DESeq was performed on macrophages from 3 patients with GBA1-PD, 4 GBA1 carriers, and 6 control individuals.

A total of 96 circRNAs were identified in macrophages across the studied groups. Of these, 25 circRNAs were differentially expressed in the GBA1-PD group compared to controls (6 downregulated, 19 upregulated), 40 circRNAs in GBA1 carriers compared to controls (10 downregulated, 30 upregulated), and 44 circRNAs in the GBA1-PD group compared to GBA1 carriers (23 downregulated, 21 upregulated). Additionally, 17 circRNAs were differentially expressed in the GBA1-PD group compared to both controls and GBA1 carriers, representing the most interest for further research as potential biomarkers for PD (circGPNMB, circRIPOR1, circUBAP2L, circP2RX4, circIQGAP1, circNFX1, circLOC124900275, circUBE2F-SCLY, circFBH1, circCHD7, circRPS6KA1, circVAMP7, circTBXAS1, circFAM50A, circCTBP1-DT, circNFE2L1, circITGAL). Moreover, 6 circRNAs were found to be present in all GBA1 mutation carriers, regardless of PD status, compared to controls (circSTAB1, circMALAT1, circITPA, circIMPACT, circTTC31, circMYL6), which may be related to the contribution of GBA1 mutations.

Our results confirm and expand the understanding of the role of circRNAs in the pathogenesis of PD and highlight their potential use as biomarkers for PD, particularly for GBA1-PD.

This work was conducted as part of the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, project №1023031500037-7-1.6.3.

## ПОИСК УНИВЕРСАЛЬНЫХ МЕТАГЕНОМНЫХ МАРКЕРОВ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА, АССОЦИИРОВАННЫХ С ОТВЕТОМ НА ИММУНОТЕРАПИЮ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ РАКА

В.А. Канаева<sup>1,2</sup>, К.М. Климина<sup>1</sup>, Е.И. Олехнович<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России; <sup>2</sup>Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный Москва

Состав микробиоты кишечника человека влияет на противоопухолевый иммунитет и эффективность иммунотерапии рака. Настоящее исследование направлено на определение универсальных метагеномных маркеров микробиоты кишечника, которые связаны с успешностью иммунотерапии при различных видах рака.

Для работы были загружены метагеномные образцы кишечной микробиоты пациентов, страдающих различными онкологическими заболеваниями (меланома, рак частей желудочно-кишечного тракта, и др.). Из 11 независимых опубликованных в SRA-NCBI исследований было получено 814 образцов: 462 образца от пациентов, которые ответили на терапию (R) и 352 от не ответивших (NR).

Из образцов был восстановлен каталог операционных геномных единиц (ОГЕ). Данный процесс включал сборку метагеномных контигов, биннинг и дерепликацию. Следующим этапом было выявление метагеномных маркеров. Для этого был получен профиль представленности ОГЕ в образцах и проведено дифференциальное ранжирование по степени их влияния на исход иммунотерапии. Маркерные геномные единицы были определены методом пересечения ранжированных списков по всем наборам данных. Для маркерных ОГЕ была проведена таксономическая и функциональная аннотация.

В результате сборки был получен список из 3855 ОГЕ, из которых было выявлено 424 метагеномных маркера: 166 связаны с позитивным исходом лечения (положительные), а 258 – с негативным (отрицательные).

В числе отрицательных маркеров преимущественно обнаруживаются патогенные микроорганизмы, такие как *Hungatella effluvii*, *Raoultella ornithinolytica* и *Klebsiella michiganensis*. В числе положительных маркеров наиболее часто встречаются симбиотические виды: *Bifidobacterium adolescentis*, *Bacteroides uniformis*, *Alistipes putredinis*.

В результате анализа функциональных путей, было установлено, что у R, по сравнению с NR, наблюдалось статистически значимое увеличение метаболизма крахмала и сахарозы. Эти вещества активно ферментируются *B. adolescentis*, которая является положительным маркером.

Для валидации выявленных маркеров была использована модель логистической регрессии, с помощью которой проводилось предсказание результатов иммунотерапии по значениям логарифмических отношений относительных представленностей маркерных ОГЕ. Значение ROC-AUC составило 0.84.

Финансирование: грант РФФ № 22-75-10029 (<https://rscf.ru/project/22-75-10029/>).

## SEARCH FOR UNIVERSAL METAGENOMIC MARKERS OF THE GUT MICROBIOTA ASSOCIATED WITH THE RESPONSE TO IMMUNOTHERAPY OF VARIOUS TYPES OF CANCER

V.A. Kanaeva<sup>1,2</sup>, K.M. Klimina<sup>1</sup>, E.I. Olekhovich<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency; <sup>2</sup>Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow

The composition of the human gut microbiota influences antitumor immunity and the efficacy of cancer immunotherapy. The present study aims to identify universal metagenomic markers of the gut microbiota that are associated with the success of immunotherapy in various cancers.

Metagenomic samples of the gut microbiota of patients suffering from different cancers (melanoma, cancer of parts of the gastrointestinal tract, etc.) were downloaded for the work. A total of 814 samples were obtained from 11 independent studies published in SRA-NCBI: 462 samples from patients who responded to therapy (R) and 352 from non-responders (NR).

A catalog of operational genomic units (OGU) was recovered from the samples. This process involved metagenomic contigs assembly, binning and dereplication. The next step was the identification of metagenomic markers. For this purpose, a profile of OGU representation in the samples was obtained and differential ranking was performed according to their impact on immunotherapy outcome. Marker genomic units were identified by intersection of ranked lists across all datasets. Taxonomic and functional annotation was performed for the marker OGU.

The assembly resulted in a list of 3855 OGU of which 424 metagenomic markers were identified: 166 were associated with positive treatment outcome (positive) and 258 with negative treatment outcome (negative).

Among the negative markers, pathogens such as *Hungatella effluvii*, *Raoultella ornithinolytica* and *Klebsiella michiganensis* are predominantly found. Symbiotic species most commonly found among the positive markers include: *Bifidobacterium adolescentis*, *Bacteroides uniformis*, *Alistipes putredinis*.

As a result of functional pathway analysis, it was found that R, compared to NR, showed a statistically significant increase in starch and sucrose metabolism. These substances are actively fermented by *B. adolescentis*, which is a positive marker.

To validate the identified markers, a logistic regression model was used to predict the results of immunotherapy according to the values of logarithmic ratios of the relative abundance of the marker OGU. The ROC-AUC value was 0.84.

The study is supported by the RSF No. 22-75-10029 (<https://rscf.ru/project/22-75-10029/>).

**ЦИФРОВАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ РАБОТЫ С ЦЕЛЕВЫМИ МЕТАБОЛОМНЫМИ ДАННЫМИ «METABOSCAN AI»:  
КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА, ПЕРВИЧНАЯ ОБРАБОТКА, ВИЗУАЛИЗАЦИЯ, АНАЛИЗ И СИСТЕМАТИЗАЦИЯ**

**К.М. Шестакова, А.А. Болдин, П.М. Резванов, С.А. Апполонова**

*Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва*

Автоматизация процессов в работе с целевыми метаболомными данными является приоритетной задачей, позволяющей не только оптимизировать время выполнения анализа и обработки данных, но и повысить его качество, а также в удобном для пользователя формате выполнять работу с матричными данными. Предлагаемая цифровая система включает в себя следующие функциональные возможности:

- автоматическая интеграция хроматографических пиков на основе методов глубокого обучения;
- проведение внутри- и между-батчами контроля качества целевого метаболомного анализа по образцам QC (лабораторные QC, верхняя точка калибровочной кривой, HQC);
- предобработка сырых матричных данных, включая устранение выбросов, нормализацию, шкалирование и поправку на различные кофакторы;
- углубленный статистический анализ в том числе функция autoML для построения предварительных диагностических и прогностических моделей;
- визуализация данных для наглядной интерпретации получаемых результатов (боксплоты, гистограммы, взвешенные корреляционные сети, бабл-плоты, хитмэпы, AUCROC);
- лабораторно-информационная система (ЛИМС), которая систематизирует, управляет и хранит результаты клинических и метаболомных данных.

Разработанная нами цифровая платформа «Metaboscan AI» значительно упрощает и ускоряет выполнение стандартных процедур в целевом метаболомном анализе, уменьшая количество операций, выполняемых вручную, и минимизируя вероятность ошибок. Четкий контроль качества на всех этапах анализа и предобработка данных обеспечивают высокую надежность и валидность получаемых результатов. Благодаря интегрированным инструментам для визуализации и анализа данных, пользователи могут легко интерпретировать результаты и формировать отчеты в удобном и понятном формате. С использованием ЛИМС, платформа обеспечивает надежное управление и хранение данных, что способствует более эффективной организации и доступу к информации.

Таким образом, цифровая платформа «Metaboscan AI» представляет собой мощный инструмент для автоматизации и улучшения процесса работы с целевыми метаболомными данными. Она предоставляет пользователям возможности для точного, быстрого и надежного анализа целевых метаболомных профилей, что открывает новые горизонты в научных исследованиях и клинической практике.

**DIGITAL PLATFORM FOR DEALING WITH TARGETED METABOLOMIC DATA "METABOSCAN AI": QUALITY CONTROL, PRIMARY PROCESSING, VISUALIZATION, ANALYSIS AND SYSTEMATIZATION**

**K.M. Shestakova, A.A. Boldin, P.M. Rezvanov, S.A. Appolonova**

*Sechenov University, Moscow*

Automation of processes in the work with target metabolomic data is a priority task that allows not only to optimize the time of data analysis and processing, but also to improve its quality, as well as to perform analysis of matrix data in a user-friendly format. The proposed digital system includes the following functions:

- Automatically integrate chromatographic peaks based on deep learning techniques;
- Perform intra- and inter-batch quality control of target metabolomic analysis using QC samples (laboratory QC, upper point of calibration curve, HQC);
- Preprocessing of raw matrix data, including outlier removal, normalization, scaling, and correction for various cofactors;- advanced statistical analysis including autoML function for building preliminary diagnostic and prognostic models;- data visualization for visual interpretation of the results (boxplots, histograms, weighted correlation networks, bubble-plots, hitmaps, AUCROC);
- Laboratory Information System (LIMS), which systematizes, manages and stores the results of clinical and metabolomic data.

Our digital platform "Metaboscan AI" significantly simplifies and speeds up standard procedures in targeted metabolomic analysis, reducing the number of manual operations and minimizing the probability of errors. Quality controls at all stages of analysis and data preprocessing ensure high reliability and validity of the obtained results. With integrated tools for data visualization and analysis, users may easily interpret results and generate reports in an easy-to-understand format. Application of LIMS provides reliable data management and storage, which facilitates better organization and access to information.

In summary, the Metaboscan AI digital platform is a powerful tool for automating and improving the process of working with targeted metabolomic data. It empowers users to accurately, quickly and reliably analyze target metabolomic profiles, which opens new horizons in research and clinical practice.

**PIKE: ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ АМПЛИКОНОВОЙ МЕТАГЕНОМИКИ OXFORD NANOPORE**

**Д.В. Кривonos, Д.Е. Федоров, Д.Н. Конанов, А.В. Введенский, И.В. Сонец, Е.В. Корнеенко, А.С. Сперанская, Е.Н. Ильина**

*НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва*

Сегодня нанопоровое секвенирование представляет большой интерес в области современной метагеномики и позволяя получить прочтения, чья длина полностью покрывает длинные ампликоны, такие как области V1-V9 16S рРНК или полноразмерные участки ITS (ITS1-5.8S-ITS2). Анализ длинных ампликонов, в свою очередь, позволит улучшить таксономическое разрешение сложных микробных сообществ. В то же время нанопоровое секвенирование характеризуется большим количеством ошибок, что затрудняет анализ таких данных. Исходя из этого, возникает задача создания подхода, который бы учитывал специфику платформы и позволял бы нивелировать избыточные ошибки, накапливающиеся в результате секвенирования. Наиболее доступным методом анализа данных секвенирования ампликонов является пакет wf-metagenomics из epi2me-labs. wf-metagenomics включает два встроенных инструмента: kraken2 и minimap2. Алгоритмы, заложенные в эти инструменты, не учитывают ошибки, возникающие в результате секвенирования, что может приводить к росту ложно положительного ответа. Единственным подходом, позволяющим собирать последовательности OTU из данных нанопорового секвенирования, является NanoCLUST. NanoCLUST, в свою очередь, способен проводить анализ прочтений только длиной более 1000 пар нуклеотидов. На практике в ряде случаев приходится анализировать более короткие фрагменты, такие как V3-V4, ITS1 и ITS2. Причем для грибных сообществ это особенно актуально, поскольку даже полноразмерные последовательности ITS могут иметь длину не более 600 пар нуклеотидов. В этом случае остается актуальной задача создания инструмента для анализа данных ампликонного секвенирования без ограничений по размеру ампликонов и позволяющего реконструировать качественные последовательности OTU.

Исходя из потребности в таком инструменте, мы разработали собственный алгоритм, который имплементировали в виде инструмента командной строки Pike. Pike основан на последовательной кластеризации прочтений с последующим построением консенсусных вариантов OTU. В этой работе мы провели валидацию инструмента на собственных синтетических грибных и бактериальных сообществах, провели детальный бенчмаркинг инструмента и провели сравнение нашего подхода с аналогами.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 24-15-00419.*

**PIKE: TOOL FOR OXFORD NANOPORE AMPLICON METAGENOMICS**

**D.V. Krivonos, D.E. Fedorov, D.N. Konanov, A.V. Vvedensky, I.V. Sonets, E.V. Korneenko, A.S. Speranskaya, E.N. Ilina**

*Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russia*

Today, nanopore sequencing is of great interest in the field of modern metagenomics and by allowing to obtain reads whose length completely covers long amplicons, such as V1-V9 regions of 16S rRNA or full-length ITS regions (ITS1-5.8S-ITS2). Analysis of long amplicons will in turn improve taxonomic resolution of complex microbial communities. At the same time, nanopore sequencing is characterized by a large number of errors, which makes it difficult to analyze such data. Based on this, the challenge is to create an approach that takes into account the specificity of the platform and allows for the leveling of excessive errors accumulated as a result of sequencing. The most readily available method for analyzing amplicon sequencing data is the wf-metagenomics package from epi2me-labs. wf-metagenomics includes two built-in tools: kraken2 and minimap2. The algorithms in these tools do not account for errors resulting from sequencing, which can lead to an increase in false positives. The only approach to assembling OTU sequences from nanopore sequencing data is NanoCLUST. NanoCLUST, in turn, is only capable of analyzing reads longer than 1000 nucleotide pairs. In practice, in some cases, it is necessary to analyze shorter fragments such as V3-V4, ITS1 and ITS2. This is especially relevant for fungal communities, since even full-length ITS sequences can be no longer than 600 nucleotide pairs. In this case, the task of creating a tool for analyzing amplicon sequencing data without restrictions on the size of amplicons and allowing for the reconstruction of high-quality OTU sequences remains relevant.

Based on the need for such a tool, we developed our own algorithm, which we implemented as a command-line tool, Pike. Pike is based on sequential clustering of reads followed by the construction of consensus OTU variants. In this work, we validated the tool on our own synthetic fungal and bacterial communities, performed detailed benchmarking of the tool, and compared our approach with analogs.

*This research was supported by the Russian Science Foundation grant No. 24-15-00419.*

## **ИННОВАЦИОННЫЙ ПОДХОД К ОЦЕНКЕ РАБОЧЕЙ ПОЗЫ ОБУЧАЮЩИХСЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ ТЕХНОЛОГИЙ КОМПЬЮТЕРНОГО ЗРЕНИЯ**

**И.И. Новикова, О.М. Куликова**

*Новосибирский научно-исследовательский институт гигиены Роспотребнадзора, Новосибирск*

Статическая нагрузка на организм ребенка, обусловленная спецификой учебного процесса, в том числе в сочетании с длительным воздействием нерациональной рабочей позы и неправильным подбором мебели, становятся факторами риска нарушений осанки и зрения). Использование компьютерного зрения может служить инновационным базисом в решении указанной проблемы путем создания необходимых условий для поддержания ребенком рациональной рабочей позы. Для решения поставленной задачи в настоящее время используются 3D-биомеханические модели, инструментарий REBA, нейронные сети. Но они обладают рядом недостатков, и снижают эффективность, производительность применения компьютерного зрения в гигиеническом мониторинге.

Цель исследования – разработать нейронную сеть оценки рабочей позы обучающихся с применением технологий компьютерного зрения. Исследование отличается от предыдущих по следующим направлениям: 1) впервые формируем комплекс показателей оценки динамики движений ребенка, находящегося в рабочей позе во время выполнения учебных занятий с применением компьютерного зрения; 2) совершенствуем разметку ключевых элементов тела человека путем внесения дополнительных точек (на проекции позвоночника) в модель Body\_25, что позволило решить задачу применения метода Дж. Кобба для диагностики сколиотических изменений; 3) разрабатываем методику оценки оптимальности рабочей позы ребенка с применением нейросети; 4) создаем алгоритм бесконтактного подбора школьной мебели с учетом антропометрических показателей ребенка. Для формирования датасетов использован Roboflow.com. Для расчета антропометрических показателей ребенка и его биомеханики движений использовано семейство моделей YOLO 8. Точность моделирования – 0,83. Нейронная сеть встраивается в андроид-приложения. Разработанный авторский алгоритм, использующий технологии компьютерного зрения, позволяет определить соответствует ли используемая школьная мебель антропометрическим показателям обучающихся.

Результаты исследования могут быть использованы для профилактики нарушений осанки и зрения у детей.

## **INNOVATIVE APPROACH TO THE ASSESSMENT OF SCHOOLCHILDREN'S SITTING POSTURE USING COMPUTER VISION TECHNOLOGIES**

**I.I. Novikova, O.M. Kulikova**

*Novosibirsk Research Institute of Hygiene, Novosibirsk*

The static tension on the child's body resulting from the specifics of the educational process, including the combination of prolonged effects of an irrational sitting posture and the improper selection of furniture, constitute risk factors for postural and visual disorders. The utilisation of computer vision has the potential to serve as an innovative basis for the resolution of the aforementioned issues, whereby the necessary conditions for the child to maintain a rational sitting posture are created. In order to address the aforementioned task, a number of tools and techniques are currently being employed, including 3D-biomechanical models, REBA, neural networks. However, these methods have several shortcomings that impede the efficacy and efficiency of computer vision utilization in hygienic monitoring.

The objective of this study is to develop a neural network for the assessment of learners' sitting posture, utilising computer vision technology. The present study differs from previous studies in several ways: 1) for the first time we form a set of indicators for assessing the dynamics of movements of a child in a sitting posture during the educational activities using computer vision; 2) we improve the marking of key elements of the human body by introducing additional points (on the projection of the spine) in the Body\_25 model, which allowed us to solve the problem of applying J. Cobb's method for diagnosing scoliotic changes; 3) we develop a method for assessing the optimal posture of a child using a neural network; 4) we develop an algorithm for non-contact selection of school furniture, with anthropometric indicators of a child taken into account. The Roboflow.com platform was employed to generate the datasets. The YOLO 8 was employed for the calculation of the anthropometric parameters of the child and its biomechanical movement characteristics. The accuracy of the model is 0.83. The neural network is incorporated into Android applications. The algorithm, developed by the author, employs computer vision technology to ascertain whether the school furniture in use aligns with the anthropometric indicators of schoolchildren.

The findings of this study have the potential to be utilized in the prevention of postural and visual disorders in children.

### ЛОВУШКА ИТЕРАТИВНОГО Ψ-BLAST

**Н.С. Богатырева, Д.Н. Иванков, А.В. Финкельштейн**

*Институт белка РАН, Пушкино*

BLAST, пожалуй, наиболее известная программа в биоинформатике, она является широко используемым инструментом для поиска наиболее похожих последовательностей. А итеративная программа Ψ-BLAST обладает большей чувствительностью и используется для обнаружения удаленных гомологов запрашиваемой последовательности посредством итеративного использования поиска BLAST. Однако количество итераций, которые должен использовать Ψ-BLAST, довольно скудно обосновано в литературе. Наше исследование показывает, что по мере увеличения количества итераций Ψ-BLAST быстро теряет способность руководствоваться запрашиваемой последовательностью при поиске гомологов. При поиске по избыточной базе данных белковых последовательностей (nr) 2021 года Ψ-BLAST уже после второй итерации сохраняет саму последовательность запроса среди топ найденных гомологов только в 18% случаев, то есть уже на второй итерации сама искомая последовательность уходит из топ поиска в 82% случаев. Более того, последовательность запроса все еще находится среди гомологов, найденных Ψ-BLAST после рекомендуемых 10 итераций [Altschul et al., 1997, Nucl. Acids Res., 25:3389-3402] только в 42% случаев, то есть в 58% случаев искомая последовательность вообще не находится после рекомендуемых 10 итераций запуска Ψ-BLAST. Используя значительно меньшую базу данных nr 2011 года для сравнения, мы показали, что наблюдаемые эффекты усиливаются со временем вследствие роста базы данных. Наши выводы подчеркивают необходимость осматривать результаты при интерпретации результатов Ψ-BLAST: степень бдительности должна увеличиваться с размером базы данных. Необходим внимательный мониторинг положения последовательности запроса среди полученных гомологов. Мы рекомендуем использовать исчезновение последовательности запроса из списка гомологов, созданного Ψ-BLAST, в качестве критерия для завершения итераций.

### A PITFALL OF ITERATIVE Ψ-BLAST

**N.S. Bogatyreva, D.N. Ivankov, A.V. Finkelstein**

*Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino*

BLAST is perhaps the best known program in bioinformatics and is a widely used tool for finding the most similar sequences. The iterative program Ψ-BLAST has greater sensitivity and is used to find distant homologues of a query sequence by iteratively using BLAST search. However, the number of iterations that Ψ-BLAST should use is rather poorly substantiated in the literature. Our study shows that as the number of iterations increases, Ψ-BLAST quickly loses the ability to guide the query sequence when searching for homologues. When searching the non-redundant protein sequence database (nr) of 2021, Ψ-BLAST already after the second iteration preserves the query sequence itself among the top found homologues only in 18% of cases, that is, already at the second iteration, the search sequence itself leaves the top of the search in 82% of cases. Moreover, the query sequence is still among the homologues found by Ψ-BLAST after the recommended 10 iterations [Altschul et al., 1997, Nucl. Acids Res., 25:3389–3402] only in 42% of cases, i.e. in 58% of cases the target sequence is not found at all after the recommended 10 iterations of Ψ-BLAST running. Using the much smaller nr 2011 database for comparison, we show that the observed effects increase with time due to database growth. Our findings highlight the need for caution in interpreting Ψ-BLAST results: the degree of vigilance should increase with the size of the database. Careful monitoring of the position of the query sequence among the resulting homologues is necessary. We recommend using the disappearance of the query sequence from the homologue list generated by Ψ-BLAST as a criterion for terminating the iterations.

## ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНЫХ МОДЕЛЕЙ В ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

К.С. Горбунов, В.Ю. Куканов, С.Ю. Селезов, Д.С. Энгин

НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва

В XX веке математическое моделирование эпидемий стало неотъемлемой частью эпидемиологической практики. Оно помогло обосновать концепцию эпидемиологической триады и ввести понятие порога. Также моделирование утвердительно обосновало эффективность фармакологических и нефармакологических методов сдерживания распространения инфекции. Однако в XXI веке модели стали более сложными, при этом не было получено принципиально новых знаний, а точность прогнозирования не увеличилась. Кризис в "классической" эпидемиологии, как науки отражается и на моделировании. Предполагается, что моделирование распространения эпидемий может стать простым и в то же время эффективным инструментом для прогнозирования тенденций заболеваемости, распространенности, смертности и развития эпидемий. Оно позволит лицам, принимающим решения, быстро получать необходимые ответы и принимать правильные управленческие решения при разработке политики в области здравоохранения, профилактики и контроля заболеваний [1]. Поэтому, важной задачей является критическое изучение опыта моделирования проблем здравоохранения в связи с инфекционной безопасностью и их вклад в принятие управленческих решений, а также оценку их реальной эффективности. Важно отметить, что в России в 1889 году врач-эпидемиолог П.Д. Енько одним из первых в мире, разработал и опубликовал модель распространения инфекционного заболевания в дискретном времени, уравнения которого описывают среднее значение численностей групп, получаемых в модели Рида—Фроста [2, 3]. Наш доклад посвящён анализу существующих эпидемиологических моделей с точки зрения практического эпидемиолога.

1. Garner MG, Hamilton SA. Principles of epidemiological modelling. *Revue scientifique et technique. International Office of Epizootics* 2011, 30(2): 407–416. <https://doi.org/10.20506/rst.30.2.2045/>
2. Енько П.Д. О ходе эпидемий некоторых заразных болезней. *Врач* 1889, 46—48
3. Леоненко В.Н. *Математическая эпидемиология: учебно-методическое пособие по выполнению лабораторных работ.* (СПб: Университет ИТМО) 2018, 38 с.

## ON THE USE OF COMPUTATIONAL EPIDEMIOLOGIC MODELS IN DECISION MAKING

K. Gorbunov, V. Kukanov, S. Selezov, D. Engin

Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow

In the 20<sup>th</sup> century, mathematical modeling of epidemics became an integral part of epidemiological practice. It helped to justify the concept of the epidemiologic triad and to introduce the concept of threshold. Modeling has also validated the effectiveness of pharmacological and non-pharmacological methods of containing the spread of infection. However, in the 21<sup>st</sup> century, models have become more sophisticated, with no fundamentally new insights gained and no increase in prediction accuracy. The crisis in "classical" epidemiology as a science is also reflected in modeling. It is suggested that epidemic modeling can be a simple yet effective tool for predicting trends in morbidity, prevalence, mortality and epidemic development. It will allow decision makers to quickly obtain the necessary answers and make the right management decisions in the development of health policy, disease prevention and control [1]. Therefore, an important task is to critically examine the experience of modeling of public health problems in connection with infection safety and their contribution to management decision-making, as well as to assess their real effectiveness. It is important to note that in Russia in 1889, a doctor-epidemiologist P.D. Yencko was one of the first in the world, developed and published a model of the spread of infectious disease in discrete time, the equations of which describe the average values of the numbers of groups obtained in the Reed-Frost model [2,3]. Our presentation is devoted to the analysis of existing epidemiological models from the point of view of a practical epidemiologist.

1. Garner MG, Hamilton SA. Principles of epidemiological modelling. *Revue scientifique et technique. International Office of Epizootics* 2011, 30(2): 407–416. <https://doi.org/10.20506/rst.30.2.2045/>
2. Yencko PD. On the course of epidemics of certain contagious diseases. *Vrach* 1889, 46—48
3. Leonenko V.N. *Mathematical Epidemiology: Textbook for Laboratory Work.* (SPb.: ITMO University) 2018, pp. 38.



## ЦИФРОВАЯ ПЛАТФОРМА МОДЕЛИРОВАНИЯ ОНТОГЕНЕЗА

**А.В. Шапкин**

*НТЦ Азимут, Москва*

Реализацию возможности эмуляции в виртуальной цифровой инфраструктуре всех этапов развития организма из одной клетки (онтогенеза) можно сравнить только с покорением человеком космоса, мир уже не будет прежним. «Выращивание» организма в цифре по информации, хранящейся в ДНК, даст возможность изучения и визуализации организма на любом этапе развития и, соответственно, позволит получать следующие характеристики: индивидуальные анатомические признаки (формы лица, головы, фигуры, конечностей), имеющиеся нарушения в физическом развитии и иные признаки, изначально закодированные в ДНК человека, животного или растения, а также прогнозирование, возникновения и развития заболеваний (сердечно-сосудистых, эндокринных, аутоиммунных, костно-мышечных, онкологических и т.д.). В процессе роста организма можно управлять любыми внешними факторами (антропогенными, абиотическими) и анализировать их влияние на развитие организма. Создав цифровую модель организма, мы не только реализуем записанную в ДНК программу развития по формированию его тканей и органов, но и сформируем реальную (работающую) цифровую модель нервной системы человека. В период активного развития технологий искусственного интеллекта, новый уровень его развития можно реализовать путем создания новой архитектуры нейронной сети - работающей по принципам заложенным в центральной нервной системе организма, которую можно вырастить по информации из ДНК.

Указанные задачи, безусловно, инновационные, но современная наука неоднократно подвергалась критике со стороны консервативно настроенной общественности, сейчас же все ищут ту нишу, в которой можно изменить мир. Кто будет первым – тот и будет лидером в мире. В рамках проекта NILLEY (<https://nilley.ru/>) ведется работа по практической реализации описанной идеи.

## A DIGITAL PLATFORM FOR MODELING ONTOGENESIS

**A. Shapkin**

*NTC Azimut, Moscow, Russia*

The realization of the possibility of emulation in the virtual digital infrastructure of all stages of the development of an organism from a single cell (ontogenesis) can only be compared with the conquest of space by man, the world will no longer be the same. "Growing" an organism in numbers based on information stored in DNA will make it possible to study and visualize the organism at any stage of development and, accordingly, will allow you to obtain the following characteristics: individual anatomical features (shapes of the face, head, figure, limbs), available disorders in physical development and other signs originally encoded in The DNA of a human, animal or plant, as well as the prediction of the occurrence and development of diseases (cardiovascular, endocrine, autoimmune, musculoskeletal, oncological, etc.). During the growth of the body, you can control any external factors (anthropogenic, abiotic) and analyze their impact on the development of the body. By creating a digital model of an organism, we not only implement a development program recorded in DNA for the formation of its tissues and organs, but also and we will form a real (working) digital model of the human nervous system. During the period of active development of artificial intelligence technologies, a new level of its development can be realized by creating a new neural network architecture - working according to the principles laid down in the central nervous system of the body, which can be grown using information from DNA.

These tasks are certainly innovative, but modern science has been repeatedly criticized by the conservative-minded public, now everyone is looking for a niche in which to change the world. Who if he is the first, he will be the leader in the world. As part of the NILLEY project (<https://nilley.ru/>) work is underway on the practical implementation of the described idea.

## **ИНТЕГРИРОВАННАЯ ЭКСПЕРТНАЯ СИСТЕМА В ЗАДАЧАХ АНАЛИЗА, ИНТЕРПРЕТАЦИИ И ПРИНЯТИЯ РЕШЕНИЙ НА БАЗЕ ОМИКСНЫХ ДАННЫХ ЧЕЛОВЕКА**

**А.Г. Шлихт, Н.В. Краморенко**

*Дальневосточный федеральный университет, Владивосток*

Целью исследования является создание интегрированной экспертной системы (ИЭС), позволяющей моделировать многообразие трансформаций омиксных процессов, а также осуществлять анализ, биохимическую и физиологическую интерпретацию и поддержку принятия решений. ИЭС реализована на основе глубоких классических продукционных экспертных систем, что позволяет дать полное объяснение предлагаемых решений. Учет геномного и эпигеномного статуса индивида является важной особенностью современной теории и практики наук о жизни. Часто факторы среды обитания, например, сбалансированное питание, воздействуя на эпигеном способно нейтрализовать последствия геномных патологий, путем создания соответствующих рационов. Здесь работают нутригенетика, нутригеномика, фудомика, диетология и физиология питания в рамках модели: Генотип – Среда обитания – Фенотип. Основными сущностями ИЭС являются ДНК, РНК, хромосомы, гены, транскрипты, белки, ферменты, метаболиты, реакции, метаболические и сигнальные пути, органеллы, органы, мутации генов, мотивы, заболевания, факторы среды обитания, рационы. Эти сущности связаны многочисленными отношениями, что позволяет формировать базы геном-центрированных знаний. Все это многообразие сущностей и отношений увязано в рамках единого информационного пространства, что обеспечивает сквозное прохождение информации и построение сложных логических цепочек, отражающих биохимические и физиологические процессы в живом организме, начиная от мутации в гене и заканчивая заболеванием. Интегрированная ЭС декомпозирована на различные подсистемы: планирования, мониторинга, интерпретации, поддержки принятия решений в рамках структурированной системно-кибернетической модели, что позволяет эффективно пополнять и актуализировать входящие базы данных и базы знаний. Отличительной особенностью разработанной ИЭС является создание автономного хранилища высокоструктурированных омиксных данных, что исключает потребность в постоянном интерактивном контакте с хранилищами данных на мировых порталах (NCBI, UniProt, KEGG, GO и др.), обеспечивая локальную обработку омиксных данных и более высокое быстродействие при анализе и интерпретации данных конкретного генотипа и фенотипа. При этом ИЭС в полной мере обеспечивает выход на мировые порталы омиксных данных для работы и актуализации данных.

## **AN INTEGRATED EXPERT SYSTEM IN THE TASKS OF ANALYSIS, INTERPRETATION AND DECISION-MAKING BASED ON HUMAN OMICS DATA**

**A.G. Shlikht, N.V. Kramorenko**

*Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia*

The aim of the study is to create an integrated expert system (IES) that allows modeling of various types of transformations of complex processes, as well as analysis, biochemical and physiological interpretation and decision support. The IES is implemented on the basis of deep classical production expert systems, which allows you to give a complete explanation of the proposed solutions. Consideration of the genomic and epigenomic status of an individual is an important feature of the modern theory and practice of life sciences. Often, environmental factors, such as a balanced diet, acting on the epigenome can neutralize the effects of genomic pathologies by creating appropriate diets. Nutrigenetics, nutrigenomics, foodomics, dietetics and nutrition physiology work here within the framework of the model: Genotype – Habitat – Phenotype. The main entities of the IES are DNA, RNA, chromosomes, genes, transcripts, proteins, enzymes, metabolites, reactions, metabolic and signaling pathways, organelles, organs, gene mutations, motives, diseases, environmental factors, diets. These entities are connected by numerous relationships, which makes it possible to form bases of genome-centered knowledge. All this diversity of entities and relationships is linked within a single information space, which ensures the end-to-end passage of information and the construction of complex logical chains reflecting biochemical and physiological processes in a living organism, starting from a mutation in a gene and ending with a disease. The integrated ES is decomposed into various subsystems: planning, monitoring, interpretation, decision support within the framework of a structured system-cybernetic model, which makes it possible to effectively replenish and update databases and knowledgebases. A distinctive feature of the developed IES is the creation of an autonomous repository of highly structured omics data, which eliminates the need for constant interactive contact with data warehouses on world portals (NCBI, UniProt, KEGG, GO, etc.), providing local processing of omics data and higher performance in the analysis and interpretation of data of a specific genotype and phenotype. At the same time, the IES fully provides access to the global omics data portals for operation and update.

## ИЗВЛЕЧЕНИЕ ВСЕСТОРОННИХ СВЕДЕНИЙ О СПЕКТРЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРОТИВОВИРУСНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИЗ БОЛЬШИХ МАССИВОВ ТЕКСТОВ НАУЧНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ

Н.Ю. Бизиукова, О.А. Тарасова

ИИХ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

Углубленные представления о механизмах действия противовирусных соединений являются предпосылкой для рационального конструирования лекарств. Алгоритмы интеллектуального анализа текстов позволяют обрабатывать большие объемы текстов и автоматически структурировать сведения о биологической активности химических соединений (ХС). Цель работы – разработка интегрального подхода к извлечению всесторонних сведений о биологической активности ХС, в том числе количественных характеристик, и апробация метода на примере извлечения сведений о веществах, обладающих потенциальной противовирусной активностью вследствие воздействия на мишени организма-хозяина. Отбор релевантных публикаций проводился из баз данных (БД) PubMed и PubMed Central с применением MeSH-термина «Antiviral Agents». Распознавание наименований объектов (заболеваний, химических соединений, видов, генов/белков) проводилось с применением моделей на основе глубокого обучения [1]. Для поиска ассоциаций между наименованиями объектов мы использовали разработанный нами подход, основанный на применении фраз-шаблонов [2]. С целью установления природы объектов, наименования которых были извлечены из текстов, и фильтрации релевантных ассоциаций в дальнейшем, мы использовали процедуру автоматических запросов к фактографическим БД [2]. Извлечение количественных характеристик активности (IC50, Kd и др.) проводилось с применением регулярных выражений. Применение критериев для отбора релевантных записей позволило загрузить более 150 тысяч резюме публикаций и более 10 тысяч полных текстов. Используя разработанный подход, мы смогли извлечь более трех миллионов уникальных ассоциаций. Исследованы возможности применения критериев категоризации извлеченных ассоциаций с точки зрения их уникальности (менее изученные, широко известные). В докладе будет обсуждена роль методов интеллектуального анализа текстов в задачах структуризации разрозненных сведений о количественных характеристиках активности химических соединений.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 124050800018-9).

1. Weber L et al. *Bioinformatics* 2021, 37(17): 2792–2794.
2. Biziukova NYu et al. *Big Data Min. Anal.* 2024, 7(1): 107–130.

## EXTRACTING COMPREHENSIVE INFORMATION ON THE SPECTRUM OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF ANTIVIRAL COMPOUNDS FROM LARGE COLLECTIONS OF TEXTS OF SCIENTIFIC PUBLICATIONS

N.Yu. Biziukova, O.A. Tarasova

Institute of Biomedical Chemistry, Moscow

In-depth understanding of the mechanisms of action of antiviral compounds is a prerequisite for rational drug design. Text mining algorithms allow to process large volumes of texts and automatically structure information about the biological activity of chemical compounds (CCs). The aim of the work is to develop an integral approach to extract comprehensive information about the biological activity of chemical compounds, including quantitative characteristics, and to test the method on the example of extracting information about substances with potential antiviral activity due to the effect on the targets of the host organism. Relevant publications were selected from PubMed and PubMed Central databases using the MeSH term “Antiviral Agents”. Recognition of entity names (diseases, chemical compounds, species, genes/proteins) was performed using deep learning based models [1]. To find associations between object names, we used our developed approach based on the application of pattern phrases [2]. In order to establish the nature of the objects whose names were extracted from the texts and to filter relevant associations further, we used the procedure of automatic queries to factorial databases [2]. The extraction of quantitative activity characteristics (IC50, Kd, etc.) was performed using regular expressions. The application of criteria for selecting relevant records allowed us to download more than 150 thousand abstracts of publications and more than 10 thousand full texts. Using the developed approach, we were able to extract more than three million unique associations. The possibilities of applying criteria for categorizing the extracted associations in terms of their uniqueness (less studied, widely known) are investigated. The paper will discuss the role of text mining methods in the task of structuring disparate information about quantitative characteristics of chemical compounds activity.

This work was performed within the framework of the Program of Fundamental Scientific Research in the Russian Federation for the Long-Term Period (2021-2030) (No. 124050800018-9).

1. Weber L et al. *Bioinformatics* 2021, 37(17): 2792–2794.
2. Biziukova NYu et al. *Big Data Min. Anal.* 2024, 7(1): 107–130.

## МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ПРОЦЕССЫ КЛЕТОЧНОГО СТАРЕНИЯ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА

Д.А. Войтенко, Е.В. Ивановская, А.Н. Свешникова

МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

В регенеративной и эстетической медицине для замедления процессов старения (сенесенса) используются искусственным образом введенные полимеры – продукты гиалуроновой кислоты (ГК). Так как ГК сама по себе является важнейшим компонентом межклеточного матрикса, она не вызывает аллергических реакций и воспалительных процессов при ее введении в организм человека. При введении препарата на основе ГК процесс ее биodeградации проходит путем гидролиза с помощью гиалуронидаз, в дальнейшем наиболее мелкие фрагменты проникают внутрь клетки путем эндоцитоза, связываясь с рецептором CD44. При взаимодействии CD44 с ГК индуцируется экспрессия циклина D, что в свою очередь влияет на прохождение клеточного цикла и переход клеток в сенесенс. Однако механизм старения фибробластов при введении ГК остается не до конца раскрытым.

Целью данной работы является экспериментальное и теоретическое исследование влияния ГК на процесс старения клеточной культуры дермальных фибробластов человека (ДФЧ). Теоретическая часть исследования состояла в создании математической модели, описывающей деградацию ГК гиалуронидазами, захват мономеров через CD44-зависимый эндоцитоз, и изменение экспрессии циклина D. Валидация модели проводилась на данных МТТ-теста ДФЧ при культивации в среде с ГК и ее продуктами, а также на данных по содержанию коллагена, определенному путем вертикального ПААГ-электрофореза. Старение ДФЧ определялось по доле фиброцитов в популяции при окраске гематоксилином-эозином.

В результате исследования была получена численная зависимость экспрессии циклина D от введения препарата гиалуроновой кислоты, проведен теоретический анализ полученных данных, который дал возможность оценить вероятность переходяния культуры ДФЧ в стареющий фенотип при различных концентрациях препарата, оценена скорость пролиферации культуры ДФЧ. Таким образом, было получено, что ДФЧ склонны к более быстрому переходу в SASP, при более высоких концентрациях полимера, так как это непосредственным образом увеличивает экспрессию циклина, способствующего аресту клеточного цикла.

*Работа поддержана грантом РНФ 23-45-10039.*

## MATHEMATICAL MODELING OF THE EFFECT OF HYALURONIC ACID-BASED DRUGS ON THE PROCESSES OF CELLULAR AGING OF HUMAN DERMAL FIBROBLASTS

D.A. Voitenko, E.V. Ivanovskaya, A.N. Sveshnikova

Lomonosov Moscow State University, Moscow

In regenerative and aesthetic medicine, artificially introduced polymers, products of hyaluronic acid (HA), are used to slow down the aging process (senescence). Since HA itself is an essential component of the intercellular matrix, it does not cause allergic reactions and inflammatory processes when it is introduced into the human body. When a HA-based drug is administered, its biodegradation process takes place by hydrolysis with the help of hyaluronidases, subsequently the smallest fragments penetrate into the cell by endocytosis, binding to the CD44 receptor. When CD44 interacts with HA, cyclin D expression is induced, which in turn affects the passage of the cell cycle and the transition of cells to senescence. However, the mechanism of fibroblast aging with the introduction of HA remains not fully disclosed. The purpose of this work is an experimental and theoretical study of the effect of HA on the aging process of human dermal fibroblast cell culture (DFC). The theoretical part of the study consisted in creating a mathematical model describing the degradation of HA by hyaluronidases, the capture of monomers through CD44-dependent endocytes, and a change in cyclin D expression. The validation of the model was carried out on the data of the MTT-test of DFC during cultivation in an environment with HA and its products, as well as on data on the collagen content determined by vertical PAAG electrophoresis. The aging of DPH was determined by the proportion of fibrocytes in the population when stained with hematoxylin-eosin.

As a result of the study, a numerical dependence of cyclin D expression on the administration of the hyaluronic acid preparation was obtained, a theoretical analysis of the data obtained was carried out, which made it possible to assess the probability of the transition of the DFCH culture into an aging phenotype at different concentrations of the drug, and the rate of proliferation of the DFCH culture was estimated. Thus, it was found that DPFs are prone to a faster transition to SASP, at higher concentrations of the polymer, since this directly increases the expression of cyclin, which promotes cell cycle arrest.

*The work was supported by the RNF grant 23-45-10039.*

## РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ НА ОСНОВЕ ИСКУССТВЕННОГО ИНТЕЛЛЕКТА ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ И МИНИМИЗАЦИИ РИСКА ПОБОЧНЫХ ЭФФЕКТОВ ПРИ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Т.А. Куропаткина<sup>1</sup>, Т.В. Сивакова<sup>2</sup>, Н.Л. Шимановский<sup>1</sup>, Ю.Н. Орлов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова; <sup>2</sup>Институт прикладной математики им. М.В. Келдыша РАН, Москва

Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) представляет собой серьезную проблему в современной системе здравоохранения. Зачастую ХСН возникает в результате других сопутствующих заболеваний и требует полифармакотерапии. В связи с этим важно разработать модель, которая учитывает лекарственные взаимодействия и потенциальные побочные эффекты всего комплекса лекарственных препаратов.

Для оценки взаимодействия был отобран список из 54 препаратов, часто используемых в сложной терапии ХСН согласно клиническим рекомендациям. Информация о побочных эффектах (ПЭ) была собрана из регистра лекарственных средств. ПЭ были ранжированы по экспертным оценкам: тяжелые (0,5 до 0,9), умеренные (0,20 до 0,49) и легкие (0,10 до 0,19). Каждый препарат был представлен n-мерным вектором побочных эффектов, где n — количество участков действия. Элементы матрицы варьировались от 0,1 до 0,9 и служили «нулевым приближением» к потенциальным комбинациям препаратов.

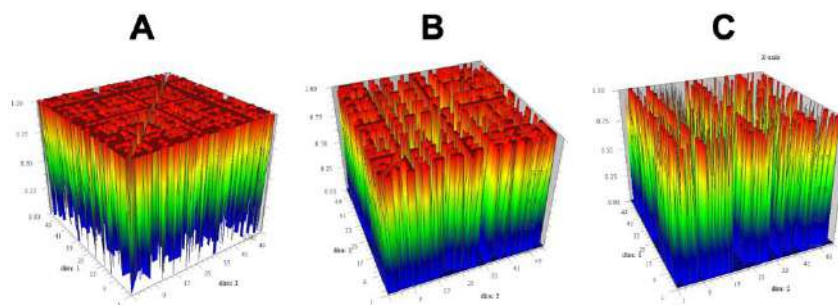
Таким образом, если нас интересуют эффекты использования двух препаратов с номерами  $i_1, i_2$ , где  $i_1 \neq i_2$ , то для получения соответствующей оценочной ранжировки мы суммируем ранги  $R_{i_1}(k)$  и  $R_{i_2}(k)$  каждого препарата, соответствующие выбранному эффекту. Результат такого кумулятивного воздействия обозначается как  $r_{i_1 i_2}(k) = R_{i_1}(k) + R_{i_2}(k)$ .

Итак, из ранговой матрицы  $R_i(k)$  мы выбрали все возможные комбинации пар строк  $i_1, i_2$ , где в данном столбце  $k$  суммарное значение  $r_{i_1 i_2}(k)$  не превышало 1. Те пары лекарств, для которых хотя бы по одному эффекту значение  $r_{i_1 i_2}(k)$  было больше или равно 1, были исключены из дальнейшего рассмотрения. При учете совместного применения препаратов значение анализировалось следующим образом:

$$r_{i_1 i_2 \dots i_n}(k) = \sum_{j=1}^n R_{i_j}(k)$$

Для комбинации трех препаратов необходимо, чтобы они были совместимы попарно, что сокращает количество возможных комбинаций, исключая заведомо несовместимые. В верхней части куба на Рис. А показаны возможные комбинации, где числа обозначают каждый препарат. Линии в нижней части куба указывают на недопустимые комбинации.

В качестве примера был выбран Амiodарон. Была рассчитана сумма трех рангов: для самого амиодарона и для двух других препаратов из оставшихся 53 вариантов. Результат показан на Рис. В. Мы выбрали пару амиодарон+апикасан из приемлемых пар и исследовали другие комбинации. Если общий ранг был меньше 1, комбинация считалась приемлемой (Рис. С).



Использование математических алгоритмов и машинного обучения может улучшить подходы к индивидуализированному лечению. Расширение списка препаратов может способствовать дальнейшему развитию модели за счет введения большего количества возможных комбинаций.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 23-75-30012. URL: <https://rscf.ru/project/23-75-30012>.

## DEVELOPMENT OF AN ARTIFICIAL INTELLIGENCE-BASED MODEL FOR PREDICTING AND MINIMISING THE RISK OF SIDE EFFECTS WITH COMBINATION THERAPY FOR CHRONIC HEART FAILURE

T. Kuropatkina<sup>1</sup>, T. Sivakova<sup>2</sup>, N. Shimanovskii<sup>1</sup>, Yu. Orlov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Plekhanov Russian University of Economics; <sup>2</sup>Keldysh Institute of Applied Mathematics of Russian Academy of Sciences

Chronic heart failure (CHF) is a major challenge in modern healthcare. It often results from other underlying diseases and requires polytherapy. It is therefore essential to develop a model that takes into account drug interactions and potential side effects of whole drug combinations.

A list of 54 drugs commonly used in complex CHF therapy according to clinical guidelines was selected for interaction assessment. Information on adverse effects (AE) was collected from the drug registry. AE were ranked according to expert judgement: severe (0.5 to 0.9), moderate (0.20 to 0.49) and mild (0.10 to 0.19). Each drug was represented by an n-dimensional vector of adverse effects, where n is the number of sites of action. The matrix elements ranged from 0.1 to 0.9 and served as a "zero approximation" to the potential drug combinations.

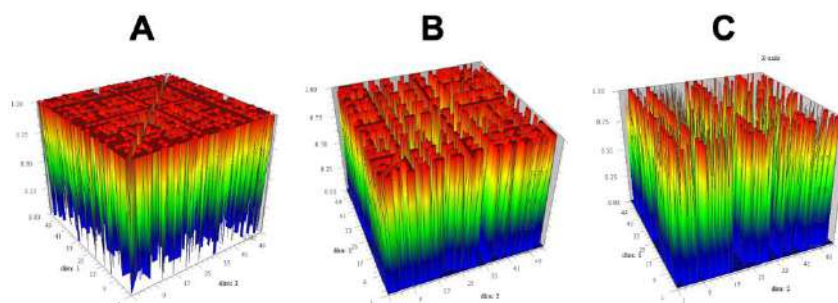
Thus, if we are interested in the effects of using two drugs with numbers  $i_1, i_2$ , where  $i_1 \neq i_2$ , then to obtain the corresponding rank assessment, we sum the ranks  $R_{i_1}(k)$  and  $R_{i_2}(k)$  of each drug corresponding to the chosen effect. The result of such a cumulative impact is denoted as  $r_{i_1 i_2}(k) = R_{i_1}(k) + R_{i_2}(k)$ .

Thus, from the rank matrix  $R_i(k)$  we selected all possible combinations of pairs of rows  $i_1, i_2$ , where in a given column  $k$  the total value  $r_{i_1 i_2}(k) \geq 1$ . Those drug pairs for which at least one effect had  $r_{i_1 i_2}(k) \geq 1$  was excluded from further consideration. When taking into account the co-administration of drugs, we analyzed the value in the following way:

$$r_{i_1 i_2 \dots i_n}(k) = \sum_{j=1}^n R_{i_j}(k)$$

To combine three drugs, they had to be compatible in pairs, which reduced the number of possible combinations by eliminating obviously incompatible ones. The top of the cube in Fig. A shows the possible combinations, with numbers representing each drug. Lines in the lower part of the cube indicate unacceptable combinations.

Amiodarone was chosen as an example. The sum of three ranks was calculated: for amiodarone itself and for two other drugs from the remaining 53 options. The result is shown in Fig.B. We selected the pair amiodarone+apixaban from the acceptable pairs and explored other combinations. If the overall rank was less than 1, the combination was considered acceptable (Fig.C).



The use of mathematical algorithms and machine learning can improve individualized treatment approaches. Expanding the list of drugs could further develop the model by introducing more possible combinations.

*The research was funded by the RSF № 23-75-30012. URL: <https://rscf.ru/project/23-75-30012/>*

## ВЛИЯНИЕ НЕПОЛНОТЫ СБОРКИ ГЕНОМА НА ТОЧНОСТЬ ВЫЯВЛЕНИЯ СИСТЕМ ЗАЩИТЫ ОТ ФАГОВ У *VIBRIO CHOLERAЕ*

Д.А. Петухова<sup>1</sup>, А.И. Козырева<sup>1,2</sup>, И.К. Чудинов<sup>1,3</sup>, А.С. Сперанская<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва; <sup>2</sup>Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург; <sup>3</sup>Физтех-школа биологической и медицинской физики, Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный

Несмотря на достижения компаний Pacific Biosciences и Oxford Nanopore Technologies в секвенировании длинных ридов, процент полных геномов в базе данных NCBI RefSeq остаётся низким по сравнению с большим количеством неполных сборок, полученных методом секвенирования следующего поколения (NGS), преимущественно из коротких ридов [1]. Геном *Vibrio cholerae*, размером ~4,1 Мб, состоит из двух хромосом. Этот патоген приобрел разнообразные механизмы защиты от фагов, и последние исследования выявили множество систем защиты, различающихся по составу белков и механизмам действия [2]. Полные последовательности геномов являются основой для точной аннотации и мониторинга этих систем.

В данной работе мы исследовали геномы *V. cholerae* с разной степенью полноты сборки, чтобы выяснить, при каких условиях количество выявленных систем защиты остаётся неизменным. Для этого были использованы полные последовательности 112 геномов *V. cholerae*, доступные в NCBI RefSeq на август 2024 г. На первом этапе мы оценили полноту геномов с помощью BUSCO [3] и идентифицировали системы защиты с помощью PADLOC [4]. На втором этапе нами были созданы неполные сборки геномов, где псевдослучайно исключали от 2% до 30% исходной последовательности с помощью Python. На третьем этапе симулировали сырые риды с помощью InSilicoSeq [5], моделируя шотган-секвенирование Illumina MiSeq PE 150, после чего геномы были повторно собраны с помощью SPAdes. Статистический анализ был проведён с использованием критериев Шапиро–Уилка и Уилкоксона при уровне значимости  $p\text{-value} = 0,05$ .

Мы исследовали геномы *V. cholerae* с различной полнотой сборки и установили, что даже при отсутствии всего 2% фрагментов (представленность полных генов-маркеров BUSCO (C): 94,67%) наблюдаются значимые отличия в выявлении компонентов систем защиты ( $p\text{-value} = 2,46e^{-5}$ ). Анализ после пересборки геномов с покрытием 75x также показал небольшое значимое отличие ( $p\text{-value} = 0,035$ ). Наши результаты показывают, что для сохранения достоверной информации о системах защиты от фагов в геноме *V. cholerae* необходимо стремиться к сборке с параметрами по BUSCO не ниже (C): 99,5%. Эти результаты могут быть полезны для оптимизации стратегий секвенирования и анализа геномов.

1. Wick RR et al. Completing bacterial genome assemblies with multiplex MinION sequencing. *Micro Genomics* 2017, 3(10): e000132.
2. Georjon H, Bernheim A. The highly diverse antiphage defense systems of bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2023, 21(10): 686-700.
3. Simão FA et al. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics* 2015, 31(19): 3210-3212.
4. Payne LJ et al. Identification and classification of antiviral defense systems in bacteria and archaea with PADLOC reveals new system types. *Nucleic Acids Res.* 2021 49(19):10868-10878.
5. Gourelé H et al. Simulating Illumina metagenomic data with InSilicoSeq. *Bioinformatics* 2019, 35(3): 521-522.

## THE IMPACT OF GENOME ASSEMBLY COMPLETENESS ON THE ACCURACY OF PHAGE DEFENSE SYSTEM DETECTION IN *VIBRIO CHOLERAЕ*

Д.А. Petukhova<sup>1</sup>, А.И. Kozyreva<sup>1,2</sup>, I.K. Chudinov<sup>1,3</sup>, А.С. Speranskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow; <sup>2</sup>National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics (ITMO University), St Petersburg; <sup>3</sup>Phystech School of Biological and Medical Physics, Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Moscow

Despite advances in long-read sequencing technologies, the percentage of complete genomes in the NCBI RefSeq database remains low compared to the significant number of incomplete assemblies, which are predominantly obtained from short reads using next-generation sequencing methods [1]. The genome of *Vibrio cholerae* ~4.1 Mb in size and consists of two chromosomes. This pathogen has acquired various mechanisms of anti-phage defense, and recent studies have revealed numerous defense systems that differ in protein composition and mechanisms of action [2]. Complete genomic sequences form the basis for accurate annotation and monitoring of defense systems.

In this study, we examined how the number of identified defense system components varies depending on different levels of *V. cholerae* genome assembly completeness. Also, we aimed to determine the threshold of genome fraction at which the number of identified anti-phage system components remains unaffected. For this, we used the complete sequences of 112 *V. cholerae* genomes available in the NCBI RefSeq database in August 2024. In the first stage, genome completeness was assessed using BUSCO [3], and defense systems were identified using PADLOC [4]. In the second stage, incomplete genome assemblies were generated by randomly excluding 2-30% of the original sequence using Python. In the third stage, raw reads were simulated using InSilicoSeq [5], modeling shotgun sequencing with Illumina MiSeq PE 150, then the genomes were reassembled using SPAdes. Statistical analysis was performed using Shapiro-Wilk and Wilcoxon tests with a significance level of  $p\text{-value} = 0.05$ .

We investigated *V. cholerae* genomes with varying assembly completeness and found that even with the absence of just 2% of fragments (complete BUSCOs marker genes (C) 94.67%), significant differences were observed in the detection of defense system components ( $p\text{-value}=2.46e^{-5}$ ). After genome reassembly with 75x coverage analysis also showed significant difference ( $p\text{-value}=0.035$ ). Our results indicate that to maintain reliable information on anti-phage defense systems in *V. cholerae*, it is necessary to aim for genome assemblies with BUSCO parameters no lower than C: 99.5%. These results may be useful for optimizing sequencing and genome analysis strategies.

1. Wick RR et al. Completing bacterial genome assemblies with multiplex MinION sequencing. *Micro Genomics* 2017, 3(10): e000132.

2. Georjon H, Bernheim A. The highly diverse antiphage defense systems of bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2023, 21(10): 686-700.
3. Simão FA et al. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics* 2015, 31(19): 3210-3212.
4. Payne LJ et al. Identification and classification of antiviral defense systems in bacteria and archaea with PADLOC reveals new system types. *Nucleic Acids Res.* 2021 49(19):10868-10878.
5. Gourlé H et al. Simulating Illumina metagenomic data with InSilicoSeq. *Bioinformatics* 2019, 35(3): 521-522.



#### МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ ТРАНСЛЯЦИИ И ДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРОВ

Е.В. Полесскова<sup>1,2</sup>, О.В. Шуленина<sup>1</sup>, Е.Б. Пичкур<sup>1,3</sup>, Е.А. Толстыко<sup>1</sup>, П.С. Касацкий<sup>1</sup>, А.Л. Конева<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, <sup>2</sup>Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, <sup>3</sup>НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Детальное выяснение молекулярных механизмов ингибирования антибиотиками дает возможность модифицировать существующие терапевтические препараты для повышения их эффективности и преодоления бактериальной резистентности. Исследование бактериальных ингибиторов биосинтеза белка класса стрептограмминов с применением функциональных биохимических тестов и криоэлектронной микроскопии демонстрирует вызываемые ими комплексные изменения в сложном многокомпонентном аппарате трансляции.

Мадумицин II связывается в пептидилтрансферазном центре, перекрывая сайт связывания акцепторного конца Р-сайтовой тРНК, отворачивая его от нормального положения. Было бы логично классифицировать Madu как стерический ингибитор реакции пептидилтрансферазной реакции, но он работает посредством более сложного механизма. Мы обнаружили, что Madu также оказывает влияние на А-сайтовую тРНК, нарушая ее контакты с рибосомной РНК, дестабилизируя aa-тРНК и вызывая диссоциацию во время этапа коррекции декодирования.

#### MOLECULAR MECHANISM OF PROCARYOTIC TRANSLATION AND INHIBITION

A. Paleskava<sup>1,2</sup>, O.V. Shulenina<sup>1</sup>, E.B. Pichkur<sup>1,3</sup>, E.A. Tolstyko<sup>1</sup>, P.S. Kasatsky<sup>1</sup>, A.L. Konevega<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>NRC "Kurchatov Institute" – PNPI, Gatchina; <sup>2</sup>Peter the Great St Petersburg Polytechnic University, St Petersburg; <sup>3</sup>National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow

A detailed study of molecular mechanisms of inhibition by antibiotics provides opportunity to modify existing therapeutic drugs to increase their efficacy and to overcome bacterial resistance. Our study of the bacterial ribosome inhibitors streptogramins utilizing functional biochemical tests and cryo-electron microscopy demonstrates a complex of changes in a large multicomponent protein biosynthesis machinery.

Madumycin II (Madu) binds to the peptidyl transferase center, clashes with the acceptor end of P-site tRNA causing its flipped-out conformation. It would be logical to classify Madu as a steric inhibitor of peptidyl transferase reaction, but it works via more sophisticated mechanism. We found that Madu allosterically targets A-site tRNA, thus disrupting its contacts with the rRNA, destabilizing the entire aa-tRNA body and forcing dissociation during the proofreading step.

## ОМОЛАЖИВАЮЩИЕ ЭФФЕКТЫ КЛЕТОЧНОГО РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ, ВЫЯВЛЯЕМЫЕ С ПОМОЩЬЮ ТРАНСКРИПТОМНЫХ ЧАСОВ

**S.E. Дмитриев**

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

Старение и дифференцировка являются двумя процессами, протекающими в клетках живых организмов в ходе онтогенеза. На ранних стадиях эмбрионального развития клеточное старение естественным образом обращается вспять, что позволяет новому организму, произведённому благодаря слиянию половых клеток взрослых особей, родиться молодым. При этом одновременно происходят процессы массивированной клеточной дифференцировки. При искусственном клеточном репрограммировании, индуцируемом генетическими или химическими воздействиями, дифференцированные клетки взрослого организма претерпевают потерю тканевой идентичности и обретают плюрипотентность, становясь похожими на клетки раннего эмбриона. Важной составляющей этого процесса является «обнуление» биологического возраста клеток, которое сопровождает их дедифференцировку. В связи с этим частичное репрограммирование соматических клеток, не приводящее к плюрипотентности, рассматривается как одна из возможных стратегий омоложения тканей взрослого организма. Однако потеря клетками тканевой идентичности несёт риски неоплазии, а возможность «размежевания» процессов клеточного омоложения и дедифференцировки неочевидна. В данной работе мы идентифицировали транскриптомные сигнатуры репрограммирования клеток человека и мыши и выявили сходную регуляцию генов, связанных с репрограммированием, и генов, ассоциированных с эффектом воздействия, увеличивающих продолжительность жизни. Часть таких генов оказалась связана, в частности, с репарацией ДНК и воспалением. С помощью мультитканевых транскриптомных часов старения (tAge), созданных нами благодаря масштабной интеграции многочисленных транскриптомных данных, мы показали, что изменения экспрессии генов, происходящие с возрастом, обращаются вспять во время клеточного репрограммирования и что эффекты омоложения, вызванные репрограммированием на транскриптомном уровне (reprogramming-induced rejuvenation, RIR), в основном не зависят от изменений, связанных с обретением плюрипотентности. Раскрытие молекулярных механизмов, связанных с RIR на уровне экспрессии генов, предоставляет инструменты для скрининга воздействий, вызывающих сходный с репрограммированием омолаживающий эффект при сохранении дифференцированного состояния клеток и отсутствии риска неоплазии.

*Работа поддержана грантом РФФ 23-14-00218.*

## REJUVENATION EFFECTS OF CELL REPROGRAMMING REVEALED BY TRANSCRIPTOMIC CLOCKS

**S.E. Dmitriev**

*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow*

Aging and differentiation are two fundamental processes that occur in the cells of living organisms during ontogeny. In the early stages of embryonic development, cellular aging is naturally reversed, enabling the new organism, formed by the fusion of gametes from adult individuals, to be born young. Simultaneously, extensive cellular differentiation takes place. In artificial cellular reprogramming, induced by genetic or chemical factors, differentiated cells from adult organisms undergo a loss of tissue identity and acquire pluripotency, resembling early embryonic cells. A crucial aspect of this process is the "resetting" of the biological age of the cells, which accompanies their dedifferentiation. Consequently, partial reprogramming of somatic cells, which does not lead to full pluripotency, is considered one of the potential strategies for rejuvenating tissues in adult organisms. However, the loss of tissue identity in cells presents risks of neoplasia, and the challenge of "disentangling" the processes of cellular rejuvenation and dedifferentiation is complex. In this study, we identified transcriptomic signatures of cell reprogramming in both human and mouse models, revealing similar regulation of reprogramming-associated genes and genes linked to lifespan-extending interventions. Some of these genes were found to be particularly related to DNA repair and inflammation. Utilizing multi-tissue transcriptomic aging clocks (tAge), developed through the large-scale integration of numerous transcriptomic datasets, we demonstrated that age-related changes in gene expression are reversed during cellular reprogramming. Furthermore, the rejuvenating effects induced by reprogramming at the transcriptomic level (reprogramming-induced rejuvenation, RIR) largely operate independently of the changes associated with acquiring pluripotency. Uncovering the molecular mechanisms related to RIR at the gene expression level provides valuable tools for screening interventions that induce rejuvenating effects similar to those of reprogramming while preserving the differentiated state of cells and minimizing the risk of neoplasia.

*The work is supported by the RSF grant no. 23-14-00218.*

## МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К АНАЛИЗУ ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК ОНКОЭНДОКРИННЫХ ПАТОЛОГИЙ

**С. Попов, В. Трофимов, А. Щербакова, М. Уткина, Г. Мельниченко**

*ГНЦ НМИЦ эндокринологии Минздрава России, Москва*

Секвенирование единичных клеток позволяет эффективно исследовать молекулярные механизмы, лежащие в основе онкоэндокринных патологий, путем применения различных биоинформатических подходов при анализе данных. Предобработка данных включает удаление низкокачественных последовательностей, фильтрацию по параметрам качества, устранение артефактов с использованием программного пакета Cell Ranger. Для выравнивания последовательностей, используются специализированные алгоритмы STAR или HISAT2, позволяющие учитывать особенности геномной структуры, участки альтернативного сплайсинга и нуклеотидные повторы. Для количественной оценки числа клеток и транскриптов используются клеточные баркоды и уникальные молекулярные идентификаторы (UMI).

После этапа предобработки, проводится фильтрация по количеству обнаруженных генов и их уровню экспрессии, на основе которых проводится нормализация данных. Например, в пакете Seurat используется log-нормализация и SCTransform, позволяющая корректировать различия в глубине секвенирования между клетками. Важным этапом является идентификация генов с высокими уровнями вариабельности, которая помогает сфокусировать внимание на изменении в экспрессии, обусловленной биологическими факторами. При этом, используется анализ главных компонент — метод снижения размерности. Затем следуют методы кластеризации и визуализации, таких как UMAP, для идентификации клеточных подтипов и межклеточных взаимодействий. Для оценки динамики клеточной дифференцировки и прогрессии опухолей применяются методы анализа траекторий, например, Monocle или Slingshot. Альтернативным способом является метод RNA velocity, оценивающий динамику экспрессии по соотношению сплайсированных и несплайсированных форм РНК. CNV-анализ так же является важным методом для изучения особенностей клональных взаимодействий в опухоли.

Современные исследования все чаще предполагают интеграцию данных секвенирования единичных клеток с другими типами данных — такими как пространственно-транскриптомные, протеомные, метаболомные и клинические данные. Перечисленные подходы к анализу данных scRNA-seq открывают новые пути изучения онкоэндокринных патологий, позволяя связывать молекулярные изменения с клиническими проявлениями и разрабатывать индивидуализированные стратегии терапии.

## METHODOLOGICAL APPROACHES TO THE ANALYSIS OF SINGLE CELL SEQUENCING DATA IN ONCOENDOCRINE PATHOLOGIES

**S. Popov, V. Trofimov, A. Shcherbakova, M. Utkina, G. Melnichenko**

*Endocrinology Research Center, Moscow*

Single cell sequencing enables efficient investigation of molecular mechanisms underlying oncoendocrine pathologies by applying various bioinformatic approaches to data analysis. Data preprocessing includes removal of low quality sequences, filtering by quality parameters, and elimination of artefacts using the Cell Ranger software package. For sequence alignment, specialised algorithms such as STAR or HISAT2 are utilized to take into account features of genomic structure, alternative splicing sites and nucleotide repeats. At the same time, cell barcodes and unique molecular identifiers (UMIs) are used to quantify the number of cells and transcripts.

After the preprocessing step, filtering is performed on the number of detected genes and their expression levels, based on which the data are normalised. For example, the Seurat package uses log-normalisation and SCTransform to correct for differences in sequencing depth between cells. An important step is the identification of genes with high levels of variability, which helps to focus on changes in expression due to biological factors. In this, principal component analysis, a dimensionality reduction technique, is used. This is followed by clustering and visualisation techniques such as UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) to identify cellular subtypes and intercellular interactions. Trajectory analysis methods such as Monocle or Slingshot are applied to assess the dynamics of cell differentiation and tumour progression. An alternative method is the RNA velocity method, which estimates expression dynamics by the ratio of spliced and unspliced RNA forms. CNV analysis is also an important method for studying the features of clonal interactions in tumours.

Modern studies increasingly involve the integration of single cell sequencing data with other types of data such as spatial transcriptomic, proteomic, metabolomic, and clinical data. These approaches to scRNA-seq data analysis open new ways to study oncoendocrine pathologies, allowing us to link molecular alterations to clinical manifestations and develop individualised therapeutic strategies.

### БЫТЬ ИЛИ НЕ БЫТЬ? РОЛЬ МАЛЫХ ОТКРЫТЫХ РАМОК СЧИТЫВАНИЯ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ КЛЕТКИ

М.П. Рубцова<sup>1,2</sup>, Н.М. Шепелев<sup>1,2</sup>, М.С. Корягина<sup>1,2</sup>, М.А. Шамонова<sup>1</sup>, Е.А. Разумова<sup>1</sup>, А.И. Лавров<sup>1</sup>, В.Р. Заббарова<sup>1</sup>, А. Макарюк<sup>1</sup>, У. Деменева<sup>1</sup>, А.В. Бачева<sup>1</sup>, М.Ю. Высоких<sup>1</sup>, Д.А. Никишин<sup>1</sup>, М.Д. Ткаченко<sup>1</sup>, И.О. Бутенко<sup>3</sup>, Д.С. Матюшкина<sup>3</sup>, В.М. Говорун<sup>3</sup>, О.А. Донцова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова; <sup>2</sup>ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН;

<sup>3</sup>НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва

Основная догма молекулярной биологии постулировала, что в клетках эукариот один ген кодирует один белок, но развитие методов анализа генома, транскриптома и протеома позволило расширить границы кодирующего и регуляторного потенциала.

Теломераза – рибонуклеопротеидный комплекс, достраивающий теломеры в активно пролиферирующих клетках. Активность теломеразы обеспечивают два основных компонента: теломеразная обратная транскриптаза и теломеразная РНК – наличие которых необходимо для функционирования фермента. Теломеразная РНК присутствует во всех клетках на протяжении всего жизненного цикла организма. Мы продемонстрировали кодирующий потенциал предшественника теломеразной РНК человека. Белок hTERP, кодируемый теломеразной РНК, участвует в механизмах активации аутофагии, поддержании протеостаза, что связано с пролиферативным статусом, а также регуляции выживания и гибели клеток.

Анализ распределения рибосом по РНК эукариотической клетки выявил накопление транслирующих рибосом в областях прежде считавшихся некодирующими, например, 5'-нетранслируемые области (5'-НТО) многих мРНК накапливают рибосомы. Мы использовали библиотеку лентивирусных частиц для подавления функционирования 977 малых рамок считывания при помощи CRISPR/Cas9 системы геномного редактирования для поиска областей, участвующих в поддержании пролиферации клеток. Исследование механизмов функционирования некоторых, выявленных в ходе скрининга, мишеней позволит определить их роль в жизнедеятельности клетки.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, проект 23-14-00058 и Программы развития МГУ (Междисциплинарная научно-образовательная школа «Молекулярные технологии живых систем и синтетической биологии» проект 23-Ш04-20).*

### TO BE OR NOT TO BE? ROLE OF SMALL OPEN READING FRAMES IN CELL FUNCTIONING

М.П. Rubtsova<sup>1,2</sup>, N.M. Shepelev<sup>1,2</sup>, M.S. Koriagina<sup>1,2</sup>, M.A. Shamonova<sup>1</sup>, E.A. Razumova<sup>1</sup>, A.I. Lavrov<sup>1</sup>, V.R. Zabbarova<sup>1</sup>, A. Makaryuk<sup>1</sup>, U. Demeneva<sup>1</sup>, A.V. Bacheva<sup>1</sup>, M.Y. Vyssokikh<sup>1</sup>, D.A. Nikishin<sup>1</sup>, M.D. Tkachenko<sup>1</sup>, I.O. Butenko<sup>3</sup>, D.S. Matyushkina<sup>3</sup>, V.M. Govorun<sup>3</sup>, O.A. Dontsova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Lomonosov Moscow State University; <sup>2</sup>Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences;

<sup>3</sup>Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow

The main dogma of molecular biology postulated that in eukaryotic cells one gene encodes one protein, but progress in genome, transcriptome, and proteome analysis has allowed the boundaries of coding and regulatory potential to be expanded.

Telomerase is a ribonucleoprotein complex that completes telomeres in actively proliferating cells. Telomerase activity is provided by two main components: telomerase reverse transcriptase and telomerase RNA, the presence of which is necessary for the enzyme to function. Telomerase RNA is present in all cells throughout the life cycle of an organism. We have demonstrated the coding potential of the precursor of human telomerase RNA. The hTERP protein, encoded by telomerase RNA, is involved in the mechanisms of autophagy activation, maintenance of proteostasis, which is associated with the proliferative status, as well as the regulation of cell survival and death.

Analysis of ribosome distribution in eukaryotic cell RNA revealed accumulation of translating ribosomes in regions previously considered non-coding, for example, 5'-untranslated regions (5'-UTR) of many mRNAs accumulate ribosomes. We used a library of lentiviral particles to suppress the functioning of 977 small reading frames using the CRISPR/Cas9 genome editing system to search for regions involved in maintaining cell proliferation. Studying the mechanisms of functioning of some targets identified during screening will help determine their role in cell life.

*The work was supported by the Russian Science Foundation, project 23-14-00058 and grant #23-SH04-20 of the Development Program of the MSU Interdisciplinary Scientific and Educational School “Molecular technologies of living systems and synthetic biology” at Lomonosov Moscow State University.*

## ПРИМЕНЕНИЕ ДАННЫХ ГЕНОМИКИ И МАССОВОГО ПРЕДСКАЗАНИЯ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ В ИССЛЕДОВАНИЯХ РЕПАРАЦИИ ДНК

Д.О. Жарков

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

Доступность геномных данных для огромного количества белок-кодирующих геномных последовательностей намного опережает количество экспериментальной информации о структуре и функциях соответствующих белков. Ввиду стремительного развития методов предсказания третичной структуры белков встает вопрос о наилучших способах использования «больших данных» такого рода для открытия новых функций белков. В работе освещены примеры применения данных геномики и массового моделирования структуры в исследованиях ферментов системы эксцизионной репарации оснований ДНК.

Структуры 200 белков из суперсемейства  $\alpha/\beta$ -урацил-ДНК-N-гликозилаз были сгенерированы при помощи пакета AlphaFold2. Опираясь на координаты двух наборов аминокислотных остатков, которые важны для функционирования фермента, была проведена кластеризация полученных структур.

В результате было выявлено новое семейство урацил-ДНК-гликозилаз, представитель которого из *Pseudomonas syringae* был затем выделен и охарактеризован биохимически. Белок обладал активностью, способной удалять из ДНК не только урацил, но и некоторые окисленные пиримидиновые основания.

Структуры 483 белков суперсемейства «спираль–два поворота–спираль» были проанализированы на предмет консервативности петли, ответственной за узнавание поврежденного основания в ДНК. Параллельно были получены варианты белка с рандомизированным тетрапептидом, составляющим центральную часть этой петли. Сравнивая их активность по отношению к разным субстратам, оказалось возможным разделить повреждения ДНК на две группы – те, для которых взаимодействие с петлей необходимо для узнавания, и те, для которых оно не обязательно, хотя имеет место в структуре фермент-субстратного комплекса.

Анализ доменных архитектур белков из суперсемейств «спираль–шпилька–спираль» и «экзонуклеаза–эндонуклеаза–фосфатаза», позволил выявить наличие в царстве Thermodesulfobacteriota уникальных белков, в которых присутствуют полноразмерные домены из обеих групп. Был выделен и охарактеризован такой белок из *Desulfobulbus oralis*. Оказалось, что он обладает как ДНК-гликозилазной активностью, удаляющей из ДНК окисленные пиримидиновые основания, так и активностью апурин-апиримидиновой эндонуклеазы.

*Работа поддержана грантом РФФ 24-14-00285.*

## USING GENOMIC AND LARGE-SCALE PROTEIN STRUCTURE MODELING IN THE STUDIES OF DNA REPAIR ENZYMES

D.O. Zharkov

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk*

The availability of genomic data for a vast number of protein-coding genomic sequences far outpaces the amount of experimental information on the structure and function of the respective proteins. The rapid advancement of protein structure prediction methods raises a question of how this kind of big data can be best used to discover new protein functions. Here we present examples of the application of genomics data and massive structure modeling in the study of base excision DNA repair.

The structures of 200 proteins from the  $\alpha/\beta$ -fold uracil–DNA N-glycosylase superfamily were generated using the AlphaFold2 package. The resulting structures were clustered based on the coordinates of two sets of amino acid residues important for the enzyme function. As a result, a new family of uracil–DNA–glycosylases was identified, a representative of which from *Pseudomonas syringae* was subsequently isolated and characterized biochemically. The protein was capable of removing not only uracil but also some oxidized pyrimidine bases from DNA.

The structures of 483 proteins of the helix–two-turn–helix superfamily were analyzed for the conservation of the loop responsible for recognizing the damaged base in DNA. In parallel, protein variants with a randomized tetrapeptide constituting the central part of this loop were made. By comparing their activity towards different substrates, it was possible to divide DNA lesions into two groups: those for which interaction with the loop is necessary for recognition, and those for which it is dispensable despite being observed in the structure of the enzyme–substrate complex.

An analysis of domain architectures of proteins from the helix–hairpin–helix and exonuclease–endonuclease–phosphatase superfamilies revealed the presence of unique proteins in the kingdom Thermodesulfobacteriota, which contain full-length domains from both groups. One such protein from *Desulfobulbus oralis* was isolated and characterized. It turned out that it has both DNA glycosylase activity, removing oxidized pyrimidine bases from DNA, and apurinic/apyrimidinic endonuclease activity.

*The work was supported by the Russian Science Foundation grant 24-14-00285.*

#### **N6-МЕТИЛАДЕНИН – ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ГЕНОМА У ЭУКАРИОТ**

**А. Сергеев<sup>1,2</sup>, А. Еремин<sup>1</sup>, А. Копылов<sup>2</sup>, Д. Малышев<sup>1</sup>, В. Родин<sup>1</sup>, Т. Панова<sup>1</sup>, И. Поляков<sup>1</sup>, М. Зверева<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова; <sup>2</sup>НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

Метилирование геномной ДНК по 5 положению остатков цитозина (5mC) является основной эпигенетической модификацией и перспективным малоинвазивным биомаркером старения [1]. Развитие технологии Oxford Nanopore Technology (ONT) за счет создания нанопоры нового поколения (R14) и машинного обучения при расшифровке сигнала позволило прямую идентификацию других модифицированных оснований: N6-метиладенин (6mA) и C5-гидроксиметилцитозина (5hmC). ONT анализ генома *Escherichia coli* позволил валидировать технологию: определить известные мотивы GmATC и CmC(T/A)GG, а также % 5hmC. ONT секвенирование генома модельного эукариотического организма (термотолерантных дрожжей) позволило заполнить пробелы в его сборке [2], выявило отсутствие 5mC, 5hmC и присутствие 6mA. Нуклеотидный состав был подтвержден независимо методом хроматографического разделения, сопряженного с масс-спектрометрией. Идентификация генома, где произошла замена 5mC на 6mA позволяет утверждать, что 6mA – это эпигенетическая модификация генома у эукариот. Анализ последовательностей с 6mA позволил определить общий неметилированный мотив TCCACCA, который был обнаружен в участках  $\pm 10$  п.о. от 6mA, то есть сайт узнавания ДНК и метилирования разнесены в пространстве у метилтрансферазы (MT) дрожжей, ответственной за модификацию. Это факт позволяет предположить отличный от бактериальных 6mA MT механизм действия фермента: узнавание ДНК отдельным доменом или белком партнером MT и привлечение каталитического домена MT на участок ДНК, что приводит к модификации близлежащих dA. Это объясняет отсутствие идентифицированного фермента для 6mA у высших эукариот и предполагает высокоспецифичную, точечную модификацию генома.

*Исследование в рамках Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология». Работа финансировалась Министерством науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Соглашения № 075-15-2024-643.*

1. Li S et al. Cell-free DNA methylation patterns in aging and their association with inflamm-aging. *Epigenomics* 2024, doi:10.1080/17501911.2024.2340958.
2. Ravin N et al. Genome sequence and analysis of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL1. *BMC Genomics* 2013, 14(1): 837.

#### **N6-METHYLADENINE IS AN EPIGENETIC MODIFICATION OF THE GENOME IN EUKARYOTES**

**A. Sergeev<sup>1,2</sup>, A. Eremin<sup>1</sup>, D. Malyushev<sup>1</sup>, A. Kopylov<sup>2</sup>, V. Rodin<sup>1</sup>, T. Panova<sup>1</sup>, I. Polyakov<sup>1</sup>, M. Zvereva<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Lomonosov Moscow State University; <sup>2</sup>Institute of Biomedical Chemistry, Moscow

Methylation of genomic DNA at the 5-position of cytosine residues (5mC) is a major epigenetic modification and a promising minimally invasive biomarker of aging [1]. The development of Oxford Nanopore Technology (ONT) through the creation of a new generation nanopore (R14) and machine learning when decoding the signal allowed the direct identification of other modified bases: N6-methyladenine (6mA) and C5-hydroxymethylcytosine (5hmC). ONT analysis of the *Escherichia coli* genome made it possible to validate the technology: to determine the known GmATC and CmC(T/A)GG motifs, as well as % 5hmC. ONT sequencing of the genome of a model eukaryotic organism (thermotolerant yeast) made it possible to fill gaps in its assembly [2] and revealed the absence of 5mC, 5hmC and the presence of 6mA. The nucleotide composition was independently confirmed by chromatographic separation coupled to mass spectrometry. Identification of the genome where the replacement of 5mC with 6mA occurred suggests that 6mA is an epigenetic modification of the genome in eukaryotes. Sequence analysis with 6mA identified a common unmethylated TCCACCA motif, which was found in  $\pm 10$  bp regions. from 6mA, that is, the site of DNA recognition and methylation is separated in space in the yeast methyltransferase (MT), responsible for the modification. This fact allows us to assume a mechanism of action of the enzyme that is different from bacterial 6mA MTs: recognition of DNA by a separate domain or partner protein of MT and recruitment of the MT catalytic domain to a DNA site, which leads to modification of nearby dA. This explains the lack of an identified enzyme for 6mA in higher eukaryotes and suggests a highly specific, targeted modification of the genome.

*Research within the framework of the Interdisciplinary Scientific and Educational School of Moscow University “Molecular technologies of living systems and synthetic biology.”*

1. Li S. et al. Cell-Free DNA Methylation Patterns in Aging and Their Association with Inflamm-Aging. *Epigenomics* 2024, doi:10.1080/17501911.2024.2340958.
2. Ravin N. et al. Genome sequence and analysis of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL1. *BMC Genomics*. 2013, 14 (1), 837.

### **ПРОТЕОМЕТАБОЛОМИКА АДИПОЦИТОВ И ПЛАЗМЫ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ДИАГНОСТИРОВАННЫМ ОЖИРЕНИЕМ**

**А.В. Лисица, А.С. Козлова, В.Г. Згода, О.И. Киселёва, Е.В. Пономаренко, Е.В. Ильгисонис, В.А. Тутельян**  
*НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича; ФИЦ питания и биотехнологии, Москва*

Интеграция разных омиксных слоев – транскриптома, транслятома и протеома – обычно осуществляется в геноцентрическом формате. Сравнение протеомных и метаболомных данных – нетривиальная задача, поскольку метаболит может быть связан сразу с несколькими генами/белками. На примере метаболомных и протеомных наборов данных, полученных при анализе образцов плазмы крови людей с ожирением, показана работа протеометаболомного конвертера – веб-приложения для сравнения и визуализации результатов протеомных и метаболомных компонентов молекулярного профиля при постгеномном анализе. Использование разработанного нами конвертера PMconv расширяет число объектов в экспериментально полученном списке белков за счет добавления белков метаболических путей, связанных с метаболитами, экспериментально обнаруженными в том же образце. Средства визуализации позволяют устанавливать связи между белками и метаболитами, что способствует более глубокому пониманию молекулярных механизмов патологических процессов.

### **PROTEOMETABOLOMICS OF ADIPOCYTES AND BLOOD PLASMA IN PATIENTS WITH DIAGNOSED OBESITY**

**A.V. Lisitsa, A.S. Kozlova, V.G. Zgoda, O.I. Kiseleva, E.V. Ponomarenko, E.V. Ilgisonis, V.A. Tutelyan**  
*Institute of Biomedical Chemistry, Federal Research Centre of Nutrition and Biotechnology, Moscow*

Integration of different omics layers — transcriptome, translatorome and proteome — is usually performed in a gene-centric format. Comparison of proteomic and metabolomic data is a non-trivial task, since a metabolite can be associated with several genes/proteins at once. Using metabolomic and proteomic datasets obtained from the analysis of blood plasma samples from obese individuals, we demonstrate the operation of the proteometabolomic converter, a web application for comparing and visualizing the results of proteomic and metabolomic components of the molecular profile in postgenomic analysis. Using the PMconv converter we developed, we expand the number of objects in the experimentally obtained list of proteins by adding proteins of metabolic pathways associated with metabolites experimentally detected in the same sample. Visualization tools allow us to establish links between proteins and metabolites, which contributes to a deeper understanding of the molecular mechanisms of pathological processes.

## СИСТЕМЫ ПРОТИВОВИРУСНОГО АБОРТИВНОГО ИММУНИТЕТА БАКТЕРИЙ

**С. Белухина, М. Скутель, А. Держаев, П. Ярема, А. Исаев**

*Сколковский институт науки и технологий, Москва*

Эволюция микробных сообществ в большой степени определяется взаимодействием с мобильными генетическими элементами. Чтобы противостоять фаговой инфекции, бактерии приобрели широкий арсенал антивирусных стратегий, и только в последние годы мы стали лучше представлять истинное разнообразие, повсеместную распространённость и эволюцию микробных иммунных систем. За последние годы было описано около 150 типов бактериальных иммунных систем, таким образом, иммуно-ассоциированные гены оказались самой большой группой генов в микробном пангеноме. В среднем каждая бактерия кодирует 5-7 различных иммунных систем, причем наиболее распространены "классические" иммунные системы, такие как рестрикция-модификация (P-M) и CRISPR-Cas. Эти системы обеспечивают первый уровень защиты, расщепляя ДНК вторгшихся мобильных элементов. Однако почти каждая бактерия также кодирует системы abortивного иммунитета в качестве второй линии защиты, которая активируется на более поздних этапах фаговой инфекции. Было показано, что около 60% новых иммунных систем действуют по принципу abortивной инфекции. В случае abortивного ответа, инфицированные клетки подавляют свой собственный метаболизм, чтобы остановить распространение фага на популяционном уровне. Abortивные системы состоят из двух модулей: сенсора инфекции и эффектора, который представляет собой токсин, подавляющий один из основных клеточных процессов при активации. Белки семейства ABC АТФаз являются одними из самых распространенных сенсоров фаговой инфекции и обнаружены в различных системах, таких как PARIS, Gabija, OLD, PrrC, Wadjet, Lamassu, Septu, Retrons, и в некоторых токсин-антитоксिनных модулях, вероятно, участвующих в противо-фаговой защите. Можно предположить, что ABC АТФазы являются универсальным доменом-сенсором, который может быть адаптирован к различным сигналам и впоследствии активировать различные эффекторы, чаще всего нуклеазы семейств TOPRIM и HNH. В докладе будут рассмотрены принципы активации трех систем с ABC АТФазными сенсорами: PARIS, Old и Ibf (R64), а также будет описано каким образом активация системы PARIS приводит к расщеплению тРНК лизина и остановке трансляции. Также будет показано, что тРНК молекулы кодируемые фагами могут играть анти-иммунную функцию и могут спасти инфекцию путем восстановления трансляции.

## BACTERIAL ANTI-PHAGE ABORTIVE IMMUNITY SYSTEMS

**S. Belukhina, M. Skutel, A. Derzhaev, P. Iarema, A. Isaev**

*Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow*

The evolution of microbial communities is shaped by interaction with mobile elements. To withstand phage invasion, bacteria have developed a broad arsenal of anti-viral strategies, and only in recent years have we uncovered the real diversity and ubiquity of microbial immune systems. ~150 types of bacterial immune systems have been described in the last years and immunity-associated genes have been shown to be the largest and one of the most understudied group of genes in the microbial pangenome. On average, each bacterium encodes 5-7 different immune systems, and "classical" immune systems such as restriction-modification and CRISPR-Cas are the most widespread. These systems provide the first layer of defense by cleaving the invading DNA of mobile elements. However, almost every bacterium also encodes abortive immunity systems as a second line of defense, which activate at later stages of phage infection. ~60% of novel immune systems have been shown to act through the abortive infection principle, so that infected cells inhibit their own metabolism to stop the spread of the phage infection at the population level. Abortive systems are comprised of two modules: an infection sensor and an effector, which is a toxin targeting one of the essential cell processes upon activation. ABC ATPase proteins are among the most abundant sensors of phage infection and have been found in a variety of systems, such as PARIS, Gabija, OLD, PrrC, Wadjet, Lamassu, Septu, Retrons, and some toxin-antitoxin modules, likely involved in phage defense. It appears that a basic ABC ATPase fold can be adapted to a variety of inputs and subsequently activate a variety of effectors, most often nucleases of the TOPRIM and HNH families. Here we will describe activation principles of the three ABC ATPase abortive immunity systems: PARIS, Old, and Ibf (R64) and will demonstrate how the activated PARIS immunity system will cleave the host tRNA Lys to halt translation. In addition, we have uncovered that tRNA molecules produced by some phages play an anti-immunity function by allowing to rescue translation and counteract the activity of anti-codon targeting immunity nucleases.



#### ОТ ПРОТЕОМИКИ К АНАЛИЗУ ЕДИНИЧНЫХ БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛ

**А.И. Арчаков, Е.А. Пономаренко, Т.О. Плешакова, В.Г. Згода, Н.Э. Вавилов, А.В. Лисица, Е.В. Ильгисонис**  
*НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва*

XX век закончился прочтением генома человека, а в XXI - старт формирования постгеномных технологий. Главное отличие геномных методов – возможность прочтения нуклеиновых кислот, как саморазмножающихся систем. В этом случае не существует предела детекции: если материала для детектора недостаточно, «размножение» системы позволит наработать недостающее количество. Основной постгеномный метод в протеомике и метаболомике – масс-спектрометрический анализ (МС) для идентификации и определения количества компонентов. Но молекулы белка и низкомолекулярные соединения не могут быть размножены. Существует предел детекции не позволяющий идентифицировать эти молекулы при недостаточном количестве материала. Делается вывод об отсутствии искомым молекул, а формирование полного молекулярного образа материала становится невозможным. Мы показали наличие подобного ограничения на примере МС-анализа смеси из 47 белков. В  $10^{-13}$ М растворе, приготовленном последовательным разведением, ни одного компонента не обнаружено. При высушивании раствора и разбавлении в меньшем объеме (концентрирование до  $10^{-9}$ М) белки уже обнаружены. Какое же расчетное количество молекул доступно для анализа? 1М раствор содержит  $10^{24}$  молекул в литре. Значит, при чувствительности  $10^{-9}$ М в 1 мкл раствора можно обнаружить  $10^9$  молекул. В  $10^{-13}$ М растворе ( $10^5$  молекул в 1 мкл) молекулы не обнаружены. Но это не значит, что их нет – они существуют, но «невидимы» для детектора. В протеомах органов и тканей найти предел детекции еще сложнее. Следовательно, при существующих технологиях нельзя получить полный протеом ни одного биообразца. Методы протеомики и метаболомики рассматриваются как основа системы ранней диагностики в медицине. Однако, наличие предела детекции делает эту задачу невыполнимой, т.к. первые молекулы, характеризующие патологический процесс, «невидимы» для детектора. Обнаружение возможно при наработке в организме большого их количества, что сопровождается развитую стадию заболевания. Для перехода к ранней диагностике, необходимо создание нового детектора подобного счетчику Гейгера–Мюллера, который позволит обнаружить каждую молекулу, используя, конечно, другой идентификационный признак молекулы, а не ее радиоактивность. Это актуальная задача, примеры решения этой задачи демонстрируются в наших исследованиях.

#### FROM PROTEOMICS TO THE ANALYSIS OF SINGLE PROTEIN MOLECULES

**A.I. Archakov, E.A. Ponomarenko, T.O. Pleshakova, V.G. Zgoda, N.E. Vavilov, A.V. Lisitsa, E.V. Ilgisonis**  
*Institute of Biomedical Chemistry, Moscow*

The 20th century came to an end with the completion of the Genome Project, and the 21<sup>st</sup> century began with the emergence of post-genomic technologies. A difference between genomic techniques is their ability to analyze nucleic acids as self-replicating systems. In this case, there is no detection limit. If there is not enough material, the "reproduction" of the system allows the missing amount to be accumulated. MS analysis is a primary postgenomic technique used in proteomics and metabolomics that is employed to identify and quantify components. But protein molecules and low molecular weight compounds cannot be multiplied. There is a detection limit that prevents the identification of these molecules using insufficient material. Using the MS of a mixture of 47 proteins as an example, we have demonstrated the such limitation. None of the components were found in the  $10^{-13}$ М solution prepared using the method of serial dilution. However, proteins are identified when solution was dried and reconstituted in a smaller volume (at a  $10^{-9}$ М). What is the estimated number of molecules available for analysis? 1M solution contains  $10^{24}$  molecules per liter. This means that  $10^9$  molecules can be found in 1µl with a sensitivity of  $10^{-9}$ М. No molecules were detected in the  $10^{-13}$ М ( $10^5$  molecules in 1 µl) solution. However, this does not mean that they do not exist – they do exist, but they are "invisible" to the detector. Using current technologies, it is impossible to obtain the complete proteome of any biological sample. Proteomic and metabolomic techniques are regarded as the cornerstones of early diagnostics. This task is challenging due to the existence of a detection limit, which prevents the detector from identifying the initial molecules that characterize the pathology. Detection becomes possible when a larger number of these molecules are produced, indicating the advanced stage of the disease. In order to advance towards early diagnosis, we need to create a new detector, similar to the Geiger–Müller counter, that can detect individual molecules based on distinct characteristics of the molecule itself rather than its radioactivity. Presently, we are confronted with a formidable task, and our research provides concrete illustrations of effective solutions to this problem.

## МОБИЛЬНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ ПРОКАРИОТ – ИСТОЧНИК НОВЫХ ИНСТРУМЕНТОВ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА

**А.В. Кульбачинский**

*Институт биологии гена РАН, Москва*

Мобильные генетические элементы прокариот обеспечивают свой горизонтальный перенос и устойчивое поддержание в популяции микроорганизмов с помощью различных классов ферментов, в число которых входят транспозазы, сайт-специфические рекомбиназы, программируемые нуклеазы и каталитические молекулы РНК. Многие из ферментов, кодируемых мобильными элементами, прежде всего, транспозазы и рекомбиназы, давно нашли широкое применение в фундаментальных исследованиях, генетической инженерии и редактировании геномов. Недавно в составе мобильных элементов открыты предшественники гид-зависимых нуклеаз Cas9 и Cas12. Эти белки в комплексе с гидовыми РНК способны вносить точечные разрывы и модификации в требуемые участки ДНК и сейчас становятся новыми инструментами для редактирования геномов. Другим классом сайт-специфических нуклеаз являются самосплайсирующие интроны, которые могут разрезать ДНК в определенных участках в ходе обратного сплайсинга. Исследование механизмов действия программируемых нуклеаз и рибозимов, кодируемых мобильными элементами, указывает на их ключевую роль в горизонтальном переносе этих элементов. Изучение свойств этих нуклеаз и количественная характеристика эффективности и специфичности их действия необходимы для их успешного использования в геномных технологиях.

*Работа выполнена при поддержке РФФ (22-14-00182).*

## PROKARYOTIC MOBILE GENETIC ELEMENTS AS A SOURCE OF NOVEL TOOLS FOR GENOME EDITING

**A. Kulbachinskiy**

*Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow*

Mobile genetic elements of prokaryotes ensure their horizontal transfer and stable maintenance in the microbial population using various classes of enzymes, including transposases, site-specific recombinases, programmable nucleases, and catalytic RNA molecules. Many of the enzymes encoded by mobile elements, primarily transposases and recombinases, have long been used in fundamental research, genetic engineering and genome editing. Recently, evolutionary predecessors of the guide-dependent nucleases Cas9 and Cas12 have been discovered in mobile elements. These proteins can use guide RNAs to introduce double-strand breaks and modifications into the required DNA regions and are now becoming new tools for genome editing. Another class of site-specific nucleases are self-splicing introns, which can cut DNA at specific sites during reverse splicing. Recent studies of the mechanisms of action of programmable nucleases and ribozymes encoded by mobile elements indicate their key role in the horizontal transfer of these elements. Analysis of the properties of these nucleases and quantitative characterization of the efficiency and specificity of their action is a prerequisite for their successful use in genomic technologies.

*This work was supported by the Russian Science Foundation (22-14-00182).*

## МЕТАБОЛИЗМ НУКЛЕОЗИДНОЙ ФОРМЫ ВИТАМИНА В3 У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

**А.А. Никифоров**

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург*

Нуклеозидная форма витамина В3 – никотинамидрибозид (NR) – является предшественником никотинамидадениндинуклеотида (NAD), который играет ключевую роль в энергетическом метаболизме и сигнальной трансдукции в клетках человека и животных. Попадая в клетку, NR фосфорилируется киназами NRK до соответствующего мононуклеотида NMN, который потом используется для синтеза NAD. Введение в организм NR эффективно восстанавливает различные физиологические функции, ослабленные или утраченные в результате падения уровня внутриклеточного NAD при старении, а также при развитии таких патологических состояний, как нарушения обмена веществ, нейродегенеративные заболевания, болезни сердца и другие. Однако несмотря на активное использование NR в прикладной биомедицине, механизмы его действия все еще исследованы недостаточно хорошо. В данной работе, используя фармакологическую и генетическую модуляцию активности белков, а также метод количественной оценки метаболитов при помощи ЯМР-спектроскопии, мы установили, что внеклеточный NR импортируется в культивируемые клетки человека представителями семейства уравнивающих переносчиков нуклеозидов (ENT) – белками ENT1, ENT2 и ENT4. Далее мы показали, что после импорта в клетку NR интенсивно расщепляется до другой формы витамина В3 – никотинамида (Nam), из которого также эффективно синтезируется NAD через образование NMN. Нами был установлен фермент, отвечающий за расщепление NR, – им оказался цитозольный белок PNP (пуриннуклеозидфосфорилаза). Подавление его активности специфическим ингибитором иммуциллин Н полностью блокировало превращение NR в Nam в различных типах клеток. Более того, мы обнаружили, что NR также быстро расщепляется до Nam после внутрибрюшинного введения мышам, и это расщепление подавляется иммуциллином Н. Наконец, на клеточных и мышечных моделях мы продемонстрировали, что ингибирование PNP может значительно усилить синтез NAD из NR. Таким образом, мы установили, что PNP-зависимое расщепление NR до Nam является альтернативным и, возможно, основным способом утилизации NR для синтеза NAD в клетках человека и животных.

*Работа выполнена при поддержке грантов РФФ № 21-14-00319 и РФФИ № 19-34-60039.*

## METABOLISM OF THE NUCLEOSIDE FORM OF VITAMIN B3 IN MAMMALS

**A.A. Nikiforov**

*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St Petersburg*

The nucleoside form of vitamin B3, nicotinamide riboside (NR), is a precursor to nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), which plays a key role in energy metabolism and signal transduction in human and animal cells. Once inside the cell, NR is phosphorylated by NR kinases to the corresponding mononucleotide, NMN, which is then used for NAD synthesis. Administration of NR effectively restores various physiological functions that are weakened or lost due to the decline in intracellular NAD levels with aging, as well as during the development of pathological conditions such as metabolic disorders, neurodegenerative diseases, heart diseases, and others. However, despite the active use of NR in applied biomedicine, the mechanisms of its action are still not well understood. In this study, using pharmacological and genetic modulation of protein activity, as well as quantitative metabolite analysis by NMR spectroscopy, we established that extracellular NR is imported into cultured human cells by members of the equilibrative nucleoside transporter (ENT) family – ENT1, ENT2, and ENT4 proteins. We further showed that after being imported into cells, NR is rapidly converted to another form of vitamin B3, nicotinamide (Nam), from which NAD is also effectively synthesized through NMN formation. We found that the cytosolic purine nucleoside phosphorylase (PNP) is the enzyme responsible for NR degradation. Suppression of its activity with the specific inhibitor immucillin H completely blocked the conversion of NR to Nam in various types of cells. Moreover, we found that NR is also rapidly converted to Nam after intraperitoneal administration in mice, and this degradation is inhibited by immucillin H. Finally, in cellular and mouse models, we demonstrated that inhibition of PNP can significantly enhance NAD synthesis from NR. Thus, we have established that PNP-dependent degradation of NR to Nam is an alternative and possibly primary pathway for NR utilization for NAD synthesis in human and animal cells.

*This work was supported by the Russian Science Foundation grant No. 21-14-00319 and the Russian Foundation for Basic Research grant No. 19-34-60039.*

## ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ В ТРАНСЛЯЦИОННОЙ И ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ ДЕРМАТОЛОГИИ

А.А. Пантелеев

НИЦ «Курчатовский институт», лаборатория тканевой инженерии

Кожа – один из наиболее функционально значимых органов человека, представляющий большой интерес не только с клинической, но также с фундаментальной (как эффективная модель исследования ключевых проблем современной биологии) и коммерческой (как предмет многомиллиардного косметологического бизнеса) точек зрения. Хотя исследования биологии кожных покровов ведутся чрезвычайно интенсивно, многие аспекты её функционирования остаются неизвестными или малопонятными. К ним относятся активация стволовых клеток кожи, поддержание баланса пролиферации и дифференцировки клеток эпидермиса, механизмы функционирования эпидермального барьера, контроль цикла волосяного фолликула и его формирование *de novo*, старение кожи, роль кожного микробиома в поддержании гомеостаза покровов, вопросы кожной иммунологии, кожа как мишень и источник гормональной активности и т.д.

В настоящее время для поиска ответов на все эти вопросы используется широкий спектр экспериментальных моделей – от кожных эквивалентов различной сложности до моделирования молекулярных взаимодействий *in silico*. Однако, наиболее информативным методологическим подходом к исследованию молекулярных и клеточных процессов, лежащих в основе функционирования кожи в норме и патологии, остаётся использование генетически модифицированных лабораторных мышей. Подобные модели позволяют исследовать генетические и молекулярные механизмы патогенеза (и, соответственно, искать новые подходы к терапии) большинства кожных заболеваний, а также моделировать различные состояния кожных покровов. Значение подобных мышинных моделей (как спонтанных мутаций, так и генетически модифицированных) для дальнейшего развития дерматологии, косметологии и космецевтики невозможно переоценить. Закономерно, что Джексонская лаборатория (США) в настоящее время предлагает более 450 различных линий мышей с кожным фенотипом для исследования биологии кожи. В России генно-модифицированные/мутантные линии мышей с кожными проявлениями единичны.

В данном докладе представлены результаты анализа кожного фенотипа у линии мышей со спонтанными мутациями в гене *Hr* (hairless), а также у линии мышей с подавлением активности гена *Arnt* (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) в эпидермисе, полученной с использованием Cre/LoxP методологии (под промотором эпидермис-специфичного кератина СК14). Показана методология выявления мутаций, определяющих фенотип «hairless» у мышей и человека, а также определения функций гена *Hr*. Выявление молекулярно-клеточных механизмов патогенеза фенотипа «hairless» позволило идентифицировать, охарактеризовать и зарегистрировать новое заболевание человека (*Atrichia with papular lesions*), а также сформировать новую систему взглядов на механизмы индукции цикла волосяного фолликула. Получение и анализ кожного фенотипа у мышей линии *Arnt:Cre-СК14* позволило выявить новые молекулярные корреляты процесса формирования и функционирования эпидермального барьера, что имеет важное значение для понимания патогенеза таких кожных заболеваний как псориаз, акне, ксерозы и проявления интоксикации организма диоксином.

В целом, использование генетических моделей лабораторных мышей (как спонтанных мутантов, так и генетически модифицированных животных) представляет собой эффективный инструмент выявления механизмов контроля функций кожных покровов человека в норме и патологии.

## ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНАЯ ХИМИЧЕСКАЯ ПРОТЕОМИКА В ЗАДАЧАХ ПОИСКА МИШЕНЕЙ И МЕХАНИЗМОВ ЛЕКАРСТВЕННОГО ДЕЙСТВИЯ

**М.В. Горшков**

*Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе ФИЦ ХФ РАН им. Н.Н. Семенова, Москва*

Быстро развивающаяся в последние годы химическая протеомика представляет собой основной метод для идентификации взаимодействий малых молекул и белков в масштабах всего протеома и картирования сигнальных и/или метаболических путей этих взаимодействий. Использование количественного полнопротеомного анализа на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и тандемной масс-спектрометрии (МС/МС), позволяющего измерять изменения концентрации белков на уровне всего протеома клеток, дает возможность выявлять не только известные и ожидаемые мишени для того или иного лекарства, но и дополнительные, неизвестные ранее белки, с которыми оно взаимодействует. При этом производительность полнопротеомного анализа, основанного на ВЭЖХ-МС/МС, является одним из основных факторов, ограничивающих масштаб таких исследований. Так, например, в быстро набирающем популярность методе химической протеомики на основе температурного профилирования протеомов (TPP), предложенном в 2014 году Савицким и др. (Savitski et al., Science 2014) и основанном на определении точки денатурации белков при изменении температуры при различных концентрациях лекарственного препарата, требуется анализ нескольких сотен протеомов только для одной системы взаимодействия «лекарство-протеом». Даже в случае использования альтернативных методов, разнообразие возможных химиотерапевтических подходов, групп лекарств и объектов их воздействия делает проблему производительности анализа критически важной. Методы ультракороткого полнопротеомного анализа, появившиеся буквально в последние несколько лет, позволили вывести производительность ВЭЖХ-МС на уровень нескольких сотен анализов в сутки. Одним из таких методов является метод прямой масс-спектрометрической идентификации белков DirectMS1, позволяющий осуществлять разделение протеолитических смесей с использованием минутных градиентов ВЭЖХ. В докладе будут рассмотрены результаты реализации этого метода для TPP и экспрессионной протеомики на примерах анализа взаимодействий протеомов клеточных линий рака с известными и экспериментальными онкопрепаратами.

*Обсуждаемые в докладе результаты были получены при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 20-14-00229.*

## HIGH-THROUGHPUT CHEMICAL PROTEOMICS IN SEARCH FOR TARGETS AND MECHANISMS OF DRUG ACTION

**M.V. Gorshkov**

*V.L. Talrose Institute for Energy Problems of Chemical Physics, FRCCP RAS, Moscow*

Chemical proteomics, which has been rapidly developing in recent years, is one of the main methods for studying small molecule-to-protein interactions on a proteome-wide scale and mapping the signaling and/or metabolic pathways of these interactions. The use of quantitative whole proteome analysis based on high-performance liquid chromatography (HPLC) and tandem mass spectrometry (MS/MS), which allows measuring changes in protein concentrations at the level of the entire cellular proteome, makes it possible to identify not only known and expected targets for a given drug, but also additional, previously unknown ones. However, the throughput of HPLC-MS/MS is one of the main factors limiting the scale of such studies. For example, the rapidly gaining popularity method of chemical proteomics based on thermal proteome profiling (TPP), proposed in 2014 by Savitski et al. (Science 2014) and based on determining the protein denaturation temperature changes at different concentrations of a drug, requires the analysis of several hundred proteomes for only one drug-to-proteome interaction system. Even in the case of alternative proteomic methods, the diversity of possible chemotherapeutic approaches, drug groups and objects of their action makes the problem of the throughput of whole proteome analysis critically important. Ultrafast proteomics methods developed in just the last few years have made it possible to bring the throughput of HPLC-MS to the rate of several hundred analyses per day. One of such methods is the DirectMS1, which allows the separation of proteolytic mixtures using HPLC gradients in a minute time scale. In the report, we will consider the results of implementing this method for TPP and expression proteomics using examples of analyzing the interactions of cancer cell line proteomes with known and experimental antitumor drugs.

*The results discussed in the report were obtained with the financial support of the Russian Science Foundation, grant No. 20-14-00229.*

### **ВЫЯВЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНО ОТЛИЧАЮЩИХСЯ СПЛАЙС-ФОРМ БЕЛКОВ, КОДИРУЕМЫХ ОДНИМ ГЕНОМ**

**Е.В. Поверенная, Л.К. Курбатов, М.А. Пятницкий, П.А. Крюкова, О.И. Киселева, В.А. Арзуманян, Я.С. Ким, Д.Д. Ромаши, Е.А. Пономаренко**

*НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва*

По-разному сплайсированные белковые продукты демонстрируют разную ферментативную активность, локализуются в разных зонах клетки и зачастую ведут себя как отдельные белки, а не как взаимозаменяемые варианты друг друга. Они могут проявлять доминантно-негативные эффекты по отношению к другим формам того же гена, экспрессироваться в большей или меньшей степени, чем конститутивный вариант, или даже обладать противоположными функциями. В условиях отсутствия общепризнанного стандарта определения функции белка, большая часть проводимых функциональных аннотаций носит предсказательный характер за счет широкого использования методов биоинформатики в приложении к большим омикс-данным и имеющейся, по сути, фрагментарной информации о регуляции клеточных процессов. Тем не менее, в случае сплайс-форм данный подход позволяет выявлять отличные по функции варианты белков, кодируемых одним геном. Помимо выявления дифференциально экспрессирующихся сплайс-форм в опухолях на основе анализа данных TCGA, нами было показано, что 16 транскриптов ассоциированы с появлением очагов бронхиальных дисплазий для предотвращения развития плоскоклеточного рака легких – одного из самых распространенных онкологических заболеваний. В рамках существующих экспериментальных подходов к функциональной аннотации белков глобально можно выделить два направления: 1) нокаут или изменение уровня экспрессии интересующего гена для выявления искажающихся молекулярных путей на основе данных анализа одного или нескольких омикс-уровней и 2) анализ интерактома. Реализация данных подходов для сплайс-форм практически невозможна без использования технологии редактирования генома на основе системы CRISPR-Cas9. Предложенный подход к определению белок-белковых взаимодействий с помощью модификации метода AP-MS путем использования генетического редактирования для встройки HA-tag в целевой ген применим и для сплайс-форм за счет сохранения нативности клеточных процессов. Однако, надо отметить, что из-за отличий сплайс-форм между собой в разных участках сиквенса, такой метод применим только для трети известных вариантов.

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

### **IDENTIFICATION OF FUNCTIONALLY DISTINCT PROTEIN SPLICE VARIANTS ENCODED BY A SINGLE GENE**

**E.V. Poverennaya, L.K. Kurbatov, M.A. Pyatnitskiy, P.A. Kryukova, O.I. Kiseleva, V.A. Arzumanyan, Ya.S. Kim, D.D. Romashin, E.A. Ponomarenko**

*Institute of Biomedical Chemistry, Moscow*

Differently spliced protein products may exhibit different enzymatic activities, localize in different cellular regions, and behave as distinct proteins rather than interchangeable variants of each other. These splice variants can exert dominant-negative effects on other forms of the same gene, be expressed at higher or lower levels than the constitutive variant, or even possess opposing functions. In the absence of a generally recognized standard for determining protein function, most functional annotations remain predictive, relying heavily on bioinformatics approaches applied to large omics datasets and the inherently fragmented information available on cellular process regulation. However, for splice variants, this approach can identify functionally distinct protein isoforms encoded by a single gene. Our analysis of the TCGA dataset revealed multiple differentially expressed splice variants in tumors. Furthermore, we have demonstrated that 16 transcripts are associated with the development of bronchial dysplasia foci, which may help prevent the progression to squamous cell lung carcinoma—one of the most prevalent types of cancer.

Existing experimental approaches to functional protein annotation can be broadly divided into two categories: 1) knockout or modulation of gene expression to identify disrupted molecular pathways through profiling of one or more -omics levels 2) interactome analysis. Implementing these approaches for splice variants is challenging without the use of genome editing technologies like the CRISPR-Cas9 system. Our proposed method for identifying protein-protein interactions through a modified AP-MS technique, which incorporates genetic editing to insert an HA-tag into the target gene, is applicable to splice variants while maintaining the integrity of native cellular processes. However, it should be noted that due to amino acid sequence differences among splice variants, this method is applicable to only one-third of known variants.

*Acknowledgments: The work was done in the framework of the Russian Federation fundamental research program for the long-term period (2021–2030) (№ 122030100168-2)*

### СЛОЖНОСТИ ДИАГНОСТИКИ НОВООБРАЗОВАНИЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: ПОИСК МАРКЕРОВ С ПОМОЩЬЮ ПРОТЕОМНОГО АНАЛИЗА ПЛАЗМЫ КРОВИ

**И.О. Бутенко, Е.В. Бондаренко, Н.А. Кициловская, Д.С. Энгин, Т.А. Аксенова, А.В. Коваленко, К.С. Горбунов, В.Д. Гремячева, В.А. Иоутси**

*НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора; НМИЦ эндокринологии Минздрава России, Москва*

Новообразования щитовидной железы чрезвычайно распространены. В преобладающем числе случаев дифференциальную диагностику между раком и доброкачественными образованиями щитовидной железы проводят с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии (ТАБ) с последующим цитологическим исследованием. Для интерпретации результатов ТАБ используется система Bethesda, включающая 6 категорий, отражающих злокачественный потенциал новообразований. Несмотря на стандартизацию и признание классификации Bethesda, исследования показывают, что результаты ТАБ не совпадают с последующими гистологическими диагнозами в 35% случаев. Также, в классификации Bethesda существует категория III, атипия неопределенной значимости/фолликулярные поражения неопределенной значимости (AUS/FLUS). Среди новообразований этой категории около 30% оказываются злокачественными, а для уточнения диагноза на данный момент рекомендована повторная биопсия, а успехи в поиске и клиническом применении молекулярных маркеров новообразований щитовидной железы остаются ограниченными.

В нашей работе мы используем восходящий протеомный анализ плазмы крови пациентов. Панорамный протеомный анализ плазмы крови позволил предложить ансамбль из 10 белков, чья представленность в плазме крови может быть использована для классификации новообразований по категориям Bethesda и диагностики злокачественных новообразований у пациентов III категории. Для данного ансамбля белков разработана методика воспроизводительного прицельного протеомного анализа и проводится её испытание для проверки возможности уточнения результатов ТАБ.

### DIFFICULTIES IN DIAGNOSING THYROID TUMORS: THE SEARCH FOR MARKERS USING PROTEOME ANALYSIS OF BLOOD PLASMA

**I.O. Butenko, E.V. Bondarenko, N.A. Kitsilovskaya, D.S. Engin, T.A. Aksenova, A.V. Kovalenko, K.S. Gorbunov, V.D. Gremyacheva, V.A. Ioutsy**

*Research Institute for Systems Biology and Medicine; Endocrinology Research Center, Moscow*

Thyroid neoplasms are extremely common. In the majority of cases, differential diagnosis between cancer and benign thyroid tumors is performed using a fine needle aspiration biopsy (TAB) followed by cytological examination. To interpret the results of the TAB, the Bethesda system is used, which includes 6 categories reflecting the malignant potential of neoplasms. Despite the standardization and recognition of the Bethesda classification, studies show that TAB results do not coincide with subsequent histological diagnoses in 35% of cases. Also, in the Bethesda classification a category III, atypia of uncertain significance/follicular lesions of uncertain significance (AUS/FLUS) exists. Among neoplasms in this category, about 30% turn out to be malignant, and repeated biopsy is currently recommended to refine the diagnosis. In the meantime, progress in the search and clinical application of alternative analysis based on molecular markers of thyroid neoplasms remains limited.

In our work, we use bottom-up proteomic analysis of patients' blood plasma. Panoramic proteomic analysis of blood plasma allowed us to propose an ensemble of 10 proteins, whose representation in blood plasma can be used to classify tumors into Bethesda categories and diagnose malignant neoplasms in patients of category III. A technique of reproductive targeted proteomic analysis has been developed for this ensemble of proteins and is being tested to verify the possibility of clarifying the results of TAB.

## РАЗРАБОТКА МЕТОДА РАННЕГО ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РИСКА РАЗВИТИЯ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА НА ОСНОВЕ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПРОТЕОМИКИ ПЛАЗМЫ КРОВИ

А.С. Кононихин, Н.В. Захарова, А.Е. Бугрова, П.А. Стрельникова, А.Г. Бржозовский, М.И. Индейкина, Я.Б. Федорова, И.В. Колыхалов, В.А. Миткевич, А.А. Макаров, С.И. Гаврилова, Е.Н. Николаев

*Сколтех, Москва*

Болезнь Альцгеймера (БА) остается наиболее распространенной социально-значимой нейродегенеративной патологией, которая к 2050 году может затронуть более 115 миллионов человек. Разработка надежных методов ранней диагностики является одной из глобальных исследовательских задач, целью которой является выявление повышенного риска развития БА еще до возникновения необратимых когнитивных нарушений. На сегодняшний день для постановки диагноза БА облигатными остаются основные клинические критерии, такие как прогрессирующее ухудшение памяти и других когнитивных функций при отсутствии нарушений сознания и пр. МРТ и/или ПЭТ мозга и анализ протеоформ  $\beta$ -амилоида ( $A\beta$ ) и белка тау в спинномозговой жидкости (СМЖ) используют лишь для подтверждения диагноза и, кроме того, они могут выявлять риск развития БА на стадии мягкого когнитивного снижения (МКС), однако не являются эффективными для выявления риска БА на бессимптомной стадии, которая может длиться 10 и более лет до появления первых признаков когнитивного снижения. В отличие от СМЖ, кровь является традиционным объектом клинического анализа с минимально инвазивным способом сбора образцов. В рамках нашего исследования получены результаты количественного протеомного (MRM) анализа более 300 образцов нативной плазмы крови пациентов с МКС и БА, а также возрастной контрольной группы, для валидации порядка 100 потенциальных ранних маркеров БА и уточнения дифференцирующей панели для ее возможного клинического применения.

По результатам проведенных исследований предложена пилотная панель из 31 белка плазмы, количественный мониторинг которой может быть использован для оценки риска развития БА у пациентов с МКС. Разработанный классификатор может указывать на повышенный риск БА с 80% точностью 79,4% чувствительностью и 83,6% специфичностью. Кроме того, нами проводится глубокий протеомный полуколичественный анализ отдельных фракций плазмы крови на предмет поиска новых потенциальных маркеров БА/МКС и их включения в аналитический набор.

*Работа проводится в тесном сотрудничестве с ведущими специалистами в области гериатрической психиатрии (НЦПЗ, ПКБ №1 ДЗМ). Работа проводится при поддержке Минобрнауки (Соглашения № 075-15-2024-530 от «24» апреля 2024 г).*

## DEVELOPMENT OF A METHOD FOR EARLY PREDICTION OF THE RISK OF ALZHEIMER'S DISEASE BASED ON QUANTITATIVE PROTEOMICS OF BLOOD PLASMA

A.S. Kononikhin, N.V. Zakharova, A.E. Bugrova, P.A. Strelnikova, A.G. Brzhozovsky, M.I. Indeykina, Ya.B. Fedorova, I.V. Kolykhalov, V.A. Mitkevich, A.A. Makarov, S.I. GavriloVA, E.N. Nikolaev

*Skoltech, Moscow*

Alzheimer's disease (AD) remains the most common socially significant neurodegenerative pathology, which may affect more than 115 million people by 2050. The development of reliable methods for early diagnosis is one of the global research tasks, aimed to identify an increased risk of developing AD even before the onset of irreversible cognitive impairment. To date, the main clinical criteria, such as progressive deterioration of memory and other cognitive functions in the absence of impaired consciousness, remain obligate for the diagnosis of AD. MRI and/or PET of the brain and analysis of  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) proteoforms and tau protein in cerebrospinal fluid (CSF) are used only to confirm the diagnosis and can detect the risk of developing AD at the stage of mild cognitive impairment (MCI), but are not effective for detecting the risk of AD at the asymptomatic stage, which can last more than 10 years before the onset of the first signs of cognitive decline. In addition, the listed methods, due to their high cost or high invasiveness, have significant limitations for use in primary screening. Unlike CSF, blood is a conventional subject for clinical analysis with minimally invasive sampling. We perform a quantitative proteomic (MRM-MS) analysis of ~300 samples of native blood plasma from patients with MCI and AD, as well as in age control group, to validate about 100 potential early markers of AD and refine the differentiating panel for its possible clinical use.

Based on the results of the study, a pilot panel of 31 plasma proteins has been proposed, the quantitative monitoring of which can be used to assess the risk of AD in patients with MCI. The developed classifier can indicate an increased risk of AD with 80% accuracy, 79.4% sensitivity and 83.6% specificity. In addition, we are conducting a deep proteomic semi-quantitative analysis of individual fractions of blood plasma in order to search for new potential markers of AD/MCI.

*The work is carried out in close cooperation with leading experts in the field of geriatric psychiatry. The work is carried out with the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2024-530 dated April 24, 2024).*



**ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВЯЗИ МЕЖДУ ТРАНСКРИПЦИЕЙ, ТРАНСЛЯЦИЕЙ И ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫМИ МОДИФИКАЦИЯМИ ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА: ЗАПОЛНЕНИЕ ПРОБЕЛОВ С ПОМОЩЬЮ БОЛЬШИХ ПРОТЕОМНЫХ ДАННЫХ**

**И.А. Тарасова, М.Ю. Бражников, А.С. Копейкина, Д.Д. Емекеева**

*Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе ФИЦ ХФ РАН им. Н.Н. Семенова, Москва*

Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее распространенной формой деменции, поражающей миллионы людей. Прогнозируется, что это число будет ежегодно увеличиваться, что подчеркивает острую необходимость в новой терапии, ранней диагностике и профилактике заболевания. Хотя значительные усилия были вложены в изучение механизмов БА, молекулярные и структурные изменения, лежащие в основе ее патогенеза, представляют собой значительный пробел в знаниях. В частности, связи между транскрипцией, трансляцией и посттрансляционными модификациями (ПТМ) при БА остаются в значительной степени неизученными. Несмотря на важную роль альтернативного сплайсинга (АС), однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) и ПТМ, их изучение на уровне белков сталкивается со значительными трудностями. Методы масс-спектрометрии обеспечивают ограниченное покрытие последовательности белка и протеома. Дополнительное осложнение возникает естественным образом: половина известных изоформ АС может быть идентифицирована только по одному уникальному пептиду. Следующая интрига — это посттрансляционные модификации белков. В то время как разные ПТМ формируют сеть регуляторных взаимодействий, современные подходы обычно могут измерять один тип ПТМ. Чтобы преодолеть ограничения, можно использовать большие протеомные данные. В работе разработаны биоинформатические конвейеры, способствующие получению новых знаний о БА. Мы подтвердили трансляцию 1500 изоформ АС, аннотированных в SwissProt db, в посмертных тканях мозга БА и здоровых доноров, выявили дифференциальную экспрессию изоформ АС MAPT, CLU и т. д. Изоформы CLU-6, PLEC-8 и другие продукты АС, дифференциально регулируемые при БА, могут быть неактивными из-за потери сигнальных пептидов и функциональных доменов. Мы наблюдали tРНК-зависимые ошибки в трансляции белков CAMK2A/B/D/G, Na,K-АТФазы АТP1A1/2/3 и др. Это наблюдение может быть связано с нарушенной активностью ацетил-tРНК-синтетазы при старении и БА. Мы подтвердили трансляцию патогенных замен (GFAP N77D, NEFL N98D и т. д.); выявили разнообразный ландшафт ПТМ, различия в уровнях ПТМ при БА, 270 случаев конкуренции разных ПТМ за одну и ту же позицию в белке, и сильно модифицированные области белков, которые соответствуют регуляторным элементам.

*Исследование поддержано Российским научным фондом (23-45-00012).*

**CROSSTALK BETWEEN TRANSCRIPTION, TRANSLATION, AND POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS IN ALZHEIMER'S DISEASE: FILLING THE GAPS WITH BIG PROTEOMIC DATA**

**I.A. Tarasova, M.Yu. Brazhnikov, A.S. Kopeykina, D.D. Emekeeva**

*V.L. Talrose Institute for Energy Problems of Chemical Physics, N.N. Semenov Federal Research Center of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow*

Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent form of dementia, affecting millions of individuals. This number is projected to annual increase, highlighting the urgent need for new therapy, early diagnostics and prevention of the disease. While significant efforts have been invested in studying AD's mechanisms, the molecular and structural changes behind its pathogenesis represent a significant knowledge gap. In particular, the crosstalks between transcription, translation and post translational modifications (PTMs) in AD remain largely unexplored. Despite the critical role the alternative splicing (AS), single nucleotide polymorphisms (SNPs) and PTMs play, their study at the protein level faces significant challenges. Mass spectrometry methods suffer from limited coverage of protein sequence and proteome. An additional complication comes naturally: a half of known AS isoforms can only be identified by a single peptide from the alternatively spliced regions. Next intrigue is the interplay of PTMs. While PTMs influence each other, creating a network of regulatory interactions, current approaches can typically measure a single PTM type. To fix limitations, big proteomics data can be used. Here, we developed bioinformatic pipelines bringing new knowledge on AD. We confirmed translation of 1,500 AS isoforms annotated in the SwissProt db, in postmortem brain tissues of AD and healthy donors, and revealed differential expression of AS isoforms of MAPT, CLU, etc. CLU isoform 6, PLEC isoform 8 and other AS products differentially regulated in AD can be dysfunctional due to the loss of signal peptides and functional domains. We observed the tRNA-dependent mistranslation, affecting CAMK2A/B/D/G proteins, Na,K-ATPases АТP1A1/2/3, and other proteins linked to neurodevelopmental disorders (ND). This observation can be evidence of inactivity of acetyl tRNA synthetase in aging and ND. We confirmed the translation of some pathogenic substitutions (GFAP N77D, NEFL N98D, etc). We revealed a diverse PTM landscape, PTM levels differential in AD, 270 PTM competitions for the same position on a protein, and over-modified regions of proteins that correspond to regulatory elements.

*The study is supported by the Russian Science Foundation (23-45-00012).*

## ПРОТЕОМНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ПОИСКА БИОМАРКЕРОВ ПСИХИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ

Л.П. Смирнова, А.А. Серегин, Е.М. Дмитриева, М.Г. Завьялова, С.А. Иванова

НИИ психического здоровья Томского НИМЦ, Томск

В последнее время открываются новые подходы к диагностике психических расстройств: поиску их биомаркеров с помощью протеомного анализа. Биполярное аффективное расстройство (БАР) является одним из самых труднодиагностируемых психических расстройств и его диагноз выставляется в среднем через 10 лет после манифестации заболевания. Но до настоящего времени в мировой практике не выявлено ни одного специфического биомаркера БАР. В работе использовали сыворотку крови больных БАР, проходивших лечение в отделении аффективных состояний НИИ психического здоровья ТНИМЦ. Сыворотку очищали от мажорных белков аффинной хроматографией и разделяли 1D электрофорезом после трипсинолиза пептиды анализировали с помощью ВЭЖХ/масс-спектрометрии. Масс-спектрометрия была проведена Центром коллективного пользования «Передовая масс-спектрометрия» Сколковского института науки и технологий. Идентификация белков проводилась с использованием базы данных UniProtKB/Swiss-Prot ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) и поисковой машины Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). А также с помощью программного обеспечения MaxQuant и поисковой системе Andromeda. Было проведено сравнение результатов полученных с помощью разных поисковых машин. В результате идентификации белков с использованием поисковой системы Mascot было идентифицировано около 1600 белков у здоровых лиц и 1300 у больных БАР. Белки дифференциально экспрессируемые у больных БАР – это белки структурных элементов рецепторов, цитоскелета и мембран клеток, участвующих в регуляции синтеза ДНК и клеточного цикла, дифференцировке нервных клеток и процессах транспорта через клеточную мембрану. При этом ряд низкокопийных белков являлся нейроспецифичными белками. С помощью программного пакета MaxQuant было идентифицировано менее 1000 белков в каждой исследуемой группе. Дифференциально экспрессируемые белки больных БАР, были представлены белками, принимающими участие в регуляции транскрипции и дифференцировке соматических клеток, а также являются регуляторами широкого спектра сигнальных путей. Самой представленной функцией идентифицированных белков оказалась регуляция иммунного ответа. В основном идентифицированные белки являлись высококопийными белками, широко представленными в сыворотке крови.

*Исследование поддержано грантом РФФ № 23-75-00023.*

## PROTEOMIC TECHNOLOGIES FOR SEARCHING FOR MARKERS OF MENTAL DISORDERS

L.P. Smirnova, A.A. Seregin, E.M. Dmitrieva, M.G. Zavyalova, S.A. Ivanova

Research Institute of Mental Health, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk

Recently, new approaches to the diagnosis of mental disorders have been discovered: the search for their biomarkers using proteomic analysis. Bipolar affective disorder (BD) is one of the most difficult to diagnose mental disorders and its diagnosis is made on average 10 years after the manifestation of the disease. However, to date, no specific biomarker of BD has been identified in world practice. In this work, we used the blood serum of patients with BD who were treated in the Department of Affective States of the Mental Health Research Institute of the TNRMС. The serum was purified from major proteins by affinity chromatography and separated by 1D electrophoresis. After trypsinolysis, the peptides were analyzed using HPLC/mass spectrometry. Mass spectrometry was performed by the Center for Shared Use "Advanced Mass Spectrometry" of the Skolkovo Institute of Science and Technology. Protein identification was performed using the UniProtKB/Swiss-Prot database ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) and the Mascot search engine ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). MaxQuant software and the Andromeda search engine were also used. The results obtained using different search engines were compared. As a result of protein identification using the Mascot search engine, about 1600 proteins were identified in healthy individuals and 1300 in bipolar patients. Proteins differentially expressed in bipolar patients are proteins of the structural elements of receptors, the cytoskeleton, and cell membranes involved in the regulation of DNA synthesis and the cell cycle, differentiation of nerve cells, and transport processes across the cell membrane. A number of low-copy proteins were neuro-specific proteins. Using the MaxQuant software package, less than 1000 proteins were identified in each study group. Differentially expressed proteins of patients with bipolar disorder were represented by proteins involved in the regulation of transcription and differentiation of somatic cells, and are also regulators of a wide range of signaling pathways. The most represented function of the identified proteins was the regulation of the immune response. The identified proteins were mainly high-copy proteins, widely represented in the blood serum.

*The study was supported by the grant of the RSF No. 23-75-00023.*

## АНАЛИЗ ПРОТЕОМНЫХ ДАННЫХ ОБРАЗЦОВ МОЗГА В ЗАДАЧАХ ПОИСКА МИШЕНЕЙ И МЕХАНИЗМОВ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

**М.В. Иванов, А.С. Копейкина, М.В. Горшков**

*Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе ФИЦ ХФ РАН им. Н.Н. Семенова, Москва*

Протеомные исследования тканей мозга расширяют наши знания о механизмах заболеваний и позволяют найти мишени для лекарств при различных неврологических заболеваниях. Однако в этих исследованиях обычно используется ограниченное количество образцов и когорт пациентов из-за трудностей с посмертным получением образцов мозга. Отсутствие стандартизации в масс-спектрометрическом анализе из-за постоянного развития протеомике приводит к низкому сходству между публикуемыми данными и добавляет дополнительные трудности в исследованиях на основе анализа больших данных при комбинировании исследований. И даже когда технологические проблемы преодолены, стандартные методы анализа не фокусируются на обобщении наборов данных или когорт пациентов. В работе показываем, что методы на основе масс-спектров первого уровня могут обеспечить универсальное решение с эффективностью количественного анализа белков, аналогичной методам на основе масс-спектров фрагментации пептидов (МС/МС). Чтобы доказать нашу идею, мы использовали протеомные данные образцов мозга, связанных с болезнью множественной системной атрофии, которые были получены с помощью наиболее современного масс-спектрометра Orbitrap Astral. Среди результатов мы смогли обнаружить снижение каспазной активности для белка виментина в образцах множественной системной атрофии, пропущенные методами количественного анализа на основе МС/МС. Во второй части нашей работы мы представляем новый подход для машинного обучения, который регулировался с помощью добавленного нами параметра `min_cohorts_leaf`, что привело к лучшему обобщению обученных моделей между разными исследованиями. Разработанный подход был протестирован с использованием пяти опубликованных наборов данных ЖХ-МС/МС, полученных для более чем 500 образцов головного мозга в ходе крупных исследований болезни Альцгеймера. Используя предложенную модифицированную модель ExtraTrees, мы обнаружили, что экспрессия двух белков, участвующих в ферроптозе, серотрансферрина TRFE и нуклеазы/редокс-регулятора репарации ДНК APEX1, важна для объяснения отсутствия деменции у пациентов с наличием бета-амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков. *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (грант 23-45-00012).*

## ANALYSIS OF DATA FROM LARGE-SCALE BRAIN PROTEOMIC STUDIES TO REVEAL MARKERS AND MECHANISMS OF NEURODEGENERATIVE DISORDERS

**M.V. Ivanov, A.S. Kopeykina, M.V. Gorshkov**

*V.L. Talrose Institute for Energy Problems of Chemical Physics, N.N. Semenov Federal Research Center of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow*

Proteomics studies of postmortem human brains enhance our knowledge of disease mechanisms and identify drug targets for a variety of neurological diseases. However, those studies usually have a limited number of samples and cohorts due to difficulties in obtaining brain samples. A lack of standardization in proteomic data acquisition leads to low similarity across data sets and adds further difficulties to the biomarkers discovery based on big data analysis of combined studies. And even when technological issues are overcome, the standard analysis techniques do not focus on the generalization across data sets or patient cohorts. In the work, we argue that MS1-based methods can provide a universal solution with quantitation effectiveness similar to DDA/DIA methods. To prove our idea, we used the proteomic data for the brain samples related to the multiple system atrophy disease which were acquired using state-of-art Orbitrap Astral mass-spectrometer. Among the findings, we were able to detect decreased caspase activity for Vimentin protein in the multiple system atrophy samples missed by the MS/MS-based quantitation methods. In the second part of our work, we presented a machine learning-based workflow, which was regulated using a newly introduced parameter, `min_cohorts_leaf`, that resulted in better generalization of trained models. The developed workflow was tested using five published LC-MS/MS data sets obtained for more than 500 brain samples in the large consortia studies of Alzheimer's disease. Using the proposed modified ExtraTrees model we found that the expressions of two proteins involved in ferroptosis Serotransferrin TRFE and DNA repair nuclease/redox regulator APEX1, are important for explaining a lack of dementia for patients with the presence of neuritic plaques and neurofibrillary tangles.

*This work was performed with financial support from the Russian Science Foundation, grant no. 23-45-00012.*

### МУЛЬТИОМНЫЙ QR-КОД ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОНИТОРИНГА

**Е.А. Пономаренко, В.Г. Згода, А.В. Лисица, Т.О. Плешакова, Ю.Д. Иванов, Е.В. Ильгисонис, А.И. Арчаков**

*НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва*

В 2024 году исполняется 10 лет с момента начала проекта «Протеом человека». В протеомику и реализацию этого проекта были вложены огромные усилия, несмотря на это, список одобренных FDA к применению предиктивных биомаркеров на данный момент не содержит ни одного маркера, который был бы найден с использованием протеомных технологий и вошел в клиническую практику для предсказательной и ранней диагностики. Интеграция массивов постгеномных данных (транскриптомных, протеомных, трансляционных и метаболомных) и их картирование на биохимические пути, связанные с развитием заболеваний, является переосмыслением понятия «биомедицинская химия», исторически связанного с характеристикой структуры и свойств отдельных молекул, выделяемых из биоматериала. Такого рода информация может быть представлена в виде мультиомного QR-кода: результаты молекулярного профилирования одного и того же образца высокопроизводительными методами с использованием классических протоколов и методами высокочувствительного анализа объединяются методами биоинформатики и проецируются на метаболические пути. Сопряжение такого рода данных для одного образца с одной стороны увеличивает уровень шума, с другой – позволяет оценить степень технических и биологических потерь на разных уровнях реализации генома. В работе представлены результаты мультиомного анализа образцов здоровых людей и людей с диагностированными метаболическими и онкологическими заболеваниями. Показано, что высокочувствительные методы позволяют существенно обогатить молекулярный портрет нозологии за счет детекции биомакромолекул в концентрации до  $10^{-14}$ М, что на два порядка ниже результатов, полученных с использованием классических протеомных протоколов. Перспективой развития работы является расширение QR-кода за счет протеоформ – модифицированных вариантов белков. Данный цикл работ представляет новый подход в медицинской диагностике, обусловленный возможностью обнаружения в плазме крови и тканях единичных биомакромолекул. Раскрытие физиологических и патофизиологических функций таких ансамблей и получения первичных данных о факторах, влияющих на их активность, позволит разрабатывать новые препараты и персонализировано отслеживать изменения метаболических процессов человека.

*Работа поддержана грантом РФФИ (проект № 24-14-000006).*

### MULTIOMIC QR-CODE FOR PERSONAL HEALTH MOLECULAR MONITORING

**E.A. Ponomarenko, V.G. Zgoda, A.V. Lisitsa, T.O. Pleshakova, Yu.D. Ivanov, E.V. Ilgisonis, A.I. Archakov**

*Institute of Biomedical Chemistry*

This year marks the 10<sup>th</sup> anniversary of the Human Proteome Project (HPP). Huge efforts have been invested in proteomics and implementation of this project. However, the list of FDA-approved predictive biomarkers currently does not contain a single marker that would be found using proteomic technologies and entered clinical practice for prediction and early diagnosis. The term "biomedical chemistry" was historically linked to the analysis of the composition and characteristics of single molecules extracted from biomaterials. A new interpretation of this term involves the integration of various postgenomic data sets, such as transcriptomic, proteomic, translational, and metabolomic data, and their correlation with biochemical pathways linked to the onset of diseases. This kind of information can be presented in the form of a Multiomic QR-code: the results of molecular profiling of the same sample using high-performance techniques with classical protocols and highly sensitive analytical methods are combined using bioinformatics techniques and projected onto metabolic pathways. While such an approach increases the noise level, it also allows us to evaluate the extent of biological and technical losses at various genome implementation stages. This work presents the results of a multiomic analysis of samples from healthy individuals and those with diagnosed metabolic and oncological conditions. It is shown that highly sensitive approaches can significantly enrich the nosology molecular portrait by detecting biomacromolecules in concentrations up to  $10^{-14}$ М, which is two orders of magnitude lower than the results obtained using classical proteomic protocols. The potential for the development of this work lies in the expansion of QR codes through the use of proteoforms, which are the modified versions of proteins. This is a novel approach to medical diagnostics, due to the potential for detecting individual biomacromolecules. Revealing the physiological and pathophysiological functions of these ensembles and obtaining primary data on the factors influencing their activity will make it possible to develop new drugs and monitor changes in human metabolic processes in a personalized manner.

*The work supported by RSF (grant № 24-14-000006).*

## ПРОТЕОМ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В КОСМИЧЕСКОМ ПОЛЕТЕ

**И.М. Ларина, О.И. Орлов, Е.Н. Николаев**

<sup>1</sup>ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН; <sup>2</sup>Центр передовых масс-спектрометрических технологий, Сколтех, Москва

Для успешного освоения ближнего космического пространства, строительства инопланетных баз и исследования планет Солнечной системы необходимо заполнить пробелы в понимании молекулярных механизмов ответа организма человека на условия космического полета (КП). В перспективе это даст возможность открытия потенциальных молекулярных мишеней для защиты от неблагоприятных процессов в организме под действием условий КП. Оценку влияния 6-месячного космического полета на протеом образцов высушенных пятен крови космонавтов выполнили в хромато-масс-спектрометрическом анализе. Использованы панорамный и таргетный методы, с применением изотопно-меченых пептидов метаболической панели.

Панорамный анализ экстрактов сухих пятен, полученных от 13 российских космонавтов в ходе космического эксперимента ОМИКи-СПК позволил выявить около 700 различных белков. Образцы капиллярной крови были собраны перед полетом, во время полета (на 5-7 сутки, через 3 мес и 6 мес полета для участников полугодовых экспедиций и для участников годовых экспедиций – через 12 мес полета), а также после полета (на 1, 7, 14 и 26 сутки после приземления). На основе результатов панорамного анализа выявлены процессы высоко- и в средней степени обогащенные белками. Среди них определены процессы с достоверной динамикой: это кластеры процессов энергетике, презентации молекул на мембране, инициации иммунной защиты, протеостаза и метаболизма.

Целевая протеомика на основе масс-спектрометрии с анализом внутренних пептидных стандартов, меченных стабильными изотопами (SIS) была выбрана в качестве надежного и точного инструмента для количественного анализа. В таргетном анализе количественно изучено содержание в экстрактах пятен 97 белков. Контекстный анализ выявленных изменений в концентрации белков показал, с какими функциями и медицинскими рисками связаны эти изменения в основных физиологических системах. Различный характер динамических изменений или их отсутствие (при дискретных изменениях уровней белков) предопределяет характер медицинских рисков, проявление которых наиболее вероятно в остром периоде приспособления (на первой неделе полета), в его середине или на заключительном этапе, в период подготовки к посадке, или в периоде реадaptации после КП.

## HUMAN BLOOD PROTEOME IN SPACE FLIGHT

**I.M. Larina, O.I. Orlov, E.N. Nikolaev**

<sup>1</sup>SSC RF – Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences; <sup>2</sup>Advanced Mass Spectrometry Core Facility, Skoltech, Moscow

For successful exploration of near space, construction of alien bases and exploration of the planets of the Solar System, it is necessary to fill the gaps in understanding the molecular mechanisms of the human body's response to space flight (SF) conditions. In the future, this will enable the discovery of potential molecular targets for protection against adverse processes in the body under the influence of space flight conditions. The impact of a 6-month space flight on the proteome of dried blood spot samples from astronauts was assessed using chromatograph mass spectrometry analysis. Panoramic and targeted methods using isotope-labeled peptides of the metabolic panel were used.

Panoramic analysis of dry spot extracts obtained from 13 Russian cosmonauts during the OMICs-DBS space experiment revealed about 700 different proteins. Capillary blood samples were collected before the flight, during the flight (on days 5-7, after 3 and 6 months and 12 months for a year-long flight), and after the flight (on days 1, 7, 14 and 26 after landing). Based on the results of the panoramic analysis, processes highly and moderately enriched in proteins were identified. Among them, processes with reliable dynamics were identified: these are clusters of energy processes, presentation of molecules on the membrane, initiation of immune defense, proteostasis and metabolism.

Targeted proteomics based on mass spectrometry with analysis of internal peptide standards labeled with stable isotopes (SIS) was chosen as a reliable and accurate tool for quantitative analysis. In a targeted analysis, the content of 97 proteins in blood spot extracts was quantitatively studied. A contextual analysis of the detected changes in protein concentrations showed the functions and medical risks associated with these changes in the main physiological systems. The different nature of dynamic changes or their absence (with discrete changes in protein levels) predetermines the nature of medical risks, the manifestation of which is most likely in the acute period of adaptation (in the first week of the flight), in its middle or final stage, during the period of preparation for landing, or in the period of readaptation after the space flight.

## ВЛИЯНИЕ ПЕРВИЧНОГО И ВТОРИЧНОГО СТАРЕНИЯ НА ТРАНСКРИПТОМ И ПРОТЕОМ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ ЧЕЛОВЕКА

Д.В. Попов, Н.С. Курочкина, М.А. Орлова, М.А. Виговский, В.Г. Згода, Т.Ф. Вепхвадзе, Н.Э. Вавилов, П.А. Махновский, О.А. Григорьева, Ю.Р. Бородай, В.В. Филиппов, Е.М. Леднев, А.Ю. Ефименко

*Институт медико-биологических проблем РАН, Москва*

Оценка роли первичного и вторичного старения в проявление молекулярных и клеточных признаков старения является сложной и в настоящее время нерешенной задачей. В нашем исследовании мы впервые исследовали влияние первичного старения и хронического воспаления/гипокинезии – наиболее важных факторов вторичного старения – на транскриптомный и протеомный профили скелетной мышцы человека. Для этого в исследование были включены молодые здоровые люди (n=15), молодые (n=8) и пожилые (n=37) пациенты с артрозом коленного/тазобедренного сустава – модель для изучения влияния хронического воспаления и гипокинезии на наружную головку четырехглавой мышцы бедра. Было обнаружено, что масштабные и выраженные возрастные изменения экспрессии генов у пожилых пациентов, относительно молодых здоровых людей, (~4000 генов, регулирующих функцию митохондрий, протеостаз, клеточные мембраны, секреторный и иммунный ответ) были связаны с влиянием длительной гипокинезии и хронического воспаления, а не с первичным старением. Первичное старение, в основном, влияло на гены (~200), кодирующие ядерные белки (регуляторы репарации ДНК, сплайсинга и транскрипции), митохондриальные белки (гены, кодирующие дыхательные ферменты, факторы сборки митохондриальных комплексов, регуляторы формирования крист и продукции активных форм кислорода в митохондриях) и протеостаза. Было обнаружено, что белки, связанные с влиянием старения, регулируются в основном на посттранскрипционном уровне. Набор генов, ассоциированных с влиянием первичного старения, может быть использован в качестве ресурса для дальнейших целевых исследований, изучающих роль отдельных генов и связанных с ними факторов транскрипции при возникновении сенесцентного фенотипа клеток.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 21-15-00405 и Государственного задания Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.*

## EFFECT OF PRIMARY AND SECONDARY AGING ON THE TRANSCRIPTOME AND PROTEOME OF HUMAN SKELETAL MUSCLE

D.V. Popov, N.S. Kurochkina, M.A. Orlova, M.A. Vigovskiy, V.G. Zgoda, T.F. Vepkhvadze, N.E. Vavilov, P.A. Makhnovskii, O.A. Grigorieva, Y.R. Boroday, V.V. Philippov, E.M. Lednev, A.Yu. Efimenko

*Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow*

Evaluation of the influence of primary and secondary aging on the manifestation of molecular and cellular hallmarks of aging is a challenging and currently unresolved issue. Our study represents the first demonstration of the distinct role of primary aging and chronic inflammation/physical inactivity – the most important drivers of secondary aging, in the regulation of transcriptomic and proteomic profiles in human skeletal muscle. To achieve this purpose, young healthy people (n=15), young (n=8) and older (n=37) patients with knee/hip osteoarthritis, a model to study the effect of long-term inactivity and chronic inflammation on the vastus lateralis muscle, were included in the study. It was revealed that widespread and substantial age-related changes in gene expression in older patients relative to young healthy people (~4,000 genes regulating mitochondrial function, proteostasis, cell membrane, secretory and immune response) were related to the long-term physical inactivity and chronic inflammation rather than primary aging. Primary aging contributed mainly to the regulation of genes (~200) encoding nuclear proteins (regulators of DNA repair, RNA processing, and transcription), mitochondrial proteins (genes encoding respiratory enzymes, mitochondrial complex assembly factors, regulators of cristae formation and mitochondrial reactive oxygen species production), as well as regulators of proteostasis. It was found that proteins associated with aging were regulated mainly at the post-transcriptional level. The set of putative primary aging genes can be used as a resource for further targeted studies investigating the role of individual genes and related transcription factors in the emergence of a senescent cell phenotype.

*This research was funded by the Russian Science Foundation grant No. 21-15-00405 and State Assignment of Lomonosov Moscow State University.*

## ТРАНСКРИПТОМНО-ПРОТЕОМНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С АДАПТАЦИЕЙ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ ЧЕЛОВЕКА К ОДНОКРАТНОЙ И РЕГУЛЯРНОЙ СИЛОВОЙ ТРЕНИРОВКЕ

Е.М. Леднев, Т.Ф. Вепхвадзе, И.П. Смирнов, Р.И. Султанов, Н.С. Курочкина, Д.В. Попов, Э.В. Генерозов  
ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва

Скелетные мышцы человека обладают высокой пластичностью, проявляющейся в способности к изменению морфофункциональных свойств в ответ на сократительную активность. Силовые тренировки приводят к увеличению размеров мышечных волокон, развитию и максимальной силы и сопровождаются выраженным синтезом белков. Регуляция таких изменений на транскриптомном и протеомном уровне остается недостаточно изученной.

В работе анализировали изменения протеомного и транскриптомного профиля скелетной мышцы, морфометрических показателей мышечных волокон до и после 12-недельных силовых тренировок. Также оценивалось изменения транскриптома после однократной силовой нагрузки. В исследовании приняли участие 10 мужчин (средний возраст 23 года), которые в течение 12 недель выполняли силовые тренировки мышц-разгибателей ног. До и после тренировочного периода, а также через 8 и 24 часа после однократной силовой нагрузки, у участников брали биопсии латеральной головки четырехглавой мышцы бедра для иммуногистохимического, протеомного (ВЭЖХ-МС/МС) и транскриптомного (РНК-секвенирование) анализа.

Было показано, что 12-недельная силовая тренировка привела к значительному увеличению максимальной произвольной силы (19%), объема четырехглавой мышцы бедра (12%) и площади поперечного сечения волокон 2-го (быстрого) типа (29%). После тренировочного периода наблюдалось изменение содержания 1174 белков, из которых 24 увеличили своё количество, а 83 – понизили. На транскриптомном уровне изменения выражались в росте экспрессии для 142 и уменьшении для 65 из 12112 детектированных мРНК. При этом изменение лишь малой доли белков (8,5%) коррелировало с изменениями соответствующих мРНК. Транскриптомный ответ на однократную силовую нагрузку показал, что через 8 и 24 часа после упражнения изменилось содержание 433 мРНК и 639 мРНК, соответственно. Суммарно, проведенный анализ показал, что 12-недельная силовая тренировка оказала слабое влияние на относительное содержание высокопредставленных белков в мышце, а прирост мышечной массы может быть объяснен одинаковыми изменениями скорости синтеза/деградации детектированных белков. В свою очередь, изменение их содержания возможно регулируется на посттранскрипционном уровне.

*Работа выполнена при поддержке РФФ, грант № 24-15-00413 «Оценка средовых и молекулярно-генетических факторов, влияющих на динамику долгосрочных и краткосрочных изменений фенотипа волокон скелетной мышцы и состава тела человека с учетом параметров физической активности».*

## TRANSCRIPTOMIC AND PROTEOMIC CHANGES ASSOCIATED WITH THE ADAPTATION OF HUMAN SKELETAL MUSCLE TO ACUTE AND REGULAR RESISTANCE TRAINING

Е.М. Lednev, T.F. Vepkhvadze, I.P. Smirnov, R.I. Sultanov, N.S. Kurochkina, D.V. Popov, E.V. Generozov  
Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of FMBA, Moscow

Human skeletal muscles possess a high degree of plasticity, which is manifested in their ability to change morphofunctional properties in response to contractile activity. Resistance training leads to an increase in muscle fiber size, development of maximal strength, and is accompanied by significant protein synthesis. However, the regulation of such changes at the transcriptomic and proteomic levels remains insufficiently studied.

This study aimed to assess the changes in the proteomic and transcriptomic profiles of skeletal muscle and the morphometric parameters of muscle fibers before and after a 12-week resistance training program. The study also evaluated transcriptomic changes following an acute resistance exercise. Ten men (average age 23 years) participated in the study, performing resistance training of the leg extensors over 12 weeks. Biopsies of the lateral head of the quadriceps femoris muscle were taken before and after the training period, as well as 8 and 24 hours after a single resistance exercise, for immunohistochemical, proteomic (HPLC-MS/MS), and transcriptomic (RNA sequencing) analyses.

It was shown that the 12-week resistance training led to a significant increase in maximal voluntary strength (19%), quadriceps femoris muscle volume (12%), and cross-sectional area of type 2 (fast) fibers (29%). After the training period, the content of 1174 proteins changed, with 24 increasing and 83 decreasing. At the transcriptomic level, changes were observed in the expression of 142 mRNAs, which increased, and 65 mRNAs, which decreased out of 12,112 detected mRNAs. However, changes in only a small proportion of proteins (8.5%) correlated with changes in the corresponding mRNAs. The transcriptomic response to a single resistance exercise showed that the content of 433 mRNAs changed after 8 hours, and 639 mRNAs after 24 hours. Excluding the contralateral (inactive) muscle from the analysis allowed the identification of genes associated solely with contractile activity, eliminating changes due to systemic factors. Overall, the analysis showed that the 12-week resistance training had a minimal effect on the relative content of highly abundant proteins in the muscle, and the increase in muscle mass may be explained by uniform changes in the synthesis/degradation rates of detected proteins.

*Study was supported by a grant from the Russian Science Foundation (grant No. 24-15-00413: "Evaluation of environmental and molecular genetic factors influencing long-term and short-term changes in human skeletal muscle fiber phenotype and body composition with regard to physical activity parameters).*

## ТЕХНОЛОГИЯ ГИДРОГЕЛЕВЫХ БИОЧИПОВ ДЛЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО АНАЛИЗА ДНК- И БЕЛКОВЫХ МАРКЕРОВ СОЦИАЛЬНО-ЗНАЧИМЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Д.А. Грядунов, А.Ю. Иконникова, Е.Н. Савватеева, М.А. Филиппова, О.В. Антонова, М.А. Емельянова, Е.Д. Федосеева, А.И. Уштанит, И.Д. Кандинов, Д.В. Кравцов, Б.Л. Шаскольский, Д.В. Зименков, А.В. Чудинов, А.С. Заседателев

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

Целью работы является развитие технологии биочипов ИМБ РАН для многопараметрического анализа биомаркеров социально значимых заболеваний, разработка и внедрение в лабораторную диагностику медицинских изделий на основе биочипов. Ключевым отличием технологии биочипов ИМБ РАН является иммобилизация молекулярных зондов в трехмерных элементах гидрогеля либо в гидрофильных ячейках, состоящих из протяженных разветвленных линкеров, объемом 0,1 нл, ковалентно закрепленных на плоской подложке. Одновременно проводимые в каждом из элементов биочипа реакции гибридизации или амплификации нуклеиновых кислот обеспечивают параллельную идентификацию множества геномных мишеней, реализуя принцип многопараметрического анализа.

Предложены подходы к одновременному анализу десятков локусов геномов с высокой аналитической чувствительностью, в том числе, за счет синтеза новых красителей и оптимизации флуоресцентного маркирования. Выявление иммуноглобулинов в сыворотке крови обеспечивается как иммобилизацией различных антигенов, так и комбинацией флуорофоров для детектирующих антивидовых антител. Регистрацию сигналов элементов биочипов проводят с использованием универсального аппаратно-программного комплекса, обеспечивающего измерение интенсивности флуоресценции при длинах волн от 380 до 850 нм с точностью  $\pm 5\%$ . Разработаны и внедрены в медицинскую практику методы идентификации ДНК инфекционных возбудителей с одновременным генотипированием и установлением генетических детерминант, ассоциированных с ответом на антибактериальную либо противовирусную терапию. Совместно с ПКБ № 1 им. Н.А. Алексеева создан и проходит регистрацию в Росздравнадзоре набор реагентов для анализа генетических маркеров полигенного риска развития болезни Альцгеймера. Исследования на белковых биочипах сфокусированы на аллергических и аутоиммунных заболеваниях. Совместно с НМИЦ эндокринологии Минздрава России создан метод одновременного выявления органоспецифических и антицитокиновых аутоантител, ассоциированных с развитием аутоиммунных полиглангулярных синдромов и ряда коморбидных заболеваний.

*При поддержке Фонда научно-технологического развития Югры, Соглашение № 2023-571-05/2023.*

## HYDROGEL MICROARRAY TECHNOLOGY FOR MULTIPLEX ANALYSIS OF DNA AND PROTEIN MARKERS OF SOCIALLY SIGNIFICANT DISEASES

Д.А. Gryadunov, А.Ю. Ikonnikova, Е.Н. Savvateeva, М.А. Filippova, О.В. Antonova, М.А. Emelyanova, Е.Д. Fedoseeva, А.И. Ustanit, И.Д. Kandinov, Д.В. Kravtsov, Б.Л. Shaskolskiy, Д.В. Zimenkov, А.В. Chudinov, А.С. Zasedatelev

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow*

The objective of this research is to advance the EIMB microarray technology for the multiparametric analysis of biomarkers associated with socially significant diseases. Additionally, this project aims to facilitate the development and integration of microarray-based diagnostic kits. The distinguishing feature of the EIMB microarrays is the immobilization of molecular probes in 0.1 nL volume three-dimensional hydrogel elements or in hydrophilic cells comprising extended branched linkers, which are covalently fixed on a flat substrate. Hybridization or amplification of nucleic acids conducted in each of the microarray elements facilitate the parallel identification of multiple genomic targets. The synthesis of novel fluorescent dyes and the optimization of fluorescent labeling have enabled the achievement of high analytical sensitivity for the simultaneous analysis of dozens of genomic loci. The detection of immunoglobulins in serum on microarrays is achieved through the immobilization of different antigens and the combination of fluorophores using the detection with secondary antibodies. The registration of signals from microarray elements is conducted using a universal fluorescence analyzer that enables the measurement of fluorescence intensity at wavelengths ranging from 380 to 850 nm with an accuracy of  $\pm 5\%$ . Novel microarray-based assays for DNA identification of infectious agents with simultaneous genotyping and analysis of genetic determinants associated with the response to antibacterial or antiviral therapy have been developed and introduced into medical practice. In collaboration with the Mental Health Clinic No. 1 named after N.A. Alekseev, a diagnostic kit for identification of markers associated with the polygenic risk of Alzheimer's disease has been developed and is currently undergoing registration with Federal Service for Surveillance in Healthcare. The research on protein microarrays has focused on the potential applications in the diagnostics of allergic and autoimmune diseases. A method of simultaneous detection of organ-specific and anti-cytokine autoantibodies associated with autoimmune polyglandular syndromes and a number of comorbid diseases was developed in collaboration with the Endocrinology Research Center.

*This work was supported by the Foundation for Scientific and Technological Development of Yugra, Agreement No. 2023-571-05/2023.*



#### ГЛИКОЭРРЕЙ: ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ

**Н.В. Шилова, С.М. Полякова, А.Ю. Нокель, А.Д. Липатников, Б.И. Карамов, Н.В. Бовин**

*ГНЦ РФ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*

Углеводы (гликаны) играют важную роль в интерактоме как микро-, так и макроорганизмов, обеспечивая взаимодействия различных уровней: лиганд-рецептор, антиген-антитело, клетка-клетка, чутко реагируя на изменения как внутри клетки, так и в окружающей среде. С помощью методов структурного анализа многие углеводные структуры различных живых организмов (гликом) расшифрованы, а с помощью химических и химико-ферментативных методов – получены в индивидуальном состоянии. Массив гликанов – гликоэррей – иммобилизуют либо на поверхности подложки (гликочип), либо микросфер (суспензионный эррей). На текущий момент существуют эрреи, содержащие сотни (до 700) различных углеводных лигандов - коровых и терминальных фрагментов N- и O-цепей гликопротеинов, гликолипидов, полисахаридов бактерий и клеточных стенок растений и их фрагментов. С момента создания (более 20 лет назад) гликоэррей занял прочное положение среди основных инструментов в гликобиологии. Изучение углевод-углеводных, углевод-белковых взаимодействий как на молекулярном, субмолекулярном, так и на клеточном уровнях (вирусы, бактерии, клетки тканей) с помощью гликоэрреев позволяет получать фундаментальные знания о качественных и количественных характеристиках таких взаимосвязей, а также провоцирует привлекать другие физико-химические методы и инструменты для их углубления. Гликом клетки млекопитающих является индикатором ее состояния – нарушения в биосинтезе гликанов, активность экзогенных и эндогенных гликозидаз, являющихся следствием как внутренних поломок клетки, так и воздействия внешних факторов, приводит к появлению так называемых образов опасности, которые распознаются антителами. На основе анализа различий в профилях антител, детектируемых с помощью гликоэррея (анти-гликом) в норме и при патологии, развиваются новые подходы в диагностике различных, в первую очередь, системных заболеваний (онкология, аутоиммунные заболевания), основанные на использовании сигнатур, т.е. комбинаций диагностически значимых антител, призванных нивелировать гетерогенность паталогически измененных клеток, например, в составе опухоли.

Таким образом, получаемые с помощью гликоэррея данные являются важной составляющей в исследовании динамических взаимосвязей между гликомом, протеомом и другими «омами» в биологических системах.

#### GLYCOARRAY: FUNDAMENTAL AND PRACTICAL ASPECTS OF ITS APPLICATION

**N.V. Shilova, S.M. Polykova, A.Yu. Nokel, A.D. Lipatnikov, B.I. Karamov, N.V. Bovin**

*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow*

Carbohydrates (glycans) play an important role in the interactome of both micro- and macroorganisms, providing interactions at various levels: ligand-receptor, antigen-antibody, cell-cell, sensitively responding to changes both within the cell and in the environment. Using structural analysis methods, many glycan structures of various living organisms (glycome) have been deciphered, and using chemical and chemical-enzymatic methods, they have been obtained in an individual state. An array of the glycans – glycoarrays – is immobilized either on the surface of a slide (glycochip) or microspheres (suspension array). Currently, there are arrays containing hundreds (up to 700) of various ligands – core and terminal fragments of N- and O-chains of glycoproteins, glycolipids, bacterial and plant cell walls polysaccharides as well as their fragments. Since its creation (more than 20 years ago), glycoarrays have taken a strong position among the main tools in glycobiology. The study of glycan-glycan, glycan-protein interactions at both the molecular, submolecular and cellular levels (viruses, bacteria, tissue cells) using glycoarrays allows us to obtain fundamental knowledge about the qualitative and quantitative characteristics of such relationships, and also provokes the use of other physicochemical methods and tools to deepen them. The glycome of a mammalian cell is an indicator of its status - disturbances in the biosynthesis of glycans, the activity of exogenous and endogenous glycosidases, which are the result of both internal cell breakages and the impact of external factors, leads to the appearance of damage-associated molecular patterns that are recognized by antibodies. Based on the analysis of differences in the profiles of antibodies detected by glycoarray (anti-glycome) in norma and pathology, new approaches are being developed in the diagnosis of various systemic diseases (oncology, autoimmune diseases), based on the signatures, i.e. combinations of diagnostically significant antibodies designed to level off the heterogeneity of pathologically altered cells, for example, in a tumor.

Thus, the data obtained by glycoarray are an important component in the study of dynamic relationships between the glycome, proteome and other "omes" in biological systems.

#### НАНОПОРОВОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Ю.Д. Иванов<sup>1</sup>, А.Н. Аблеев<sup>1</sup>, А.В. Виноградова<sup>1</sup>, Е.Д. Неvedрова<sup>1</sup>, И.Д. Шумов<sup>1</sup>, В.С. Зиборов<sup>2</sup>, Н.В. Ваулин<sup>3</sup>,  
Д.В. Лебедев<sup>3</sup>, А.С. Букатин<sup>3</sup>, И.С. Мухин<sup>3</sup>, А.И. Арчаков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва; <sup>2</sup>Объединенный институт высоких температур РАН, Москва;

<sup>3</sup>Академический университет им. Ж.И. Алферова, Санкт-Петербург; <sup>4</sup>Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург; <sup>5</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург; <sup>6</sup>Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург

Исследование единичных молекул ферментов представляет важную задачу, для решения которой создаются новые технологии, к которым относится нанопоровое детектирование. Этот подход основан на регистрации сигнала от единичной макромолекулы фермента, встроенной в нанопору, размером несколько меньше размера этой макромолекулы. Нанопора в свою очередь разделяет цис- и транс-камеры, между которыми приложено напряжение, что позволяет регистрировать ток, проходящий через нанопору, во время функционирования фермента. Во время функционирования фермента происходит изменение формы фермента, что вызывает изменение тока, проходящего через нанопору со встроенным в нее ферментом.

С помощью такой системы было проведено детектирование в реальном времени функционирования двух гемсодержащих ферментативных систем – пероксидазы хрена и цитохрома P450 BM3. Для иммобилизации этих ферментов в нанопоре были изготовлены твердотельные нанопоры размером около 5 нм. Мониторинг каталитической активности этих ферментов был проведен путем регистрации ионного тока, протекающего через пору во время их функционирования. Было получено, что при наличии в цис- камере субстрата и перекиси водорода во время функционирования пероксидазы хрена наблюдались импульсы тока, которые свидетельствовали о ее активности. Также, было проведено детектирование активности молекулы P450 BM3 с помощью такого нанопорового детектора при гидроксировании лауриновой кислоты в присутствии донора электронов NADPH. При этом наблюдались импульсы тока, проходящего от цис- к транс-камере. Контрольные эксперименты, проведенные в отсутствие донора электронов, не показали таких импульсов тока.

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

#### NANOPORE DETECTION OF ENZYME ACTIVITY

Yu.D. Ivanov<sup>1</sup>, A.N. Ableev<sup>1</sup>, A.V. Vinogradova<sup>1</sup>, E.D. Nevedrova<sup>1</sup>, I.D. Shumov<sup>1</sup>, V.S. Ziborov<sup>2</sup>, N.V. Vaulin<sup>3</sup>, D.V. Lebedev<sup>3</sup>,  
A.S. Bukatin<sup>3</sup>, I.S. Mukhin<sup>3</sup>, A.I. Archakov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Chemistry, Moscow; <sup>2</sup>Joint Institute for High Temperatures, Russian Academy of Sciences, Moscow;

<sup>3</sup>St Petersburg Academic University, St Petersburg; <sup>4</sup>Institute for Analytical Instrumentation, Russian Academy of Sciences, St Petersburg; <sup>5</sup>St Petersburg State University, St Petersburg; <sup>6</sup>Peter the Great Polytechnic University, St Petersburg

The study of single enzyme molecules is an important task for which new technologies are being created which include nanopore detection. This approach is based on the registration of a signal from a single enzyme macromolecule embedded in a nanopore that is slightly smaller than the size of this macromolecule. The nanopore in turn separates the cis- and trans- chambers between which a voltage is applied which allows recording the current passing through the nanopore during the functioning of the enzyme. During the functioning of the enzyme the shape of the enzyme is changed which causes a change in the current passing through the nanopore with the enzyme embedded in it.

By using such a system, the real-time detection of the functioning of two heme-containing enzymatic systems - horseradish peroxidase and cytochrome P450 BM3 was carried out. Solid-state nanopores of about 5 nm in size were manufactured to immobilize these enzymes in a nanopore. The catalytic activity of these enzymes was monitored by recording the ion current flowing through the pore during their operation. It was found that in the presence of a substrate and hydrogen peroxide in the cis- chamber current pulses were observed during the operation of horseradish peroxidase which indicated its activity. Also the activity of the P450 BM3 molecule was detected using such a nanopore detector during hydroxylation of lauric acid in the presence of an electron donor NADPH. At the same time pulses of current passing from the cis- to the trans- chamber were observed. Control experiments conducted in the absence of an electron donor did not show such current pulses.

*The work was performed within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021-2030) (№122030100168-2).*

## КЛИНИЧЕСКАЯ МЕТАБОЛОМИКА: ТЕКУЩЕЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ В РОССИИ

**П.Г. Лохов, Е.Е. Балашова, О.П. Трифонова, Д.Л. Маслов, А.И. Арчаков**

*НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва*

Омиксные науки позволяют измерять все разнообразие молекул в незначительном количестве биологического материала. Представленная среди них метаболомика может использоваться для одновременного измерения тысяч низкомолекулярных веществ всего в нескольких микролитрах крови. Такая аналитическая эффективность крайне привлекательна для клинко-лабораторной диагностики, которая до сих пор оперирует измерением лишь отдельных клинически значимых веществ или их малочисленных групп. К сожалению, внедрение метаболомных технологий в клиническую практику затруднено и происходит крайне медленно. В докладе освещены объективные трудности, связанные с этим процессом, а также текущая ситуация в России с внедрением метаболомики в клиническую практику. Сделан акцент на наиболее успешные работы, ведущиеся в этом направлении, в том числе Институтом биомедицинской химии (ИБМХ), который консолидируя усилия ведущих научных и медицинских организаций, добился успехов, разработав клиническую метабограмму крови (КМК). Являясь адаптированным под клинко-лабораторную практику способом измерения низкомолекулярных веществ (метаболома) крови, КМК позволяет получить обзорную информацию по состоянию организма с детализацией индивидуальных метаболических характеристик пациента. В ряде научных исследований было показано, что на основе сигнатур (паттернов), формируемых КМК, можно осуществлять диагностику и контроль лечения многих заболеваний. Были описаны сигнатуры КМК для таких распространенных в популяции заболеваний, как ожирение, сахарный диабет, болезнь Паркинсона, рак почки. Список сигнатур постоянно пополняется, что делает диагностические возможности КМК перманентно нарастающими. На сегодняшний день создание КМК во многом определяет текущее состояние и перспективы клинической метаболомики в России. Помимо обзора этих достижений с представлением перспектив их внедрения в клиническую практику, в докладе представлены доступные формы и правовые основы применения метаболомики в медицинском секторе России.

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

## CLINICAL METABOLOMICS: CURRENT STATE AND PROSPECTS IN RUSSIA

**P.G. Lokhov, E.E. Balashova, O.P. Trifonova, D.L. Maslov, A.I. Archakov**

*Institute of Biomedical Chemistry, Moscow*

Omics sciences make it possible to measure the full diversity of molecules in small amounts of biological samples. Presented among them, metabolomics can be used to simultaneously measure thousands of low-molecular substances in just a few microliters of blood. Such analytical efficiency is extremely attractive for clinical laboratory diagnostics, which currently only measure individual clinically significant substances or small groups of them. Unfortunately, the introduction of metabolomics technologies into clinical practice is difficult and occurs extremely slowly. The report highlights the objective difficulties associated with this process, as well as the current state in Russia with the introduction of metabolomics into clinical practice. Emphasis is placed on the most successful work being conducted in this direction, including by the Institute of Biomedical Chemistry (IBMC), which, consolidating the efforts of leading scientific and medical organizations, has achieved success by developing a clinical blood metabogram (CBM). Being a method for measuring low-molecular substances (metabolome) in blood, adapted for clinical laboratory practice, CBM allows one to obtain an overview of the body state with details of the individual metabolic characteristics of the patient. Several scientific studies showed that based on signatures (patterns) formed by CBM, it is possible to diagnose and monitor the treatment of many diseases. CBM signatures were described for such common diseases in the population as obesity, diabetes mellitus, Parkinson's disease, and kidney cancer. The list of signatures is constantly updated, which makes the diagnostic capabilities of the CBM permanently increasing. Today, the development of CBM largely determines the current state and prospects of clinical metabolomics in Russia. In addition to reviewing these achievements and presenting prospects for their implementation in clinical practice, the report presents the available forms and legal framework for the use of metabolomics in the Russian healthcare system.

*The work was performed within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021-2030) (№122030100168-2).*

## СИСТЕМЫ ПОДДЕРЖКИ ПРИНЯТИЯ ВРАЧЕБНЫХ РЕШЕНИЙ НА ОСНОВЕ ЦЕЛЕВЫХ МЕТАБОЛОМНЫХ ДАННЫХ И МЕТОДОВ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ: МИФ ИЛИ РЕАЛЬНОСТЬ?

**С.А. Апполонова, Н.Е. Москалева, М.В. Савицкий, К.М. Шестакова**

*Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва*

Системы поддержки принятия врачебных решений (СППВР), основанные на метаболомных данных и методах машинного обучения (ML), становятся все более важным инструментом в современной медицине. СППВР, основанные на машинном обучении и метаболомных данных, уже показывают свою эффективность в клинической практике, так нами было показано, что данная система способна диагностировать такие заболевания как сердечно-сосудистые и онкология, дифференцировать заболевания внутри одной патологии. Проводить мониторинг эффективности лечения ревматоидного артрита, множественной миеломы и лимфомы. Несмотря на значительные достижения, существует множество вызовов, связанных с использованием этих технологий. В рамках доклада будут освещены проблемы и возможные пути их решений при разработке таких СППВР, а именно:

- воспроизводимость аналитических методик целевого метаболомного профилирования. Разработка стандартизованных протоколов пробоподготовки биологических образцов, методологии составления последовательностей вколов образцов в систему ВЭЖХ-МС/МС или ГХ-МС, автоматизации процессов контроля качества внутри и между аналитическими циклами, интеграции пиков с применением нейронных сетей и предобработки данных для дальнейшего анализа;
- нормализация данных;
- учет изменения метаболитов под воздействием различных факторов: медикаментозное лечение, питание, возраст, экология и др.;
- размерность данных, отсутствие баланса между количеством образцов и наблюдаемыми признаками;
- модели, обученные на одном наборе данных, могут не работать так же хорошо на других наборах данных или в других клинических условиях;
- разработка базы данных с охарактеризованными данными в контексте «норма-патология», включающие в себя клинические данные и метаболомные, для создания эталонных целевых метаболомных «дата-сетов».

В заключение можно сказать, что СППВР на основе метаболомных данных и методов машинного обучения представляют собой не миф, а реальность. Однако для преодоления существующих ограничений требуется дальнейшее развитие технологий и методологических подходов. Текущие достижения дают нам уверенность в том, что эти системы будут играть все более важную роль в будущем здравоохранения, делая процессы диагностики и лечения более точными, быстрыми и персонализированными.

## CLINICAL DECISION SUPPORT SYSTEMS BASED ON TARGETED METABOLOMIC DATA AND ML-TECHNIQUES: MYTH OR REALITY?

**S. Appolonova, N. Moskaleva, M. Savitskii, K. Shestakova**

*Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow*

Clinical decision support systems (CDSS) based on metabolomic data and machine learning (ML) methods are becoming increasingly important tools in modern medicine. CDSSs that utilize machine learning and metabolomic data have already demonstrated their effectiveness in clinical practice. For example, it has been shown that these systems can diagnose diseases such as cardiovascular conditions and cancers, differentiate diseases within the same pathology, and monitor the effectiveness of treatments for rheumatoid arthritis, multiple myeloma, and lymphoma. Despite these significant advances, there are many challenges associated with the use of these technologies. This presentation will highlight the challenges and propose possible solutions in the development of such CDSSs, specifically addressing:

- The reproducibility of analytical methodologies for targeted metabolomic profiling. This includes the development of standardized protocols for the preparation of biological samples, methodologies for sample injection sequences into HPLC-MS/MS or GC-MS systems, automation of quality control processes within and between analytical runs, integration of peaks using neural networks, and preprocessing of data for further analysis.
- Data normalization.
- Accounting for changes in metabolites influenced by various factors such as medication, diet, age, and environmental conditions.
- The dimensionality of the data and the imbalance between the number of samples and observed traits.
- Models trained on one dataset may not perform as well on other datasets or in different clinical settings.
- Therefore, the development of a database with characterized data in a "norm-pathology" context, incorporating both clinical and metabolomic data, is needed to create reference target metabolomic datasets.

In conclusion, metabolomic data-driven CDSSs and machine learning techniques are not a myth but a reality. However, further development of technologies and methodological approaches is required to overcome the existing limitations. Current advances give us confidence that these systems will play an increasingly important role in the future of healthcare, making diagnostic and treatment processes more accurate, faster, and personalized.

**МЕТАБОЛОМИКА СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ: СУЩЕСТВУЮЩИЕ РЕШЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

**А.К. Паутова, Н.В. Белобородова, П.Д. Соболев, Н.А. Бурнакова, А.И. Ревельский**

*Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии; ООО «Экзактэ Лабс»; Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва*

Анализ спинномозговой жидкости (СМЖ) является перспективным направлением для поиска новых биомаркеров заболеваний мозговых оболочек и центральной нервной системы (ЦНС). Авторами исследования предложены способы определения метаболитов ароматических альфа-аминокислот в СМЖ методами газовой (ГХ-МС) и высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС), которые могут быть использованы в дифференциальной диагностике инфекционных осложнений после нейрохирургических вмешательств, а именно вторичного бактериального менингита. Методом ГХ-МС проанализировано 138 остаточных после плановых клинико-лабораторных исследований образцов СМЖ, в которых обнаружены бензойная и 4-гидроксибензилмолочная (п-ГФМК) кислоты во всех образцах; гомованилиновая, 4-гидроксибензилуксусная, 4-гидроксибензойная, фенилмолочная (ФМК) и фенилпропановая кислоты – в 125, 90, 76, 74 и 12 образцах, соответственно. Анализ прогностической значимости выявил возможность использования только п-ГФМК для диагностики вторичного бактериального менингита со значением под ROC-кривой 0,73, чувствительностью 67% и специфичностью 83%. Ограничениями метода ГХ-МС являются количественное определение только нескольких метаболитов тирозина и фенилаланина в большинстве проб из-за нижних пределов определения на уровне мкМ и невоспроизводимое определение метаболитов триптофана. Использование метода ВЭЖХ-МС/МС позволило расширить перечень определяемых за 1 анализ метаболитов. Чувствительность разработанной и валидированной методики определения 11 фенил- и индол-содержащих метаболитов методом ВЭЖХ-МС/МС на уровне нМ позволила выявить статистически значимое повышение концентрации п-ГФМК, ФМК, индол-3-молочной и индол-3-карбоновой кислот в образцах СМЖ (n=29) пациентов с подозрением на вторичный бактериальный менингит. Проведено профилирование образцов СМЖ и сыворотки крови, одновременно полученных от пациентов с тяжелым повреждением головного мозга (n=29), и обнаружены более высокие концентрации п-ГФМК в СМЖ в 48% случаях по сравнению с концентрацией п-ГФМК в сыворотке.

Выявленное соотношение позволяет предположить, что п-ГФМК может быть синтезирована в инфекционных очагах непосредственно в ЦНС в случае вторичного бактериального менингита, что является важным результатом для дальнейших клинических исследований.

**CEREBROSPINAL FLUID METABOLOMICS FOR DIAGNOSTICS OF INFECTIOUS DISEASES: CURRENT SOLUTIONS AND PROSPECTS FOR USING CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY**

**A.K. Pautova, N.V. Beloborodova, P.D. Sobolev, N.A. Burnakova, A.I. Revelsky**

*Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation; Exacte Labs Bioanalytical; Laboratory Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow*

Analysis of cerebrospinal fluid (CSF) is a promising direction for the search for new biomarkers of the meninges and central nervous system (CNS) diseases. The authors of the study proposed methods for determining metabolites of aromatic alpha-amino acids in CSF using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS/MS), which can be used in the differential diagnosis of infectious complications after neurosurgery, namely secondary bacterial meningitis. The GC-MS method was used to analyze 138 residual CSF samples after routine clinical laboratory studies, in which benzoic and 4-hydroxyphenyllactic (p-HPhLA) acids were detected in all samples; homovanillic, 4-hydroxyphenylacetic, 4-hydroxybenzoic, phenyl-lactic (PhLA) and phenylpropanoic acids – in 125, 90, 76, 74 and 12 samples, respectively. The analysis of prognostic significance revealed the possibility of using only p-HPhLA for the diagnosis of secondary bacterial meningitis with an area under the ROC curve of 0.73, sensitivity of 67% and specificity of 83%. The limitations of the GC-MS method are the quantitative determination of only a few metabolites of tyrosine and phenylalanine in most samples due to the lower detection limits at the  $\mu\text{M}$  level and non-reproducible determination of tryptophan metabolites. The use of the HPLC-MS/MS method made it possible to expand the list of metabolites determined in 1 analysis. The sensitivity of the developed and validated method for determining 11 phenyl- and indole-containing metabolites by HPLC-MS/MS at the nM level allowed us to detect a statistically significant increase in the concentration of p-HPhLA, PhLA, indole-3-lactic and indole-3-carboxylic acids in CSF samples (n=29) of patients with suspected secondary bacterial meningitis. Profiling of CSF and serum samples obtained simultaneously from patients with severe brain injury (n=29) was performed, and higher concentrations of p-HPhLA in CSF were found in 48% of cases compared to that in serum.

The revealed ratio suggests that p-HPhLA can be synthesized in infectious foci directly in the CNS in case of secondary bacterial meningitis, which is an important result for further clinical studies.

**СИСТЕМА БИОБАНКИРОВАНИЯ – ЕДИНСТВО ПРАКТИКИ И НАУКИ. ОПЫТ РАБОТЫ ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ ЭНДОКРИНОЛОГИИ» МИНЗДРАВА РОССИИ**

**Е.В. Бондаренко, И.Р. Миннихметов, Н.Г. Мокрышева**

*ГНЦ РФ НМИЦ эндокринологии Минздрава России, Москва*

В последние годы биобанки становятся основной ресурсной базой для биомедицинских исследований и разработки новых лекарственных средств. Следует отметить, что накопленный мировой опыт биобанкинга, позволяет создавать четко структурированные коллекции материалов наиболее социально значимых заболеваний, к которым относятся патологии эндокринной системы. Существует объединение биобанков в сети и создание международных проектов в области медицинских исследований, в которых ЭНЦ принимает непосредственное участие. Рассматривая биобанк как одну из основ развития персонализированной медицины, руководство ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России одним из первых в 2013 году начал разработку создание биобанка. Пройдя сложный путь, только в 2016 году благодаря слаженной работе всех подразделений была создана и внедрена система биобанкирования. В данном докладе будет показан весь путь создания, а также будут освещены имеющиеся результаты и перспективные исследования.

**THE BIOBANKING SYSTEM REPRESENTS A CONVERGENCE OF PRACTICE AND SCIENCE. THIS PAPER PRESENTS THE EXPERIENCE OF WORK OF THE ENDOCRINOLOGY RESEARCH CENTER**

**E.V. Bondarenko, I.R. Minniakhmetov, N.G. Mokrysheva**

*Endocrinology Research Center, Russian Ministry of Health, Moscow*

In recent years, biobanks have become the main resource base for biomedical research and development of new drugs. It should be noted that the accumulated global experience of biobanking allows creating clearly structured collections of materials of the most socially significant diseases, which include pathologies of the endocrine system. There is a networking of biobanks and the creation of international projects in the field of medical research, in which ENC is directly involved. Considering biobanking as one of the foundations for the development of personalised medicine, the management of FGBU "NMRC Endocrinology" of the Ministry of Health of Russia was one of the first in 2013 to start the development of a biobank. Having travelled a difficult path, only in 2016, thanks to the coordinated work of all departments, the biobanking system was created and implemented. This report will show the whole path of creation, as well as highlight the existing results and prospective studies.

## ПРИМЕНЕНИЕ КЛИНИЧЕСКОЙ МЕТАБОГРАММЫ КРОВИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА НА РАННЕЙ СТАДИИ РАЗВИТИЯ

О.П. Трифонова<sup>1</sup>, Е.Е. Балашова<sup>1</sup>, Д.Л. Маслов<sup>1</sup>, М.В. Угрумов<sup>2</sup>, П.Г. Лохов<sup>1</sup>, А.И. Арчаков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича; <sup>2</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва

Масс-спектрометрическая клиническая метабограмма крови (КМК) позволяет проводить панорамный метаболомный анализ с высокой воспроизводимостью и оптимальными временными и ресурсными затратами, что важно в клинической лабораторной диагностике. Компоненты метабограммы представляют собой взаимосвязанные группы метаболитов крови, ассоциированные с гуморальной регуляцией, метаболизмом липидов, углеводов и аминов, поступлением липидов в организм и функцией печени, что позволяет быстро получить клинически значимую информацию о состоянии организма. В проведенной работе была изучена способность КМК выявлять метаболические изменения в плазме крови на ранних стадиях болезни Паркинсона (БП). В исследовании "случай-контроль" (n=56) с помощью КМК удалось выявить изменения в метаболоме крови, относящиеся к 1-2,5 клиническим стадиям БП, согласно модифицированной шкале Хен-Яра, которые определялись изменениями в уровне эйкозаноидов, фосфолипидов и, предположительно, в метаболизме бутадииона. Точность диагностики на основе КМК достигла 77% при специфичности и чувствительности – 71% и 82%, соответственно. Таким образом, результаты исследования расширили перечень заболеваний, для которых показана эффективность применения КМК, что открывает новые возможности для выявления метаболических изменений, характерных для БП, и диагностики БП на самых ранних стадиях развития.

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

## APPLICATION OF CLINICAL BLOOD METABOGRAM FOR DIAGNOSIS OF PARKINSON'S DISEASE IN THE EARLY STAGES

O.P. Trifonova<sup>1</sup>, E.E. Balashova<sup>1</sup>, D.L. Maslov<sup>1</sup>, M.V. Ugrumov<sup>2</sup>, P.G. Lokhov<sup>1</sup>, A.I. Archakov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Chemistry; <sup>2</sup>Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow

The mass spectrometry-based clinical blood metabogram (CBM) allows to perform panoramic metabolomics analysis with high reproducibility and optimal expenditures of time and resources, which is important for clinical laboratory diagnostics. The metabogram components represent interrelated groups of blood metabolites associated with humoral regulation, metabolism of lipids, carbohydrates and amines, lipid intake and liver function, which allows to quickly obtain clinically significant information about the state of the organism. In this work, the ability of CBM to detect metabolomics changes in the blood plasma in the early stages of Parkinson's disease (PD) was studied. In the case-control study (n=56), using CBM, it was possible to identify changes in the blood metabolome related to the 1–2.5 clinical stages of PD, according to the modified Hoehn and Yahr scale, which were determined by alterations in the level of eicosanoids, phospholipids and, presumably, in the butadione metabolism. The CBM-based diagnostic accuracy reached 77% with specificity and sensitivity of 71% and 82%, respectively. Thus, the results of the study extended the list of diseases for which the effectiveness of the use of CBM has been shown, which offers new opportunities for detecting PD-specific metabolomics changes and diagnosing PD in the very early stages.

*The work was performed within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021–2030) (№ 122030100168-2).*

## ДИАГНОСТИКА ПАТОЛОГИЙ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА УНИВЕРСАЛЬНОГО ЦЕЛЕВОГО МЕТАБОЛОМНОГО ПРОФИЛЯ

**Н.Е. Москалева, С.Н. Басханова, П.А. Маркин, С.А. Апполонова**

*Центр биофармацевтического анализа и метаболомных исследований, Институт трансляционной медицины и биотехнологии, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва*

Диагностика патологий организма человека на основе анализа универсального целевого метаболомного профиля (УЦМП) является современной и перспективной областью медицинской науки. Особая актуальность этой темы обусловлена необходимостью улучшения системы профосмотров с целью своевременного выявления патологических изменений в организме.

Метаболомика предоставляет нам уникальные возможности для понимания физиологических и патологических процессов в организме. УЦМП как совокупность метаболитов, характеризующих различные состояния организма, может служить надежным индикатором биологических изменений, происходящих при различных заболеваниях. В разработанный нами УЦМП входит 110 метаболитов и их соотношений, он охватывает метаболиты цикла триптофана, синтез аминокислот, ацилкарнитинов и нуклеозидов. Количественное измерение метаболитов проводится на системе ВЭЖХ-МС/МС, длительность анализа составляет 5 минут.

Результаты наших исследований показали, что УЦМП позволяет проводить диагностику сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), онкологию (рак легкого, колоректальный рак, рак почки, рак простаты), неалкогольный/алкогольный жировой гепатоз печени, ожирение, ревматоидный артрит и заболевания рака крови (множественная миелома и лимфома). Дифференциация патологий проводится по интегральному параметру, включающему в себя количественное изменение метаболитов в системе «норма-патология» и совокупному вкладу той или иной патологии в соответствующий метаболомный путь. Проведена кросс-валидация, чувствительность и специфичность диагностики варьируется в пределах 88-98%, в зависимости от патологии. Персонализированная медицина, основанная на индивидуальных метаболомных профилях пациентов, обещает стать основой для разработки эффективных и целенаправленных терапевтических стратегий. Таким образом, метаболомный анализ представляет собой мощный инструмент для диагностики патологий организма человека, открывающий новые перспективы в системе профосмотров и не только.

В заключение можно отметить, что дальнейшие исследования и внедрение метаболомного профилирования в клиническую практику являются необходимыми шагами для совершенствования медицинской диагностики и улучшения здоровья населения.

## DIAGNOSTICS OF HUMAN PATHOLOGIES BASED ON THE ANALYSIS OF THE UNIVERSAL TARGET METABOLOMIC PROFILE

**N.E. Moskaleva, S.N. Baskhanova, P.A. Markin, S.A. Appolonova**

*Centre of Biopharmaceutical analysis and Metabolomics, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia*

Diagnostics of human pathologies based on the analysis of the universal target metabolomic profile (UTMP) is a modern and promising area of medical science. The development and implementation of UTMP hold significant importance for improving the system of medical examinations, as well as for timely detection and prevention of pathological changes in the body.

Metabolomics provides us with unique opportunities to understand physiological and pathological processes in the body. UTMP as a set of metabolites characterizing various states of the body can serve as a reliable indicator of biological changes occurring in various diseases. The UTMP we developed includes 110 metabolites and their ratios, it covers metabolites of the tryptophan cycle, the synthesis of amino acids, acylcarnitines and nucleosides. Quantitative measurement of metabolites is carried out on the HPLC-MS/MS system, the analysis duration is 5 minutes.

The results of our studies have shown that the UCMP allows for the diagnosis of cardiovascular diseases (CVD), oncology (lung cancer, colorectal cancer, kidney cancer, prostate cancer), non-alcoholic/alcoholic fatty liver disease, obesity, rheumatoid arthritis and blood cancers (multiple myeloma and lymphoma). Differentiation of pathologies is carried out by an integral parameter that includes a quantitative change in metabolites in the "norm-pathology" system and the combined contribution of a particular pathology to the corresponding metabolomic pathway. Cross-validation was carried out, the sensitivity and specificity of diagnostics varies within 88–98%, depending on the pathology. Personalized medicine based on individual metabolomic profiles of patients promises to become the basis for the development of effective and targeted therapeutic strategies. Thus, metabolomic analysis is a powerful tool for diagnosing pathologies of the human body, opening up new prospects in the system of medical examinations and more.

In conclusion, it can be noted that further research and implementation of metabolomic profiling into clinical practice are necessary steps to improve medical diagnostics and population health.



## МЕТОДЫ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК МАЛЫХ МОЛЕКУЛ

**С.В. Осипенко, А.Ф. Киреев, А.А. Башилов, Е.Н. Николаев, Ю.И. Костюкевич**

*Сколковский институт науки и технологий, Москва*

Идентификация соединений в сложных образцах методами хромато-масс-спектрометрии обычно проводится сопоставлением характеристик удерживания, точных масс и спектров фрагментации с данными библиотек или с результатами, полученными при измерении образцов известного состава. Такой подход, однако, ограничен с одной стороны коммерческой доступностью чистых химических соединений, с другой – доступностью информации в базах данных, содержащих спектры фрагментации и значения времен удерживания. Возможным решением проблемы является оценка характеристик удерживания и масс-спектров с помощью вычислительных методов, в частности методов машинного обучения. В работе предложены подходы к прогнозированию времен удерживания в жидкостной хроматографии, с использованием традиционных методов машинного обучения и методов глубокого обучения искусственных нейронных сетей. Наиболее точный подход с использованием графовых нейронных сетей с распространением сообщений характеризуется средним отклонением в 32 с, что сопоставимо с воспроизводимостью измерений времен удерживания (данные получены с использованием библиотеки METLIN SMRT в режиме кросс-валидации). Использование предсказаний для произвольных условий разделения возможно с помощью «обучения с переносом». Данный подход позволяет повысить точность моделей при обучении на небольших выборках, что актуально для жидкостной хроматографии. Обучение с переносом характеризуется более высокой точностью по сравнению с применением кусочно-линейных функций пересчета, что продемонстрировано с использованием открытых данных по удерживанию. Предсказанные времена удерживания можно использовать в качестве фильтра ложноположительных определений среди изомерных кандидатов, сокращая пространство дальнейшего поиска более чем на 50%. Дополнительно в работе рассматривалась возможность прогнозирования масс-спектров электронной ионизации, а также индексов удерживания в ГХ-МС. Показано, что методы машинного обучения имеют большой потенциал для предсказания характеристик, используемых при идентификации веществ.

## MACHINE LEARNING TO PREDICT MOLECULAR PROPERTIES IN CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRE

**S.V. Osipenko, A.F. Kireev, A.A. Bashilov, E.N. Nikolaev, Y.I. Kostyukevich**

*Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow*

Identification of compounds in complex samples with chromatography-mass spectrometry is often performed via comparison of retention, accurate masses, and fragmentation spectra with library records, or with values obtained for samples of known composition. Such an approach, however, lacks of availability of reference materials, and of the coverage of the mass spectral and retention libraries. A possible solution is to evaluate retention and mass spectral behaviour with computational methods, particularly with machine learning. The work presents approaches to predict liquid chromatography retention times with machine and deep learning. The most accurate approach with message passing neural networks results in mean absolute error of 32 s, which is comparable with the experimental variation of retention measurement (data obtained for METLIN SMRT library in cross-validation mode). Application of the predictions for other LC conditions can be achieved with transfer learning. This approach improves model accuracy when trained on small sets, which is essential for LC. Transfer learning outperforms direct mapping of predicted values between systems with piecewise regression, as was demonstrated with open retention sets. Predicted retention times can be used as a filter to eliminate false positives among isomeric candidates, reducing the search space by up to 50%. In addition, the possibilities of prediction GC-MS molecular properties (retention indexes and electron ionization mass spectra) was investigated. It was shown that machine learning methods have a great potential to predict molecular properties, used for identification.

## ПРОГРАММНО-АППАРАТНЫЙ КОМПЛЕКС ХРАНЕНИЯ И АНАЛИЗА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ И РАСТЕНИЙ

**Н.А. Кулемин, В.В. Васипов**

*ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва*

За последние десятилетие значительно возросла популярность различных NGS-методов в селекции и генетике сельскохозяйственных растений и животных. Такие изменения в первую очередь обусловлены значительным снижением стоимости исследований, а также формированием новых разделов науки (геномика, транскриптомика, метиломика). Для решения задач хранения и обработки данных стали использоваться все более и более производительные машины, в том числе – суперкомпьютеры. Однако значительный объем данных и отсутствие работ по оптимизации полного цикла анализа стали приводить к значительным финансовым и временным затратам, а также к возрастанию рисков полной потери полученных данных.

На основании полученного опыта был разработан аппаратно-программный комплекс учета, хранения и анализа геномных данных, поддерживающий работу с любыми изученными биологическими видами. Для корректного учета метаданных был разработан подход к формированию наименований файлов, включающий на каждом последующем шаге добавочное описание о стадиях анализа. В качестве системы хранения был адаптирован открытый программный комплекс CEPH, включающий в себя не менее 3х узлов хранения. Настройки копийности хранения различных форматов файлов позволили достичь такой же гибкости, но при этом существенно большей надежности чем аналогичные системы хранения данных RAID10, массово применяемые в хранении NGS-данных. Для максимальной стабильности и производительности вычислительные узлы были разделены на группы «производственная» и «разработки». В производственной группе узлы были сконфигурированы совместно с дисковыми полками, что позволяет проводить анализ каждой задачи независимо, без постоянной перезаписи временных папок. Любые используемые программные протоколы были разделены на 3 независимые части: выполняемая для запуска прибора, выполняемая для полного образца и формирование отчетов на основе полученных ранее и сохраненных данных. Система запуска программных конвейеров была стандартизирована на основе контейнеров, которые формируются прямо на узлах без использования основного репозитория.

Система позволяет быстро, эффективно и масштабируемо проводить неограниченное количество различных исследований, протокол анализа которых является стандартизированным.

## HARDWARE AND SOFTWARE COMPLEX FOR STORAGE AND ANALYSIS OF GENETIC INFORMATION OF ANIMALS AND PLANTS

**N.A. Kulemin, V.V. Vasipov**

*Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency of Russia, Moscow*

Over the past decade, the popularity of various NGS methods in genetics of agricultural plants and animals has increased significantly. Such changes are primarily due to a reduction in the cost of research, as well as the formation of new branches of science (genomics, transcriptomics, methylomics). More and more productive machines, including supercomputers, have been used to solve data storage and processing problems. However, a huge amount of data and the lack of work to optimize the full cycle of analysis began to lead to significant financial and time costs, as well as to an increase in the risks of complete loss of the data obtained.

Based on the experience gained, a hardware and software system for accounting, storing and analyzing genomic data was developed that supports work with any studied biological species. To correctly account for metadata, an approach to the formation of file names has been developed, including an additional description of the analysis stages at each subsequent step. The CEPH open source software package, which includes at least 3 storage nodes, has been adapted as a storage system. The copy storage settings of various file formats made it possible to achieve the same flexibility, but at the same time is more reliable than similar RAID10 data storage systems, widely used in storing NGS data. For maximum stability and performance, the computing nodes were divided into "production" and "development" groups. In the production group, nodes were configured together with disk shelves, which allows you to analyze each task independently, without constantly overwriting temporary folders. Any software protocols used were divided into 3 independent parts: performed to start the device, performed for a complete sample, and generating reports based on previously received and stored data. The system for running software pipelines has been standardized based on containers that are formed directly on nodes without using the main repository.

The system allows you to quickly, efficiently and scalably conduct an unlimited number of different studies, the analysis protocol of which is standardized.

## ПОЛНОГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ СИГОВЫХ РЫБ СИБИРСКИХ РЕК И ОЗ. БАЙКАЛ

Н.С. Мюге, В.А. Сошникова, Л.Н. Мюге

Всероссийский институт рыбного хозяйства и океанографии

Сиговые рыбы (Coregonidae) – обширное успешное семейство в большой группе лососевидных рыб. Они занимают первое место по биомассе, являясь доминантными или супердоминантными видами во многих рыбных сообществах Арктики и суб-Арктики. В разное время ставились такие проблемы, как валидность видов сиговых, широта их распространения, число видов в определенных регионах, вопросы гибридизации между формами, линиями и видами сиговых и др. Методы и подходы на основе анализа морфологических, экологических, физиологических особенностей сиговых не позволяют ответить на поставленные выше вопросы, возможность решить их появилась лишь с развитием молекулярно-генетических методов анализа.

Полногеномный анализ показал генетическую самостоятельность всех изученных нами видов сиговых (Сиг-пыжьян, муксун, чир, пелядь, тугун, ряпушка, нельма, байкальский озерный сиг и байкальский омуль) и возможность разработки панели маркеров для идентификации каждого вида. Сравнение филогенетических деревьев, полученных методом анализа митогенома и полногеномного секвенирования указывают на четкую видовую дифференциацию всех изученных видов сиговых по ядерным маркерам, при отсутствии кластеризации некоторых пар видов по митохондриальной ДНК. Также проведен анализ главных компонент для всех трех экологических форм омуля и байкальского сига с использованием данных геномного полиморфизма. Проведенный анализ указывает на обособление озерного сига от всех трех экологических форм омуля, и также позволил выявить три кластера, соответствующие каждой из экологических форм.

Полученные данные позволяют подтвердить существование генетически обособленных экологических форм омуля в озере Байкал, что подтверждает необходимость научно обоснованного и предосторожного подхода при разработке программ искусственного воспроизводства этого ценного промыслового вида.

## WHOLE GENOME SEQUENCING OF WHITEFISH FROM SIBERIAN RIVERS AND LAKE BAIKAL

N. Muge, V. Soshnina, L. Muge

VNIRO

Whitefish (Coregonidae) are dominant or superdominant species in many fish communities of the Arctic and sub-Arctic. Methods and approaches based on the analysis of morphological, ecological, physiological characteristics of whitefish do not allow us to answer the above questions; the opportunity to solve them appeared only with the development of molecular genetic analysis methods.

Whole-genome analysis showed the genetic independence of all whitefish species studied by us (Humpback whitefish (*Coregonus pidschian*), moksun (*C. muksun*), broad whitefish (*C. nasus*), peled (*C. peled*), tugun (*C. tugun*), vendace (*C. albula*), nelma (sheefish, *Stenodus leucichthys*), Baikal lake whitefish (*C. baicalensis*) and Baikal omul (*C. migratorius*) and the possibility of developing a panel of markers for the identification of each species. Comparison of phylogenetic trees obtained by mitogenome analysis and whole-genome sequencing indicate a clear species differentiation of all studied whitefish species by nuclear markers, with no clustering of some species pairs by mitochondrial DNA. Also, a principal component analysis was performed for all three ecological forms of omul and Baikal whitefish using genomic polymorphism data. The analysis indicates the isolation of lake whitefish from all three ecological forms of omul, and also allowed us to identify three clusters corresponding to each of the ecological forms.

The data obtained confirm the existence of genetically distinct ecological forms of omul in Lake Baikal, which confirms the need for a scientifically sound and precautionary approach in developing artificial reproduction programs for this valuable commercial species.

## ПОДХОДЫ ПО ИЗУЧЕНИЮ НОВЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ПАТОГЕНЕЗА НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

**М.Ю. Скоблов, П.А. Спарбер, Е.В. Татарский, К.А. Давыденко, Ю.В. Вяхирева, Д.Б. Акимова, Д.В. Шерстюкова, А.Ю. Филатова**

*Медико-генетический научный центр им. Н.П. Бочкова, Москва*

На сегодняшний день больше половины пациентов с наследственными заболеваниями остаётся без молекулярно-подтверждённого диагноза. Даже применение современных подходов с помощью использования полногеномного секвенирования не приводят к значимому увеличению эффективности диагностики. Одной из возможных причин является существующее высокое многообразие молекулярных механизмов патогенеза наследственных заболеваний, которые очень сложно выявлять при анализе геномных данных пациентов.

Анализ профессиональных баз данных, содержащих информацию о патогенных генетических изменениях, показал, что большую часть данных представляют варианты расположенные в кодирующей части генов и влияющими на структуру и функцию белка, что логично, так как механизм их действия хорошо изучен на большом количестве генов и соответствующих заболеваний. Генетические изменения, расположенные в сайтах сплайсинга и приводящие к изменению структуры и функции РНК описаны гораздо меньше, так как до недавнего времени не существовало эффективных инструментов по поиску и аннотации таких изменений. И совсем мало представленными являются все остальные типы вариантов, такие как регуляторные, гипоморфные, комплексные, структурные, и многие другие. Для поиска таких изменений существует большая потребность в разработке как эффективных биоинформатических инструментов, так и экспериментальных систем для валидации соответствующих находок. Нами разработаны инструменты для поиска и аннотации вариантов нуклеотидной последовательности способных влиять как транскрипцию за счёт механизма РНК-интерференции, так и на трансляцию за счёт нарушения структуры uORF и последовательности Козак. Данные инструменты позволили найти новые ранее не описанные варианты способные приводить к возникновению различных наследственных заболеваний. Для экспериментальной валидации обнаруженных вариантов были разработаны экспрессионные системы с репортерным геном люциферазы.

Проведенные эксперименты позволили не только подтвердить патогенность найденных вариантов, но и определить молекулярный механизм патогенеза соответствующих заболеваний.

## APPROACHES TO STUDYING NEW MOLECULAR MECHANISMS IN THE PATHOGENESIS OF HEREDITARY DISEASES

**M.Yu. Skoblov, P.A. Sparber, E.V. Tatarskiy, K.A. Davydenko, Yu.V. Viakhireva, D.B. Akimova, D.V. Sherstyukova, A.Yu. Filatova**

*Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia*

To date, more than half of patients with hereditary diseases remain without a molecularly confirmed diagnosis. Even the application of modern approaches, such as whole-genome sequencing, has not led to a significant increase in diagnostic efficiency. One possible reason for this is the wide variety of molecular mechanisms underlying the pathogenesis of hereditary diseases, which are difficult to detect when analyzing patients' genomic data.

An analysis of professional databases containing information on pathogenic variants has shown that the majority of data represent variants located in the coding regions of genes that affect protein structure and function. Indeed, such variants are easy to identify, since the mechanisms of action of these variants are well studied for many genes and corresponding diseases. Nucleotide variants located in splice sites, which lead to alterations in RNA structure and function, have been much less described, because effective tools for identifying and annotating such changes have only recently become available. Other types of pathogenic variants, such as regulatory, hypomorphic, complex, structural, and many others, are even less represented. To detect these types of changes, there is a great need for the development of both effective bioinformatics tools and experimental systems for validating the findings. We developed tools for identifying and annotating nucleotide sequence variants that can affect both transcription through RNA interference mechanisms and translation by disrupting uORF structure and Kozak sequence. These tools allowed us to discover previously undescribed variants that can lead to the development of various hereditary diseases. For experimental validation of the identified variants, we developed expression systems with a luciferase reporter gene.

The experiments not only confirmed the pathogenicity of the identified variants, but also clarified the molecular mechanisms of the pathogenesis of the corresponding diseases.

### EXO-C – КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ И ИНТЕРПРЕТАЦИИ ГЕНОМНЫХ ВАРИАНТОВ ЧЕЛОВЕКА

М. Гридина<sup>1,2,3</sup>, Т. Лагунов<sup>1,2</sup>, П. Белокопытова<sup>1,2,3</sup>, Н. Торгунаков<sup>1,2</sup>, М. Нуриддинов<sup>1,2</sup>, А. Нурисламов<sup>1,2</sup>, Л. Назаренко<sup>3</sup>, А. Кашеварова<sup>3</sup>, М. Лопаткина<sup>3</sup>, Е. Беляева<sup>3</sup>, О. Салюкова<sup>3</sup>, А. Черемных<sup>3</sup>, Н. Суханова<sup>3</sup>, М. Миньженкова<sup>4</sup>, Ж. Маркова<sup>4</sup>, Н. Демина<sup>4</sup>, Я. Степанчук<sup>1,2</sup>, А. Хабарова<sup>1</sup>, А. Ян<sup>1,2</sup>, Э. Валиев<sup>1,2</sup>, Г. Кокшарова<sup>1,2</sup>, Е. Григорьева<sup>1</sup>, Н. Кох<sup>2,8</sup>, Т. Лукьянова<sup>5</sup>, Ю. Максимова<sup>1,5</sup>, Е. Мусатова<sup>6</sup>, Е. Шабанова<sup>7</sup>, А. Кечин<sup>8</sup>, Е. Храпов<sup>8</sup>, У. Боярских<sup>8</sup>, О. Рыжкова<sup>4</sup>, М. Сунцова<sup>11,12</sup>, А. Матросова<sup>11,12</sup>, М. Кароли<sup>10</sup>, А. Манахов<sup>10</sup>, М. Филипенко<sup>8</sup>, Е. Рogaев<sup>10,13</sup>, Н. Шилова<sup>4</sup>, И. Лебедев<sup>3</sup>, В. Фишман<sup>1,2,3,9</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск; <sup>2</sup>Новосибирский государственный университет, Новосибирск;

<sup>3</sup>НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, Томск; <sup>4</sup>Медико-генетический научный центр им. Н.П. Бочкова, Москва;

<sup>5</sup>Центр репродуктивной медицины, Новосибирск; <sup>6</sup>Центр генетики и репродуктивной медицины Genetico, Москва;

<sup>7</sup>Центр репродуктивной медицины им. Д.О. Отто, Санкт-Петербург; <sup>8</sup>Институт химической биологии

и фундаментальной медицины, Новосибирск; <sup>9</sup>НИИ искусственного интеллекта, Новосибирск; <sup>10</sup>Научно-технологический

университет «Сириус», Сочи; <sup>11</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова,

Москва; <sup>12</sup>НИИ эндокринологии, Москва, Россия; <sup>13</sup>UMass Chan Medical School, Ворчестер, США

Развитие методов анализа генома привело к более точной детекции различных геномных вариантов, и, следовательно, к лучшему выявлению генетической компоненты заболеваний. Однако, для эффективного поиска различных вариантов традиционно используют целый набор методов, специфичных для каждого типа: секвенирование всего генома или экзома для поиска однонуклеотидных вариантов и коротких вставок или делеций, агау CGH для поиска изменения копийности и микроскопию для детекции структурных вариантов. Мы разработали новый комплексный подход, названный Exo-C, сочетающий секвенирование экзома с захватом конформации хромосом. Этот метод позволяет одновременно идентифицировать точечные мутации в клинически значимых генах и структурные варианты по всему геному. Exo-C применим к анализу различных типов исходного материала: образцов крови, клеточных культур и срезов FFPE блоков. Мы показали, что этот метод способен детектировать различные типы хромосомных перестроек, в том числе и комплексные с большим числом разрывов. Exo-C хорошо подходит для уточнения структуры кариотипических аномалий неопределенного клинического значения. В таких случаях Exo-C позволяет достаточно точно определять точки разрывов, а, следовательно, можно идентифицировать гены или их регуляторные районы, нарушенные хромосомной перестройкой. Одновременно Exo-C дает информацию о дополнительных структурных вариантах, упущенных другими методами анализа и об экзонных однонуклеотидных вариантах, что может привести к появлению альтернативной гипотезы о причине развития заболевания. Большим преимуществом Exo-C является то, что он не просто детектирует хромосомные перестройки, но позволяет изучать регуляторные эффекты обнаруженных вариантов, используя данные о частотах контактов хроматина для получения информации об их функциональных последствиях. Таким образом разработанный нами метод Exo-C расширяет возможности выявления патогенных вариантов, предлагая значительный потенциал в генетической диагностике и исследованиях.

Финансирование: Исследование поддержано РФФ, грант №.22-14-00247

### EXO-C: AN INTEGRATED APPROACH FOR DETECTING AND INTERPRETING HUMAN GENOMIC VARIANTS

М. Gridina<sup>1,2,3</sup>, Т. Lagunov<sup>1,2</sup>, P. Belokopytova<sup>1,2,3</sup>, N. Torgunakov<sup>1,2</sup>, M. Nuriddinov<sup>1,2</sup>, A. Nurislamov<sup>1,2</sup>, L. Nazarenko<sup>3</sup>, A. Kashevarova<sup>3</sup>, M. Lopatkina<sup>3</sup>, E. Belyaeva<sup>3</sup>, O. Salyukova<sup>3</sup>, A. Cheremnykh<sup>3</sup>, N. Suhanova<sup>3</sup>, M. Minzhenkova<sup>4</sup>, Z. Markova<sup>4</sup>, N. Demina<sup>4</sup>, Y. Stepanchuk<sup>1,2</sup>, A. Khabarova<sup>1</sup>, A. Yan<sup>1,2</sup>, E. Valeev<sup>1,2</sup>, G. Koksharova<sup>1,2</sup>, E. Grigor'eva<sup>1</sup>, N. Kokh<sup>2,8</sup>, T. Lukjanova<sup>5</sup>, Y. Maximova<sup>1,5</sup>, E. Musatova<sup>6</sup>, E. Shabanova<sup>7</sup>, A. Kechin<sup>8</sup>, E. Khrapov<sup>8</sup>, U. Boyarskih<sup>8</sup>, O. Ryzhkova<sup>4</sup>, M. Suntsova<sup>11,12</sup>, A. Matrosova<sup>11,12</sup>, M. Karoli<sup>10</sup>, A. Manakhov<sup>10</sup>, M. Filipenko<sup>8</sup>, E. Rogaev<sup>10,13</sup>, N. Shilova<sup>4</sup>, I. Lebedev<sup>3</sup>, V. Fishman<sup>1,2,3,9</sup>

<sup>1</sup>Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk; <sup>2</sup>Novosibirsk State University, Novosibirsk; <sup>3</sup>Research Institute of Medical Genetics,

Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk; <sup>4</sup>Research Centre for Medical Genetics,

Moscow; <sup>5</sup>Center for Family Care and Reproduction, Novosibirsk; <sup>6</sup>Center of Genetics and Reproductive Medicine "Genetico", Moscow;

<sup>7</sup>D.O. Reproduction Center, St Petersburg; <sup>8</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk; <sup>9</sup>Artificial

Intelligence Research Institute, Novosibirsk; <sup>10</sup>Sirius University of Science and Technology, Sochi; <sup>11</sup>Sechenov First Moscow State

Medical University, Moscow; <sup>12</sup>Endocrinology Research Center, Moscow, Russia; <sup>13</sup>UMass Chan Medical School, Worcester, USA

Advancements in genome analysis methods have significantly improved the detection of various genomic variants, leading to better identification of the genetic components of diseases. Traditionally, different methods are used to search for specific types of variants: whole genome or exome sequencing for single nucleotide variants and short insertions or deletions, array CGH for copy number changes, and microscopy for structural variants. We have developed a novel integrated approach called Exo-C, which combines exome sequencing with chromosome conformation capture. This method enables the simultaneous identification of point mutations in clinically significant genes and structural variants throughout the genome. Exo-C is versatile and can be applied to various types of source material, including blood samples, cell cultures, and FFPE block sections. Our research has demonstrated that Exo-C can detect a wide range of chromosomal rearrangements, including complex ones with numerous breaks. It is particularly effective in clarifying the structure of karyotypic abnormalities of uncertain clinical significance, allowing for precise determination of breakpoints and identification of disrupted genes or regulatory regions. Additionally, Exo-C provides information on structural variants missed by other methods and on exonic single-nucleotide variants, which may suggest alternative hypotheses for disease causation. A major advantage of Exo-C is its ability to not only detect chromosomal rearrangements but also study the regulatory effects of these variants. By analyzing chromatin contact frequencies, Exo-C provides insights into the functional consequences of detected variants. In conclusion, the Exo-C method we have developed enhances the detection of pathogenic variants and offers significant potential in genetic diagnostics and research, expanding the possibilities for identifying and understanding genetic contributions to disease.

Funding: The study was supported by RSF №.22-14-00247.

## РАЦИОНАЛЬНЫЙ ДИЗАЙН ПРОМОТОРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ

**В. Фишман, Д. Пензар, П. Белокопытова, А. Шмелев, Ю. Куратов, О. Кардымон, М. Бурцев**

*Институт искусственного интеллекта, Москва; Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*

Множество современных биотехнологических задач требует доставки в клетку векторов для экзогенной продукции белков или РНК. Важнейшим элементом дизайна экспрессирующего вектора является выбор промотора. В серии экспериментальных работ нами показано, что использование эндогенных промоторов тканеспецифичных генов зачастую не позволяет обеспечить достаточный уровень продукции целевых белков и, кроме того, требует сохранения длинных 5'-некодирующих областей для обеспечения тканеспецифичной экспрессии. Таким образом, для развития биотехнологий важно решить задачу рационального дизайна коротких промоторных последовательностей с заданной тканеспецифичной активностью.

Недавно нами была разработана языковая модель ДНК GENA-LM. Мы показали, что GENA-LM позволяет решить широкий круг геномных задач с точностью, превышающей ранее опубликованные методы. В этой работе мы адаптировали модели GENA-LM и Enformer и для предсказания уровней экспрессии на основе последовательности ДНК и показали, что GENA-LM имеет ряд преимуществ при работе с короткими последовательностями. В то же время, обе модели демонстрируют низкую чувствительность к межклеточным различиям в уровне экспрессии. Мы показали, что набор данных, выбранный для обучения и файн-тюнинга моделей, существенно влияет на точность предсказаний и предложили оптимальную схему создания моделей, аннотирующих промоторные последовательности.

Используя созданные модели, мы показали возможность *in silico* генерации тканеспецифичных промоторов для различных типов клеток человека, а также проанализировали эволюционные изменения в “грамматике” промоторов. Хотя для близких видов мы наблюдали универсальность грамматики промоторов, на больших эволюционных дистанциях последовательности промоторов существенно различаются. Согласно нашим данным, промоторы, универсально работающие в различных типах клеток и видах млекопитающих, не способны активировать транскрипцию в клетках беспозвоночных животных. В то же время, мы обнаружили что промотор цитомегаловируса человека является редким исключением и демонстрирует активность в клетках филогенетически далеких видов, таких как человек, мышь и комар-анофелес.

## RATIONAL DESIGN OF SYNTHETIC PROMOTER USING ML-BASED METHODS

**V. Fishman, D. Penzar, P. Belokopytova, Y. Kuratov, A. Shmelev, O. Kardymon, M. Burtsev**

*Artificial Intelligence Research Institute, Moscow; Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk*

Modern biotechnological applications require delivery of genetic vectors into cells for the exogenous production of proteins or RNA. A critical element in the design of an expressing vector is the choice of promoter. Through a series of experimental studies, we have previously demonstrated that the use of endogenous promoters from tissue-specific genes often fails to achieve sufficient levels of target protein production and requires long 5'-UTR to achieve tissue-specific expression. Thus, addressing the challenge of designing short promoter sequences with predefined tissue-specific activity is vital for biotechnological advancements.

We recently developed the DNA language model, GENA-LM, and have shown that it surpasses previously published methods in diverse genomic tasks. In this study, we adapted both GENA-LM and Enformer models for predicting expression levels based on DNA sequences and demonstrated that GENA-LM is particularly advantageous for working with short sequences. However, both models exhibit low sensitivity to tissue-specific differences in expression levels. We found that the dataset selected for training and fine-tuning the models significantly impacts the accuracy of predictions, and proposed an optimal scheme for creating models that annotate promoter sequences.

Using the developed models, we demonstrated the possibility of *in silico* generation of tissue-specific promoters for various human cell types and analyzed evolutionary changes in promoter “grammar”. While we observed a universality in promoter grammar among closely related species, promoter sequences differ significantly across large evolutionary distances. According to our data, promoters that are universally functional in various cell types and mammalian species fail to activate transcription in invertebrate cells. Nonetheless, we discovered that the human cytomegalovirus promoter is a rare exception, exhibiting activity in cells of phylogenetically distant species such as mammals and insects.

#### **РЕЗУЛЬТАТЫ ПЕРВОГО ГОДА НАЦИОНАЛЬНОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНИЦИАТИВЫ «100000+Я»**

**Е. Климук, К. Северинов**

*ООО "Биотехнологический кампус", Москва*

Результаты первого года Национальной генетической инициативы «100000+Я» позволяют с уверенностью утверждать, что выстроенные в кратчайшие сроки процессы эффективны и позволят реализовать проект на высоком уровне. В рамках доклада будут представлены результаты проекта, проблемы, с которыми мы сталкиваемся во время его реализации и пути решения этих проблем. Эта информация будет полезна партнерам проекта, как текущим, так и потенциальным.

#### **RESULTS OF THE FIRST YEAR OF THE NATIONAL GENETIC INITIATIVE "100000+ME"**

**E. Klimuk, K. Severinov**

*Biotech Campus LLC, Moscow*

The results of the first year of the National Genetic Initiative "100000+Me" proved the effectiveness of the processes and procedures built in the short time and will allow us to implement the project at a high level. The report will present the results of the project, the problems we faced with and ways to solve these problems. This information will be useful to the project partners, both current and potential.

#### **ПОТОКОВАЯ ОБРАБОТКА NGS И TGS ДАННЫХ В 2024: НЕОБХОДИМАЯ И ПЕРСПЕКТИВНАЯ**

**Д.В. Пустошилов, Н.Н. Чеканов**

*ООО "Биотехнологический кампус", Москва*

В рамках выполнения задач Национальной Генетической Инициативы "100 000+Я" Биотехнологический Кампус еженедельно секвенирует до 3000 образцов полных геномов человека на технологиях массового параллельного секвенирования (МПС) с короткими чтениями и до 1000 — с длинными. В данном докладе представлены наши лучшие практики по обработке данных МПС, включая решение задач по определению SNP, CNV, SV, MGE, STR, VNTR и анеуплоидий; а также по их автоматизации.

#### **STREAM PROCESSING OF NGS AND TGS DATA IN 2024: ESSENTIAL AND PROMISING**

**D.V. Pustoshilov, N.N. Chekanov**

*Biotech Campus LLC, Moscow*

As part of the National Genetic Initiative "100,000+Me" the "Biotech Campus" LLC sequences up to 3,000 human whole genome samples weekly using short-read next-generation sequencing (NGS) technologies and up to 1,000 samples using long-read technologies (TGS). This report presents our best practices for NGS and TGS data processing, including SNP, CNV, SV, MGE, STR, VNTR, and aneuploidy detection, as well as their automation.

## РАЗРАБОТКА ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКОГО ОТЧЕТА О РИСКАХ ПОБОЧНЫХ ЭФФЕКТОВ ДЛЯ ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

**И. Заигрин, А. Монахова, Ю. Суворова, М. Гуржиханова, И. Антонов, О. Мушарова, Е. Климук, К. Северинов**

*ООО «Биотехнологический кампус», Москва*

Известно, что генетические факторы влияют на метаболизм и определяют индивидуальную реакцию на широкий спектр лекарственных препаратов. Информация о влиянии генотипа на реакцию на лекарство помогает подобрать наиболее подходящий конкретному пациенту препарат и дозировку. Особенно важна эта информация для пациентов, которые получают несколько препаратов в течение длительного времени, таких как дети, проходящие лечение от острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) в НМИЦ ДГОИ им. Д. Рогачева.

Совместно с врачами НМИЦ ДГОИ им. Д. Рогачева был собран список используемых в терапии ОЛЛ препаратов и наиболее актуальных побочных эффектов. Была собрана база геномных вариантов, гаплотипов и фенотипов фармакогенов ассоциированных с возникновением побочных эффектов терапии ОЛЛ. База включает в себя как препараты для химиотерапии, так и сопроводительную терапию.

По последним данным для корректной оценки риска требуется знание о гаплотипах, диплотипах и фенотипах фармакогенов. Типирование фармакогенов даже из полногеномных данных является сложной задачей, так гаплотипы включают в себя комбинации из нескольких коротких полиморфизмов, изменения копийности гена или его части, а также в случае с геном CYP2D6 — фьюжены. Для типирования фармакогенов был разработан биоинформатический пайплайн, включающий публичные инструменты (Aldy4, PyPGx, StellarPGx), а также собственный код. Валидация пайплайна проводилась на референсных образцах публичного датасета GetRM. А также на 1000 полногеномных образцах популяционной части Инициативы “100000+Я”. Для автоматического расчета рисков и сборки отчетов на основании геномных данных пациента используется система, основанная на Django. Система принимает на вход полногеномные данные (vcf, bam файлы, а также файл с результатами фармакогенетического пайплайна) и на основании собранной базы данных рисков, создает предсказания по каждому препарату и известному побочному эффекту и формирует итоговый pdf отчет для пациента. Генотипы, диплотипы и предсказания алгоритмов сохраняются в базе данных для накопления статистики и дальнейшего анализа.

## DEVELOPMENT OF AUTOMATED PHARMACOGENETIC CLINICAL REPORT FOR EVALUATING POSSIBLE SIDE EFFECTS OF ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA THERAPY

**I. Zaigrin, A. Monakhova, Y. Suvorova, M. Gurzhikhanova, I. Antonov, O. Musharova, E. Klimuk, K. Severinov**

*“Biotechnology Campus” LLC, Moscow*

Pharmacogenetics focuses on the genetic foundations of individual responses to medications and the development of adverse drug reactions (ADR). These adverse effects occur when an individual with a specific genetic risk profile is administered a particular drug. Knowledge about the association between certain genotypes and drug responses is essential for guiding medication prescriptions and dosages. This information is particularly crucial for patients who are prescribed multiple medications during treatment, such as children undergoing treatment from acute lymphoblastic leukemia (ALL) in Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology. The goal of our work was to develop a personal pharmacogenetic report for childhood ALL patients based on WGS data.

In collaboration with the physicians at the Dmitry Rogachev Center, a list of medications used in the treatment of ALL and the most relevant side effects was compiled. A database of genomic variants, haplotypes, and phenotypes of pharmacogenes associated with the occurrence of treatment-related side effects in ALL was established. This database includes both chemotherapy drugs and supportive treatments.

According to current studies, knowledge of haplotypes, diplotypes, and phenotypes of pharmacogenes is required for accurate risk assessment. Typing of pharmacogenes, even from whole genome data, is a complex task, as haplotypes consist of combinations of SNPs, CNVs in gene or its parts, and in the case of the CYP2D6 gene, fusions with the pseudogene CYP2D7. A bioinformatics pipeline was developed for pharmacogene haplotyping, which includes public tools (Aldy4, PyPGx, StellarPGx) as well as custom code. The pipeline was validated using reference samples from the public GetRM dataset, as well as on 1000 WGS samples of the population part of the “100,000+Me” Initiative. For automatic risk calculation and report generation based on patient genomic data, a system built on Django is employed. This system accepts WGS data and generates predictions for each drug and known side effect, ultimately creating a final PDF report for the patient. Genotypes, diplotypes, and algorithm predictions are stored in the database for accumulating statistics and further analysis.



## ПОПУЛЯЦИОННАЯ ГЕНОМИКА НАРОДОВ РОССИИ

**В.А. Степанов**

*Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск*

Полногеномное изучение генетического разнообразия в популяциях человека оказывает значительное влияние на медицинскую генетику и персонализированную медицину. Целью наших работ является выявление популяционной структуры населения России на уровне полных геномов, поиск сигналов адаптивной эволюции в коренных популяциях России, а также обоснование использования данных о геномном разнообразии и популяционном происхождении в современных биомедицинских исследованиях. Геномный анализ генетического разнообразия с использованием данных WGS и массива SNP демонстрирует общую картину генетического разнообразия, распределенного в соответствии с географическим положением популяций. Неравномерное распределение ROH среди популяций показывает выраженный эффект основателя в большинстве популяций Северной Азии и Северного Кавказа. Показано популяционно-специфическое распределение медицински значимых вариантов в различных популяциях человека.

Таким образом, сложная генетическая история, сформированная ранними миграциями, изоляцией расстоянием, эффектами основателя и естественным отбором, привела к наблюдаемому паттерну геномного разнообразия в популяциях человека в России. Будущие генетические исследования и медицинские программы должны учитывать Генетическую архитектуру народов Северной Евразии должна быть учтена будущими генетическими, медико-генетическими и медицинскими национальными программами.

*Исследование было поддержано грантом Российского научного фонда № 22-64-00060.*

## POPULATION GENOMICS OF THE PEOPLES OF RUSSIA

**V.A. Stepanov**

*Tomsk National Research Medical Center, Tomsk*

The whole genome research on genetic diversity in human populations is accumulating significant impact for medical genetics and personalized medicine. Objective of the study is to identify population structure and reveal signals of adaptive evolution in native populations of Russia. We also aim to demonstrate the importance of incorporating population genetic diversity and ancestry information into present biomedical research. Genome-wide analysis of genetic diversity using WGS and SNPs array data demonstrates general pattern of genetic diversity distributed according geographic locations of the populations. Uneven distribution of ROH among populations demonstrated founder effect in most North Asian and North Caucasian populations. We demonstrate the population-specific distributions of medically relevant variants in diverse human populations.

Thus, complex genetic history shaped by early migrations, isolation by distance, founder effects and natural selection has led to current genomic diversity patterns in human populations of Russia. Future genetic studies and medical programs should take into account the genetic architecture of North Eurasian peoples.

*The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 22-64-00060.*

## ДИПЛОИДНАЯ ГЕНОМНАЯ СБОРКА РУССКИХ МУЖЧИНЫ И ЖЕНЩИНЫ

**Д. Мелешко, А. Дерягина, Д. Пустошилов, О. Климчук, К. Северинов**

*ООО Биотек-Кампус, Москва; ИТМО, Санкт-Петербург*

Геномная сборка с разрешением гаплотипов все еще сложная задача, требующая совместного использования данных от нескольких технологий секвенирования и значительных вычислительных ресурсов. В рамках проекта “Платиновый геном” Биотек-Кампуса мы отсеквенировали женатую пару и их родителей с использованием технологий ONT и MGI. Муж является русским, в то время как жена по национальности грузинка. Для сборки геномов мы предварительно создали базу k-меров родителей с использованием прочтений MGI и утилиты meryl, а также провели коррекцию прочтений ONT используя Herro. Сборка с разрешением гаплотипов была проведена с использованием сборщика Verkko последней версии, которому на вход были поданы откорректированные и неоткорректированные прочтения ONT, а также информация о родителях. Из-за недостатка UL ONT и PacBio Hi-Fi прочтений геномная сборка от теломеры до теломеры (T2T) недостижима, наша сборка для большинства хромосом достигает качества от теломеры до центромеры (T2C). Несмотря на то, что сборка центромерных регионов оказалась сильно фрагментирована, метрика N80 превышает 20Mbp для обоих гаплотипов обоих геномов. Самые длинные контиги для гаплотипов достигают длины порядка 135 Mbp и картируются на длинное плечо второй хромосомы. Насколько нам известно, это первая геномная сборка с разрешением гаплотипов для русского человека и она может служить референсом для будущих исследований.

На основе данных секвенирования и сборки мы составляем набор “платиновых” вариантов для сертификации биоинформатических методов.

## HAPLOTYPE-RESOLVED ASSEMBLY OF RUSSIAN MALE AND FEMALE GENOME

**D. Meleshko, A. Deryagina, D. Pustoshilov, O. Klimchuk, K. Severinov**

*Biotech-Campus, Moscow; National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics (ITMO University), St Petersburg*

Haplotype-resolved assembly for human genome is still a complex task that requires several sequencing technologies to be integrated as well as trio information and large computational resources. Within “Platinum genome” project of Biotech-Campus we performed ONT and MGI sequencing of a married couple together with their parents. The man is Russian, and the woman has Georgian origins. As a preliminary steps to assemble their genomes, we constructed MGI-based kmer databases of the parents using meryl, and corrected ONT reads of couple using Herro. Haplotype-resolved genomes were then assembled using the latest version of Verkko with corrected and uncorrected ONT reads and trio information as input. While the lack of UL ONT and PacBio Hi-Fi reads hindered complete telomere-to-telomere (T2T) assembly our assemblies are effectively telomere-to-centromere (T2C). While centromeric regions remained poorly assembled, N80 metric exceeds 20Mbp for both haplotypes for both genomes. The largest contigs are about 135 Mbp in size and cover the long arm of Chromosome 2. To the best of our knowledge, this is the first haplotype resolved assembly of russian person that can serve as a reference genome in future studies.

Based on the sequencing data obtained in this study, we plan to create a benchmark of “platinum” structural variants that can be used to certify bioinformatics pipelines.

## АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ РЕДКИХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ В РОССИЙСКОЙ КОГОРТЕ ПАЦИЕНТОВ С ВРОЖДЕННЫМИ ОШИБКАМИ ИММУНИТЕТА

Ю.С. Петрусенко<sup>1</sup>, Н.Н. Чеканов<sup>1</sup>, Ю.М. Суворова<sup>1</sup>, О.С. Мушарова<sup>1</sup>, А.С. Монахова<sup>1</sup>, Е.И. Климук<sup>1</sup>, К.В. Северинов<sup>1</sup>, Т.В. Савин<sup>2</sup>, А.М. Миличкина<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ООО «Биотехнологический кампус», Москва, <sup>2</sup>НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Врожденные ошибки иммунитета (ВОИ) представляют собой гетерогенную группу расстройств, для которых генетический анализ бывает критичен при определении точного диагноза и подбора терапии, однако, молекулярно-генетическая причина по менделевскому сценарию устанавливается далеко не во всех случаях. В данном исследовании мы сфокусировались на изучении спектра низкочастотных вариантов группы российских пациентов с ВОИ. Мы составили списки генов, ассоциированных с врожденными ошибками иммунитета, разделяя их по категориям согласно классификации Международного союза иммунологических обществ IUIS, а также включили гены, связанные с другими врожденными патологиями. В итоге, в анализ вошли 620 генов. Используя данные секвенирования полного генома короткими прочтениями, мы проанализировали 150 образцов пациентов НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, чтобы оценить долю моногенных случаев. У всех пациентов было получено информированное согласие в соответствии с этическими стандартами. Большую часть выборки составляли пациенты с неопределенным иммунодефицитом и общим варибельным иммунодефицитом (ОВИН). В результате мы идентифицировали 14 патогенных вариантов, известных в базах данных, и 23 новых вероятно патогенных генетических варианта в генах NFKB1, SOCS1, CTLA4, FAS, CARD11 и др. Наши данные подтверждают опубликованные сведения о том, что в менее 20% случаев ОВИН обнаруживаются причинные генетические aberrации, в нашей выборке среди пациентов с ОВИН и неопределенными иммунодефицитами – у 15% и 7% соответственно. Кроме того, мы решили рассмотреть геномы пациентов с неопределенной генетической причиной в контексте накопления редких вариантов в различных генах из составленных списков.

Итак, мы протестировали наличие статистических различий в числе, локализации, функциональном типе редких вариантов (порог частоты 1%) в выбранных генах среди остаточной когорты больных ВОИ (98 пациентов), учитывая их клинические проявления, и идентичной выборки здоровых людей из геномной базы «ООО Биотехнологический кампус». При наличии генетически не охарактеризованных пациентов рассмотрение других сценариев наследования, таких как вклад нескольких редких вариантов, может быть важным шагом к пониманию наследственности в целом и улучшению диагностики заболеваний в будущем.

## THE ANALYSIS OF RARE VARIANT DISTRIBUTION IN RUSSIAN IIE COHORT

Y. Petrusenko<sup>1</sup>, N. Chekanov<sup>1</sup>, Y. Suvorova<sup>1</sup>, O. Musharova<sup>1</sup>, A. Monakhova<sup>1</sup>, E. Klimuk<sup>1</sup>, K. Severinov<sup>1</sup>, T. Savin<sup>2</sup>, A. Milichkina<sup>2</sup>

<sup>1</sup>"Biotech campus" LLC, Moscow; <sup>2</sup>St Petersburg Pasteur Institute, St Petersburg

Inborn errors of immunity (IEI) represent a heterogeneous group of inborn disorders for which genetic analysis is crucial for accurate diagnostics and selection of appropriate therapy. However, a molecular-genetic cause under the Mendelian scenario cannot be established sometimes. Here, we investigated the spectrum of low-frequency variants in a group of Russian patients with IEI. We generated lists of genes associated with IEI, dividing them into categories according to the classification of the International Union of Immunological Societies (IUIS). Besides, we included genes associated with other congenital pathologies. As a result, 620 genes were included in the analysis. We first analyzed the short-read whole-genome sequencing data from 150 patients provided by Saint-Petersburg Pasteur Institute Medical Centre to estimate the proportion of monogenic cases. Informed consents were obtained for all the patients in accordance with the ethical standards. The majority of the sample consists of patients with unspecified immunodeficiency and common variable immunodeficiency (CVID). Our results identify 14 pathogenic variants published in the databases and 24 new likely pathogenic variants in the genes NFKB1, SOCS1, CTLA4, FAS, CARD11, etc. Thus, our data confirm that genetic aberrations are found in less than 20% of CVID cases, in our sample among patients with CVID and unspecified immunodeficiencies - in 15% and 7%, respectively.

Then we focused on the genomes of patients with an unrevealed genetic cause in the context of rare variant accumulation in different genes from the generated lists. Thus, we tested the statistical differences in the number, localization, and functional type of rare variants (frequency threshold is 1%) in the selected genes among the residual cohort of patients with IEI (98 patients), considering their clinical manifestations, and an identical sample of healthy individuals from the genomic database of "Biotech campus" LLC. In the presence of genetically uncharacterized patients, studying of other inheritance scenarios, such as the contribution of multiple rare variants, may be an important step towards understanding heredity in general and improving diagnostics power in the future.

## ПАЛЕОГЕНОМНОЕ НАПРАВЛЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ В ООО «БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ КАМПУС»: РЕЗУЛЬТАТЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

А.А. Крицкий<sup>1</sup>, Н.Я. Березина<sup>2</sup>, Е.И. Ботманов<sup>1</sup>, А.О. Иванова<sup>1</sup>, Т.Р. Цедилина<sup>1</sup>, А.В. Павлова<sup>1</sup>, Н.А. Прокопьев<sup>1</sup>, А.А. Перевозчикова<sup>2</sup>, К.Ю. Куприкова<sup>2</sup>, Е.И. Климук<sup>1</sup>, А.П. Бужилова<sup>2</sup>, К.В. Северинов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ООО «Биотехнологический кампус»; <sup>2</sup>Научно-исследовательский институт и музей антропологии МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Методические подходы палеогеномики включают в себя как лабораторные технологии, так и биоинформатический анализ. Специфика методик определяется особенностями древней ДНК и ее сохранности в объекте. Древняя ДНК отличается малой длиной и наличием посмертного деаминирования, приводящего к возникновению однонуклеотидных замен в последовательности. На этапах биоинформатического анализа первичной задачей становится установление аутентичности древности и аутентичности таксономической принадлежности, что особенно критично для метагеномных исследований. Разнообразие применяемых подходов зачастую приводит к неоднозначным результатам и выводам. В геномном центре ООО «Биотехнологический Кампус» разработаны подходы для исследования разнообразного археологического и палеонтологического материала. Основное направление работы – палеопатология человека и популяционная генетика древних млекопитающих на основе костного материала, собранного на территории Российской Федерации.

Получены следующие результаты: реконструированы полные древние геномы патогенных и комменсальных микроорганизмов (*Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Aggregatibacter aphrophilus*, *Tannerella forsythia*), проведено комплексное палеогеномное исследование Таганского могильника, включая идентификацию возбудителей раневых инфекций и зоонозных патогенов, получены данные о циркуляции возбудителей малярии на территории европейской части России в исторический период, определено филогенетическое положение вымерших пещерных гиен Алтая.

Полученные данные, будучи интегрированными в область гуманитарного знания, послужат инструментом интерпретации различных исторических процессов. Анализ данных древних микробных геномов может помочь в поиске новых биологически активных молекул.

## PALEOGENOMIC RESEARCH IN LLC "BIOTECH CAMPUS", RESULTS AND FUTURE DIRECTIONS

A.A. Kritsky<sup>1</sup>, N.Y. Berezina<sup>2</sup>, E.I. Botsmanov<sup>1</sup>, A.O. Ivanova<sup>1</sup>, T.R. Tsedilina<sup>1</sup>, A.V. Pavlova<sup>1</sup>, N.A. Prokopev<sup>1</sup>, A.A. Perevozchikova<sup>2</sup>, K.Y. Kuprikova<sup>2</sup>, E.I. Klimuk<sup>1</sup>, A.P. Buzhilova<sup>2</sup>, K.V. Severinov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biotech Campus LLC; <sup>2</sup>Research Institute and Museum of Anthropology, Lomonosov Moscow State University, Moscow

Methodological approaches to paleogenomics include both laboratory technologies and bioinformatical analysis. The specifics of the methods are determined by the characteristics of ancient DNA and its preservation in the object. Ancient DNA is characterized by its short length and the presence of *post mortem* deamination, which leads to the single-nucleotide substitutions in the sequence. Verification of ancient authenticity and the taxonomic identity is a primary task for bioinformatical analysis stage. These is especially critical for meta-genomic studies. The variety of approaches often leads to ambiguous results and conclusions. The genomic center "Biotech Campus" LLC has developed approaches for studying a variety of archaeological and paleontological material. The main area of work is human paleopathology and population genetics of ancient mammals based on osteological materials collected in the Russian Federation.

The following results have been obtained: reconstruction of ancient whole-genomes of pathogenic and commensal microorganisms (*Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Aggregatibacter aphrophilus*, *Tannerella forsythia*), comprehensive paleogenomic study of the "Taganskiy" burial ground including identification of wound infections and zoonotic pathogens, new data on the spread of plasmodium in the territory of Russia during the historical period, determination of the phylogenetic position of the extinct cave hyenas of Altai.

The obtained data, being integrated into the area of humanitarian knowledge, might be helpful for interpreting various historical processes. The research of ancient microbial genomes could help find novel bioactive molecules.

## КЛИНИЧЕСКАЯ ГЕНОМИКА В ДЕТСКОЙ ГЕМАТОЛОГИИ И ОНКОЛОГИИ

**М.А. Масчан**

*НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева МЗ РФ, Москва*

Современные достижения в области геномных технологий кардинально изменили подходы к лечению детских онкологических и гематологических заболеваний, предоставляя новые возможности для изучения молекулярных механизмов этих состояний. Доклад посвящен роли клинической геномики в диагностике, прогнозировании и лечении этих сложных состояний. Будет рассмотрен интегральный подход проекта, включающий технологии секвенирования нового поколения, такие как полногеномное секвенирование и панели генов, для идентификации генетических aberrаций, которые являются драйверами злокачественных новообразований и гематологических заболеваний у детей.

Проект осуществляется при сотрудничестве ведущих научно-исследовательских и клинических центров и направлен на преобразование геномных данных в практические клинические стратегии. С помощью конкретных примеров будет показано, как генотипические данные направляли выбор целенаправленной терапии, что приводило к персонализированным планам лечения, улучшающим исходы для пациентов. Также будут освещены проблемы, с которыми сталкивается клиническая геномика на широкомасштабном уровне, включая этические вопросы, связанные с генетическим тестированием у детей, управление данными и интеграцию геномных данных в существующие медицинские процессы. Обсуждение также затронет разработку надежных биоинформационных инструментов, необходимых для эффективной интерпретации обширных объемов геномных данных, чтобы результаты были клинически релевантны и могли быть немедленно применены в практике лечения пациентов.

В заключение, данный проект демонстрирует трансформационный потенциал клинической геномики в педиатрической гематологии и онкологии, а также служит моделью для будущих исследований и клинической практики. Доклад подчеркнет необходимость продолжения исследований, сотрудничества и инноваций в этой динамичной области, с целью сделать персонализированную медицину стандартной частью ухода за детьми с онкологическими и кроветворными заболеваниями. Конечная цель - повысить показатели выживаемости и качество жизни педиатрических пациентов.

## CLINICAL GENOMICS IN PEDIATRIC HEMATOLOGY AND ONCOLOGY

**M. Maschan**

*Dmitriy Rogachev Center of Pediatric Hematology and Oncology*

Recent advances in genomic technologies have revolutionized the field of pediatric hematology and oncology, offering new insights into the molecular underpinnings of childhood cancers and blood disorders. This talk will discuss the pivotal role of clinical genomics in diagnosing, prognosticating, and treating these complex conditions. We will explore the project's multifaceted approach, which integrates next-generation sequencing (NGS) technologies, including whole-genome sequencing (WGS) and targeted gene panels, to identify genetic mutations and aberrations that drive pediatric malignancies and hematologic conditions.

The project, involving a collaboration between leading research institutes and clinical centers, aims to translate genomic data into actionable clinical strategies. By examining specific case studies, we will demonstrate how genotypic data have guided targeted therapy choices, leading to personalized treatment plans that improve patient outcomes. For instance, the identification of specific mutations in leukemia patients has facilitated the use of tailored tyrosine kinase inhibitors, significantly improving survival rates.

Further, we will highlight the challenges faced in implementing clinical genomics on a broad scale, including ethical issues related to genetic testing in children, data management, and the integration of genomic data into existing medical frameworks. The talk will also address the development of robust bioinformatics tools necessary to interpret vast amounts of genomic data effectively, ensuring that findings are clinically relevant and can be readily applied to patient care.

In conclusion, this project not only exemplifies the transformative potential of clinical genomics in pediatric hematology and oncology but also sets a blueprint for future research and clinical practice. Our discussion will underscore the necessity for ongoing research, collaboration, and innovation in this dynamic field, aiming to make personalized medicine a standard part of care for children with cancer and blood disorders. The ultimate goal is to enhance survival rates and quality of life for pediatric patients through the precise application of genomic insights.

### **ПЕРЕСТРОЙКИ ГЕНА KMT2A ПРИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗАХ У ДЕТЕЙ – ОПРЕДЕЛЕНИЕ В ДАННЫХ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ И КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

**Е.А. Зеркаленкова, К.Р. Ильясова, О.И. Солдаткина, А.Н. Казакова, Ю.В. Ольшанская, И.И. Калинина, А.А. Масчан, Г.А. Новичкова, М.А. Масчан**

*НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, Москва*

Рекуррентные хромосомные транслокации, приводящие к формированию химерных генов, являются ведущим механизмом патогенеза острых лейкозов (ОЛ) у детей; особое внимание отводится перестройкам гена KMT2A в силу их частой встречаемости, большого количества генов-партнеров и локализаций точек разрыва.

Целью работы явилось выявление перестроек KMT2A при ОЛ у детей в данных полногеномного секвенирования (ПГС) в проспективных образцах костного мозга от пациентов с ОЛ (n=716; м:ж=1.4:1; медиана возраста 6,5 лет, 3 сут-18 лет), для которых была проведена диагностика в НМИЦ ДГОИ им. Д. Рогачева и последующее ПГС в рамках национальной генетической инициативы «100 000+Я». Кроме того, ретроспективно были проанализированы KMT2A+ ОЛ, ранее исследованные ОТ-ПЦР либо KMT2A-таргетной ДНК-панелью (n=93). В ретроспективной когорте результаты ПГС полностью совпали с таргетным секвенированием прямых KMT2A-химерных генов, а также подтвердили простой реципрокный (n=47,3%), одношаговый (n=3,3%) и комплексный (n=51,6%) характер перестройки 11q23.3. Медиана числа слияний в сложных перестройках составила 3; в 12,5% реципрокный KMT2A-химерный ген не формировался в результате делеций 11q23.3. В исследуемой когорте было выявлено 84 KMT2A+ образца (11,4%), наиболее часто с ОМЛ (24,7% от всех ОМЛ, что соответствует частоте среди пациентов протокола ОМЛ-MRD-2018), реже при В-ОЛЛ (7,9%) и Т-ОЛЛ (1,4%). Наиболее частым геном-партнером явился MLLT3 (28,0%), наиболее частым регионом разрыва – интрон 11 (35,4%). Перестройки были представлены простыми реципрокными (52,4%), одношаговыми (1,2%) и комплексными (46,2%) событиями, причем медиана числа слияний в составе сложных транслокаций составила 6, а максимальное число – 17 (для t(10;11)). В ходе работы было обнаружено 5 случаев криптических перестроек KMT2A, что явилось основанием для рестратификации пациентов в группу высокого риска. Были обнаружены 2 ранее неописанные перестройки KMT2A::SORBS1 и KMT2A::MRTFB у пациентов первого года жизни с ОМЛ и ОЛЛ соответственно. Найденные последовательности KMT2A-химерных генов были использованы для определения минимальной остаточной болезни (МОБ) методом ОТ-ПЦР. Так, персистенция ПЦР-МОБ показала значимое влияние на бессобытийную выживаемость в протоколе ОМЛ-MRD-2018 (36,0±10,4% vs 26,4±12,8%, p=0,024).

### **KMT2A GENE REARRANGEMENTS IN PEDIATRIC ACUTE LEUKEMIA – IDENTIFICATION IN WHOLE GENOME SEQUENCING DATA AND CLINICAL APPLICATION**

**E.A. Zerkalenskova, K.R. Ilyasova, O.I. Soldatkina, A.N. Kazakova, Yu.V. Olshanskaya, I.I. Kalinina, A.A. Maschan, G.A. Novichkova, M.A. Maschan**

*Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow*

Recurrent chromosomal translocations leading to the formation of chimeric genes are the leading mechanism of the pathogenesis of acute leukemia (AL) in children; special attention is paid to KMT2A gene rearrangements (KMT2Ar) due to their frequent occurrence, a large number of partner genes and heterogenic localization of breakpoints.

The aim of the work was to identify KMT2Ar in AL in children in whole-genome sequencing (WGS) data in prospective bone marrow samples from patients with AL (n=716; m:f=1.4:1; median age 6.5 years, 3 days-18 years), for whom diagnostics were carried out at the D. Rogachev NMRCPHOI and the subsequent WGS within the framework of the national genetic initiative "100,000+Ya". In addition, KMT2A+ ALs previously tested by RT-PCR or KMT2A-targeted DNA panel (n=93) were retrospectively analyzed. In the retrospective cohort, WGS results were completely consistent with targeted sequencing of direct KMT2A chimeric genes and confirmed the simple reciprocal (n=47.3%), one-step (n=3.3%), and complex (n=51.6%) nature of the 11q23.3 rearrangement. The median number of fusions in complex rearrangements was 3; in 12.5%, the reciprocal KMT2A chimeric gene was not formed due to 11q23.3 deletions. In the study cohort, 84 KMT2A+ samples (11.4%) were identified, most often with AML (24.7% of all AML, which corresponds to the frequency among patients of AML-MRD-2018 protocol), less often with B-ALL (7.9%) and T-ALL (1.4%). The most frequent partner gene was MLLT3 (28.0%), breakpoint region was intron 11 (35.4%). KMT2Ar were represented by simple reciprocal (52.4%), one-step (1.2%) and complex (46.2%) events, with the median number of fusions in complex translocations being 6 and the maximum number being 17 (for t(10;11)). Besides, 5 cases of cryptic KMT2Ar were detected, leading to restratification of patients into the high-risk group. Two previously undescribed rearrangements KMT2A::SORBS1 and KMT2A::MRTFB were found in patients of the first year of life with AML and ALL, respectively. The identified sequences of KMT2A chimeric genes were used to determine minimal residual disease (MRD) using RT-PCR. Thus, the persistence of PCR-MRD showed a significant effect on event-free survival in the AML-MRD-2018 protocol (36.0±10.4% vs 26.4±12.8%, p=0.024).

### РОЛЬ «ЭФФЕКТА ОСНОВАТЕЛЯ» В РАЗВИТИИ СИНДРОМА РОДЖЕРСА

**М.Х. Гуржиханова, Т.Ю. Салимова, О.В. Горонкова, Н.Н. Чеканов, Р.Х. Абасов, Н.Г. Боярчук, Е.В. Райкина, М.А. Масчан**

*НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, Москва*

**Введение.** Синдром Роджерса или тиамин-зависимая мегалобластная анемия (TRMA) — это генетически детерминированный наследственный синдром, развивающийся вследствие нарушения функций высокоаффинного тиаминового переносчика человека 1 (THTR-1). TRMA характеризуется клинической триадой симптомов: (1) мегалобластная анемия, (2) неаутоиммунный сахарный диабет и (3) прогрессирующая нейросенсорная тугоухость [Rogers L. E., 1969]. На сегодняшний день описано около 100 клинических случаев из трех эндемичных регионов – Ближний Восток, Южная Азия и в северное Средиземноморье. В России на сегодняшний день нет ни одного опубликованного ранее клинического случая [Mohsen-Pour N., 2022].

**Цель работы.** Охарактеризовать клинически пациентов с генетически доказанным синдромом Роджерса.

Проведен анализ 6 пациентов с генетически установленным диагнозом TRMA. Медиана возраста пациентов на момент постановки диагноза 2 года (1 год–16 лет), соотношение М/Ж — 5/1.

Дебют заболевания пациентов от первых месяцев до первого года жизни (у 4 – с анемии, у двоих – с потери слуха). У 5 пациентов по результатам обследования отмечалась классическая триада, у одного пациента возраста 1 год на сегодняшний день не отмечено развитие тугоухости. У двух пациентов также диагностированы иные проявления синдрома Роджерса (у двоих – кардиомиопатия, у одного по в сочетании с ангиопатией сетчатки). По результатам NGS у всех пациентов была обнаружена патогенная гомозиготная мутация с.1223+1G>A в каноническом сайте сплайсинга в гене SLC19A2. При подробном анализе семейного анамнеза наших пациентов нами было обнаружено, что они все проживают на территории Северо-Кавказского федерального округа. Всё это в совокупности позволило нам предположить роль «эффекта основателя» в повышенной частоте развития данного заболевания в этом регионе.

Синдром Роджерса – это тяжелый наследственный синдром, несвоевременная диагностика и терапия которого может привести к тяжелым инвалидизирующим последствиям, вплоть до летального исхода. Выявление нового эндемичного региона, формулировка рекомендаций по диагностике TRMA и проведение просветительской работы среди врачей в регионе может способствовать быстрому выявлению таких детей и их своевременному лечению.

### THE ROLE OF THE FOUNDER EFFECT IN THE DEVELOPMENT OF ROGERS SYNDROME

**M.Kh. Gurzhihanova, T.Y. Salimova, O.V. Goronkova, N.N. Chekanov, R.H. Abasov, N.G. Boyarchuk, E.V. Raikina, M.A. Maschan**

*Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow*

**Background.** Rogers syndrome or thiamine- responsive megaloblastic anemia (TRMA) is a genetically determined hereditary syndrome that develops due to dysfunction of the high-affinity human thiamine transporter 1 (THTR-1). TRMA is characterized by a clinical triad of symptoms: (1) megaloblastic anemia, (2) non-autoimmune diabetes mellitus, and (3) progressive sensorineural hearing loss [Rogers L.E., 1969]. To date, about 100 clinical cases have been described from three endemic regions – the Middle East, South Asia and the northern Mediterranean. In Russia, to date, there are no published clinical cases [Mohsen-Pour N., 2022].

**Aim of research.** To clinically characterize patients with genetically proven Rogers syndrome.

Six patients with genetically established diagnosis of TRMA were analyzed. The median age of patients at the time of diagnosis was 2 years (1 year -16 years), 5 of them were male and one female.

The age of disease manifestation in patients varied from the first months to the first year of life (4 patients presented with anemia and two with hearing loss). In 5 patients the classical triad was noted by physical exam, in one patient of 1 year of age no development of hearing loss has been observed to date. Two patients were also diagnosed with other symptoms of Rogers syndrome (two had cardiomyopathy, one of them in combination with retinal angiopathy). NGS results revealed a pathogenic homozygous c.1223+1G>A mutation in the canonical splice site in the SLC19A2 gene in all patients. When we analyzed the family history of our patients, we found that they all live in the territory of the North Caucasian federal district. All this together allowed us to suggest the role of the "founder effect" in the increased frequency of this disease development in the North Caucasus.

Rogers syndrome is a severe hereditary syndrome, untimely diagnosis and therapy of which can lead to severe disabling complications, up to lethal outcome. Identification of a new endemic region, development of recommendations on TRMA diagnosis and educational work among physicians in the region may contribute to the rapid identification of such children and their timely treatment.

**ПРЕИМУЩЕСТВА НАНОПОРОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ СЛОЖНЫХ ВНУТРИХРОСОМНЫХ ПЕРЕСТРОЕК НА ПРИМЕРЕ ИНВЕРСИЙ-ДУПЛИКАЦИИ С ВОВЛЕЧЕНИЕМ ГЕНОВ RAB27A И PIGB**

**М.Ю. Алексенко, М.Х. Гуржиханова, А.Л. Хорева, Н.Б. Кузьменко, Ю.А. Родина, Р.Х. Абасов, Е.В. Райкина, А.Ю. Щербина, М.А. Масчан**

*НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, Москва*

Секвенирование ДНК методом коротких прочтений (<300 п.о.) – наиболее распространённый на сегодняшний день вариант высокопроизводительного секвенирования. Данный метод наиболее эффективен в отношении точковых мутаций и небольших делеций/инсерций, однако не позволяет достоверно определять изменение числа копий генов и визуализировать сложные структурные варианты. Сложные структурные перестройки описаны при различных генетических заболеваниях. Так, например, комплексная инверсия-дупликация с вовлечением генов RAB27A и PIGB описана В. Tesi et al. (2018) как патогенная у пяти пациентов с атипичным синдромом Грисцелли и гемофагоцитарным лимфогистиоцитозом (ГЛГ). Данный структурный вариант представляет собой комбинацию из дупликации фрагмента первого интрона гена RAB27A длиной около 1 kb и другой, более протяжённой дупликации, вовлекающей гены PIGB и PIGBOS1 (~28 kb). Перестройка сопровождается инверсией фрагмента PIGB-PIGBOS1 и его последующей инсерцией в регион дупликации в первом интроне RAB27A. Перестройка с вовлечением RAB27A и PIGB была выявлена у трёх пациентов, проходивших лечение НМИЦ ДГОИ им. Д. Рогачева в связи с ГЛГ. Полногеномное секвенирование было проведено в ООО «Биотехнологический Кампус» методом длинных прочтений для одного из пациентов и методом коротких прочтений для двух других. Анализ полученных данных выполняли в НМИЦ ДГОИ. Секвенирование методом коротких прочтений позволяет косвенно заподозрить такую перестройку путём оценки покрытия с помощью биоинформатических *in silico* алгоритмов. Оценка покрытия позволяет также определить границы дублицированных участков, однако наиболее подробное представление о перестройке может быть получено при использовании технологий секвенирования на основе длинных прочтений, в частности – с помощью нанопоровых секвенаторов третьего поколения. Такой подход позволяет получать прочтения гораздо большей длины (~5-100 kb), а значит даёт возможность полностью визуализировать перестройку и получить более детализированное представление о ней – не только определить координаты точек разрыва, но и показать изменение направления (инверсию) одного из дублицированных участков.

**ADVANTAGES OF LONG-RANGE NANOPORE SEQUENCING IN DETECTION OF COMPLEX INTRACHROMOSOMAL REARRANGEMENTS ILLUSTRATED BY COMPLEX INVERSION-DUPLICATION INVOLVING THE RAB27A AND PIGB GENES**

**M.Yu. Aleksenko, M.Kh. Gurzhikhanova, A.L. Khoreva, N.B. Kuzmenko, Yu.A. Rodina, R.Kh. Abasov, E.V. Raykina, A.Yu. Shcherbina, M.A. Maschan**

*Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology; Moscow*

Short-read DNA sequencing methods are currently the most commonly used forms of massive parallel sequencing (MPS) and are most effective for detecting of point mutations such as single-nucleotide variants (SNVs) and short indels. Complex structural variants have been previously reported as disease-causing in various genetic diseases. Structural variant involving RAB27A and PIGB genes, has been reported as pathogenic by В. Tesi et al (2018) in five patients with atypical Griscelli syndrome and hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH). This complex rearrangement includes ~1 kb length duplication in 1 intron of RAB27A gene, and ~28 kb duplication involving PIGB and PIGBOS1 genes. At the same time the PIGB-PIGBOS1 fragment was inverted and inserted near duplicated region in first intron of RAB27A gene. Such rearrangement was detected in three patients, treated for HLH in immunology department of Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology (Moscow, Russia). Sequencing was performed at Biotechnology Campus (Moscow, Russia) using the long-read method for one of the patients and using short-read method for the other two. The analysis of the obtained sequencing data was performed at the Dmitry Rogachev National Medical Research Center. Rearrangement of RAB27A and PIGB genes can be captured by coverage depth evaluation using *in silico* bioinformatic tools. Coverage evaluation also allows determine coordinates of both duplicated regions, but the most comprehensive and detailed data about this structural variant can be obtained using nanopore-based technology – third generation sequencing. This approach allows to obtain much longer reads (~5-100 kb), and therefore makes it possible to fully visualize the complex rearrangement and obtain a more detailed information about it – not only determine the coordinates of the breakpoints, but also to show the inversion of one duplicated region.



#### **АНАЛИЗ ВТОРИЧНЫХ НАХОДОК У ВОЛОНТЕРОВ НАЦИОНАЛЬНОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНИЦИАТИВЫ «100 000+Я»**

**И.И. Низамутдинов, А.С. Монахова, Ю.М. Суворова, Н.Н. Чеканов, И.В. Антонов**

*ООО «Биотехнологический кампус», Москва*

Целью исследования была оценка частот встречаемости среди волонтеров инициативы «100 000+Я» патогенных вариантов, приводящих к развитию моногенных заболеваний, проявляющихся во взрослом возрасте, и выявление наиболее часто встречающихся подобных вариантов в различных регионах и этносах России. Для анализа использовались полногеномные последовательности волонтеров инициативы «100 000+Я» со средним покрытием 30x и более. Анализировались патогенные и вероятно патогенные по базе данных ClinVar варианты в генах, связанных с заболеваниями в соответствии с рекомендациями ACMG по «вторичным находкам» (ACMG SF v3.2). Оценка частот встречаемости проводилась как для доминантных, так и для рецессивных и X-сцепленных заболеваний.

В ходе работы были проанализированы полные геномы более 32 тысяч волонтеров, проживающих в разных регионах РФ (от каждого волонтера получено информированное согласие на проведение анализа). Определены частоты встречаемости/носительства более 25000 патогенных мутаций в 89 генах, вызывающих 40 различных моногенных заболеваний. Дополнительно проанализированы частоты встречаемости/носительства среди различных этнических групп. Далее проведено сравнение полученных частот с соответствующими частотами из БД gnomAD. Также проведен поиск новых, ранее не описанных вариантов в исследуемых генах.

Полученные результаты позволили определить частоты встречаемости патогенных вариантов, приводящих к моногенным заболеваниям во взрослом возрасте. Данный анализ был проведен как для популяции в целом, так и для отдельных этнических групп. В исследуемых генах были выявлены ранее не описанные аллели, которые также могут быть патогенными.

#### **ANALYSIS OF SECONDARY FINDINGS FROM VOLUNTEERS OF THE NATIONAL GENETIC INITIATIVE "100,000+ME"**

**I.I. Nizamutdinov, A.S. Monahova, Y.M. Suvorova, N.N. Chekanov, I.V. Antonov**

*Biotechnology Campus LLC, Moscow*

The aim of the study was to assess the frequencies of pathogenic mutations causing monogenic diseases manifesting in adulthood among volunteers of the national initiative

“100,000+Me”, as well as identifying the most common such mutations in various regions and ethnic groups of Russia. For the analysis, we used volunteers’ genome sequences with an average coverage of 30X. The list of diseases and genes was compiled according to ACMG recommendations. The list of pathogenic mutations was selected from the ClinVar database. Frequencies were estimated out for both dominant and recessive and X-linked alleles.

During the study, we analyzed the whole genomes of more than 32 thousand volunteers living in different regions of the Russia (All volunteers signed informed consent before participating in the study). The frequencies of more than 25,000 pathogenic mutations in 89 genes causing 40 different monogenic diseases was determined. Additionally, the frequencies of these mutations were analyzed among different ethnic groups. The obtained frequencies were compared with the corresponding frequencies from the gnomAD database. Also, a search was carried out for new, previously undescribed variants in the genes under study.

The obtained results made it possible to assess the frequencies of pathogenic mutations causing monogenic diseases manifesting in adulthood. The analysis was carried out both for the whole population and for individual ethnic groups. Previously undescribed alleles were identified in the studied genes, which potentially can also be pathogenic.

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ - УЧАСТНИКОВ ПОСТИНТЕГРАЦИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ВИЧ-1

**А.Н. Анисенко, О.Е. Щигал, Ю.Ю. Агапкина, С.П. Королев, М.Б. Готтих**

*МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва*

Важной проблемой при лечении ВИЧ-инфекции является возникновение лекарственно устойчивых форм вируса, что делает актуальной разработку новых подходов к ингибированию ВИЧ-1, способных свести к минимуму появление резистентных штаммов. Решение этой проблемы невозможно без детального понимания механизмов всех стадий репликации вируса и выявления новых мишеней для антиретровирусной терапии. Наименее изученным этапом репликации ВИЧ-1 является репарация повреждений, возникающих в геноме клетки при интеграции в нее кДНК вируса. Без постинтеграционной репарации генома репликация вируса невозможна. Считается, что такая репарация осуществляется клеточными белками, однако точно неизвестно, какие именно клеточные белки вовлечены в этот процесс.

Ранее нами было показано, что ключевую роль в этом процессе играют киназы DNA-ПК и АТМ - известные участники систем репарации двуцепочечных разрывов ДНК. Их активация строго зависит от способности интегразы ВИЧ-1 взаимодействовать с одной из субъединиц DNA-ПК комплекса – белком Ku70.

Для выяснения других клеточных белков, вовлеченных в постинтеграционную репарацию, мы проанализировали изменение клеточного фосфопротеома в ответ на трансдукцию клеток псевдовиром на основе генома ВИЧ-1. В результате было установлено, что через 14 и 18 часов после трансдукции повышается уровень фосфорилирования около 300 белков, в том числе 28 - из систем репарации ДНК. С использованием CRISPR-Cas9 библиотеки к генам из систем клеточного ответа на повреждения ДНК нам удалось идентифицировать 11 потенциальных участников постинтеграционной репарации, включая ранее изученные нами факторы Ku70 и Ku80. Для двух новых кандидатов: Fen1 и Plk1, – подтверждена роль в постинтеграционной репарации ВИЧ-1 с использованием клеток с пониженной экспрессией указанных генов.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ 22-14-00073.*

## IDENTIFICATION OF CELLULAR PROTEINS - PARTICIPANTS OF HIV-1 POST-INTEGRATION REPARATION

**A.N. Anisenko, O.E. Shchigal, Yu.Yu. Agapkina, S.P. Korolev, M.B. Gottikh**

*Lomonosov Moscow State University, Moscow*

An important problem in the treatment of HIV infection is the emergence of drug-resistant forms of the virus. Therefore, the development of new approaches to inhibiting HIV-1 that can minimize the emergence of resistant strains is relevant. The solution to this problem is impossible without a detailed understanding of the mechanisms of all stages of virus replication and the identification of new targets for antiretroviral therapy. The least studied stage of HIV-1 replication is the repair of damage that occurs in the cell genome in the course of the integration of viral cDNA. Without post-integration repair of the genome, viral replication is impossible. It is considered that such repair is carried out by cellular proteins, but it is not exactly known which cellular proteins are involved in this process.

We have previously shown that the key role in this process is played by DNA-PK and ATM kinases - known participants in the systems of repair of double-stranded DNA breaks. Their activation strictly depends on the ability of HIV-1 integrase to interact with one of the subunits of the DNA-PK complex - the Ku70 protein.

To identify other cellular proteins involved in post-integration repair, we analyzed changes in the cellular phosphoproteome in response to cell transduction with a pseudovirus based on the HIV-1 genome. As a result, it was found that 14 and 18 hours after transduction, the phosphorylation level of about 300 proteins increases, including 28 proteins from the DNA repair systems. Using a CRISPR-Cas9 library of genes from the cellular response systems to DNA damage, we could identify 11 potential participants in post-integration repair, including the previously studied Ku70 and Ku80 factors. For two new candidates, Fen1 and Plk1, their role in HIV-1 post-integration repair was confirmed using cell lines with reduced expression of these genes.

*The work was supported by the Russian Science Foundation grant 22-14-00073.*

### МУЛЬТИ-ОМИКСНОЕ ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО ПРОФИЛЯ ОПУХОЛЕВОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ HepG2

**В.А. Арзуманян, М.А. Пятницкий, И.В. Вахрушев, К.Г. Птицин, С.П. Радько, В.Г. Згода, О.И. Киселева, Е.В. Поверенная**  
*НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва*

Благодаря достижениям в высокопроизводительных технологиях, современная наука может анализировать геном, эпигеном, экзом, транскриптом, протеом и метаболом на уровне отдельных клеток и тканей, что позволяет комплексно изучать молекулярные процессы. В исследованиях часто используются клеточные линии из-за их доступности, стабильности и функциональной схожести с оригинальными клетками. Клеточная линия HepG2, являющаяся четвертой по популярности, широко используется в токсикологических и метаболических исследованиях благодаря сохранению ключевых свойств гепатоцитов. Однако, несмотря на частое использование, для клеточных линий, включая HepG2, не проводилось полноценного анализа и сопоставления омикс данных. Для построения портрета мы использовали ранее полученные нами данные для одного образца, включающие результаты полногеномного (WGS), метиломного (WGBS), транскриптомного (RNA-seq), транслятомного (Polysome-seq) и протеомного (LC-MS/MS) профилирования. Для оценки гетерогенности клеточной линии HepG2 анализировали полногеномные и транскриптомные данные, опубликованные в базе данных NCBI SRA, а также результаты протеомных исследований, доступных в ресурсе PRIDE.

Результаты нашего исследования показали, что линия HepG2 демонстрирует высокую стабильность на уровне генома и транскриптома, однако образцы из Китая требуют особого внимания при интерпретации транскриптомных и протеомных данных. Генотип HepG2 характеризуется устойчивыми хромосомными перестройками, такими как транслокация между хромосомами 1p и 21p, тетрасомия хромосомы 20, утрата короткого плеча SAT-хромосом и длинного плеча Y-хромосомы. На уровне транскриптома экспрессируются 12 602 гена, из которых 10 461 детектируются на уровне транслятов, а на уровне протеома идентифицировано лишь 1027 генов, что объясняется ограниченной чувствительностью методов масс-спектрометрии.

В результате проведенный анализ омикс данных позволил создать подробный молекулярный портрет клеточной линии HepG2, который отображает мультиомный профиль каждого гена.

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

### MULTI-OMICS STUDY OF THE MOLECULAR PROFILE OF THE HEPG2 TUMOR CELL LINE

**V.A. Arzumanyan, M.A. Pyatnitsky, I.V. Vakhrushev, K.G. Ptitsyn, S.P. Radko, V.G. Zgoda, O.I. Kiseleva, E.V. Povernyennaya**  
*Institute of Biomedical Chemistry, Moscow*

Thanks to the advancements in high-capacity technologies, current scientific research is capable of analyzing the genome, epigenome, exome, transcriptome, proteome, and metabolome at the level of individual cells and tissues, enabling a comprehensive study of molecular processes. Cell lines, with their availability, stability, and functional similarity to original cells, are often the subject of our research. The HepG2 cell line, the fourth most popular, is widely used in toxicological and metabolic studies due to its retention of fundamental properties of hepatocytes. Our study, which is the first of its kind, has conducted a complete analysis and comparison of omics data for cell lines, including HepG2, providing a comprehensive understanding of its molecular profile.

To create a profile, we used previously obtained data for a single sample, which includes the results of whole-genome (WGS), methylome (WGBS), transcriptome (RNA-seq), translatoome (Polysome-seq), and proteome (LC-MS/MS) profiling. To assess the heterogeneity of the HepG2 cell line, we analyzed whole-genome and transcriptome data published in the NCBI SRA database, as well as proteomic data available in the PRIDE resource.

Our study results showed that the HepG2 cell line demonstrates high stability at the genome and transcriptome levels. However, it is crucial to note that samples from China require special attention when interpreting transcriptomic and proteomic data. The HepG2 genotype is characterized by stable chromosomal rearrangements, such as a translocation between chromosomes 1p and 21p, tetrasomy of chromosome 20, loss of the short arm of SAT chromosomes, and the long arm of the Y chromosome. At the transcriptome level, 12,602 genes are expressed, of which 10,461 are detected at the translatoome level, and only 1,027 genes are identified at the proteome level, which is explained by the limited sensitivity of mass spectrometry methods.

As a result, the omics data analysis allowed us to create a detailed molecular portrait of the HepG2 cell line, reflecting each gene's multi-omic profile.

*The work was performed within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021-2030) (№122030100168-2).*

## МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ОСНОВАНИЯ В СОСТАВЕ мяРНК U2 И U6 ВАЖНЫ ДЛЯ ПОДДЕРЖАНИЯ ОПТИМАЛЬНОЙ СКОРОСТИ СПЛАЙСИНГА

А.К. Болихова<sup>1,2,3</sup>, А.И. Буян<sup>3,4</sup>, С.С. Марьясина<sup>2,3</sup>, О.А. Донцова<sup>1,2,3</sup>, П.В. Сергиев<sup>1,2,3,5</sup>

<sup>1</sup>Сколковский институт науки и технологий, Москва; <sup>2</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва; <sup>3</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва; <sup>4</sup>Институт белка РАН, Пушкино; <sup>5</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова, Институт функциональной геномики, Москва

Сплайсинг – процесс удаления интронов из первичных транскриптов эукариот, осуществляемый сплайсосомным комплексом из пяти малых ядерных РНК (мяРНК) и разнообразных белков. Множество сайтов внутри мяРНК модифицируются посттранскрипционно, однако роль данных модификаций часто малоизучена.

В данной работе мы стремились понять роль модифицированных нуклеотидов m6Am30 в мяРНК U2 и m2G72 в мяРНК U6. Для проведения анализа на основании клеток HeLa S3 получили две клеточных линии с нокаутом генов, кодирующих метилтрансферазы METTL4 и THUMP2. Показано, что первый белок метилирует Am30 в мяРНК U2, а второй G72 в мяРНК U6. Чтобы оценить всевозможные изменения сплайсинга при исчезновении каждой из модификаций провели мечение 5-этилилуридином ново-синтезированной РНК в трех линиях клеток (диком типе и двух линиях с нокаутом). При сравнении количества нессплайсированной и сплайсированной формы каждого интрона через 20 минут и 24 часа после добавления 5-этилилуридина была получена скорость преобразования каждого сайта сплайсинга в клетке. Полученные данные позволили оценить изменения сплайсинга, произошедшие после исчезновения каждой из модификаций.

Для обеих нокаутных клеточных линий было замечено малое по амплитуде, общее замедление сплайсинга, а также снижение аккуратности работы сплайсосомы, однако без значительной зависимости от конкретных характеристик сайтов сплайсинга, таких как длина интрона, или его положение на транскрипте. Как следствие более медленного сплайсинга в обеих клеточных линиях наблюдали накопление интронов по сравнению с диким типом.

Обобщая, метилирование оснований Am30 в мяРНК U2 и G72 в мяРНК U6 имеет общий характер и важно для обеспечения оптимальной скорости и точности сплайсинга.

## MODIFIED BASES IN U2 AND U6 snRNAs ARE IMPORTANT FOR MAINTAINING OPTIMAL SPLICING RATE

A.K. Bolikhova<sup>1,2,3</sup>, A.I. Buyan<sup>3,4</sup>, S.S. Mariasina<sup>2,3</sup>, O.A. Dontsova<sup>1,2,3</sup>, P.V. Sergiev<sup>1,2,3,5</sup>

<sup>1</sup>Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow; <sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University, A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow; <sup>3</sup>Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Moscow; <sup>4</sup>Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino; <sup>5</sup>Lomonosov Moscow State University, Institute of Functional Genomics, Moscow

Splicing is the process of removing introns from primary eukaryotic transcripts, carried out by the spliceosomal complex of five small nuclear RNAs (snRNAs) and various proteins. Many sites within snRNAs are modified posttranscriptionally, but the role of these modifications is often poorly understood.

In this work, we aim to understand the role of the modified nucleotides m6Am30 in U2 snRNA and m2G72 in U6 snRNA. To carry out the analysis, two cell lines with knockout of the genes encoding methyltransferases METTL4 and THUMP2 were obtained using HeLa S3 cells. It is known that the first protein methylates Am30 in U2 snRNA, and the second G72 in U6 snRNA. To evaluate all possible changes in splicing upon the disappearance of each modification, 5-Ethynyl-uridine labeling of nascent RNA was carried out in three cell lines (wild type and two lines with knockouts). By comparing the amount of unspliced and spliced forms of each intron 20 minutes and 24 hours after the addition of 5-Ethynyl-uridine, the conversion rate of each splice site in the cell was obtained. The data obtained allowed us to evaluate the changes in splicing that occurred after the disappearance of each modification.

For both knockout cell lines, a slight but global slowdown in splicing was observed, as well as a decrease in spliceosome fidelity, but without significant dependence on specific characteristics of the splice sites, such as intron length or position on the transcript. As a consequence of slower splicing, a general accumulation of introns was observed in both cell lines compared to the wild type.

Summarizing, methylation of bases Am30 in U2 snRNA and G72 in U6 snRNA is important for optimal splicing speed and fidelity.

## ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ СМЕСЕЙ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ МЕТОДАМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

А.Г. Бржозовский, А.С. Кононихин, А.Е. Бугрова, С.Д. Семёнов, О.А. Ковалёва, Ю.В. Жернов, М.Н. Юрова, Е.И. Федорос, Е.Н. Николаев

*Сколковский институт науки и технологий, Москва*

Целью данной работы является исследование гепатопротекторной активности многокомпонентных смесей природного происхождения *in vivo* на модели «подострого» поражения печени у самок мышей линии BALB/c, индуцированного токсином – четыреххлористым углеродом (CCL4). Была проведена оценка гепатопротекторной активности препарата окисленного гидролизованного лигнина (BP-Cx-1), гуминовых кислот пелоидов (PelHA) и изофлавонов из корней кудзу, пуэрарии долбчатой (ISF).

В рамках данной работы были проанализированы по 62 образца мочи и печени. Для анализа протеомной композиции печени к 10-20 мг ткани, растертой в порошок в жидком азоте, добавляли лизирующий буфер, содержащий коктейль ингибиторов протеаз (Roche). Образцы растворяли в 8М мочеvine (в 0,1М Tris-HCL pH 8.5), затем добавляли ДТТ до конечной концентрации 0,1М и инкубировали в течении 30 мин при 37°C. Для гидролиза использовали 50мкг белка, в качестве протеолитического фермента использовался трипсин (Promega gold, США. Анализ смеси триптических пептидов проводился на ВЭЖХ-системе Dionex Ultimate 3000, соединенной с масс-спектрометром TIMS TOF Pro, с использованием метода сбора данных с помощью параллельного накопления и последовательной фрагментации (PASEF) в режиме DDA. Полученные данные были проанализированы с использованием программного обеспечения PEAKS Studio 11, с использованием следующих параметров: погрешность измерения массы родительского иона – 20 ppm; погрешность массы фрагмента – 0,01 Да. Дополнительно была проанализирована метаболитная фракция мочи на приборе Apex Ultra ИЦР МС.

По результатам исследования молекулярного состава (метаболом, протеом) образцов от экспериментальных животных в модели подострого поражения печени было показано, что гепатопротекторная эффективность исследуемых многокомпонентных смесей природного происхождения сопровождается закономерными изменениями метаболомного и протеомного профиля состава мочи и печени. Выявленные изменения наиболее выражены при применении изофлавонов из корней кудзу (ISF). Возможно, данное преимущество связано с более низкой молекулярной массой активных изовлавоноидов по сравнению с компонентами полифенольного препарата BP-Cx-1.

*Работа выполнена в рамках гранта РНФ РНФ № 22-75-10140 от (28.07.2022).*

## THE MECHANISM OF HEPATOPROTECTIVE ACTIVITY OF MULTICOMPONENT MIXTURES OF NATURAL ORIGIN STUDIED BY MASS SPECTROMETRY BASED OMICS TECHNOLOGIES

A.G. Brzhozovskiy, A.S. Kononikhin, A.E. Bugrova, S.D. Semenov, O.A. Kovaleva, Yu.V. Zhernov, M.N. Yurova, E.I. Fedoros, E.N. Nikolaev

*Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow*

The aim of this study is to investigate the hepatoprotective activity of multicomponent mixtures of natural origin using *in vivo* models of BALB/c mice with “subacute” liver damage induced by the carbon tetrachloride (CCL4). In this study the hepatoprotective activity of activated hydrolytic lignin (BP-Cx-1), humic acid peloids (PelHA) and isoflavones from kudzu, Pueraria lobata (ISF) roots was evaluated.

In this study, 62 urine and liver samples were evaluated. In order to analyze the proteomic composition of the liver, lysis buffer containing a protease inhibitor cocktail (Roche) was added to 10-20 mg of tissue ground into powder in liquid nitrogen. Samples were dissolved in 8M urea (in 0.1M Tris-HCL pH 8.5), then DTT was added (final concentration of 0.1M) and incubated for 30 min at 37°C. For proteolysis trypsin (Promega gold, USA) was added to 50 µg of protein. The tryptic peptide mixture was analyzed on a Dionex Ultimate 3000 HPLC system coupled to a TIMS TOF Pro mass spectrometer using the parallel accumulation and sequential fragmentation (PASEF) acquisition method in DDA mode. The obtained data were analyzed using PEAKS Studio 11 software, using the following parameters: parent ion mass measurement error – 20 ppm; fragment mass error – 0.01 Da. Additionally, the metabolomic fraction of urine was analyzed on an Apex Ultra ICR MS.

Based on the results of a study of the molecular composition (metabolome, proteome) of samples from experimental animals in a model of subacute liver damage, it was shown that the hepatoprotective effectiveness of the studied multicomponent mixtures of natural origin is accompanied by natural changes in the metabolomic and proteomic profile of the composition of urine and liver. The observed changes are most pronounced when using isoflavones from kudzu roots (ISF). This advantage may be due to the lower molecular weight of the active isoflavonoids compared to the components of the polyphenolic drug BP-Cx-1.

*The work was carried out within the framework of the Russian Science Foundation grant No. 22-75-10140 dated (07/28/2022).*

### ВЛИЯНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ДЕТЕРМИНАНТ МРНК НА ИНИЦИАЦИЮ ТРАНСЛЯЦИИ В *E. COLI*

Д.С. Виноградова<sup>1,2</sup>, П.С. Касацкий<sup>1</sup>, Е.В. Полесскова<sup>1,3</sup>, А.Л. Конева<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина;

<sup>2</sup>NanoTemper Technologies Rus, Санкт-Петербург; <sup>3</sup>Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург; <sup>4</sup>НИЦ «Курчатовский институт», Москва

В условиях канонической инициации трансляции в бактериальной клетке происходит формирование 30S инициаторного комплекса (30S IC), где при участии инициаторных факторов (IFs) инициаторная fMet-tRNA<sup>fMet</sup> связывается с мРНК в Р сайте рибосоме. После ассоциации большой 50S субъединицы стадия инициации завершается формированием зрелого 70S IC. IF3 связывается с 30S субъединицей рибосомы и обеспечивает пул свободных 30S субъединиц для инициации трансляции. Кроме того, IF3 имеет неканонический сайт связывания с 50S субъединицей рибосомы [1], участвующий в 70S-опосредованной инициации трансляции. В данном случае 70S рибосома не диссоциирует после терминирования, а сканирует мРНК в поисках близлежащей последовательности Шайна–Дальгарно (ШД). Данный процесс зависит от наличия вторичных структур и их стабильности в 5'-нетранслируемой области (5'-НТО) мРНК, а также от присутствия IF1. При этом связывание 70S с мРНК не гарантирует формирование продуктивного 70S IC [2]. Мы анализировали эффективность инициации трансляции по каноническому типу и в условиях 70S сканирования в зависимости от изменений в длине последовательности ШД, ее удаленности от стартового кодона, а также в присутствии вторичных структур. Аффинность мРНК, содержащей 2 нуклеотида в последовательности ШД на удалении 7 нуклеотидов от стартового кодона, была выше к 70S рибосоме в 65 раз по сравнению с 30S субъединицей. Присутствие вторичной структуры в области стартового кодона со свободной энергией сворачивания – 15 ккал/моль стимулировало повышение аффинности связывания таких мРНК к 70S рибосоме по сравнению к 30S субъединице до 200 раз. Эффективность связывания всех мРНК зависела от присутствия IF3 и IF1 для обоих типов инициации трансляции независимо от изучаемой вариативности мРНК.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда 23-74-10088.

1. Goyal A et al. Non-canonical binding site for bacterial initiation factor 3 on the large ribosomal subunit. *Cell Rep.* 2017, 20(13): 3113-31222.
2. Hiroshi Yamamoto et al. 70S-scanning initiation is a novel and frequent initiation mode of ribosomal translation in bacteria. *PNAS* 2016, 113(9): E1180-9.

### INFLUENCE OF FUNCTIONAL DETERMINANTS OF mRNA ON TRANSLATION INITIATION IN *E. COLI*

D.S. Vinogradova<sup>1,2</sup>, P.S. Kasatsky<sup>1</sup>, A.V. Paleskava<sup>1,3</sup>, A.L. Koneva<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>B.P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, NRC «Kurchatov Institute», Gatchina; <sup>2</sup>NanoTemper Technologies Rus, St Petersburg; <sup>3</sup>Peter the Great St Petersburg Polytechnic University, St Petersburg; <sup>4</sup>NRC Kurchatov Institute, Moscow

Under conditions of canonical translation initiation in a bacterial cell, the 30S initiation complex (30S IC) is formed, where, with the participation of initiation factors (IFs), the initiator fMet-tRNA<sup>fMet</sup> binds to mRNA in the P site of the ribosome. After association of the large 50S subunit, the initiation stage is completed by the formation of the mature 70S IC. IF3 binds to the 30S subunit of the ribosome and provides a pool of free 30S subunits for translation initiation. In addition, IF3 has a non-canonical binding site for the 50S subunit of the ribosome [1], which is involved in 70S-mediated translation initiation. In this case, the 70S ribosome does not dissociate after termination, but scans the mRNA in search of a nearby Shine-Dalgarno (SD) sequence. This process depends on the presence of secondary structures and their stability in the 5'-untranslated region (5'-UTR) of mRNA, as well as on the presence of IF1. However, the binding of 70S to mRNA does not guarantee the formation of a productive 70S IC [2]. We analyzed the efficiency of translation initiation by the canonical type and under 70S scanning conditions depending on changes in the length of the SD sequence, its distance from the start codon, and the presence of secondary structures. The affinity of mRNA containing 2 nucleotides in the SD sequence at a distance of 7 nucleotides from the start codon was 65 times higher for the 70S ribosome compared to the 30S subunit. The presence of a secondary structure in the region of the start codon with a free energy of folding of 15 kcal/mol stimulated an increase in the binding affinity of such mRNAs to the 70S ribosome compared to the 30S subunit by up to 200 times. The binding efficiency of all mRNAs depended on the presence of IF3 and IF1 for both types of translation initiation, regardless of the studied mRNA variability.

The work was supported by the grant of the Russian Science Foundation 23-74-10088.

1. Goyal A et al. Non-canonical binding site for bacterial initiation factor 3 on the large ribosomal subunit. *Cell Rep.* 2017, 20(13): 3113-31222.
2. Hiroshi Yamamoto et al. 70S-scanning initiation is a novel and frequent initiation mode of ribosomal translation in bacteria. *PNAS* 2016, 113(9): E1180-9.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ САЙТОВ ТРАНСКРИПЦИИ *GALLUS GALLUS* 7

В.А. Грушина, С.С. Пинтус

АННО ВО университет "Сириус", нгт Сириус

Анализ промоторных областей генов часто выявляет расхождения с существующими аннотациями, что может быть обусловлено как недостаточной точностью текущих аннотаций, так и присутствием ранее неизвестных транскриптов, активирующихся в специфических, нестандартных условиях [1]. Включение данных экспериментов CAGE позволяет более точно определять начальные позиции таких транскриптов и выявлять события смещения промотора. В данном исследовании мы предсказали сайты начала транскрипции (TSS) в геноме курицы и оценили их экспрессию на основе данных, полученных из CAGE-экспериментов, включая проект FANTOM5. В качестве эталона для сравнения и валидации координат TSS использовались сборки генома galGal6 и galGal7 Ensembl и Refseq. Для выравнивания чтений CAGE по использовался STAR, после чего пики CAGE были кластеризованы с использованием DPII. Координаты TSS и альтернативные сайты транскрипции были определены с применением пакета CageFightR. В результате, были обнаружены различия между предсказанными TSS в FANTOM5 и аннотациями генома курицы версии 6 в Ensembl и Refseq, а также между повторно выровненными чтениями FANTOM5 относительно генома версии 7 и аннотациями генома курицы версии 7 в Ensembl и Refseq. Данные проекта FANTOM5 были повторно аннотированы к galGal7, что позволило провести валидацию TSS, полученных в результате анализа новых данных CAGE. Мы предсказали и аннотировали TSS в геноме курицы на основе новых экспериментов CAGE для различных тканей. Полученные TSS были сопоставлены с аннотациями Ensembl и Refseq galGal7 с использованием методов интервальной арифметики. Далее были идентифицированы и аннотированы статистически значимые альтернативные TSS в геноме курицы на основе данных проекта FANTOM5 и новых экспериментальных данных CAGE. Результаты свидетельствуют о том, что некоторые гены характеризуются феноменом смещения начала транскрипции, проявляющимся в специфических условиях.

*Работа поддержана грантом РФ (24-24-20106).*

1. Anderson WD, Duarte FM, Civelek M, Guertin MJ. Defining data-driven primary transcript annotations with primaryTranscriptAnnotation in R. *Bioinformatics* 2020, 36(9): 2926–2928.

## IDENTIFICATION OF ALTERNATIVE TRANSCRIPTION SITES *GALLUS GALLUS* 7

V.A. Grushina, S.S. Pintus

Sirius University of Science and Technology, Sirius

Analysis of promoter regions of genes often reveals discrepancies with existing annotations, which may be due to both insufficient accuracy of current annotations and the presence of previously unknown transcripts activated under specific, non-standard conditions [1]. The inclusion of these CAGE experiments are more accurately determine the initial positions of such transcripts and identify promoter displacement events. In this study, we predicted transcription initiation sites (TSS) in the chicken genome and evaluated their expression based on data obtained from CAGE experiments, including the FANTOM5. The assemblies of the galGal6 and galGal7 Ensembl and Refseq genomes were used as a reference for comparing and validating TSS coordinates. STAR was used to align the CAGE reads, after which the CAGE peaks were clustered using DPII. The TSS coordinates and alternative TSS were determined using the CageFightR. As a result, differences were found between the predicted TSS in FANTOM5 and the annotations of the chicken genome version 6 in Ensembl and Refseq, as well as between the re-aligned readings of FANTOM5 relative to the genome version 7 and the annotations of the chicken genome version 7 in Ensembl and Refseq. The data of the FANTOM5 were re-annotated to galGal7, which allowed for the validation of TSS obtained as a result of the analysis of new CAGE data.

We predicted and annotated TSS in the chicken genome based on new CAGE experiments for various tissues. The obtained TSS were compared with the annotations of Ensembl and Refseq galGal7 using interval arithmetic methods. Next, statistically significant alternative TSS in the chicken genome were identified and annotated based on data from the FANTOM5 project and new experimental CAGE data. The results indicate that some genes are characterized by the phenomenon of displacement of the beginning of transcription, manifested in specific conditions.

*The work was supported by an RNF grant (24-24-20106).*

1. Anderson WD, Duarte FM, Civelek M, Guertin MJ. Defining data-driven primary transcript annotations with primaryTranscriptAnnotation in R. *Bioinformatics* 2020, 36(9): 2926–2928.

## МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ *DE NOVO* СЕКВЕНИРОВАНИЕ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РОЛИ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН В ПАТОГЕНЕЗЕ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Д.Д. Емекеева, И.А. Тарасова

*Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе ФИЦ ХФ РАН им. Н.Н. Семенова, Москва*

Болезнь Альцгеймера (БА) – наиболее распространенная форма деменции, сопровождающаяся когнитивной, двигательной дисфункцией, патогенез которой недостаточно изучен. Изучение изменений первичной структуры белков, посредством масс-спектрометрического *de novo* секвенирования, может способствовать выявлению ключевых молекулярных механизмов, лежащих в основе развития БА. Разработанный программный конвейер, предназначенный для идентификации аминокислотных замен (АКЗ) в белках, в частности участвующих в патогенезе БА, обеспечивает новый подход к исследованию этого нейродегенеративного заболевания. Исследование проводилось с использованием опубликованных масс-спектрометрических данных, полученных на белковых гидролизатах префронтальной коры и височной доли головного мозга пациентов с болезнью Альцгеймера и контрольных групп, взятых посмертно.

Разработанная методика анализа показала аминокислотные замены в последовательности белков, которые далее были классифицированы как продукты пост-трансляционных модификаций (ПТМ), несинонимичных замен нуклеотида, а также последствия неспецифического действия тРНК. Идентифицированные белки с аминокислотными заменами были охарактеризованы как участвующие в патогенезе БА. При анализе однонуклеотидных замен были предсказаны патогенные замены нуклеотидов, влекущие АКЗ. Среди них было выявлено 11 клинически подтвержденных продуктов замены нуклеотида, среди них HBB Q128E, GFAP N77D, NEFL N98D являются патогенными.

Анализ показал, что алгоритм применим для слепой идентификации ПТМ. В образцах мозга пациентов с БА было выявлено 33 белка, демонстрирующие значительное обогащение деаминации аспарагина. Функциональная активность этих белков связана с метаболическими процессами, включая гликолиз.

Были обнаружены белки, АКЗ на которых соответствуют редактированию заряженной тРНК, что может быть связано с уменьшением активности аминоацил-тРНК синтетазы. Функции таких белков связаны с транспортом металлов, фолдингом белка и АТФ-связыванием. Результаты свидетельствуют о том, что разработанная методика анализа аминокислотных замен поможет извлечь новую информацию, характеризующую развитие и прогрессирование БА. Дальнейшие исследования необходимы для определения функциональных последствий этих замен и их роли в патогенезе болезни Альцгеймера.

*Поддержано грантом РФФ 23-45-00012.*

## MASS SPECTROMETRY-BASED *DE NOVO* SEQUENCING TO STUDY THE ROLE OF AMINO ACID SUBSTITUTIONS IN THE PATHOGENESIS OF ALZHEIMER'S DISEASE

D. Emekeeva, I. Tarasova

*Talroze Institute for Energy Problems of Chemical Physics, Semenov Federal Research Center of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow*

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia, characterized by cognitive and motor impairment. The pathogenesis of this disease is not fully understood, but research into changes in the primary structure of proteins through mass spectrometry based *de novo* sequencing can help identify key molecular mechanisms involved in AD development. The software pipeline developed to identify amino acid substitutions (AASs) in proteins, including those involved in AD pathogenesis, provides a novel approach to understanding this neurodegenerative disorder. The study used published mass spectrometry data from protein hydrolysates obtained from the prefrontal cortex and temporal lobes of the brains of patients with AD and control groups, collected post-mortem.

The developed analysis technique identified amino acid substitutions in protein sequences, which were classified as products of post-translational modifications (PTMs), non-synonymous nucleotide substitutions, and the consequences of nonspecific tRNA action. Proteins with AASs identified are involved in AD pathogenesis.

In the analysis of single-nucleotide substitutions, pathogenic ones were predicted to entail AASs. Among these, 11 nucleotide replacement products have been clinically confirmed, including HBB Q128E, GFAP N77D, NEFL N98D, which are pathogenic. The analysis showed that the algorithm is applicable for blind identification of PTMs, 33 proteins were identified in the brain samples of patients with AD, demonstrating significant enrichment of asparagine deamidation. The functional activity of these proteins is associated with metabolic processes, including glycolysis.

Proteins have been found that correspond to editing of charged tRNAs, which may be related to decreased activity of aminoacyl-tRNA synthetases. The functions of these proteins relate to metal transport, protein folding and ATP binding. The results indicate that the developed method for amino acid substitutions search can help extract new information about the development and progression of Alzheimer's disease. Further research is required to determine the functional effects of these substitutions and their roles in the pathogenesis of AD.

*This work was performed with financial support from the Russian Science Foundation, grant no. RSF 23-45-00012.*



## АНАЛИЗ КИШЕЧНОГО ВИРОМА ПАЦИЕНТОВ С МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ МЕЛАНОМОЙ

**Н.В. Захаревич, Е.И. Олехнович, К.М. Климина**

*ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва*

В последнее время кишечная микробиота была признана новым значимым компонентом в патогенезе и лечении злокачественной меланомы. У людей с злокачественной меланомой происходят изменения в кишечной микробиоте, как в бактериальной составляющей, так и в популяции фагов. Несмотря на возросший в последнее время интерес к анализу кишечного виroma, на сегодняшний день нет работ в которых бы анализировался виром ответивших и не ответивших на иммунотерапию онкологических больных. В случае кишечного виroma, мы считаем, что роль фагов во влиянии на структуру и функции кишечной микробиоты недооценена. Например, фаги наравне с бактериями способны усиливать ответ на иммунотерапию, индуцируя Т-клетки, перекрестно реагирующие с раковыми антигенами. Также при помощи фагов, нацеленных на определенные таксоны бактерий, можно успешно снизить патогенную нагрузку, часто сопровождающую злокачественные опухоли.

В нашем исследовании мы изучаем возможность применения фагов из кишечной микробиоты в качестве прогностических биомаркеров исхода иммунотерапии. Для этого мы проводим масштабный анализ метагеномов кишечной микробиоты от пациентов с злокачественной меланомой с различным ответом на анти-PD1 терапию из открытых источников. Модулирование популяции бактерий при помощи фагов может стать новым инновационным подходом для увеличения частоты ответов на иммунотерапию. А выяснение взаимосвязи между бактериальной составляющей кишечной микробиоты и бактериофагами на фоне иммунотерапии злокачественной меланомы может значительно улучшить наше понимание протекания заболевания и найти новые способы для усовершенствования существующих протоколов лечения.

*Финансирование: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (№ 23-75-10125, <https://rscf.ru/project/23-75-10125/>).*

## GUT VIROME OF PATIENTS WITH METASTATIC MELANOMA ANALYSIS

**N.V. Zakharevich, E.I. Olekhovich, K.M. Klimina**

*Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of FMBA, Moscow, Russia*

Recently, the gut microbiota has been recognized as a new important component in the pathogenesis and treatment of malignant melanoma. In people with malignant melanoma, there are changes in the gut microbiota, both in the bacterial component and in the phage population. Despite the recent increased interest in the analysis of the gut virome, to date there are no studies that have analyzed the virome of responders and non-responders to immunotherapy in cancer patients. In the case of the gut virome, we believe that the role of phages in influencing the structure and function of the gut microbiota is underestimated. For example, phages, like bacteria, can enhance the response to immunotherapy by inducing T cells that cross-react with cancer antigens. Phages targeting specific bacterial taxa can also successfully reduce the pathogenic load that often accompanies malignant tumors.

In our study, we explore the potential of gut microbiota-derived phages as prognostic biomarkers for immunotherapy outcome. To do so, we conduct a large-scale analysis of gut microbiota metagenomes from open-source malignant melanoma patients with varying responses to anti-PD1 therapy. Modulating bacterial populations with phages may be a new innovative approach to increase immunotherapy response rates. And elucidating the relationship between the bacterial component of the gut microbiota and bacteriophages during immunotherapy for malignant melanoma may significantly improve our understanding of the disease and find new ways to improve existing treatment protocols.

*Funding: The research was funded by the Russian Science Foundation (No. 23-75-10125, <https://rscf.ru/project/23-75-10125/>).*

## РОЛЬ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ РИБОСОМНОГО БЕЛКА uL15 В ИЗМЕНЕНИИ РЕПЕРТУАРА ТРАНСЛИРУЕМЫХ мРНК В КЛЕТКАХ HEK293T

Е.А. Золотенкова, А.В. Гопаненко, А.Е. Тупикин, М.Р. Кабилов, А.А. Малыгин

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

Белок большой субчастицы рибосомы человека uL15 является одним из трёх рибосомных белков, подвергающихся гидроксигидроксилированию. Гидроксигидроксилирование uL15 по остатку His39 осуществляет оксигеназа MINA53. Показано, что при гипоксии этот процесс нарушается [1]. Ранее обнаружено, что гидроксигидроксилирование белка uL15 играет важную роль в поддержании функционально активной структуры рибосомы [2].

Чтобы выяснить роль гидроксигидроксилирования белка uL15 в регуляции экспрессии генов, мы трансфицировали клетки HEK293T плазмидами, кодирующими 3×FLAG-меченый uL15 дикого типа или с заменой His39Ala. При помощи высокопроизводительного секвенирования мы определили гены, дифференциально экспрессируемые на уровне транскрипции и трансляции в этих клетках. Анализ характеристик мРНК этих генов показал, что мРНК генов с повышенной экспрессией в транслятоме значительно короче мРНК всех генов в среднем и генов с пониженной экспрессией. Похожая закономерность была найдена и уровня мРНК. Таким образом, короткие и более распространённые мРНК получают преимущество при трансляции в случае, если часть популяции рибосомам содержит мутантный uL15. Учитывая тот факт, что количество полисом в клетках с мутантным белком также было снижено, мы заключили, что наблюдаемые изменения в транслятоме и в транскриптоме в целом могут происходить из-за снижения эффективности трансляции рибосомами, содержащими негидроксигидроксилированный uL15.

*Исследование поддержано грантом РФФ № 22-14-00039.*

1. Ge W et al. Oxygenase-catalyzed ribosome hydroxylation occurs in prokaryotes and humans, *Nat Chem Biol.* 2012, 8: 960-962.
2. Yanshina DD et al. Replacement of hydroxylated His39 in ribosomal protein uL15 with Ala or Thr impairs the translational activity of human ribosomes. *Mol Biol.* 2020, 54: 449-457.

## THE ROLE OF RIBOSOMAL PROTEIN uL15 HYDROXYLATION IN CHANGING THE TRANSLATED MRNAS REPERTOIRE IN HEK293T

Е.А. Золотенкова, А.В. Гопаненко, А.Е. Тупикин, М.Р. Кабилов, А.А. Малыгин

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia*

The protein of the large subunit of the human ribosome uL15 is one of three ribosomal proteins undergoing hydroxylation. Hydroxylation of uL15 by His39 residue is carried out by MINA53 oxygenase. It has been shown that this process is disrupted in hypoxia [1]. It was previously found that the hydroxylation of the uL15 protein plays an important role in maintaining the functionally active structure of the ribosome [2].

To find out the role of uL15 protein hydroxylation in the regulation of gene expression, we transfected HEK293T cells with plasmids encoding 3×FLAG-labeled uL15 wild type or with His39Ala substitution. Using high-throughput sequencing, we identified the genes differentially expressed at the level of transcription and translation in these cells. Analysis of the mRNA characteristics of these genes showed that the mRNAs of genes with increased expression in the translatoome are significantly shorter than the mRNAs of all genes on average and genes with reduced expression. A similar pattern was found in the mRNA level. Thus, shorter and more common mRNAs gain an advantage in translation if part of the ribosome population contains mutant uL15. Considering the fact that the number of polysomes in cells with the mutant protein was also reduced, we concluded that the observed changes in the translatoome and in the transcriptome as a whole may occur due to a decrease in the translation efficiency of ribosomes containing nonhydroxylated uL15.

*The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 22-14-00039.*

1. Ge W et al. Oxygenase-catalyzed ribosome hydroxylation occurs in prokaryotes and humans, *Nat Chem Biol.* 2012, 8: 960-962.
2. Yanshina DD et al. Replacement of hydroxylated His39 in ribosomal protein uL15 with Ala or Thr impairs the translational activity of human ribosomes. *Mol Biol.* 2020, 54: 449-457.

## АНАЛИЗ МИКРОБИОМОВ МЕТОДОМ УЛЬТРАБЫСТРОЙ ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Е.М. Казакова<sup>1,2</sup>, М.В. Иванов<sup>2</sup>, И.А. Тарасова<sup>2</sup>, М.В. Горшков<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный;

<sup>2</sup>Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе ФИЦ ХФ РАН, Москва

Сообщества микроорганизмов играют важную роль во многих биологических системах. Современные научные исследования все чаще указывают на связь микробиома с различными заболеваниями, такими как депрессия и болезнь Альцгеймера. Для понимания механизмов взаимодействия микробных сообществ друг с другом и с другими живыми организмами необходимо изучать микробиом как с точки зрения его видового состава, так и с точки зрения его функциональной активности.

Данное исследование фокусируется на разработке биоинформатического подхода, позволяющего идентифицировать и характеризовать сообщества микроорганизмов при помощи ультрабыстрой хроматомасс-спектрометрии. Разработанная методика направлена на решение следующих задач: таксономическая идентификация состава образца, количественное сравнение видового состава различных образцов и анализ функциональной активности организмов сообщества. В работе используются данные, соответствующие 19 различным культурам микроорганизмов, а также образцы модельных микробиомов, пробиотических добавок, микробиомов кишечника модельных животных и образцов донных отложений.

Алгоритм идентификации видового состава образца, представляющий из себя двухстадийный поиск по белковой базе данных UniProt, был протестирован на различных типах образцов, таких как бактериальные культуры, пробиотические препараты и микробиом кишечника модельных животных. При анализе образцов бактериальных культур было корректно идентифицировано 95% образцов. При разработке и тестировании алгоритма количественного сравнения состава образцов были использованы образцы модельных микробиомов. Значения кратных изменений концентраций, рассчитанные с применением алгоритма, совпали с истинными с коэффициентом корреляции Пирсона до 0.97. Метод анализа функциональной активности был протестирован на нескольких моделях бактериальных культур, которые были культивированы при различных условиях. Также при разработке данного алгоритма было проведено сравнение методики ультрабыстрой протеомики с классическими методами количественного протеомного анализа: LFQ и TMT.

*И.А.Т. благодарит профессора В.Г. Згоду (ЦКП «Протеом человека») и А.В. Третьякова (ФГБУ «ВГНКИ») за реализацию метода ультрабыстрой протеомики. Протеомные исследования были выполнены при поддержке гранта РФФИ № 20-14-00229.*

## MICROBIOME ANALYSIS BY ULTRAFAST LC-MS1

Е.М. Kazakova<sup>1,2</sup>, М.В. Ivanov<sup>2</sup>, I.A. Tarasova<sup>2</sup>, М.В. Gorshkov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny; <sup>2</sup>Talrose Institute for Energy Problems of Chemical Physics, Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow

Microbial communities play an important role in many biological systems. Current scientific research points to the microbiome's association with various diseases, such as depression and Alzheimer's disease. To understand the mechanisms of interaction of microbial communities with each other and with other organisms, it is necessary to study the microbiome both in terms of its taxonomic composition and its functional activity.

This study focuses on the development of a bioinformatic approach to identify and characterize microbial communities using ultrafast liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS1). The developed approach aims at solving the following problems: taxonomic identification of the sample composition, quantitative comparison of the taxonomic composition of different samples and analysis of the functional activity of the community. Data corresponding to 19 different cultures of microorganisms, as well as samples of model microbiomes, probiotic supplements, gut microbiomes of model animals and bottom sediment samples are used in this work.

The algorithm for identifying the species composition of a sample, which consists of a two-stage search of the UniProt protein database, was tested on different types of samples, such as bacterial cultures, probiotic preparations, and so on. When analyzing bacterial culture samples, 95% of the samples were correctly identified. Samples from model microbiomes were used in the development and testing of an algorithm for quantitative comparison of sample composition. The values of multiple changes in concentrations calculated using the algorithm matched the true values with Pearson's correlation coefficient up to 0.97. The functional activity analysis method was tested on several bacterial culture models that were cultured under different conditions. The ultrafast proteomics technique was also compared with traditional methods of quantitative proteomic analysis: LFQ and TMT.

*I.A.T. thanks Dr. V.G. Zgoda (IBMC) and A.V. Tretyakov (FGBU "VGNKI") for the implementation of DirectMS1. Proteomic studies were supported by RSF grant №20-14-00229.*

### ПОТЕНЦИАЛ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ШТАММА *BACILLUS VELEZENSIS* RV7

Д.Р. Камальдинова, М.Н. Синягина, М.И. Маркелова

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

*Bacillus velezensis* относится к спорообразующим видам Bacillaceae. Эти микроорганизмы являются одними из наиболее распространенных в природе, поскольку участвуют в различных биохимических процессах в экологически разнообразных нишах. *Bacillus velezensis* – недавно признанный вид Bacillaceae, известный своими противогрибковыми, антибактериальными, стимулирующими рост растений и биоконтролирующими свойствами, что делает его перспективным для использования в качестве пробиотика.

Целью нашего исследования явилась оценка потенциала штамма *B. velezensis* RV7 для создания кожного пробиотического препарата. Штамм *B. velezensis* RV7 выделен с кожных покровов клинически здорового человека в процессе скрининга спорообразующих бактерий. Проведено полногеномное секвенирование. Для идентификации биосинтетических генов, связанных с производством вторичных метаболитов, геном был загружен и проанализирован с помощью онлайн-программы antiSMASH bacteria, версии 7.1.0, с использованием настроек по умолчанию.

Нами были идентифицированы нерибосомально продуцируемые пептиды (сурфактин, бациллибактин, бацилизин и фенгидин), три поликетидных антибиотика (бациллаен, диффицидин и макролактин Н), и группа рибосомально-синтезированных посттрансляционно-модифицированных пептидов (бацинапептин и плантазолин). Все данные вещества относятся к большому семейству вторичных метаболитов, которое включает множество биоактивных соединений с антибактериальной, иммунодепрессивной, противоопухолевой или другой физиологически значимой биоактивностью.

Наличие данных генных кластеров подтверждает функциональный потенциал *B. velezensis* RV7 в качестве пробиотического компонента в кожных антисептиках и требует дальнейшего исследования безопасности и подтверждения антагонистической активности *in vitro*.

### POTENTIAL OF ANTAGONISTIC ACTIVITY OF *BACILLUS VELEZENSIS* STRAIN RV7

D. Kamaldinova, M. Sinyagina, M. Markelova, T. Grigoryeva

Kazan (Volga region) Federal University, Kazan

*Bacillus velezensis* is a spore-forming species of Bacillaceae. These microorganisms are among the most widespread in nature, as they participate in various biochemical processes in ecologically diverse niches. *Bacillus velezensis* is a recently recognized species of Bacillaceae, known for its antifungal, antibacterial, plant growth-promoting, and biocontrol properties, making it promising for use as a probiotic.

The aim of our study was to evaluate the potential of *B. velezensis* RV7 strain for the development of a cutaneous probiotic preparation. *B. velezensis* RV7 strain was isolated from the skin of a clinically healthy person during the screening of spore-forming bacteria. Whole genome sequencing was performed. To identify biosynthetic genes associated with secondary metabolite production, the genome was downloaded and analyzed using the online program antiSMASH bacteria, version 7.1.0, using default settings. We identified non-ribosomally produced peptides (surfactin, bacillibactin, bacilizin and fengycin), three polyketide antibiotics (bacillaen, diffidicin and macrolactin H), and a group of ribosomally synthesized post-translationally modified peptides (bacinapeptin and plantazolicin). All these substances belong to a large family of secondary metabolites, which includes many bioactive compounds with antibacterial, immunosuppressant, antitumor or other physiologically significant bioactivity.

The presence of these gene clusters confirms the functional potential of *B. velezensis* RV7 as a probiotic component in skin antiseptics and requires further safety studies and confirmation of antagonistic activity *in vitro*.

### МУЛЬТОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ОЖИРЕНИЯ: РЕЗУЛЬТАТЫ ПИЛОТНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

**О. Киселева, М. Пятницкий, В. Арзуманян, И. Курбатов, В. Ильинский, Е. Ильгисонис, Е. Поверенная**

*НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва*

Ожирение – это социально значимое заболевание, которое характеризуется аномальным накоплением жировой ткани и связано с хроническим воспалением, раком, диабетом и другими сопутствующими состояниями. Поиск биомаркеров и исследование патологических процессов, связанных с ожирением, особенно важно для молодых людей с большим потенциалом для изменения образа жизни. Мы сопоставили геномные, протеомные и метаболомные профили у людей с различным индексом массы тела (ИМТ), чтобы определить, какой омикс-слой наиболее точно отражает вызванные ожирением изменения фенотипа. Анализ плазмы крови методом выявил 647 250 однонуклеотидных замен, 708 белков (HPLC-MS/MS) и 313 метаболитов (GC×GC-MS). Мы использовали самостоятельно обученные модели частично наименьших квадратов для предсказания ИМТ, которые позволили выделить потенциальные биомаркеры и подсветить ассоциированные с ожирением молекулярные пути. Протеомные данные дали наилучшие результаты (средняя абсолютная ошибка (MAE)=5,44±0,31 кг/м<sup>2</sup>), в среднем модель строилась на 24 белках. Метаболомные данные продемонстрировала меньшую точность (MAE=6,06±0,33 кг/м<sup>2</sup>), еще менее точные результаты были получены на геномной модели (MAE=6,20±0,34 кг/м<sup>2</sup>). Как и ожидалось, мультиомные модели оказались более точными, особенно комбинация протеомных и метаболомных моделей (MAE=4,77±0,33 кг/м<sup>2</sup>), при этом добавление геномных данных качественно не улучшило результаты. Это исследование является первым мультиомным анализом ожирения в сбалансированной когорте молодых взрослых, проведенным с использованием геномных, протеомных и метаболомных методов. Комплексный подход предоставил новые сведения о молекулярных механизмах ожирения и открыл возможности для более целенаправленных вмешательств.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственной поддержки создания и развития исследовательских центров мирового уровня «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение» № 075-15-2020-913.*

### MULTIOMIC PROFILING OF OBESITY: PILOT PROJECT

**O. Kiseleva, M. Pyatnitskiy, V. Arzumanyan, I. Kurbatov, V. Ilinsky, E. Ilgisonis, E. Ponomarenko, E. Poverennaya**

*Institute of Biomedical Chemistry, Moscow*

Obesity, a disease with significant societal impact, is marked by abnormal fat accumulation and is linked to chronic inflammation, cancer, diabetes, and other related conditions. Studying biomarkers and the underlying pathological processes associated with obesity is crucial, especially for younger individuals who have a higher capacity for lifestyle changes. Our research focused on comparing genetic, proteomic, and metabolomic profiles across underweight, normal, overweight, and obese categories to identify which omics layer best captures the phenotypic changes induced by obesity. We analyzed blood plasma samples using three omics approaches: an untargeted GC×GC-MS metabolomics technique identified 313 metabolites, while a label-free HPLC-MS/MS proteomics method revealed 708 proteins. Additionally, the genomic analysis covered 647,250 SNPs. We employed sparse Partial Least Squares models to predict body mass index using these omics data. Molecular features with frequent non-zero coefficients were pinpointed as potential biomarkers, and we examined the enriched biological pathways. Among single-omics analyses, proteomics showed the highest accuracy (MAE=5.44±0.31 kg/m<sup>2</sup>), using an average of 24 proteins per model. Metabolomics followed with slightly lower accuracy (MAE=6.06±0.33 kg/m<sup>2</sup>), and genomics had the lowest (MAE=6.20±0.34 kg/m<sup>2</sup>). Multiomics models, particularly those combining proteomics and metabolomics (MAE=4.77±0.33 kg/m<sup>2</sup>), showed superior accuracy, while adding genomic data did not further improve the results. This study represents the first multiomics analysis of obesity in a gender-balanced cohort of young adults, offering new insights into the molecular mechanisms of obesity and paving the way for more targeted interventions.

*This research was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of state support for the creation and development of World-Class Research Centers “Digital biodesign and personalized healthcare” No. 075-15-2020-913.*

### СЕКВЕНИРОВАНИЕ МИКРОБИОТЫ В ЭПОХУ ТЕХНОЛОГИЙ: ILLUMINA И OXFORD NANOPORE

К. Климина, П. Зорук, А. Строкач, В. Веселовский, В. Бабенко, С. Колдман, В. Колдман, М. Одорская, В. Даниленко, О. Селезнева, Н. Захаревич, А. Ларин, М. Морозов, Е. Олехнович

ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва

Микробиом кишечника является одним из крупнейших бактериальных сообществ в человеческом организме и влияет как на поддержание здоровья, так и на развитие различных заболеваний, поэтому его изучение является важной и перспективной областью исследований. Технологии секвенирования нового поколения произвели революцию в изучении микробиоты, так как с помощью них была получена детальная информация о микробных сообществах, основными методами идентификации которых служат анализ последовательности гена 16S рРНК и полногеномное секвенирование (whole genome sequencing (WGS)). Цель данного исследования заключается в сравнении методов секвенирования на платформах Illumina и ONT для определения наиболее эффективного подхода к анализу состава микробиоты кишечника.

В ходе эксперимента было исследовано влияние двух штаммов, *L. rhamnosus* K32 и *B. adolescentis* 150, на кишечную микробиоту мышей линии C57BL/6. Изменения бактериального состава оценивали путем секвенирования гена 16S рРНК и WGS на двух платформах – Illumina и ONT. Для секвенирования гена 16S рРНК на ONT использовали 5 известных комбинаций праймеров, и проводили сравнительный анализ эффективности определения бактериального разнообразия с помощью данных комбинаций. Все 5 исследуемых комбинаций праймеров на ген 16S рРНК позволили выявить сопоставимое альфа-разнообразие кишечной микробиоты мышей. Также мы провели попарное сравнение данных, полученных с разных платформ для секвенирования и с разной исходной ДНК (обычная и высокомолекулярная). Результаты исследования демонстрируют высокую степень корреляции между данными, полученными с одной платформы и с разным типом исходной ДНК. Данные WGS, полученные с платформ Illumina и ONT, имеют высокий уровень сходства. В целом, использование комбинированных данных с двух платформ секвенирования позволяет более полно и точно оценивать бактериальное разнообразие в анализируемых образцах. Наше исследование подчеркивает важность выбора подходящих стратегий секвенирования для тщательного изучения микробиома. Использование гибридного подхода к сборке увеличивает количество идентифицированных контигов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-75-10125 <https://rscf.ru/project/23-75-10125/>.

### MICROBIOTA SEQUENCING IN MODERN TECHNOLOGIES: ILLUMINA AND OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES

K. Klimina, P. Zoruk, A. Strokach, V. Veselovsky, V. Babenko, S. Koldman, V. Koldman, M. Odorskaya, V. Danilenko, O. Selezneva, N. Zakharievich, A. Larin, M. Morozov, E. Olekhovich

Lopukhin Federal Research and Clinical Center, Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow

The gut microbiome plays a critical role in maintaining overall health and contributes to the development of various illnesses. As a result, its investigation has emerged as an essential area of research with significant potential. Next-generation sequencing techniques have revolutionized the study of the gut microbiota by providing comprehensive information about microbial populations. Two primary methods are employed for identification: analysis of 16S rRNA gene sequences and whole-genome sequencing (WGS). This study intends to compare these sequencing techniques using the Illumina and Oxford Nanopore Technologies (ONT) platforms in order to identify the most effective approach for examining the composition of the gut microbiome.

During the experiment, we investigated the impact of two bacterial strains, *L. rhamnosus* K32 and *B. adolescentis* 150, on the gut microbiota of C57BL/6 mice. The changes in bacterial composition were evaluated by sequencing 16S rRNA and whole genome sequences (WGS) on two platforms, Illumina and ONT. The results of the study demonstrate a strong correlation between data obtained from the same platform but using different types of DNA sources. Whole-genome sequencing (WGS) data generated by the Illumina and Oxford Nanopore Technologies platforms exhibit a high degree of similarity. Overall, combining data from two sequencing platforms allows for a more comprehensive and precise assessment of bacterial diversity in samples. This research emphasizes the significance of selecting suitable sequencing strategies for in-depth analysis of the microbiome. Utilizing a hybrid approach for assembly increases the number of contigs identified.

Financial support for this study was provided by the Russian Science Foundation under the grant number 23-75-10125, available at <https://rscf.ru/project/23-75-10125/>.

### ЭПИТРАНСКРИПТОМ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА (HEC) ФОРМИРУЕТ ЭПИТРАНСЛЯТОМ И ПРОФИЛЬ ТРАНСЛЯЦИИ

**А.С. Козлова, С.П. Радько, Е.А. Пономаренко, Е.В. Ильгисонис**

*НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва*

Метилирование мРНК m6A участвует в важных регуляторных функциях, таких как правильный сплайсинг, инициация трансляции и остановка трансляции. В последнее время накопилось довольно много информации о метилировании транскриптома, но мало кто упоминал метилирование в контексте транслатома. Для изучения влияния метилирования m6A на трансляцию мы получили профили транслатома и транскриптома для тех же образцов эмбриональных стволовых клеток человека на платформе секвенирования Oxford Nanopore. Около 42% экспрессированных сплайс-форм были обнаружены на уровне транслатома. Модификация m6A была обнаружена примерно в 50% транскриптов на уровне транскриптома, но только в 3% (476 транскриптов) на уровне транслатома. В транслатоме было обнаружено 106 транскриптов с модификацией m6A, которые не были обнаружены в транскриптоме. Сравнение данных эпитранслатома с сайтами рибосомной паузы, полученными из данных Ribo-seq, показало, что метилирование играет важную роль в регуляции скорости трансляции.

*Работа выполнена в рамках РФФ №24-14-0006.*

### HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS (HEC) EPITRANSCRIPTOME FORMS EPITRANSLATOME AND TRANSLATION PROFILES

**A.S. Kozlova, S.P. Radko, E.A. Ponomarenko, E.V. Ilgisonis**

*Institute of Biomedical Chemistry, Moscow*

Methylation of m6A mRNA is involved in important regulatory functions such as proper splicing, translation initiation, and translation arrest. Recently, quite a lot of information has been accumulated on transcriptome methylation, but few people have mentioned methylation in the context of the translatoome. To study the effect of m6A methylation on translation, we obtained the translatoome and transcriptome profiles for the same human embryonic stem cell samples on the Oxford Nanopore sequencing platform. About 42% of expressed splice-forms were detected at the translatoome level. The m6A modification was detected in about 50% of transcripts at the transcriptome level, but only in 3% (476 transcripts) at the translatoome level. In the translatoome, 106 m6A-modified transcripts were detected, which were not found in the transcriptome. Comparison of epitranlatome data with ribosomal pause sites obtained from Ribo-seq data showed that methylation plays an important role in the regulation of translation rate.

*Financial support was provided by the Russian Science Foundation grant No 24-14-0006.*

### АНАЛИЗ КРОСС-КОНТАМИНАЦИИ ПРОЧТЕНИЙ В ДАННЫХ DNBSEQ СЕКВЕНИРОВАНИЯ

**Д.Н. Конанов, В.Ю. Терещук, И.В. Сонец, Е.В. Корнеенко, А.С. Сперанская, Е.Н. Ильина**

*НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва*

Сегодня технология секвенирования DNBSEQ рассматривается как одна из альтернатив Illumina. MGI DNBSEQ обеспечивает высокопроизводительное секвенирование на базе коротких ридов с разнообразной конфигурацией длин, от SE50 до SE400 и PE300. Вариант PE300 главным образом рекомендован MGI для секвенирования сравнительно длинных ампликонов (16S/18S/ITS).

В запуске PE300, с которого началась представленная работа, было совмещено пять разных типов библиотек, включая ампликоны 16S, полные геномы индивидуальных бактерий, WGS-метагеномы и РНКомы. В процессе анализа данных мы обнаружили кросс-контаминацию секвенируемых объектов, которая проявлялась даже на уровне геномных сборок в виде контигов, принадлежащих нецелевым организмам. Было обнаружено, что парные прочтения, порождающие эти контиги, в большинстве некорректно соотносены, то есть прямой и обратный рид несли разные вставки.

В случае, когда длина вставки менее чем 260 нуклеотидов, риды PE300 позволяют прочитать последовательность баркода внутри рида. Пользуясь этим, мы выяснили, что контаминирующие риды, как правило, несут нецелевой баркод, то есть были неверно демультимплексированы, причем прямые прочтения были неверно демультимплексированы в 2,54% случаев, а обратные в 0,56%. Эффект был воспроизведен на демо-данных MGI (PE100 и PE150). Было установлено, что короткие вставки значительно более подвержены как неверному соотносению, так и неверному демультимплексированию. Мы заметили, что описываемые артефактные прочтения часто имеют риды-дубликаты с номером рида, отличным на единицу. номер рида определяется позицией DNB в ячейке, т.е. наблюдаемые дубликаты относятся к оптическим и вызваны неверным разрешением сигнала с соседних DNB. Было установлено, что как неверно разрешенные пары прочтений сильно ассоциированы с наличием у них оптических дубликатов. Доля оптических дубликатов в запуске PE300 составила 2,516%, в демо-датасете MGI – 1,65%. Дискордантные пары ридов характерны и для результатов Illumina, и данные DNBSEQ-секвенирования сопоставимы с ними по частоте подобных событий, что было показано на внешних данных. Однако строгое следование рекомендациям MGI и одновременное секвенирование только гомогенных по средней длине и загрузке библиотек – необходимое условие получения непротиворечивых данных.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 24-15-00419.*

### THE ANALYSIS OF READ CROSS-CONTAMINATION IN DNBSEQ DATA

**D.N. Konanov, V.Y. Tereshchuk, I.V. Sonets, E.V. Korneenko, A.S. Speranskaya, E.N. Ilina**

*Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow*

Today, DNBSEQ sequencing technology is considered as one of the alternatives to Illumina. MGI DNBSEQ provides high-throughput sequencing based on short reads with a variety of length configurations, from SE50 to SE400 and PE300. The PE300 variant is mainly recommended by MGI for sequencing relatively long amplicons (16S/18S/ITS).

The PE300 run, with which this work began, combined five different types of libraries, including 16S amplicons, complete genomes of individual bacteria, WGS metagenomes and RNAomes. During the data analysis, we found cross-contamination of the sequenced objects, which manifested even at the level of genomic assemblies as contigs belonging to non-target organisms. It was found that the paired reads generating these contigs were mostly incorrectly assigned, i.e. the forward and reverse reads carried different inserts.

In the case where the insert length is less than 260 nucleotides, PE300 reads allow reading the barcode sequence within the read. Using this, we found that contaminating reads usually carry an off-target barcode, i.e. were incorrectly demultiplexed, with forward reads being incorrectly demultiplexed in 2.54% of cases and reverse reads in 0.56%. The effect was reproduced on MGI demo data (PE100 and PE150). It was found that short inserts are significantly more susceptible to both misassignment and incorrect demultiplexing. We noticed that the described artifactual reads often have duplicate reads with a read number that differs by one. The read number is determined by the position of the DNB in the cell, i.e. the observed duplicates are optical and are caused by incorrect resolving of the signal from neighboring DNBs. It was found that incorrectly resolved read pairs are strongly associated with the presence of optical duplicates. The proportion of optical duplicates in the PE300 run was 2.516%, in the MGI demo dataset – 1.65%. Discordant read pairs are also typical for Illumina results, and DNBSEQ sequencing data are comparable to them in the frequency of such events, which was shown on the external data. However, strict following to the MGI recommendations and simultaneous sequencing of only libraries homogeneous in mean insert length and loading are a prerequisite for obtaining consistent data.

*The study was funded by an RSF grant No 24-15-00419.*



**УЛЬТРАБЫСТРАЯ ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ В ПРОТЕОМИКЕ РАСТЕНИЙ: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПРОРОСТКАХ ОЗИМОЙ И ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ В ОТВЕТ НА ВНЕШНИЙ СТИМУЛ**

**Т.Т. Кусаинова, Д.Д. Емекеева, Е.М. Казакова, А.В. Горшков, Ф. Кьелдсен, М.Л. Кусков, А.Н. Жигач, И.П. Ольховская, О.А. Богословская, Н.Н. Глушченко, И.А. Тарасова**

*Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе ФИЦ ХФ РАН, Москва*

В последние годы активно развиваются методы ультрабыстрого хроматомасс-спектрометрического профилирования протеомов для биохимических исследований. Они позволяют быстро оценивать клеточный ответ на биотические стимулы. Для повышения эффективности сельского хозяйства внедряются новые биотехнологии, включая использование наноматериалов. Несмотря на достижения, разработка и тестирование новых препаратов остаются актуальными, особенно с учетом проблем хранения урожая и угнетения почвенных микробиомов. Это требует комплексных исследований новых препаратов и изучения влияния наночастиц на рост растений.

Цель работы — адаптация метода ультрабыстрой хроматомасс-спектрометрии DirectMS1 для быстрого профилирования молекулярных изменений в 7-дневных проростках пшеницы после обработки наночастицами железа. Для этого семена 3 сортов озимой и 3 сортов яровой пшеницы обрабатывались препаратами на основе ПЭГ-400, Na-КМЦ, Na<sub>2</sub>-ЭДТА, наночастиц железа и проращивались по ГОСТ 12038-84 в течение 7 дней. Затем проводились измерения длин корней и побегов, пробоподготовка для протеомного анализа и измерения активности супероксиддисмутазы. Протеомное профилирование осуществлялось методом DirectMS1, а статистический анализ данных — программой Diffacto. Функциональная аннотация белков выполнялась с помощью DeepGO-SE, а их интерпретация — через анализ генных онтологий с использованием GOATOOLS. Результаты показали, что обработка наночастицами железа вызывает изменения в процессах фотосинтеза и биосинтеза хлорофилла в тканях побегов, а также в метаболизме полисахаридов в корнях. Протеомные изменения согласуются с морфометрическими данными побегов и корней 7-дневных проростков. Метод DirectMS1 показал высокий потенциал для молекулярной диагностики процессов в растительных тканях, включая влияние обработки препаратами и выявление контаминации. В сочетании с другими методами, данный подход является важным источником информации для исследования молекулярных механизмов действия препаратов и факторов внешней среды на живые системы.

*Работа поддержана РНФ №20-14-00229.*

**ULTRAFAST CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY IN PLANT PROTEOMICS: MOLECULAR CHANGES IN WINTER AND SPRING WHEAT SEEDLINGS IN RESPONSE TO AN EXTERNAL STIMULUS**

**T.T. Kusainova, D.D. Emekeeva, E.M. Kazakova, V.A. Gorshkov, F. Kjeldsen, M.L. Kuskov, A.N. Zhigach, I.P. Olkhovskaya, O.A. Bogoslovskaya, N.N. Glushchenko, I.A. Tarasova**

*Talroze Institute for Energy Problems of Chemical Physics, Semenov Federal Research Center of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow*

In recent years, methods for ultrafast chromatographic-mass spectrometric profiling of proteomes have been actively developed for biochemical research. These methods allow for rapid assessment of cellular responses to biotic stimuli. To increase the efficiency of agriculture, new biotechnologies are being introduced, including the use of nanomaterials. Despite advancements, the development and testing of new formulations remain relevant, especially considering the challenges of crop storage and soil microbiome suppression. This necessitates comprehensive studies of new formulations and the examination of the impact of nanoparticles on plant growth.

The aim of this work is to adapt the ultrafast chromatographic-mass spectrometry method DirectMS1 for rapid profiling of molecular changes in 7-day-old wheat seedlings after treatment with iron nanoparticles. To achieve this, seeds of three winter wheat and three spring wheat varieties were treated with formulations based on PEG-400, Na-CMC, Na<sub>2</sub>-EDTA, and iron nanoparticles, and germinated according to GOST 12038-84 for 7 days. Measurements of root and shoot lengths were then performed, along with sample preparation for proteomic analysis and the measurement of superoxide dismutase activity. Proteomic profiling was carried out using the DirectMS1 method, and statistical data analysis was conducted using the Diffacto software. Functional annotation of proteins was performed using DeepGO-SE, and their interpretation was done through gene ontology analysis using GOATOOLS. The results showed that treatment with iron nanoparticles induces changes in photosynthesis and chlorophyll biosynthesis processes in shoot tissues, as well as in polysaccharide metabolism in root tissues. The proteomic changes correlate with morphometric data of the shoots and roots of 7-day-old seedlings. The DirectMS1 method demonstrated high potential for molecular diagnostics of processes occurring in plant tissues, including the impact of treatment and the detection of contamination. In combination with other methods, this approach serves as an important source of information for studying the molecular mechanisms of the action of formulations and environmental factors on living systems.

*The work was supported by RNF №20-14-00229.*

### ИЗУЧЕНИЕ *IN VIVO* СИНТЕЗА ЛИПИДОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ ТЯЖЕЛОЙ И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

**А.И. Левашова, А.И. Вишневецкая, А.Э. Коваленко, С.В. Осипенко, А.А. Башилов, Ю.И. Костюкевич**

*Сколковский институт науки и технологий, Москва*

Метабомика является перспективной областью клиничко-лабораторной диагностики. Исследование метаболических путей, включающий метаболомный анализ является актуальной задачей медицины при прогнозировании и оценке состояния пациента. Одним из методов, увеличивающих возможности идентификации, является введения метки *in vivo* и мониторинг соединений, встроивших изотопную метку в результате метаболизма. В данной работе проводили сравнительный анализ липидома мышей линии C57BL, получающих дейтерированную и питьевую воду. Через 7 дней были получены органы (печень, почки, легкие, сердце, мозг, жировая ткань), кровь, моча, выделены лимфоциты. Ткани гомогенизировали. Метанольные экстракты анализировали в системе UPLC Waters Acquity с масс-спектрометром Q-Exactive Orbitrap. В результате идентифицировано 2000+ липидов. Содержание атомов дейтерия в молекулах липидов проводили путем сравнения спектров экспериментальных и контрольных образцов каждого идентифицированного липида, отдельно по всем органам и тканям. В результате дейтериевая метка была обнаружена в 500+ липидах, с различным её содержанием. Причем включение установлено преимущественно в классе в глицерофосфолипидах, в их жирно-кислотных частях. И в них же наблюдалась максимальная глубина дейтерирования - включалось до восьми атомов дейтерия. При сравнении распределения в различных органах было обнаружено, что меченные липиды преобладают в плазме крови, печени, легких. Это согласуется с различным распределением глицерофосфолипидов в каждом типе ткани и соответствующей состав клеточной мембраны.

Таким образом, данный метод идентификации вновь синтезированных метаболитов (в т.ч. липидов) позволит мониторировать появление и скорости их накопления в различных органах биомоделей при моделировании, в частности, неврологических заболеваний, в которых, по последним данным, именно липидные маркерные панели играют существенную роль в этиологии, патогенезе, прогнозе и лечении.

### INVESTIGATION *IN VIVO* OF LIPID SYNTHESIS USING HEAVY WATER AND HIGH-RESOLUTION MASS SPECTROMETRY

**A.I. Levashova, A.I. Vishnevskaya, A.E. Kovalenko, S.V. Osipenko, A.A. Bashilov, Yu.I. Kostyukevich**

*Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow*

Metabolomics is a promising area of clinical laboratory diagnostics. The study of metabolic pathways including metabolome analysis is relevant in medicine assessment of patient status. One of the methods that increases the possibilities of identification is the introduction of a label *in vivo* and monitoring of compounds that have incorporated an isotopic label during metabolism. In this work, a comparative analysis of the lipidomes of C57BL mice receiving deuterated and drinking water is performed. After 7 days, organs (liver, kidneys, lungs, heart, brain, living tissue), blood, urine, lymphocyte were obtained. Tissues were homogenized. Methanol extracts were analyzed using Waters Acquity UPLC system with a Q-Exactive Orbitrap mass spectrometer. As a result, more than 2000 lipids were identified. The content of deuterium atoms in lipid molecules was detected by comparing the spectra of experimental and control samples for each identified lipid throughout all tissues and fluids. As a result, the deuterium label was detected in 500+ lipids with varying degree of inclusion. The inclusion observed mostly in glycerophospholipids (GP), in their fatty acid parts. Also, in GP the maximum deuteration depth was observed - up to eight deuterium atoms. When considering the distribution in different organs, labeled lipids identified predominantly in blood plasma, liver, lungs. This is consistent with the distinct distributions of GP in each tissue type and the corresponding cell membrane.

Thus, this method of identification of newly synthesized labelled metabolites, in particular lipids, allows to monitor its appearance and accumulation rates in various organs during biomodelling, in particular, of neurological diseases, because, according to the latest data, especially lipidomic panels are important in etiology and pathogenesis as well as prognostic markers.

## ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА микроРНК ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ЖИРОВОЙ ТКАНИ И СЫВОРОТКИ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ОЖИРЕНИЕМ И САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

В.В. Мирошникова<sup>1,2</sup>, К.В. Драчева<sup>1,2</sup>, К.А. Анисимова<sup>2</sup>, Е.Т. Берулава<sup>2</sup>, В.К. Скорнякова<sup>1</sup>, А.Д. Изюмченко<sup>1,2</sup>, И.А. Побожева<sup>1,2</sup>, Д.И. Василевский<sup>2</sup>, С.Н. Пчелина<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина; <sup>2</sup>Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова Минздрава России, Санкт-Петербург

Как регуляторы экспрессии генов, микроРНК могут принимать участие в патогенезе различных заболеваний. Ожирение может сопровождаться изменением профиля микроРНК секретируемых ЖТ экстраклеточных везикул (ЭВ), которые могут оказывать свои эффекты как локально, так и дистанционно, играя роль в патогенезе сопутствующих ожирению патологий, в частности сахарного диабета 2 типа (СД2).

Цель исследования: поиск микроРНК ЖТ, секретируемых в составе ЭВ, которые могут участвовать в патогенезе СД2, а также выступать в качестве биомаркеров развития СД2 при ожирении.

Исследование проводилось с использованием коллекции образцов подкожной и висцеральной жировой ткани (ПЖТ и ВЖТ) и сыворотки крови пациентов с ожирением с/без СД2 (N=26/27) и лиц без ожирения и СД2 (N=15; контрольная группа). Первый этап исследования предполагал профилирование микроРНК ЭВ, полученных при культивировании ЖТ *ex vivo*, с помощью метода NanoString (Human v3 miRNA expression assay kit). На втором этапе исследовалось содержание микроРНК, продемонстрировавших различия по составу в ЭВ ЖТ при ожирении, в ЖТ, а также в ЭВ сыворотки крови при ожирении и СД2 методом ПЦР в реальном времени.

Продемонстрировано снижение содержания микроРНК hsa-miR-145-5p, hsa-miR-551b-3p, hsa-miR-1246 в ЭВ ВЖТ при ожирении без СД2, которое в случае hsa-miR-551b-3p было подтверждено и для ЭВ сыворотки крови. В то же время уровень экзосомальной hsa-miR-551b-3p в сыворотке крови у пациентов с ожирением и СД2 был выше, чем у пациентов с ожирением без СД2 (p=0.030): при этом уровень hsa-miR-551b-3p выше 0.91 на фоне ожирения может свидетельствовать о развитии СД2 (ROC-анализ: AUC=0.77 (0.58-0.96), p=0.019). Для пациентов с ожирением характерна положительная корреляция уровня hsa-miR-551b-3p в ЭВ сыворотки крови с уровнем гликированного гемоглобина (r=0.616, p=0.005); отрицательная корреляция с уровнем hsa-miR-551b-3p в ПЖТ с индексом инсулинорезистентности НОМА-IR (r=-0.540, 0.002).

МикроРНК 551b-3p задействована в патогенезе инсулинорезистентности и СД2.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 23-25-00207.

## ADIPOSE TISSUE AND SERUM EXTRACELLULAR VESICLES MICRORNA COMPOSITION IN PATIENTS WITH OBESITY AND TYPE 2 DIABETES MELLITUS

V.V. Miroshnikova<sup>1,2</sup>, K.V. Dracheva<sup>1,2</sup>, K.A. Anisimova<sup>2</sup>, E.T. Berulava<sup>2</sup>, V.K. Skornyakova<sup>1</sup>, A.D. Izumchenko<sup>1,2</sup>, I.A. Pobozheva<sup>1,2</sup>, D.I. Vasilevsky<sup>2</sup>, S.N. Pchelina<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>B.P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, National Research Centre "Kurchatov Institute", Gatchina; <sup>2</sup>Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University, St Petersburg

As regulators of gene expression, microRNAs can participate in the pathogenesis of various diseases. Obesity can be accompanied by changes in the microRNA profile of adipose tissue extracellular vesicles (EVs), which can expose their effects locally and in distant tissues, playing a role in the pathogenesis of obesity associated pathologies, in particular type 2 diabetes mellitus (T2DM).

The aim of the study was search for exosomal microRNAs secreted by adipose tissue, which can participate in the pathogenesis of T2DM, and also act as biomarkers for the development of T2DM in obesity.

The study was conducted using a collection of subcutaneous and visceral adipose tissue (SAT and VAT) samples and blood serum from patients with obesity with/without T2DM (N=26/27) and individuals without obesity and T2DM (N=15; control group). The first stage of the study involved profiling of microRNAs in EVs obtained during *ex vivo* cultivation of adipose tissue using the NanoString method (Human v3 miRNA expression assay kit). At the second stage, the level of microRNAs that demonstrated differences in composition in adipose tissue EVs in obesity, was investigated in adipose tissue, and in serum EVs in obesity and T2DM using real-time PCR.

The level of hsa-miR-145-5p, hsa-miR-551b-3p, and hsa-miR-1246 microRNAs was decreased in VAT EVs in obesity without T2DM, which was also confirmed for serum EVs only for hsa-miR-551b-3p. At the same time, the level of exosomal hsa-miR-551b-3p in serum of patients with obesity and T2DM was higher than in obese patients without T2DM (p=0.030): the level of hsa-miR-551b-3p above 0.91 in obesity may indicate the development of T2DM (ROC analysis: AUC=0.77 (0.58-0.96), p=0.019). For patients with obesity, a positive correlation between the level of hsa-miR-551b-3p in the serum EV and the level of glycosylated hemoglobin was found (r=0.616, p=0.005); as well as negative correlation between the level of hsa-miR-551b-3p in the SAT and the insulin resistance index HOMA-IR (r=-0.540, 0.002).

MicroRNA 551b-3p is involved in the pathogenesis of insulin resistance and T2DM.

The work was supported by the Russian Science Foundation grant 23-25-00207.

**ВЫЯВЛЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ВИДОВ КАК ПРЕДИКТОРОВ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИММУНОТЕРАПИИ ПРИ МЕЛАНОМЕ**  
**М.Д. Морозов, А.А. Строкач, П.Ю. Зорук, В.А. Веселовский, В.А. Колдман, С.Д. Колдман, Е.И. Олехнович,**  
**К.М. Климина**

*ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва*

Микробиота кишечника участвует в метаболических реакциях, критически важных для поддержания здоровья человека. Ряд исследований продемонстрировали роль кишечных бактерий в обеспечении положительного результата иммунотерапии меланомы. Тем не менее полного понимания биологических механизмов, лежащих в основе такого эффекта все еще нет. В связи с этим целью данного исследования была идентификация бактерий, потенциально влияющих на эффективность иммунотерапии меланомы, и проверка их действия на мышинной модели. Было собрано 680 образцов кишечных метабеномов из 7 опубликованных исследований (базы данных NCB-EBI). Модель смешанных эффектов (ZicoSeq) с применением двух поправок на множественное сравнение (FWER и FDR) была использована для определения статистической разницы между содержанием бактерий пациентов с разным ответом на иммунотерапию. По итогам анализа *Bifidobacterium adolescentis* была идентифицирована как единственный строгий биомаркер положительного исхода иммунотерапии (FWER  $p < 0.05$ ; FDR  $p < 0.05$ ). Поэтому штамм *B. adolescentis* 150 был выбран для экспериментального тестирования в качестве адьюванта на мышинной модели меланомы с последующей оценкой его влияния на ответ иммунотерапии. В исследованиях использовались самки мышей C57Bl/6, приобретенные в питомнике «Филиал Столбовая ФГБУН НЦБМТ ФМБА России». Мышам была привита культура клеток меланомы B16-F10, после чего вводилась лиофильная культура бифидобактерий в соответствии с разработанным протоколом исследования. В дальнейшем проводился сбор мышинных фекалий в 7 временных точках для оценки бактериального разнообразия микробиоты посредством секвенирования гена 16S рРНК на Oxford Nanopore Technologies. Транскриптомное секвенирование тотальной РНК опухоли применялось для количественной оценки уровня экспрессии генов. Результаты показали, что введение штамма *B. adolescentis* 150 способствует увеличению роста экспериментальной меланомы и приводит к повышению количества условно-патогенных бактерий в кишечнике. Анализ данных транскриптома продемонстрировал повышение экспрессии опухолевых генов *Ero11*, *Mtss11*, *Atf3*, *Mitf*, *Mxi1*, *Vegfa*, *Slc2a1*, которые согласно литературным данным ассоциируются с метастазированием и прогрессированием опухоли.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-75-10029.*

**IDENTIFICATION OF BACTERIAL SPECIES AS PREDICTORS OF IMMUNOTHERAPY EFFICACY IN MELANOMA**

**M.D. Morozov, A.A. Strokach, P.Yu. Zoruk, V.A. Veselovsky, V.A. Coldman, S.D. Coldman, E.I. Olekhovich, K.M. Klimina**  
*Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency, Moscow*

Gut microbiota is involved in a number of metabolic reactions that are critical for maintaining human health. Several studies have demonstrated the significance of gut microbiota in promoting favorable outcomes from melanoma immunotherapy. Still, there is a lack of a thorough knowledge of the basic mechanisms underlying this effect. Therefore, the aim of this study was to identify bacteria that potentially affect the efficacy of melanoma immunotherapy and test their effect in a mouse model. Six hundred eighty gut metagenome samples were gathered from seven published investigations (NCB-EBI databases). Utilizing a mixed-effects model (ZicoSeq) with two multiple comparison corrections (FWER and FDR), it was possible to ascertain statistical distinctions between the bacterial composition of individuals who had varying immunotherapy responses. The analysis revealed that the only robust biomarker of a successful immunotherapy outcome was *Bifidobacterium adolescentis* (FWER  $p < 0.05$ ; FDR  $p < 0.05$ ). As a result, the *B. adolescentis* 150 strain was chosen for experimental testing as an adjuvant in a melanoma mouse model, and its impact on the immunotherapy response was then evaluated. The research used female C57Bl/6 mice that were obtained from the "Stolbovaya Branch of the Federal State Budgetary Educational Institution of the National Research Institute of FMBA of Russia". Following the development of a study protocol, a lyophilized culture of bifidobacteria was injected into the mice that had been vaccinated with a B16-F10 melanoma cell culture. Afterwards, mouse feces were gathered at seven time points in order to evaluate the microbiota's bacterial diversity by 16S rRNA gene sequencing at Oxford Nanopore Technologies. The levels of gene expression was measured by transcriptome sequencing of the total tumor RNA. The findings demonstrated that the *B. adolescentis* 150 strain increases the amount of opportunistic bacteria in the intestine and promotes the growth of experimental melanoma. Tumor genes *Ero11*, *Mtss11*, *Atf3*, *Mitf*, *Mxi1*, *Vegfa*, and *Slc2a1* were found to be more highly expressed in transcriptome data analysis. These genes have been linked in the literature to metastasis and tumor growth.

*The work was supported by the Russian Science Foundation grant № 22-75-10029.*

## МЕЖДУНАРОДНОЕ НАУЧНОЕ СОТРУДНИЧЕСТВО В УСЛОВИЯХ САНКЦИОННОГО ДАВЛЕНИЯ

**А.В. Москалев**

*ООО "ЭОЛ ЛАБС", Новосибирск*

Антироссийские санкции в последние два года становятся все жестче и затрагивают все больше областей. Они оказывают значительное влияние на научную деятельность и международное научно-техническое сотрудничество (МНТС), в которых Российская Федерация играет значимую роль. В этой ситуации критически важно обеспечить национальную научно-технологическую безопасность и достижение технологического суверенитета страны.

В новейшей истории есть множество примеров применения санкций в сфере науки, например против ЮАР, Израиля, Ирана, Ирака, Судана, Сербии и др. В свое время 57,3% южноафриканских ученых испытали на себе последствия бойкота, включая отказы в принятии рукописей, прямые запреты на участие и проведении конференций, а также ограничение доступа к информационным ресурсам.

В условиях санкций приобретают особый статус прямое взаимодействие исследователей в рамках наиболее актуальных тематиках МНТС. Анализ международного опыта и наш собственный опыт показывают, что, несмотря на усиление давления, можно сохранять и развивать международное сотрудничество в интересах российских ученых. На данный момент активное взаимодействие с глобальным югом и дружественными странами Европы позволит сохранить высокий уровень отечественной науки и заложить фундамент восстановления полноценного МНТС. Несмотря на последовательное ужесточение санкционного давления, уже не первый год нам удается вносить свой посильный вклад в решение этих задач и иных, которые научное сообщество перед нами ставит. Сегодня мы делаем все, что от нас зависит, чтобы российская наука и исследователи:

- сохранили возможность научных публикаций в рецензируемых высокорейтинговых журналах;
- имели возможность организовать и посещать международные конференции;
- могли приобретать необходимое оборудование и расходные материалы;
- сохранить возможность российским журналам принимать публикации зарубежных авторов;
- получать доступ к международным научным базам данных.

Анализ опыта других стран и наш текущий опыт по преодолению санкций показывает, что всегда есть обход санкционных барьеров, сильно снижающий давление на российскую науку и исследователей.

## INTERNATIONAL SCIENTIFIC COOPERATION UNDER THE PRESSURE OF SANCTIONS

**A.V. Moskalev**

*EOLLABS, Novosibirsk*

Anti-Russian sanctions have become increasingly strict over the past two years and affect more and more areas. They have a significant impact on scientific activity and international scientific and technical cooperation (ISTC), in which the Russian Federation plays a significant role. In this situation, it is critically important to ensure national scientific and technological security and achieve technological sovereignty of the country.

In modern history, there are many examples of sanctions in the field of science, for example, against South Africa, Israel, Iran, Iraq, Sudan, Serbia, etc. At one time, 57.3% of South African scientists experienced the consequences of a boycott, including refusals to accept manuscripts, direct bans on participation in and holding conferences, as well as restrictions on access to information resources.

Under sanctions, direct interaction between researchers within the framework of the most relevant ISTC topics acquires a special status. Analysis of international experience and our own experience show that, despite increased pressure, it is possible to maintain and develop international cooperation in the interests of Russian scientists. At the moment, active interaction with the global south and friendly countries of Europe will allow us to maintain a high level of domestic science and lay the foundation for the restoration of a full-fledged ISTC.

Despite the consistent tightening of sanctions pressure, for several years now we have been able to make our feasible contribution to solving these and other problems that the scientific community sets for us. Today, we are doing everything in our power to ensure that Russian science and researchers could:

- retain the opportunity to publish scientific papers in peer-reviewed, highly rated journals;
- have the opportunity to organize and attend international conferences;
- be able to purchase the necessary equipment and consumables;
- maintain the opportunity for Russian journals to accept publications from foreign authors;
- gain access to international scientific databases;

Analysis of the experience of other countries and our current experience in overcoming sanctions shows that there is always a way around the sanction barriers, which greatly reduces the pressure on Russian science

## ТРАНСКРИПТОМНЫЙ ПОДХОД ДЛЯ ОЦЕНКИ РЕГУЛЯЦИИ ПУТЕЙ МЕТАБОЛИЗМА АЛКАНОВ ПРЕДСТАВИТЕЛЕМ ФИЛЫ АСТИНОМУСЕТОТА

**В.А. Романова, М.И. Маркелова, Т.В. Григорьева, А.В. Лайков**

*Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань*

Микробная биоремедиация имеет большой потенциал для эффективного восстановления загрязненной углеводородами среды. Во время процесса биоремедиации микроорганизмы используют углеводороды в качестве источника углерода, извлекая энергию и питательные вещества для размножения. Системная биология является перспективным направлением для понимания взаимодействий между микроорганизмами, загрязняющими агентами и окружающей средой. Применение омиксных технологий для решения проблем системной биологии расширяет возможности для использования метаболической инженерии.

Штамм *Tsukamurella tyrosinosolvans* PS2 способен расти на алканах средней и длинной цепи (C12-C24). В наших предыдущих исследованиях протеома штамма PS2 сообщалось, что доминирующую роль в окислении гексадекана играет система, в которой главным ферментом является P450. Целью данной работы является исследование глобального ответа штамма *T. tyrosinosolvans* PS2 на воздействие углеводородов на транскриптомном уровне, в частности анализ регуляции экспрессии двух систем окисления в зависимости от длины алканов.

Штамм PS2 был выращен на минеральной среде с добавлением разных источников углерода: сахароза, додекан (C12), тетракозан (C24). Тотальная РНК клеток штамма PS2 была выделена с помощью набора Qiagen RNeasy Mini kit с некоторыми модификациями. Секвенирование транскриптома проводили на приборе FASTASeq 300. ПЦР в реальном времени проводили с помощью специфичных праймеров.

Анализ транскриптомных профилей показал кластеризацию образцов в зависимости от агрегатного состояния алканов. Особое внимание было уделено двум системам окисления алканов. Обнаружено, что на среде с добавлением C12 преимущественно активировался ген P450, а на среде с C24- ген *alkB*. Для проверки интересующих генов, выявленных в результате секвенирования транскриптома, была проведена количественная ПЦР транскриптов генов *alkB* и P450. Выявлено, что уровень экспрессии гена P450 повышался в 1000 раз на среде с C12, а гена *alkB* в 120 раз на среде с C24, по сравнению с контролем. При этом минимальное увеличение экспрессии генов обоих систем наблюдалось во всех образцах с добавлением алканов. Полученные результаты позволят получить более четкое представление о механизме окисления алканов.

## TRANSCRIPTOMIC APPROACH TO EVALUATE THE REGULATION OF ALKANE METABOLISM PATHWAYS BY A MEMBER OF ACTINOMYCETOTA PHYLUM

**V.A. Romanova, M.I. Markelova, T.V. Grigoryeva, A.V. Laikov**

*Kazan (Volga region) Federal University, Kazan*

Microbial biodegradation has a great potential for the effective remediation of hydrocarbon-contaminated environments. During the bioremediation process, microorganisms utilize hydrocarbons as a carbon source, extracting energy and nutrients for reproduction. Systems biology is a promising field for understanding the interactions between microorganisms, contaminating agents and the environment. The application of omics technologies to systems biology problems expands the opportunities for the use of metabolic engineering.

The *Tsukamurella tyrosinosolvans* PS2 strain is able to grow on medium and long chain alkanes (C12-C24). Our previous proteomic studies of strain PS2 indicated that a system in which P450 is the main enzyme plays a dominant role in hexadecane oxidation. The aim of this work is to investigate the global response of strain *T. tyrosinosolvans* PS2 to hydrocarbon exposure at the transcriptomic level, in particular to analyze the regulation of the expression of two oxidation systems depending on alkanes length.

The PS2 strain was grown on mineral medium supplemented with different carbon sources: sucrose, dodecane (C12), and tetracosane (C24). Total RNA of PS2 cells was isolated using the Qiagen RNeasy Mini kit with some modifications. Transcriptome sequencing was performed on a FASTASeq 300 platform. Real-time PCR was performed using specific primers.

Transcriptomic profiles analysis showed clustering of samples depending on the aggregation state of alkanes. Special attention was paid to two alkane oxidation systems. It was found that the P450 gene was preferentially activated on C12-supplemented medium and the *alkB* gene- on C24-supplemented medium. To validate the genes of interest identified by transcriptome sequencing, quantitative PCR of *alkB* and P450 gene transcripts was conducted. It was found that the expression level of P450 gene was increased 1000-fold on medium with C12 and *alkB* gene 120-fold on medium with C24, compared to control. At the same time, a minimal increase in gene expression of both systems was observed in all samples with the addition of alkanes. The results obtained will provide a clearer understanding of the mechanism of alkane oxidation.

**ДЕЛЕЦИЯ ДВУХ МАЛЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК MTS1338 И MTS0997 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS НАРУШАЕТ ИММУННЫЙ ОТВЕТ И ВЫЗЫВАЕТ ПРЕЖДЕВРЕМЕННУЮ ГИБЕЛЬ ИНФИЦИРОВАННЫХ МЫШЕЙ**

Е.Г. Салина<sup>1</sup>, Б.А. Мартини<sup>1</sup>, А.С. Григоров<sup>2</sup>, К.Б. Майоров<sup>3</sup>, Ю.В. Скворцова<sup>2</sup>, О.С. Быченко<sup>2</sup>, Н.Н. Логунова<sup>3</sup>, М.А. Капина<sup>3</sup>, И.А. Линге<sup>3</sup>, А.С. Апт<sup>3</sup>, Т.Л. Ажикина<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; <sup>2</sup>ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; <sup>3</sup>ЦНИИ туберкулеза, Москва

Малые некодирующие РНК играют ключевую роль в регуляции экспрессии генов и адаптации патогена к неблагоприятным стрессовым факторам. Известно, что малые РНК *M. tuberculosis* MTS0997 и MTS1338 присутствуют только у патогенных бактерий туберкулезного комплекса, а уровень их экспрессии многократно возрастает при инфекции *in vivo*, что указывает на их вероятное участие в регуляции жизнеспособности патогена при инфекции и его взаимодействии с иммунной системой хозяина.

Нами были получены мутантные штаммы *M. tuberculosis*  $\Delta$ MTS0997,  $\Delta$ MTS1338 и  $\Delta\Delta$ MTS0997\_MTS1338 с делецией генов малых РНК (по отдельности и совместно). Сравнение транскриптома  $\Delta\Delta$ MTS0997\_MTS1338 с транскриптомом клеток дикого типа выявило активацию генов, кодирующих секретиремые белки системы ESX-1, направленные на подавление иммунных клеток макроорганизма. Транскриптом костномозговых макрофагов мышей C57BL/6 при заражении мутантными штаммами  $\Delta$ MTS0997,  $\Delta$ MTS1338 и особенно  $\Delta\Delta$ MTS0997\_MTS1338 свидетельствовал о подавлении иммунных реакций макроорганизма, а именно, презентации антигенов, образования иммунопротеасомы, созревания фагосомы, синтеза провоспалительных цитокинов и интерферонов I типа. При инфекции чувствительных к туберкулезу мышей линии I/St мутантным штаммом  $\Delta\Delta$ MTS0997\_MTS1338 наблюдалось сокращение времени жизни животных по сравнению с их временем жизни при инфекции штаммом *M. tuberculosis* дикого типа; при восстановлении ранее утраченных генов малых РНК продолжительность жизни мышей при инфекции восстанавливалась. Сокращение времени жизни мышей наблюдалось и при инфекции мышей штаммом  $\Delta$ MTS0997; при инфекции штаммом  $\Delta$ MTS1338 не наблюдалось статистически достоверного отличия в продолжительности жизни животных от контрольной группы мышей, инфицированных штаммом дикого типа.

Таким образом, малые РНК MTS0997 и MTS1338 могут являться регуляторами метаболической адаптации *M. tuberculosis* при инфекции, влияя на жизнеспособность патогена и модулируя иммунный ответ организма-хозяина.

Работа поддержана грантом РФФ 22-14-00235.

**KNOCK-OUT OF TWO SMALL NON-CODING RNAs MTS1338 AND MTS0997 OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DISRUPTS THE HOST IMMUNE RESPONSE AND LEADS TO PREMATURE DEATH OF INFECTED MICE**

Е.Г. Salina<sup>1</sup>, B.A. Martini<sup>1</sup>, A.S. Grigorov<sup>2</sup>, K.B. Majorov<sup>3</sup>, Yu.V. Skvortsova<sup>2</sup>, O.S. Bychenko<sup>2</sup>, N.N. Logunova<sup>3</sup>, M.A. Kapina<sup>3</sup>, I.A. Linge<sup>3</sup>, A.S. Apt<sup>3</sup>, T.L. Azhikina<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences; <sup>2</sup>Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry; <sup>3</sup>Central Research Institute for Tuberculosis, Moscow

Small non-coding RNAs play a key role in regulating gene expression and pathogen adaptation to unfavorable stress factors. It is known that the small RNAs *M. tuberculosis* MTS0997 and MTS1338 are present only in pathogenic bacteria of the mycobacterium tuberculosis complex, and their expression significantly increases during infection *in vivo*, indicating their probable involvement in the regulation of the viability of the pathogen during infection and in the interaction with the host immune system.

We have constructed *M. tuberculosis* mutant strains  $\Delta$ MTS0997,  $\Delta$ MTS1338 and  $\Delta\Delta$ MTS0997\_MTS1338 with deletion of small RNA genes (individually and both together). Comparison of the transcriptome of  $\Delta\Delta$ MTS0997\_MTS1338 with the transcriptome of wild type *M. tuberculosis* cells revealed the activation of genes encoding secreted proteins of the ESX-1 system, which suppress the immune cells of the macroorganism. The transcriptome of bone marrow macrophages of C57BL/6 mice infected with mutant strains  $\Delta$ MTS0997,  $\Delta$ MTS1338, and especially  $\Delta\Delta$ MTS0997\_MTS1338 indicated suppression of the immune response of the macroorganism, e.g. the presentation of antigens, the formation of the immunoproteasome, the maturation of the phagosome, the synthesis of proinflammatory cytokines and type I interferons. Infection of tuberculosis-susceptible I/St mice with the mutant strain  $\Delta\Delta$ MTS0997\_MTS1338 caused a significant reduction in time of survival of infected animals compared to that when mice were infected with the wild-type strain of *M. tuberculosis*; complementation of deleted genes of small RNAs MTS0997 and MTS1338 restored the time of survival. A decrease in the time of survival of mice was also observed during infection with the  $\Delta$ MTS0997 strain, while infection with  $\Delta$ MTS1338 caused no statistically significant changes in comparison to control group of mice infected with the wild-type strain.

Thus, small RNAs MTS0997 and MTS1338 may be the regulators of metabolic adaptation of *M. tuberculosis* during infection, affecting the viability of the pathogen and modulating the host immune response.

This work was supported by the Russian Science Foundation (Grant 22-14-00235).

## НАНОПОРОВОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ CpG-ОСТРОВКА ИЗ ПРОМОТОРА O6-МЕТИЛГУАНИН-ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ: ПРОБЛЕМЫ И НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ

А.В. Сергеев, Д.П. Малышев, А.И. Генатуллина, М.Э. Зверева

Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Статус метилирования остатков цитозина по 5 положению в CpG-островке гена O6-метилгуанин-метилтрансферазы (MGMT) в глиобlastомах является общепризнанным молекулярным биомаркером для противоопухолевой терапии [1]. Технологии одно-молекулярного нанопорового секвенирования позволяют напрямую «считать» информацию о распределении метилированных оснований в геноме. Методом нанопорового секвенирования изучен статус метилирования 97 клинически значимых CpG-сайтов в промоторе MGMT человека. Показано, что гуанин-богатые области, формирующие G-квадруплексы (G4), гипометилируются, а комплементарные им цитозин-богатые последовательности, напротив, метилируются ДНК-метилтрансферазой Dnmt3a с повышенной эффективностью. Точность определения модифицированных оснований в G4-формирующих областях значительно снижалась по сравнению с окружающими последовательностями. Способность гипометилированных последовательностей промотора MGMT формировать G4-структуры была установлена алгоритмом G4Hunter [2] и подтверждена методом кругового дихроизма. Методом биослойной интерферометрии показано, что одноцепочечная гуанин-богатая ДНК-последовательность из промотора гена MGMT, формирующая G4, связывается с Dnmt3a-CD на порядок прочнее комплементарной ей цитозин-богатой цепи (Kd  $3 \cdot 10^{-8}$  и  $3 \cdot 10^{-7}$ М, соответственно), что свидетельствует о высоком сродстве Dnmt3a-CD к G4. Связываясь с Dnmt3a, G4-формирующие олигонуклеотиды из MGMT эффективно ингибировали реакцию метилирования (IC50  $6 \cdot 10^{-7}$ М). Полученные данные свидетельствуют о роли G4-формирующих последовательностей в метилировании промотора MGMT и подчеркивают сложности секвенирования гуанин-богатых областей методом нанопорового секвенирования.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по соглашению № 075-15-2021-1343.

1. Weller M, Stupp R, Reifenberger G et al. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol* 2010, 6: 39–51.
2. Brázda V et al. G4Hunter web application: a web server for G-quadruplex prediction. *Bioinformatics* 2019, 35: 3493–3495.

## NANOPORE SEQUENCING OF THE CpG ISLAND FROM THE PROMOTER OF O6-METHYLGUANINE-DNA METHYLTRANSFERASE: CHALLENGES AND NEW OPPORTUNITIES.

A. Sergeev, D. Malyshev, A. Genatullina, M. Zvereva

Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

The methylation status of cytosine residues at the 5th position within the CpG island of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene in glioblastomas is a well-established molecular biomarker for anti-cancer therapy [1]. Single-molecule nanopore sequencing technologies allow for the direct "reading" of information on the distribution of methylated bases in the genome. Using nanopore sequencing, the methylation status of 97 clinically significant CpG sites in the human MGMT promoter was studied. It was shown that guanine-rich regions, which form G-quadruplexes (G4), are hypomethylated, whereas complementary cytosine-rich sequences, on the contrary, are methylated by DNA methyltransferase Dnmt3a with increased efficiency. The accuracy of detecting modified bases in G4-forming regions was significantly reduced compared to the surrounding sequences. The ability of hypomethylated sequences in the MGMT promoter to form G4 structures was established using the G4Hunter algorithm [2] and confirmed by circular dichroism. Using bilayer interferometry, it was shown that the single-stranded guanine-rich DNA sequence from the MGMT gene promoter, forming G4, binds to Dnmt3a-CD an order of magnitude more strongly than the complementary cytosine-rich strand (Kd  $3 \cdot 10^{-8}$  and  $3 \cdot 10^{-7}$ М, respectively), indicating a high affinity of Dnmt3a-CD for G4. By binding to Dnmt3a, G4-forming oligonucleotides from MGMT effectively inhibited the methylation reaction (IC50  $6 \cdot 10^{-7}$ М). The obtained data indicate the role of G4-forming sequences in the methylation of the MGMT promoter and highlight the challenges of sequencing guanine-rich regions using nanopore sequencing.

The work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation under agreement No. 075-15-2021-1343.

1. Weller M, Stupp R, Reifenberger G et al. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol* 2010, 6: 39–51.
2. Brázda V et al. G4Hunter web application: a web server for G-quadruplex prediction. *Bioinformatics* 2019, 35: 3493–3495.



### ЭМБРИОГЕНЕЗ И ОНКОГЕНЕЗ ЧЕРЕЗ ПРИЗМУ ТРАНСКРИПЦИОННОГО АНАЛИЗА ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК

Н.А. Скрябин, Д.И. Жигалина, Т.Н. Киреева, Т.В. Никитина, С.Н. Государкина, Т.С. Герашченко, А.А. Хозяинова, М.Е. Меньяло, А.А. Фролова, А.А. Коробейникова, М.С. Третьякова, Е.В. Денисов

*НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, Томск*

Механизмы раннего постимплантационного эмбриогенеза человека остаются практически неизученными, в силу невозможности как наблюдения за физиологическим процессом, так и экспериментального моделирования. Одним из подходов, который можно применить для изучения данного этапа онтогенеза, может быть использование эмбриоидных тел (ЭТ), которые в значительной степени повторяют раннее эмбриональное развитие. Однако существуют сложности в определении типов клеток, поскольку практически отсутствуют данные о профиле экспрессии РНК в нормальных эмбрионах человека. Решение данной задачи возможно посредством сравнения клеток ЭТ и опухолевых клеток. Это позволит правильно охарактеризовать типы клеток, поскольку опухолевые дедифференцированные клетки могут сохранять маркеры как изначальных клеток, так и стволовых или прогениторных. Кроме того, такой сравнительный анализ может быть использован для поиска опухолевых стволовых и прогениторных клеток. Анализ ЭТ, полученных из индуцированных стволовых клеток здорового индивида (K7-4LF), проводился с помощью технологии 10x Genomics single cell 3' RNA-seq. Для сравнения были использованы результаты 10x Genomics single cell 5' RNA-seq 4 образцов аденокарциномы легкого T1-4N0-3M0, NACHT+/NACHT-. Биоинформатический анализ проводился с использованием Cell Ranger 7.1.0, Seurat 4.4.0, DoubletFinder 2.0.3, MAST 1.26.0., ScType и SCEVAN 1.0.1.

Клетки ЭТ проявляют транскрипционное сходство с опухолевыми клетками, как на математическом уровне (нахождение клеток в идентичных кластерах), так и на биологическом уровне через экспрессию маркеров, участвующих в эмбрио- и онкогенезе. В результате сравнения профилей экспрессии клеток ЭТ с образцами рака легкого показано значительное перекрытие кластеров. В частности, идентифицированы клетки эктодермального происхождения, имеющие маркеры эпителиальных прогениторов. Кластеры, которые показали различия в профилях экспрессии, включали в себя клетки, дифференцирующиеся в нейрональном направлении, плюрипотентные стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки и клетки плаценты. Дальнейший вектор исследований будет направлен на более глубокое профилирование эмбриоидных и опухолевых клеток, а также моделирование динамических процессов эмбрио- и канцерогенеза.

### EMBRYOGENESIS AND ONCOGENESIS THROUGH THE PRISM OF TRANSCRIPTIONAL ANALYSIS OF SINGLE CELLS

N.A. Skryabin, D.I. Zhigalina, N.N. Kireeva, T.V. Nikitina, S.N. Gosudarkina, T.S. Gerashchenko, A.A. Khozyainova, M.E. Menyailo, A.A. Frolova, A.A. Korobeynikova, M.S. Tretyakova, E.V. Denisov

*Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk*

The mechanisms of early postimplantation human embryogenesis remain practically unexplored due to the inability to observe the physiological process and to conduct experimental modeling. A potential approach to studying this ontogenic stage is the use of embryoid bodies (EBs), which largely replicate early embryonic development. However, identifying cell types is challenging due to the lack of data on the RNA expression profile in normal human embryos. A potential solution is to compare ET cells and tumor cells, which may facilitate the proper characterization of cell types. This approach could also be used to search for tumor stem and progenitor cells. EBs derived from induced pluripotent stem cells from a healthy individual (K7-4LF) were subjected to analysis using the 10x Genomics single-cell 3' RNA-seq technology. The results of the 10x Genomics single-cell 5' RNA-seq of four T1-4N0-3M0, NACHT+/NACHT- lung adenocarcinoma samples were employed for comparison. A bioinformatics analysis was conducted using the following software: Cell Ranger 7.1.0, Seurat 4.4.0, DoubletFinder 2.0.3, MAST 1.26.0, ScType, and SCEVAN 1.0.1.

EBs cells demonstrate transcriptional similarity with tumor cells at both the mathematical and biological levels. This similarity is evident at the mathematical level, where cells in identical clusters are identified, and at the biological level, through the expression of markers involved in both embryo- and oncogenesis. A comparison of the expression profiles of EBs cells with lung cancer samples revealed a significant overlap in clusters. In particular, cells of ectodermal origin with epithelial progenitor markers were identified. Clusters that exhibited differences in expression profiles included neuronal differentiating cells, pluripotent stem cells, mesenchymal stem cells, and placental cells. A future avenue of research will focus on a more detailed profiling of embryoid and tumor cells, as well as modeling the dynamic processes of embryo- and oncogenesis.

## ТАРГЕТНЫЙ ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ КРОВ В ПЕРВЫЙ ТРИМЕСТР С ЦЕЛЬЮ РАННЕГО ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ПРЕЭКЛАМПСИИ

**Н.Л. Стародубцева, А.С. Кононихин, А.Е. Бугрова, А.Г. Бржозовский, Е.Н. Николаев**

*НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова Минздрава России, Москва*

Преэклампсия (ПЭ) – одно из наиболее опасных акушерских патологий, характеризующееся различными молекулярными вариациями. ПЭ осложняет течение до 5% беременностей, значительно повышая уровень материнской и неонатальной заболеваемости, что в конечном итоге снижает долгосрочное качество жизни женщин. Общая неудовлетворенность рутинными методами оценки риска ПЭ во время скрининга первого триместра подчеркивает необходимость поиска более точных предикторов. Данное исследование направлено на определение ранних изменений протеома сыворотки крови матери и ассоциированных с ним процессов. Уровни 69 белков сыворотки крови первого триместра беременности (n=50) были определены количественно с использованием жидкостной хроматографии с мониторингом множественных реакций (ЖХ-МРМ МС). Семь сывороточных белков были идентифицированы как потенциальные ранние маркеры ПЭ: аполипопротеин М (АПОМ), субъединица В субкомпонента комплемента C1q (C1QB), лизоцим (LYZ), протромбин (F2), альбумин (ALB), цинк-альфа-2-гликопротеин (AZGP1) и тенасцин-X (TNXB). Ассоциация шести белков с ПЭ была показана ранее. Эти белки участвуют в таких важных молекулярных процессах, как активация комплемента и тромбоцитов, регуляция коагуляции. Кроме того, выраженное повышение уровня альбумина на 11-13 неделе беременности было достоверно связано с основными клиническими проявлениями ПЭ, что позволяет предложить альбумин в качестве раннего маркера патологии. Прогностические модели на основе метода опорных векторов (SVM), включающие белки сыворотки крови матери, продемонстрировали высокую точность, превзойдя традиционные методы скрининга. Это исследование не только закладывает основу для разработки более эффективных диагностических инструментов, но и позволяет предложить новые терапевтические мишени.

## TARGETED PROTEOMIC ANALYSIS OF BLOOD PROTEINS IN THE FIRST TRIMESTER FOR EARLY PREDICTION OF PREECLAMPSIA

**N.L. Starodubtseva, A.S. Kononikhin, A.E. Bugrova, A.G. Brzhozovskiy, E.N. Nikolaev**

*V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics Gynecology and Perinatology, Ministry of Healthcare, Moscow,*

Preeclampsia (PE) is a multifaceted and complex obstetric condition characterized by distinct molecular subtypes. Affecting up to 5% of pregnancies, PE significantly contributes to maternal and neonatal morbidity, ultimately diminishing the long-term quality of life for affected women. Due to widespread dissatisfaction with current methods for assessing PE risk, ongoing research is critically needed to pinpoint more accurate predictors. This study sought to investigate early changes in the maternal serum proteome and related signaling pathways. The study quantified the levels of 69 maternal serum proteins in the first trimester using liquid chromatography-multiple reaction monitoring mass spectrometry (LC-MRM MS) for 50 patients. Seven serum proteins were identified as potential early markers for PE: Apolipoprotein M (APOM), Complement C1q subcomponent subunit B (C1QB), Lysozyme (LYZ), Prothrombin (F2), Albumin (ALB), Zinc-alpha-2-glycoprotein (AZGP1), and Tenascin-X (TNXB). Six of these proteins have previously been linked to PE in earlier studies, underscoring the reliability and consistency of the findings. These proteins are integral to important molecular processes such as the complement and coagulation cascades and platelet activation. Additionally, significantly increased maternal albumin levels at 11-13 weeks of gestation were linked to PE characteristics, suggesting albumin's potential as an early biomarker. Support vector machine (SVM) models based on maternal serum proteome demonstrated high prognostic accuracy, outperforming traditional screening methods. This research not only lays the foundation for developing more effective diagnostic tools but also paves the way for innovative therapeutic approaches.

## ПРИМЕНЕНИЕ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ СУЛЬФАТИРОВАННОГО ПОЛИСАХАРИДА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫХ БУРЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

М.Н. Усачёв<sup>1</sup>, Е.С. Нерябова<sup>1</sup>, С.П. Ермакова<sup>2</sup>, В.Ф. Таранченко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>РТУ МИРЭА, Москва; <sup>2</sup>Тихоокеанский институт биорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток

Меланома человека является одним из самых агрессивных и устойчивых к терапии видов рака. Терапевтическое действие сульфатированных полисахаридов бурых водорослей, хорошо известно и является объектом интенсивного изучения. Установлено, что биологическое действие полисахаридов обусловлено их структурой, которая зависит от многих факторов: вида водорослей, места и времени сбора водорослей, также методов выделения полисахаридов. Ранее было установлено, что полисахариды, выделенные из бурых водорослей, проявляют выраженную активность к ингибированию роста клеток меланомы и не токсичны для здоровых клеток организма. Однако, несмотря на множество проведённых исследований, в настоящее время механизм терапевтического действия полисахарида до конца не изучен.

Разработана методика ненаправленного протеомного анализа с использованием ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии и масс спектрометрии (УВЭЖХ-МС). Ферментативный гидролиз белков клеток меланомы «SK-MEL-28» проводили трипсином на фильтрах «Amicon» с предварительным восстановлением дисульфидных связей и алкилированием 4-винилпиридином. Полученные пептиды анализировали с использованием УВЭЖХ-МС системы «Dionex UltiMate RS 3000», сопряжённой с гибридным масс-спектрометром высокого разрешения «Q Exactive HF-X», на колонке «Acquity UPLC BEH C-18» (100×2,1 мм, Ø 1,7 мкм). Первичную обработку масс-хроматограмм и последующий статистический анализ выполняли с применением программного обеспечения «Peaks XI». Полученные результаты интерпретировали с помощью онлайн платформы прогнозирования белковых взаимодействий «STRING».

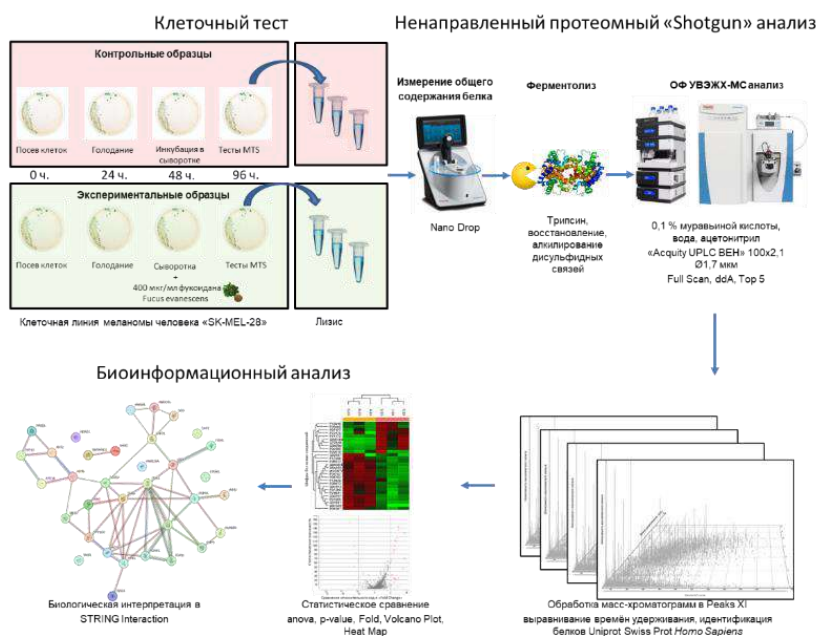


Рис. 1. Схема эксперимента при исследовании терапевтического действия сульфатированного полисахарида,

Проведены регистрация и идентификация более 2000 белков в лизатах клеток меланомы человека SK-MEL-28. С использованием предложенной методики идентифицированы 34 белка, содержание которых изменялось в исследуемых клетках под действием полисахарида, выделенного из бурых водорослей. Согласно литературным данным, выявленные белки участвуют в формировании селективного клеточного отклика на внешнее воздействие. Таким образом, применение предложенной методики позволило получить достоверную информацию о механизме терапевтического действия полисахарида *in vitro*: сульфатированный полисахарид может непосредственно взаимодействовать с идентифицированными белками или действовать опосредованно через другие белки путей сигнальной трансдукции.

Работа выполнена при реализации в Институте тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова в РТУ МИРЭА программы стратегического академического лидерства «Программы Приоритет 2030» – «Радиофармпрепараты 2023».

## THE LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY BY THE STUDY OF THE ANTITUMOR ACTIVITY OF FUCOIDAN ISOLATED FROM THE FAR EASTERN BROWN ALGAE *FUCUS EVANESCENS*

M.N. Usachev<sup>1</sup>, E.S. Neryabova<sup>1</sup>, S.P. Ermakova<sup>2</sup>, V.F. Taranченко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>RTU MIREA; <sup>2</sup>Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok

Human melanoma is one of the most aggressive and treatment-resistant types of cancer. Fucoidan, contained in Far Eastern algae, inhibits the growth of melanoma cells and is harmless to healthy cells. The antitumor activity of fucoidan is related to the structure of the polysaccharide and depends on the type of producer, the place of its growth, the methods of extracting the substance. Many studies have

focused on the antitumor action of fucoidan. Currently it is not understood. In this study, a HPLC-MS method for non-targeted proteomic analysis of human melanoma cell lysates was developed. More than 2000 proteins of melanoma were identified. After treating SK-MEL-28 cell line with fucoidan extracted from the *Fucus evanescence*, the level of 34 proteins statistically significantly changed. The obtained results expand the understanding of the antitumor action of fucoidan. Digest of melanoma cell lysates was performed with trypsin by FASP technology. Disulfides reducing by DTT and alkylation of cysteine residues by 4-vinylpyridine was performed previously. HPLC-MS analysis was performed by "Dionex UltiMate RS 3000" coupled with a "Q Exact HF-X". The column is "Acquity UPLC BEH C-18" 100x2.1 mm, Ø 1.7 microns. Mobil phase is 0,1% formic acid in water and acetonitrile. Data processing was performed by Peaks XI software and using the online protein interaction prediction platform "STRING".

*This study was performed by the strategic academic leadership program "Priority 2030 Program" – "Radiopharmaceuticals 2023" at RTU MIREA.*

**МЕТАБОЛОМНОЕ И ПРОТЕОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ПРИ ГСД: АНАЛИЗ РИСКОВ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ПОДХОД**  
**В.Е. Франкевич, В.В. Чаговец, Н.А. Франкевич**

*НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова Минздрава России, Москва*

Большое количество белков и метаболитов во время беременности являются важными элементами внутриутробной среды и оказывают влияние на плод, тем самым обеспечивая большое количество информации для прогнозирования возможных исходов беременности и состояния плода, особенно при развитии осложнений. Некоторые изменения белков и метаболитов при нормальной и осложненной беременности давно известны. Но несмотря на значительный прогресс в понимании механизмов осложнений беременности и их влияния на плод, еще предстоит изучить те ультраструктурные механизмы реализации заболеваний на ранних стадиях, которые позволят разработать диагностические панели для персонализированного подхода к различным когортам пациентов и транслировать данные знания в рутинную клиническую практику.

Целью нашего исследования является разработка системы прогнозирования аномалий роста и развития плода с использованием метаболомного и протеомного профиля сыворотки крови беременных на ранних сроках беременности.

В рамках пилотного исследования было проведено исследование с участием 160 женщин, которые обратились для пренатального скрининга в I триместре беременности. Были взяты образцы крови на трех этапах беременности: на 11–14 неделях, 24–28 неделях и 30–32 неделях. Липиды были извлечены из сыворотки крови с использованием модифицированного метода Фолча, а их молекулярный состав был проанализирован методом масс-спектрометрии. Данные были обработаны с помощью многофакторного анализа OPLS-DA, а также проведен анализ ROC-кривых для определения прогностической значимости признаков.

Были обнаружены изменения в липидном профиле сыворотки крови у беременных с фетальной макросомией по сравнению с теми, у кого этого осложнения нет. Были разработаны модели логистической регрессии для прогнозирования развития фетальной макросомии. Это может быть важным шагом в раннем выявлении и прогнозировании фетальной макросомии и ГСД, что позволит своевременно принимать меры по предотвращению осложнений как для матери, так и для ребенка.

**METABOLOMIC AND PROTEOMIC PROFILING IN GDM: RISK ANALYSIS AND DIAGNOSTIC APPROACH**

**V.E. Frankevich, V.V. Chagovets, N.A. Frankevich**

*V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics Gynecology and Perinatology, Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow*

A large number of proteins and metabolites during pregnancy are important elements of the intrauterine environment and affect the fetus, thereby providing a large amount of information for predicting possible pregnancy outcomes and fetal health, especially in the development of complications. Some changes in proteins and metabolites during normal and complicated pregnancy have long been known. But despite significant progress in understanding the mechanisms of pregnancy complications and their impact on the fetus, it is still necessary to study those ultrastructural mechanisms of disease implementation in the early stages that will allow developing diagnostic panels for a personalized approach to various patient cohorts and translating this knowledge into routine clinical practice.

The aim of our study is to develop a system for predicting fetal growth and development abnormalities using the metabolomic and proteomic profile of pregnant women's blood serum in early pregnancy.

As part of the pilot study, a study was conducted involving 160 women who applied for prenatal screening in the first trimester of pregnancy. Blood samples were collected at three stages of pregnancy: 11–14 weeks, 24–28 weeks, and 30–32 weeks. Lipids were extracted from serum using a modified Folch method, and their molecular composition was analyzed by mass spectrometry. The data were processed using OPLS-DA multivariate analysis, and ROC curve analysis was performed to determine the prognostic significance of the features.

Changes in the serum lipid profile were found in pregnant women with fetal macrosomia compared to those without this complication. Logistic regression models were developed to predict the development of fetal macrosomia. This may be an important step in early detection and prediction of fetal macrosomia and GDM, which will allow timely measures to prevent complications for both mother and child.

## ПОИСК МЕХАНИЗМОВ ПРИОБРЕТЕНИЯ ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ЦИСПЛАТИНУ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ СЕКРЕТОМА, ИНДУЦИРОВАННОГО ТЕРАПИЕЙ

**И.В. Бекбаева<sup>1,2</sup>, П.В. Шнайдер<sup>1</sup>, О.М. Иванова<sup>1</sup>, А.И. Лашкин<sup>1</sup>, В.О. Шендер<sup>1,3</sup>, К.С. Ануфриева<sup>1</sup>, Г.П. Арапиди<sup>1,2,3</sup>**

<sup>1</sup>ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва; <sup>2</sup>Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный; <sup>3</sup>ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемакина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Цисплатин применяется при терапии аденокарциномы яичника в связи с его способностью повреждать ДНК опухолевых клеток и вызывать апоптоз. Приобретаемая резистентность к цисплатину, в основном, объясняется активацией процессов репарации и изменения регуляции клеточного цикла в опухолевых клетках. Ранее нами было описано приобретение резистентности к химиотерапии реципиентными клетками при инкубации с внеклеточными везикулами от донорных апоптотических опухолевых клеток.

В данной работе на модели аденокарциномы яичника мы исследовали изменения транскриптома и обуславливающие их молекулярные механизмы в реципиентных клетках под воздействием везикул от донорных клеток, погибающих под действием цисплатина. Для опухолевых клеток линий SKOV3 и A2780 было показано, что секретом, индуцируемый терапией (therapy-induced secretome, TIS), способствует приобретению резистентности к терапии. Аналогичные эксперименты с линиями hTERT FT282, HaCaT и фибробластов не привели к появлению резистентности у реципиентных клеток. По данным транскриптомного анализа в опухолевых клетках активировались процессы сплайсинга РНК, регуляции клеточного цикла и репарации ДНК. В неопухолевых клеточных линиях изменения транскриптома были слабее, так, в клетках hTERT FT282 обработка TIS приводила к активации провоспалительных путей, а для HaCaT и фибробластов клеточные процессы значимо не менялись.

Для поиска молекулярных механизмов, которые запускаются компонентами TIS и вызывают изменения транскриптома, по данным белок-белковых взаимодействий был построен граф клеточных сигнальных каскадов. Анализ протеомных данных позволил определить белки, которые встречаются только в TIS и могут запускать сигнальные каскады. По результатам анализа открытых данных было показано, что транскрипционные факторы FOXM1, MYBL2 и STAT3 могут влиять на изменения транскриптома в SKOV3 после обработки TIS.

## MECHANISMS OF ACQUIRED TUMOR CELL RESISTANCE TO CISPLATIN MEDIATED BY THERAPY-INDUCED SECRETOME

**I.V. Bekbaeva<sup>1,2</sup>, P.V. Shnaider<sup>1</sup>, O.M. Ivanova<sup>1</sup>, A.I. Lashkin<sup>1</sup>, V.O. Shender<sup>1,3</sup>, K.S. Anufrieva<sup>1</sup>, G.P. Arapidi<sup>1,2,3</sup>**

<sup>1</sup>Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency, Moscow;

<sup>2</sup>Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny; <sup>3</sup>Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

Cisplatin is widely used in the treatment of ovarian adenocarcinoma due to its ability to damage tumor cell DNA and induce apoptosis. The resistance to cisplatin acquisition is mainly explained by the activation of repair processes and changes in cell cycle regulation in tumor cells. Previously we described the acquisition of resistance to chemotherapy by recipient cells under incubation with extracellular vesicles from donor apoptotic tumor cells.

In this work, using a model of ovarian adenocarcinoma, we investigated transcriptome changes and the molecular mechanisms that determine them in recipient cells under the influence of vesicles from donor cells that die under the cisplatin treatment. For SKOV3 and A2780 tumor cell lines, the therapy-induced secretome (TIS) was shown to contribute to the acquisition of resistance to therapy. Similar experiments with hTERT FT282, HaCaT, and fibroblast lines showed no acquired resistance in recipient cells. According to transcriptome analysis, RNA splicing, cell cycle regulation, and DNA repair processes were activated in tumor cells. In non-tumor cell lines, transcriptome changes were less noticeable, for example, in hTERT FT282 cells, TIS treatment led to activation of proinflammatory pathways, while for HaCaT and fibroblasts, cellular processes did not change significantly.

To investigate molecular mechanisms that are triggered by TIS components and cause transcriptome changes, a graph of cellular signaling cascades was constructed based on protein-protein interaction data. Analysis of proteomic data allowed to identify proteins that are present only in TIS and can trigger signaling cascades. Analysis of publicly available data showed that transcription factors FOXM1, MYBL2, and STAT3 might be responsible for transcriptome changes in SKOV3 after TIS treatment. To analyze the changes occurring in cells upon further treatment with cisplatin, we analyzed scRNA-seq data for SKOV3. The response to cisplatin was shown to involve sequential activation of genes responsible for mRNA splicing and oxidative phosphorylation.

## НЕОЧЕВИДНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ПРИ ПОИСКЕ БЕЛКОВЫХ МИШЕНЕЙ ЛЕКАРСТВ МЕТОДОМ ТЕМПЕРАТУРНОГО ПРОТЕОМНОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ

Л.А. Гарибова, И.И. Федоров, М.В. Иванов, М.В. Горшков

*Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе, ФИЦ химической физики РАН им. Н.Н. Семенова, Москва*

Одним из определяющим этапов разработки новых лекарственных препаратов является идентификация таргетных белков, с которыми взаимодействует лекарство. Этот процесс имеет критическое значение для понимания механизмов действия лекарства и его потенциальных побочных эффектов. Химическая протеомика, в частности температурное профилирование протеома (ТПР), представляет собой важный метод для решения этой задачи. ТПР основан на измерении точек температурной денатурации белков. При изменении температуры белки переходят в нерастворимое состояние, и их можно разделить на растворимые и нерастворимые фракции. С помощью масс-спектрометрии можно построить температурные кривые растворимости для каждого белка и определить их точки денатурации. Взаимодействие белков с химическими соединениями изменяет эти точки, что позволяет выявить белковые мишени лекарств.

Тем не менее, в методе температурного профилирования протеома возникает ряд вопросов. Во-первых, теоретически кривые растворимости для одного белка в контрольных и обработанных лекарством образцах совпадают при начальной температуре 37°C. Однако на практике это часто не наблюдается. Это явление связано с тем, что белки уже на исходной температуре демонстрируют различия в интенсивности. Во-вторых, использование высоких концентраций лекарственного вещества в классических экспериментах по ТПР может приводить к неспецифическому связыванию лекарственного соединения с белками, что усложняет идентификацию истинных мишеней. Кроме того, дополнительной проблемой является изменение фоновых сигналов при записи спектров, что может искажать данные о интенсивности части пептидов. Целью данного исследования является анализ возникающих проблем, связанных с классическим методом температурного профилирования протеома, а также разработка альтернативного подхода на основе ультракороткого полнопротеомного анализа DirectMS1. В рамках работы планируется исследовать клеточные линии различных типов рака, обработанные как известными, так и новыми экспериментальными онкологическими препаратами. В работе рассмотрены результаты, полученные для клеточной линии рака яичников A2780 и онкопрепаратов топотекан, 8-азагуанин и экспериментальных соединений.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-14-00229-П).*

## PITFALLS IN TEMPERATURE PROTEOMIC PROFILING FOR PROTEIN DRUG TARGETS IDENTIFICATION

L.A. Garibova, I.I. Fedorov, M.V. Ivanov, M.V. Gorshkov

*Talrose Institute for Energy Problems of Chemical Physics, Semenov Federal Research Center of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow*

One of the key stages in the development of new drugs is the identification of target proteins with which the drug interacts. This process is critically important for understanding the mechanisms of drug action and its potential side effects. Chemical proteomics, particularly thermal proteome profiling (TPP), is a significant method for addressing this task. TPP is based on measuring the thermal denaturation points of proteins. As the temperature changes, proteins transition to an insoluble state, allowing their separation into soluble and insoluble fractions. Using mass spectrometry, it is possible to construct thermal solubility curves for each protein and determine their denaturation points. The interaction of proteins with chemical compounds alters these points, enabling the identification of drug target proteins.

However, there are several pitfalls associated with the TPP method. First, theoretically, solubility curves for a single protein in control and drug-treated samples should match at the initial temperature of 37°C. In practice, however, this is often not observed. This discrepancy is related to the fact that proteins already show differences in intensity at the initial temperature. Second, the use of high concentrations of drug compounds in classic TPP experiments can lead to nonspecific binding of the drug to proteins, complicating the identification of true targets. Additionally, another issue is the change in background signals when spectra are recorded, which can distort intensity data for some peptides. The aim of this study is to analyze the emerging challenges associated with the classical thermal proteome profiling method, as well as to develop an alternative approach based on the ultrafast quantitative proteomics method DirectMS1. In this work, we plan to investigate cell lines from various types of cancer treated with both known and new experimental anticancer drugs. The study includes results obtained for the A2780 ovarian cancer cell line and the anticancer drugs topotecan, 8-azaguanine, and experimental compounds.

*This work was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 20-14-00229-P).*

## РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ СОЗДАНИЯ ПАНЕЛЕЙ ПЕПТИДНЫХ СТАНДАРТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Г.Л. Кожемякин<sup>1</sup>, О.В. Федоров<sup>1</sup>, И.О. Бутенко<sup>1</sup>, И.К. Чудинов<sup>1,2</sup>, М.С. Носов<sup>2</sup>, В.Д. Гремячева<sup>1</sup>, Н.А. Кициловская<sup>1</sup>, И.А. Никитеев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва; <sup>2</sup>Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный

Для проведения количественных протеомных исследований методом хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС) необходимо применять наборы синтетических пептидных стандартов, которые включают пары из синтетических пептидов, получаемых при подготовке проб для восходящего протеомного ВЭЖХ-МС анализа, содержащие изотопы в природном соотношении («лёгких»), или же несущие на С-конце остаток лизина или аргинина, содержащий изотопы <sup>13</sup>C и <sup>15</sup>N в соотношении 100:1 и выше по отношению к наиболее распространённым в природе <sup>12</sup>C и <sup>14</sup>N. Это особенно важно для применения данного метода в клинической практике, для определения абсолютной концентрации белков плазмы крови (цитокины, С-реактивный белок, онкомаркёры), которые могут являться маркерами различных заболеваний и состояний. Основным методом получения таких стандартов, является твердофазный пептидный синтез (SPPS). Несмотря на распространённость данного подхода в биоорганической химии, разработка и отладка самого протокола получения стандартов, от создания программного обеспечения для отбора пептидов на основе анализа литературы и актуальных баз данных до определения точной концентрации полученных пептидных препаратов, является важнейшим направлением для реализации концепции персонализированной медицины, особенно в условиях санкционного давления и плана правительства РФ по реализации импортозамещения. В нашей работе представлено описание получения готовых пептидных стандартов для более чем 100 белков плазмы крови, в том числе для белков-онкомаркёров, таких как: тиреоглобулин, галектин-3, цитокератин-19, матриксная металлопротеиназа 9, металлоэндопротеиназа 2, тканевой ингибитор металлопротеиназ-1, дипептидилпептидаза 4. Разработанная последовательность действий включает в себя программный пакет для отбора наиболее подходящих для MRM-анализа пептидов, проект планшетного пептидного синтезатора (на данный момент синтез проводится на синтезаторе PurePep®Chorus, компании GyrosProtein Technologies (США)), а также методы очистки и определения концентрации с использованием ВЭЖХ УФ-МС.

В дальнейшем планируется прототипирование планшетного синтезатора пептидов для реализации высокопараллельного автоматизированного синтеза, что позволит производить быстрый поиск необходимых последовательностей для панелей стандартов клинически важных белков.

## DEVELOPMENT OF A METHODOLOGY FOR CREATING PANELS OF PEPTIDE STANDARDS FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF CLINICALLY RELEVANT HUMAN BLOOD PLASMA PROTEINS

G.L. Kozhemyakin<sup>1</sup>, O.V. Fedorov<sup>1</sup>, I.O. Butenko<sup>1</sup>, I.K. Chudinov<sup>1,2</sup>, M.S. Nosov<sup>2</sup>, V.D. Gremyacheva<sup>1</sup>, N.A. Kitsilovskaya<sup>1</sup>, I.A. Nikiteev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow; <sup>2</sup>Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny

In order to conduct quantitative proteomic studies by high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS), it is essential to utilise sets of synthetic peptide standards. These include pairs of synthetic peptide analogues obtained during sample preparation for bottom-up HPLC-MS analysis, containing isotopes in the natural ratio (termed 'light'). The peptide standards are required to carry a lysine or arginine residue at the C-terminus, effectively labelled with <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N isotopes in a ratio of 100:1 or higher relative to the most abundant <sup>12</sup>C and <sup>14</sup>N in nature. This is particularly crucial for the implementation of this methodology in clinical applications, where the objective is to determine the precise concentration of blood plasma proteins, including cytokines, C-reactive protein, and oncomarkers, which can serve as biomarkers for a range of diseases and conditions. In this study, we present a description of the synthesis of peptide standards for over 100 blood plasma proteins, including oncomarker proteins such as thyroglobulin, galectin-3, cytokeratin-19, metalloendoprotease 2, matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinases-1, and dipeptidyl peptidase 4. The developed technological pipeline includes a software package for the selection of the most suitable peptides for MRM analysis, a tablet peptide synthesiser design (currently synthesis is performed on a PurePep® Chorus synthesiser, GyrosProtein Technologies (USA)), and methods of purification and concentration determination using amino acid analysis with HPLC-UV-MS.

In the future, we plan to develop a prototype of a tablet peptide synthesiser for the implementation of highly parallel automated synthesis, which will allow rapid screening for sequences, suitable for including into panels of standards of clinically important proteins.



**НОКДАУН ADAR УСИЛИВАЕТ АКТИВАЦИЮ КОНТРОЛЬНОЙ ТОЧКИ СБОРКИ ВЕРЕТЕНА ДЕЛЕНИЯ И АПОПТОЗ В КЛЕТКАХ РАКА ЯИЧНИКА, ВЫЗВАННУЮ ИНГИБИТОРОМ СПЛАЙСИНГА**

**В.В. Кудрявский<sup>1,3</sup>, А.О. Гончаров<sup>1,2</sup>, О.М. Иванова<sup>1</sup>, М.М. Лукина<sup>1</sup>, А.Г. Бржозовский<sup>3</sup>, А.С. Кононихин<sup>3</sup>, Е.Н. Николаев<sup>3</sup>, С.А. Мошковский<sup>1</sup>, В.О. Шендер<sup>1,4</sup>**

<sup>1</sup>ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России; <sup>2</sup>ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России; <sup>3</sup>Сколковский институт науки и технологий; <sup>4</sup>ФГБУ ГНЦ ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Сплайсинг пре-мРНК и редактирование РНК А-на-И являются взаимосвязанными процессами, имеющими решающее значение для регуляции экспрессии генов и разнообразия белков. Мы создали линию клеток аденокарциномы яичников SKOV3 с нокдауном ADAR, чтобы исследовать это взаимодействие. Клетки с дефицитом ADAR показали повышенную чувствительность к терапии, нацеленной на сплайсосому (STT). Протеомный анализ выявил повышенное содержание белков, участвующих в контрольной точке сборки веретена (SAC), в клетках, обработанных ингибитором сплайсинга пладиенолидом В (PldB), по сравнению с контрольными клетками. Этот эффект был усилен в клетках с нокдауном ADAR. Кроме того, мы наблюдали снижение уровня антиапоптотического белка BIRC6 и повышение уровня проапоптотических белков DAPK1 и DNAJB4 в клетках с нокдауном ADAR после обработки PldB. Наши результаты показывают, что совместный нокдаун ADAR и воздействие PldB синергически вызывают митотический стресс и активируют апоптотические пути. Эти результаты свидетельствуют о том, что снижение активности ADAR увеличивает эффективность STT посредством активации SAC, что подчеркивает потенциал воздействия на механизмы редактирования и сплайсинга РНК при лечении аденокарциномы яичников.

**ADAR KNOCKDOWN ENHANCES SPLICING INHIBITOR-INDUCED ACTIVATION OF SPINDLE ASSEMBLY CHECKPOINT AND APOPTOSIS IN OVARIAN CANCER CELLS**

**V. Kudriavskii<sup>1,3</sup>, A. Goncharov<sup>1,2</sup>, O. Ivanova<sup>1</sup>, M. Lukina<sup>1</sup>, A. Brzhozovskiy<sup>3</sup>, A. Kononikhin<sup>3</sup>, E. Nikolaev<sup>3</sup>, S. Moshkovskii<sup>1</sup>, V. Shender<sup>1,4</sup>**

<sup>1</sup>Lopukhin Federal Research and Clinical Center, Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency; <sup>2</sup>Pirogov Russian National Research Medical University; <sup>3</sup>Skolkovo Institute of Science and Technology; <sup>4</sup>Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

RNA splicing and A-to-I RNA editing are interconnected processes crucial for gene expression regulation and protein diversity. We created an ADAR-knockdown SKOV3 ovarian adenocarcinoma cell line to investigate this interplay. ADAR-deficient cells showed increased sensitivity to the spliceosome-targeted therapy (STT). Proteomic analysis revealed increased abundance of proteins involved in the spindle assembly checkpoint (SAC) in cells under splicing inhibitor pladienolide B (PldB) treatment compared to control cells. This effect was facilitated by ADAR knockdown. Additionally, we observed decreased levels of the antiapoptotic protein BIRC6 and increased proapoptotic proteins DAPK1 and DNAJB4 in ADAR-knockdown cells after PldB treatment. Our results suggest that ADAR knockdown and PldB synergistically induce mitotic stress and activate apoptotic pathways. These findings indicate that ADAR knockdown facilitates STT via activation of SAC, highlighting the potential of targeting RNA editing and splicing mechanisms in ovarian adenocarcinoma treatment.

## МЕТАБОЛОМ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ HEPG2 ПРИ НОКАУТЕ ПО ГЕНУ ТОММ34 ПРИ ПРОЛОНГИРОВАННОМ НАБЛЮДЕНИИ

**И.Ю. Курбатов, О.И. Киселева, В.А. Арзуманян, И.В. Вахрушев, Я.С. Ким, Е.В. Поверенная**

*НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва*

Клеточные линии незаменимы при проведении практически любых современных исследований в области наук о жизни. И хотя они имеют заслуженную репутацию биологически стабильных в продолжительном периоде времени объектов, аккумулируется все больше данных, свидетельствующих, что эта стабильность локальна и границы ее колеблются при переходе от задачи к задаче. Отсутствие четких и общепринятых процедур контроля молекулярной сохранности клеточных линий ставит под вопрос воспроизводимость получаемых омикс-данных и, тем самым, снижает доверие к результатам экспериментов. Метаболом наиболее чувствительный к изменениям уровень, профилирование которого позволяет оценить «стабильность» организмов. Мы выполнили лонгитудинальное исследование метаболома клеточной линии гепатобластомы человека HepG2 как наиболее используемых объектов по исследованию токсичности и метаболизма лекарств. Клетки культивировали в течение 0, 5, 10, 15 и 20 дней без явных внешних воздействий с идентичными интервалами обновления питательной среды. В результате профилирования с помощью ГХ × ГХ-МС анализа было выявлено три группы метаболитов, отличающихся по паттерну количественного изменения их содержания во времени.

Аналогичное исследование нокаутированной по гену ТОММ34 клеточной линии HepG2 также показало наличие изменений в динамике содержания метаболитов. Однако, в нокаутированных клетках отсутствует ряд сахаров и их конъюгатов, участвующих в пентозофосфатном пути и метаболизме галактозы, представляющих 40% суммарно выявленных метаболитов для нормальных клеток HepG2. Данная работа является первым этапом к определению границ значимых изменений метаболитов, необходимых для функциональной оценки клеточных линий при различных типах исследований и сопоставления получаемых результатов омикс-профилирования. В случае нокаутированных по гену ТОММ34 клетках, полученные сведения позволяют уточнить функцию кодируемого белка, который является субъединицей митохондриального белкового комплекса.

## LONGITUDINAL STUDY OF THE HEPG2 CELL LINE METABOLOME AFTER TOMM34 KNOCK-OUT

**I.Yu. Kurbatov, O.I. Kiseleva, V.A. Arzumanyan, I.V. Vakhrushev, Y.S. Kim, E.V. Poverennaya**

*Institute of Biomedical Chemistry, Moscow*

Cell lines are indispensable for virtually any modern life science research. Although they have a well-deserved reputation as biologically stable objects over a long period of time, more and more data are accumulating indicating that this stability is localised and its boundaries fluctuate from task to task. The lack of clear and generally accepted procedures for controlling the molecular integrity of cell lines calls into question the reproducibility of the omics data obtained and thus reduces confidence in the results of experiments. The metabolome is the most sensitive level to changes, profiling of which allows us to assess the "stability" of organisms. We performed a longitudinal study of the metabolome of the human hepatoblastoma cell line HepG2 as the most used targets for drug toxicity and metabolism studies. Cells were cultured for 0, 5, 10, 15 and 20 days without obvious external influences with identical nutrient medium renewal intervals. Profiling by GC×GC-MS analysis identified three groups of metabolites that differed in the pattern of quantitative change in their content over time.

A similar study of the TOMM34 gene-knockout HepG2 cell line also showed the presence of changes in the dynamics of metabolite content. However, a number of sugars and their conjugates involved in the pentose phosphate pathway and galactose metabolism, representing 40% of the total metabolites identified for normal HepG2 cells, were absent in the knockout cells.

This work is a first stage towards defining the boundaries of significant metabolite changes required for functional assessment of cell lines in different types of studies and comparing the resulting omics profiling results. In the case of TOMM34 gene-knockout cells, the information obtained allows us to clarify the function of the encoded protein, which is a subunit of the mitochondrial protein complex.

**ТАРГЕТНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ В ЗАМОРОЖЕННЫХ ОБРАЗЦАХ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С COVID-19**  
**П. Стрельникова<sup>1,2</sup>, А. Бугрова<sup>1,2</sup>, А. Кононихин<sup>1,3</sup>, Н. Захарова<sup>2</sup>, Е. Дьячкова<sup>4</sup>, А. Бржозовский<sup>1</sup>, М. Индейкина<sup>2</sup>,  
И. Курочкин<sup>2,5</sup>, А. Аверьянов<sup>4</sup>, Е. Николаев<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Сколковский институт науки и технологий, <sup>2</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН,  
<sup>3</sup>Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе РАН, <sup>4</sup>НИИ пульмонологии ФМБА России, <sup>5</sup>Ка-  
федра  
химической энзимологии химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Пандемия COVID-19 стала серьезным вызовом для медицины и науки вследствие необходимости оперативной разработки инновационных терапевтических и диагностических средств. В частности, актуальной задачей является быстрая идентификация, а также валидация прогностических маркеров, позволяющих определить риски тяжелой формы заболевания.

В данной работе методы таргетной (количественной) протеомики в сочетании с анализом данных с помощью инструментов математической статистики и машинного обучения впервые применялись к исследованию протеома замороженной крови пациентов с COVID-19.

Все пациенты (n = 99) были госпитализированы, диагноз (COVID-19) подтвержден методом кПЦР. Пациенты были разделены на группы тяжести в зависимости от уровня необходимой им респираторной поддержки (“легкая” группа, n=32, “умеренная”, n=39, “тяжелая”, n=19). Контрольная группа (n= 32) была представлена парными образцами цельной крови и плазмы. От всех участников исследования было получено информированное согласие на обработку данных.

Измерение концентраций 203 белков проводили с применением таргетной масс-спектрометрии (МС), основанной на методе мониторинга множественных реакций (multiple reaction monitoring, MRM) с использованием пептидных стандартов, меченных стабильными изотопами.

Для образцов цельной крови были получены достоверные измерения концентраций 94 белков. Статистически значимые различия были выявлены для 44 белков между разными группами тяжести. Изменения уровней 61 воспроизводимого маркера COVID-19 (SERPINA3, SERPING1, ORM1, HRG, LBP, APOA1, AHSG, AFM, ITIH2 и т. д.) соответствовали исследованиям, ранее проведенным для образцов сыворотки/плазмы крови. В результате анализа были предложены различные варианты наборов белков-биомаркеров, позволяющих классифицировать пациентов по тяжести заболевания. Наилучший результат был получен с использованием панели из 10 белков: PZP, THBS1, APOC4, APOE, APOM, AHSG, APOA4, LUM, HRG, APOC3. Для модели, основанной на алгоритме линейной регрессии, были получены следующие показатели: ROC-AUC = 0.98 для классификации всех пациентов с COVID-19 и контролей ROC-AUC = 0.97 для разделения тяжелой и легкой групп.

**TARGETED ANALYSIS OF PLASMA PROTEINS IN FROZEN WHOLE BLOOD SAMPLES FROM PATIENTS WITH COVID-19**  
**P. Strelnikova<sup>1,2</sup>, A. Bugrova<sup>1,2</sup>, A. Kononikhin<sup>1,3</sup>, N. Zakharova<sup>2</sup>, E. Diyachkova<sup>4</sup>, A. Brzhozovskiy<sup>1</sup>, M. Indeykina<sup>2</sup>,  
I. Kurochkin<sup>2,5</sup>, A. Averyanov<sup>4</sup>, E. Nikolaev<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Skolkovo Institute of Science and Technology, <sup>2</sup>Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences,  
<sup>3</sup>Talrose Institute for Energy Problems of Chemical Physics, Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, <sup>4</sup>Pulmonology Scientific and Research Institute, Federal Medical and Biological Agency, <sup>5</sup>Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow

The COVID-19 pandemic has become a serious challenge for medicine and science due to the need for rapid development of innovative therapeutic and diagnostic tools. In particular, an urgent task is the rapid identification and validation of prognostic markers that allow determining the risks of severe forms of the disease. In this work, quantitative proteomics methods combined with data analysis using mathematical statistics and machine learning tools were first applied to the study of the proteome of the whole frozen blood samples from patients with COVID-19.

All patients (n=99) were hospitalized, the diagnosis (COVID-19) was confirmed by qPCR. Patients were divided into groups depending on the level of respiratory support they needed (“mild” group, n=32, “moderate”, n=39, “severe”, n=19). The control group (n=32) was represented by paired samples of whole blood and plasma. Informed consent for data processing was obtained from all study participants. The concentrations of 203 proteins were measured using targeted mass spectrometry (MS) based on the multiple reaction monitoring (MRM) assay using stable isotope-labeled peptide standards.

For whole blood samples, reliable concentration measurements of 94 proteins were obtained. Statistically significant differences were found for 44 proteins between different severity groups. Changes in the levels of 61 reproducible COVID-19 markers (SERPINA3, SERPING1, ORM1, HRG, LBP, APOA1, AHSG, AFM, ITIH2, etc.) were consistent with studies previously conducted for serum/plasma samples.

As a result of the analysis, several protein biomarker panels were proposed that allow classifying patients by disease severity. The best result was obtained using a panel of 10 proteins: PZP, THBS1, APOC4, APOE, APOM, AHSG, APOA4, LUM, HRG, APOC3. For the model based on the linear regression algorithm, the following metrics were obtained: ROC-AUC = 0.98 for classifying all patients with COVID-19 and controls ROC-AUC = 0.97 to distinguish severe and mild groups.

## ВЛИЯНИЕ ДИЗАЙНА shRNA НА СОЗРЕВАНИЯ МИКРОРНК ПРИ ИХ СВЕРХЭКСПРЕССИИ В СОСТАВЕ ЭКСПРЕССИОННОЙ КАССЕТЫ С ПРОМОТОРОМ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ III

Р. Суворов, И. Кириллов, А. Жиянов, Д. Аверинская, Д. Губани, А. Кудряева, А. Белогуров, А. Тоневицкий, Д. Мальцева

*Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва*

Экспрессия коротких шпилечных РНК (shRNA) в составе экспрессионной кассеты с промотором РНК-полимеразы III (Pol III) широко применяется как для регуляции экспрессии конкретных генов (нокдаун), так и для сверхэкспрессии микроРНК. В случае кластерных микроРНК такой подход — практически единственный способ для стабильной сверхэкспрессии микроРНК. Участок микроРНК со 2 по 8 нуклеотиды с 5' конца, называемый seed-регионом, отвечает за комплементарное взаимодействие с мРНК. Поэтому, изменение последовательности seed-региона влияет на набор мРНК-мишеней микроРНК. В процессе созревания молекула-предшественник (pre-miRNA, аналог shRNA) может подвергаться альтернативному процессингу РНКазой Dicer. Изменение последовательности на 5'-конце зрелой микроРНК в результате альтернативного процессинга приводит к формированию 5'-изоформ микроРНК (5'-изомиРНК) и изменению последовательности seed-региона.

В настоящем исследовании показано, что экспрессия микроРНК длиннее 19 нт (например, hsa-miR-93-5p длиной 23 нт) с использованием подхода shRNA сопровождается образованием преимущественно 5'-изомиРНК. Добавление дополнительных нуклеотидов U (до пяти U) РНК-полимеразой III на 3'-конце транскрибируемой shRNA при терминеции транскрипции способствует смещению положения разрезания shRNA ферментом Dicer. Образующиеся в результате 5'-изомиРНК имеют значительно измененную последовательность seed-региона по сравнению с изначально закодированной формой hsa-miR-93-5p. Важно, что традиционно применяемый метод ПЦР-РВ оказался нечувствителен к образованию 5'-изомиРНК, и поэтому не может быть использован для подтверждения сверхэкспрессии микроРНК при таком подходе. Однако метод секвенирования микроРНК (miRNA-Seq) способен обнаружить формирование 5'-изомиРНК вместо канонической изоформы. Совместная обработка результатов секвенирования микроРНК и мРНК позволила показать, что 5'-изоформы hsa-miR-93-5p регулируют свои собственные мишени мРНК.

Таким образом, отсутствие результатов miRNA-Seq может привести к ошибочным выводам о результатах сверхэкспрессии микроРНК и влиянии этого на клетку. В целом, полученные результаты демонстрируют, что дизайн shRNA для стабильной сверхэкспрессии микроРНК требуют тщательного продумывания во избежании образования нежелательных 5'-изомиРНК.

## EFFECT OF DESIGN ON MIRNA MATURATION UPON THEIR OVEREXPRESSION USING RNA POLYMERASE III

R. Suvorov, I. Kirillov, A. Zhiyanov, D. Averinskaya, D. Gubani, A. Kudriaeva, A. Belogurov, A. Tonevitsky, D. Maltseva

*National Research University "Higher School of Economics", Moscow*

Short hairpin RNA (shRNA) expression on RNA Polymerase III (Pol III) expression cassette is a widely used method for research purposes. It is used for certain gene expression regulation (knockdown) and miRNA overexpression. This approach may be the only way for stable individual overexpression of miRNAs encoded as a part of a cluster. Nucleotides 2-8 from miRNA 5' end (also known as seed-region) are essential for complementary interaction with mRNA. Therefore, alterations in the seed-region result in a change in the miRNA targetome. During processing precursor molecule of miRNA (pre-miRNA, analog of shRNA) can undergo alternative processing by RNase Dicer. Change in 5' end miRNA sequence in these process leads to a formation of miRNA 5'-isoforms (5'-isomiRNAs) and shift of seed-region.

In the current study, we have shown that expression of miRNAs longer than 19 nt (e.g., has-miR-93-5p of length 23 nt) with the shRNA-based approach results in predominantly formation of 5'-isomiRNAs. Extension of shRNA 3' end by additional uracil nucleotides (up to 5) during Pol III transcription termination supports the shift in the Dicer cleavage site of shRNA. Formed 5'-isomiRNAs have significantly changed seed-region sequences compared to an initially introduced canonical form of has-miR-93-5p. Importantly, the ubiquitously used RT-PCR method was insensitive to formation of 5'-isomiRNAs, therefore it cannot be used to confirm miRNA overexpression in such an approach. However, miRNA-Seq is able to detect the predominant formation of 5'-isomiRNAs instead of the canonical form. MiRNA and mRNA sequencing analysis showed that 5'-isomiRNAs regulate their own targets.

Overall, the absence of miRNA-Seq data can lead to erroneous conclusions about miRNA overexpression results, affected molecular mechanisms, and mRNA targets. In general, the results obtained demonstrate that the design of shRNA for stable overexpression of miRNA requires a thorough approach to omit the formation of undesired 5'-isomiRNAs.

### МЕТАБОЛОМИКА СЫВОРОТКИ КРОВИ КАЗАХСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГХ-МС

**М. Тойшиманов, А. Нуртазина, И. Войцеховский, Б.Канапьянов**

*Медицинский университет Семей, Семей, Казахстан*

Сыворотка крови является наиболее часто используемой биожидкостью в метаболомике. Профили метаболомики анализировались с помощью газовой хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ-МС) с последующим дериватизации BSTFA + 1% TMCS (MeOx-TMS). Образцы сыворотки были собраны у здоровых и больных добровольцев с метаболischem синдромом среди местного казахского населения. Экспериментальные результаты показали, что профилированные сыворотки крови включают летучие органические кислоты, аминокислоты, жирные кислоты, углеводы и другие вещества, которые участвуют в метаболизме. Результаты этого исследования дадут некоторые ценные предложения исследователям по изучению этнических вариаций в метаболомических исследованиях. В этом исследовании мы проанализировали повторяемость и точность метода дериватизации MeOx-TMS, чтобы подтвердить его диапазон. Повторяемость была получена путем анализа 5 параллельных образцов плазмы, а точность была проверена путем 5 непрерывных инъекций одного и того же образца. Хроматограммы общего иона (TIC) образцов сыворотки, полученные с помощью ГХ-МС, показали высокие результаты у пациентов с МС по молочной кислоте, аланину, глицину, мочевины, фосфату, изолейцину, серину, треонину, глутаминовой кислоте, гексадекановой кислоте, пальмитиновой кислоте, октадеценной кислоте, олеиновой кислоте, стеариновой кислоте, арахидоновой кислоте и монопальмитину. Кроме того, уровень глюкозы был одинаковым в обеих группах. Метод дериватизации MeOx-TMS, используемый с помощью ГХ-МС, очень точен в исследованиях метаболомики. В этом исследовании здоровые и больные группы показали большие различия для анализа метаболомики. Сравнительный анализ между двумя группами показал, что мочевина, глюкоза, пальмитиновая кислота будут полезны в качестве ключевых метаболитов.

*Это исследование финансируется Комитетом науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (грант AP23490656).*

### BLOOD SERUM METABOLOMICS OF KAZAKH POPULATION WITH METABOLIC SYNDROME USING GC-MS

**M. Toishimanov, A. Nurtazina, I. Voitsehovsky, B. Kanapiyanov**

*Semey Medical University, Semey, Kazakhstan*

In metabolomics research, blood serum and plasma are commonly used biofluids. Researchers often employ gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) to analyze metabolite profiles. One established method involves methoximation followed by silylation using BSTFA + 1% TMCS (MeOx-TMS) derivatization.

In a recent study, serum samples were collected from both healthy volunteers and individuals with metabolic syndrome in the local Kazakh population. The experimental results revealed that blood serum profiles include a variety of compounds, such as volatile organic acids, amino acids, fatty acids, and carbohydrates, all of which contribute to metabolism. Results of this study will provide some valuable suggestions to researchers on the study ethnic variations in metabolomic research.

We investigated the repeatability and precision of the MeOx-TMS derivatization method to assess its reliability. The GC-MS total ion chromatograms (TICs) of serum samples revealed significant differences between healthy individuals and those with metabolic syndrome. MetS patients exhibited elevated levels of various metabolites, including lactic acid, alanine, glycine, urea, phosphate, isoleucine, serine, threonine, glutamic acid, hexadecanoic acid, palmitic acid, octadecenoic acid, oleic acid, stearic acid, arachidonic acid, and mono-palmitine. Interestingly, glucose levels were similar in both groups.

The MeOx-TMS derivatization method with GC-MS demonstrated remarkable precision in metabolomics research. We observed substantial variations in metabolite profiles between healthy individuals and those with metabolic disorders. A comparative analysis revealed that urea, glucose, and palmitic acid may serve as key metabolites for distinguishing between the two groups.

*This research is funded by the Science Committee of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan (grant AP23490656).*

### РЕТРОННАЯ мсДНК СЛУЖИТ ОСНОВНЫМ ИСТОЧНИКОМ СПЕЙСЕРОВ ДЛЯ НАИВНОЙ CRISPR-АДАПТАЦИИ В СИСТЕМЕ I-E *E. COLI*

Т.С. Хвостиков, Ю.С. Петрусенко, А.А. Ширяева, К.В. Северинов, А.Б. Исаев

ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; Сколковский институт науки и технологий, Москва

Ретроны — это бактериальные антифаговые защитные системы, состоящие из обратной транскриптазы (ОТ) и некодирующей РНК (нкРНК) [1]. ОТ использует нкРНК в качестве матрицы, создавая химерную молекулу РНК/ДНК, в которой компоненты РНК и ДНК ковалентно связаны. Защитная единица состоит из трех компонентов: РТ, нкРНК и эффекторного белка. Другой антифаговой системой защиты является CRISPR-Cas, в основе которой лежит адаптивный иммунитет. В ходе CRISPR-адаптации происходит интеграция новых спейсеров за счёт ферментативной активности комплекса Cas1-Cas2 [2]. Встроенный спейсер имеет длину 33 п.о. и обеспечивает защиту от мобильных генетических элементов. В ходе изучения процесса наивной CRISPR-адаптации в системе I-E *E. coli*, была обнаружена интеграция в CRISPR-кассету спейсеров, полученных из ретронной мсДНК. Кроме того, делеция гена *dnaQ*, кодирующего экзонуклеазную субъединицу комплекса ДНК полимеразы III, вызывает значительное увеличение адаптации из ретрона. Также было обнаружено, что делеция *dnaQ* затрагивает соседний ген *rnhA*, экспрессирующий РНКазу H1, белок, необходимый для процесса формирования ретрона. Помимо этого, Fraq-Seq анализ показал повышенную аффинность адаптационного комплекса Cas1-Cas2 к ретрону. Повторный Fraq-Seq анализ коротких ДНК фрагментов, штаммов с комплементарией генов *dnaQ* и *rnhA*, подтвердил вовлечение обоих белков в процесс формирования преспейсера на основе ретронной мсДНК. Кроме того, показана роль белков *dnaQ* и *rnhA* на процесс терминации синтеза мсДНК ретрона и комплементарной ей второй ДНК цепи. В связи с этим целью работы является изучить влияние делеции генов *rnhA* и *dnaQ* на процесс формирования ретрона и наивную CRISPR-адаптацию.

### RETRON msDNA SERVES AS A MAJOR SPACER SOURCE FOR NAIVE CRISPR ADAPTATION IN THE I-E SYSTEM OF *E. COLI*

T. Khvostikov, Yu. Petrusenko, A. Shiryaeva, K. Severinov, A. Isaev

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow

Retrons are bacterial antiphage defense systems consisting of reverse transcriptase (RT) and non-coding RNA (ncRNA) [1]. RT uses ncRNA as a matrix, creating a chimeric RNA/DNA molecule in which the RNA and DNA components are covalently linked. The defense unit consists of three components: RT, ncRNA, and effector protein. Another antiphage defense system is CRISPR-Cas, which is based on adaptive immunity. During CRISPR adaptation, new spacers are integrated due to the enzymatic activity of the Cas1-Cas2 complex [2]. The integrated spacer is 33 bp long and provides protection against mobile genetic elements. While studying the process of naive CRISPR adaptation in the I-E system of *E. coli*, the integration of spacers derived from retron msDNA into the CRISPR cassette was detected. In addition, deletion of the *dnaQ* gene encoding the exonuclease subunit of the DNA polymerase III complex causes a significant increase in adaptation from retron. Deletion of *dnaQ* was also found to affect the neighboring gene *rnhA*, which expresses RNase H1, a protein required for the retron formation process. In addition, Fraq-Seq analysis showed increased affinity of the Cas1-Cas2 adaptation complex to the retron. Repeated Fraq-Seq analysis of short DNA fragments from strains with complementation of the *dnaQ* and *rnhA* genes confirmed the involvement of both proteins in the formation of a prespacer based on retron msDNA. In addition, the role of *dnaQ* and *rnhA* proteins on the process of termination of synthesis of retron msDNA and its complementary second DNA strand was shown. Therefore, the aim of this work is to study the effect of deletion of *rnhA* and *dnaQ* genes on the process of retron formation and naive CRISPR adaptation.

## ПОЛИ(АДР-РИБОЗА) ПОЛИМЕРАЗЫ В ПОДДЕРЖАНИИ СТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА, ЗДОРОВЬЯ И ДОЛГОЛЕТИЯ О.И. Лаврик

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

Поли(АДР-рибозил)ирование белков, катализируемое поли(АДР-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 АДР-рибозы (PAR). PAR может быть присоединен к белкам-акцепторам или к самой PARP1. Этот процесс приводит к реорганизации хроматина и формированию функциональных белковых комплексов, участвующих в процессах репарации ДНК. Механизмы репарации ДНК относятся к числу основных стратегий, обеспечивающих сохранение целостности генома. Дефекты систем репарации приводят к возникновению онкологических и нейродегенеративных заболеваний, а также к старению. С другой стороны, активность репарации необходимо ингибировать для повышения эффективности онкотерапии ДНК-повреждающими агентами.

В докладе будет обсуждена роль PARP1/2 и их белков-партнеров в регуляции репарации ДНК, включая модификацию гистонов и ремоделирование хроматина. Будет рассмотрена роль РНК-связывающих белков, содержащих неупорядоченные домены, в первую очередь YB-1 и FUS, в регуляции активности PARP1/2. Белок YB-1 гиперэкспрессирован в некоторых агрессивных опухолях, стимулирует активность PARP1 [1] и может снижать действие антираковых препаратов – ингибиторов PARP. FUS локализуется вблизи повреждений ДНК при активации PARP1 и формирует немембранные компартменты с участием PAR, в которых концентрируются повреждения ДНК и белки репарации, что облегчает процесс репарации и другие ключевые процессы [2, 3]. Будет обсуждена стратегия создания ингибиторов PARP1/2, специфически регулирующих активности этих ферментов, для эффективной и одновременно менее токсичной терапии онко- и нейродегенеративных заболеваний, а также ключевая роль PARP в процессах старения.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект 22-14-00112).*

1. Naumenko KN, Sukhanova MV, Hamon L, Kurgina TA, Alemasova EE, Kutuzov MM, Pastré D, Lavrik OI. *Biomolecules* 2020.
2. Singatulina AS, Hamon L, Sukhanova MV, Desforges B, Joshi V, Bouhss A, Lavrik OI, Pastré D. *Cell Rep.* 2019.
3. Mamontova EM, Clément MJ, Sukhanova MV, Joshi V, Bouhss A, Rengifo-Gonzalez JC, Desforges B, Hamon L, Lavrik OI, Pastré D. *Cell Rep.* 2023.

## POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASES IN MAINTAINING GENOME STABILITY, HEALTH AND LONGEVITY O.I. Lavrik

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk*

Poly(ADP-ribosyl)ation of proteins catalyzed by poly(ADP-ribose) polymerases (PARP), primarily PARP1, regulates important cellular processes such as chromatin remodeling, replication, transcription, and DNA repair in higher eukaryotes. Upon interaction with damaged DNA, PARP1 catalyzes the synthesis of ADP-ribose polymer (PAR). PAR can be attached to acceptor proteins or to PARP1 itself. This process leads to chromatin reorganization and the formation of functional protein complexes involved in DNA repair processes. DNA repair mechanisms are among the main strategies that maintain genome integrity. Defects in repair systems lead to the development of cancer and neurodegenerative diseases, as well as aging. On the other hand, repair activity should be suppressed to increase the effectiveness of DNA-damaging agents used in oncotherapy.

The report will discuss the role of PARP1, PARP2 and their partner proteins in the regulation of DNA repair, including through histone modification during chromatin remodeling. The role of RNA-binding proteins containing disordered domains, primarily YB-1 and FUS, in the regulation of PARP1/2 activity will be considered. The YB-1 protein is overexpressed in some aggressive tumors, it stimulates PARP1 activity [1] and can reduce the effect of anticancer drugs – PARP inhibitors. FUS is localized near DNA damage upon PARP1 activation and forms non-membrane compartments with the participation of PAR, in which DNA damage and repair proteins are concentrated, which facilitates the DNA repair and other key processes [2, 3]. The strategy for creating PARP1/2 inhibitors that provide specific regulation of the activity of these enzymes, as well as effective and at the same time less toxic therapy for onco- and neurodegenerative diseases, as well as the key role of PARP in aging will be discussed.

*The study was supported by the Russian Science Foundation (Project 22-14-00112).*

1. Naumenko KN, Sukhanova MV, Hamon L, Kurgina TA, Alemasova EE, Kutuzov MM, Pastré D, Lavrik OI. *Biomolecules* 2020.
2. Singatulina AS, Hamon L, Sukhanova MV, Desforges B, Joshi V, Bouhss A, Lavrik OI, Pastré D. *Cell Rep.* 2019.
3. Mamontova EM, Clément MJ, Sukhanova MV, Joshi V, Bouhss A, Rengifo-Gonzalez JC, Desforges B, Hamon L, Lavrik OI, Pastré D. *Cell Rep.* 2023.

**ПЕРВИЧНАЯ ХРОНИЧЕСКАЯ НАДПОЧЕЧНИКОВАЯ НЕДОСТАТОЧНОСТЬ: МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЙ ИММУННОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ, ПРОГНОЗИРОВАНИЕ РИСКОВ НА ОСНОВЕ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ АНТИТЕЛ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРЕДИКТОРОВ**

**Н.Ф. Нуралиева, М.Ю. Юкина, Е.А. Трошина**

*ГНЦ РФ НИИЦ эндокринологии Минздрава России, Москва*

Антитела к 21-гидроксилазе (АТ к P450c21) формируются за несколько лет до развития симптомов аутоиммунной надпочечниковой недостаточности (АНН) на потенциальной стадии заболевания (пАНН). На латентной стадии (лАНН) инициируется деструкция коры надпочечников; симптомы АНН эпизодические и легкие. Манифестная АНН развивается при разрушении 90% коры надпочечников и проявляется яркой клинической картиной. Активный скрининг ранних стадий АНН позволяет своевременно инициировать лечение и уменьшить смертность пациентов. Цель: уточнить группы риска, в которых требуется проведение активного скрининга АНН.

В исследование включены пациенты с аутоиммунными заболеваниями (АИЗ; n=513; группа (гр.) 1): аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы (АЗЩЖ; n=236; гр. 1a); сахарным диабетом 1 типа (СД1; n=172; гр. 1b), АЗЩЖ в сочетании с СД1 (n=75; гр. 1c); другими АИЗ (n=30; гр. 1d) без носительства АТ-маркеров АЗЩЖ и СД1; пациенты-носители АТ-маркеров АЗЩЖ и/или СД1, но без нарушения функции органа-мишени (n=36; гр. 2); пациенты с неаутоиммунной эндокринной патологией (n=97; гр. 3); условно здоровые лица (n=70; гр. 4). Участникам выполнялось определение уровня АТ к P450c21. При повышении АТ к P450c21 проводились анализы крови на АКТГ, кортизол, альдостерон, ренин, при необходимости – проба с инсулиновой гипогликемией.

Повышение АТ к P450c21 выявлено у 15 пациентов гр. 1 (2% от всех участников, 3% от включенных в гр. 1): в гр. 1a – n=7 (3%), 1b – n=4 (2%), 1c – n=4 (5%), 1d – n=0. При сравнении частоты повышения АТ к P450c21 в гр. 1a-1d значимые отличия не выявлены (p=0,452). n=3 больным с повышением АТ к P450c21 выполнено гормональное исследование; у n=1 пациента диагностирована лАНН с дефицитом минералокортикоидов и глюкокортикоидов, и у n=2 – пАНН. При генетическом обследовании у пациента с лАНН выявлены мутации в гене AIRE R257X/c.821delG.

Впервые в РФ осуществлен активный скрининг ранних стадий АНН и обосновано обследование группы риска (пациентов с эндокринными АИЗ) с обязательным определением АТ к P450c21. Исследование может осуществляться совместно с другими АТ методом мультиплексного иммуноанализа.

**PRIMARY CHRONIC ADRENAL INSUFFICIENCY: MECHANISMS OF IMMUNE TOLERANCE DISORDERS, RISK PREDICTION BASED ON MULTIPLEX PROFILING OF ANTIBODIES AND MOLECULAR GENETIC PREDICTORS**

**N.F. Nuralieva, M.Yu. Yukina, E.A. Troshina**

*Endocrinology Research Center, Russian Ministry of Health, Moscow*

Antibodies to 21-hydroxylase (AB to P450c21) are formed several years before the development of symptoms of autoimmune adrenal insufficiency (AAI) at a potential stage of the disease (pAAI). At the latent stage (IAAI) destruction of the adrenal cortex is initiated; symptoms are episodic and mild. Manifest AAI develops, when the destruction of 90% of the adrenal cortex occurs, and manifests with a severe symptoms. Active screening of the early stages of AAI makes it possible to initiate treatment in a timely manner and reduce mortality. Aim: to clarify the risk groups in which active screening of AAI is required.

We included patients with autoimmune diseases (AID; n=513; group (gr.) 1): AID of the thyroid gland (ATD; n=236; gr. 1a); type 1 diabetes mellitus (DM1; n=172; gr. 1b); ATD in combination with DM1 (n=75; gr. 1c); other AID (n=30; gr. 1d) without the carriage of AB-markers of ATD and DM1; patients carrying AB-markers of ATD and/or DM1 without impaired function of the target organ (n=36; gr. 2); patients with non-autoimmune endocrine pathology (n=97; gr. 3); conditionally healthy individuals (n=70; gr. 4). The participants were assessed the level of AB to P450c21. In patients with increased AB to P450c21, blood tests for ACTH, cortisol, aldosterone, renin were performed and, if necessary, a test with insulin hypoglycemia.

An increase of AB to P450c21 was detected in 15 patients of gr. 1 (2% of all participants, 3% of those included in gr. 1): in gr. 1a – n=7 (3%), 1b – n=4 (2%), 1c – n=4 (5%), 1d – n=0. When comparing the frequency of an increase of AB to P450c21 in gr. 1a-1d, no significant differences were found (p=0.452). n=3 patients with an increase in AB to P450c21 underwent hormonal testing; n=1 patient was diagnosed with IAAI with a deficiency of mineralocorticoids and glucocorticoids, and n=2 – pAAI. A genetic examination revealed mutations in the AIRE R257X/c.821delG gene in a patient with IAAI.

For the first time in Russia, active screening of the early stages of AAI was carried out and a risk group examination (patients with endocrine AID) with mandatory determination of AB to P450c21 was justified. The study can be carried out in conjunction with other AB by multiplex immunoassay



## ТРАНСКРИПТОМНЫЕ ЧАСЫ ВЫЯВЛЯЮТ УНИВЕРСАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СТАРЕНИЯ, ЗАБОЛЕВАНИЙ И ОМОЛОЖЕНИЯ

**М.С. Давитадзе, С.Е. Дмитриев, А.Э. Тышковский**

*Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва*

Старение характеризуется постепенным накоплением молекулярных и клеточных повреждений, приводящих к нарушению функционирования клеток, развитию хронических заболеваний и увеличению риска смерти. Несмотря на существование ряда интервенций, влияющих на продолжительность жизни млекопитающих, универсальные механизмы регуляции смертности, связанные со старением и этими вмешательствами, остаются недостаточно изученными.

Для решения этой задачи мы разработали мульти-тканевые транскриптомные часы, позволяющие количественно оценивать ожидаемую смертность млекопитающих на основе профилей геной экспрессии. Для построения часов мы использовали данные более 4500 образцов экспрессии из 26 различных тканей мышей и крыс разного возраста и пола, включая животных, подверженных генетическим, фармакологическим и диетическим воздействиям, продлевающим или сокращающим жизнь. Обнаруженные биомаркеры оказались способны предсказывать эффект новых интервенций на продолжительность жизни мышей, а также были ассоциированы со старением в большинстве типов клеток организма. Кроме того, для разработки мульти-видовых часов мы использовали данные экспрессии генов из тканей человека, что позволило выявить общие механизмы смертности у разных видов млекопитающих. Для определения молекулярных путей клетки, связанных со старением и долголетием, с помощью анализа сетей мы идентифицировали и охарактеризовали ко-регулируемые группы генов. Для каждого из 26 обнаруженных функционально интерпретируемых генетических модулей мы построили индивидуальные транскриптомные часы, оценивающие возрастные изменения в различных компонентах клетки.

Разработанные транскриптомные биомаркеры позволили предсказать и описать увеличение биологического возраста в тканях млекопитающих, подверженных моделям хронических заболеваний и прогерии. Часы также продемонстрировали омоложение в ходе гетерохронного парабиоза, клеточного репрограммирования и раннего эмбриогенеза, выявив универсальные сигнатуры смертности, связанные с омоложением и возраст-зависимыми заболеваниями, включая гены *Cdkn1a* и *Lgals3*. В целом, наши результаты углубляют понимание молекулярных механизмов старения и создают основу для разработки новых интервенций, направленных на продление жизни.

## TRANSCRIPTOMIC CLOCKS REVEAL UNIVERSAL MECHANISMS OF AGING, DISEASE, AND REJUVENATION

**M.S. Davitadze, S.E. Dmitriev, A.E. Tyshkovskiy**

*Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Moscow State University, Moscow*

Aging is characterized by the gradual accumulation of molecular and cellular damage, leading to impaired cellular function, development of chronic diseases, and an increased risk of mortality. Despite the existence of various lifespan-modulating interventions, the universal mechanisms of mortality regulation associated with aging and these interventions remain unclear.

To address this challenge, we developed multi-tissue transcriptomic clocks that quantitatively assess expected mortality based on mammalian gene expression profiles. To construct these clocks, we utilized over 4,500 expression samples from 26 tissues of mice and rats of various ages and sexes, including animals subjected to genetic, pharmacological, and dietary interventions that either extend or shorten lifespan. The identified biomarkers were able to predict the effect of novel interventions on mouse lifespan and were associated with aging across most cell types of the organism. Additionally, to develop multi-species clocks, we used gene expression data from human tissues, allowing us to identify shared molecular mechanisms of mortality across different mammalian species.

To characterize molecular pathways associated with aging and longevity, we identified and characterized co-regulated gene sets through network analysis. For each of the 26 discovered functionally annotated gene modules, we constructed individual transcriptomic clocks to assess aging- and mortality-related changes for various cellular components.

The developed transcriptomic biomarkers allowed us to predict and characterize the increase in biological age in mammals subjected to chronic diseases and progeria. The clocks also revealed rejuvenation induced during heterochronic parabiosis, cellular reprogramming, and early embryogenesis, uncovering universal mortality signatures associated with rejuvenation and age-related diseases, including *Cdkn1a* and *Lgals3* genes. Overall, our findings deepen the understanding of the molecular mechanisms of aging and lay the foundation for the development of novel effective lifespan-extending interventions.

## **ЗДОРОВОЕ СТАРЕНИЕ ЖЕНЩИН И МУЖЧИН: ГОРМОНАЛЬНЫЙ СТАТУС**

**Е.Н. Андреева**

*ГНЦ НИИЦ эндокринологии Минздрава России, Москва*

Лекция посвящена актуальным аспектам возрастных изменений у женщин и мужчин, связанных со снижением выработки половых гормонов (эстрогенов, прогестерона, андрогенов). Будут освещены особенности лабораторной диагностики с применением радиоиммунного, иммуноферментного и хроматомасспектрометрического анализов, приведены данные по изменению длины теломер (эпигенетика) у женщин под влиянием заместительной терапии эстрогенами. Отдельный аспект лекции – современные возможности терапии возрастного гипогонадизма у женщин и мужчин с использованием заместительной терапии эстрогенами и андрогенами, позволяющие снизить процент коморбидных заболеваний в старшей возрастной группе населения России и увеличить продолжительность жизни.

## **HEALTHY AGING IN WOMEN AND MEN: HORMONAL STATUS**

**E.N. Andreeva**

*Endocrinology Research Center, Russian Ministry of Health, Moscow*

The lecture will be about the current aspects of age-related changes in women and men associated with a decrease in the production of sex hormones (estrogens, progesterone, androgens). The features of laboratory diagnostics using radioimmunoassay, immunoenzyme and chromatograph mass spectrometric analyses will be covered, data on changes in telomere length (epigenetics) in women under the influence of estrogen replacement therapy will be presented. A separate aspect of the lecture is the modern possibilities of treating age-related hypogonadism in women and men using estrogen and androgen replacement therapy, which make it possible to reduce the percentage of comorbid diseases in the older age group of the Russian population and increase life expectancy.

### ТОЧНЫЙ АНАЛИЗ ВОЗРАСТНЫХ ЗАВИСИМОСТЕЙ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ КРОВИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БОЛЬШИХ ДАННЫХ

**А.И. Манолов, Д.Е. Федоров, К.С. Горбунов, С.А. Ширяев, Е.Н. Ильина, В.М. Говорун**

*НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва*

Гематологические и биохимические параметры крови, рутинно измеряемые в лабораторных исследованиях, служат важными индикаторами физиологического состояния организма человека. Многие из этих параметров зависят от возраста. На сегодняшний день накоплено значительное количество данных по лабораторным исследованиям крови.

В этом исследовании мы проанализировали возрастные зависимости 50 параметров с высоким временным разрешением (0,1 года), что обеспечивает более точную оценку по сравнению с традиционными интервалами в 5-10 лет. Измеренные значения были сгруппированы по полу и возрасту, после чего для каждой группы рассчитывались средние и медианные значения. Если распределение параметра было лог-нормальным, данные логарифмировались, рассчитывалось среднее значение в логарифмической шкале, которое затем переводилось обратно в исходную шкалу измерений.

Возрастные зависимости были аппроксимированы сплайнами, что позволило выявить точки изменения знака первой и второй производных. Мы зафиксировали значимые изменения возрастных зависимостей для всех исследованных параметров, при этом количество выявленных точек изменения варьировалось от 1 до 4. Проведенный анализ позволил с высокой точностью определить ключевые точки в программе развития человека.

### PRECISE ANALYSIS OF AGE-RELATED DEPENDENCIES IN HEMATOLOGICAL AND BIOCHEMICAL BLOOD PARAMETERS USING BIG DATA

**A.I. Manolov, D.E. Fedorov, K.S. Gorbunov, S.A. Shiryaev, E.N. Ilina, V.M. Govorun**

*Research Institute of Systems Biology and Medicine, Moscow, Russia*

Hematological and biochemical blood parameters, routinely measured in laboratory tests, serve as important indicators of the physiological state of the human body. Many of these parameters are age-dependent. To date, a significant amount of data from blood laboratory tests has been accumulated.

In this study, we analyzed the age-related dependencies of 50 parameters with high temporal resolution (0.1 year), providing a more precise assessment compared to the traditional 5–10 year intervals. The measured values were grouped by gender and age, after which the mean and median values were calculated for each group. If the parameter distribution was log-normal, the data were logarithmized, the mean value was calculated in the logarithmic scale, and then converted back to the original measurement scale.

The age dependencies were approximated using splines, which allowed us to identify points where the sign of the first and second derivatives changed. Significant changes in age-related dependencies were observed for all examined parameters, with the number of detected change points ranging from 1 to 4. The analysis provided high precision in identifying key control points in human development.

## ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ И СТАРЕНИЯ НА ИЗМЕНЕНИЕ ПРОТЕОМНЫХ СИГНАТУР КЛЕТОК РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ

Т.И. Иванова, Ю.К. Слепов, Е.О. Кожевникова, С.В. Калиш, Д.С. Барановский, С.В. Лямина

Российский университет медицины Минздрава России, Москва

Поиск новых биомаркеров старения обуславливает необходимость дополнительного изучения функционального состояния стареющих клеток различных типов в изменяющихся условиях. Цель: проанализировать протеомные сигнатуры клеток различных типов в *in vitro* моделях сенесценса при изменяющихся условиях содержания кислорода.

Мезенхимальные стволовые клетки из жировой ткани (МСКж) и фибробласты человека (ФБ) исходно культивировали в бесывороточной среде (STEMin1, HiMedia) в стандартных клеточных условиях (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub>) и условиях гипоксии (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 6,5% O<sub>2</sub>), что для МСКж является физиоксией. Тестируемые *in vitro* модели: сенесценс, индуцированный повреждением ДНК (доксорубин 0,2 мкл/мл) и стресс-индуцированный преждевременный сенесценс (СИПС) (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% 0,35 мкл/мл). Сенесцентность клеток документирована колориметрическим методом определения β-галактозидазы (EZdetect™ Cell Senescence Detection Kit, HiMedia). Подготовка образцов для протеомного анализа проведена с использованием FASP-протокола. Протеомный анализ выполнен на ВЭЖХ системе Ultimate 3000 RSLCnano («Thermo Scientific», США), соединенной с масс-спектрометром Q-exactive HFX («Thermo Scientific», США). Для идентификации белков был использован пакет программ MaxQuant (v2.6.2.0). Аннотация белков и статистический анализ проводились с помощью Perseus (v2.0.11).

В ходе протеомного анализа было обнаружено 515 белков, общих для всех образцов. Количество протеинов со статистически значимым изменением синтеза варьировало в группах: от 4 белков, чей синтез увеличивался в фибробластах при гипоксии, до 145 белков, синтез которых снижался в МСКж, обработанных H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и помещенных в условия гипоксии. Интересной находкой стали протеины, чья реакция на измененные условия среды была общей как для сенесцентных, так и контрольных МСКж и ФБ.

Протеомные сигнатуры МСКж и ФБ в различных условиях значимо отличались как при оценке изолированного эффекта гипоксии, так и при сочетанном воздействии индукторов старения и гипоксии. Выявленные закономерности однонаправленных изменений синтеза протеинов сенесцентных клеток могут рассматриваться в качестве кандидатов для углубленного анализа протеомных биомаркеров старения, в том числе значимых компонентов SASP – MIF, CTSB, COTL1.

## HYPOXIA AND AGING EFFECTS IN PROTEOMIC SIGNATURES OF DIFFERENT CELL TYPES

T.I. Ivanova, Yu.K. Slepov, E.O. Kozhevnikova, S.V. Kalish, D.S. Baranovskii, S.V. Lyamina

Russian University of Medicine, Moscow

The search for new biomarkers of aging specifies further studies of the functional phenotypes in aging cells of various types under changing microenvironment. Objective: To analyze proteomic signatures of various cell types in senescence *in vitro* models under changing oxygen conditions.

Adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSCs) and human fibroblasts (Fb) were initially cultured in serum-free medium (STEMin1, HiMedia) under standard cell conditions (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub>) and hypoxic conditions (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 6.5% O<sub>2</sub>), which is physioxia for ADMSCs. The *in vitro* models tested were DNA damage-induced senescence (doxorubicin 0.2 μl/ml) and stress-induced premature senescence (SIPS) (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% 0.35 μl/ml). Cell senescence was documented by a colorimetric assay for β-galactosidase (EZdetect™ Cell Senescence Detection Kit, HiMedia). Samples for proteomic analysis were prepared using the FASP protocol. Proteomic analysis was performed on an Ultimate 3000 RSLCnano HPLC system (Thermo Scientific, USA) coupled to a Q-exactive HFX mass spectrometer (Thermo Scientific, USA). The MaxQuant software package (v2.6.2.0) was used for protein identification. Protein annotation and statistical analysis were performed using Perseus (v2.0.11).

Proteomic analysis revealed 515 proteins common in all samples. The number of proteins with statistically significant synthesis changes varied between groups: from 4 proteins with increased synthesis in Fb under hypoxia to 145 proteins with decreased synthesis in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated and placed in hypoxic conditions ADMSCs. An interesting finding was the proteins whose response to altered microenvironment was common to both senescent and control ADMSCs and Fb.

Proteomic signatures of ADMSCs and FB under different conditions differed significantly both when assessing the isolated effect of hypoxia and under the combined effect of induced senescence and hypoxia. The identified patterns of unidirectional changes in the synthesis of proteins in senescent cells can be considered as candidates for in-depth analysis of proteomic biomarkers of aging, including significant components of SASP – MIF, CTSB, COTL1.

## ЛОНГИТУДНЫЕ ПРОТЕОМНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

**К.С. Горбунов, Д.С. Энгин, О.В. Курилова, С.Ю. Селезов, А.В. Шунаев**

*НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва*

Лонгитюдные исследования представляют собою отдельный класс исследований, который не часто представлен в биохимии. Их цель – показать изучаемый предмет в динамике, либо установить временные периоды, когда что-то изменяется или значимо для последующих прогнозов. Это относится как к исследованию процессов в норме, так и к патологическим процессам [1]. Лонгитюдные исследования требуют особого подхода как к обработке данных, так и к их интерпретации [2, 3]. Авторы доклада предприняли сравнение динамики протеомных профилей плазмы крови условно здоровых добровольцев и разработали протокол статистического анализа для сравнения динамических профилей здоровых добровольцев в связи с их физиологическими и психологическими индивидуальными различиями. На материале своих и опубликованных исследований рассмотрены возможные артефакты лонгитюдного протеомного анализа и проблемы верификации получаемых результатов. Рассмотрены также вопросы необходимого объема выборок, дизайна и сопоставления исследуемых групп. Рассмотрены аспекты биобанкирования образцов. Обобщены ограничения лонгитюдных исследований. Приведены результаты систематического ревью лонгитюдных исследований здоровых добровольцев и больных COVID-19.

*Работа выполнена в рамках государственного задания "Разработка методов молекулярно-генетической диагностики для квантификации саногенеза у здоровых людей" ЕГСУ НИОКТР 122030900062-5.*

1. Gisby J et al. Longitudinal proteomic profiling of dialysis patients with COVID-19 reveals markers of severity and predictors of death. *eLife* 2021, 10: e64827. <https://doi.org/10.7554/eLife.64827>
2. Viode A et al. Longitudinal plasma proteomic analysis of 1117 hospitalized patients with COVID-19 identifies features associated with severity and outcomes. *Sci Adv.* 2024, 10: ead15762(2024). DOI:10.1126/sciadv.ad15762
3. Gu X et al. Probing long COVID through a proteomic lens: a comprehensive two-year longitudinal cohort study of hospitalized survivors. *EBioMedicine* 2023 Dec;98:104851. doi: 10.1016/j.ebiom.2023.104851.

## LONGITUDINAL PROTEOMIC STUDIES IN NORM AND PATHOLOGY

**K. Gorbunov, D. Engin, O. Kurilova, S. Selezov, A. Snunaev**

*Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow*

Longitudinal studies are a separate class of studies that are not often represented in biochemistry. Their purpose is to show the subject under study in dynamics, or to establish time periods when something changes or is significant for subsequent predictions. This applies to the study of both normal and pathologic processes [1]. Longitudinal studies require a special approach to both data processing and interpretation [2, 3]. The authors of the presentation have undertaken a comparison of the dynamics of proteomic profiles of blood plasma of conditionally healthy volunteers and developed a statistical analysis protocol for comparing the dynamic profiles of healthy volunteers due to their physiological and psychological individual differences. Possible artifacts of longitude proteomic analysis and problems of verification of the obtained results are considered on the material of their own and published studies. The issues of necessary sample size, design and comparison of study groups are also considered. Aspects of biobanking of samples are considered. Limitations of longitudinal studies are summarized. The results of a systematic review of longitudinal studies of healthy volunteers and COVID-19 patients are presented.

*The work was carried out with government funding. Registration number 22030900062-5*

1. Gisby J et al. Longitudinal proteomic profiling of dialysis patients with COVID-19 reveals markers of severity and predictors of death. *eLife* 2021, 10: e64827. <https://doi.org/10.7554/eLife.64827>
2. Viode A et al. Longitudinal plasma proteomic analysis of 1117 hospitalized patients with COVID-19 identifies features associated with severity and outcomes. *Sci Adv.* 2024, 10: ead15762(2024). DOI:10.1126/sciadv.ad15762
3. Gu X et al. Probing long COVID through a proteomic lens: a comprehensive two-year longitudinal cohort study of hospitalized survivors. *EBioMedicine* 2023 98: 104851. doi: 10.1016/j.ebiom.2023.104851.

## МИРОВАЯ КАРТА УСКОРЕННОГО ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОГО СТАРЕНИЯ

**М.В. Иванченко, А.И. Калякулина, И.И. Юсипов, К. Франчески**

*Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород*

В докладе будет дан обзор результатов систематического анализа ускорения эпигенетического возраста на основе крупнейшего набора общедоступных данных о метилировании ДНК для здоровых участников исследований (93 набора данных, 23 тыс. образцов). Особое внимание уделяется географическим и этническим аспектам разных стран (25 стран) и популяций (31 этническая группа). Подробно рассмотрены наиболее распространенные модели эпигенетических часов для оценки ускорения старения, проанализированы их показатели качества и способность экстраполировать эпигенетические данные из разных типов тканей и возрастных диапазонов, отличные от данных обучения этих моделей. Обнаружено, что в большинстве случаев модели не согласуются друг с другом и демонстрируют разные признаки ускорения старения. Так, модель PhenoAge имеет тенденцию систематически недооценивать, а различные версии модели GrimAge – переоценивать прогноз возраста здоровых субъектов. При том, что GEO является крупнейшей открытой эпигенетической базой данных, большинство стран и групп населения остаются не представленными в ней, кроме того, в разных наборах данных используются разные критерии для определения здорового контроля. В этой связи затруднительно однозначно установить вклад «географии/окружающей среды», «этнической принадлежности» и «здоровья» в ускорение эпигенетического старения. Вместе с тем можно заключить, что метрика DunedinPACE, оценивающая скорость старения, наиболее адекватно отражает уровень жизни и социально-экономические показатели в странах, хотя ее можно применять только к данным по метилированию крови. Наконец, согласно эпигенетическому ускорению старения, в большинстве рассматриваемых стран и популяций мужчины стареют быстрее, чем женщины.

## A WORLDWIDE MAP OF EPIGENETIC AGE ACCELERATION

**M.V. Ivanchenko, A.I. Kalyakulina, I.I. Yusipov, C. Franceschi**

*Lobachevsky University, Nizhny Novgorod*

We present the first systematic study of epigenetic age acceleration of the largest publicly available DNA methylation data for healthy samples (93 datasets, 23K samples), focusing on geographic and ethnic aspects of different countries (25 countries) and populations (31 ethnicities) around the world. The most popular epigenetic tools for assessing age acceleration were examined in detail, their quality metrics were analyzed, and their ability to extrapolate to epigenetic data from different tissue types and age ranges different from the training data of these models was explored. In most cases, the models are not consistent with each other and show different signs of age acceleration, with the PhenoAge model tending to systematically underestimate and different versions of the GrimAge model tending to systematically overestimate the age prediction of healthy subjects. Although GEO is the largest open-access epigenetic database, most countries and populations are not represented, and different datasets use different criteria for determining healthy controls. Because of this, it is difficult to fully isolate the contribution of “geography/environment”, “ethnicity” and “healthiness” to epigenetic age acceleration. However, the DunedinPACE metric, which measures aging rate, adequately reflects the standard of living and socioeconomic indicators in countries, although it can be applied only to blood methylation data. When comparing epigenetic age acceleration, males age faster than females in most of the countries and populations considered.

## ОНТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ПРОГРАММИРОВАНИЕ: ВЛИЯНИЕ НЕПЕРЕНOSИМОСТИ ЛАКТОЗЫ В ПЕРИНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ НА ПРЕЖДЕВРЕМЕННОЕ СТАРЕНИЕ КАРДИОМИОЦИТОВ И ДЛИТЕЛЬНУЮ ДИСФУНКЦИЮ СЕРДЦА У КРЫС

**О.В. Анацкая, С.В. Пономарцев, А.У. Елмуратов, М.В. Харченко, А.Е. Виноградов**

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург*

Неонатальное программирование (НП) заболеваний взрослых людей – это способность стрессовых воздействий, перенесенных в раннем постнатальном развитии, вызывать изменения в физиологии и эпигенетике клеток, которые приводят к повышенному риску развития широкого спектра патологий. Наиболее сильно этому явлению подвержено сердце. Известно, что гипертония, кардиомиопатии различного генеза, ишемическая болезнь сердца и даже инфаркт миокарда могут происходить из-за задержки роста, воспалений и инфекций, перенесенных в детстве. В связи с этим нахождение новых триггеров НП сердечно-сосудистых заболеваний представляет особенный интерес.

Цель нашего исследования состоит в изучении долговременных последствий воспалительного стресса, вызванного неонатальной непереносимостью лактозы (ННЛ), на транскриптом и фенотип кардиомиоцитов. Наши предыдущие исследования долговременных качественных изменений в транскриптом кардиомиоцитов крыс, показали, что ННЛ вызывает частичное выключение генов в сигнальных каскадах гормона щитовидной железы, кальция и глутатиона и включение генов ответа на повреждение ДНК и воспаление. В настоящей работе мы сфокусировались на оценке ремоделирования кардиомиоцитов и полнотранскриптомном анализе генов, которые количественно и достоверно изменили экспрессию.

Наши данные показали, что ННЛ вызывает удлинение и сужение кардиомиоцитов, а также активацию генных путей старения и сопутствующих путей, вовлеченных в ответ на повреждение ДНК в области теломер, ответ на окислительный стресс, цилиогенез, ремоделирование хроматина и воспаление. Эти изменения сопровождались подавлением путей секреции инсулина, сигнализации кальция и некоторых путей иммунитета. Исследование интерактома сократительных белков выявило фетализацию сократительного аппарата клеток (замещение взрослых изоформ миозина и тропонина на фетальные). Основным результатом наших исследований является обнаружение того, что ННЛ может быть важным триггером онтогенетического программирования заболеваний сердца, который патологически меняет программы развития, ускоряя процессы старения сердца.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1075 от 28 сентября 2021 г.).*

## DEVELOPMENTAL PROGRAMMING: PERINATAL LACTOSE INTOLERANCE INDUCES PREMATURE CARDIOMYOCYTE SENESCENCE AND LONG-TERM HEART DYSFUNCTION IN RATS

**O.V. Anatskaya, S.V. Ponomartsev, A.U. Elmuratov, M.V. Kharchenko, A.E. Vinogradov**

*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St Petersburg*

Neonatal programming (NP) of adult diseases refers to the ability of stress factors experienced during early postnatal development to induce changes in cell physiology and epigenetics thereby leading to an increased risk of developing a wide range of pathologies. The heart is particularly susceptible to this phenomenon. It is known that hypertension, cardiomyopathies of various origins, ischemic heart disease, and even myocardial infarction can result from growth retardation, inflammation, and infections experienced in childhood. Therefore, identifying new triggers of NP for cardiovascular diseases is of particular importance.

The aim of our study is to investigate the long-term consequences of inflammatory stress caused by neonatal lactose intolerance (NLI) on the transcriptome and phenotype of cardiomyocytes. Our previous studies on long-term qualitative changes in the transcriptome of rat cardiomyocytes showed that NLI causes partial switch-off of genes in the signaling cascades of thyroid hormone, calcium, and glutathione, and switch-on of genes involved in DNA damage response and inflammation. In this study, we focused on assessing cardiomyocyte remodeling and performed a whole-transcriptome analysis of genes that showed quantitative changes in expression.

Our data revealed that NLI leads to elongation and narrowing of cardiomyocytes, as well as the activation of aging-related gene pathways and associated pathways involved in the DNA damage response at telomeres, oxidative stress response, ciliogenesis, chromatin remodeling, and inflammation. These changes were accompanied by the suppression of insulin secretion pathways, calcium signaling, and certain immune pathways. The study of the interactome of contractile proteins revealed signs of fetalization of the cellular contractile apparatus, as evidenced by the replacement of adult isoforms of myosins and troponins with fetal ones. The main result of our research is the discovery that NLI may be an important trigger of the ontogenetic programming of heart diseases, pathologically altering developmental programs and accelerating the aging processes of the heart.

*We thank Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for support (Agreement No. 075-15-2021-1075, dated September 28, 2021).*

## БЕТА АМИЛОДИД С ИЗОМЕРИЗОВАННЫМ ASP7 КАК МИШЕНЬ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

**В.А. Митькевич**

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

Патогенез болезни Альцгеймера (БА) связан с образованием церебральных амилоидных бляшек, основными компонентами которых являются модифицированные молекулы бета-амилоида ( $A\beta$ ), а также ионы металлов.  $A\beta$ , изомеризованный по остатку Asp7 (iso $A\beta$ ), является наиболее распространенной изоформой в амилоидных бляшках. IsoD7- $A\beta$  играет критическую роль в ассоциированных с развитием БА процессах: цинк-зависимой олигомеризации  $A\beta$ , усилении его нейротоксичности; гиперфосфорилировании белка тау, резкого ускорения развития церебрального амилоидогенеза в животных моделях БА. Показано, что у трансгенных мышей iso $A\beta$  обнаруживается уже в раннем возрасте и установлена корреляция накопления этого пептида в мозге с возрастом как у мышей, так и у пациентов с БА. Согласно разработанной нами модели, триггерами патологического каскада при БА, инициирующими церебральный амилоидогенез, являются комплексы цинк-связанных молекул iso $A\beta$  с белками на поверхности клеток. Одним из основных таких комплексов является комплекс, состоящий из изоформы  $A\beta$  и одной из субъединиц холинорецепторов ( $\alpha 4$ ), межмолекулярный интерфейс которого образован фрагментами 11-EVHH-14 со стороны  $A\beta$  и 35-NAEE-38 со стороны рецептора, совместно хелатирующими ион цинка. Этот комплекс играет роль матрицы для образования нейротоксичных олигомеров  $A\beta$ . Мы показали, что как *in vitro*, так и *in vivo* нейтрализовали негативное действие iso $A\beta$  можно с использованием тетрапептида NAEE и его аналогов, которые потенциально могут служить антиамилоидными терапевтическими средствами.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант №19-74-30007.*

## BETA-AMYLOID WITH ISOMERIZED ASP7 AS A TARGET FOR DIAGNOSTICS AND THERAPY OF ALZHEIMER'S DISEASE

**V.A. Mitkevich**

*Engelhardt institute of Molecular Biology RAS, Moscow*

The pathogenesis of Alzheimer's disease (AD) is associated with the formation of cerebral amyloid plaques, the main components of which are modified beta-amyloid molecules ( $A\beta$ ) and metal ions.  $A\beta$  isomerized at the Asp7 residue (iso $A\beta$ ) is the most common isoform in amyloid plaques. IsoD7- $A\beta$  plays a critical role in the processes associated with the development of AD: zinc-dependent oligomerization of  $A\beta$ , increased neurotoxicity; hyperphosphorylation of the tau protein, and a sharp acceleration of the development of cerebral amyloidogenesis in animal models of AD. It has been shown that iso $A\beta$  is detected in transgenic mice already at an early age, and a correlation has been established between the accumulation of this peptide in the brain and age in both mice and patients with AD. According to our model, the triggers of the pathological cascade in AD, initiating cerebral amyloidogenesis, are complexes of zinc-bound iso $A\beta$  molecules with proteins on the cell surface. One of the main such complexes is a complex consisting of the  $A\beta$  isoform and one of the cholinergic receptor subunits ( $\alpha 4$ ), the intermolecular interface of which is formed by fragments 11-EVHH-14 on the  $A\beta$  side and 35-NAEE-38 on the receptor side, jointly chelating the zinc ion. This complex plays the role of a matrix for the formation of neurotoxic  $A\beta$  oligomers. We have shown that both *in vitro* and *in vivo* the negative effect of iso $A\beta$  can be neutralized using NAEE tetrapeptide and its analogs, which can potentially serve as anti-amyloid therapeutic agents.

*Supported by the Russian Science Foundation, grant #19-74-30007.*



## ОСОБЕННОСТИ РЕПЛИКАТИВНЫХ И БИОХИМИЧЕСКИХ АСПЕКТОВ СТАРЕНИЯ У ЖЕНЩИН ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ НЕЯТРОГЕННОГО ГИПЕРГОНАДОТРОПНОГО ГИПОГОНАДИЗМА

Р.К. Михеев, Е.Н. Андреева, Г.А. Мельниченко

ГНЦ РФ НМИЦ эндокринологии Минздрава России, Москва

Старение – это универсальный гетерогенный биологический процесс, заложенный в геноме живых организмов и неоспоримо являющийся актуальной проблемой как в научном, так и социально-демографическом плане. Одной из многообещающих теорий женского старения является эндокринно-теломеразная теория старения, в основе которой лежит процесс укорочения теломер – шестинуклеотидных (TTAGGG) концевых участков линейных хромосом, которому препятствует эстроген-зависимая активность теломеразы.

Цель исследования: изучить наличие связи заместительной терапии половыми стероидами в долгосрочном режиме (более 5 лет) с маркерами репликативного клеточного старения (ДТЛ), биохимическими маркерами у женщин с различными формами неятрогенного гипергонадотропного гипогонадизма (физиологическая менопауза/преждевременная недостаточность яичников/синдром Тернера) в сравнении со здоровыми женщинами репродуктивного возраста без данной терапии.

Выводы.

1. Приём низкодозированной (1 мг 17 $\beta$ -эстрадиола) и микродозированной (0,5 мг 17 $\beta$ -эстрадиола) непрерывной МГТ от 5 лет и более пациентками с физиологической менопаузой ассоциирован с поддержанием репликативного потенциала (ДТЛ) периферической крови и снижению биохимических показателей коморбидного статуса до уровня, соответствующего здоровым женщинам репродуктивного возраста.

2. На фоне приёма циклической (1/2 мг 17 $\beta$ -эстрадиола в течение 14 дней) ЗГТ половыми стероидами длительностью от 5 лет и более пациентками с ПНЯ ДТЛ выше, чем у женщин в физиологической менопаузе.

3. Пациентки с СТ (45, X0), не получающие циклическую ЗГТ половыми стероидами, являются группой пациенток с самой короткой ДТЛ и высоким уровнем биохимических показателей коморбидного статуса.

4. Здоровые пациентки репродуктивного возраста имеют самую высокую ДТЛ; пациентки с ПНЯ, получающие ЗГТ половыми стероидами  $\geq 5$  лет, имеют более «длинные» теломеры, чем женщины с физиологической менопаузой; приём/отсутствие МГТ  $\geq 5$  лет по поводу физиологической менопаузы не ассоциирован с изменением длины теломер.

5. ДТЛ периферической крови и уровень фолликулостимулирующего гормона являются обратно коррелирующими между собой показателями, зависящими от выраженности насыщения организма собственными фракциями эстрогенов.

## FEATURES OF REPLICATIVE AND BIOCHEMICAL MARKERS OF AGING AMONG FEMALES WITH NON-IATROGENIC HYPERGONADOTROPIC HYPOGONADISM

R.K. Mikheev, E.N. Andreeva, G.A. Melnichenko

Endocrinology Research Center, Russian Ministry of Health, Moscow

Ageing is universal biological process and social demographic problem. Endocrine-telomerase theory of ageing is one of the most promising aging theories which is based on telomeres shortening (six nucleotide terminal DNA fragments) and estrogen protective influence of telomere length. AIM: To evaluate influence of sex steroid replacement therapy (> 5 years) with markers of replicative cellular aging (leukocyte telomere length – LTL), biochemical markers among females with non-iatrogenic forms of hypergonadotropic hypogonadism (physiological menopause, premature ovarian failure, Turner syndrome) in comparison with reproductive age females without therapy.

Conclusions

1. Low-dosed (1 mg 17 $\beta$ -estradiol) and microdosed (0.5 mg 17 $\beta$ -estradiol) of MHT (>5 years) among menopausal females is associated with same LTL and lowering biochemical markers as reproductive age females.

2. Cyclic (1/2 mg 17 $\beta$ -estradiol for 14 days) therapy (5 years and longer) by females with POI leads to higher LTL than menopausal females.

3. Non-receiving 17 $\beta$ -estradiol therapy females with Turner syndrome (45, X0) have shortest LTL and highest levels of biochemical comorbidity markers.

4. Healthy reproductive age females have highest LTL; females with POI on therapy  $\geq 5$  years, have longer telomeres than physiological females; receiving/absence of 17 $\beta$ -estradiol therapy  $\geq 5$  years among menopausal females is not associated with LTL.

5. LTL correlates inversely with FSH level.

## ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ДЕТЕКТОРОВ ДЛЯ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ОБНАРУЖЕНИЯ БЕЛКОВ

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

*НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва*

Обнаружение и изучение свойств отдельных белков является новым вектором развития постгеномных технологий. В отличие от молекул нуклеиновых кислот, молекулы белков не могут быть размножены и зарегистрированы методами, подобными ПЦР-анализу. Знания о биологических процессах на принципиально новом уровне – уровне единичных молекул, необходимы для создания основы превентивной и предиктивной медицины. Для обнаружения единичных молекул белков предлагается особый подход на основе использования молекулярных детекторов – устройств, позволяющих регистрировать сигнал от отдельных молекул. Для возможности эффективного использования этого подхода необходима комбинация молекулярного детектора с методом молекулярного фишинга – концентрирования целевых биомолекул из большого объема анализируемого раствора в небольшой сенсорной зоне для обеспечения возможности детекции. В работе рассмотрены принципы методов обнаружения белков с помощью двух молекулярных детекторов – атомно-силового микроскопа (АСМ) и нанопроводного детектора (НП-детектора). Рассматриваются расчетные данные, теоретически обосновывающие эффективность предлагаемого подхода. Приведены примеры обнаружения белков в буферных растворах и биологических образцах с фемто- и субфемтомолярной чувствительностью. Разработка нового подхода также описана в ракурсе существующих оригинальных инструментальных, методологических и программных решений для молекулярных детекторов, составляющих основу уникальной научной установки (УНУ) «Авогадро» – единственного в России комплекса, на котором может быть реализован предлагаемый подход.

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

## MOLECULAR DEVICES FOR HIGHLY SENSITIVE PROTEIN DETECTION

**T.O. Pleshakova, Yu.D. Ivanov, A.I. Archakov**

*Institute of Biomedical Chemistry, Moscow*

One novel vector for the advancement of postgenomic technologies is the detection and study of the properties of individual proteins. Unlike nucleic acid molecules, protein molecules cannot be multiplied and registered by methods similar to PCR analysis. Knowledge about biological processes at a fundamentally new level – the level of single molecules, is necessary to create the basis for preventive and predictive medicine. To detect single protein molecules, a special approach is proposed based on the use of molecular detectors - devices that allow recording a signal from individual molecules. To effectively use this approach, a combination of a molecular detector with a molecular fishing method is necessary – concentrating the target biomolecules from a large volume of the analysed solution into a small sensor region to enable detection. The work considers the principles of protein detection methods using two molecular detectors – an atomic force microscope (AFM) and a nanowire detector (NW detector). The calculated data that theoretically substantiate the effectiveness of the proposed approach are considered. Examples of protein detection in buffer solutions and biological samples with femto- and subfemtomolar sensitivity are given. The development of a new approach is also described from the perspective of existing original instrumental, methodological and software solutions for molecular detectors, which form the basis of the “Avogadro” large-scale research facilities (USU) – the only complex in Russia on which the proposed approach can be implemented.

*The work was performed within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021-2030) (№122030100168-2).*

## ИММУННЫЕ И ЭНДОКРИННЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ И ИХ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

**К.Ю. Слащук, М.В. Рейнберг**

*ГНЦ РФ НМИЦ эндокринологии Минздрава России, Москва*

В последние годы внедрение таргетной терапии и ингибиторов контрольных точек иммунного ответа существенно изменило подходы в онкологии, предоставив новые возможности для пациентов с злокачественными новообразованиями. Эти методы лечения, включая ингибиторы PD-1/PD-L1, ингибиторы CTLA-4 и различные ингибиторы тирозинкиназы (TKIs), усиливают способность иммунной системы распознавать и уничтожать опухолевые клетки или воздействуют на специфические молекулярные пути, участвующие в онкогенезе. Несмотря на их клиническую эффективность, данные методы лечения сопряжены с риском значительных побочных эффектов, в том числе аутоиммунного характера. Частота нежелательных явлений варьируется от 20-40%, при этом эндокринные патологии встречаются в 10-15% случаев. Своевременная диагностика потенциально угрожающих жизни побочных эффектов, в том числе гипопфизита, адреналита, сахарного диабета, позволят выбрать оптимальную стратегию мультидисциплинарного ведения таких пациентов. Высокая частота дисфункции щитовидной железы в исходе противоопухолевой терапии также может внести трудности в клиническом наблюдении пациентов с онкологической патологией.

## IMMUNE AND ENDOCRINE COMPLICATIONS OF ANTITUMOR THERAPY AND THEIR CLINICAL AND LABORATORY DIAGNOSTICS

**K. Slashchuk, M. Reinberg**

*Endocrinology Research Center, Russian Ministry of Health, Moscow*

In recent years, the introduction of targeted therapy and immune checkpoint inhibitors has significantly changed approaches in oncology, providing new options for patients with malignant neoplasms. These treatments, including PD-1/PD-L1 inhibitors, CTLA-4 inhibitors, and various tyrosine kinase inhibitors (TKIs), enhance the ability of the immune system to recognize and destroy tumor cells or affect specific molecular pathways involved in oncogenesis. Despite their clinical efficacy, these treatments are associated with the risk of significant side effects, including autoimmune ones. The incidence of adverse events varies from 20-40%, with endocrine pathologies occurring in 10-15% of cases. Timely diagnosis of potentially life-threatening side effects, including hypophysitis, adrenalitis, diabetes mellitus, will allow choosing the optimal strategy for multidisciplinary management of such patients. The high incidence of thyroid dysfunction following antitumor therapy may also complicate the clinical monitoring of patients with cancer.

### СВЯЗЬ SNP rs7903146, rs11196205 И rs12255372 В ГЕНЕ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА TCF7L2 С СИНДРОМОМ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ

Л.А. Усакин, Н.В. Максимова, А.А. Пантелеев

НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Синдром диабетической стопы (СДС) является одним из самых тяжёлых осложнений диабета 2 типа, которое проявляется в виде незаживающих (хронических) язв кожных покровов нижних конечностей вследствие нарушения эпителиальной регенерации. Лечение СДС остаётся сложным, трудоёмким и весьма дорогим, несмотря на наличие хорошо отработанных протоколов. Раннее прогнозирование потенциального развития СДС у диабетиков может значительно снизить негативные последствия этого осложнения. Для выявления потенциальных генетических маркеров СДС группа пациентов из Московской области с диабетом 2 типа с СДС и без СДС была генотипирована по ряду однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs). Аллель t rs7903146 в гене TCF7L2, известный как один из наиболее значимых факторов риска диабета 2 типа, показал защитный эффект от СДС с  $OR(95\%)=0,68(0,48-0,96)$ . Этот эффект аллеля t rs7903146 на предрасположенность к СДС подразумевает, что его присутствие увеличивает вероятность развития диабета 2 типа, но, в то же время, снижает вероятность появления СДС.

Проверка SNP, находящихся вблизи от rs7903146, а именно rs11196205 и rs12255372, выявила ассоциацию с диабетом второго типа гаплотипа tct ( $p=0.002$ ), но не с СДС. Отсутствие ассоциации с СДС полиморфизмов, находящихся в неравновесном сцеплении (linkage disequilibrium) с rs7903146, предполагает функциональный (каузальный) эффект полиморфизма rs7903146 на СДС.

Ген TCF7L2 кодирует белок семейства транскрипционных факторов, специфичных для T-клеток, которые активируются бета-катенином, опосредуют регуляторный путь WNT и являются антагонистами TNF. Ранее было показано, что Tcf3 (Tcf711) и Tcf4 (Tcf712) незаменимы для поддержания долгосрочного гомеостаза в коже мышей. В кожных трансплантатах мышей Tcf3/4-null не наблюдалось регенерации эпителия из-за неспособности поддерживать долгосрочное самообновление популяции стволовых клеток в эпидермисе. Недавно также было показано, что ген TCF7L2 подавлен в макрофагах M1 из образцов стоп пациентов с СДС, у которых наблюдался процесс ремиссии. Таким образом, выявление ассоциации TCF7L2 с СДС в нашем исследовании является первым и весьма значимым наблюдением, проливающим новый свет на роль нарушения эпителиальной регенерации в патогенезе СДС.

### ASSOCIATION OF SNPS RS7903146, RS11196205 AND RS12255372 IN THE GENE TCF7L2 WITH DIABETIC FOOT SYNDROME

L.A. Usakin, N.V. Maksimova, A.A. Panteleyev

NRC Kurchatov Institute, Moscow

Diabetic foot syndrome (DFS) is one of the most severe complications of type 2 diabetes, manifesting itself in the form of non-healing ulcers of the skin of the lower extremities due to impaired epithelial regeneration. Treatment of DFS remains complex, labor-intensive and very expensive, despite the availability of well-established protocols. Early prediction of the potential development of DFS in diabetics can significantly reduce the negative consequences of this complication. To identify potential genetic markers of DFS, a cohort of patients from the Moscow region with type 2 diabetes with and without DFS was genotyped for a number of single nucleotide polymorphisms (SNPs). The t allele rs7903146 in the TCF7L2 gene, known as one of the most significant risk factors for type 2 diabetes, showed a protective effect against DFS with  $OR(95\%) = 0.68(0.48-0.96)$ . This effect of the t allele of rs7903146 on the susceptibility to DFS implies that its presence increases the probability of developing type 2 diabetes, but at the same time decreases the probability of DFS.

Testing of SNPs located near rs7903146, namely rs11196205 and rs12255372, revealed an association with type 2 diabetes of the tct haplotype with  $p=0.002$ , but not with the DFS. The absence of an association with DFS of SNPs in linkage disequilibrium with rs7903146 suggests a functional (causal) effect of the rs7903146 polymorphism on DM.

The TCF7L2 gene encodes a protein of the T-cell specific transcription factor family that is activated by beta-catenin, mediates the WNT regulatory pathway, and is a TNF antagonist. It has been previously shown that Tcf3 (Tcf711) and Tcf4 (Tcf712) are essential for maintaining long-term homeostasis in mouse skin. Skin grafts from Tcf3/4-null mice failed to regenerate epithelia due to the inability to maintain long-term self-renewal of the stem cell population in the epidermis. Recently, it has also been shown that the TCF7L2 gene is down-regulated in M1 macrophages from foot samples from patients with DFS who were in remission. Thus, the identification of the association of TCF7L2 with DFS in our study is the first and highly significant observation that sheds new light on the role of impaired epithelial regeneration in the pathogenesis of DFS.

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ПРОЛАКТИН-СЕКРЕТИРУЮЩИХ АДЕНОМ ГИПОФИЗА

А.С. Шутова, Л.К. Дзеранова, Е.А. Пигарова, В.А. Иоутси, Л.С. Усольцева, М.В. Уткина, Е.Г. Пржихалковская, Е.А. Трошина

ГНЦ РФ НИИЦ эндокринологии Минздрава России, Москва

Пролактиномы – наиболее распространенные (40%) гормонально-активные аденомы гипофиза. Основным методом лечения – терапия агонистами дофамина, которая позволяет нормализовать уровень пролактина и уменьшить аденому. Однако около 20% пациентов неудовлетворительно реагируют даже на высокие дозы агонистов дофамина, что обусловлено резистентностью к терапии. Причины резистентности – предмет научной дискуссии, а клинические предикторы резистентности – отсутствуют.

Цель: изучение метаболомных генетических характеристик пациентов с резистентными пролактиномами.

У пациентов (n=4) с резистентными пролактиномами и у одного пациента с адекватной чувствительностью к препарату проведен специфический фармакокинетический тест: 1) каберголин предварительно отменялся за 4 дня до исследования; 2) взятие крови осуществлялось утром в день исследования, затем через 30, 60, 90, 120 минут и 4, 12, 24 часа после приема фиксированной дозы каберголина – 0,5 мг. Измерение концентрации каберголина в сыворотке крови проводилось с использованием метода высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии.

Получены данные, свидетельствующие об отсутствии ожидаемых фармакокинетических пиков кривой концентрации каберголина крови у 3 пациентов с резистентностью к лечению (скорость прироста менее +1-50%). На фармакокинетической кривой 1 резистентного пациента концентрация каберголина достигла пика на 30-й минуте (скорость прироста +175%) с последующим снижением до исходного. Кривая концентрации чувствительного к терапии пациента характеризовалась исходно высокой концентрацией каберголина, достигшей пика (скорость прироста +112%) к концу времени исследования.

Обнаруженные по данным РНК-секвенирования и секвенирования единичных клеток генетические особенности являются перспективными мишенями адьювантного лечения и основой разработки методов ранней диагностики.

Полученные данные свидетельствуют о наличии дефектов достижения адекватной концентрации препарата в крови, обусловленных метаболомными и абсорбционными особенностями, наряду с молекулярно-генетическими нарушениями. Определение изменений, характерных для резистентности, будет способствовать формированию оптимальной, персонализированной тактики лечения.

## GENETIC PREDICTORS OF PROLACTINOMA'S RESISTANCE TO THERAPY

A.S. Shutova, L.K. Dzeranova, E.A. Pigarova, V.A. Ioutsi, L.S. Usoltseva, E.G. Przhiyalkovskaya, E.A. Troshina

Endocrinology Research Center, Russian Ministry of Health, Moscow

Prolactinomas are the most common (40%) functioning pituitary adenomas. First line treatment is dopamine agonists therapy, which allows to normalize prolactin level and reduce the size of the adenoma. However, about 20% of patients with prolactinomas poorly respond even to high doses of dopamine agonists due to resistance to therapy. The causes of resistance - subject of discussion, while predictors of resistance remain obscured.

Aim: Investigation of the metabolomic and genetic characteristics of patients with prolactinomas.

In patients (n=4) with resistant prolactinomas and one with normal effect of the drug we conducted a specific pharmacokinetic test: 1) cabergoline was preliminary withdrawn 4 days before the test; 2) at 9:00 the blood was taken before and 30, 60, 90, 120 minutes and 4 hours after taking the cabergoline in a fixed doze of 0.5 mg. The concentration of cabergoline substance in the serum was measured using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry method (LC-MS/MS).

It is shown that the serum cabergoline concentration curve in 3 patients with resistance to treatment doesn't represent expected pharmacokinetic peaks (the growth rate less than + 1-50%). The pharmacokinetic curve of 1 resistant patient represented a cabergoline concentration peak at 30 min point (the growth rate +175%) with subsequent decline to baseline levels. The serum cabergoline concentration curve of drug-sensitive patient is characterized by an already significant baseline concentration that becomes progressively higher reaching an outstanding peak (the growth rate +112%) at the end of the test period.

Results indicate that the patients with dopamine-resistant prolactinomas may have defects in forming an adequate blood concentrations of the drug due to metabolomic and absorption features, along with morphological and genetic alterations. Determining changes that are characteristic for patients with resistant prolactinomas will lead to understanding of the general principles of resistance and contribute to the development of optimal, personalized treatment strategy.

## ГЛОБАЛЬНАЯ ПРОБЛЕМА АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ БАКТЕРИЙ И ПУТИ ЕЕ РЕШЕНИЯ

**А.М. Егоров**

*МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва*

Проблема резистентности патогенных бактерий к антибиотикам приобрела характер глобальной мультифакторной угрозы, что вызывает необходимость ее разностороннего изучения. ВОЗ назвала проблему устойчивости бактерий к антибактериальным препаратам (АБП) одной из десяти основных угроз здоровью населения во всем мире. К настоящему времени обнаружены бактерии, резистентные ко всем классам АБП, результатом чего является ограничение «жизненного цикла» препаратов в клинической практике и фатальное сокращение новых препаратов, находящихся в разработке или уже одобренных для применения. Механизмы бактериальной резистентности разнообразны. В их реализации участвуют суперсемейства ферментов, совокупность которых получила название «энзимом». Эволюция резистентности обусловлена мутационной изменчивостью кодирующих «энзимом» генов, а широкое распространение резистентных штаммов – локализацией генетических кластеров, включающих гены устойчивости, на плаزمидах. Важнейшей составляющей «энзимоста» являются бета-лактамазы (БЛ), гидролизующие бета-лактамные антибиотики. БЛ включают сериновые гидралазы и металло-ферменты, которые различаются по структуре, субстратной специфичности и стабильности. Основным подходом к преодолению резистентности, обусловленной синтезом БЛ, является создание ингибиторов этих ферментов и их использование в комбинации с АБП. Для поиска новых мишеней подавления БЛ и создания новых аллостерических ингибиторов активно используются компьютерное моделирование, анализ структурных моделей БЛ, докинг и виртуальный скрининг лигандов. Методом виртуального скрининга на основе изменения структурного остова лигандов нами найдены новые не бета-лактамные ингибиторы сериновых БЛ. Другим подходом является использование компьютерного моделирования для поиска поверхностных «горячих точек» белковой глобулы, в качестве которых большой интерес представляют подвижные петли. В качестве потенциальной мишени мы рассматриваем омега-петлю сериновых БЛ, мутации остатков которой способствуют изменению каталитических функций. Потенциальные петли-мишени обнаружены и у металло-БЛ. Другим подходом к преодолению резистентности является создание вакцин против патогенных бактерий.

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

## THE GLOBAL PROBLEM OF BACTERIAL ANTIBIOTIC RESISTANCE AND POTENTIAL SOLUTIONS

**A.M. Egorov**

*Lomonosov Moscow State University, Moscow*

The problem of the resistance of pathogenic bacteria to antibiotics has acquired the character of a global multifactorial threat, which necessitates its comprehensive study. WHO has named the problem of bacterial resistance to antibacterial drugs (ABD) as one of the ten main threats to public health worldwide. To date, bacteria resistant to all classes of ABD have been discovered, resulting in a limitation of the "life cycle" of drugs in clinical practice and a fatal reduction in new drugs under development or already approved for use. The mechanisms of bacterial resistance are diverse. Superfamilies of enzymes are involved in their implementation, in general they are called "the enzystem". The evolution of resistance is due to the mutational variability of the genes encoding the "enzyme," and the widespread spread of resistant strains is due to the localization of genetic clusters, including resistance genes, on plasmids. The most important component of the "enzystem" are beta-lactamases (BLs), which hydrolyze beta-lactam antibiotics. BLs include serine hydralases and metallo-enzymes, which differ in structure, substrate specificity, and stability. The main approach to overcoming the resistance is the creation of inhibitors of these enzymes and their use in combination with ABD. Computer modeling, analysis of structural models of BL, docking, and virtual screening of ligands are actively used to find new targets for the suppression of BL and the creation of new allosteric inhibitors. By using the method of virtual screening based on changes in the structural backbone of ligands, we found new non-beta-lactam inhibitors of serine BLs. Another approach consists in the application of computer modeling to search for surface "hot spots" of a protein globule, for which flexible loops are of great interest. As a potential target, we consider the omega-loop of serine BLs, mutations of the residues of which contribute to a change in catalytic functions. Potential target loops were also found in metallo-BLs. Another approach to overcoming the resistance is to create vaccines against pathogenic bacteria.

*The work was carried out with the financial support of the Lomonosov Moscow University State Program (123032300028-0).*

### СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ПОИСКУ ПРИРОДНЫХ АНТИБИОТИКОВ

**В.А. Алферова, Т.В. Кравченко, С.С. Терехов, А.А. Баранова, А.П. Тюрин, В.А. Коршун**

*ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*

Распространение резистентных патогенов по всему миру создает острую потребность в новых антибиотиках с оригинальным механизмом действия. Тем не менее, как открытие, так и внедрение природных соединений в клинику сдерживается рядом факторов. Природные источники по-прежнему являются очень привлекательным источником активных метаболитов с ценными фармакологическими свойствами. За последние несколько десятилетий скорость открытия новых антибиотиков с использованием стандартной платформы открытий, представленной Зельманом Ваксманом в начале XX века, постепенно снизилась. В настоящее время существует ряд современных и развивающихся тенденций в области скрининга и идентификации природных биоактивных соединений. Методы в этой междисциплинарной области можно разделить на три группы: основанные на микробиологии (например, культивирование *in situ* и микрофлюидика), химии (например, дерепликация и масс-профилирование) и молекулярной биологии (например, геномный майнинг и репортерные штаммы).

В настоящее время понимание молекулярного механизма действия антибиотиков играет решающую роль. Во-первых, даже соединения, не имеющие клинических перспектив, могут служить источником новых привлекательных мишеней для подавления роста резистентных бактерий. Более того, для разработки полусинтетических производных необходима подробная информация о механизмах действия и цитотоксичности. В случае биологически активных соединений даже малейшие структурные различия могут привести к существенным изменениям в биологической активности. Например, наши недавние исследования семейства антибиотиков тетраценомицина показали, что гидроксирование ядра может полностью предотвратить проникновение в клетку, а O4-метилирование – способность связываться с рибосомой. Наконец, природные соединения по-прежнему могут быть источником соединений с ценной биологической активностью. Недавно мы выделили новое семейство пептидных антибиотиков, названных гауземицинами, с высокой структурной новизной и оригинальным мембраноассоциированным механизмом антибактериальной активности.

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект №. 23-24-00409, <https://rscf.ru/project/23-24-00409/>.*

### MODERN TRENDS IN NATURAL ANTIBIOTIC DISCOVERY

**V.A. Alferova, T.V. Kravchenko, S.S. Terekhov, A.A. Baranova, A.P. Tyurin, V.A. Korshun**

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences*

The worldwide spread of resistant pathogens creates an urgent need for novel scaffolds with original modes of action. Nonetheless, both the discovery and the introduction of natural compounds into the clinic are hampered by a number of factors. From a scientific point of view, natural sources are still a very attractive source of active metabolites with valuable pharmacological properties. In the past few decades, the rate of discovery of novel antibiotics using the standard discovery platform, introduced by Selman Waksman at the beginning of the 20th century, has gradually reduced. Currently, there is a number of modern and emerging trends in the screening and identification of natural bioactive compounds. The methods in this multidisciplinary area can be divided into three groups: based on microbiology (e.g., *in situ* cultivation and microfluidics), chemistry (e.g., dereplication and MS-networking) and molecular biology (e.g., metagenomics and mechanism-revealing reporter strains).

Currently, the understanding of the molecular mode of action of antibiotics plays a crucial role. First of all, even compounds with no actual clinical perspectives can serve as a source of novel attractive targets for inhibiting the growth of resistant bacteria. Moreover, detailed information on the mechanisms of action and cytotoxicity is necessary for the development of semi-synthetic derivatives. In the case of bioactive compounds, even the slightest structural differences can bring dramatic changes to biological activity. For example, our recent studies on the tetracenomycin antibiotic family revealed that hydroxylation of the core can totally prevent cell entry, whether O4-methylation abolishes ribosome binding ability. Finally, natural compounds can still be the source of novel drugs with intriguing biological activity. Recently we isolated a novel family of peptide antibiotics, named gausemycins, with striking structural novelty and an original membrane-associated antibacterial activity mechanism.

*This work was supported by the Russian Science Foundation, project no. 23-24-00409, <https://rscf.ru/en/project/23-24-00409/>.*

## МЕХАНИЗМЫ ИЗМЕНЕНИЯ ВОСПРИИМЧИВОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ В СМЕШАННЫХ СООБЩЕСТВАХ

А.Р. Каюмов<sup>1</sup>, Е.Ю. Тризна<sup>1</sup>, А.В. Миронова<sup>1</sup>, М.С. Федорова<sup>1</sup>, С.А. Лисовская<sup>1,2</sup>, М.И. Богачев<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; <sup>2</sup>Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии, Казань;

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ», Санкт-Петербург

Большое количество инфекционных заболеваний человека и животных ассоциировано с образованием биопленок – моно- и многовидовых микробных консорциумов, погруженных в выделяемый ими высокомолекулярный матрикс, состоящий из белков, нуклеотидов и полисахаридов. В составе биопленки микроорганизмы защищены от иммунной системы хозяина и антимикробных препаратов, а также изменяется метаболический статус клеток за счет гипоксии, голодания, перехода в персистентное состояние, а также влиянию метаболитов одних бактерий на другие в смешанных сообществах. Это в свою очередь изменяет восприимчивость микроорганизмов к антимикробным препаратам и снижает эффективность лечения в клинических условиях.

В докладе приводятся данные по изменению 3D-структуры, биохимического состава и физико-химических свойств матрикса двувидовых биопленок и их проницаемости для антибиотиков по сравнению с биопленками монокультур. Обсуждаются механизмы этих изменений на основе данных транскриптомного анализа и количественной ОТ-ПЦР-РВ. Так, в биопленке *S. aureus-K. pneumoniae* увеличивается содержание бета-полисахаридов и снижается количество белков. В матриксе биопленки *S. aureus-P. aeruginosa* снижаются альфа-полисахариды и белки. Кроме того, в биопленках *S. aureus* с *P. aeruginosa* или *K. pneumoniae* подавляется транскрипция *ica*-оперона *S. aureus* и повышается транскрипция генов полисахаридов в *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*. При этом в двувидовых биопленках повышается проницаемость матрикса для фторхинолонов, и снижается для цефалоспоринов, бета-лактамов и аминогликозидов. Данный эффект сохраняется при внесении культуральной жидкости *S. aureus* к биопленкам клинических изолятов *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* и повышает чувствительность бактерий к антибиотикам, и изменяет паттерн экспрессии генов.

Знание эффективности различных групп антибиотиков в отношении различных смешанных инфекций и причины этих особенностей позволит скорректировать рекомендации по рациональному использованию различных групп антимикробных препаратов в зависимости от микробного состава инфекции и повысить эффективность ее терапии.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 24-14-00194, <https://rscf.ru/project/24-14-00194>.

## MECHANISMS OF CHANGES IN THE SUSCEPTIBILITY OF MICROORGANISMS TO ANTIMICROBIALS IN MIXED COMMUNITIES

A.R. Kayumov<sup>1</sup>, E.Yu. Trizna<sup>1</sup>, A.V. Mironova<sup>1</sup>, M.S. Fedorova<sup>1</sup>, S.A. Lisovskaya<sup>1,2</sup>, M.I. Bogachev<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Kazan Federal University, Kazan; <sup>2</sup>Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan; <sup>3</sup>St Petersburg State Electrotechnical University "LETI", St Petersburg

Infectious diseases of Human and animals are often associated with biofilms, microbial consortia embedded in the high-molecular matrix, secreted by bacteria themselves and consisting of proteins, nucleotides and polysaccharides. While in the biofilm, microorganisms are protected from the host's immune system and antimicrobials, the metabolic status of cells changes due to hypoxia, starvation, transition to a persistence, as well as the effect of metabolites of some or other bacteria in mixed communities. This, in turn, changes the bacterial susceptibility to antimicrobials and reduces the efficiency of treatment.

The report provides data on changes in the 3D structure, biochemical composition and physical and chemical properties of the matrix of dual-species biofilms and their permeability to antibiotics compared to monoculture ones. The mechanisms of these changes are discussed based on data from transcriptomic analysis and qRT-PCR. Thus, in the biofilm of *S. aureus-K. pneumoniae*, the content of beta-polysaccharides increases and the content of proteins decreases. Alpha-polysaccharides and proteins decrease in the matrix of *S. aureus-P. aeruginosa* biofilm. In addition, in biofilms of *S. aureus* with *P. aeruginosa* or *K. pneumoniae* the transcription of the *ica* operon in *S. aureus* becomes suppressed and the transcription of polysaccharide genes in *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* increases. At the same time, the permeability of the matrix for fluoroquinolones increases in two-species biofilms, and decreases for cephalosporins, beta-lactams and aminoglycosides. This effect retains when *S. aureus* culture liquid is added to biofilms of clinical isolates of *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* and bacterial susceptibility to antibiotics increases, as well as changes the pattern of gene expression are observed.

Thus, the understanding of the efficiency of different groups of antibiotics against various mixed infections and mechanisms of these changes would allow adjusting recommendations for the rational use of various groups of antimicrobials, depending on the microbial composition of the infection and increase the efficiency of the treatment.

This research was funded by Russian Science Foundation (project No. 24-14-00194), <https://rscf.ru/en/project/24-14-00194>.



## РОЛЬ ГЕНОМНЫХ ПЕРЕСТРОЕК В ФОРМИРОВАНИИ РЕЗИСТЕНТНОГО К АДБАХ ФЕНОТИПА *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Т.А. Савинова, Д.Н. Конанов, С.Н. Ковальчук, А.Л. Архипова, О.А. Райдару, Е.В. Корнеенко, Л.С. Федорова, Е.Н. Ильина

*НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва*

Алкилдиметилбензиламмоний хлорид (АДБАХ) – биоцид, широко используемый в медицине и в быту в качестве дезинфицирующего средства, генетические механизмы формирования микробной устойчивости к которому, однако, изучены слабо. Для выявления мишеней действия АДБАХ и особенностей формирования резистентности *in vitro* проведена серийная селекция штамма *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 в жидкой среде с возрастающими концентрациями дезинфектанта. В результате селекции получены резистентные мутанты, способные расти при концентрации АДБАХ, в 8 раз превышающей минимальную подавляющую концентрацию исходного штамма. Стабильность приобретенной резистентности подтверждена 10-кратным пассированием мутантов на среде без АДБАХ и на среде с субингибирующими концентрациями биоцида, после которых мутанты сохраняли устойчивый фенотип.

Полногеномное секвенирование мутантов выявило присутствие двух фрагментов хромосомной ДНК с повышенной копийностью, что свидетельствует о геномных перестройках. Границы мультиплицированных фрагментов были идентичны в двух независимых повторах, что позволяет сделать вывод о неслучайности наблюдаемого события, произошедшего, вероятно, под селективным давлением АДБАХ. Фрагмент длиной 27Кб показал почти 4X повышение копийности по сравнению с исходным штаммом, которое сохранялось после пассирования на среде без АДБАХ. Повышенная в 1,6X копийность фрагмента размером 126Кб снижалась до уровня исходного штамма после пассирования на среде без АДБАХ и сохранялась при пассировании на среде с дезинфектантом. Большой фрагмент (126Кб) полностью элиминировался из хромосомы и встраивался в одну из плазмид исходного штамма, поддерживая копийность за счет репликативных механизмов плазмиды. Этот фрагмент включает оперон *marRAB*, регулирующий эффлюксные помпы *AcrAB-TolC*, а также гены транскрипционных регуляторов, ассоциированных с устойчивостью к биоцидам. Фрагмент 27Кб содержит более 20 генов, таких как гены транскрипционных регуляторов *GlpR* и *GntR*, влияющих на синтез полисахаридов.

Наблюдаемая амплификация фрагментов генома *K. pneumoniae* может приводить к изменениям в экспрессии генов, вовлеченных в адаптацию бактерий к стрессовым условиям, таким как рост в присутствии биоцида, и соответственно влиять на изменение фенотипического профиля резистентности к АДБАХ.

## THE ROLE OF GENOMIC REARRANGEMENTS IN THE DEVELOPMENT OF THE ADBAC-RESISTANT PHENOTYPE IN *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

T.A. Savinova, D.N. Konanov, S.N. Kovalchuk, A.L. Arkhipova, O.A. Raidaru, E.V. Korneenko, L.S. Fedorova, E.N. Ilina

*Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow*

Alkyldimethylbenzylammonium chloride (ADBAC) is a biocide widely used as a disinfectant in both clinical and domestic settings, but the genetic mechanisms of microbial resistance to it are poorly understood. To identify the targets of ADBAC and the resistance mechanisms *in vitro*, *Klebsiella pneumoniae* strain ATCC 700603 was stepwise selected in liquid medium with increasing concentrations of the disinfectant. As a result, resistant mutants were obtained that were able to grow at ADBAC concentrations 8 times higher than the minimum inhibitory concentration of the parent strain. The stability of the acquired resistance was confirmed by 10 passages of the mutants on both free-ADBAC medium and medium containing subinhibitory concentrations of the biocide, after which the mutants remained resistant.

Whole genome sequencing of the mutants revealed the presence of two fragments of chromosomal DNA with increased copy number, indicating genomic rearrangements. The boundaries of the amplified fragments were identical in two independent replicates, suggesting that the observed event was not random and probably occurred under selective pressure of ADBAC. The 27Kb fragment showed an almost 4X increase in copy number compared to the parent strain, which was maintained after passages on free-ADBAC medium. The 1.6X increase in copy number of the 126Kb fragment decreased to the level of the parent strain after passages on free-ADBAC medium and was not reduced when passaged on medium containing disinfectant. The larger fragment (126Kb) was eliminated from the chromosome and inserted into a plasmid from the parent strain, maintaining its copy number by the plasmid's replication mechanisms. This fragment contains the *marRAB* operon, regulating *AcrAB-TolC* efflux pumps, and genes encoding transcriptional regulators associated with biocide resistance. The 27Kb fragment contains more than 20 genes, including genes of the transcriptional regulators *GlpR* and *GntR* involved in polysaccharide biosynthesis.

The amplification of chromosomal fragments of the *K. pneumoniae* genome may result in changes in the expression of genes involved in the microbial adaptation to stressful conditions, such as growth in the presence of biocides. Consequently, this may affect the ADBAC resistance profile.

## НОВЫЕ ПОДХОДЫ К РЕШЕНИЮ ПРОБЛЕМЫ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

**А.Б. Шеремет**

*НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва*

Разработка новых антибактериальных препаратов важнейшая задача современной медицины. Основываясь на многолетнем опыте решения проблемы антибиотикорезистентности можно выделить основные требования для разработки современных лекарств: новая мишень и новый механизм действия, новый класс соединений, эффективность в отношении резистентных бактерий, снижение скорости развития резистентности. Антибиотики по своей природе способствуют отбору устойчивых вариантов бактерий, поэтому наряду с поиском новых антибактериальных препаратов большое значение приобретает альтернативный подход по разработке препаратов с отличным от антибиотиков механизмом действия. В ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ был разработан, зарегистрирован и выпущен в гражданский оборот антибактериальный препарат, относящийся к категории препаратов с альтернативным антибиотикам механизмом действия. Препарат Фтортиазинон – инновационный антибактериальный препарат широкого спектра действия, для лечения и профилактики инфекций, вызванных антибиотикорезистентными *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Chlamydia* spp., *S. enterica*, в том числе критически приоритетных карбапенемрезистентных бактерий. По механизму действия Фтортиазинон специфически подавляет секрецию токсинов, подвижность, адгезию, образование биопленок. Мишенью Фтортиазинона является система секреции третьего типа и жгутик, играющие важную роль в патогенезе заболеваний.

Были проведены клинические исследования (КИ) безопасности и эффективности препарата Фтортиазинон в 15 клиниках в разных городах России. Показан благоприятный профиль переносимости при однократном и курсовом приеме. На 777 пациентах с осложненными инфекциями мочевыводящих путей показано статистически достоверное и клинически значимое превосходство терапии Фтортиазиноном над терапией цефалоспорином IV поколения Цефепимом. На основании механизма действия и полученных экспериментальных данных препарат Фтортиазинон может применяться как в составе комплексной терапии с антибиотиками, так и в режиме монотерапии. Дальнейшие КИ направлены на изучение эффективности Фтортиазинона для профилактики и лечения внутрибольничных инфекций и тяжелых хронических инфекций, для которых терапия антибиотиками малоэффективна в силу высокого процента антибиотикорезистентных штаммов.

## NEW APPROACHES TO THE PROBLEM OF ANTIBIOTIC RESISTANCE

**A.B. Sheremet**

*N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of Russia, Moscow*

Development of new antibacterial drugs is the most crucial task of modern medicine. Based on many years of experience in solving the problem of antibiotic resistance, it is possible to identify the main requirements for the development of modern drugs: a new target and a new mechanism of action, a new class of compounds, efficacy against resistant bacteria, and a decrease in the rate of resistance development. Antibiotics contribute the selection of resistant bacterial variants. Therefore, along with the search for new antibacterial drugs, an alternative approach to the development of drugs with a mechanism of action different from antibiotics should be found. The National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya of Russia has developed and registered an antibacterial drug, which mechanism of action is an alternative to antibiotics. Fluorothiazinone is an innovative broad-spectrum antibacterial drug for treatment and prevention of infections caused by antibiotic-resistant *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K.pneumoniae*, *E. coli*, *Chlamydia* spp., *S. enterica*, including critical priority carbapenem-resistant bacteria. Fluorothiazinone specifically suppresses the secretion of toxins, mobility, adhesion, and biofilm formation. The target of Fluorothiazinone is the type III secretion system and the flagellum, which play a major role in the pathogenesis of infectious diseases.

Clinical trials (CT) studying safety and efficacy of Fluorothiazinone were conducted in 15 hospitals in different cities of Russia. A favorable tolerance profile has been shown for a single dose and course administration. A clinically significant superiority of therapy with Fluorothiazinone over therapy with the IV generation cephalosporin antibiotic Cefepime has been shown in 777 patients with complicated urinary tract infections. Based on the mechanism of action and the experimental data obtained, Fluorothiazinone can be used both as part of combination therapy with antibiotics and in monotherapy. Further CT are aimed at studying the effectiveness of Fluorothiazinone for the prevention and treatment of nosocomial infections and severe chronic infections for which antibiotic therapy is ineffective due to the high percentage of antibiotic-resistant strains.

### ПРЕДСКАЗАНИЕ ХОЗЯИНА ВИРУСА НА ОСНОВАНИИ КОРОТКИХ К-МЕРОВ

**Ф.С. Перелыгин, Ю.А. Алешина, А.Н. Лукашев**

*Первый Московский государственный медицинский университет (Сеченовский университет); НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва*

Кодирующая последовательность вирусных геномов находится под влиянием множества ограничений в дополнение к непосредственно кодируемой белковой последовательности. Использование нуклеотидов, динуклеотидов и сиенонимических кодонов находится под давлением отбора со стороны клетки-хозяина. Вирусы должны адаптировать свой геномный профиль к хозяину, чтобы избежать распознавания сенсорами или акторами врожденного иммунитета, или должны блокировать такое распознавание другими способами, такими как специальные защитные белки. Эти особенности вирусных геномов создают теоретическую основу для математически обоснованного предположения о хозяине неизвестного вируса, например, обнаруженного в метавиrome. Ранее машинное обучение использовалось для прогнозирования хозяина вируса на основе k-меров с короткой последовательностью ( $k < 8$  для нуклеотидных последовательностей и  $k < 4$  для аминокислотных последовательностей). В нашей работе использовались четыре алгоритма машинного обучения на полногеномных наборах данных с перекрывающимися или неперекрывающимися таксонами вирусов в обучающих и тестовых выборках. Когда для обучения и тестирования использовались перекрывающиеся роды, почти все комбинации признаков и референсные методы (tBLASTx и Host Taxon Predictor) обеспечивали довольно хорошее предсказание хозяина со значениями  $F1 > 0,85$ . Когда для обучения и тестирования использовались неперекрывающиеся роды, показатели  $F1$  были ниже 0,75 и далее снижались примерно до 0,5 при использовании неперекрывающихся семейств вирусов, но все же были выше нейтрального значения показателя  $F1$  0,29–0,32. Хорошие результаты можно было получить при  $k=2$ , которые далее можно было немного улучшить, используя  $k=3$ , тогда как более длинные k-меры не превосходили короткие по качеству предсказания хозяев. При этом использованные нами модели были лучше, чем работающий сходным образом инструмент Host Taxon Predictor, а tBLASTx был практически непригоден для идентификации неизвестных родов вирусов. При прогнозировании хозяев коротких фрагментов последовательности (400 или 800 нт) использование фрагментов той же длины вместо полных геномов для обучения привело к умеренному улучшению качества прогнозирования, но также к намного более надежному прогнозированию.

### PREDICTING VIRUS HOST USING SHORT SEQUENCE K-MERS

**F.S. Perelygin, Y.A. Aleshina, A.N. Lukashev**

*First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia; Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow*

Coding sequence of virus genomes is a subject to many constraints in addition to the encoded protein sequence. Nucleotide, dinucleotide and codon usage are under various kinds of selection pressure from the host cell. Viruses have to adapt their genomic features to the host to avoid recognition by innate immunity sensors or actors, or should block such recognition by other means, such as specific safeguarding proteins. These features of virus genomes provide a theoretical basis for inferring a host of an unknown virus, for example, detected in a metavirome. Machine learning has been used previously to predict the host of a virus based on short sequence k-mers ( $k < 8$  for nucleotide and  $k < 4$  for amino acid sequences). Four machine learning algorithms were used here on full-genome datasets with overlapping or non-overlapping virus taxa in training and testing samples. When overlapping genera were used for training and testing, almost all feature combinations and reference methods (tBLASTx and Host Taxon Predictor) provided fairly good host prediction with  $F1$ -scores  $> 0.85$ . When non-overlapping genera were used for training and testing,  $F1$ -scores were below 0.75, and decreased further to about 0.5 when using non-overlapping virus families, but were still above the neutral  $F1$ -score value of 0.29 - 0.32. Good results could be obtained with  $k=2$ , which could be slightly improved by using  $k=3$ , while longer k-mers were not superior over short ones. Our approach was slightly better than a previously suggested tool Host Taxon Predictor, while tBLASTx was practically useless for identification of unknown virus genera. Using ensembles of machine learning models or combinations of genomic features did not allow improving the result. When predicting hosts of short sequence fragments (400 or 800 nt), using same-length fragments instead of full genomes for training produced moderate improvement of prediction quality ( $F1$  scores increase by about 0.05), but much more robust prediction (less variation between replicates). Therefore, universal host-dependent sequence features are a major data source for host taxon prediction.

**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ФИЛОГЕОГРАФИЧЕСКИЕ СВЯЗИ ПОТЕНЦИАЛЬНО ЗООНОЗНЫХ ВИРУСОВ СЕМЕЙСТВ ARENAVIRIDAE, CORONAVIRIDAE И ADENOVIRIDAE ИЗ РУКОКРЫЛЫХ И НАСЕКОМОЯДНЫХ ИЗ ЦЕНТРАЛЬНОЙ РОССИИ, ЗАПАДНОЙ ЕВРОПЫ И ВОСТОЧНОЙ АЗИИ**

**А.С. Сперанская**

*НИИ системной биологии и медицины, Москва*

Вирусы считаются наиболее изменчивым компонентом микробиомов. Вирусы диких животных изучаются с целью поиска оптимальных стратегий борьбы с зоонозными инфекциями. Летучие мыши - известные резервуары различных вирусов, в том числе зоонозных. Многие виды европейских летучих мышей ежегодно мигрируют на большие расстояния, что повышает вероятность распространения вирусов. По нашим данным, альфа- и бетакоронавирусы (Coronaviridae) и мастаденовирусы (Adenoviridae) от летучих мышей *Pipistrellus* и *Nyctalus*, отловленных в европейской России, генетически ближе к европейским вирусам. Ближайшими родственниками некоторых бетакоронавирусов от российских летучих мышей оказались вирусы из Италии, что подтверждает гипотезу о быстром распространении бетакоронавирусов по Европе, обусловленном миграцией животных. Но на евразийском пространстве, наблюдается территориальная кластеризация: вирусы из Европы образуют общую кладу и филогенетически отделены от вирусов из Восточной Азии. Ежи (*Erinaceus*), являются менее общеизвестными источниками вирусов, ведут одиночный, территориальный образ жизни, часто контактируют с людьми. Опубликованных данных, о вирусах из диких ежей, немного, но в последние годы интерес к ним растет. Давно известно, что ежи, как и рукокрылые, являются носителями коронавирусов, тогда как вирусы рода *Mammarenavirus* (Arenaviridae) были открыты в 2023. Данные, полученные в результате исследования виroma ежей, пойманных в разных регионах европейской части России, показали, что вирусы рода *Betacoronavirus* генетически ближе к европейским вирусам, но занимают промежуточное положение между вирусами из Европы и Восточной Азии. Варианты маммаренавирусов из России филогенетически объединяются с выявленными в европейских странах и территориально кластеризуются по странам, но достоверность формирования клад низкая. Очевидно, для диких животных, как и для человека, применимо понятие "нормального виroma" (постоянно встречающиеся вирусы). *Coronaviridae*, *Adenoviridae* и *Arenaviridae* представляют собой компонент нормального виroma летучих мышей и насекомоядных (ежей). По всей вероятности, скорость распространения вирусов по территории Европы является высокой, в том числе, среди не мигрирующих животных.

*Работа выполнена в рамках государственного задания No. 12203090069-4.*

**GENETIC FEATURES AND PHYLOGEOGRAPHIC RELATIONSHIPS OF POTENTIALLY ZOOONOTIC VIRUSES OF THE FAMILIES ARENAVIRIDAE, CORONAVIRIDAE AND ADENOVIRIDAE FROM BATS AND INSECTIVORES FROM CENTRAL RUSSIA, WESTERN EUROPE AND EASTERN ASIA**

**A.S. Speranskaya**

*Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow*

Viruses are considered to be the most variable component of microbiomes. Wildlife viromes are being studied to find optimal strategies to control zoonotic infections. Some animals, such as bats, are known reservoirs of various viruses, including zoonotic agents. Many species of European bats migrate long distances each year, increasing the likelihood of viruses spreading across Europe. Currently, our data show that alpha- and betacoronaviruses (Coronaviridae) and mastadenoviruses (Adenoviridae) from *Pipistrellus* and *Nyctalus* bats captured in European Russia are genetically closer to European viruses. The closest relatives of some betacoronaviruses from Russian bats were viruses from Italy, supporting the hypothesis of a rapid spread of betacoronaviruses across Europe due to animal migration. Overall, territorial clustering has been observed in the Eurasian space: the listed viruses from European bats form the common clade and are phylogenetically separated from viruses from East Asia. Other animals, such as hedgehogs (*Erinaceus*), are not commonly known sources of zoonotic viruses; they are solitary, non-migratory animals that often come into contact with humans. There is little published data on viruses from wild hedgehogs, but this has been increasing in recent years. It is known that hedgehogs, like bats, could be carriers of coronaviruses in the wild, and members of the genus *Mammarenavirus* (Arenaviridae) have recently been discovered in hedgehogs from western and eastern Europe (from Hungary and Italy). We studied betacoronaviruses from hedgehogs captured in European Russia and showed that they are genetically closer to European viruses, but occupy a clear intermediate position between viruses from Europe and East Asia. The identified variants of mammalian viruses from Russian animals (with one exception) belong to the European clade. We assume that for wild animals, as well as for humans, the concept of "normal virome" is applicable. The *Coronaviridae*, *Adenoviridae*, and *Arenaviridae* represent a component of the normal virome of bats and insectivores (hedgehogs), and the rate of distribution of potentially zoonotic viruses all over Europe could be high even in non-migratory animals.

*Supported by state project No. 12203090069-4.*

## АВТОМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТЕКСТОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ БАЗЫ ЗНАНИЙ О ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ВИРУСОВ И ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА

О.А. Тарасова, Н.Ю. Бизюкова, Р.Р. Такташов, Д.А. Карасев, Б.Н. Соболев, Н.С. Ионов, С.М. Иванов, А.В. Дмитриев, А.В. Рудик, Д.А. Филимонов, В.В. Поройков

НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

Разработка безопасных и эффективных противовирусных препаратов имеет существенное значение как в случаях быстрого распространения новых вирусных инфекций, так и для хорошо изученных вирусов, для которых существуют сложности в полной элиминации вируса, например, вследствие лекарственной устойчивости и при латентном течении инфекции. Огромное количество информации о взаимодействии вируса и хозяина и о потенциальных противовирусных химических соединениях содержится в базах данных и научных публикациях. Эта информация может быть использована для получения новых знаний о взаимодействии вирусов и организма человека, и о потенциальных противовирусных веществах. Целью работы является создание вычислительного подхода для извлечения знаний о взаимодействии вирусов и организма человека и о потенциальных противовирусных агентах на основе анализа текстов биомедицинской тематики и баз данных. Мы разработали подход для автоматического извлечения информации о взаимодействии вируса и организма человека и химических соединениях, который может быть использован для получения новых знаний о противовирусных средствах с оценкой их потенциальных побочных эффектов и токсичности, лекарственной устойчивости вируса и сопутствующих заболеваний для данной вирусной инфекции.

Разработанный подход включает несколько этапов: автоматический отбор релевантных публикаций, распознавание наименований биологических и химических объектов и извлечения взаимосвязей между ними. Распознавание химических и биологических именованных объектов производится с применением метода условных случайных полей и Наивного Байесовского алгоритма в сочетании с регулярными выражениями для идентификации аминокислотных замен и названий мРНК. Мы создали базу знаний о взаимодействии молекул ряда вирусов (вирусы гепатита В и С; гриппа А и В; SARS-CoV-2; вирус простого герпеса) с организмом человека и воздействии на эти молекулы соответствующих ингибиторов. Информация о молекулярных механизмах взаимодействия вирусов и организма человека будет полезна для разработки новых терапевтических стратегий лечения и предотвращения вирусных инфекций.

*Исследование выполнено при поддержке программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 124050800018-9).*

## KNOWLEDGE ABOUT VIRUS-HOST INTERACTIONS BASED ON BIOMEDICAL TEXT AND DATA MINING

О.А. Tarasova, N.Yu. Biziukova, R.R. Taktashov, D.A. Karasev, B.N. Sobolev, N.S. Ionov, S.M. Ivanov, A.V. Dmitriev, A.V. Rudik, D.A. Filimonov, V.V. Poroikov

*Institute of Biomedical Chemistry, Moscow*

The development of safe and effective antivirals is important both in cases of unexpectedly rapid spread of novel viral infections and for well-studied viruses where the problems of resistance and latency can complicate treatment. A large amount of information on virus-host interactions and potential antiviral chemical compounds is being published and deposited in databases. This information can be used to generate new knowledge about molecular mechanisms of viruses-host interactions and corresponding inhibitors of viruses. The aim of our study is to develop a computational approach for extracting knowledge about viruses and the host and potential antiviral agents based on biomedical text and data mining.

We developed an approach to automatically extract comprehensive information about virus-host interactions and chemical compounds, which can be used to gain new knowledge about antiviral agents with assessment of their potential side effects and toxicities, viral drug resistance and co-morbidities for a given viral infection. The developed approach includes several steps from automated selection of relevant publications, recognition of named entities and extraction of associations between them. The method for chemical and biological named entity recognition is based on the Conditional Random Fields and Naïve Bayesian approaches in combination with regular expressions to identify substitutions and miRNAs names. The approach was used to analyze data for hepatitis B and C viruses, SARS-CoV-2, influenza A and B, and herpes simplex virus. We created a freely available knowledgebase on the interaction of chemical compounds with viral proteins and their host targets. The developed approach allows for the identification of both well-studied and recently discovered novel interactions between a virus, a host and a chemical compound. Information on virus-host interactions is useful for a comprehensive understanding of viral infection mechanisms and the development of new therapeutic strategies.

*This study was supported by the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period 2021–2030 (project No. 124050800018-9).*

### РОЛЬ ЭПИТРАНСКРИПТОМНЫХ МОДИФИКАЦИЙ РНК В ПАТОГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА В+D

А.П. Костюшева, В.В. Володин, И.А. Гоптарь, Н.И. Пономарева, С.А. Брезгин, П.О. Богомолов, А.С. Житкевич, А.О. Буеверов, Е.О. Баюрова, И.В. Гордейчук, А.Н. Лукашев, В.П. Чуланов, Д.С. Костюшев

*Первый Московский государственный медицинский университет (Сеченовский университет), Москва*

Вирус гепатита В (ВГВ) может вызывать хронический гепатит В (ХГВ) – тяжелое заболевание, которое приводит к циррозу и раку печени. Вирус гепатита D (ВГД) – вирус-сателлит, может заражать гепатоциты человека только при условии наличия инфекции ВГВ. Присоединение ВГД резко ускоряет прогрессию заболевания печени. Пятилетняя выживаемость пациентов с ХГВ+D составляет менее 50%. Проблема ХГВ+D осложняется отсутствием эффективных методов лечения инфекции ВГВ и ВГД, а также высокими рисками онкотрансформации клеток с развитием рака печени (РП). ХГВ и ХГВ+D – основная причина РП в мире. При ранней постановке диагноза РП на ранней стадии (размер опухоли до 2 см) пятилетняя выживаемость пациентов составляет 80-90%, тогда как на более поздних стадиях снижается до 25%. Следовательно, оценка рисков и ранняя диагностика онкотрансформации печени – залог успешного лечения и снижения смертности пациентов с ХГВ+D.

В данной работе впервые использована технология MeRIP-Seq для высокопроизводительного анализа профилей м6А-метилирования РНК в биопсиях печени пациентов с ХГВ, ХГВ+D на разных стадиях болезни печени и в образцах печени, полученных в ходе трансплантации.

По результатам анализа впервые выявлены дифференциально представленные пики м6А у пациентов при прогрессии стадии фиброза по шкале METAVIR 1-4, а также ассоциированные с повышенными уровнями вирусной репликации. Влияние селективных по результатам биоинформатического анализа 95 сайтов м6А-метилирования РНК человека изучено в экспериментах *in vitro* на моделях клеток HepG2 и Huh7. Продемонстрировано воспроизводимое, 2-4-кратное увеличение онкогенности для 8 сайтов м6А-метилирования по тестам на клоногенность и миграцию. Определено влияние 7 сайтов м6А на индукцию интерферонового ответа в тестах с RFP репортером под контролем интерферон-респонсивного элемента и по анализу уровней мРНК методом ПЦР. Идентифицированы новые сайты м6А-метилирования в РНК ВГД и ВГВ, изучено их влияние на репликацию вирусов, стабильность и локализацию вирусных РНК.

В совокупности, в рамках исследования впервые были изучены профили м6А метилома в РНК человека и вирусов при ХГВ и ХГВ+D, что в перспективе можно использовать для создания панели прогностических м6А сайтов для оценки рисков и раннего выявления РП.

### THE ROLE OF EPITRANSCRIPTOMIC RNA MODIFICATIONS IN PATHOGENESIS OF CHRONIC HEPATITIS B+D

A.P. Kostyusheva, V.V. Volodin, I.A. Goptar, N.I. Ponomareva, S.A. Brezgin, P.O. Bogomolov, A.S. Zhitkevich, A.O. Buyeverov, E.O. Bayurova, I.V. Gordeychuk, A.N. Lukashev, V.P. Chulanov, D.S. Kostyushev

*Sechenov University, Moscow*

Hepatitis B virus (HBV) can cause chronic hepatitis B (CHB), a severe condition that leads to cirrhosis and liver cancer. Hepatitis D virus (HDV), a satellite virus, can infect human hepatocytes only in the presence of HBV infection. Co-infection with HDV accelerates the progression of liver disease. The five-year survival rate for patients with CHB+D is less than 50%. The issue of CHB+D is complicated by the lack of effective treatments for both HBV and HDV infections, as well as the high risks of oncotransformation of cells leading to the development of liver cancer (LC). CHB and CHB+D are major causes of LC worldwide. When LC is diagnosed at an early stage (tumor size less than 2 cm), the five-year survival rate for patients is 80-90%, whereas it drops to 25% at later stages. Therefore, risk assessment and early diagnosis of LC are crucial for successful treatment and reducing mortality in CHB+D patients.

In this study, for the first time, MeRIP-Seq technology was employed for analysis of m6A methylation profiles in RNA from liver biopsies of patients with CHB+D at different stages of liver disease, as well as in liver samples obtained during transplantation.

The analysis revealed differentially represented peaks of m6A in patients correlating with the progression of fibrosis stages according to the METAVIR scale (1-4), as well as those associated with elevated levels of viral replication. The effects of 95 selected m6A methylation sites, identified through bioinformatics analysis, were studied *in vitro* using HepG2 and Huh7 cell models. A 2-4 fold increase in oncogenicity was demonstrated for 8 m6A methylation sites by clonogenicity and migration assays. The influence of 7 m6A sites on the induction of the IFN response was assessed using RFP reporters controlled by IFN-responsive elements and through mRNA level analysis via PCR. New m6A methylation sites in RNA from HDV and HBV were identified, and their effects on viral replication, stability, and localization of viral RNAs were studied.

Overall, this research provides the first comprehensive examination of m6A methylome profiles in human RNA and viruses in the context of CHB+D, which may pave the way for developing a panel of prognostic m6A sites for risk assessment and early detection of liver cancer.

## АНАЛИЗ ГЕНОМНЫХ ДАННЫХ SARS-CoV-2 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СЕТЕЙ ГАПЛОТИПОВ

**А.Е. Самойлов, И.К. Чудинов, Е.Н. Ильина, А.Н. Лукашев**

*НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва*

С начала пандемии COVID-19 мировое научное сообщество столкнулось с проблемой анализа геномных последовательностей SARS-CoV-2. В данной работе мы использовали сети гаплотипов для визуализации и выявления завозов SARS-CoV-2 в Россию.

Из баз данных GISAID и VGARus были отобраны геномные последовательности SARS-CoV-2 длиной более 29 000 п.н. и с числом N-баз менее 1%, принадлежащие к линиям pangolin BA.1, BA.2 (исключая BA.2.75, XBB и более поздние линии) и Delta. Фильтрация проводилась с помощью Nextclade и скриптов на языке R. Графы сетей гаплотипов были построены и визуализированы с помощью скриптов на R.

Для каждой линии среди анализированных (BA.1, BA.2 и Delta) был получен список замен и делеций родительской линии, а также истинных реверсивных замен, связанных с определенными линиями pangolin. Геномы с псевдореверсиями (ошибками, приводящими к отсутствию мутаций) и геномы низкого качества были отфильтрованы. После фильтрации недостающие данные в неполных российских геномах восстанавливали с помощью ближайших геномов. Для создания сетей гаплотипов мы определили всех потенциальных предков и потомков анализируемых геномов из России и создали граф, ориентированный от корневого генома по направлению к возрастающему количеству замен. Полученный сетевой граф гаплотипов был триммирован путем выбора более вероятного предка (из нескольких вариантов выбирался ближайший предок, если вариантов оставалось несколько - выбирался обнаруженный в той же стране, что и потомок, если вариантов снова оставалось несколько - выбирался предок с самой ранней датой взятия образца). После триммирования мы выявили цепочки заражений SARS-CoV-2 в России (последовательность соединенных ребрами графа геномов, каждый из которых был найден в России) и направлений завоза SARS-CoV-2 в Россию (ближайших зарубежных предков цепочек заражений из России). Мы выявили 987, 543 и 486 цепочек заражений, и 349, 471 и 398 направлений завоза для линий Delta, BA.1 и BA.2 соответственно.

*Финансирование. Данная работа поддержана субсидией Роспотребнадзора № 141-02-2023-208.*

## ANALYSIS OF SARS-CoV-2 GENOMIC DATA USING HAPLOTYPE NETWORKS

**A.E. Samoilov, I.K. Chudinov, E.N. Ilina, A.N. Lukashov**

*Research Institute for System Biology and Medicine, Moscow, Russia*

Since the beginning of the COVID-19 pandemic, the global scientific community has faced the problem of analyzing SARS-CoV-2 genomic sequences. In this work, we applied haplotype networks to visualize and identify SARS-CoV-2 imports into Russia.

SARS-CoV-2 genomic sequences of more than 29,000 bp in length and with less than 1% N content belonging to pangolin Delta, BA.1, BA.2 lineages (excluding BA.2.75, XBB and lineages that appeared later) were selected from GISAID and VGARus databases. Filtering was performed using Nextclade and R scripts. Haplotype network graphs were constructed and visualized using R scripts.

For each lineage among those analyzed (BA.1, BA.2, and Delta), lists of parental lineage substitutions and deletions as well as true reversion substitutions associated with specific pangolin lines were obtained. Genomes with pseudoreversions (errors resulting in missing mutations) and low quality genomes were filtered out. After filtration, missing data in incomplete Russian genomes were reconstructed using nearby genomes. To create haplotype networks, we identified all potential ancestors and descendants of the analyzed genomes from Russia and created a graph oriented from the root genome towards the increasing number of substitutions. The resulting haplotype network graph was trimmed by selecting a more probable ancestor (the closest ancestor was selected from several variants, if several variants remained, the ancestor was selected from the same country as the descendant, if several variants remained again, the ancestor with the earliest sampling date was selected). After trimming, we identified chains of SARS-CoV-2 infections in Russia (a sequence of Russian genomes connected by edges of the graph) and directions of SARS-CoV-2 importation into Russia (the closest foreign ancestors of Russian chains of infections). We identified 987, 543, and 486 chains of infection and 349, 471, and 398 directions of importation for Delta, BA.1, and BA.2 lineages, respectively.

*Funding: The study is supported by the subsidy of the Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing No. 141-02-2023-208.*

#### МЕТАВИРОМНЫЙ АНАЛИЗ КЛЕЩЕЙ СЕВЕРО-ЗАПАДНОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ОКРУГА

А.С. Гладких, В.А. Сбарцалья, Е.О. Ключникова, М.Р. Попова, А.А. Шарова, Т.В. Арбузова, А.С. Грицева, В.Г. Дедков  
НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург

Изучение виромов клещей представляет большой интерес как с точки зрения экологии для понимания вирусного разнообразия, переносимого членистоногими, так и для оценки риска наличия новых неизвестных ранее патогенов с трансмиссивным механизмом передачи. Арбовирусные инфекции привлекают особое внимание во всем мире в связи с их широким распространением, многообразием и тяжестью клинического течения. Клещи как резервуар арбовирусов представляют значительную угрозу общественному здоровью из-за широты ареала и способности переносить широкий спектр патогенов.

В настоящем исследовании были проанализированы виromы клещей рода *Ixodes* (вид *I. persulcatus* и вид *I. ricinus*) и рода *Dermacentor* (вид *D. reticulatus*), основных переносчиков клещевого энцефалита и клещевого боррелиоза на территории Северо-Западного федерального округа (СЗФО). В исследование взят гомогенизированный материал 50 имаго клещей собранных в 2021–2023 гг. на территории СЗФО, а именно: г. Санкт-Петербург, Республика Карелия, Ленинградская и Псковская области. Выборка была основана на данных диагностики ОТ-ПЦР в режиме реального времени (набор реагентов для выявления РНК вируса клещевого энцефалита ВКЭ (ВКЭ), РеалБест РНК ВКЭ), разделенная в равном соотношении на группу РНК ВКЭ «-» и группу РНК ВКЭ «+». Для изучения метавиромов были подготовлены NGS библиотеки с последующим секвенированием на приборе MiSeq Illumina.

Анализ данных секвенирования в обеих группах выявил вирусные последовательности длиной 286–11000 п.н., которые были гомологичны 13 известным вирусам из базы данных NCBI (более 98% гомологии), принадлежащих к пяти семействам РНК-вирусов, а именно Flaviviridae, Chuviridae, Nairoviridae, Partitiviridae и Phenuiviridae. Кроме того, в составе клещевых гомогенатов помимо вируса клещевого энцефалита были обнаружены найровирусы, родственные с ассоциированными с лихорадками у жителей КНР. Эпидемиологический потенциал других найденных вирусов еще предстоит оценить. Более того, предстоит более подробно изучить филогеографию выявленных на территории СЗФО вирусов, их связь с ландшафтами и видами переносчиков.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-45-20005).*

#### METAVIROME ANALYSIS OF TICKS FROM THE NORTHWESTERN FEDERAL DISTRICT

A.S. Gladkikh, V.A. Sbarzaglia, E.O. Klyuchnikova, M.R. Popova, A.A. Sharova, T.V. Arbuzova, A.S. Gritseva, V.G. Dedkov  
St Petersburg Pasteur Institute, St Petersburg

The study of tick viromes is of great interest both from an ecological point of view to understand the viral diversity carried by arthropods and to assess the risk of new previously unknown pathogens with a vector-borne transmission mechanism. Arboviral infections have attracted particular attention worldwide due to their wide distribution, diversity and severity of clinical course. Ticks as a reservoir of arboviruses pose a significant threat to public health due to their wide areal and ability to transmit a wide spectrum of pathogens.

This study analyzed the viromes of ticks of the genus *Ixodes* (species *I. persulcatus* and species *I. ricinus*) and the genus *Dermacentor* (species *D. reticulatus*), the main vectors of tick-borne encephalitis and tick-borne borreliosis in the Northwestern Federal District (NWFD). Homogenized material of 50 adult ticks collected in 2021–2023 in the territory of the NWFD, namely St. Petersburg, the Republic of Karelia, Leningrad and Pskov regions, was taken for the study. The sample was based on real-time OT-PCR diagnostics (a set of reagents for detection of tick-borne encephalitis virus RNA, RealBest TBE RNA), divided equally into TBE RNA “-” group and TBE RNA “+” group. NGS libraries were prepared for the study of metaviromes, followed by sequencing on a MiSeq Illumina instrument.

Analysis of sequencing data in both groups revealed viral sequences of 286–11000 bp in length, which were similar to 13 known viruses from the NCBI database (more than 98% similarity) belonging to five RNA virus families, namely Flaviviridae, Chuviridae, Nairoviridae, Partitiviridae and Phenuiviridae. In addition to tick-borne encephalitis virus, nairoviruses related to fever-associated viruses in China residents were found in tick homogenates. The epidemiologic potential of the other viruses found remains to be evaluated. Moreover, the phylogeography of the viruses detected in the territory of the NWFD, their relationship to landscapes and vector species should be studied in more detail.

*The research was supported by RSF (project No. 24-45-20005).*



**ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННЫЙ АЛГОРИТМ ПОДБОРА БАКТЕРИОФАГОВ ПРОТИВ ESKAPE-ПАТОГЕНОВ – ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИСМП У ПАЦИЕНТОВ С ОГНЕСТРЕЛЬНЫМИ И ОЖГОВЫМИ РАНЕНИЯМИ**

**А.В. Алешкин, А.В. Алехнович, Н.Д. Долинер, Е.В. Тиванова, П.С. Маркевич, Е.С. Зубкова, И.А. Киселева, Э.Р. Мехтиев**  
*МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, Москва; ЦНИИ эпидемиологии, Москва; НМИЦ ВМТ им. А.А. Вишневого, Красногорск; Главный военный клинический госпиталь им. Н.Н. Бурденко, Москва*

Среди пациентов хирургического профиля, подверженных высокому риску развития ИСМП стоит особо выделить пациентов с огнестрельными и ожоговыми ранениями, полученными в ходе военных действий, в частности в СВО. Роспотребнадзором инициировано межведомственное взаимодействие с ЛПУ Министерства обороны, в рамках которого ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского разработан алгоритм персонализированного подбора бактериофагов, активных в отношении ESKAPE-патогенов - возбудителей ИСМП у пациентов с огнестрельными и ожоговыми ранениями. Основными элементами индивидуализированного подхода к фаготерапии ИСМП являются: определение чувствительности выделенных от больного бактерий-мишеней к фагам с подбором лечебного титра препарата, оценка уровня нейтрализующих IgG-антител в сыворотке пациента к выбранным для терапии фагам, выбор (с учетом локализации инфекционного процесса и фармакокинетических свойств отобранных для терапии фагов) пути введения и соответствующей ему лекарственной формы. В результате индивидуализированного подбора и последующего применения бактериофагов у данного контингента пациентов удалось добиться санации инфицированного поли- и панрезистентными возбудителями локуса в 81% случаев, что способствовало более благоприятному клиническому исходу у 2/3 больных.

**PERSONALIZED SELECTION ALGORITHM OF PHAGES AGAINST ESKAPE-PATHOGENS, CAUSATIVE AGENTS OF HAI, IN PATIENTS WITH GUNSHOT AND BURN WOUNDS**

**A.V. Aleshkin, A.V. Alekhnovich, N.D. Doliner, E.V. Tivanova, P.S. Markevich, E.S. Zubkova, I.A. Kiseleva, E.R. Mekhtiyev**  
*G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow; Central Research Institute of Epidemiology, Moscow; A.A. Vishnevsky Central Military Clinical Hospital, Krasnogorsk; N.N. Burdenko Main Military Clinical Hospital, Moscow*

Among surgical patients at high risk of developing HAI, it is worth highlighting patients with gunshot and burn wounds received during military operations, in particular in the SMO. Rosпотребнадзор initiated interdepartmental cooperation with the hospitals of the Ministry of Defense, within the framework of which the G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology developed the personalized selection algorithm of phages active against ESKAPE pathogens, causative agents of HAI, in patients with gunshot and burn wounds. The main elements of the individualized approach to phage therapy of HAI are determining the sensitivity of target bacteria isolated from the patient to phages with the selection of a therapeutic titer of the drug, assessing the level of neutralizing IgG-antibodies in the patient's serum to the phages selected for therapy, choosing (taking into account the localization of the infectious process and the pharmacokinetic properties of the phages selected for the therapy) the route of administration and the corresponding dosage form. As a result of individualized selection and subsequent use of bacteriophages in this group of patients we have seen sanitation of the locus infected by poly- and panresistant pathogens in 81% of cases, which contributed to a more favorable clinical outcome in 2/3 of patients.

## ПЛАЗМИДНО-ЛОКАЛИЗОВАННЫМИ ДЕТЕРМИНАНТЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *K. PNEUMONIAE*

**В.В. Шаповалова, П.С. Чулкова, В.А. Агеевец, С.В. Сидоренко**

ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России

*K. pneumoniae* стабильно занимает одно из ведущих мест среди патогенов и вызывает широкий спектр внебольничных и госпитальных инфекций. Недавние сообщения о конвергентных штаммах, несущих как гены вирулентности, так и гены устойчивости к антибиотикам, вызывают обеспокоенность общественного здравоохранения. Среди известных механизмов формирования изолятов с конвергентным патотипом наиболее опасным следует признать возникновение гибридных плазмид.

В работе проведен анализ плазмидома 53 клинических изолятов (*K. pneumoniae* и *E. coli*), устойчивых к карбапенемам и/или продуцирующих карбапенемазы. Данная выборка охватывает 21 стационар среди 9 городов России за 6 лет.

Выявлены кластеры потенциально гибридных плазмид, в которых было найдено наибольшее количество последовательно-стей с карбапенемазами и факторами вирулентности. Сравнительный анализ потенциально гибридных плазмид из данного исследования, с плазмидами из Genbak выявил 4 кластера, наибольший из которых почти полностью состоял из плазмид, выделенных в Китае. Большинство плазмид данного кластера имели репликон *repB\_kleb\_vir*, кодировали несколько факторов вирулентности, включая аэробактин, без генов антибиотикорезистентности и не являлись конъюгативными. Только 5 плазмид из России были отнесены к этому кластеру, подразумевая, что данная линия не является широко распространенной на территории РФ. Три других кластера почти полностью состояли из плазмид, выделенных в России. Большинство плазмид имели несколько репликонов, наиболее распространенными являлись *IncHI1B(pNDM-MAR)* и *IncFIB(pNDM-Mar)*. Плазмиды были конъюгативными и несли различные гены карбапенемаз. В выборке обнаружены плазмиды, сходные по структуре с гибридными, но не содержащие генов резистентности и вирулентности. Указанные плазмиды можно рассматривать в качестве исходной или промежуточной ступени эволюции в направлении формирования конвергентного патотипа. Структура потенциально конвергентных плазмид даёт основание считать гомологичную рекомбинацию, интеграцию или делецию фрагмента, кодирующего вирулентность и/или резистентность возможными механизмами формирования гибридных плазмид.

Наше исследование демонстрирует, что распространение гибридных плазмид или их предшественников требует тщательного мониторинга полного плазмидного состава патогенов.

## PLASMID-BORN VIRULENCE DETERMINANTS OF *K. PNEUMONIAE* CLINICAL ISOLATES

**V.V. Shapovalova, P.S. Chulkova, V.A. Ageevets, S.V. Sidorenko**

Centre for Strategic Planning, Federal Medical and Biological Agency, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, St Petersburg

*Klebsiella pneumoniae* is consistently ranked among the most common pathogens, which causes a wide range of community- and hospital-acquired infections. Recent reports of convergent strains carrying both virulence and antimicrobial resistance genes raise concerns for public health. Among the known mechanisms for the formation of convergent isolates the emergence of hybrid plasmids is recognized as the most dangerous.

This study analyzed the plasmidome of 53 clinical isolates (*K. pneumoniae* and *E. coli*) resistant to carbapenems and/or producing carbapenemases. The isolates were sampled across 21 hospitals among 9 cities across Russia collected over a 6-year period.

Clustering of the plasmids from the studied samples was performed. Clusters of potentially hybrid plasmids were identified in which the largest number of sequences with carbapenemases and virulence factors were found. A comparative analysis of the potentially hybrid plasmids from this study with plasmids from Genbak was conducted. The analysis identified 4 clusters, the largest of which was almost entirely composed of plasmids isolated in China. Most plasmids in this cluster had the *repB\_kleb\_vir* replicon, encoded several virulence factors, including aerobactin, lacked antibiotic resistance genes, and were non-conjugative. Only 5 plasmids from Russia were classified into this cluster, implying that this lineage is not widespread in Russian. The other 3 clusters were almost entirely composed of plasmids isolated in Russia. Most plasmids had multiple replicons, where the most common were *IncHI1B(pNDM-MAR)* and *IncFIB(pNDM-Mar)*. The plasmids were conjugative and carried various carbapenemase genes. The sample revealed plasmids structurally similar to hybrid ones but not containing resistance and virulence genes. These plasmids can be considered as an initial or intermediate stage in the evolution toward the formation of a convergent pathotype. The structure of potentially convergent plasmids suggests that homologous recombination, integration, or deletion of fragments encoding virulence and/or resistance may be possible mechanisms for hybrid plasmids formation.

Our study demonstrates that the spread of hybrid plasmids or their predecessors requires careful monitoring of the complete pathogens' mobilome.

## ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ОТВЕТ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* НА КОМБИНИРОВАННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ЛИНЕЗОЛИДА И ЛИТИЧЕСКОГО БАКТЕРИОФАГА СЕМЕЙСТВА HERELLEVIIRIDAE

Н.К. Абдраймова, Е.А. Шитиков, Д.А. Беспятых, К.М. Климина, М.А. Корниенко

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

Комбинируемое использование литических бактериофагов с антибиотиками в субингибирующих концентрациях в настоящее время рассматривается как один из вариантов для повышения эффективности терапии инфекционных заболеваний и предотвращения побочных эффектов.

В настоящей работе методами системного анализа проведено исследование комбинированного воздействия субингибирующих концентраций бактериофага vB\_SauM-515A1 (сем. Herelleviridae), и препарата первой линии против метициллин-устойчивых штаммов *S. aureus* (MRSA) линезолида на штамм SA0413Rev. Клинический штамм продемонстрировал чувствительность к фагу и линезолиду. Оценка эффективности комбинации фага (0,1; 0,01; 0,001 MOI, от англ. multiplicity of infection) и линезолида (2; 1; 0,5 мкг/мл) проводилась посредством анализа кривых роста зараженных клеток. Для РНК-секвенирования клеток, подвергшихся воздействию фага (10 MOI) и антибиотика (1 мкг/мл) совместно или по отдельности, отбирались пробы в точках 5, 20, 30 и 50 минут. Секвенирование проводилось на платформе Illumina.

Сочетание антибиотика и фага демонстрировало повышенный антибактериальный эффект, в сравнении с отдельным использованием агентов. По данным РНК-секвенирования штамма под действием двух агентов было выявлено 839 дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) по сравнению с неинфицированным контролем ( $FDR \leq 0,05$ ;  $FC \geq 2$ ). Количество ДЭГ для культур, обработанных только антибиотиком или только бактериофагом, было ниже – 651 и 681 соответственно. Функциональный анализ ДЭГ выявил ряд категорий, связанных с жизненно важными клеточными процессами. Транскрипционный ответ бактерии на комбинацию двух агентов характеризовался наличием как уникальных категорий, отличных от случаев индивидуального воздействия агентов, так и общих. Уникальные категории включали себя процессы метаболизма лактозы и декарбоксилирование глицина.

Таким образом, комбинация субингибирующих концентраций линезолида и бактериофага vB\_SauM-515A1 наиболее эффективно ингибирует бактериальный рост. Транскрипционный ответ штамма *S. aureus* SA413 в ходе совместного воздействия фага и антибиотика характеризуется наличием уникальных функциональных категорий.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-00443, <https://rscf.ru/project/22-15-00443/>.*

## TRANSCRIPTIONAL RESPONSE OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* TO COMBINED ADMINISTRATION OF LINEZOLID AND LYTIC BACTERIOPHAGE OF THE HERELLEVIIRIDAE FAMILY

N. Abdraimova, E. Shitikov, D. Bespiatykh, K. Klimina, M. Kornienko

Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency, Moscow

Combined use of lytic bacteriophages with antibiotics in subinhibitory concentrations is currently considered as one of the options for improving the effectiveness of therapy of infectious diseases and preventing side effects.

In the present work, the combined effect of subinhibitory concentrations of bacteriophage vB\_SauM-515A1 (Herelleviridae family) and the first-line drug against methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains linezolid on strain SA0413Rev was investigated by the methods of system analysis. The clinical strain demonstrated sensitivity to phage and linezolid. The efficacy of the combination of phage (0.1; 0.01; 0.001 MOI, from the multiplicity of infection) and linezolid (2; 1; 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was evaluated by analyzing the growth curves of infected cells. For RNA sequencing of cells exposed to phage (10 MOI) and antibiotic (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) together or separately, samples were collected at 5, 20, 30, and 50 min. Sequencing was performed on the Illumina platform.

The combination of antibiotic and phage showed an increased antibacterial effect compared to the use of the agents alone. RNA sequencing of the strain under the influence of the two agents revealed 839 differentially expressed genes (DEGs) compared to the uninfected control ( $FDR \leq 0,05$ ;  $FC \geq 2$ ). The number of DEGs for cultures treated with antibiotic only or bacteriophage only was lower, 651 and 681, respectively. Functional analysis of DEGs revealed a number of categories related to vital cellular processes. The bacterial transcriptional response to the combination of the two agents was characterized by the presence of both unique categories, distinct from the cases of individual agent exposure, and general categories. The unique categories included the processes of lactose metabolism and glycine decarboxylation.

Thus, the combination of sub-inhibitory concentrations of linezolid and bacteriophage vB\_SauM-515A1 most effectively inhibited bacterial growth. The transcriptional response of *S. aureus* strain SA413 during joint exposure to phage and antibiotic is characterized by the presence of unique functional categories.

*The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 22-15-00443, <https://rscf.ru/project/22-15-00443/>.*

## ЭВОЛЮЦИЯ ПАТОГЕННОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ: СОВРЕМЕННЫЕ ГЕНОМНЫЕ ДАННЫЕ

А.Н. Балыкова, Г.А. Ерошенко, В.В. Кутырев

Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов

Возбудитель чумы, бактерия *Yersinia pestis* является природной моделью для выяснения молекулярных основ быстрого формирования высокой вирулентности. Эволюционным предшественником *Y. pestis* является энтеропатогенная бактерия и возбудитель псевдотуберкулеза *Yersinia pseudotuberculosis*. Геном чумного микроба претерпевал ряд изменений: приобрел две плазмиды патогенности – pFra и pPst и около 32 новых генов, потерял более 460 функциональных генов, что в конечном итоге привело к неминусовой дивергенции этих видов 6-7 тысяч лет назад.

Было установлено, что мутация в сайте I259T гена *pla*, приобретение гена *ymt* и инактивация *ureD*, *rcsA*, *flhD*, *pde2* и *pde3* внесли решающий вклад в выработку механизма трансмиссии чумы блохами, что обусловило распространение и укоренение возбудителя в различных ландшафтно-географических условиях. V.V. Kutyrev et al. (2018) создали современную классификацию возбудителя чумы с выделением 7 подвидов (основной и 6 неосновных), отличающихся по вирулентности и эпидемической значимости. Причины высокой и универсальной вирулентности основного подвида в сравнении с избирательной вирулентностью неосновных подвида (вирулентны для мелких грызунов и зайцеобразных) до сих пор не установлены. Ввиду того, что вирулентность возбудителя чумы является полидетерминированной, а экспрессия генов факторов патогенности температурозависимой, то решение этой проблемы невозможно без использования мультидисциплинарных подходов. При проведении мультиомиксных исследований Ansong et al., (2013) установлены более высокие уровни экспрессии генов и белков основных факторов патогенности у возбудителя чумы по сравнению с предшественником *Y. pseudotuberculosis* при различных температурах. Получены данные по протеому (Chromy et al., 2005) и секретому (Cao et al., 2021), которые показали, что почти все известные гены вирулентности *Y. pestis* по-разному регулировались при множественных воздействиях окружающей среды. Детального выяснения различий в вирулентности между основным и неосновными подвидами *Y. pestis* на основе мультиомиксных технологий не проводилось. Не исключено, что именно системный подход позволит расшифровать молекулярные механизмы формирования высокой вирулентности смертельного патогена *Y. pestis*.

## EVOLUTION OF PATHOGENICITY OF THE PLAGUE PATHOGEN: MODERN GENOMIC DATA

A.N. Balykova, G.A. Eroshenko, V.V. Kutyrev

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" of Rosпотребнадзор, Saratov

The plague pathogen, *Yersinia pestis*, is a natural model for identifying the molecular basis for the rapid formation of high virulence. The evolutionary precursor of *Y. pestis* is an enteropathogenic bacterium and the causative agent of pseudotuberculosis, *Yersinia pseudotuberculosis*. *Y. pestis* genome underwent a number of changes: acquired two pathogenicity plasmids - pFra and pPst and about 32 new genes, lost more than 460 functional genes, which eventually led to the inevitable divergence of these species 6-7 thousand years ago.

Mutation in the I259T site of the *pla* gene, *ymt* gene acquisition, and inactivation of *ureD*, *rcsA*, *flhD*, *pde2*, and *pde3* were found to contribute decisively to the development of the plague transmission mechanism by fleas, which caused the spread and establishment of the pathogen in different landscape and geographical conditions. V.V. Kutyrev et al. (2018) developed a modern classification of the plague pathogen with the subdivision of 7 subspecies (the main and 6 non-main subspecies), differing in virulence and epidemic significance. The reasons for the high and universal virulence of the main subspecies compared to the selective virulence of the non-main subspecies (virulent for small rodents and lagomorphs) are still unknown. Since the virulence of the plague pathogen is polydeterministic and the expression of pathogenicity genes is temperature-dependent, it is impossible to solve this problem without using multidisciplinary approaches. In multi-omics studies, Ansong et al. (2013) found higher levels of gene and protein expression of the main pathogenicity factors at different temperatures in the plague pathogen compared to *Y. pseudotuberculosis*. Evidence from the proteome (Chromy et al., 2005) and secretome (Cao et al., 2021) showed that almost all known virulence genes of *Y. pestis* are differently regulated under various environmental conditions. Detailed elucidation of virulence differences between the main and non-main subspecies of *Y. pestis* on the basis of multi-omics technologies has not been carried out. Probably, the systematic approach will allow us to decipher the molecular mechanisms of formation of high virulence of the lethal pathogen *Y. pestis*.

## ПЕРСИСТЕНЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ В МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВАХ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ

Е.Г. Оглодин, Г.А. Ерошенко, В.В. Кутырев

*Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов*

Природные очаги чумы расположены в различных ландшафтно-климатических зонах. Адаптация к выживанию в разных условиях окружающей среды в совокупности с трансмиссивным типом передачи по цепи грызун-блоха-грызун не может объяснить длительные межэпизоотические периоды в природных очагах. В такие периоды отсутствуют зараженные грызуны и блохи, но возбудитель чумы сохраняется в не установленном природном резервуаре. Наличие длительных межэпизоотических периодов объясняется с помощью разработанной гипотезы вертикальной трансмиссии, предусматривающая ассоциацию и сохранение *Yersinia pestis* в экосистеме почв очагов. С наступлением благоприятных условий происходит вынос *Y. pestis* в наземную экосистему, где распространение инфекции происходит по трансмиссивному пути. Поскольку *Y. pestis* длительное время существует в тесном контакте с почвенным микробиомом, возможна адаптация к выживанию в различных ассоциациях с членами почвенного микробного сообщества. В качестве резервуаров рассматриваются различные ассоциации с простейшими, биопленки на кутикуле нематод и в пищеварительном тракте блох. В свою очередь, ферменты почвенного микробного сообщества могут влиять на активацию резервуаров и выход возбудителя чумы из ассоциации с простейшими. Биопленка *Y. pestis* образуется при оптимальной влажности и температуре, что в совокупности с наличием переносчиков и носителей, может быть причиной переноса возбудителя чумы из почвенного в наземный биоценоз.

Кроме того, проведенные исследования по выживанию возбудителя чумы в условиях нор грызунов показывают возможность длительного сохранения *Y. pestis* в *A. castellanii* в модельной системе, а также активацию резервуаров и образование смешанных биопленок. Определена генетически детерминированная возможность утилизации N-ацетилглюкозамина и это позволяет предположить возможность использования этого матрикса биопленок для энергетического обмена возбудителя чумы в составе биопленок.

Полученные данные могут быть реализованы на практике для определения и создания диагностических критериев контроля почвенных популяций *Y. pestis* с использованием геномных и постгеномных технологий.

## PERSISTENCE OF THE PLAGUE PATHOGEN IN MICROBIAL COMMUNITIES OF NATURAL FOCI

E.G. Oglodin, G.A. Eroshenko, V.V. Kutyrev

*Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of Rospotrebnadzor, Saratov*

Natural foci of plague are located in different landscape and climatic zones. Adaptation to survival in different environmental conditions together with the vector-borne type of transmission through the rodent-flea-rodent chain cannot explain the long inter-epizootic periods in natural foci. During such periods, infected rodents and fleas are absent, but the plague pathogen persists in an unidentified natural reservoir. The existence of prolonged inter-epizootic periods is explained by the developed hypothesis of vertical transmission, which specifies the association and preservation of *Yersinia pestis* in the soil ecosystem of foci. With the onset of favorable conditions, *Y. pestis* is transferred to the terrestrial ecosystem, where the infection spreads by vector-borne pathway. Since *Y. pestis* has been in close contact with the soil microcosm for a long time, it may be adapted to survive in various associations with members of the soil microbial community. Various associations with protozoa, biofilms on the cuticle of nematodes and in the digestive tract of fleas are considered as reservoirs. In turn, enzymes of the soil microbial community can influence the activation of reservoirs and the release of the plague pathogen from association with protozoa. The biofilm of *Y. pestis* is formed at optimal humidity and temperature, which, together with the presence of vectors and carriers, may be the reason for the transfer of the plague pathogen from soil to terrestrial biocenosis.

In addition, studies on the survival of the plague pathogen in rodent burrows show the possibility of long-term persistence of *Y. pestis* in *A. castellanii* in the model system, as well as the activation of reservoirs and formation of mixed biofilms *Y. pestis* in *A. castellanii* in a model system, as well as activation of reservoirs and formation of mixed biofilms. The genetically determined possibility of utilization of N-acetylglucosamine was identified thus suggesting this biofilm matrix to be used for energy metabolism of the plague pathogen in biofilms.

The data obtained can be put into practice to determine and create diagnostic criteria for the control of soil populations of *Y. pestis* using genomic and post-genomic technologies.

## ИЗУЧЕНИЕ МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *ENTEROCOCCUS FAECIUM* ИЗ РАЗЛИЧНЫХ СТАЦИОНАРОВ РОССИИ С ПОМОЩЬЮ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

А.А. Славохотова, А.А. Шеленков, Ю.В. Михайлова, В.Г. Акимкин

ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

*Enterococcus faecium* является комменсальной грамположительной бактерией, обитающей в желудочно-кишечном тракте человека и в окружающей среде. Однако, на сегодняшний день данные микроорганизмы относят к оппортунистическим патогенам, причем большое число выделяемых клинических изолятов обладают множественной устойчивостью к антибиотикам, что представляет особую опасность для пациентов, пребывающих в стационарах длительное время и имеющих сопутствующие заболевания. Благодаря высокой пластичности генома, изоляты *E. faecium* могут приобретать различные гены устойчивости к антибиотикам, включая гликопептидные препараты. К последним относится ванкомицин, воздействующий на пептидогликан клеточных стенок бактерий, и являвшийся основным антибиотиком, применяемым при лечении инфекций, вызванных энтерококками.

В данной работе был проведен фенотипический анализ резистентности и полногеномное секвенирование 8 мультирезистентных изолятов *E. faecium*, выделенных от различных пациентов, пребывающих в стационарах, расположенных в разных регионах России. При этом 6 обнаруженных изолятов относились к глобальному клону GC78, известному своей способностью к быстрому приобретению резистентности и распространению в клинических условиях, а остальные два – к сиквенс-типам ST117 и ST552, соответственно. Все изоляты обладали устойчивостью к ампициллину и ванкомицину, большинство из них были также были устойчивы к некоторым аминогликозидам и фторхинолонам, и три изолята – к имипенему, при этом все изоляты были чувствительны к линезолиду и тигециклину. В результате биоинформатического анализа последовательностей геномов были выявлены гены, определяющие устойчивость к антибиотикам и вирулентность изолятов. Оказалось, что большинство обнаруженных генов резистентности расположено в плазмидах, однако устойчивость к ампициллину и фторхинолонам определялась известными мутациями в генах *pbp5*, *gyrA*, *parC*, расположенных на бактериальной хромосоме.

Данная работа показывает, что сочетание эпидемиологического анализа и полногеномного секвенирования способствует лучшему пониманию причин распространения конкретного клона и детерминант резистентности и предоставляет необходимую информацию для осуществления мониторинга мультирезистентных *E. faecium* в условиях стационаров.

## INVESTIGATION OF MULTIDRUG-RESISTANT CLINICAL ISOLATES OF *ENTEROCOCCUS FAECIUM* FROM VARIOUS HOSPITALS IN RUSSIA USING WHOLE-GENOME SEQUENCING

A.A. Slavokhotova, A.A. Shelonkov, Yu.V. Mikhailova, V.G. Akimkin

Central Research Institute of Epidemiology, Rospotrebnadzor, Moscow

*Enterococcus faecium* is a commensal gram-positive bacterium that inhabits the human gastrointestinal tract and the environment. However, today these microorganisms are considered opportunistic pathogens, and a large number of clinical isolates possess multiple resistance to antibiotics, which is especially dangerous for patients who stay in hospitals for a long time and have concomitant diseases. Due to the high plasticity of the genome, *E. faecium* isolates can acquire various genes providing resistance to antibiotics, including glycopeptide drugs. The latter include vancomycin, which acts on the peptide glycan of bacterial cell walls and represents the main antibiotic used to treat infections caused by enterococci.

In this work, a phenotypic analysis of resistance and whole-genome sequencing of 8 multidrug-resistant *E. faecium* isolates from various patients in hospitals located in different regions of Russia were performed. In this case, 6 detected isolates belonged to the global clone GC78, known for its ability to quickly acquire resistance and spread in clinical settings, and the remaining two belonged to sequence types ST117 and ST552, respectively. All isolates were resistant to ampicillin and vancomycin, most of them were also resistant to some aminoglycosides and fluoroquinolones, and three isolates were resistant to imipenem, while all isolates were sensitive to linezolid and tigecycline. Bioinformatics analysis of genome sequences allowed revealing the genes conferring antibiotic resistance and virulence of the isolates. Most of the detected resistance genes were located on plasmids, but resistance to ampicillin and fluoroquinolones was determined by known mutations in the *pbp5*, *gyrA*, and *parC* genes located on the bacterial chromosome.

This work demonstrates that the combination of epidemiological analysis and whole genome sequencing contributes to a better understanding the mechanisms of particular clone and resistance determinant spreading and provides the necessary information for multidrug-resistant *E. faecium* monitoring in hospital settings.

## САТЕЛЛИТНЫЕ АНАЭРОБЫ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО ОЧАГА: МЕТАГЕНОМИКА И НЕКОТОРЫЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ФЕНОМЕНЫ

О.Б. Огарков<sup>1</sup>, Е.А. Орлова<sup>1</sup>, В.В. Синьков<sup>1</sup>, И.Г. Кондратов<sup>1</sup>, Я.Ш. Шварц<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт эпидемиологии и микробиологии, Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск;

<sup>2</sup>Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза, Новосибирск

Казеозный некроз в центре является отличительным признаком этой патологии. В 1955 г. Жорж Канетти предложил 4 возможных механизма, лежащих в основе изменений казеозного туберкулезного очага. Проводимые нами исследования, как и работы других авторов исключают возможность активного размножения *M. tuberculosis* в анаэробных условиях туберкулезной гранулемы. Можно утверждать, что при формировании гипоксического центра туберкулезного очага в анаэробных условиях возможность для размножения имеет только ограниченное число видов бактерий. Общим свойством этих микроорганизмов является возможность утилизации липидов казеума в анаэробных условиях. Можно отметить, что в столь специфических условиях основным свойством формирующегося полимикробного сообщества является ограниченное видовое разнообразие и отсутствие необходимости формирования макроскопических биопленок.

Проведенные нами метагеномные исследования казеума из ТБ очагов приблизительно в 70% случаев можно отнести к классическим казеомам, с преобладанием семейства *Mycobacteriaceae*. В остальных случаях наблюдается преобладанием полимикробного сообщества, заменившего или дополнившего исходную микобактериальную микрофлору казеума. Метаболомика штаммов стафилококков и коринебактерий, выделенных нами из казеума туберкулем, позволяет предполагать, что внутри полимикробного сообщества казеума формируется патологический консорциум, способствующий усвоению липидного субстрата. Мы также предполагаем, что внутри этого патологического сообщества может возникать явление анаэробного дыхания микроорганизмов с участием органическими субстратов в качестве конечного акцептора электронов. Для выявления влияния спутниковых анаэробов на иммунологические процессы при образовании казеом было исследовано влияние экстрактов культур бактерий *Corynebacterium kefrresidentii* и *Staphylococcus epidermidis*, выделенных из туберкулезных очагов на формирование гранулем и рост микобактерий в модели *M. tuberculosis*-индуцированного гранулемогенеза *in vitro*. Показано, что экстракты исследуемых микроорганизмов приводят к более эффективному рекрутированию иммунокомпетентных клеток в гранулемы в результате чего происходит значимое укрупнение этих образований и увеличение их количества.

## SATELLITE ANAEROBES OF THE TUBERCULOSIS FOCUS: METAGENOMICS AND SOME IMMUNOLOGICAL PHENOMENA

O.B. Ogarkov<sup>1</sup>, E.A. Orlova<sup>1</sup>, V.V. Sinkov<sup>1</sup>, I.G. Kondratov<sup>1</sup>, Y.S. Schwartz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Epidemiology and Microbiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk;

<sup>2</sup>Novosibirsk Research Institute of Tuberculosis, Novosibirsk

Closed granulomas are typical lesions of pulmonary tuberculosis. Caseous necrosis in the centre is the hallmark of this pathology. In 1955, Georges Canetti proposed 4 possible mechanisms underlying the changes in the caseous tuberculosis centre. Our studies, as well as the works of other authors exclude the possibility of active multiplication of *M. tuberculosis* in anaerobic conditions of tuberculous granuloma. It can be stated that only a limited number of bacterial species have the opportunity for multiplication when the hypoxic centre of the tuberculosis focus is formed in anaerobic conditions. The common property of these microorganisms is the ability to utilise caseum lipids under anaerobic conditions. It can be noted that under such specific conditions, the main property of the forming polymicrobial community is limited species diversity and the absence of the need to form macroscopic biofilms.

Our metagenomic studies of caseiomas from TB foci in approximately 70% of cases can be classified as classical caseiomas, with a predominance of the *Mycobacteriaceae* family. In the remaining cases, a polymicrobial community predominated, replacing or supplementing the original mycobacterial microflora of the caseum. Metabolomics of *Staphylococcus* and *Corynebacterium* strains isolated from tuberculomas caseum allows us to suggest that a pathological consortium is formed within the polymicrobial community of the caseum that promotes lipid substrate assimilation. We also suggest that within this pathological community the phenomenon of anaerobic respiration of microorganisms with the participation of organic substrates as the final electron acceptor may occur. To reveal the influence of satellite anaerobes on immunological processes during caseomas formation, the influence of extracts of bacterial cultures of *Corynebacterium kefrresidentii* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from tuberculosis foci on granuloma formation and mycobacterial growth in the model of *M. tuberculosis*-induced granulomogenesis *in vitro* was investigated. It is shown that extracts of the microorganisms under study lead to more effective recruitment of immunocompetent cells into granulomas, resulting in a significant enlargement of these formations and an increase in their number.

## ОЦЕНКА МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Е.А. Сорокина, М.Л. Гецина, Е.А. Черневская

ФНКЦ реаниматологии и реабилитологии, Москва

Исследование метаболитов является перспективным методом и находит все более широкое применение для выявления дисфункций различных органов пациентов. Одним из источников метаболитов в организме является микробиота кишечника. Повышение концентрации сепсис-ассоциированных ароматических микробных метаболитов — прогностически неблагоприятный фактор риска летального исхода у пациентов с сепсисом.

Целью работы была оценка состава и функции микробиоты кишечника у пациентов с сепсисом по сравнению со здоровыми донорами. В исследование были включены 10 пациентов с сепсисом и 9 здоровых доноров, сопоставимые по полу и возрасту. Инкубация кишечного содержимого проводилась в тиогликолевой среде (при 37°C) с добавлением сепсис-ассоциированных микробных метаболитов (25 мкМ фенилмолочная кислота (ФМК) или 25 мкМ 4-гидроксифенилмолочная кислота (4-ГФМК)). Концентрации метаболитов определялись на газовом хроматографе GC-2010 Plus и масс-спектрометре GCMS-QP2020 (Shimadzu, Япония).

Доля сепсис-ассоциированных фенольных метаболитов у пациентов с сепсисом была значительно выше по сравнению со здоровыми и составляла 40%, в то время как у доноров в норме не превышала 5%. Сравнение метаболомных профилей нормобиоты и патобиоты в эксперименте показало, что при нагрузке сепсис-ассоциированными метаболитами ФМК и 4-ГФМК микробиота здорового человека подвергает их биотрансформации до конечных продуктов микробного метаболизма, а патобиота септического пациента не способна выполнять эту функцию. Видовой состав кишечного содержимого количественно оценивали методом ПЦР в режиме реального времени, (амплификатор CFX96 Touch, Bio-Rad тест-система «Колонофлор-16 (биоценоз)», АльфаЛаб). У 76% пациентов с сепсисом выявлено увеличение содержания условно-патогенных микроорганизмов, таких как: *Proteus vulgaris/mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*. Количество лактобацилл и бифидобактерий было снижено у 60% пациентов.

Таким образом, происходит превращение микробиома в патобиом, что приводит к метаболической дисфункции «незримого органа» – микробиоты кишечника.

## ASSESSMENT OF METABOLYTIC ACTIVITY OF GUT MICROBIOTA IN HEALTHY AND PATHOLOGICAL CONDITIONS

Е.А. Sorokina, M.L. Getsina, E.A. Chernevskaya

Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology, Moscow

Metabolite analysis is a promising method and is increasingly used to identify dysfunctions of various organs in patients. One of the sources of metabolites in the body is the intestinal microbiota. An increase of sepsis-associated aromatic microbial metabolites is a prognostically unfavorable factor and the risk of death in patients with sepsis.

The aim of the work was to evaluate the composition and function of the intestinal microbiota in patients with sepsis compared to healthy donors using chromatograph mass spectrometry and real-time polymerase chain reaction (PCR). The study included 10 patients with sepsis and 9 healthy donors, comparable in gender and age. Incubation of stool samples was carried out in thioglycollate medium (TG (at 37°C)) with the addition of sepsis-associated microbial metabolites (25 μM phenyllactic acid (PLA) or 25 μM 4-hydroxyphenyllactic acid (4-HPLA)). Metabolite concentrations were determined with using a GC-2010 Plus gas chromatograph and a GCMS-QP2020 mass spectrometer (Shimadzu, Japan).

The proportion of sepsis-associated aromatic metabolites in patients with sepsis was significantly higher than normal and significance of 40%, while in donors it did not exceed 5%. Comparison of the metabolomic profiles of normobiota and pathobiota in an experiment showed that when loaded with sepsis-associated metabolites of PLA and 4-HPLA, the microbiota of a healthy subject's biotransforms them into the end products of microbial metabolism, whereas the pathobiota of a septic patient is unable to perform this function. Taxonomic abundance of the gut microbiota indicator was evaluated using real-time PCR (CFX96 Touch amplifier, Bio-Rad "Colonoflor-16 (bioecosis)" test system, AlfaLab). In 76% of patients with sepsis, an increase in the content of opportunistic nosocomial microorganisms was detected, such as: *Proteus vulgaris/mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*. The number of lactobacilli and bifidobacteria was reduced in 60% of patients.

Thus, in sepsis, the normobiome is transformed into a pathobiome, which reflects the dysfunction of the gut microbiota.



**КВАНТИФИКАЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП СИМБИОТИЧЕСКОЙ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА: МИКРОБИОМ ЧЕРЕЗ ПРИЗМУ ЭКОЛОГИИ, ОСНОВАННОЙ НА ПРИЗНАКАХ**

**А.И. Клименко, А.И. Кропочев, С.А. Лашин**

*Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*

Микробиота кишечника человека играет важнейшую роль в работе пищеварения, иммунитета и поддержании здоровья организма. При этом большинство биоинформатических инструментов анализа данных высокопроизводительного секвенирования, полученных из микробиоты кишечника, дают широкую оценку её функционального потенциала, но не всегда способны провести глубокий анализ отдельных ключевых процессов, определяющих состояние и динамику экосистемы. Подход экологии, основанной на признаках, позволяет описывать экосистемы в терминах взаимодействия функциональных групп, выделяемых на основе экологически значимых признаков, что особенно актуально для микробных сообществ, характеризующихся функциональным гомеостазом при изменчивом таксономическом составе.

В данной работе представлен биоинформатический метод квантификации экологических функциональных групп симбиотической микробиоты кишечника человека, таких как ацетогены, сульфатредукторы, бутират-производящие и муцин-разлагающие бактерии. Количественная оценка представленности и активности функциональных групп может производиться на основе метатранскриптомных и метатранскриптомных данных на основе высокоэффективного подхода псевдо-выравнивания. Расширяемый и настраиваемый каталог позволяет учесть различные варианты функционально-значимых генетических последовательностей для определения соответствующих экологических функциональных групп. Метод был успешно верифицирован с использованием опубликованных экспериментальных данных, обнаружены известные закономерности в изменении состава микробиоты при различных диетах, проведено сопоставление с оценками, полученными по независимым данным на основе таксономического маркера. Сравнение результатов оценки количественной представленности экологических функциональных групп с инструментом функционального анализа микробиомов HumanN 3 показало более высокую точность разработанного метода при определении последовательностей, относящихся к исследуемым экологическим функциональным группам.

*Работа была поддержана бюджетным проектом № FWNR-2022-0006.*

**QUANTIFYING FUNCTIONAL GROUPS OF THE HUMAN GUT SYMBIOTIC MICROBIOTA: THE MICROBIOME THROUGH THE LENS OF TRAIT-BASED ECOLOGY**

**A.I. Klimenko, A.I. Kropochev, S.A. Lashin**

*Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk*

The human gut microbiota plays an important role in digestive function, immunity and health maintenance. However, most bioinformatic tools for analysing high-throughput sequencing data from the gut microbiota provide a broad assessment of its functional potential, but are not always able to analyse in depth the particular key processes of interest that determine the state and dynamics of the ecosystem. The trait-based ecology approach allows to describe ecosystems in terms of the interaction of functional groups defined on the basis of ecologically relevant traits, which is particularly relevant for microbial communities characterised by functional homeostasis with variable taxonomic composition.

This work presents a bioinformatic method for quantification of ecological functional groups of human gut symbiotic microbiota such as acetogens, sulfate reducers, butyrate-producing and mucin-decomposing bacteria. Functional group abundance and activity can be quantified using metagenomic and metatranscriptomic data based on a highly efficient pseudo-alignment approach. An extensible and customisable catalogue allows to consider different sequence variants of trait-determining genetic features to identify relevant ecological functional groups. The method was successfully verified using published experimental data, there were observed the known patterns in the change of microbiota composition under different diets, and comparison with estimates obtained from independent data based on taxonomic marker was performed. The results of estimation of quantitative representation of ecological functional groups were compared with the HumanN 3 microbiome functional analysis tool and the developed method was shown to exhibit higher accuracy in determining sequences belonging to the ecological functional groups under study.

*Acknowledgements: This work was supported by the Budget Project FWNR-2022-0006.*

## ОСОБЕННОСТИ ГЕНОМНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ШТАММА STREPTOCOCCUS PYOGENES, ВЫЗВАВШЕГО СМЕРТЕЛЬНЫЙ ИСХОД НА ФОНЕ МЕТАПНЕВМОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

А.В. Павленко, Д.В. Кривонос, Е.В. Корнеенко, А.С. Сперанская, Е.Н. Ильина

НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва

Стрептококковая инфекция группы А (СГА-инфекция), которой наиболее подвержены дети в возрасте до 10 лет, в большинстве случаев вызывает легко протекающие заболевания, такие как тонзиллиты, фарингиты и скарлатина. Своевременно начатая антибиотикотерапия у пациентов с легкой формой заболевания приводит к быстрому выздоровлению. Однако в редких случаях могут развиваться инвазивные формы СГА-инфекции, приводящие к жизнеугрожающим состояниям, таких как синдром стрептококкового токсического шока. За последние 3 года в мире наблюдается рост заболеваемости инвазивной СГА-инфекцией и связанной с ней смертности. Данный скачок заболевания может быть вызван ростом распространения респираторных вирусных инфекций, способных повышать риск развития инвазивных форм СГА-инфекции.

В своей работе мы изучили особенности геномной организации штамма *Streptococcus pyogenes*, вызвавшего летальный исход при коинфекции метапневмовирусом у 3-летнего ребенка. Ребенок 3 лет, мальчик, поступил в больницу в тяжелом состоянии с дыхательной недостаточностью 3-й стадии, интоксикационным синдромом и температурой 35,9. При осмотре выявлены гипертрофированные и гиперемизированные миндалины, без налета. На рентгенограмме грудной клетки выявлены признаки правосторонней тотальной пневмонии. По данным анализа крови наблюдаются признаки иммунодефицита в виде лейкопении, снижения абсолютного числа нейтрофилов и моноцитов. В связи с нарастающей дыхательной недостаточностью ребенок был переведен на искусственную вентиляцию легких и через 3 часа скончался. Проведено исследование аутопсийного материала от пациента (легкие, трахея, селезенка) методами RT-PCR для выявления респираторных вирусов и метагеномным секвенированием генов 16S rRNA для выявления сопутствующей бактериальной флоры. Во всех образцах обнаружено присутствие метапневмовируса и *S. pyogenes*. Клинические изоляты *S. pyogenes*, выделенные из всех образцов аутопсийного материала (по два из каждого) подвергнуты геномному секвенированию.

По результатам секвенирования была получена полногеномная сборка *S. pyogenes*, для которого был установлен ST648 секвенс-тип с помощью MLST (по генам *gki*, *gtr*, *murI*, *mutS*, *recP*, *xpt*, *yqiL*). Также в геноме был обнаружен вариант экзотоксина типа C. Специфических детерминант устойчивости к антибиотикам не выявлено.

*Работы выполнены в рамках госзадания 12203090069-4.*

## FEATURES OF GENOMIC ORGANIZATION OF STREPTOCOCCUS PYOGENES STRAIN THAT CAUSED FATAL OUTCOME OF THE BACKGROUND OF METAPNEUMOVIRUS INFECTION

A.V. Pavlenko, D.V. Krivonos, E.V. Korneenko, A.S. Speranskaya, E.N. Ilina

Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow

Group A streptococcal infection (SGA infection), to which children under 10 years of age are most susceptible, in most cases causes mild illnesses such as tonsillitis, pharyngitis and scarlatina. Timely antibiotic therapy in patients with a mild form of the disease leads to a rapid recovery. However, in rare cases, invasive forms of SGA infection may develop, leading to life-threatening conditions such as streptococcal toxic shock syndrome. Over the past 3 years, there has been a worldwide increase in the incidence of invasive SGA infection and associated mortality. This jump in incidence may be due to the increased prevalence of respiratory viral infections that can increase the risk of invasive SGA infection.

In our work, we studied the features of genomic organization of *Streptococcus pyogenes* strain that caused lethal outcome in coinfection with metapneumovirus in a 3-year-old child. A 3-year-old child, a boy, was admitted to the hospital in a serious condition with respiratory failure of the 3rd stage, intoxication syndrome and temperature of 35.9. Examination revealed hypertrophied and hyperemic tonsils, without plaque. Chest X-ray showed signs of right-sided total pneumonia. According to blood test data, there are signs of immunodeficiency in the form of leukopenia, decrease in the absolute number of neutrophils and monocytes. Due to increasing respiratory failure, the child was transferred to artificial ventilation and died 3 hours later. Autopsy material from the patient (lungs, trachea, spleen) was analyzed by RT-PCR to detect respiratory viruses and 16S rRNA metagenomic sequencing to detect concomitant bacterial flora. The presence of metapneumovirus and *S. pyogenes* was detected in all samples. Clinical isolates of *S. pyogenes* isolated from all autopsy specimens (two of each) were subjected to genomic sequencing.

Based on the sequencing results, a full-genome assembly of *S. pyogenes* was obtained, for which ST648 sequence type was established using MLST (for the genes *gki*, *gtr*, *murI*, *mutS*, *recP*, *xpt*, *yqiL*). A variant of exotoxin type C was also detected in the genome. No specific determinants of antibiotic resistance were identified.

*The research was carried out within the framework of the government assignment number 12203090069-4.*

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОВЕДЕНИЯ ЭНТЕРАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ КЛОСТРИДАЛЬНОГО КОЛИТА У ПАЦИЕНТОВ С ТЯЖЕЛЫМ ОСТРЫМ ПАНКРЕАТИТОМ

**В.В. Киселев, М.С. Жигалова, Т.В. Черненкокая, П.А. Ярцев**

*НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗ Москвы, Москва*

Множественные хирургические вмешательства и гнойно-септические осложнения у пациентов с тяжелым острым панкреатитом (ТОП) увеличивают сроки госпитализации и требуют проведения пролонгированной антибактериальной терапии, которая является пусковым триггером в развитии дисбактериоза и колонизации кишечника *Clostridium difficile*.

Цель – оптимизация лечения *Clostridium difficile*-ассоциированной болезни пациентов с ТОП.

В исследование включены 83 пациента с ТОП (52 (62,6%) мужчины и 31 (37,4%) женщина), с *Clostridium difficile*-ассоциированной болезнью, подтвержденной иммунохроматографическим экспресс-тестом *C. difficile* A+B. Средний возраст 51,2±10,7 года. Группа сравнения (n=47)-ретроспективная, в которой использовался Ванкомицин 125 мг 4 раза в сутки per os, в течение 10 дней. Исследуемая группа (n=36) АБ-терапия, дополненная энтеральной терапией (ЭТ) с применением солевого энтерального раствора (СЭР) и многокомпонентной смеси (МС) для энтерального питания (состав: дипептид глутамина, трибутирин, селен, цинк, витамины). Введение СЭР проводилось в объеме 1500-3000 мл/сут, далее начинали ЭТ по схеме: МС-500 мл в течение 1-2 суток + парентеральное питание, затем полуэлементная смесь 100-500 мл с постепенным увеличением до 1500-2000 мл/сут на фоне снижения объема парентерального питания, и дальнейшим переходом на стандартную смесь 1500-2500 мл/сут, регидратация с использованием СЭР от 1000 мл/сут., в течении 7 дней.

В результате проведения ЭТ с использованием предложенной комбинации у 58,3% пациентов основной группы к 7-м суткам от начала терапии получены отрицательные результаты на наличие токсинов А/В *C. difficile* в кале, а у 41,7% к 9-м суткам. У пациентов группы сравнения наличие отрицательных тестов на наличие токсинов А и В *C. difficile* в кале регистрировалось к 16 (±5) суткам.

Восстановление гомеостаза кишечника способствует более быстрому выздоровлению пациентов с ТОП, которые находятся в группе риска по развитию *Clostridium difficile*-ассоциированной болезни. Применение ЭТ обеспечивает протективное действие на энтероциты и микробное сообщество микрофлоры кишечника.

## EFFECTIVENESS OF ENTERAL THERAPY IN THE TREATMENT OF CLOSTRIDIAL COLITIS IN PATIENTS WITH SEVERE ACUTE PANCREATITIS

**V.V. Kiselev, M.S. Zhigalova, T.V. Chernenkaya, P.A. Yartsev**

*N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, Moscow*

Multiple surgical interventions and purulent-septic complications in patients with severe acute pancreatitis (SAP) increase the duration of hospitalization and require prolonged antibacterial therapy, which is a trigger for the development of dysbacteriosis and intestinal colonization with *Clostridium difficile*.

Objective: to optimize the treatment of *Clostridium difficile*-associated disease in patients with SAP.

The study included 83 patients with SAP (52 (62.6%) men and 31 (37.4%) women), with *Clostridium difficile*-associated disease confirmed by immunochromatographic rapid test *C. difficile* A + B. The average age was 51.2 ± 10.7 years. The comparison group (n = 47) was retrospective, in which Vancomycin 125 mg 4 times a day per os was used for 10 days. Study group (n=36): AB therapy supplemented with enteral therapy (ET) using enteral saline solution (ESS) and a multicomponent mixture (MM) for enteral nutrition (composition: glutamine dipeptide, tributyrin, selenium, zinc, vitamins). ESS was administered in a volume of 1500-3000 ml/day, then ET was started according to the scheme: MS-500 ml for 1-2 days + parenteral nutrition, then a semi-elemental mixture of 100-500 ml with a gradual increase to 1500-2000 ml/day against the background of a decrease in the volume of parenteral nutrition, and then a transition to a standard mixture of 1500-2500 ml/day, rehydration using ESS from 1000 ml/day, for 7 days.

As a result of ET using the proposed combination, 58.3% of patients in the main group had negative results for the presence of *C. difficile* toxins A/B in feces by the 7th day from the start of therapy, and 41.7% by the 9th day. In patients in the comparison group, negative tests for the presence of *C. difficile* toxins A and B in feces were recorded by the 16th (±5) day.

Restoration of intestinal homeostasis contributes to a faster recovery of patients with SAP, who are at risk for developing *Clostridium difficile*-associated disease. The use of ET provides a protective effect on enterocytes and the microbial community of the intestinal microflora.

## ПОИСК РАСПРОСТРАНЯЮЩИХСЯ МИКРООРГАНИЗМОВ, ОСНОВАННЫЙ НА АНАЛИЗЕ ПРЕДСТАВЛЕННОСТИ К-МЕРОВ В ДАННЫХ МЕТАГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

В.В. Панова<sup>1</sup>, С.А. Гуров<sup>2</sup>, М.В. Молчанова<sup>2</sup>, Н.С. Попов<sup>1</sup>, Д.Е. Федоров<sup>1</sup>, А.И. Манолов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора (НИИ СБМ), Москва; <sup>2</sup>Московский физико-технический институт, Долгопрудный

Целью данной работы является разработка подхода к идентификации новых возможных инфекционных агентов на основе увеличения представленности и распространенности коротких подстрок фиксированной длины (к-меров) в данных полногеномного метагеномного секвенирования. Этот подход потенциально позволяет выявлять ранее не встречающиеся организмы без требований высокого уровня гомологии к уже известным последовательностям.

Для валидации предложенного метода было проведено моделирование метагеномных прочтений при помощи InSilicoSeq. Набор и значения представленности видов были получены из анализа секвенирования тотальной РНК, выделенной из мазка из носоглотки пациента с COVID-19 (эксперимент SRA SRX8697677, запуск SRR12183113). Для подсчета представленности к-меров был использован Jellyfish. Для оценки таксономического состава образца использовали Kraken2.

В наборе симулированных данных точность метода составляет от 84.48% до 85.57%. В наборе данных, который использовался для подбора оптимального значения длины к-меров, точность уменьшается от 99.97% при k=10 до 52.19% при k=14. Чувствительность метода изменяется от 1.74% при k=10 до 82.67% при k=14.

На парных чтениях метагеномных образцов кала добровольцев (215 образцов, собранных в 2017 году и 178 образцов – в 2022 году, в одном образце в среднем 40 млн. прочтений, секвенатор: BGI), подбирался оптимальный размер k. Для k=14 у каждого к-мера рассчитаны для каждого образца и каждого пациента средняя/медианная представленность по годам и распространенность по отдельным годам.

Выявление новых организмов предложенным нами способом возможно при k≥15. Для уменьшения объема вычислений были убраны к-меры, присутствующие в базе данных RefSeq.

Из открытых баз данных (SRA, CNGBdb) собраны метагеномы назофарингеальных мазков, полученных методом тотального РНК-секвенирования.

*Работа выполнена на базе НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора в рамках госзадания “Разработка алгоритмов для выявления новых, уникальных последовательностей ДНК или РНК в метагеномах и их фенотипическая характеристика in vitro”, номер 12203090069-4.*

## SEARCH FOR SPREADING MICROORGANISMS BASED ON THE ANALYSIS OF THE ABUNDANCE OF K-MERS IN METAGENOMIC SEQUENCING DATA

V. Panova<sup>1</sup>, S. Gurov<sup>2</sup>, M. Molchanova<sup>2</sup>, N. Popov<sup>1</sup>, D. Fedorov<sup>1</sup>, A. Manolov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow; <sup>2</sup>Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny

This work aims to develop an approach to the identification of possible infectious agents based on increasing the abundance and prevalence of short fixed-length substrings (k-mers) in the data of genome-wide metagenomic sequencing. This approach potentially makes it possible to identify new infectious agents without requiring a high level of homology to already known sequences.

Metagenomic reads were simulated using the InSilicoSeq tool to validate the proposed method. The set and values of species abundance were obtained from the analysis of sequencing of total RNA isolated from a nasopharyngeal swab of a patient with COVID-19 (experiment SRA SRX8697677, run SRR12183113). Jellyfish was used to calculate the abundance of k-mers. Kraken2 was used to assess the taxonomic composition of the sample.

In the set of simulated data, the precision of the method ranges from 84.48% to 85.57%. In the dataset that was used to select the optimal value of the length of k-mers, the precision decreases from 99.97% at k=10 to 52.19% at k=14. The sensitivity in the target organism varies from 1.74% at k=10 to 82.67% at k=14.

On paired reads of metagenomic stool samples of volunteers (215 samples collected in 2017 and 178 samples in 2022, an average of 40 million reads in one sample, sequencer: BGI), the optimal k size was selected. For k=14 for each k-mer, the mean/median representation by year and prevalence by individual years are calculated for each sample and each patient.

The identification of new organisms by our proposed method is possible at k≥15. To reduce the amount of calculations, the k-mers present in the RefSeq database were removed.

Metagenomes of nasopharyngeal swabs obtained by total RNA sequencing have been collected from open databases (SRA, CNGBdb).

*The research was carried out on the basis of the Research Institute of Systems Biology and Medicine within the framework of the government assignment “Development of algorithms for identifying new, unique DNA or RNA sequences in metagenomes and their phenotypic characteristics in vitro”, number 12203090069-4.*

## АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ АУТОФАГИИ В ЛЕЙКОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ COVID-19

С.И. Панченко<sup>1</sup>, О.В. Балан<sup>1</sup>, Э.Л. Тихонович<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии КарНЦ РАН; <sup>2</sup>Медицинский институт ПетрГУ, Петрозаводск

Аутофагия, как один из важнейших механизмов поддержания гомеостаза клетки, играет важную роль, в том числе, и в противовирусном иммунном ответе. Однако ряд вирусов выработали механизмы, позволяющие манипулировать аутофагией с целью усиления вирусной репликации и формирования персистенции. Цель исследования заключалась в анализе экспрессии генов, кодирующих белки аутофагии в лейкоцитах периферической крови (ЛПК) пациентов после перенесенного COVID-19 на разных сроках после выздоровления. Для исследования использованы ЛПК условно здоровых доноров, до пандемии (n=13, ср. возраст - 44±2,9) и пациентов после перенесенной НКВИ спустя 3, 6 и 12 мес после выздоровления (n=31, ср. возраст - 50±1,9). Экспрессию генов оценивали методом RT-PCR. Выявление нуклеотидных последовательностей неструктурного белка Nsp6 вируса SARS-Cov-2 проводили с использованием капельной цифровой ПЦР. Исследования выполнены на научном оборудовании ЦКП КарНЦ РАН.

Результаты исследования представлены в таблице 1. Кроме того, корреляционный анализ позволил выявить положительную тесную связь между содержанием мРНК генов *ATG5*, *LC3BII* и количеством нуклеотидной последовательности неструктурного вирусного белка Nsp6 (r=0,59; p=0,03 и r=0,86; p=0,002 соответственно) и отрицательную - между Nsp6 и уровнем экспрессии гена *mTOR* (r=-0,64; p=0,01).

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФ № 23-25-10102, № 15-P23.

Таблица 1

Содержание мРНК генов в ЛПК здоровых доноров (до пандемии) и пациентов с установленным диагнозом COVID-19 спустя 3, 6 и 12 мес. после выздоровления

Название гена	До пандемии COVID-19 (контроль)	После COVID-19		
		3 мес	6 мес	12 мес
ATG10	0,000023 (0,0000172; 0,0000257)	0,000123* (0,000095; 0,000454) p=0,002	0,000072* (0,000025; 0,000622) p=0,0004	0,000052* (0,000039; 0,000059) p=0,003
LC3B2	0,00168 (0,00117; 0,00408)	0,03703* (0,00846; 0,04688) p=0,0008	0,01568* (0,00344; 0,03716) p=0,002	0,00658* (0,00636; 0,01791) p=0,008
mTOR	0,000309 (0,000234; 0,000369)	0,000006* (0,000005; 0,000049) p<0,001	0,000381 (0,000077; 0,000507) p=0,44	0,000905* (0,000902; 0,001372) p<0,001
ATG5	0,000016 (0,000010; 0,000020)	0,000760* (0,00070; 0,001903) p=0,0009	0,002010* (0,001902; 0,002670) p=0,002	0,000560* (0,000345; 0,00082) p=0,0008

Примечание: Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха. \*различия достоверны в сравнении с контрольной группой.

## ANALYSIS OF AUTOPHAGY GENE EXPRESSION IN PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES OF PATIENTS AFTER COVID-19

S.I. Panchenko<sup>1</sup>, O.V. Balan<sup>1</sup>, E.L. Tikhonovich<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biology, KarRC RAS; <sup>2</sup>Medical Institute, PetrSU, Petrozavodsk

Autophagy, as one of the most important mechanisms for maintaining cellular homeostasis, plays an important role, including in the antiviral immune response. However, a number of viruses have developed mechanisms that allow manipulating autophagy in order to enhance viral replication and form persistence. The study aimed to analyze the expression of genes encoding autophagy proteins in peripheral blood leukocytes (PBL) of patients after COVID-19 at different times after recovery. PBL of conditionally healthy donors were used, before the pandemic (n=13, average age – 44±2.9) and patients after COVID-19 3, 6 and 12 months after recovery (n=31, average age – 50±1.9). Gene expression was assessed by RT-PCR. The nucleotide sequences of the non-structural protein Nsp6 of the SARS-Cov-2 virus were identified using. The studies were carried out using scientific equipment from the Collective Use Center of the Karelian Research Center of the Russian Academy of Sciences.

The results of the study are presented in Table. In addition, correlation analysis revealed a positive close relationship between the mRNA content of the *ATG5*, *LC3BII* genes and the amount of nucleotide sequence of the non-structural viral protein Nsp6 (r=0.59; p=0.03 and r=0.86; p=0.002, respectively) and a negative one between Nsp6 and the level of expression of the *mTOR* gene (r=-0.64; p=0.01).

The study was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation grant No. 23-25-10102, No. 15-P23.

Table 1

The mRNA content of genes in the PBL of healthy donors (before the pandemic) and patients with an established diagnosis of COVID-19 3, 6 and 12 months after recovery

Gene	Before COVID-19 (control)	After COVID-19		
		3 months	6 months	12 months
ATG10	0.000023 (0.0000172; 0.0000257)	0.000123* (0.000095; 0.000454) p=0.002	0.000072* (0.000025; 0.000622) p=0.0004	0.000052* (0.000039; 0.000059) p=0.003
LC3B2	0.00168 (0.00117; 0.00408)	0.03703* (0.00846; 0.04688) p=0.0008	0.01568* (0.00344; 0.03716) p=0.002	0.00658* (0.00636; 0.01791) p=0.008
mTOR	0.000309 (0.000234; 0.000369)	0.000006* (0.000005; 0.000049) p<0.001	0.000381 (0.000077; 0.000507) p=0.44	0.000905* (0.000902; 0.001372) p<0.001
ATG5	0.000016 (0.000010; 0.000020)	0.000760* (0.00070; 0.001903) p=0.0009	0.002010* (0.001902; 0.002670) p=0.002	0.000560* (0.000345; 0.00082) p=0.0008

Note: Data are presented as median and interquartile range. \*Differences are significant in comparison with the control group.

**МОДИФИЦИРОВАННЫЙ АНТИСМЫСЛОВОЙ ОЛИГОНУКЛЕОТИД, НАЦЕЛЕННЫЙ НА ГЕН *mecA*, ВОЗВРАЩАЕТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ПЕНИЦИЛЛИНУ У АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОГО ШТАММА *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS***

А.А. Фокина<sup>1</sup>, Е.А. Буракова<sup>1</sup>, А.В. Бардашева<sup>2</sup>, С.Н. Бизяев<sup>1</sup>, Ч. Гао<sup>1</sup>, К.В. Клабенкова<sup>1</sup>, Д.Э. Патрушев<sup>1</sup>, Н.В. Тикунова<sup>2</sup>, Д.А. Стеценко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН; <sup>2</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Распространение лекарственной устойчивости патогенных микроорганизмов рассматривается ВОЗ с 2014 г. как одна из серьезнейших угроз здоровью. Широкое распространение в текущее десятилетие приобрели больничные инфекции, вызванные антибиотикорезистентными штаммами *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium difficile* и др. патогенов, что делает разработку новых эффективных средств борьбы с ними чрезвычайно актуальной. Производные нуклеиновых кислот, такие как антисмысловые олигонуклеотиды, способные избирательно подавлять экспрессию индивидуальных генов, рассматриваются за рубежом в качестве одного из перспективных инструментов для преодоления антибиотикорезистентности. Однако для успешного противодействия бактериальным инфекциям с помощью олигонуклеотидов необходимо в первую очередь обеспечить эффективную доставку препаратов в бактериальные клетки.

Целью данной работы является разработка новых подходов к созданию антибактериальных препаратов, способных успешно подавлять рост бактерий, в том числе проявляющих лекарственную устойчивость, на основе научного задела коллектива лаборатории в области синтеза модифицированных аналогов нуклеиновых кислот, принадлежащих к двум основным классам – фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов (ФГО) [1, 2] и сульфонилфосфорамидных олигонуклеотидов (СФО) [3, 4], в особенности, мезилфосфорамидных олигонуклеотидов ( $\mu$ , или MsPA) [5].

В данной работе было показано восстановление чувствительности метициллинрезистентного штамма *Staphylococcus epidermidis* к пенициллину при ингибировании гена антибиотикорезистентности *mecA* с помощью антисмыслового олигонуклеотида, содержащего цвиттер-ионные модификации фосфатной группы, повышающие устойчивость комплементарного комплекса и слабо влияющие на цитотоксичность.

Работа поддержана грантом РФФ 22-13-00212.

1. Купрюшкин М.С., Пышный Д.В., Стеценко Д.А. *Acta Naturae* 2014, 6: 123–125.
2. Skvortsova YuV, Salina EG, Burakova EA, Bychenko OS, Stetsenko DA, et al. *Front Pharmacol.* 2019(10): 1049.
3. Burakova EA, Derzhalova AS, Chelobanov BP, Fokina AA, Stetsenko DA. *Russ J Bioorg Chem.* 2019, 45: 662–668.
4. Derzhalova A, Markov O, Fokina A, Shiohama Y, Zatsepin T et al. *Appl Sci.* 2021, 11: 1174.
5. Miroshnichenko SK, Patutina OA, Burakova EA, Chelobanov BP, Fokina AA et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019, 116: 1229–1234.

**A MODIFIED ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDE TARGETING THE *mecA* GENE RESTORES PENICILLIN SENSITIVITY IN THE ANTIBIOTIC-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* STRAIN**

А.А. Фокина<sup>1</sup>, Е.А. Буракова<sup>1</sup>, А.В. Бардашева<sup>2</sup>, С.Н. Бизяев<sup>1</sup>, Ч. Гао<sup>1</sup>, К.В. Клабенкова<sup>1</sup>, Д.Э. Патрушев<sup>1</sup>, Н.В. Тикунова<sup>2</sup>, Д.А. Стеценко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; <sup>2</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

The emergence of antibiotic resistance in pathogenic bacteria has been marked by WHO ten years ago as a major threat to public health. Widespread in the current decade, hospital infections caused by resistant strains of *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium difficile* and other pathogens have made the development of new efficient antibacterials a particularly urgent task. Nucleic acid derivatives such as antisense oligonucleotides that are capable of targeting individual genes have been regarded as one of the prospective tools to overcome bacterial resistance. However, to be able to produce maximum effect, the compounds need to be efficiently delivered into bacterial cells.

The aim of this work is to look for practical approaches to the design of antibacterials capable of targeting antibiotic-resistant strains of bacteria based on the new nucleic acid analogues developed in our group, namely, the representatives of the two classes of phosphoryl guanidine oligonucleotides (PGO) [1, 2] and sulfonyl phosphoramidate oligonucleotides (SPO) [3, 4], in particular, mesyl phosphoramidate oligonucleotides ( $\mu$  or MsPA), among the latter [6].

In this work, we demonstrated the restoration of the sensitivity to penicillin in methicillin-resistant strain of *Staphylococcus epidermidis* via targeting the *mecA* gene of penicillin resistance by an antisense oligonucleotide incorporating zwitter-ionic modifications, which enhance complementary binding and do not appreciably increase cytotoxicity.

The work was funded by RSF (grant No. 22-13-00212).

1. Купрюшкин М.С., Пышный Д.В., Стеценко Д.А. *Acta Naturae* 2014, 6: 123–125.
2. Skvortsova YuV, Salina EG, Burakova EA, Bychenko OS, Stetsenko DA, et al. *Front Pharmacol.* 2019(10): 1049.
3. Burakova EA, Derzhalova AS, Chelobanov BP, Fokina AA, Stetsenko DA. *Russ J Bioorg Chem.* 2019, 45: 662–668.
4. Derzhalova A, Markov O, Fokina A, Shiohama Y, Zatsepin T et al. *Appl Sci.* 2021, 11: 1174.
5. Miroshnichenko SK, Patutina OA, Burakova EA, Chelobanov BP, Fokina AA et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019, 116: 1229–1234.

## ВODIPY-ФЛУОРЕСЦЕНТНО МЕЧЕННЫЕ НЕБОЛЬШИЕ ПЕПТИДЫ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ МОНИТОРИНГА ЭТАПОВ ТРАНСЛЯЦИИ *IN VITRO*

В.И. Марина, В.Э. Сагитова, А.С. Ферберг, М.С. Биджиева, О.А. Толичева, Е.В. Полесскова, А.Л. Конева, И.А. Остерман, О.А. Донцова, П.В. Сергиев

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

На сегодняшний день существует много различных способов для изучения и визуализации стадий биосинтеза белка: toe-printing анализ с использованием флуоресцентной или изотопной [1] меток, анализ формирования ди-/трипептида с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ [2] и др. Однако несмотря на большое разнообразие методов, у каждого из них существует ряд ограничений: большая трудоемкость, дороговизна, необходимость использования специфического оборудования и пр. Мы представляем простой и доступный подход, который позволяет поэтапно отслеживать стадии биосинтеза белка с разрешением до одной аминокислоты. Так, мы демонстрируем возможность визуализации коротких BODIPY-меченных пептидов (длиной 1–7 аминокислот) с помощью денатурирующего полиакриламидного геля с мочевиной. Синтез полипептидной цепочки осуществляется при помощи коммерческой системы для сопряженной транскрипции-трансляции (PURExpress® In Vitro Protein Synthesis Kit) с использованием инициаторной BODIPY-Мет-тРНК, синтезированные продукты можно различить после гидролиза 1 М NaHCO<sub>3</sub>. С помощью данного метода возможно отслеживать активность факторов трансляции, изучать ингибиторы пептидилтрансферазной реакции, транслокации и терминации трансляции. Мы показали, что разработанная система подтверждает механизмы действия известных антибиотиков таких как тиострептон, эритромицин, тилозин, пурамицин, мадумицин, этамицин, ретапамулин и бластицидин S, а также малоизученных – оксидифицидин. Кроме того, данный метод помог выявить схожесть механизмов действия антибиотиков пурамицина и цистостина. Данный метод открывает огромные возможности для глубоко и детального изучения каждого шага биосинтеза белка.

*Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 21-64-00006.*

1. Hartz D. Extension inhibition analysis of translation initiation complexes. *Methods in Enzymology* 1988, 164: 419–425. doi:10.1016/S0076-6879(88)64058-4.
2. Maksimova EM, Vinogradova DS, Osterman IA, Kasatsky PS, Nikonov OS, Milón P, Dontsova OA, Sergiev PV, Paleskava A, Konevega AL. Multifaceted mechanism of amicoumacin a inhibition of bacterial translation. *Front Microbiol.* 2021, 12: 618857. doi: 10.3389/fmicb.2021.618857.

## BODIPY-FLUORESCENTLY LABELED SMALL PEPTIDES AS A TOOL TO MONITOR STEPS OF IN VITRO TRANSLATION

V.I. Marina, V.E. Sagitova, A.S. Ferberg, M.S. Bidzhieva, O.A. Tolicheva, A.V. Paleskava A.L. Konevega, I.A. Osterman, O.A. Dontsova, P.V. Sergiev

A.N. Belozersky Research Institute of Physical and Chemical Biology, Moscow

Today, there are many different methods for studying and visualizing the stages of protein biosynthesis: toe-print analysis using fluorescent or isotopic [1] labels, analysis of the formation of di-/tripeptides using reverse-phase HPLC [2], etc. However, Despite the wide variety of methods, each of them has a number of limitations: high labor intensity, high cost, the need to use specific equipment, etc. We present a simple and accessible approach that allows step-by-step tracking of protein biosynthesis steps at single amino acid resolution. In summary, we demonstrate the ability to visualize short BODIPY-labeled peptides (1–7 amino acids in length) using a denaturing urea polyacrylamide gel. Synthesis of the polypeptide chain is carried out using a commercial coupled transcription-translation system (PURExpress® In Vitro Protein Synthesis Kit) using the BODIPY-Met-tRNA initiator, the synthesized products can be distinguished after hydrolysis with 1 M NaHCO<sub>3</sub>. Using this method, it is possible to monitor the activity of translation factors and study inhibitors of the peptidyl transferase reaction, translocation and translation termination. We have shown that the developed system confirms the mechanisms of action of well-known antibiotics, such as thiostrepton, erythromycin, tylosin, puromycin, madamycin, etamycin, retapamulin and blasticidin C, as well as little-studied ones – oxydifidicin. In addition, this method helped to reveal the similarity in the mechanisms of action of the antibiotics puromycin and cystocin. This method opens up enormous opportunities for an in-depth and detailed study of each stage of protein biosynthesis.

*This work was supported by the Russian Science Foundation under grant no. 21-64-00006.*

1. Hartz D. Extension inhibition analysis of translation initiation complexes. *Methods in Enzymology* 1988, 164: 419–425. doi:10.1016/S0076-6879(88)64058-4.
2. Maksimova EM, Vinogradova DS, Osterman IA, Kasatsky PS, Nikonov OS, Milón P, Dontsova OA, Sergiev PV, Paleskava A, Konevega AL. Multifaceted mechanism of amicoumacin a inhibition of bacterial translation. *Front Microbiol.* 2021, 12: 618857. doi: 10.3389/fmicb.2021.618857.



## ВОССТАНОВЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ТРАНСГЛУТАМИНАЗЫ 1 IN VIVO: ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АДЕНО-АССОЦИИРОВАННОГО ВЕКТОРА

А.С. Пономарев, Р.Р. Норкин, Л.А. Хусаинова, А.А. Ризванов

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Ламеллярный ихтиоз (ЛИ) представляет собой нарушение барьерной функции эпидермиса, что ведет к гиперкератозу, шелушению кожи и воспалительным реакциям из-за недостатка фермента TGM1, вызванного мутацией гена TGM1. Эти осложнения могут замедлить физическое развитие ребенка и нарушить его терморегуляцию в раннем возрасте. Кроме того, увеличивается риск кожных суперинфекций и потери влаги через эпидермис, что может привести к сепсису и летальному исходу. Генетическая терапия, направленная на исправление мутации в гене TGM1, предлагает возможность восстановления нормального уровня фермента. В первом опыте была проведена качественная оценка эффективности вектора на 7 суток после инъекции. Опытным животным вводился AAV2-TGM1, контрольному животному вводился физиологический раствор. Во втором опыте оценивалась динамика изменения экспрессии TGM1 на 1, 3 и 7 суток после инъекции AAV2-TGM1. Эффективность конструкции определяли с помощью молекулярно-генетических и иммуногистохимических методов. Оценка количества копий мРНК целевого гена TGM1 у контрольного животного копии мРНК гена TGM1 не обнаружили, в то время как у первой и второй опытной свиньи количество копий на 1 мкг общей РНК составило  $1,5 \times 10^4$  и  $0,5 \times 10^3$  соответственно. Данные гистоморфометрии показали, что введение вируса не привело к патологическим изменениям в коже животных. Данные иммуногистохимического анализа показали наличие флуоресценции к белку TGM1. Средняя интенсивность флуоресценции была выше в 4 и 2 раза у первого и второго опытного животного, по сравнению с контрольным. Во втором опыте по данным ПЦР-РВ было выявлено, что количество копий мРНК гена TGM1 на 1 мкг общей РНК составило  $10 \times 10^{13}$ ,  $10 \times 10^7$  и  $10 \times 10^5$  на 1, 3 и 7 суток, соответственно. Результаты по двум опытам показывают, что вирус был успешно доставлен в клетки опытных животных, шел процесс экспрессии мРНК гена TGM1, что приводило к синтезу белка. Кроме того, дополнительное исследование показало снижение экспрессии трансгена в динамике.

Данное исследование выполнено в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

## RESTORATION OF TRANSGLUTAMINASE 1 ACTIVITY IN VIVO: AN EVALUATION OF THE EFFICACY AND SAFETY OF GENE THERAPY USING AN ADENO-ASSOCIATED VECTOR

A.S. Ponomarev, R.R. Norkin, L.A. Khusainova, A.A. Rizvanov

Kazan (Volga Region) Federal University

Lamellar ichthyosis (LI) is a disorder of the epidermal barrier function, leading to hyperkeratosis, flaking of the skin and inflammatory reactions due to a deficiency of the TGM1 enzyme caused by a mutation in the TGM1 gene. These complications can delay a child's physical development and impair thermoregulation at an early age. In addition, there is an increased risk of skin superinfections and loss of moisture through the epidermis, which can lead to sepsis and death. Genetic therapy aimed at correcting a mutation in the TGM1 gene offers the possibility of restoring normal levels of the enzyme. In the first experiment, the efficacy of the vector was qualitatively evaluated at 7 days post-injection. Experimental animals were injected with AAV2-TGM1, control animals were injected with physiological solution. In the second experiment, the dynamics of TGM1 expression change was evaluated at 1, 3 and 7 days after AAV2-TGM1 injection. The efficiency of the construct was determined using molecular-genetic and immunohistochemical methods. Evaluation of the number of mRNA copies of the target TGM1 gene mRNA copies of the TGM1 gene were undetectable in the control animal, whereas in the first and second experimental pig the number of copies per 1  $\mu$ g of total RNA was  $1.5 \times 10^4$  and  $0.5 \times 10^3$ , respectively. Histomorphometry data showed that virus administration did not result in pathologic changes in the skin of the animals. Immunohistochemical analysis data showed the presence of fluorescence to TGM1 protein. The average fluorescence intensity was 4 and 2 times higher in the first and second experimental animals compared to the control animal. In the second experiment, PCR-RV data revealed that the number of TGM1 gene mRNA copies per 1  $\mu$ g of total RNA was  $10 \times 10^{13}$ ,  $10 \times 10^7$ , and  $10 \times 10^5$  on days 1, 3, and 7, respectively. The results for the two experiments show that the virus was successfully delivered into the cells of the experimental animals, the mRNA expression process of TGM1 gene was underway, leading to protein synthesis. In addition, an additional study showed a decrease in transgene expression in dynamics.

This study was carried out within the framework of the Strategic Academic Leadership Program of Kazan Federal University (PRIORITY-2030).

## АДАПТАЦИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ: ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИЙ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ

В.М. Чернов, А.Р. Каюмов, М.И. Маркелова, И.О. Бутенко, А.О. Аристова, М.С. Федорова, О.А. Чернова

ФИЦ «Казанский научный центр РАН»; Казанский федеральный университет, Казань; НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва

Количество сообщений о полезных свойствах внеклеточных везикул (ВВ) пробиотиков растет, но данные о свойствах ВВ, секретируемых адаптированными к антибиотикам бактериями, пока отсутствуют. Ранее нами было показано, что развитие резистентности к амоксициллину и кларитромицину у пробиотического штамма *Lactiplantibacillus plantarum* 8p-a3 (Биомед, Россия) сопровождается крупномасштабными геномными перестройками, изменением профиля фенотипической чувствительности к антимикробным препаратам разных групп и эволюцией вирулентности [Kostenko et al., 2022]. Выяснение особенностей структуры ВВ штамма *L. plantarum* 8p-a3 и его производного антибиотикоустойчивого штамма *L. plantarum* R, а также влияния везикул штаммов на модельные бактериальные биопленки явилось задачей данного исследования.

Для характеристики ВВ применялся междисциплинарный подход с использованием линейки современных методов высокого разрешения, постгеномных технологий.

Нами было установлено, что развитие антибиотикоустойчивости у *L. plantarum* 8p-a3 сопровождается изменением представленности субпопуляций ВВ, а также профиля везикулярного cargo - липидов, нуклеиновых кислот, полисахаридов и белков. В профиле белков ВВ штаммов регистрировались качественные и количественные различия. Значительная часть везикулярного протеома у штаммов – белки, вовлеченные в процессы адгезии и агрегации, формирования и ремоделирования клеточной стенки, но в случае *L. plantarum* R обнаруживалось большее разнообразие гидролитических ферментов, потенциально способных приводить к снижению биомассы бактериальных биопленок. Эффекты ВВ штаммов в отношении модельных бактериальных биопленок различались: везикулы *L. plantarum* 8p-a3 индуцировали увеличение, а везикулы *L. plantarum* R – снижение биомассы биопленок бактерий группы ESKAPE. Вклад специфичных белков, а также липидов и полисахаридов в про- и антибиопленочные эффекты ВВ штаммов исследуется с учетом мутаций в геноме *L. plantarum* R.

Впервые показано, что адаптация пробиотического штамма *L. plantarum* к антимикробным препаратам сопровождается существенными изменениями свойств везикул лактобациллы, связанных с их структурой и активностью в отношении бактериальных биопленок.

## ADAPTATION OF PROBIOTIC BACTERIA TO ANTIBIOTICS: CHANGES IN THE STRUCTURE AND FUNCTIONS OF BACTERIAL EXTRACELLULAR VESICLES

V.M. Chernov, A.R. Kayumov, M.I. Markelova, I.O. Butenko, A.O. Aristova, M.S. Fedorova, O.A. Chernova

Federal Research Center "Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences"; Kazan Federal University, Kazan; Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow

There are increasing reports of the benefits of extracellular vesicles (EVs) derived from probiotics, but data on the properties of EVs secreted by antibiotic-adapted bacteria are lacking. Previously, we showed that the development of resistance to amoxicillin and clarithromycin in the probiotic strain, *Lactiplantibacillus plantarum* 8p-a3 (Biomed, Russia), is accompanied by large-scale genomic rearrangements, changes in the profile of phenotypic sensitivity to antimicrobials of different groups, and virulence evolution [Kostenko et al., 2022]. The task of this study was to elucidate the structure of EVs from *L. plantarum* 8p-a3 and its derivative antibiotic-resistant strain, *L. plantarum* R, as well as the effect of the EVs on model bacterial biofilms.

To characterize the EVs, an interdisciplinary approach was used with a line of modern high-resolution methods, postgenomic technologies.

We found that the development of antibiotic resistance in *L. plantarum* 8p-a3 is accompanied by a change in the representation of subpopulations of EVs, as well as the profile of vesicular cargo - lipids, nucleic acids, polysaccharides and proteins. Qualitative and quantitative differences were recorded in the vesicular protein profiles of the strains. A significant part of the vesicular proteome in strains is proteins involved in the processes of adhesion and aggregation, cell wall formation and remodeling, but in the case of *L. plantarum* R, a greater diversity of hydrolytic enzymes was found, that could potentially lead to a decrease in the biomass of bacterial biofilms. The effects of the EVs of the strains on model biofilms of ESKAPE group differed: vesicles from *L. plantarum* 8p-a3 induced an increase in the biomass of biofilms, but vesicles from *L. plantarum* R – a decrease. The contribution of specific proteins, as well as lipids and polysaccharides, to the pro- and antibiofilm effects of the EVs is studied taking into account mutations in the *L. plantarum* R genome.

For the first time, it was shown that the adaptation of the probiotic *L. plantarum*, 8p-a3, to antimicrobials is accompanied by significant changes in the properties of the lactobacillus vesicles related to their structure and activity against bacterial biofilms.

## ШТАММ-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ЖЕЛЧНЫХ КИСЛОТ БАКТЕРИЯМИ *LIGILACTOBACILLUS SALIVARIUS*

Д.Р. Хуснутдинова<sup>1</sup>, О.В. Куприянова<sup>1,2</sup>, М.И. Маркелова<sup>1</sup>, М.Н. Синягина<sup>1</sup>, С.Р. Абдулхаков<sup>1,2</sup>, Т.В. Григорьева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет; <sup>2</sup>Казанский государственный медицинский университет, Казань

*Ligilactobacillus salivarius* – представитель молочнокислых бактерий, широко распространен в ферментированных пищевых продуктах, желудочно-кишечном тракте животных и человека. Некоторые штаммы *L. salivarius* рассматриваются в качестве пробиотиков. С другой стороны, при воспалительных заболеваниях кишечника характерно увеличение доли *L. salivarius* в кишечном микробиоме. Существуют ли штаммовые различия представителей, обитающих в здоровом и воспаленном кишечнике, остаётся загадкой. Цель исследования: сравнительный геномный и метаболомный анализ штаммов *L. salivarius*, выделенных от пациентов с болезнью Крона (БК), здоровых добровольцев (ЗД) и пробиотического препарата (ПП) в отношении метаболизма желчных кислот.

Исследовали штаммы *L. salivarius*: 3 – выделенные из микробиоты кишечника пациентов с БК, 4 – от ЗД, и 1 – из ПП OMNI-biotic (AllergoSan, Германия). Полногеномное секвенирование проводили на приборе MiSeq (Иllumina) (PRJNA934275, PRJNA956528). Спектр желчных кислот оценивали методом газовой хромато-масс-спектрометрии после инкубации штаммов на среде с желчью (проект № FZSM-2023-0013).

Выявлено, что штаммы *L. salivarius* обладают различными структурами генов *bsh* – гидролаз, участвующих в деконъюгации желчных кислот. Штаммы, выделенные от ЗД, обладают одним общим мотивом белка, а штаммы от пациентов с БК другим – WP\_003699092.1. Пробиотический штамм *L. salivarius* Di6 обладал двумя гомологичными генами *bsh* (WP\_034983830.1; WP\_032494132.1), однако они отличались от генов в остальных штаммах. В результате 48 часов культивирования у всех штаммов на среде с желчью увеличивалось количество холевой кислоты (ЗД – в 2,1 раз, БК – в 2,6 раз, ПП – в 51 раз). Штаммы от пациентов с БК и ПП увеличивали количество деоксихолевой (в 1,6 и в 172,1 раз) и 7-кето-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -дигидроксихолановой кислоты (в 1,3 и 6,2 раз), тогда как штаммы от ЗД уменьшали количество данных кислот. Кроме того, после инкубации, по сравнению с начальной точкой, во всех трёх группах идентифицируется 7-дегидрохолевая кислота с максимальной концентрацией у ПП штамма.

Таким образом, обнаружены различия в структуре генов *bsh*, которые могут быть связаны с различной скоростью метаболизма первичных и конъюгированных желчных кислот.

## STRAIN-SPECIFIC FEATURES OF BILE ACID METABOLISM IN *LIGILACTOBACILLUS SALIVARIUS*

Д.Р. Хуснутдинова<sup>1</sup>, О.В. Куприянова<sup>1,2</sup>, М.И. Маркелова<sup>1</sup>, М.Н. Синягина<sup>1</sup>, С.Р. Абдулхаков<sup>1,2</sup>, Т.В. Григорьева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kazan Federal University; <sup>2</sup>Kazan State Medical University, Kazan,

*Ligilactobacillus salivarius* is a lactic acid bacteria widely found in fermented foods and the gastrointestinal tract of animals and humans. Some strains of *L. salivarius* are considered as probiotic. On the other hand, the proportion of *L. salivarius* in the gut microbiome increases in inflammatory bowel disease. Whether there are strain differences in the healthy and inflamed gut remains unknown. Aim of the study: comparative genomic and metabolomic analysis of *L. salivarius* strains isolated from patients with Crohn's disease (CD), healthy volunteers (HV) and a probiotic preparation (PP) in relation to bile acid metabolism.

The following strains of *L. salivarius* were studied: 3 – isolated from the intestinal microbiota of patients with CD, 4 – from HV and 1 – from PP OMNI-biotic (AllergoSan, Germany). Whole genome sequencing was performed on MiSeq (Illumina) (PRJNA934275, PRJNA956528). The spectrum of bile acids was determined by gas chromatography-mass spectrometry after incubation of the strains on a medium containing bile (project no. FZSM-2023-0013).

It has been shown that *L. salivarius* strains have different structures of the *bsh* genes – hydrolases involved in the deconjugation of bile acids. Strains isolated from CD have one common protein motif and strains from patients with CD have another – WP\_003699092.1. The probiotic strain *L. salivarius* Di6 had two homologous *bsh* genes (WP\_034983830.1; WP\_032494132.1), but they were different from the genes in the other strains. Culturing all strains on medium with bile for 48 hours increased the amount of cholic acid (HV – 2.1 times, CD – 2.6 times, PP – 51 times). Strains from patients with CD and PP increased the amount of deoxycholic acid (1.6 and 172.1 times) and 7-keto-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihydroxycholanic acid (1.3 and 6.2 times), while strains from HV decreased the amount of these acids. In addition, after incubation, compared to the initial point, 7-dehydrocholic acid is identified in all three groups, with the maximum concentration in the PP strain.

Thus, differences in the structure of the *bsh* genes were found, which may be associated with different rates of metabolism of primary and conjugated bile acids.

**DEVELOPING GLYCAN-CENTRIC CHEMICAL APPROACHES TO AUGMENT IMMUNITY: FUNDAMENTALS AND APPLICATIONS**

**Senlian HONG**

*Peking University, Beijing, China*

Mammalian cell surface glycans play a vital role in immune responses and dysregulated glycosylation has been implicated in the immunopathology of various diseases. In particular, glycan immune checkpoints defined as immune-modulatory pathways that involve multivalent interactions between glycans and glycan-binding proteins, are newly identified targets for immunotherapy of orthogonal to the established CTL-4 and PD-1 pathways, even though the detailed mechanism remains elusive. The research in our lab integrates synthetic chemistry with glycobiology to explore the core circuits that control immune responses against cancer and infection. In this talk, I will discuss our recent progress in understanding how glycans modulate the function of immune cells in health and disease and developing glycan-centric approaches to augment immunity.

Mammalian cell surface glycans play a vital role in immune responses and dysregulated glycosylation has been implicated in the immunopathology of various diseases. In particular, glycan immune checkpoints defined as immune-modulatory pathways that involve multivalent interactions between glycans and glycan-binding proteins, are newly identified targets for immunotherapy of orthogonal to the established CTL-4 and PD-1 pathways, even though the detailed mechanism remains elusive. The research in our lab integrates synthetic chemistry with glycobiology to explore the core circuits that control immune responses against cancer and infection. In this talk, I will discuss our recent progress in understanding how glycans modulate the function of immune cells in health and disease and developing glycan-centric approaches to augment immunity.

## ХАРАКТЕР ДВИЖЕНИЯ МСК И КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА КАК ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЙ МАРКЕР В КО-КУЛЬТУРЕ

Д. Бобков<sup>1,2</sup>, Р. Лихоманова<sup>1,2</sup>, Г. Фофанов<sup>2</sup>, А. Лукачева<sup>1,2</sup>, Н. Юдинцева<sup>1,2</sup>, М. Шевцов<sup>1,2</sup>, А. Каюмов<sup>3</sup>, М. Богачев<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; <sup>2</sup>НМИЦ им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург; <sup>3</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; <sup>4</sup>Санкт-Петербург государственный электротехнический университет «ЛЭТИ», Санкт-Петербург

Глиобластома — наиболее агрессивный тип злокачественной опухоли головного мозга, которая содержит популяцию высокоинвазивных устойчивых к терапии клеток. Выявление признаков подвижности клеток глиобластомы, которые отличают их от нормальных клеток, необходимо для разработки новых диагностических подходов.

В данной работе проведена сравнительная оценка характера подвижности клеток глиобластомы (T98G) и МСК человека (FetMSC). Треки движения отдельных клеток получали в течение 24 ч через (240 треков в 20 полях зрения) с помощью автоматизированной системы прижизненной микроскопии Image Exfluorier LCI, оснащённой программным модулем трекинга на основе машинного обучения. Треки анализировали модифицированными методами флуктуационного анализа (DFA). Оценивали перемещения клеток за каждые 15 мин, строили флуктуационные функции, представленные зависимостями среднеквадратических отклонений  $F(s)$  перемещений клеток в скользящем окне (1-24 ч) от времени перемещения  $s$ , и рассчитывали показатель Хёрста  $H$ , определяемый как скорость их прироста  $F(s) \sim s^H$ . Эффективность распознавания клеток по их паттернам подвижности оценивали методом ROC-анализа с оценкой площади под кривой (AUC).

Показано, что характер движения нормальных клеток МСК человека в монокультуре соответствует супердиффузионному режиму с  $\frac{1}{2} < H < 1$ , тогда как у опухолевых клеток он редуцируется до случайного блуждания с  $H \approx 1/2$ . При этом полученные оценки  $H$  при усреднении в каждом поле зрения ( $n=20$ ) не перекрываются (AUC=1).

Так как в реальных условиях микроокружение опухоли значительно влияет на подвижность клеток, был проведен анализ движения МСК и клеток T98G в ко-культуре. При этом показана возможность распознавания отдельных опухолевых клеток и нормальных клеток МСК человека по их паттернам подвижности при использовании показателя Хёрста  $H$  как единственного классификационного признака с AUC=0.82, а при его комбинировании с масштабным параметром распределения приращений достигается AUC=0.85.

Таким образом, оценка паттернов подвижности нормальных и раковых клеток в культуре *in vitro* представляется перспективным дифференциальным маркером в моно- и ко-культурах для выявления клеток злокачественной опухоли, характеристики их инвазивности и агрессивности с использованием методов компьютерного зрения и машинного обучения.

## HUMAN MSCS AND GLIOBLASTOMA CELL MOTILITY PATTERNS AS A DIFFERENTIAL MARKER IN CO-CULTURE

D. Bobkov<sup>1,2</sup>, R. Likhomanova<sup>1,2</sup>, G. Fofanov<sup>2</sup>, A. Lukacheva<sup>1,2</sup>, N. Yudinseva<sup>1,2</sup>, M. Shevtsov<sup>1,2</sup>, A. Kayumov<sup>3</sup>, M. Bogachev<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St Petersburg; <sup>2</sup>Personalized Medicine Centre, Almazov National Medical Research Centre, St Petersburg; <sup>3</sup>Kazan Federal University, Kazan; <sup>4</sup>St Petersburg State Electrotechnical University "LETI", St Petersburg

Glioblastoma is the most aggressive type of malignant brain tumor, which contains a population of highly invasive, therapy-resistant cells. Identification of the motility features of glioblastoma cells that distinguish them from normal cells is necessary for the development of new diagnostic approaches. In this work, a comparative assessment of the motility pattern of glioblastoma cells (T98G) and human MSCs (FetMSC) was carried out. Tracks of individual cells were obtained for 24 hours (240 tracks in 20 fields of view) using the Image Exfluorier LCI automated intravital microscopy system equipped with a machine learning-based tracking software module. Tracks were analyzed using modified fluctuation analysis (DFA) methods. Cell positions were determined every 15 min. Fluctuation functions representing standard deviations  $F(s)$  as functions of the movement time  $s$  were calculated in moving windows (1-24 h), and Hurst exponents  $H$  in the equation  $F(s) \sim s^H$  were estimated. The effectiveness of cell recognition based on their motility patterns was assessed using ROC-analysis and quantified by AUC.

Our results indicate that in a monoculture normal MSC cells exhibit super-diffusive motility characterized by  $\frac{1}{2} < H < 1$ , while in tumor cells the diffusion laws reduce to a simple scenario with random displacements  $H \approx 1/2$ . In this case,  $H$  estimates could be averaged in each field of view, resulting in non-overlapping  $H$  distributions for MSC and tumor cells (AUC=1).

Since in real-world conditions the tumor microenvironment significantly affects cell motility, an analysis of the movement of MSCs and T98G cells in a co-culture was carried out. At the same time, the possibility of recognizing individual tumor cells and normal human MSC cells by their motility patterns using only the Hurst exponent  $H$  as the only classification feature with AUC=0.82 was demonstrated, while its combination with the scale parameter of the cell displacement distribution resulted in AUC=0.85.

Thus, the assessment of motility patterns of normal and cancer cells *in vitro* culture appears to be a promising differential marker in mono- and co-cultures for identifying malignant tumor cells, characterizing their invasiveness and aggressiveness using computer vision and machine learning methods.

## РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

**Т.С. Гриненко**

*Шанхайский институт гематологии, Государственная ключевая лаборатория медицинской геномики, Национальный исследовательский центр трансляционной медицины в Шанхае, больница Руйцзинь при Медицинской школе Университета Цзяо Тун, Шанхай, Китай*

Гемопоэз – это высокоорганизованный процесс, в ходе которого редкая популяция гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) пополняет запасы зрелых клеток крови. ГСК восстанавливают кровеносную систему после трансплантации и используются для лечения лейкозов. Многочисленные исследования показали, что 20-30% ГСК находятся в состоянии глубокого покоя или спячки, не производят клеток в гомеостатических условиях и служат резервным пулом стволовых клеток, что свидетельствует об их важности для устойчивости организма к стрессу и восстановления после химиотерапии. Однако детальная характеристика спящих ГСК (сГСК) затруднена из-за отсутствия известных поверхностных маркеров для их идентификации. Мы открыли, что маркер CD38 экспрессируется на мышинных сГСК и может быть использован для их выделения. Более того, мы показали, что эктоферментная активность CD38 запускает сигнальный каскад CD38/cADPR/Ca<sup>2+</sup>/c-Fos/p57<sup>kip2</sup>, подавляющий деление сГСК. Важно отметить, что эктоферментная активность CD38 на клетках, контактирующих с CD38 негативными ГСК человека, контролирует их деление. Многие гематологические злокачественные опухоли экспрессируют CD38, таким образом, микроокружение, обогащенное продуктами эктоферментной активности CD38, может подавлять активацию здоровых ГСК и приводить к панцитопении.

ГСК находятся в костном мозге (КМ), клетки которого участвуют в поддержании и регенерации ГСК. Мы изучали реакцию ГСК в ответ на разрушение тромбоцитов в мышинной модели аутоиммунной тромбоцитопении и открыли сложное взаимодействие между эндотелиальными клетками и мегакариоцитами, отвечающее за активацию программы деления и дифференцировки в ГСК.

Архитектура человеческого КМ остается малоизученной. Мы разработали метод трехмерной визуализации КМ человека и обнаружили драматическое снижение количества функциональных симпатических нервных волокон в КМ пациентов с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ). Кроме того, потеря симпатических волокон коррелировала с неблагоприятным прогнозом. Нарушение симпатической иннервации КМ может приводить к длительной панцитопении. Таким образом, защита или восстановление симпатических нервных волокон во время или после цитотоксической терапии может стать терапевтической целью для пациентов с ОМЛ.

## REGULATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELL ACTIVATION

**T. Grinenko**

*Shanghai Institute of Hematology, State Key Laboratory of Medical Genomics, National Research Center for Translational Medicine at Shanghai, Ruijin Hospital Affiliated to Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, China*

Hematopoiesis is a highly organized process in which a small number of hematopoietic stem cells (HSC) replenish mature blood cells in a steady state condition and in response to hematological stresses. HSCs can repopulate the blood system after transplantation and are used to treat hematologic malignancies. Numerous studies have demonstrated that 20–30% of HSCs are deeply quiescent or dormant, do not produce cells under homeostatic conditions, and that these ‘dormant’ HSCs (dHSCs) harbor the greatest long-term repopulation capacity in transplantation assays. Thus, dHSCs serve as a reserve pool of stem cells, demonstrating their importance in organismal stress resistance and recovery after chemotherapy. However, detailed characterization of such dHSCs has been challenging due to the absence of known surface markers for their identification. We identified CD38 as a novel surface marker for isolating dHSCs and uncovered the previously unknown signaling axis driven by CD38 ecto-enzymatic activity that controls HSC dormancy: CD38/cADPR/Ca<sup>2+</sup>/c-Fos/p57<sup>kip2</sup>. Importantly, CD38 ecto-enzymatic activity at the neighboring CD38-positive cells promotes human HSC quiescence. Several hematological malignancies (chronic myeloid leukemia, acute myeloid leukemia, acute lymphoblastic leukemia, and multiple myeloma) express CD38 at a high level. Therefore, the microenvironment enriched in the products of CD38 ecto-enzymatic activity may keep healthy HSCs in the quiescent state, leading to cancer-related pancytopenia, and it may preserve the dormancy of cancer stem cells promoting disease persistence. Manipulation of this axis can improve the therapy of hematological cancers.

HSCs reside in the spatial bone marrow (BM) niche. Notably, niche cells can provide signals necessary for HSC maintenance and regeneration. We investigated the activation of HSCs in the Immune thrombocytopenia murine model. We uncovered the complex dynamic network between endothelial cells, megakaryocytes, and HSCs in response to platelet loss driving HSC activation and differentiation.

The 3D architecture of human BM remains poorly investigated. We developed the 3D imaging technique to examine human BM. We found the dramatic loss of sympathetic nerves in acute myeloid leukemia (AML) patient's BM, with their further destruction due to cytotoxic therapy, which could lead to prolonged hematological dysfunction. Moreover, loss of BM sympathetic fibers correlated with adverse prognosis. Therefore, protecting or restoring sympathetic nerve fibers in human BM during or after cytotoxic treatment could be a therapeutic goal for AML patients.

## ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19, ПОЛУЧАВШИХ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНУЮ ТЕРАПИЮ, ФОКУС НА ЦИТОКИНЫ

Е.А. Старостина, И.Н. Дьяков, Е.А. Трошина

ГНЦ РФ НМИЦ эндокринологии Минздрава России, Москва

Основной мишенью SARS-CoV-2 являются альвеолярные клетки 2-го типа легких, однако имеется достаточное количество данных об экстралегочном распространении SARS-CoV-2 и мультиорганном поражении при коронавирусной инфекции, в том числе органов эндокринной системы. В частности, актуальным является изучение особенностей тиреопатий, варьирующих в зависимости от выбранной стратегии терапии цитокинового шторма, а также аспектов адаптации самой щитовидной железы (ЩЖ) к COVID-19.

Проведено одномоментное исследование серии случаев с COVID-19 в остром периоде болезни (n=113); проспективное когортное исследование динамики лабораторных показателей функции ЩЖ и уровней цитокинов в дебюте COVID-19 и через 6 месяцев после выздоровления от коронавирусной болезни (n=41); ретроспективный случай – контроль перенесших COVID-19 и группы сравнения без имеющихся данных за перенесенную COVID-19 и без аутоиммунных заболеваний ЩЖ в анамнезе (n=78). Исследованы уровни тиреотропного гормона (ТТГ), Т3 свободного, Т4 свободного, антител к тиреоидной пероксидазе, антител к рецептору ТТГ, выполнен анализ 27 сигнальных молекул цитокинов и хемокинов: IL-1b, IL-1ra, IL-2, IL-4-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, Eotaxin, FGF, GM-CSF, G-CSF, IFN-g, IP-10, MCP-1, MIP-1a and -1b, PDGF-bb, RANTES, TNF-a, VEGF.

Подтверждена ассоциация функциональных нарушений ЩЖ и COVID-19 как в остром, так и в отсроченном периодах заболевания. Развитие SARS-CoV-2-атипичного тиреоидита регистрируется у 4% пациентов в остром периоде заболевания. Отрицательная корреляционная связь уровней ТТГ и провоспалительных цитокинов указывает на повреждение ткани ЩЖ вследствие гиперактивации иммунной системы у пациентов с тяжелым течением COVID-19. Регистрируется стойкое снижение функции ЩЖ после перенесенной COVID-19 у 9% пациентов, рост антитиреоидных антител, что свидетельствует о развитии АИТ. Спустя 6 месяцев после дебюта COVID-19 в группе пациентов с появившимися антитиреоидными антителами отмечаются изменения в цитокиновом профиле, характеризующиеся дисбалансом провоспалительных и противовоспалительных цитокинов. Биологическая терапия тоцилизумабом оказывает положительное влияние на иммунный ответ у пациентов с тяжелым течением COVID-19.

## THE THYROID GLAND FUNCTION IN PATIENTS WITH COVID-19 WHO RECEIVED GENETIC ENGINEERING THERAPY, FOCUS ON CYTOKINES

Е.А. Starostina, I.N. Dyakov, E.A. Troshina

Endocrinology Research Center, Russian Ministry of Health, Moscow

The main target of SARS-CoV-2 is alveolar cells of the lung type 2, but there is sufficient data on the extrapulmonary spread of SARS-CoV-2 and multiorgan damage in coronavirus infection, including the endocrine system. In particular, it is relevant to study the characteristics of thyroid pathologies that vary depending on the chosen strategy for treating cytokine storm, as well as aspects of adaptation of the thyroid gland itself to COVID-19.

A cross-sectional study of a series of cases with COVID-19 in the acute period of the disease (n=113); a prospective cohort study of the dynamics of laboratory parameters of thyroid function and cytokine levels at the onset of COVID-19 and 6 months after recovery from coronavirus disease (n=41); a retrospective case - control of those who had COVID-19 and a comparison group without available data on previous COVID-19 and without a history of autoimmune thyroid diseases (n=78). The levels of thyroid stimulating hormone (TSH), free T3, free T4, thyroid peroxidase antibodies, TSH receptor antibodies were studied, an analysis of 27 signaling molecules of cytokines and chemokines was performed: IL-1b, IL-1ra, IL-2, IL-4-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, Eotaxin, FGF, GM-CSF, G-CSF, IFN-g, IP-10, MCP-1, MIP-1a and -1b, PDGF-bb, RANTES, TNF-a, VEGF.

The association of thyroid dysfunction and COVID-19 has been confirmed in both the acute and late stages of the disease. The development of SARS-CoV-2 atypical thyroiditis is recorded in 4% of patients in the acute stage of the disease. A negative correlation between TSH and proinflammatory cytokine levels indicates thyroid tissue damage due to hyperactivation of the immune system in patients with severe COVID-19. A persistent decrease in thyroid function after COVID-19 is recorded in 9% of patients, an increase in antithyroid antibodies, which indicates the development of autoimmune thyroiditis. Six months after the onset of COVID-19, changes in the cytokine profile are noted in the group of patients with the appearance of antithyroid antibodies, characterized by an imbalance of cytokines. Biological therapy with tocilizumab has a positive effect on the immune response in patients with severe COVID-19.

#### АНАЛИЗ РЕПЕРТУАРА АНТИГЕН-СПЕЦИФИЧНЫХ В-КЛЕТОК ПРИ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ

Я.А. Ломакин<sup>1</sup>, Л.А. Овчинникова<sup>1</sup>, С.С. Джелад<sup>1</sup>, С.С. Терехов<sup>1</sup>, Т.О. Симанив<sup>2</sup>, М.Н. Захарова<sup>2</sup>, А.Г. Габиров<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, <sup>2</sup>Научный центр неврологии, отделение нейрореабилитации, Москва

Рассеянный склероз (РС) – воспалительное иммуноопосредованное заболевание центральной нервной системы (ЦНС), приводящее к нейродегенерации. На начальных этапах РС может мимикрировать под некоторые инфекционные, неопластические, генетические, метаболические, сосудистые и другие патологии. Точная дифференциальная диагностика данного заболевания важна для улучшения качества жизни пациентов и снижения возможных необратимых поражений ЦНС. В данной работе мы идентифицировали панель аутоантигенов - потенциальных биомаркеров РС (SPTAN1 + PRX + LMP1), для которых в крови и ЦСЖ пациентов наблюдается повышенный титр антиген-специфичных антител. Кроме того, в данном исследовании при помощи широкомасштабного секвенирования (NGS), микрофлюидных технологий и проточной цитофлуориметрии была создана платформа для обнаружения антиген-специфичных В-клеток, потенциально участвующих в развитии заболевания. Особенностью данной работы является анализ репертуара иммуноглобулинов с правильным сочетанием вариабельных фрагментов тяжелых и легких цепей. Помимо продукции антител, В-клетки способны участвовать в регуляции иммунного ответа. Нарушение их противовоспалительной активности может привести к ряду иммунологических патологий, в частности к аутоиммунным заболеваниям. К сожалению, на сегодняшний день точный механизм функционирования и развития регуляторных В-клеток (Breg) неизвестен. Почти ничего не известно о их специфичности и структуре их В-клеточного рецептора.

В данной работе с использованием NGS мы проанализировали репертуар В-клеточных рецепторов субпопуляции транзитных Breg CD19(+)/CD24(high)/CD38(high) у пациентов с РС. Мы впервые показали, что при развитии РС тяжелая цепь иммуноглобулинов транзитных Breg пациентов с активной формой РС содержит меньшее количество гипермутаций по сравнению со здоровыми донорами. Содержание транзитных Breg в периферической крови повышено, тогда как частота дифференцированных CD27+ клеток среди них снижена у пациентов с РС по сравнению со здоровыми донорами. Причем у пациентов с активной формой РС эта разница сильнее, чем у пациентов со стабильным течением РС.

*Исследования были проведены в рамках проекта РФФИ 22-14-00219.*

#### CHARACTERIZATION OF PATHOLOGICAL ANTIGEN-SPECIFIC B CELL REPERTOIRE IN MULTIPLE SCLEROSIS

Y.A. Lomakin<sup>1</sup>, L.A. Ovchinnikova<sup>1</sup>, S.S. Dzhelad<sup>1</sup>, S.S. Terekhov<sup>1</sup>, T.O. Simaniv<sup>2</sup>, M.N. Zakharova<sup>2</sup>, A.G. Gabibov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS; <sup>2</sup>Research Center of Neurology, Moscow

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory, immune-mediated disease of the central nervous system (CNS) that leads to neurodegeneration. In the early stages, MS can mimic various infectious, neoplastic, genetic, metabolic, vascular, and other pathologies. Accurate differential diagnosis of this disease is crucial for improving the quality of life of patients and reducing possible irreversible damage to the CNS. In this study, we identified a panel of autoantigens - potential biomarkers for MS (SPTAN1 + PRX + LMP1) that exhibit elevated levels of antigen-specific antibodies in the blood and cerebrospinal fluid of patients. Furthermore, using next-generation sequencing (NGS), microfluidic technologies, and flow cytometry, we designed a platform for isolation of antigen-specific B cells potentially involved in disease development. A distinctive feature of this work is the analysis of the immunoglobulin repertoire with the correct combination of variable fragments of heavy and light chains (VH-VL). In addition to antibody production, B cells participate in regulating the immune response. Disruption of their anti-inflammatory activity can lead to various immunological pathologies, particularly autoimmune diseases. Unfortunately, to date, the exact mechanism of functioning and development of regulatory B cells (Bregs) remains unknown. Little is known about their specificity and the structure of their B cell receptor. In this study, using NGS, we analyzed the repertoire of B cell receptors in the subpopulation of transient Bregs CD19(+)/CD24(high)/CD38(high) in patients with MS.

We demonstrated for the first time that in the development of MS, the heavy chain of immunoglobulins in transient Bregs of patients with active MS (AMS) contains fewer mutations compared to healthy donors. The proportion of transient Bregs in peripheral blood is increased, while the frequency of differentiated CD27+ cells among them is decreased in MS patients compared to healthy donors. Moreover, this difference is more pronounced in patients with AMS than in those with stable MS (SMS). Thus, it can be suggested that changes in the Breg repertoire occur early during B cell maturation in the development of MS.

*This study was funded by Russian Science Foundation Grant #22-14-00219.*



## СЕЛЕКТИВНАЯ КЛЕТЧНАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

**А.В. Степанов**

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

Терапия Т-клетками, модифицированными химерными антигенными рецепторами (CAR Т клетками), показала крайне высокую эффективность при терапии лимфом и лейкемии. Для повышения безопасности и специфичности адоптивной иммунотерапии CAR Т клетками мы разработали подход селективной элиминации опухолевых клонов, не затрагивая здоровые лимфоциты. Для поиска специфических лигандов опухолевых клеток были использованы фаговый и лентивирусный дисплей библиотек антител и пептидов, которые избирательно связываются с уникальными рецепторами на поверхности раковых клеток пациентов. Отобранные лиганды, в качестве антигенсвязывающего домена химерного антигенного рецептора позволили специфически элиминировать злокачественные клоны пациентов *in vitro* и *in vivo*. Терапия солидных опухолей с помощью CAR Т клеток ограничена малым количеством антигенов специфичных для опухоли и не представленных на здоровых тканях. Одним из возможных решений повышения безопасности и контроля над CAR Т клетками при терапии солидных опухолей после введения является создание адаптеров, которые одной частью взаимодействуют с опухолевым антигеном, а другой связываются с химерным антигенным рецептором. В нашей работе для создания адаптерных CAR был использован белковый интерфейс на основе пары барназа-барстар, который позволил контролировать цитотоксичность и специфичность CAR Т-клеток. Мы разработали слитые белки анти-HER2-DARPs, в которых барназа действует как молекулярный медиатор, ответственный за связывание CAR Т-клеток с опухолевыми HER2-положительными клетками в наномолярном диапазоне. Для создания CAR, контролируемых низкомолекулярными соединениями, мы разработали CAR, состоящий из каталитического антитела, которое образует ковалентную связь с гаптенем 1,3-дикетона. Для поиска новых опухоль-специфичных низкомолекулярных адаптеров был использован дисплей библиотеки химических соединений баркодированной ДНК (DNA encoded library, DEL). Созданные адаптеры избирательно связывались с опухолевыми клетками и позволили контролировать цитотоксичность и специфичность ковалентных CAR Т-клеток *in vitro* и *in vivo*.

## IMPROVING CONTROL AND SPECIFICITY OF CAR T CELLS

**A.V. Stepanov**

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

Efficient and specific removal of malignant cells is the ultimate goal of cancer therapy. The current rapid development of chimeric antigen receptor T-cell (CAR T-cell) therapy potentially provides high efficiency and allows long-term surveillance, which have greatly extended the frontier of leukemia treatment. We developed a new strategy for safe and specific depletion of cancerous cells without affecting any other normal tissues. Our approach combines the cutting-edge technologies of cancer therapy, gene therapy and drug safety. The technology platform was designed to utilize an established screening technique to identify polypeptide domains that selectively bind to the unique receptors on the surface of individual lymphoma and leukemia patient's cells. This tumor-selective targeting domain is engineered into the antigen-binding domain of a chimeric antigen receptor, creating the possibility of a CAR T treatment that should only recognize malignant clones in a given patient. However, the fact that there are very few truly tumor-specific antigens limits the availability of targeting antibodies required for the construction of CAR T cells. We propose spatially separate the cytotoxic function of CAR T cells from tumor antigen recognition by protein or small-drug mediators that allows the precise control of CAR T cell cytotoxicity. We developed a proteinaceous barnase-barstar interface as a novel on/off switch module of the CAR T cell cytotoxic effects. We designed fusion proteins of anti-HER2 DARPs, with barnase acting as a molecular mediator responsible for the binding of CAR T cells to tumor HER2-positive cells in the nanomolar range. To generate the small-drug switchable CARs we designed a CAR consisting of an antibody with a lysine residue that catalytically forms a covalent bond with a 1,3-diketone hapten. This adapter selectively binds to the hapten and to a chosen tumour antigen via a small-molecule binder identified via a DNA-encoded library. The adapter therefore controls the formation of a covalent bond between the catalytic antibody and the hapten, as well as the tethering of the CAR T cells to the tumour cells, and hence the cytotoxicity and specificity of the cytotoxic T cells, as we show *in vitro* and *in mice* with prostate cancer xenografts.

## СРАВНЕНИЕ СНА-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛАНДШАФТОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ЛЕГКОГО, ГОРТАНИ, ЯИЧНИКА, ШЕЙКИ МАТКИ И КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА, СВЯЗЬ С ОСОБЕННОСТЯМИ И ИСХОДОМ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Н.В. Литвяков, М.К. Ибрагимова, И.А. Цыденова, Д.С. Долгашева, Е.А. Гаптулбарова, Е.А. Кравцова

*НИИ онкологии Томского НИМЦ, Томск*

Проведен микроматричный анализ СНА-генетического ландшафта опухолевой ткани, молочной железы (РМЖ), легкого (РЛ), гортани (РГ), яичника (РЯ), шейки матки (РШМ), колоректального рака (КРР) от 50 до 100 образцов в каждой локализации. По частоте амплификаций (Gain) опухоли, от наименьшей к наибольшей можно выстроить следующим образом: РШМ (50,3±9,8), РЛ (91,7±8,6), РМЖ (143,6±15,3), КРР (143,7±11,5), РГ (190,1±22,8), РЯ (215,9±26,0). Аналогично, по частоте делеций (Loss): РШМ (72,2±22,5), РЛ (115,9±13,8), РМЖ (156,7±40,0), КРР (173,4±18,3), РГ (194,1±27,5), РЯ (255,5±40,9). Наибольшая частота Gain у больных РШМ определяется в длинном плече 2 хромосомы, у больных РЛ в коротком плече 5 хромосомы, у больных РМЖ в длинном плече 1 и 8 хромосом, у больных КРР в длинном плече 19 и 12 хромосом и коротком плече 13 хромосомы, у больных РГ в длинном плече 3 и 8 хромосом, также, как и у больных РЯ. Наибольшая частота Loss у больных РШМ в коротком плече 14 и 15 хромосом, у больных РЛ в коротком плече 3 хромосомы, у больных РМЖ в коротком плече 3 и 17 хромосом, у больных КРР в длинном плече 7, 16 хромосом и в 17 хромосоме, у больных РГ в коротком плече 3 хромосомы, у больных РЯ в длинном плече 7 и 16 хромосом. В большинстве этих локусов располагаются гены стволовости и некоторые гены WNT-сигналинга. Как показали наши исследования амплификации генов стволовости ассоциированы с метастазированием, амплификации активаторов WNT-сигналинга и делеции негативных регуляторов также ассоциированы с резистентностью к терапии и метастазированием [Litviakov N.V. et al., 2020 doi.org/10.18632/oncotarget.27608, Litviakov N.V. et al., 2020 doi.org/10.21294/1814-4861-2020-19-3-78-88]. На следующем этапе был проведен анализ ассоциации наличия в опухоли амплификаций генов стволовости и СНА (Gain и Loss) генов WNT-сигналинга с исходом при изученных локализациях. Было установлено, что при помощи этих маркеров возможно прогнозировать исход (безметастатическую выживаемость и выживаемость без прогрессирования) для всех 6-ти локализаций с диагностической точностью (по сумме чувствительности и специфичности /2) в пределах 78-89,5%. Это показывает универсальность прогностической значимости маркеров генов стволовости и WNT-сигналинга.

## COMPARISON OF CNA-GENETIC LANDSCAPES OF BREAST, LUNG, LARYNX, OVARY, CERVIX AND COLORECTAL CANCER, ASSOCIATION WITH CHARACTERISTICS AND OUTCOME OF THE DISEASE

N.V. Litviakov, M.K. Ibragimova, I.A. Tsydenova, D.S. Dolgasheva, E.A. Gaptulbarova, E.A. Kravtsova

*Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk*

We studied of the CNA-genetic landscape of tumor tissue was performed: breast (BC), lung (LC), larynx (LT), ovary (OC), cervix (CC), colorectal cancer (CRC) from 50 to 100 samples in each localization. According to the tumor amplification frequency (Gain), from the lowest to the highest, they can be arranged as follows: CC (50.3±9.8), LC (91.7±8.6), BC (143.6±15.3), CRC (143.7±11.5), LT (190.1±22.8), OC (215.9±26.0). Similarly, according to the deletion frequency (Loss): CC (72.2±22.5), LC (115.9±13.8), BC (156.7±40.0), CRC (173.4±18.3), LT (194.1±27.5), OC (255.5±40.9). The highest frequency of Gain in patients with CC is determined in the long arm of chromosome 2, in patients with LC in the short arm of chromosome 5, in patients with BC in the long arm of chromosomes 1 and 8, in patients with CRC in the long arm of chromosomes 19 and 12 and the short arm of chromosome 13, in patients with LT in the long arm of chromosomes 3 and 8, as well as in patients with OC. The highest frequency of Loss in patients with CC in the short arm of chromosomes 14 and 15, in patients with LC in the short arm of chromosome 3, in patients with BC in the short arm of chromosomes 3 and 17, in patients with CRC in the long arm of chromosomes 7, 16 and chromosome 17, in patients with LT in the short arm of chromosome 3, in patients with OC in the long arm of chromosomes 7 and 16. Most of these loci contain stemness genes and some genes WNT signaling. As our studies have shown, amplification of stemness genes is associated with metastasis, amplification of WNT signaling activators and deletions of negative regulators are also associated with resistance to therapy and metastasis [doi.org/10.18632/oncotarget.27608, doi.org/10.21294/1814-4861-2020-19-3-78-88]. At the next stage, an analysis of the association of the presence of amplifications of stemness genes and CNA of WNT signaling genes in the tumor with the outcome in the studied localizations was carried out. It was established that using these markers it is possible to predict the outcome (metastatic-free survival and progression-free survival) for all 6 localizations with a diagnostic accuracy within 78-89.5%. This demonstrates the universality of the prognostic significance of stemness gene markers and WNT signaling.

## НОВАЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ СТРАТЕГИЯ, НАПРАВЛЕННАЯ НА МОДУЛЯЦИЮ СПЛАЙСИНГА И ПОВРЕЖДЕНИЕ ДНК В ЛЕЧЕНИИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ

Е.А. Свирина<sup>1</sup>, М.М. Лукина<sup>1,2</sup>, К.С. Ануфриева<sup>1</sup>, П.В. Шнайдер<sup>1,2</sup>, О.М. Иванова<sup>1,2</sup>, А.О. Гончаров<sup>1</sup>, М.А. Лагарькова<sup>1</sup>, В.М. Говорун<sup>4</sup>, Г.П. Арапиди<sup>1,3</sup>, В.О. Шендер<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва; <sup>2</sup>Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва; <sup>3</sup>ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; <sup>4</sup>НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва

Существенным минусом современной противоопухолевой терапии является возникновение химиорезистентности опухолей, в связи с этим, поиск новых терапевтических подходов и агентов является актуальной задачей. Поскольку сплайсинг мРНК представляет собой терапевтическую уязвимость для множества видов опухолей, сплайсосома может быть использована в качестве мишени для новых терапевтических агентов. Хотя малые молекулы, ингибирующие сплайсинг, были протестированы в клинических исследованиях, механизм их цитотоксического действия до конца не изучен. Ранее мы показали, что низкие дозы модулятора сплайсинга не вызывают гибели нормальных и опухолевых клеток, но значительно увеличивают чувствительность последних к цисплатину [Anufrieva K.S. et al./Genome Med, 2018]. Однако, механизм действия данной комбинации не был установлен.

Мы предложили последовательное введение модулятора сплайсинга (Пладиенолида В) и ДНК повреждающего агента (цисплатина). Предварительная обработка опухолевых клеток Пладиенолидом В приводила к снижению экспрессии и нарушению сплайсинга генов ДНК репарации. Последующее добавление цисплатина приводило к нарушению сигнальных путей, важных для ответа опухолевых клеток на повреждение ДНК (репарация ДНК, регуляция клеточного цикла).

Таким образом, мы продемонстрировали эффективность данной комбинации как на клеточных культурах *in vitro*, так и на опухолевых моделях *in vivo*. Более того, наша комбинация оказалась эффективной для резистентных линий опухолевых клеток, что указывает на ее потенциал для широкого применения в лечении онкологии.

Работа поддержана грантом РФФИ №22-15-00462 (за LC-MS/MS анализ) и грантом 075-15-2019-1669 Министерства науки и высшего образования РФ (за RNAseq).

## A NOVEL THERAPEUTIC STRATEGY COMBINING SPLICEOSOME MODULATION AND DNA-DAMAGING AGENTS IN CANCER TREATMENT

Е.А. Svirina<sup>1</sup>, М.М. Lukina<sup>1,2</sup>, К.С. Anufrieva<sup>1</sup>, P.V. Shnaider<sup>1,2</sup>, O.M. Ivanova<sup>1,2</sup>, A.O. Goncharov<sup>1</sup>, M.A. Lagarkova<sup>1</sup>, V.M. Govorun<sup>4</sup>, G.P. Arapidi<sup>1,3</sup>, V.O. Shender<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency of Russia, Moscow; <sup>2</sup>Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency of Russia, Moscow; <sup>3</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow; <sup>4</sup>Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow

A significant disadvantage of modern antitumor therapy is the emergence of tumor chemoresistance. Therefore, the search for new therapeutic approaches and agents is an urgent priority. Since mRNA splicing is a therapeutic vulnerability in many types of tumors, the spliceosome presents a promising target for novel therapeutic agents. Although small molecules that inhibit splicing have been tested in clinical studies, the precise mechanisms underlying their cytotoxic effects remain incompletely understood. Previously, we demonstrated that low doses of splicing modulators do not induce cell death in either normal or tumor cells but significantly increase the sensitivity of tumor cells to cisplatin [Anufrieva K.S. et al./Genome Med, 2018]. However, the exact mechanism behind this synergistic effect was not established.

We proposed a sequential treatment strategy involving a splicing modulator (Pladienolide B) followed by a DNA-damaging agent (cisplatin). Pretreatment of tumor cells with Pladienolide B resulted in decreased expression and disrupted splicing of DNA repair genes. Subsequent exposure to cisplatin further disrupted signaling pathways crucial for the tumor cell response to DNA damage, including those involved in DNA repair and cell cycle regulation.

Our results demonstrated the effectiveness of this combination in both *in vitro* cell cultures and *in vivo* tumor models. Furthermore, this combination was effective against resistant tumor cell lines, suggesting its potential for broader application in cancer therapy.

This work was supported by the Russian Science Foundation project no. 22-15-00462 (for LC-MS/MS analysis) and grant 075-15-2019-1669 from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (for RNAseq).

## ИЗУЧЕНИЕ ОПУХОЛЬ-СУПРЕССИРУЮЩЕЙ ПОПУЛЯЦИИ ФИБРОБЛАСТОВ И ЕЕ ВЛИЯНИЯ НА КЛЕТКИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКА

А.Н. Казакова<sup>1,2,3</sup>, К.С. Ануфриева<sup>2</sup>, М.М. Лукина<sup>1,2</sup>, О.М. Иванова<sup>1,2</sup>, П.В. Шнайдер<sup>1,2</sup>, В.О. Шендер<sup>2,4</sup>, Г.П. Арапиди<sup>2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА; <sup>2</sup>ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА; <sup>3</sup>Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет); <sup>4</sup>ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Самыми высоко представленными клетками опухолевого микроокружения являются опухоль-ассоциированные фибробласты (ОАФ). В последние два десятилетия появляется все больше доказательств того, что ОАФ обладают широким спектром онкогенных функций и вносят свой вклад на каждом этапе формирования опухоли, включая ее прогрессию и метастазирование. Поэтому ОАФ рассматриваются научным сообществом, как потенциальные мишени для противоопухолевой терапии. Однако на данный момент нет ни одной работающей терапевтической стратегии для лечения онкологических заболеваний, нейтрализующей активность ОАФ. Во многом, это объясняется отсутствием специфичных для ОАФ маркеров среди клеток опухоли и ее микроокружения. Кроме того, текущие стратегии терапии нацелены на истощения всех ОАФ, и не учитывают их гетерогенную природу. Отдельные популяции ОАФ могут проявлять как опухолестимулирующие, так и опухолесупрессивные свойства. Перепрограммирование фенотипа ОАФ к единой противоопухолевой популяции представляется более эффективной стратегией. Тем не менее, разработка таких терапевтических агентов требует четкого понимания того, какие популяции ОАФ в опухолях обладают исключительно опухолесупрессивными свойствами.

В данной работе мы всесторонне изучили отличительные особенности транскриптома ОАФ 11 различных типов опухолей на основании биоинформатического анализа большого массива данных РНК секвенирования. Создание собственного алгоритма поиска маркеров позволило нам выявить список генов, которые специфичны для ОАФ во всех или хотя бы в нескольких исследуемых типах опухолей. На основании всестороннего изучения особенностей транскриптома ОАФ в опухолях яичника была идентифицирована популяция, которая вызывает подавляющий опухоль эффект. Анализ данных секвенирования одиночных клеток опухоли яичника выявил, что данная популяция специфично экспрессирует маркер ОАФ *CCL11*, а также гены, которые активируются в ответ на воздействие IFN $\gamma$ . Нами была получена линия клеток дермальных фибробластов со стабильной сверхэкспрессией гена *CCL11* и добавлением IFN $\gamma$ . Было показано, что секретом полученных фибробластов приводит к увеличению чувствительности опухолевых клеток к химиотерапевтическим агентам, а также снижает их способность к миграции.

*Работа была поддержана грантом Министерства науки и высшего образования 075-15-2019-1669.*

## INVESTIGATING TUMOR-SUPPRESSING FIBROBLAST POPULATION AND ITS IMPACT ON OVARIAN ADENOCARCINOMA CELLS

A.N. Kazakova<sup>1,2,3</sup>, K.S. Anufrieva<sup>2</sup>, M.M. Lukina<sup>1,2</sup>, O.M. Ivanova<sup>1,2</sup>, P.V. Shnaider<sup>1,2</sup>, V.O. Shender<sup>2,4</sup>, G.P. Arapidi<sup>2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency; <sup>2</sup>Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency; <sup>3</sup>Moscow Institute of Physics and Technology (State University); <sup>4</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow

The most highly represented cells in the tumor microenvironment are cancer-associated fibroblasts (CAFs). Over the past two decades, there has been increasing evidence that CAFs have a broad range of oncogenic functions and contribute to every stage of tumor development, including its progression and metastasis. Consequently, CAFs have been considered by the scientific community as potential targets for anti-tumor therapy. However, to date, there is no effective therapeutic strategy for treating cancer that neutralizes CAF activity. This is largely due to the lack of specific markers for CAFs among tumor cells and their microenvironment. Additionally, current therapeutic strategies aim at depleting all CAFs and do not take into account their heterogeneous nature. Different CAF populations can exhibit either tumor-promoting or tumor-suppressing properties. Reprogramming CAFs to a unified anti-tumor population appears to be a more effective strategy. Nonetheless, developing such therapeutic agents requires a clear understanding of which CAF populations in tumors possess exclusively tumor-suppressive properties.

In this study, we extensively examined the distinctive features of the transcriptome of CAFs from 11 different types of tumors using bioinformatics analysis of a large RNA sequencing dataset. The creation of our own CAF marker discovery algorithm allowed us to identify a list of genes that are specific to CAFs in all or at least some of the studied tumor types. Based on a comprehensive study of the transcriptome features of CAFs in ovarian tumors, a population that exerts a dominant tumor-suppressive effect was identified. Analysis of single-cell sequencing data from ovarian tumors revealed that this population specifically expresses the CAF marker *CCL11*, as well as genes that are activated in response to IFN $\gamma$  exposure. We generated a line of dermal fibroblasts with stable overexpression of the *CCL11* gene and the addition of IFN $\gamma$ . It was demonstrated that the secretome of these fibroblasts increases the sensitivity of tumor cells to chemotherapeutic agents and reduces their migratory capacity.

*The work was supported by the grant of the Ministry of Science and Higher Education 075-15-2019-1669.*

## ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА АСПАРАГИНСИНТЕТАЗЫ КАК ПРЕДИКТОР ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ К L-АСПАРАГИНАЗЕ

**И.А. Кисляк, В.С. Покровский**

*Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы Минобрнауки РФ; НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина МЗ РФ, Москва*

Онкологические заболевания остаются одной из основных причин смертности в мире, а химиотерапия – важным компонентом многих схем лечения. L-аспарагиназа успешно применяется в терапии многих лейкозов, но её иммуногенность и неэффективность в ряде случаев ограничивают её использование. В связи с этим важным представляется обнаружение маркёров, с помощью которых можно превентивно оценить эффективность терапии L-аспарагиназой конкретного онкологического заболевания. Особый интерес представляет меланома – крайне агрессивная опухоль, склонная к активному метастазированию.

Цель исследования. Определить связь уровней экспрессии генов аспарагинсинтетазы (ASNS) и глутаминсинтетазы (GLUL) в клеточных линиях меланомы и их чувствительности к L-аспарагиназе *in vitro*.

Исследования проводили на шести клеточных линиях меланомы: SK-Mel-28, Mel P, Mel Z, Mel IL, Mel Kor, Mel CherK. Клетки пассировали в культуральных флаконах в средах RPMI и DMEM. Цитотоксичность L-аспарагиназы оценивали с помощью МТТ-теста. Уровни экспрессии генов ASNS и GLUL определяли с помощью ПЦР с обратной транскрипцией. Значения генной экспрессии выражали как отношение к средней экспрессии трёх контрольных генов: генов GAPDH, 18S рРНК и β-актина.

Обнаружено, что более высокие уровни экспрессии гена ASNS (в диапазоне значений 5,26-7,38) связаны с меньшей чувствительностью клеток меланомы к L-аспарагиназе (диапазон IC<sub>50</sub> 87-95 МЕ/мл), в то время как низкие уровни экспрессии гена ASNS (диапазон 0,75-4,1) связаны с большей чувствительностью (диапазон IC<sub>50</sub> 13-18 МЕ/мл). Для уровня экспрессии GLUL связь с цитотоксичностью нами не установлена.

В пилотном эксперименте установлена взаимосвязь уровня экспрессии гена аспарагинсинтетазы и чувствительности клеток меланомы к L-аспарагиназе. Определение экспрессии гена ASNS в перспективе может выявить более чувствительные к терапии аспарагиназой линии клеток меланомы.

## EXPRESSION OF THE ASPARAGINE SYNTHETASE GENE AS A PREDICTOR OF MELANOMA SENSITIVITY TO L-ASPARGINASE

**I.A. Kislyak, V.S. Pokrovsky**

*Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia; N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow*

Cancer remains one of the leading causes of death in the world, and chemotherapy is an important component of many treatment regimens. L-asparaginase is successfully used for the treatment of many leukemias, but its immunogenicity and inefficiency in some cases limit its use. In this regard, it is important to detect markers that can be used to preventively assess the effectiveness of L-asparaginase therapy for a specific oncological disease. Of particular interest is melanoma, an extremely aggressive tumor prone to active dissemination.

Aim of the study. To determine the relationship between the expression of asparagine synthetase (ASNS) and glutamine synthetase (GLUL) genes in melanoma cell lines and their sensitivity to L-asparaginase *in vitro*.

Six melanoma cell lines were used: SK-Mel-28, Mel P, Mel Z, Mel IL, Mel Kor, Mel CherK. The cells were passaged in culture flasks in RPMI and DMEM media. The cytotoxicity of L-asparaginase was assessed using MTT test. The expression levels of the ASNS and GLUL genes were determined using reverse transcription PCR. Gene expression values were expressed as a ratio to the average expression of three control genes: GAPDH, 18S rRNA and β-actin genes.

It was found that higher levels of ASNS gene expression (in the range of 5.26–7.38) were associated with lower sensitivity of melanoma cells to L-asparaginase (IC<sub>50</sub> range 87–95 IU/ml), while low levels of ASNS gene expression (range 0.75–4.1) were associated with higher sensitivity (IC<sub>50</sub> range 13–18 IU/ml). We did not find a relationship between the GLUL expression level and cytotoxicity.

In a pilot experiment, it was found that the level of asparagine synthetase gene expression and the sensitivity of melanoma cells to L-asparaginase are linked. Determination of ASNS gene expression may reveal melanoma cell lines that are more sensitive to asparaginase therapy.

### ОСОБЕННОСТИ ИММУНОФЕНОТИПОВ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКИ

А.С. Авдеева, А.П. Алексанкин, Е.В. Четина, Ю.Н. Горбунова, Т.В. Попкова, Г.А. Маркова, Т.А. Панафидина, Е.Л. Насонов

*НИИ ревматологии им. В.А. Насоновой, Москва*

Цель исследования – оценить субпопуляции В-лимфоцитов и особенности интерферонового (ИФН) статуса у пациентов с системной красной волчанкой (СКВ), уточнить взаимосвязь иммунологических показателей с клиническими проявлениями болезни.

В анализ было включено 139 пациентов (123 (88%) женщины и 16 (12%) мужчин) с достоверным диагнозом СКВ. Длительность заболевания составила 3,0 [0,3; 12,0] года, SLEDAI-2K (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000) – 7 [4; 11] баллов, SDI (Systemic Lupus International Collaborating Clinics Damage Index) – 0 [0; 1] баллов. Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови, включая определение В-клеток, общей популяции В-клеток памяти, непереключенных и переключенных В-клеток памяти, наивных, транзиторных В-клеток, плазмобластов, проводилось методом многоцветной проточной цитофлуориметрии. ИФН-статус оценивали по экспрессии ИФН-стимулированных генов (MX1, RSAD2, EPSTI1) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени

ИФН «автограф» присутствовал у 55 (72,4%) пациентов и отсутствовал у 21 (27,6%) больных. Пациенты с наличием ИФН «автографа» имели более высокие значения АНФ, антител к dsДНК, Sm,  $p < 0,05$ . У пациентов с СКВ отмечалась более высокая ПК и абс. уровень В клеток памяти; ПК не переключенных клеток памяти, ПК и абсолютного уровня плазматических клеток, плазмобластов и транзиторных В лимфоцитов,  $p < 0,05$ . Среди пациентов с наличием ИФН «автографа» отмечался более низкий уровень общей популяции В лимфоцитов (абс 0,078 (0,052-0,167) и 0,179 (0,12-0,31)), В клеток памяти (абс 0,017 (0,009-0,034) и 0,037 (0,03-0,13)), транзиторных В лимфоцитов (абс 0,009 (0,004-0,017) и 0,021 (0,008-0,05)), а также более высокий уровень плазмобластов (ПК 2,855 (0,93-4,99) и 1,03 (0,28-3,0)) соответственно,  $p < 0,05$ .

Результаты работы позволяют говорить о широком разнообразии иммунных механизмов, лежащих в основе патогенеза СКВ. Можно выделить ряд ведущих молекулярных «паттернов» патогенеза заболевания, которые необходимо учитывать для выбора эффективного «таргетного» препарата.

### FEATURES OF IMMUNOPHENOTYPES SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

A.S. Avdeeva, A.P. Aleksankin, E.V. Tchetina, Yu.N. Gorbunova, T.V. Popkova, G.A. Markova, T.A. Panafidina, E.L. Nasonov  
*V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow*

The aim: to evaluate subpopulations of B lymphocytes and features of interferon (IFN) status in patients with systemic lupus erythematosus (SLE), to clarify the relationship of immunological parameters with clinical manifestations of the disease.

139 patients (123 (88%) women and 16 (12%) men) with a definite diagnosis of SLE were included in the analysis. The disease duration was 3.0 [0.3; 12.0] years, SLEDAI-2K (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000) – 7 [4; 11] points, SDI (Systemic Lupus International Collaborating Clinics Damage Index) – 0 [0; 1] points. Immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes, including determination of B cells, the general population of memory B cells, non-switched and switched memory B cells, naive, transient B cells, and plasmablasts was carried out using multicolor flow cytometry. IFN status was assessed by the expression of IFN-stimulated genes (MX1, RSAD2, EPSTI1) using real-time polymerase chain reaction.

IFN signature was present in 55 (72.4%) patients and absent in 21 (27.6%) patients. Patients with the presence of IFN signature had higher values of ANA, antibodies to dsDNA, Sm,  $p < 0.05$ . Patients with SLE had a higher absolute level of B memory cells; non-switched memory cells, plasma cells, plasmablasts and transient B lymphocytes,  $p < 0.05$ . Among patients with the presence of IFN signature was noted to have a lower level of the total population of B lymphocytes (abs 0.078 (0.052-0.167) and 0.179 (0.12-0.31)), memory B cells (abs 0.017 (0.009-0.034) and 0.037 (0.03-0.13)), transient B lymphocytes (abs 0.009 (0.004-0.017) and 0.021 (0.008-0.05)), as well as a higher level of plasmablasts (2.855 (0.93-4.99) and 1.03 (0.28-3.0)) respectively,  $p < 0.05$ .

The results of the work suggest a wide variety of immune mechanisms underlying the pathogenesis of SLE. It is possible to identify a number of leading molecular “patterns” of the pathogenesis of the disease, which must be taken into account to select an effective “targeted” drug.

#### РЕЦЕПТОР CD44 В МЕТАСТАЗИРОВАНИИ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

Д.В. Мальцева, А. Эверест-Дасс, С. Нерсисян, Х. Маар, В.О. Новосад, Дж. Шрёдер-Шварц, В. Фрайтаг, Дж.Л. Штуке, М.С. Байне, А. Шике, М. Кригс, О. Елакад, Г. Боненбергер, Л.-К. Конради, М.П. Райгородская, Л. Краузе, М. Итцштайн, А.Г. Тоневицкий, У. Шумахер, Д. Викляейн, Т. Ланге  
*Факультет биологии и биотехнологии НИУ ВШЭ, Москва*

Гематогенное метастазирование — основная клиническая проблема при колоректальном раке (КРР). В работе исследовалась функциональная значимость изоформ рецептора CD44 в этом процессе. На основании данных мРНК-секвенирования было выявлено, что у пациентов с КРР преимущественно экспрессируются изоформы 3 и 4 рецептора CD44. Причем, более высокая экспрессия изоформы 4 коррелировала с неблагоприятным исходом для пациентов, эпителиально-мезенхимальной трансформацией (ЭМТ) и сниженным окислительного фосфорилирования (OxPhos) в клетках опухолей. Высокая экспрессия изоформы 3, наоборот, коррелировала с лучшим прогнозом для пациентов, снижением ЭМТ и увеличением OxPhos. Нокдаун CD44 в клетках HT-29 способствовал замедлению роста первичной опухоли в иммунодефицитных мышах и уменьшению количества отдаленных метастазов. Как и клинические образцы пациентов с КРР ксенотрансплантантные опухоли экспрессировали в основном изоформы 3 и 4 рецептора CD44. Экспрессия обеих изоформ была повышена в паранекротической области ксенотрансплантантных опухолей, однако отсутствовала в метастазах в легкие. Нокдаун CD44 способствовал ангиогенезу в паранекротических областях опухолей, что также сопровождалось снижением экспрессии HIF-1 $\alpha$  и CEACAM5, и увеличением экспрессии E-кадгерина. Также в результате нокдауна CD44 наблюдалась индукция экспрессии митохондриальных генов/белков и генов OxPhos. Культивирование 3D сфероидов HT-29 в условиях гипоксии стимулировало секрецию VEGF, которая значительно усиливалась при нокдауне CD44. Выявленная прометастатическая роль CD44 согласовывалась с выявленной неблагоприятной прогностической значимостью изоформы 4 CD44 (в отличие от изоформы 3) у пациентов. Кроме того, гены, экспрессия которых изменилась в результате нокдауна CD44, значительно перекрывались с генами, экспрессия которых коррелирует с высокой экспрессией изоформы 4 CD44 у пациентов. Таким образом, нокдаун CD44 способствует значительному снижению метастазирования, посредством стимулирования продукции VEGF и ангиогенеза в опухоли в условиях гипоксии, что также сопровождается снижением ЭМТ и стимулированием OxPhos. Используемый в работе интегративный подход к анализу указывает на то, что все эти эффекты обусловлены преимущественно снижением экспрессии изоформы 4 рецептора CD44.

#### CD44 RECEPTOR IN COLORECTAL CANCER METASTASIS

D. Maltseva, A. Everest-Dass, S. Nersisyan, H. Maar, V. Novosad, J. Schroder-Schwarz, V. Freytag, J.L. Stuke, M.C. Beine, A. Schiecke, M.-T. Haider, M. Kriegs, O. Elakad, H. Bohnenberger, L.-C. Conradi, M. Raygorodskaya, L. Krause, M. von Itzstein, A. Tonevitsky, U. Schumacher, D. Wicklein, T. Lange  
*Faculty of Biology and Biotechnology, HSE University, Moscow*

Hematogenous metastasis is the main clinical problem in colorectal cancer (CRC). In our work we investigated the functional significance of CD44 receptor isoforms in this process. Based on mRNA-Seq data, it was revealed that isoforms 3 and 4 of the CD44 receptor are predominantly expressed in patients with CRC. Moreover, higher expression of CD44 isoform 4 correlated with an unfavorable outcome for patients, epithelial-mesenchymal transformation (EMT) and reduced oxidative phosphorylation (OxPhos) in tumor cells. High expression of isoform 3, on the contrary, correlated with a better prognosis for patients, a decrease in EMT and an increase in OxPhos. Knockdown of CD44 in HT-29 cells contributed to a slowdown in primary tumor growth in immunodeficient mice and a decrease in the number of distant metastases. Similar to clinical samples from CRC patients, xenograft tumors expressed mainly CD44 isoforms 3 and 4. Expression of both isoforms was increased in the paranecrotic region of xenograft tumors, but was absent in lung metastases. CD44 knockdown promoted angiogenesis in paranecrotic areas of tumors, which was also accompanied by a decrease in HIF-1 $\alpha$  and CEACAM5 expression, and an increase in E-cadherin expression. Induction of mitochondrial genes/proteins and OxPhos genes was also observed as a result of CD44 knockdown. Cultivation of HT-29 3D spheroids under hypoxic conditions stimulated VEGF secretion, which was significantly enhanced by CD44 knockdown. The identified prometastatic role of CD44 was consistent with the identified poor prognostic significance of CD44 isoform 4 (but not isoform 3) in patients. In addition, genes whose expression was altered by CD44 knockdown significantly overlapped with genes whose expression correlates with high CD44 isoform 4 expression in patients. Thus, CD44 knockdown significantly reduces metastasis by stimulating VEGF production and tumor angiogenesis under hypoxic conditions, which is also accompanied by a decrease in EMT and stimulation of OxPhos. The integrative analysis approach used in this work indicates that all these effects are primarily due to a decrease in CD44 isoform 4 expression.

### ЛАМИНИНЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

**Д.В. Мальцева, В. Галатенко, А. Галатенко, М. Райгородская, С. Родин, А. Тоневицкий**

*Факультет биологии и биотехнологии, НИУ ВШЭ, Москва*

Значительную роль в развитии и прогрессировании опухолей, а также в их устойчивости к химиотерапии играет взаимодействие опухолевых клеток с микроокружением. Важнейшие компоненты микроокружения опухоли — белки внеклеточного матрикса (ВМ), которые могут нарабатываться как опухолевыми клетками, так и другими клетками, окружающими опухоль (фибробласты, клетки иммунной системы, эндотелиальные клетки сосудов). Самый ближайший слой белков ВМ составляют ламинины (ЛМ), которые формируют базальную мембрану. Взаимодействуя с рецепторами на поверхности клетки, преимущественно интегринами, ЛМ способны запускать внутриклеточные сигналы, оказывающие влияние на различные процессы жизнедеятельности клетки и баланс между сигналами выживания и апоптоза.

В настоящей работе исследовалось влияние ламининов на свойства клеток колоректального рака (КРР). Анализ прогностической значимости экспрессии цепей ламининов, а также их совокупностей в опухолях пациентов показал, что при КРР, по-видимому, наиболее значимыми являются альфа5 и альфа4 цепи ламининов.

Последующая оценка влияния адгезии клеток КРР на различных ламининах на их чувствительность к химиотерапевтическим препаратам 5-фторурацил (5-FU) и регорафениб выявила значимый эффект только в случае ЛМ-521, содержащего альфа5 цепь. Однако степень и направления влияния различалась для разных клеточных линий, что может объясняться различием профиля рецепторов ламининов на поверхности этих клеток. Исследование влияния ЛМ на эпителиально-мезенхимальные свойства клеток также выявило зависимость эффекта от профиля экспрессии рецепторов ЛМ, а также от степени выраженности эпителиального/мезенхимального фенотипа в исходных клетках. Нокаун гена альфа5 цепи ламининов (LAMA5) к клетках HT-29 был ассоциирован с ER-стрессом и частичной дедифференцировкой опухолевых клеток, а также увеличением чувствительности клеток к 5-FU.

Таким образом, ламинины, действительно, влияют на свойства клеток КРР. Среди цепей ламининов, продуцируемых опухолевыми клетками КРР эндогенно, по-видимому, наибольшей значимость обладает альфа5 цепь. Совместный анализ экспрессии ламининов и их рецепторов, а также выраженности эпителиальных/мезенхимальных свойств, позволит получить более точную информацию о механизмах влияния ЛМ, и предложить способы для их модуляции.

### LAMININS IN THE PATHOGENESIS OF COLORECTAL CANCER

**D. Maltseva, V. Galatenko, A. Galatenko, M. Raygorodskaya, S. Rodin, A. Tonevitsky**

*Faculty of Biology and Biotechnology, HSE University, Moscow*

The interaction of tumor cells with the microenvironment plays a significant role in the development and progression of tumors, as well as their resistance to chemotherapy. The most important components of the tumor microenvironment are extracellular matrix (ECM) proteins, which can be produced by both tumor cells and other cells surrounding the tumor (fibroblasts, immune system cells, vascular endothelial cells). The closest layer of ECM proteins is made up of laminins (LM), which form the basement membrane. By interacting with cell surface receptors, primarily integrins, LM are able to trigger intracellular signals that affect various processes of cell activity and the balance between survival and apoptosis signals. In this work, we studied the effect of laminins on the properties of colorectal cancer (CRC) cells. Analysis of the prognostic significance of the expression of individual laminin chains, as well as their sets, in patient tumors showed that in CRC, the most significant are probably the  $\alpha 5$  and  $\alpha 4$  laminin chains.

Subsequent assessment of the effect of CRC cell adhesion to various laminins on their sensitivity to the chemotherapeutic drugs 5-fluorouracil (5-FU) and regorafenib revealed a significant effect only in the case of LM-521, which contains the  $\alpha 5$  chain. However, the degree and direction of the effect varied for different cell lines, which can be explained by the difference in the profile of laminin receptors on the surface of these cells. The study of the effect of LM on the epithelial-mesenchymal properties of cells also revealed the dependence of the effect on the expression profile of LM receptors, as well as on the degree of expression of the epithelial/mesenchymal phenotype in the original cells. Knockdown of the laminin  $\alpha 5$  chain (LAMA5) gene in HT-29 cells was associated with ER stress and partial dedifferentiation of tumor cells, as well as increased cell sensitivity to 5-FU.

Thus, laminins do affect the properties of CRC cells. Among the laminin chains produced endogenously by CRC cells, the  $\alpha 5$  chain appears to be the most significant. Joint analysis of the expression of laminins and their receptors, as well as the manifestation of epithelial/mesenchymal properties, will provide more accurate information on the mechanisms of LM influence and suggest methods for their modulation.



## ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ABCB1, GSTP1 И GSTT1 У БЕРЕМЕННЫХ С ОНКОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

М.А. Капралова<sup>1</sup>, Т.М. Заварыкина<sup>1,2</sup>, Е.В. Козырко<sup>2</sup>, Е.А. Лузина<sup>2</sup>, П.К. Ломскова<sup>1</sup>, Д.А. Байгазиева<sup>2</sup>, С.В. Хохлова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН; <sup>2</sup>НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова Минздрава России, Москва

Онкологические заболевания во время беременности стали в последние несколько лет крайне острым вопросом, затрагивающим одновременно несколько направлений медицинской науки. Известно, что одна на тысячу беременностей осложняется раком. Наиболее часто встречающимися при этом солидными опухолями являются рак молочной железы (РМЖ), рак шейки матки (РМШ), рак яичника (РЯ). В зависимости от вида рака применяются различные схемы лечения, в частности, цитостатическая химиотерапия. С транспортом лекарственных веществ, применяющихся в лечении онкологических заболеваний, тесно связаны транспортные белки, отвечающие за их перенос через плазматическую мембрану клетки. К ним относится суперсемейство ABC-транспортёров, осуществляющее активный транспорт лекарственных веществ. Ген ABCB1 кодирует р-гликопротеин, который является наиболее представленным белком-транспортёром в плаценте. Система глутатиона является одной из основных ферментативных систем организма и играет важную роль в плацентарном метаболизме. Глутатионтрансферазы участвуют в биотрансформации ксенобиотиков на этапе детоксикации и метаболизируют широкий спектр токсинов и лекарственных препаратов. Гены глутатионтрансфераз GSTP1 и GSTT1 кодируют ключевые ферменты этой системы.

Целью работы было определение роли генов ABCB1, GSTP1 и GSTT1, отвечающих за транспорт и метаболизм токсинов и лекарственных препаратов, в плаценте беременных женщин с РМЖ, РМШ и РЯ, развившихся на фоне беременности, после химиотерапии по сравнению со здоровыми пациентками. В исследование были включены 17 пациенток с РМЖ, РМШ и РЯ и 10 здоровых беременных в качестве контроля. Методом ПЦР была определена относительная экспрессия генов ABCB1, GSTP1 и GSTT1.

Выявлено повышение экспрессии генов GSTT1 ( $p=0,024$ ) и ABCB1 ( $p=0,020$ ) у беременных с онкологическими заболеваниями. В плаценте женщин с РМЖ и РМШ значения для генов GSTT1 и ABCB1 сохранялись на том же уровне, тогда как для гена GSTP1 было выявлено значимое снижение экспрессии гена ( $p=0,041$ ).

Исследование молекулярно-генетических особенностей беременных пациенток с онкологическими заболеваниями может выявить новые мишени терапии, прогностические маркеры акушерских осложнений лечения РМЖ у беременных пациенток, возможности для оценки эффективности химиотерапии на фоне беременности.

## STUDY OF THE ABCB1, GSTP1 AND GSTT1 GENE EXPRESSION IN PREGNANCY-ASSOCIATED CANCER

М.А. Kapralova<sup>1</sup>, Т.М. Zavarykina<sup>1,2</sup>, Е.В. Kozyrko<sup>2</sup>, Е.А. Luzina<sup>2</sup>, П.К. Lomskova<sup>1</sup>, Д.А. Bajgazieva<sup>2</sup>, С.В. Khokhlova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences; <sup>2</sup>Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

Pregnancy-associated cancers (PAC) have become an extremely acute issue in recent years, affecting several areas of medical science at the same time. It is known that one in a thousand pregnancies is complicated by cancer. The most common solid tumors are breast cancer (BC), cervical cancer (CC), and ovarian cancer (OC). Depending on the type of PAC different treatment regimens are used, in particular, cytostatic chemotherapy. Transport proteins responsible for transfer of drugs through the cell membrane and they are closely associated with the transport of chemotherapy drugs. This system includes the ABC transporter superfamily, which carries out active transport of drugs. The ABCB1 gene encodes p-glycoprotein, which is the most represented transporter protein in the placenta. The glutathione system is a major metabolic system which also plays important roles in placental metabolism. Glutathione transferases participate in the biotransformation of xenobiotics at the detoxification stage and metabolize a wide range of toxins and drugs. The glutathione transferase genes GSTP1 and GSTT1 encode the key enzymes of this system.

The aim of the work was to determine the role of the ABCB1, GSTP1 and GSTT1 genes responsible for the transport and metabolism of toxins and drugs in the placenta of pregnant women with BC, CC and OC that developed during pregnancy after chemotherapy compared with healthy women. The study included 17 patients with BC, CC and OC and 10 healthy pregnant women as a control. The relative expression of the ABCB1, GSTP1 and GSTT1 genes was determined using the PCR method.

An increase in the expression of the GSTT1 ( $p=0.024$ ) and ABCB1 ( $p=0.020$ ) genes in placenta was revealed in women with PAC. In the placenta of women with BC and CC, the values for the GSTT1 and ABCB1 genes remained at the same level, while a significant decrease in expression was revealed for the gene GSTP1 gene ( $p=0.041$ ).

The study of molecular genetic characteristics of pregnant patients with oncological diseases can identify new targets for therapy, prognostic markers of obstetric complications of PAC treatment, and opportunities for assessing the effectiveness of chemotherapy for these patients.

## РОЛЬ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В ФОРМИРОВАНИИ УСТОЙЧИВОСТИ К ДНК-ПОВРЕЖДАЮЩИМ ХИМИОПРЕПАРАТАМ

П.В. Шнайдер<sup>1,2,3</sup>, А.И. Лашкин<sup>1,3</sup>, М.М. Лукина<sup>1,2</sup>, Г.П. Арапиди<sup>1,4,5</sup>, И.В. Бекбаева<sup>1,4</sup>, О.М. Иванова<sup>1,2</sup>, М.А. Лагарькова<sup>1,2</sup>, В.М. Говорун<sup>6</sup>, В.О. Шендер<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА, Москва; <sup>2</sup>Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА, Москва;

<sup>3</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; <sup>4</sup>Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный; <sup>5</sup>Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва;

<sup>6</sup>НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва

Одним из основных отличий опухолевой ткани от нормальной является ее высокая пластичность в ответ на стрессовые воздействия. В последнее время стало ясно, что эта пластичность обусловлена не только запуском внутриклеточных каскадов, но и активацией особых паттернов межклеточной коммуникации. Так, на модели аденокарциномы яичника нами было установлено, что секретомы погибающих опухолевых клеток существенно отличаются от контрольных и способствуют изменению фенотипа реципиентных клеток, приводя к развитию резистентности к химиотерапии. Однако молекулярные механизмы этого процесса оставались малоизученными.

Наши исследования показали, что секретомы от погибающих клеток (АпоС) способствуют формированию химиорезистентности у аутологичных реципиентных клеток, причем данное утверждение справедливо только для опухолевых, но не нормальных клеток. Протеомный анализ показал, что в ответ на химиотерапию опухолевые клетки выделяют большое количество белков, участвующих в метаболизме, репарации ДНК, трансляции и сплайсинге пре-мРНК, а также регуляции клеточного цикла. Причем многие из них (например, белки сплайсосомы) ранее не были охарактеризованы как секретируемые. Нормальные клетки, напротив, секретируют белки, связанные с иммунными процессами и клеточным старением. Протеомный анализ также показал, что инкубация реципиентных опухолевых клеток с АпоС приводит к повышению экспрессии белков, участвующих в сплайсинге РНК, репарации ДНК и клеточного цикла.

Дополнительно было установлено, что АпоС защищают реципиентные клетки от агентов, повреждающих ДНК, но не оказывают защитного эффекта против других типов препаратов. Инкубация реципиентных клеток с секретомы приводила к химиорезистентности, сопровождающейся удлинением S-фазы клеточного цикла, снижением уровня фрагментации ДНК, уменьшением количества аддуктов цисплатина с ДНК и снижением фосфорилирования RPA2.

Таким образом, мы показали, что химиотерапия ДНК-повреждающими агентами активирует секрецию внеклеточных везикул. Эти везикулы содержат сигнальные молекулы, которые эффективно защищают опухолевые клетки от повреждений ДНК, регулируя клеточный цикл и способствуя более эффективной репарации ДНК, что в конечном итоге приводит к развитию устойчивости к химиотерапии.

*Работа была поддержана грантом Министерства науки и высшего образования 075-15-2019-1669.*

## THE ROLE OF CANCER CELL-DERIVED EXTRACELLULAR VESICLES IN THE DEVELOPMENT OF RESISTANCE TO DNA-DAMAGING CHEMOTHERAPY

P.V. Shnaider<sup>1,2,3</sup>, A.I. Lashkin<sup>1,3</sup>, M.M. Lukina<sup>1,2</sup>, G.P. Arapidi<sup>1,4,5</sup>, I.V. Bekbaeva<sup>1,4</sup>, O.M. Ivanova<sup>1,2</sup>, M.A. Lagarkova<sup>1,2</sup>, V.M. Govorun<sup>6</sup>, V.O. Shender<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency, Moscow; <sup>2</sup>Center for High-Precision Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency, Moscow; <sup>3</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow; <sup>4</sup>Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny; <sup>5</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow; <sup>6</sup>Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow

One of the hallmark differences between cancer and normal tissues is the pronounced plasticity of cancer cells in response to stress. Recent studies have highlighted that this plasticity is driven not only by intracellular signaling cascades but also by enhanced intercellular communication. Using an ovarian adenocarcinoma model, we discovered that the secretome of apoptotic cancer cells differs significantly from that of non-apoptotic cells and can induce phenotypic changes in recipient cells, contributing to the development of chemoresistance. However, the molecular mechanisms underlying this process remain largely unexplored.

Our research demonstrates that the therapy-induced secretion (TIS) of apoptotic cancer cells specifically promote chemoresistance in autologous cancer cells but not in normal cells. Proteomic analysis revealed that in response to chemotherapy, cancer cells release a distinct set of proteins involved in metabolism, DNA repair, translation, pre-mRNA splicing, and cell cycle regulation. Notably, many of these proteins, such as spliceosome components, were not previously recognized as secreted molecules. In contrast, normal cells predominantly secrete proteins associated with immune responses and cellular senescence. Furthermore, when recipient cancer cells were incubated with TIS, we observed an upregulation of proteins involved in RNA splicing, DNA repair, and cell cycle progression.

We also found that TIS confer protection to recipient cells specifically against DNA-damaging agents, without affecting sensitivity to other drug types. This protection is associated with an extended S-phase, reduced DNA fragmentation, decreased cisplatin-DNA adduct formation, and reduced phosphorylation of RPA2 in recipient cells.

In summary, our findings indicate that DNA-damaging chemotherapy triggers the release of extracellular vesicles containing signaling molecules that protect cancer cells by modulating the cell cycle and enhancing DNA repair, ultimately leading to the development of chemoresistance.

*The work was supported by the grant of the Ministry of Science and Higher Education 075-15-2019-1669.*

## МЕТОД ПРЕДИКЦИИ ОТВЕТА ПАЦИЕНТОВ С МЕЛАНОМОЙ НА АНТИ-PD1 ТЕРАПИЮ С ПОМОЩЬЮ АНАЛИЗА ЛОКАЛИЗАЦИИ И СТЕПЕНИ ИСТОЩЕНИЯ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Д.С. Мялик, Е.В. Шурганова, Г.В. Шаронов

*НИИ ЭОиБМТ, Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород*

Цель. Иммуноterapia с использованием ингибиторов контрольных точек (ИКТ) позволила существенно увеличить выживаемость онкологических больных. Относительным иммуноморфологическим показателем для назначения блокаторов PD1 является экспрессия соответствующего маркера, однако в полной мере не является прогностическим критерием ответа. Дополнительно повысить эффективность терапии ИКТ можно за счет отбора пациентов с высокой вероятностью ответа на терапию.

Целью данной работы является анализ подхода к стратификации пациентов с использованием патоморфологических и иммуногистохимических (ИГХ) критериев оценки истощения лимфоцитов для прогнозирования ответа меланомы на иммунотерапию анти-PD1.

Цитометрическое исследование опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, четырехцветное флуоресцентное ИГХ окрашивание формалин-фиксированных, парафин заключенных фрагментов меланомы.

По данным литературы, для прогнозирования ответа на иммунотерапию ИКТ используют показатели инфильтрации лимфоцитами и их отдельными субпопуляциями, а также экспрессию молекул мишеней ИКТ (PD-1, PD-L1, CTLA4). Для классификации пациентов нами был использован показатель истощения лимфоцитов (ПИЛ), который рассчитывался методом проточной цитометрии и на основании анализа данных ИГХ. ПИЛ является отношением истощенных цитотоксических лимфоцитов к общему числу цитотоксических опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов. По результату ИГХ параллельных срезов опухоли удалось произвести корреляцию с данными цитометрии, а также выяснить соотношение их числа в паренхиме опухоли и в перитуморальном инфильтрате дермы. Аналогичное окрашивание произведено для группы пациентов с известным результатом анти-PD1 терапии. Было выявлено значимое повышение частоты ответа на терапию ИКТ при локализации цитотоксических лимфоцитов с фенотипом истощения в паренхиме первичной опухоли.

Имеющиеся данные показывают значимость высокого количества цитотоксических Т-лимфоцитов с фенотипом истощения, локализующихся в паренхиме опухоли при прогнозировании ответа меланомы на иммунотерапию анти-PD1. Для использования этих подходов в широкой клинической практике требуется проведение дополнительных исследований и создание простых и воспроизводимых протоколов морфометрического анализа.

## A METHOD FOR PREDICTING THE RESPONSE OF MELANOMA PATIENTS TO ANTI-PD1 THERAPY USING ANALYSIS OF THE LOCATION AND DEGREE OF T-LYMPHOCYTE EXHAUSTION

D. Myalik, E. Shurganova, G. Sharonov

*Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies, Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod*

Objective. Immunotherapy with checkpoint inhibitors (ICI) has significantly increased the survival of cancer patients. A relative immunomorphological indication for the use of PD1 blockers is the expression of the corresponding marker, but it is not a complete prognostic criterion for response. The effectiveness of ICI therapy can be additionally increased by selecting patients with a high probability of response to therapy.

The purpose of this work is to analyze the approach to patient stratification using pathomorphological and immunohistochemical (IHC) criteria for assessing lymphocyte depletion to predict the response of melanoma to anti-PD1 immunotherapy.

Cytometric examination of tumor-infiltrating lymphocytes, four-color fluorescent IHC staining of formalin-fixed, paraffin-embedded melanoma fragments.

According to the literature, the response to ICT immunotherapy is predicted using the indices of lymphocyte infiltration and their individual subpopulations, as well as the expression of ICT target molecules (PD-1, PD-L1, CTLA4). To classify patients, we used the lymphocyte depletion index (LDI), which was calculated by flow cytometry and based on the analysis of IHC data. LDI is the ratio of depleted cytotoxic lymphocytes to the total number of cytotoxic tumor-infiltrating lymphocytes. Based on the results of IHC of parallel tumor sections, it was possible to correlate with the cytometry data, as well as to determine the ratio of their numbers in the tumor parenchyma and in the peritumoral infiltrate of the dermis. Similar staining was performed for a group of patients with a known result of anti-PD1 therapy. A significant increase in the frequency of response to ICI therapy was revealed when cytotoxic lymphocytes with the depletion phenotype were localized in the parenchyma of the primary tumor.

The available data show the significance of high numbers of cytotoxic T lymphocytes with an exhausted phenotype localized in the tumor parenchyma in predicting the response of melanoma to anti-PD1 immunotherapy. Additional studies and the creation of simple and reproducible morphometric analysis protocols are required to use these approaches in clinical practice.

## ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ В ОРТОТОПИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ EMT-6 У МЫШЕЙ BALB/c

А. Мишуков, С. Гаур, И. Колесникова, Е.-И. Адаманская, А. Свешникова

*Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва*

Рак является одной из главных проблем здравоохранения. На сегодняшний день показано, что взаимодействие тромбоцитов с опухолями в целом способствует росту, развитию и метастазированию рака. Однако взаимодействие тромбоцитов с опухолями является двунаправленным, и влияние опухолевых клеток на физиологию тромбоцитов остается малоизученным. В настоящей работе мы использовали *in vivo* модель спонтанно-метастазирующего рака молочной железы (РМЖ) у мышей для оценки влияния опухоли на функциональную активность тромбоцитов.

В качестве модели РМЖ использовались 7–8 недельные самки мышей BALB/c, которым ортотопически инокулировалась суспензия клеток EMT-6. Опухоли развивались в течение 38–42 дней, после чего у мышей бралась кровь из ретро-орбитального синуса на эноксапарин натрия (10 МЕ/мл). Из цельной крови выделялись тромбоциты. Оценка функциональной активности тромбоцитов проводилась с помощью end-point и непрерывной проточной цитометрии.

Количественный выход тромбоцитов при выделении из цельной крови мышей, несущих опухоль EMT-6, был значительно ниже по сравнению со здоровыми мышами. В дополнение к этому, размер тромбоцитов опухолевых мышей статистически значимо превосходит размер тромбоцитов здоровых мышей. Оба факта говорят о потреблении тромбоцитов в организме мыши с опухолью. Однако, преактивация тромбоцитов (экспозиция Р-селектина, концентрация кальция и доля прокоагулянтных тромбоцитов в покое) у мышей с опухолью не наблюдалась. С другой стороны, у мышей с опухолью снижена реакция тромбоцитов на активацию по параметрам изменения аффинности GPIIb, активации интегринов, появления прокоагулянтных тромбоцитов в ответ на тромбин и изменения формы (показателя среднего бокового светорассеяния суспензии).

Таким образом, развитие рака молочной железы у мыши индуцирует тромбоцитопению и мягкую рефрактерность тромбоцитов к активации, что может свидетельствовать о потреблении тромбоцитов в результате латентного тромбообразования в организме.

*Работа была поддержана грантом РФФ № 23-45-10039.*

## PLATELET FUNCTIONAL ACTIVITY IN THE EMT-6 ORTHOTOPIC BREAST CANCER MODEL IN BALB/c MICE

A. Mishukov, S. Gaur, I. Kolesnikova, E.-I. Adamanskaya, A. Sveshnikova

*CTP PCP RAS, Moscow*

Cancer is one of the major public health problems. To date, it has been shown that platelets impact on tumor cells generally contribute to cancer growth, development, and metastasis. However, platelet-tumor interactions are bidirectional, and the effect of tumor cells on platelet physiology remains poorly understood. In this study, we used an *in vivo* model of spontaneously metastatic breast cancer (BC) in mice to assess the effect of tumor on platelet functional activity.

As a BC model, we used 7–8 week-old female BALB/c mice, which were orthotopically inoculated with an EMT-6 cell suspension. Tumors developed for 38–42 days, after which blood was collected from the retro-orbital sinus on sodium enoxaparin (10 IU/ml). Platelets were isolated from whole blood. Platelet functional activity was assessed using end-point and continuous flow cytometry.

The quantitative yield of platelets when isolated from whole blood of mice bearing EMT-6 tumor was significantly lower compared to healthy mice. In addition, the platelet size of tumor-bearing mice was statistically significantly larger than that of healthy mice. Both facts indicate platelet consumption in the body of tumor-bearing mice. However, platelet preactivation (P-selectin exposure, calcium concentration, and the proportion of procoagulant platelets at resting state) was not observed in tumor-bearing mice. On the other hand, tumor-bearing mice had a reduced platelet response to activation in terms of changes in GPIIb affinity, integrin activation, the appearance of procoagulant platelets in response to thrombin, and shape changes (mean side scattering value of the suspension).

Thus, the development of breast cancer in mice induces thrombocytopenia and mild platelet refractoriness to activation, which may indicate platelet consumption as a result of latent thrombus formation in the body.

*The work was supported by the grant of the Russian Science Foundation № 23-45-10039.*

## ПОДАВЛЕНИЕ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ АНТИКОАГУЛЯНТАМИ И АНТИАГРЕГАНТАМИ В МОДЕЛИ ЛИНИИ ЕМТ6 У МЫШЕЙ BALB/c

Е.И. Адаманская, А. Мишуков, С. Кузнецова, А. Свешникова

*Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва*

Метастазирование рака ответственно за почти 90% смертельных исходов пациентов с солидной онкологией. Одним из вариантов метастазирования рака молочной железы является интравасация опухолевых клеток в кровеносный сосуд, где тромбоцитарное и плазменное звенья гемостаза способствуют их защите от иммунной системы. Для исследования этого процесса ранее нами был предложен метод фильтрации крови с целью поиска циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК-ов). Целью настоящей работы является исследование влияния антиагрегантной и антикоагулянтной терапий на количество ЦОКов и поверхностных легочных метастаз в модели рака молочной железы ЕМТ-6 у мышей линии BALB/c.

В работе использовано 15 мышей-самок линии BALB/c возраста 7-8 недель. Метастазирующий рак моделировался инъекцией клеток линии ЕМТ6 в ретроорбитальный синус. В качестве антиагреганта использовался аспирин (перорально). В качестве антикоагулянта применялся препарат с действующим веществом эноксапарин (подкожно). Прием/инъекции терапии или контрольного раствора начинался за 1 час до введения опухолевых клеток и далее проводился ежедневно. С 10 по 14 день мыши выводились одновременно по 2-3 особи из трех групп (контроль, аспирин, эноксапарин). При некропии изымались легкие и визуально при помощи монокуляра подсчитывалось количество метастаз. У каждой мыши отбиралась венозная кровь и проводилась ее фильтрация на наличие ЦОК-ов.

В рассматриваемой модели мыши начинали проявлять признаки заболевания (пилоэрекция, снижение активности, появление опухоли) на 5-й день. По результатам исследования оказалось, что у мышей на терапии количество метастаз на легких было снижено (в среднем 40 для терапии и 90 без терапии). В результате оказалось, что при терапии эноксапарином число метастаз и ЦОК-ов (суммарно 191 и 182 соответственно) было меньше, чем в остальных группах, а при терапии аспирином количество метастаз оказалось в среднем меньше, чем в контрольной группе, но ЦОК-ов больше (суммарно 262 метастаз и 556 ЦОК-ов для группы на аспирине, 547 метастаз и 359 ЦОК-ов в контрольной группе). Таким образом, можно сделать вывод, что антикоагулянтная терапия уменьшает количество и цоков и метастаз, а антиагрегантная терапия увеличивает количество ЦОК-ов метастаз. *Работа поддержана грантом РФФ 23-45-10039.*

## SUPPRESSION OF BREAST CANCER METASTASIS WITH ANTICOAGULANTS AND ANTIPLATELET AGENTS IN THE EMT6 LINE MODEL IN BALB/c MICE

E.I. Adamanskaya, A. Mishukov, S. Kuznetsova, A. Sveshnikova

*Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow*

Cancer metastasis is responsible for nearly 90% of deaths among patients with advanced cancer. One possible mechanism for the metastasis of breast cancer involves the intrusion of tumor cells into blood vessels, where platelet and plasma components of hemostasis help protect them from the immune system.

We have previously proposed a method of blood filtration to search for circulating tumor cells (CTCs). The goal of this study is to investigate the impact of antiplatelet and anticoagulant treatments on the number of CTCs and superficial pulmonary metastases in the EMT-6 breast cancer model using BALB/c mice. 15 female BALB/c mice, aged 7-8 weeks, were used in this study.

Metastatic cancer was modeled by injecting EMT6 cells into the retroorbital sinus. Aspirin, an antiplatelet agent, was given orally every day for 10-14 days, and a drug with the active ingredient enoxaparin, an anticoagulant, was used. The therapy or control solution started 1 hour before injection of tumor cells and continued daily. From days 10 to 14, several mice from three groups (control, aspirin, and enoxaparin) were bred simultaneously. During necropsy, lungs were removed, and the number of metastases was calculated visually using a monocular. Venous blood was also taken from each mouse to test for the presence of CTCs.

In the model under consideration, mice began to show signs of disease (piloerection, decreased activity, and tumor formation) on day 5. Based on the results of the study, mice on therapy had a reduced number of lung metastases (40 on average for therapy and 90 without therapy). As a result, we found that with enoxaparin therapy, there were fewer metastases and CCS (191 and 182, respectively), compared to the other groups. Mice treated with aspirin had lower metastases number (262) but more CTCs (556) compared to the control group, that had 547 metastases and 359 CTC. *The study was supported by Russian Science Foundation grant 23-45-10039.*

### ИЗОТОПНОМЕЧЕННЫЙ SAM: ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ В ИЗУЧЕНИИ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗ

С.С. Марьясина, А.Ю. Руденко, В.И. Польшаков

МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

S-аденозил-L-метионин (SAM) — второй (после АТФ) по распространённости белковый кофактор. Он участвует во множестве биологических процессов, включая реакции метилирования под действием метилтрансфераз. S-аденозил-L-гомоцистеин (SAH) — побочный продукт биометилирования, образующийся в результате переноса CH<sub>3</sub>-группы с SAM на субстрат.

В данной работе мы предложили новый способ получения SAM, меченного изотопами. Природные вещества, содержащие редкие изотопы, позволяют решать множество научных и практических задач. В ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии широко применяются соединения, содержащие стабильные изотопы. Также существует ряд методов, основанных на включении в биомолекулы радиоактивных изотопов.

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.

В основе предложенного нами способа получения изотопномеченного SAM 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, а также способность WBSCR27 образовывать прочный комплекс с кофактором позволили нарабатывать изотопномеченный SAM в бактериях и выделять его в чистом виде. Разработанный нами метод 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. Протокол апробирован нами на получении <sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N-меченного SAH, который был далее использован для определения структуры белка WBSCR27 в растворе методом спектроскопии ЯМР. Этот протокол можно легко адаптировать для получения SAM и SAH с любыми изотопами C, H, O и N, которые необходимы для различных задач.

*Работа выполняется при финансовой поддержке РФФ, проект 24-74-00052.*

### ISOTOPICALLY LABELED SAM: PREPARATION AND APPLICATION IN THE STUDY OF METHYLTRANSFERASES

S.S. Mariasina, A.Y. Rudenko, V.I. Polshakov

Lomonosov Moscow State University, Moscow

S-adenosyl-L-methionine (SAM) is the second most common protein cofactor after ATP. It is involved in many biological processes, including methylation reactions catalyzed by methyltransferases. S-adenosyl-L-homocysteine (SAH) is a by-product of biomethylation resulting from the transfer of a CH<sub>3</sub> group from SAM to a substrate.

In this study, we propose a new method for obtaining isotope-labeled SAM. Natural substances containing rare isotopes make it possible to solve many scientific and practical problems. Compounds containing stable isotopes are widely used in NMR spectroscopy and mass spectrometry. There are also a number of methods based on the incorporation of radioactive isotopes into biomolecules.

Usually, to obtain isotopically labeled compounds, it is necessary to develop multi-stage synthetic schemes. This complicates production and makes them difficult for researchers to access. On the other hand, many biomolecules can be obtained from bacteria, eukaryotic cells or plant material. Growing natural objects on media containing the necessary isotopes allows obtaining target compounds with a given isotopic composition.

The method for obtaining isotopically labeled SAM proposed by us is based on growing *Escherichia coli* cells expressing the recombinant protein WBSCR27 from *Mus Musculus* on an isotopically enriched medium. The high level of expression of this protein and its extraordinary stability, as well as the ability of WBSCR27 to form a strong complex with a cofactor, made it possible to produce isotopically labeled SAM in bacteria and isolate it in pure form. The method we developed does not involve synthetic procedures and also eliminates the need for expensive equipment for separating complex mixtures, such as an HPLC chromatograph. This method can be easily implemented in any laboratory equipped for growing bacteria and isolating proteins. We have tested the developed protocol by obtaining <sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N-labeled SAH, which was then used to determine the structure of the WBSCR27 protein in solution by NMR spectroscopy. This protocol can be easily adapted to obtain SAM and SAH with any isotopes of C, H, O and N that are needed for various tasks.

*The study was supported by the Russian Science Foundation, project 24-74-00052.*

## ПЕПТИДНЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ВАКЦИНЫ К МЕЛАНОМЕ B16: МАРКЕРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ И РЕЗИСТЕНТНОСТИ

А.В. Шабалкина<sup>1,2,3</sup>, А.В. Изосимова<sup>4</sup>, Е.В. Шурганова<sup>4</sup>, Д.С. Мялик<sup>4</sup>, Н.О. Наконечная<sup>2,3</sup>, О.В. Британова<sup>2,3</sup>, Д.И. Князев<sup>4</sup>, Н.Р. Хилал<sup>4</sup>, Д.М. Чудаков<sup>2,3,4</sup>, Г.В. Шаронов<sup>2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный;

<sup>2</sup>НИИ трансляционной медицины, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва; <sup>3</sup>ГНЦ Институт биорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; <sup>4</sup>НИИ ЭОУТМ, Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород

Противоопухолевые вакцины являются сегодня одним из наиболее перспективных направлений в терапии рака. При этом наиболее высокую эффективность показали РНК вакцины, которые послужили прототипом для создания РНК-вакцины против COVID-19. Эффективность пептидных вакцин существенно ниже, но в некоторых случаях они незаменимы, как например, при использовании не кодируемых антигенов.

В настоящей работе мы исследовали эффективность противоопухолевого иммунитета, формируемого пептидной вакциной к мышинной меланоме B16. Для этого мы применили профилактическую схему вакцинации за 3 и 1 неделю до введения опухолевых клеток и использовали созданную нами ранее базу данных опухоль-специфических клонов Т-клеток (ОСКТ) для анализа репертуаров лимфоцитов. Профилактическая вакцина достоверно замедляла рост опухоли и также усиливала противоопухолевый эффект терапии антителами с анти-CTLA4. При этом эффект вакцинации и терапии проявлялся лишь у части мышей, в то время как у других рост опухоли не замедлялся или даже усиливался. При сравнении мышей, ответивших и не ответивших на вакцинацию и терапию, мы обнаружили, что в дренирующих лимфоузлах (дЛУ) у первых существенно выше клональность CD8+ Т-лимфоцитов, а у вторых – процент CD4+ ОСКТ. Резистентность опухоли может быть обусловлена дисфункцией ОСКТ в этих мышцах или другими механизмами ускользания опухоли от иммунного контроля. Для более детального понимания этих механизмов в настоящее время ведется анализ репертуаров Т-клеток опухоли, а также данных проточной цитометрии по их фенотипу и представленности отдельных субпопуляций в опухоли и дЛУ.

## PEPTIDE ANTITUMOR VACCINES FOR MELANOMA B16: MARKERS OF EFFICACY AND RESISTANCE

A.V. Shabalkina<sup>1,2,3</sup>, A.V. Izosimova<sup>4</sup>, E.V. Shurganova<sup>4</sup>, D.S. Myalik<sup>4</sup>, N.O. Nakonechnaya<sup>2,3</sup>, O.V. Britanova<sup>2,3</sup>, D.I. Knyazev<sup>4</sup>, N.R. Hilal<sup>4</sup>, D.M. Chudakov<sup>2,3,4</sup>, G.V. Sharonov<sup>2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny; <sup>2</sup>Institute of Translational Medicine, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow; <sup>3</sup>Department of Genomics of Adaptive Immunity, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow; <sup>4</sup>Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod

Antitumor vaccines are one of the most promising cancer therapies today. RNA vaccines showed the highest effectiveness and became a prototype for the creation of an RNA vaccine against COVID-19 showed the highest effectiveness. The effectiveness of peptide vaccines is significantly lower, but in some cases they are indispensable, for example for non-encoded antigens.

In this work, we investigated the effectiveness of antitumor immunity generated by a peptide vaccine against murine melanoma B16. We applied a prophylactic vaccination scheme 3 and 1 week before the inoculation of tumor cells and used our previously created database of tumor-specific T-cell clones (TSTC) to analyze lymphocyte repertoires. The prophylactic vaccine significantly slowed tumor growth and also enhanced the antitumor effect of anti-CTLA4 antibody therapy. At the same time, the effect of vaccination and therapy was manifested only in some mice, while in others, tumor growth was not affected or even accelerated. When comparing responding and non-responding mice to vaccination and therapy, we found that in the draining lymph nodes (dLNs) the former had a significantly higher clonality of CD8+ T-lymphocytes, and the latter had a significantly higher percentage of CD4+ TSTC. Tumor resistance may be due to TSTC dysfunction in these mice or other mechanisms of tumor immune escape. To get insight into these mechanisms, repertoires of tumor infiltrating T-cell are currently being analyzed, as well as flow cytometry data on their phenotype and the representation of individual subpopulations in the tumor and dLNs.

#### ИССЛЕДОВАНИЕ РЕПЕРТУАРА БЕЛКОВ-ПАРТНЕРОВ SF3B1 ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИНГИБИТОРОВ СПЛАЙСИНГА

Е.А. Свирина<sup>1</sup>, М.М. Лукина<sup>1</sup>, К.С. Ануфриева<sup>1</sup>, П.В. Шнайдер<sup>1</sup>, О.М. Иванова<sup>1</sup>, А.О. Гончаров<sup>1</sup>, М.А. Лагарькова<sup>1</sup>, В.М. Говорун<sup>2</sup>, Г.П. Арапиди<sup>1</sup>, В.О. Шендер<sup>1</sup>

ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России; <sup>2</sup>НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва

Модуляторы сплайсинга, направленные на ингибирование белка SF3B1, являются многообещающими противоопухолевыми препаратами. Однако точный механизм цитотоксического действия данной группы препаратов детально не изучен. В клинических испытаниях I фазы модуляторы сплайсинга тестировались в режиме монотерапии и только тормозили рост опухоли, но не элиминировали ее полностью. Ранее нами было показано, что предварительная инкубация опухолевых клеток с модуляторами сплайсинга может увеличивать их чувствительность к ДНК-повреждающим агентам.

Чтобы изучить механизм синергетического эффекта модулятора сплайсинга пладениолида Б с ДНК-повреждающими препаратами, мы исследовали протеомный профиль опухолевых клеток, а также паттерны изменения репертуара белков-партнеров SF3B1 после воздействия пладениолида Б в момент, когда опухолевые клетки наиболее выражено увеличивают чувствительность к ДНК-повреждающим препаратам.

В результате мы показали, что под действием пладениолида Б значительно изменяется пул белков-партнеров SF3B1 по сравнению с контрольными клетками. Под действием пладениолида происходит значительное ослабление связи SF3B1 с каноническими белками-партнерами, вовлеченными в процессинг пре-мРНК, а также белками, участвующими в ацетилировании гистонов и их модификации в транскрипционно активное состояние. Помимо известных белков-партнеров мы обнаружили значительное увеличение белков, взаимодействующих с SF3B1 под действием данного модулятора сплайсинга, которые относились к рибосоме, а также были вовлечены в пути, связанные с регуляцией клеточного цикла. Согласно полученным данным, можно предположить, что под действием пладениолида Б SF3B1 может в большей степени локализоваться в цитоплазме. Согласно данным протеомного анализа опухолевых клеток пладениолид Б приводит преимущественно к снижению представленности белков клеточного цикла и репарации ДНК.

Таким образом, мы обнаружили, что воздействие пладениолида Б приводит к изменению репертуара белков-партнеров SF3B1 и его локализации в клетке, что может лежать в основе механизма увеличения чувствительности опухолевых клеток к ДНК-повреждающим препаратам, а также расширять возможности разработки новых схем противоопухолевой терапии.

*Работа поддержана грантом РФФ 22-15-00462.*

#### INVESTIGATION OF THE SF3B1 PARTNER PROTEIN REPERTOIRE UNDER THE INFLUENCE OF SPLICING INHIBITORS

Е.А. Свирина<sup>1</sup>, М.М. Лукина<sup>1</sup>, К.С. Ануфриева<sup>1</sup>, П.В. Шнайдер<sup>1</sup>, О.М. Иванова<sup>1</sup>, А.О. Гончаров<sup>1</sup>, М.А. Лагарькова<sup>1</sup>, В.М. Говорун<sup>2</sup>, Г.П. Арапиди<sup>1</sup>, В.О. Шендер<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency; Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow

Splicing modulators targeting the SF3B1 protein are promising antitumor drugs. However, the exact mechanism of cytotoxic action of this group of drugs has not been studied in detail. In phase I clinical trials, splicing modulators were tested in monotherapy and only inhibited tumor growth, but did not eliminate it completely. We have previously shown that pre-incubation of tumor cells with splicing modulators can increase their sensitivity to DNA-damaging agents.

To study the mechanism of the synergistic effect of the splicing modulator pladienolide B with DNA-damaging drugs, we investigated the proteomic profile of tumor cells, as well as the patterns of changes in the repertoire of SF3B1 partner proteins after exposure to pladienolide B at the time when tumor cells most significantly increase their sensitivity to DNA-damaging drugs.

As a result, we showed that under the influence of pladienolide B, the pool of SF3B1 partner proteins significantly changes compared to control cells. Under the influence of pladienolide, there is a significant weakening of SF3B1 binding to canonical partner proteins involved in pre-mRNA processing, as well as proteins involved in histone acetylation and their modification to a transcriptionally active state. In addition to the known partner proteins, we found a significant increase in proteins interacting with SF3B1 under the influence of this splicing modulator, which belonged to the ribosome and were also involved in pathways associated with cell cycle regulation. According to the data obtained, it can be assumed that under the action of pladienolide B, SF3B1 can be localized to a greater extent in the cytoplasm. According to the proteomic analysis of tumor cells, pladienolide B leads mainly to a decrease in the representation of cell cycle proteins and DNA repair.

Thus, we found that the effect of pladienolide B leads to a change in the repertoire of SF3B1 partner proteins and its localization in the cell, which may underlie the mechanism of increasing the sensitivity of tumor cells to DNA-damaging drugs, as well as expand the possibilities for developing new antitumor therapy regimens.

*The work was supported by the Russian Science Foundation grant 22-15-00462.*



## ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПОТЕНЦИАЛА МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, СВЕРХЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ИНДУЦИРУЮЩИЙ АПОПТОЗ ЛИГАНД TRAIL

А.В. Городилова, И.И. Абдрахманова, И.Ю. Филин, В.М. Чернов, А.А. Ризванов, В.В. Соловьева  
Казанский (Приволжский) федеральный университет; ФИЦ Казанский научный центр РАН, Казань

Опухоли головного мозга – одни из самых агрессивных форм злокачественных новообразований. Лиганд, индуцирующий апоптоз, ассоциированный с фактором некроза опухоли (TRAIL), является одним из наиболее перспективных терапевтических цитокинов, избирательно индуцирующих апоптоз в опухолевых клетках. Мезенхимные стволовые клетки (МСК) обладают естественным тропизмом к опухолевым клеткам и являются перспективным способом доставки противоопухолевых агентов. Сверхэкспрессия МСК лиганда TRAIL способна усилить потенциал стволовых клеток в терапии онкологических заболеваний. МСК были выделены из жировой ткани человека и Вартоновского студня (МСК-BC) и генетически модифицированы с помощью лентивирусного вектора, кодирующего TRAIL (МСК-TRAIL), а также лентивирусного вектора Katushka2S (МСК-Katushka). Далее проводили культивирование клеточных линий глиобластомы человека U-138 MG и SNB-19 с кондиционированной средой (КС), полученной от МСК, МСК-TRAIL, МСК-Katushka, BC-МСК, BC-МСК-TRAIL и BC-МСК-Katushka и оценивали их пролиферативную активность с помощью MTS-теста. Также анализировали жизнеспособность популяции клеток глиобластомы после кокультивирования с помощью теста на апоптоз.

Сверхэкспрессия TRAIL после трансдукции была подтверждена с помощью ПЦР в режиме реального времени и вестерн-блот анализа. Через 48 часов наблюдалось снижение пролиферативной активности опухолевых клеток, которые культивировались в КС от BC-МСК-TRAIL, у U-138 MG (74%) и SNB-19 (62%) по сравнению с опухолевыми клетками, которые культивировались в КС от нативных BC-МСК (U-138 MG —85%, SNB-19 —89%). В аналогичном эксперименте с применением жировых МСК жизнеспособность опухолевых клеток после культивирования в КС от МСК-TRAIL для U-138 MG составила 88%, для SNB-19 76%, по сравнению с опухолевыми клетками, которые культивировались в КС от нативных МСК (U-138 MG – 98,3%, SNB-19 – 93%). Ко-культивирование как жировых МСК, так и BC-МСК совместно с опухолевыми клетками указывало на угнетение пролиферации клеток SNB-19 и U-138 MG.

Таким образом, установлено, что МСК-TRAIL, полученные из жировой ткани и Вартоновского студня, способны подавлять пролиферацию клеток SNB-19 и U-138 MG.

Работа выполнена в рамках программы «Стратегическое академическое лидерство Казанского федерального университета» ПРИОРИТЕТ-2030

## EVALUATION OF THE ANTITUMOR POTENTIAL OF MESENCHYMAL STEM CELLS OVEREXPRESSING THE APOPTOSIS-INDUCING LIGAND TRAIL

А.В. Городилова, И.И. Абдрахманова, И.Ю. Филин, В.В. Соловьева, А.А. Ризванов  
Kazan Federal University; FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan

Brain tumors are among the most aggressive forms of malignant neoplasms. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is one of the most promising therapeutic cytokines that selectively induce apoptosis in tumor cells. Mesenchymal stem cells (MSCs) have a natural tropism for tumor cells and are a promising method for delivering antitumor agents. Overexpression of TRAIL ligand by MSCs can enhance the potential of stem cells in cancer therapy. MSCs were isolated from human adipose tissue and Wharton's jelly (WJ-MSC) and genetically modified using a lentiviral vector encoding TRAIL (MSC-TRAIL) and a lentiviral vector Katushka2S (MSC-Katushka). Next, human glioblastoma cell lines U-138 MG and SNB-19 were cultured with conditioned medium (CM) obtained from MSCs, MSC-TRAIL, MSC-Katushka, WJ-MSCs, WJ-MSC-TRAIL and WJ-MSC-Katushka and their proliferative activity was assessed using the MTS test. The viability of the glioblastoma cell population after co-culture was also analyzed using the apoptosis test.

TRAIL overexpression after transduction was confirmed using real-time PCR and Western blot analysis. After 48 hours, a decrease in the proliferative activity of tumor cells cultured in CM from WJ-MSC-TRAIL was observed in U-138 MG (74%) and SNB-19 (62%) compared to tumor cells cultured in CM from native WJ-MSC (U-138 MG – 85%, SNB-19 – 89%). In a similar experiment using adipose-derived MSCs, the viability of tumor cells after culturing in CM from MSC-TRAIL was 88% for U-138 MG and 76% for SNB-19, compared to tumor cells cultured in CM from native MSC (U-138 MG – 98.3%, SNB-19 – 93%). Co-cultivation of both adipose-derived MSCs and Wharton's jelly-derived MSCs with tumor cells indicated suppression of SNB-19 and U-138 MG cell proliferation.

Thus, it was established that TRAIL-MSCs obtained from adipose tissue and Wharton's jelly are capable of suppressing SNB-19 and U-138 cell proliferation.

The work was carried out within the framework of the program "Strategic Academic Leadership of Kazan Federal University" PRIORITY-2030.

## ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ВАРИАНТНОГО ЭКЗОНА V9 CD44 ПРИ РАКЕ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

М. Янова, Е. Степанова, Д. Мальцева

НИУ ВШЭ, Москва

Актуальность: CD44, многофункциональный гликопротеин на клеточной поверхности, участвует в различных аспектах биологии рака. Посредством альтернативного сплайсинга CD44 может образовывать изоформы, в том числе с добавлением вариант-ного экзона v9, который часто экспрессируется в опухолевой ткани и ассоциирован со стволовостью, эпителиально-мезенхималь-ным переходом и химиорезистентностью. Однако, его роль в прогрессии и химиорезистентности рака мочевого пузыря (РМП) не до конца изучена.

В исследование включены 407 больных РМП. Данные о результатах секвенирования и клиническая информация о пациентах были доступны в базах данных TCGA и cBioPortal. Уровень CD44 *in vitro* определялся с помощью ПЦР-РВ, электрофореза и блоттинга. Цитотоксичность *in vitro* определялась с помощью МТТ теста при добавлении препаратов на 72 часа. Статистический анализ результатов осуществляли в программе Python и Prism. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

Высокая экспрессия CD44v9 ассоциировалась с ранним снижением (в течение двух лет после удаления опухоли) общей выживаемости пациентов ( $p=0,03$ ). Анализ корреляции активности генов методом GSEA выявил повышение у пациентов CD44v9high активности генов сигнальных путей, связанных с клеточным стрессом и гибелью, клеточным циклом и стволовостью (FDR  $< 0,05$ ). Данные сигнальные пути активно вовлечены в возникновение химиорезистентности опухолевых клеток. Так, клеточная линия RT112 с CD44v9high характеризуется высокой резистентностью к цисплатину *in vitro*, в то время как клеточная линия T24 с CD44v9low – чувствительностью. При этом ингибирование CD44v9-хСТ комплекса сульфасалазином значимо повысило чувствительность к цисплатину клеточной линии RT112, но не T24 ( $p < 0,05$ ).

CD44v9 может рассматриваться как маркер прогноза общей выживаемости больных РМП и в качестве мишени для разработки таргетных препаратов. Требуется проведение дополнительных исследований для изучения CD44v9-опосредованных механизмов химиорезистентности и подходов к ее преодолению.

## STUDYING THE ROLE OF THE VARIANT EXON V9 CD44 IN BLADDER CANCER

М. Yanova, E. Stepanova, D. Maltseva

NRU HSE, Moscow

Relevance of the study: CD44, a multifunctional glycoprotein on the surface of the cell, is involved in various aspects of cancer biology. Through alternative splicing, CD44 can form isoforms, including isoforms with the inclusion of a variant exon v9, which is often expressed in tumor tissue and associated with stemness, epithelial-mesenchymal transition process and chemoresistance. However, its role in the progression and chemoresistance of bladder cancer (BLCA) has not been fully studied.

407 patients with BLCA were included in the study. Sequencing data and clinical data were available in the TCGA and cBioPortal databases. The level of CD44 *in vitro* was determined using RT-PCR, electrophoresis and blotting. Cytotoxicity *in vitro* was determined using the MTT test with drug incubation for 72 hours. Statistical analysis of the results was carried out in the Python and Prism programs. The differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

High CD44v9 expression levels were associated with an early decrease (within two years after tumor removal) in the overall survival of patients ( $p=0.03$ ). GSEA analysis of the correlation of gene activity revealed an increase in the activity of signaling pathways associated with cellular stress and death, cell cycle and stemness in CD44v9high patients (FDR  $< 0.05$ ). These signaling pathways are actively involved in the occurrence of chemoresistance of tumor cells. Moreover, the RT112 cell line with CD44v9high is characterized by high resistance to cisplatin *in vitro*, while the T24 cell line with CD44v9low is sensitive. Inhibition of the CD44v9-хСТ complex by sulfasalazine significantly increased the sensitivity of the RT112 BLCA cell line to cisplatin, but not in T24 ( $p < 0.05$ ).

CD44v9 can be considered as a marker for predicting the overall survival of patients with BLCA and as a potential target for the development of targeted drugs. Additional research is required to study the CD44v9-mediated mechanisms of chemoresistance and approaches for its alleviation.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СФИНГОЛИПИДНОГО МЕТАБОЛИЗМА ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У БЕРЕМЕННЫХ

М.А. Капралова<sup>1</sup>, В.Е. Блохин<sup>2</sup>, Т.М. Заварыкина<sup>1,3</sup>, У.А. Гутнер<sup>1</sup>, М.А. Шупик<sup>1</sup>, Е.В. Козырко<sup>3</sup>, Е.А. Лузина<sup>3</sup>, П.К. Ломскова<sup>1</sup>, Д.А. Байгазиева<sup>3</sup>, С.В. Хохлова<sup>3</sup>, А.В. Алесенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН; <sup>2</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН;

<sup>3</sup>НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова Минздрава России, Москва

Сфинголипиды играют ключевую роль в регуляции процессов апоптоза и деления клеток, что делает их важными компонентами канцерогенеза. Рак молочной железы (РМЖ) у беременных женщин является наиболее распространенным видом рака, развивающимся во время беременности, однако он до сих пор остается малоизученным.

Целью нашего исследования являлось определение роли генов метаболизма сфинголипидов, продукты которых контролируют пролиферацию и апоптоз, в плаценте беременных женщин с РМЖ, развившемся на фоне беременности, после химиотерапии по сравнению со здоровыми пациентками.

В исследование были включены семь пациенток с РМЖ и восемь здоровых беременных в качестве контроля. Методом ПЦР была определена относительная экспрессия 15 генов метаболизма сфинголипидов, ферменты которых контролируют синтез церамидов, сфингозинов и сфингозин-1-фосфата: сфингомиелиназа (SMPD1, SMPD3), кислой церамидазы (ASAH1), глюкозилцерамидазы (GBA), церамидсинтазы (CERS 1-6), сфингозинкиназы 1 (SPHK1), сфингозин-1-фосфатлиазы 1 (SGPL1), рецепторов сфингозин-1-фосфата (S1PR1, S1PR2, S1PR3).

Было выявлено повышение экспрессии генов сфингозин-1-фосфат лиазы 1 SGPL1 ( $p=0,04$ ), сфингозин киназы SPHK1 ( $p=0,009$ ), церамид синтаз 1-6 CERS1 ( $p=0,001$ ), CERS2 ( $p=0,004$ ), CERS3 ( $p=0,001$ ), CERS5 ( $p=0,002$ ), CERS6 ( $p=0,006$ ) в образцах плаценты пациенток с РМЖ после цитостатической химиотерапии. Отмечена тенденция к увеличению экспрессии гена ASAH1,  $p=0,09$ . Анализ генов сфингозин-1-фосфатных рецепторов выявил увеличение экспрессии S1PR1,  $p=0,01$ ; S1PR2,  $p=0,04$ ; S1PR3,  $p=0,002$  в плаценте беременных пациенток с РМЖ после химиотерапии.

Наше пилотное исследование является одним из первых, изучающих молекулярно-генетические особенности беременных пациенток с РМЖ. Мы полагаем, что данное направление исследований позволит выявить новые мишени и прогностические маркеры акушерских осложнений лечения РМЖ у беременных пациенток, а также возможности для оценки эффективности химиотерапии при лечении РМЖ на фоне беременности. Значительные изменения в экспрессии генов, контролирующих уровень церамидов, сфингозина и S1P, могут указывать на их перспективность для рассмотрения в качестве потенциальных кандидатов как для диагностики, так и для терапии больных РМЖ у беременных.

## STUDY OF THE SPHINGOLIPID-RELATED GENE EXPRESSION IN PREGNANCY-ASSOCIATED BREAST CANCER

М.А. Kapralova<sup>1</sup>, V.E. Blokhin<sup>2</sup>, T.M. Zavarykina<sup>1,3</sup>, U.A. Gutner<sup>1</sup>, M.A. Shupik<sup>1</sup>, E.V. Kozyrko<sup>3</sup>, E.A. Luzina<sup>3</sup>, P.K. Lomskova<sup>1</sup>, D.A. Bajgazieva<sup>3</sup>, S.V. Khokhlova<sup>3</sup>, A.V. Alesenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences; <sup>2</sup>Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences; <sup>3</sup>Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

Sphingolipids are now recognized as multifaceted mediators in cancer biology and therapeutics. The key role of sphingolipids in the regulation of apoptosis and cell division processes makes them important regulating compounds in cancerogenesis. Pregnancy-associated breast cancer (PABC) is the most common cancer during pregnancy, but it remains poorly studied.

The aim of our study is to determine the role of sphingolipid metabolism genes, the products of which control proliferation and apoptosis, in the placenta of pregnant women with PABC after chemotherapy compared to healthy patients.

Seven patients with breast cancer (BC) and eight healthy pregnant women as control group were studied. We detected (by PCR method) the expression of 15 genes of sphingolipid metabolism: sphingomyelinases (SMPD1 and SMPD3), acid ceramidase (ASAH1), glucosylceramidase (GBA), ceramide synthases (CERS 1-6), sphingosine kinase1 (SPHK1), sphingosine-1-phosphate lyase 1 (SGPL1), sphingosine-1-phosphate receptors (S1PR1, S1PR2 and S1PR3) whose enzymes control the synthesis of ceramides, sphingosines and sphingosine-1-phosphates. We found a significant increase in the expression of genes of sphingosine-1-phosphate lyase 1 SGPL1 ( $p=0.04$ ), sphingosine kinase SPHK1 ( $p=0.009$ ), ceramides synthases 1-6 CERS1 ( $p=0.001$ ), CERS2 ( $p=0.004$ ), CERS3 ( $p=0.001$ ), CERS5 ( $p=0.002$ ), CERS6 ( $p=0.006$ ) in samples of placenta of patients with PABC during their treatment with cytostatic chemotherapy. The tendency to increase of expression of ASAH gene,  $p=0.09$  was observed. Analysis of genes of sphingosine-1-phosphate receptors revealed increasing in expression of S1PR1,  $p=0.01$ ; S1PR2,  $p=0.04$ ; S1PR3,  $p=0.002$ .

Our pilot study is one of the first investigating the molecular genetic characteristics of PABC. We suppose that such researches could allow identifying new targets and prognostic markers of obstetric complications, as well as opportunities to assess the effectiveness of chemotherapy in the treatment of BC during pregnancy. Significant changes in the expression of genes controlling the level of ceramides, sphingosine and S1P may indicate their promise for consideration as potential candidates for both diagnostics and therapy of patients with BC in pregnant women.

## ВЛИЯНИЕ ХИМИОТЕРАПИИ НА ПЕПТИДНЫЙ ПАТТЕРН ЛИГАНДОВ ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ I КЛАССА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ЯИЧНИКОВ

А.В. Игнатьева, А.А. Кузнецов, В.О. Шендер, П.В. Шнайдер, Г.П. Арапиди

<sup>1</sup>ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА; <sup>2</sup>ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемакина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Ранее нами было показано изменение сплайсинга в опухолевых клетках в ответ на использование химиотерапевтических препаратов платины и таксанов, причем различные препараты вызывали схожие изменения сплайсинга. У нас возникла гипотеза о том, что в результате изменения сплайсинга, вызванного применением терапевтических препаратов, через главный комплекс гистосовместимости I класса (МНС I; Major histocompatibility complex class I) опухолевые клетки будут презентировать новые антигены, которые можно рассматривать как потенциальные мишени для иммунотерапии.

Целью работы является поиск потенциальных мишеней для иммунотерапии аденокарциномы яичника, появляющихся после химиотерапии. Предварительно была разработана и улучшена методика выделения иммунопептидома из клеточных линий и постоперационного опухолевого материала, которая позволила идентифицировать с 0,1 г опухолевого материала (примерно 100 млн клеток) свыше 1000 уникальных пептидных последовательностей лигандов МНС I, более 80% которых являются аффинными к соответствующим аллелям МНС I по данным биоинформатического анализа.

Среди 3774 идентифицированных пептидов иммунопептидома аденокарциномы яичника обнаружено 97 пептидных фрагментов 10 опухоль-специфичных белков (СТА, Cancer/Testis Antigens), которые в норме синтезируются только клетками половых желез мужчин, и которые представляют интерес для иммунотерапии. 7 СТА белков были описаны как потенциальные мишени для иммунотерапии ранее, в базе данных CTDdatabase. 3 потенциальных СТА белка, фрагменты которых мы обнаружили в иммунопептидоме аденокарциномы яичника, ранее не были обнаружены в опухолях. Это продукты генов FSIP2, RCC2, CLGN. Их специфичность для опухоли была подтверждена на основании данных ресурса «The Human Protein Atlas». Также в иммунопептидоме пациентов (как до, так и после химиотерапевтического лечения) были обнаружены пептидные фрагменты продукта гена MUC16 – Муцина-16 или опухолевого антигена CA125 – известного маркера аденокарциномы яичника.

Работа осуществлена при государственном финансировании проекта «Имунопептидом», номер государственной регистрации НИОКР 124031200004-7.

## EFFECT OF CHEMOTHERAPY ON THE PEPTIDE PATTERN OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS I LIGANDS IN MALIGNANT OVARIAN TUMOURS

A.V. Ignateva, A.A. Kuznetsov, V.O. Shender, P.V. Schnaider, G.P. Arapidi

<sup>1</sup>Lopukhin Federal Scientific and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical and Biological Agency; <sup>2</sup>Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

Previously, we demonstrated a change in the splicing pattern of tumor cells in response to treatment with chemotherapeutic agents such as platinum and taxanes, and various other drugs caused similar alterations in splicing. Based on these findings, we hypothesized that due to the changes in splicing induced by therapeutic drugs, tumor cells may present new antigens through the major histocompatibility complex (MHC) class I, which could potentially serve as targets for immunotherapeutic interventions.

The goal of this study is to identify potential targets for immunotherapy in ovarian adenocarcinoma patients who have undergone chemotherapy. To this end, we have developed and refined a technique for extracting the immunopeptidome from both cell lines and tumor tissue samples obtained after surgery. This technique has enabled us to identify more than 1,000 unique peptides associated with MHC I molecules, from only 0.1 g of tumor tissue (equivalent to approximately 100 million cells). Bioinformatic analysis indicates that more than 80% of these peptides are affine to the corresponding MHC I allele.

Among the 3,774 peptides identified in the ovarian adenocarcinoma immunopeptidome, we found 97 peptide fragments from 10 tumor-specific proteins (Cancer/Testis Antigens, or CTA), which are typically produced only by cells of the male genital glands and are of interest for immunotherapy. Seven of these CTA proteins have been previously described as potential targets for immunotherapy in the CTDdatabase. Three potential CTA peptides, fragments of which were found in our immunopeptidomic analysis of ovarian adenocarcinomas, had not been previously detected in tumors: these are products of FSIP2, RCC2, and CLGN genes. The tumor specificity of these peptides was confirmed using data from the Human Protein Atlas. Additionally, peptide fragments from the mucin-16 (MUC16) protein or the CA125 tumor antigen, a well-known marker for ovarian adenocarcinoma, were also found in the immunopeptidomes of patients (before and after chemotherapy).

The work was conducted with the financial support of the State for the Immunopeptide Project, which has the state registration number R&D 124031200004-7.

# Цитофлуориметр SinoCyte для широчайшего круга задач



## Новый! Быстрый! Удобный!



- до 3х лазеров (405, 488 и 637 нм)
- до 15 каналов детекции флуоресценции
- скорость сбора данных – до 50 000 событий/с
- размер клеток от 0,2 до 50 мкм
- точный подсчет концентрации клеток
- защита от перекрестной контаминации образцов
- упрощенный протокол настройки компенсации сигнала и удобное ПО
- высокое разрешение, чувствительность и стабильность сигнала

**Опции:** автоматический забор образцов из планшета или пробирок.

[www.dia-m.ru](http://www.dia-m.ru)



**Эксклюзивный дистрибьютор компаний:**  
**Domel, Don Whitley Scientific, ABE и**  
**авторизованный поставщик компаний: Crystal,**  
**Heal Force, HyHas, Logos Biosystems, Ke Cheng**

Мы поставляем сертифицированное  
общелaborаторное оборудование:

- Центрифуги, центрифужные испарители
- Станции для работы в анаэробных условиях, гипоксии и микроанаэробных условиях
- Средоварки и модули для розлива
- CO<sub>2</sub>-инкубаторы и ламинары
- Шейкеры-инкубаторы и роллерные установки
- Системы визуализации и подсчета клеток
- Холодильники и морозильники
- Хроматографические системы
- Системы водоподготовки



### Узнайте больше

[sales@3s-laboratory.ru](mailto:sales@3s-laboratory.ru)  
+7 (499) 135-40-22,  
+7 (495) 978-29-90,  
+7 (929) 543-15-11

Наша сервисная служба проводит пусконаладочные работы, а также диагностику, ремонт и техническое обслуживание поставляемого оборудования

ООО «Компания 3с-лаборатория»  
Россия, 117 036, Москва, ул. Шверника, д. 4



# БЕЗУПРЕЧНЫЙ СИНТЕЗ (м)РНК

ПОЛНЫЙ СПЕКТР РЕШЕНИЙ:  
ОТ RAW-MATERIALS ДО READY-TO-USE

## АНАЛОГИ СТРУКТУРЫ КЭПА

m6AG  
m7GmAmG  
ARCA

## МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ТРИФОСФАТЫ

Pseudo-UTP  
N1-Me-Pseudo-UTP  
N6-Me-ATP  
5-Me-CTP  
5-OMe-UTP

## ГОТОВЫЕ НАБОРЫ ДЛЯ СИНТЕЗА

Немодифицированной РНК  
Кэпированной РНК  
Кэпированной мРНК,  
содержащей в структуре  
модифицированные  
нуклеотиды:  
псевдоуридин (Ψ),  
5-метилцитидин (m5C)

## РЕАГЕНТЫ ДЛЯ СОПРЯЖЕННЫХ СТАДИЙ СИНТЕЗА (м)РНК

Наборы для мечения РНК  
Высокоточные полимеразы  
Наборы для выделения  
РНК и ДНК



8 800 600 88 76



## ВСЕ САМОЕ НЕОБХОДИМОЕ

для молекулярной биологии,  
работы с клетками, изучения белков

### Высококачественные реактивы для повседневного использования:

- Наборы для выделения и очистки нуклеиновых кислот
- ДНК-полимеразы и обратные транскриптазы
- Реактивы для электрофореза нуклеиновых кислот
- Ферменты рестрикции и реактивы для клонирования
- Питательные среды, ростовые добавки, антибиотики и буферы для культуральных работ
- Наборы для оценки выживаемости клеток, детекции апоптоза и анализа клеточного цикла
- Красители для органелл
- Наборы для выделения белков, ингибиторы протеаз
- Реактивы для электрофореза белков и вестерн-блоттинга
- Наборы для определения концентрации белка

А также разнообразный пластик и общелабораторное, научное и диагностическое оборудование в полном ассортименте!



АО «БиоХимМак»  
119192, Москва, Ломоносовский пр., д. 29, корп. 1  
☎ (495)647-27-40  
✉ pcr@biochemmack.ru  
🌐 biochemmack.ru



## НИКОТИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, НЕЙРОТОКСИНЫ И ДРУГИЕ ЛИГАНДЫ: ХОРОШО ИЗВЕСТНОЕ И НОВОЕ

**В.И. Цетлин, Ю.Н. Уткин, И.Е. Кашеверов, И.В. Шелухина, Е.В. Крюкова, Д.С. Кудрявцев**

*ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*

$\alpha$ -Бунгаротоксин ( $\alpha$ -Bgt), белковый  $\alpha$ -нейротоксин из яда змеи, более 60 лет назад сыграл решающую роль в выделении и характеристике никотинового ацетилхолинового рецептора (nAChR) мышечного типа из электрического органа ската. Позднее  $\alpha$ -конотоксины (пептидные нейротоксины из ядовитых морских моллюсков) позволили различать типы мышечных и нейрональных nAChR.

За установлением голландскими исследователями кристаллической структуры ацетилхолин-связывающего белка ( модели лиганд-связывающего домена nAChR и всех других Cys-петельных рецепторов ) последовало установление криоэлектронной микроскопией строения nAChR *Torpedo marmorata* с разрешением 4,5 Å, затем были установлены кристаллические структуры ряда нейрональных nAChR, а информация о связывании  $\alpha$ -нейротоксинов и  $\alpha$ -конотоксинов имела только для их комплексов с AChBP и лиганд-связывающими доменами мономерных  $\alpha 1$  и  $\alpha 9$ -субъединиц nAChR. Недавно криоэлектронной микроскопией установлены структуры высокого разрешения для nAChR *Torpedo marmorata* и нейронального  $\alpha 7$  nAChR в свободном виде, а также в комплексах с  $\alpha$ -Bgt, агонистами и аллостерическими модуляторами. Давно идущие в ИБХ РАН исследования nAChR частично отражены в обзоре [1].

В настоящее время нами проводится конструирование и синтез новых антагонистов и агонистов nAChR: показано, что фиксированный дисульфидной связью фрагмент петли II белка Lynx1 человека (имеющего трех-петельную структуру, сходную с таковой  $\alpha$ -нейротоксинов) эффективно ингибирует мышечный nAChR. Открыто, что олигоаргинины являются новым классом ингибиторов nAChR, а октааргинин R8 на мышинной модели снижает индуцированную оксалиплатином боль столь же эффективно, как и  $\alpha$ -конотоксин RgIA, селективно ингибирующий  $\alpha 9 \alpha 10$  nAChR. К имеющимся антагонистам недавно добавлен и новый тип агонистов: ранее нами было открыто, что 6-бромгипафорин из морского моллюска является агонистом  $\alpha 7$  nAChR; недавно с помощью молекулярного моделирования были сконструированы и затем синтезированы аналоги со значительно возросшей эффективностью связывания, обладающие противовоспалительной и анальгетической активностью.

1. Tsetlin V, Shelukhina I, Kozlov S, Kasheverov I. Fifty years of animal toxin research at the Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS. *Int J Mol Sci.* 2023, 24(18): 13884.

## NICOTINIC RECEPTORS, NEUROTOXINS AND OTHER LIGANDS: WELL-KNOWN AND NEW

**V.I. Tsetlin, Yu.N. Utkin, I.E. Kasheverov, I.V. Shelukhina, E.V. Kryukova, D.S. Kudryavtsev**

*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow*

$\alpha$ -Bungarotoxin ( $\alpha$ -Bgt), a protein  $\alpha$ -neurotoxin from the snake venom, over 60 years ago played a critical role in characterization of the muscle-type nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) from the ray electric organ. Later,  $\alpha$ -conotoxins (peptide neurotoxins from poisonous marine snails) allowed distinguishing the muscle and neuronal nAChRs.

The crystal structure of the acetylcholine-binding protein (AChBP), a model of the ligand-binding domain of the nAChR and all other Cys-loop receptors, was followed by the establishment by cryo-electron microscopy of the *Torpedo marmorata* nAChR structure with a resolution of 4.5 Å, then crystal structures of several neuronal nAChRs were established, but information about binding of  $\alpha$ -neurotoxins and  $\alpha$ -conotoxins was available only for their complexes with AChBP and ligand-binding domains of monomeric  $\alpha 1$  and  $\alpha 9$  nAChR subunits. Recently, cryo-electron microscopy has revealed high-resolution structures for *Torpedo marmorata* nAChR and neuronal  $\alpha 7$  nAChR in the free form, as well as in complexes with  $\alpha$ -Bgt, agonists and allosteric modulators. The decades of research on nAChR and neurotoxins at the Institute of Bioorganic Chemistry are partially reflected in the review [1].

We are currently designing and synthesizing new nAChR antagonists and agonists: it has been shown that a disulfide-linked synthetic fragment of loop II of the human Lynx1 protein (having a three-loop structure similar to that of  $\alpha$ -neurotoxins) effectively inhibits muscle nAChR. Oligoarginines have been discovered to be a new class of nAChR inhibitors, and octaarginine R8 in a mouse model reduced oxaliplatin-induced pain as effectively as  $\alpha$ -conotoxin RgIA, which selectively inhibits  $\alpha 9 \alpha 10$  nAChRs. A new type of agonists has recently been added to the existing class of antagonists: we previously discovered that 6-bromohypaphorin from the sea mollusk is an  $\alpha 7$  nAChR agonist; recently, using molecular modeling we designed and then synthesized analogues with significantly increased binding efficiency and possessing anti-inflammatory and analgesic activities.

1. Tsetlin V, Shelukhina I, Kozlov S, Kasheverov I. Fifty years of animal toxin research at the Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS. *Int J Mol Sci.* 2023, 24(18): 13884.

### ПЕПТИДНЫЕ ФРАГМЕНТЫ ТРЕХ-ПЕТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ: СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Ю.Н. Уткин<sup>1</sup>, Н.С. Егорова<sup>1</sup>, Е.В. Крюкова<sup>1</sup>, И.В. Шелухина<sup>1</sup>, М.С. Северюхина<sup>2</sup>, Л.О. Оджомоко<sup>1</sup>, Л.А. Епифанова<sup>1</sup>, М.В. Владыкина<sup>1</sup>, А.М. Исмаилова<sup>2</sup>, Э.Р. Шайхутдинова<sup>2</sup>, И.А. Дьяченко<sup>2</sup>, К.С. Минеев<sup>1</sup>, И.Е. Кашеверов<sup>1</sup>, В.И. Цетлин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; <sup>2</sup>Филиал ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушchino

Ряд представителей семейства трех-петельных белков, включая нетрадиционные токсины змей и эндогенные белки животных lynx1 и SLURP, взаимодействуют с никотиновыми холинорецепторами (нХР). Для ряда этих белков показано, что центральная полипептидная петля II играет важную роль в их биологической активности. Мы синтезировали ряд фрагментов петли II и изучили их активность. В частности, получен фрагмент lynx1 человека с остатками Cys на N- и C-концах, образующими дисульфид, а также аналогичные формы SLURP1 и SLURP2 человека [1]. По данным радиолигандного анализа значения IC<sub>50</sub> для нХР *Torpedo californica* составили 4,9 мкМ для фрагмента lynx1 и более 300 мкМ для фрагментов SLURP1 и SLURP2. По данным кальциевого имиджинга фрагменты SLURP1 и SLURP2 (50 мкМ) не ингибировали  $\alpha 7$  нХР. IC<sub>50</sub> фрагмента lynx1 для  $\alpha 7$  нХР человека равнялась 147 мкМ, он ингибировал функциональную активность  $\alpha 7$  нХР и  $\alpha 3^*$  нХР с IC<sub>50</sub>=1 и 0,86 мкМ, соответственно. При конкуренции за лиганд-связывающий домен  $\alpha 9$  субъединицы нХР фрагмент lynx1 показал IC<sub>50</sub> около 40 мкМ. Исследование фрагмента lynx1 методом 1H-ЯМР показало, что соединение C- и N-концов стабилизировало его конформацию, которая стала похожей на петлю II в структуре ws-Lynx1 [2]. Для токсина WTX кобры *Naja kaouthia* синтезированы несколько фрагментов петли II, которые содержали остатки Cys на N- и C-концах, окисленные с образованием дисульфидной связи. Изучено ингибирование различных подтипов нХР пептидами и их влияние на артериальное давление (АД) и частоту сердечных сокращений (ЧСС) крыс. Синтетические фрагменты ингибировали  $\alpha 7$  и нХР мышечного типа сильнее, чем WTX. Впервые показано, что WTX и его фрагменты ингибируют  $\alpha 3$ -содержащие и  $\alpha 9\alpha 10$  нХР, причем фрагменты более активны, чем WTX. Фрагменты сильнее чем WTX снижали АД у крыс.

Таким образом, как в ингибировании всех анализируемых подтипов нХР, так и в снижении артериального давления фрагменты центральной петли были более активны, чем WTX. Интересно, что фрагмент lynx1 также снижал АД и увеличивал ЧСС крыс.

1. Kryukova et al. From synthetic fragments of endogenous three-finger proteins to potential drugs. *Front Pharmacol.* 2019, 10: 748.
2. Mineev et al. Spatial structure and activity of synthetic fragments of Lynx1 and of nicotinic receptor loop C models. *Biomolecules* 2020, 11(1): 1.

### PEPTIDE FRAGMENTS OF THREE-FINGER PROTEINS: SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY

Yu.N. Utkin<sup>1</sup>, N.S. Egorova<sup>1</sup>, E.V. Kryukova<sup>1</sup>, I.V. Shelukhina<sup>1</sup>, M.S. Severyukhina<sup>2</sup>, L.O. Ojomoko<sup>1</sup>, L.A. Epifanova<sup>1</sup>, M.V. Vladykina<sup>1</sup>, A.M. Ismailova<sup>2</sup>, E.R. Shaykhutdinova<sup>2</sup>, I.A. Dyachenko<sup>2</sup>, K.S. Mineev<sup>1</sup>, I.E. Kasheverov<sup>1</sup>, V.I. Tsetlin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow; <sup>2</sup>Branch of the Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Pushchino

Several members of three-finger protein family, including nonconventional snake toxins and animal proteins lynx1 and SLURP, interact with nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). For some proteins, an important role of the central polypeptide loop II in their biological activity was shown. We synthesized a number of loop II fragments and studied their activity. In particular, a fragment of human lynx1 with Cys residues at N- and C-termini forming a disulfide, as well as similar forms of human SLURP1 and SLURP2, were obtained [1]. According to radioligand analysis, IC<sub>50</sub> values for *Torpedo californica* nAChRs were 4.9  $\mu$ M for the lynx1 fragment and more than 300  $\mu$ M for the SLURP1 and SLURP2 fragments. According to calcium imaging, the SLURP1 and SLURP2 fragments (50  $\mu$ M) did not inhibit  $\alpha 7$  nAChR. The IC<sub>50</sub> of the lynx1 fragment for human  $\alpha 7$  nAChR was 147  $\mu$ M, it inhibited the functional activity of  $\alpha 7$  nAChR and  $\alpha 3^*$  nAChR with IC<sub>50</sub>=1 and 0.86  $\mu$ M, respectively. The lynx1 fragment in competition for the ligand-binding domain of the  $\alpha 9$  nAChR subunit showed an IC<sub>50</sub> of about 40  $\mu$ M. A 1H-NMR study of the lynx1 fragment showed that connection of the C- and N-termini stabilized its conformation, which became similar to loop II in the ws-Lynx1 [2]. Several fragments of loop II containing Cys residues at the N- and C-termini oxidized to a disulfide bond were synthesized for the WTX toxin of the cobra *Naja kaouthia*. The inhibition of various nAChR subtypes by the peptides and their effect on blood pressure (BP) and heart rate (HR) in rats were studied. The fragments inhibited  $\alpha 7$  and muscle-type nAChR more strongly than WTX. It was shown for the first time that WTX and its fragments inhibit  $\alpha 3^*$  and  $\alpha 9\alpha 10$  nAChRs, and the fragments are more active than WTX. The fragments decreased BP in rats more strongly than WTX.

Thus, the fragments of the central loop were more active than WTX both in inhibiting all analyzed nAChR subtypes and in decreasing BP. Interestingly, the lynx1 fragment also decreased BP rats.

1. Kryukova et al. From synthetic fragments of endogenous three-finger proteins to potential drugs. *Front Pharmacol.* 2019, 10: 748.
2. Mineev et al. Spatial structure and activity of synthetic fragments of Lynx1 and of nicotinic receptor loop C models. *Biomolecules* 2020, 11(1): 1.



## ПЕПТИДНЫЕ МОДУЛЯТОРЫ ASIC КАНАЛОВ ИЗ ЯДОВ МОРСКИХ АНЕМОН

Я.А. Андреев, Т.А. Хасанов, Д.И. Осмаков

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

Кислото-чувствительные ионные каналы (ASIC) привлекают значительное внимание в качестве фармакологических мишеней. Изоформа канала ASIC1a широко представлена в нейронах центральной нервной системы и играет важную роль в синаптической пластичности, тревожности, нейродегенерации и т. д. В периферической нервной системе ASIC1a экспрессируется вместе с каналом ASIC3, который хорошо известен своим участием в передаче болевых сигналов, механической чувствительности и воспалительной гипералгезии. Интересно, что точные функции ASIC1a в периферической нервной системе до конца не ясны и требуют дополнительного изучения. Для анализа конкретных ролей каналов ASIC незаменимыми инструментами служат пептидные лиганды, способные специфично изменять активность этих каналов.

Из яда актинии *Metridium senile* нами был выделен первый селективный положительный аллостерический модулятор канала ASIC1a. Активное соединение представляет собой пептидную молекулу, названную Ms13-1. Пептид Ms13-1 представляет собой совершенно новый тип укладки пептидных молекул, которую мы назвали «Cys-ladder». Анализ действия вещества в электрофизиологических экспериментах на ооцитах *X. laevis* показал, что Ms13-1 обладает высоким сродством к ASIC1a и способен увеличивать амплитуду активации канала в наномолярных концентрациях. Инъекция Ms13-1 в подушечки задней лапы вызывала устойчивое и длительное болевое поведение, которое можно ослабить антагонистом канала ASIC1a. Используя молекулярное моделирование, мы получили пептидный ингибитор канала ASIC1a из пептида актинии Ugr9-1, изначально действующего только на ASIC3 канал. Этот пептид (A23K) сохранил ингибирующий эффект на ASIC3 (IC<sub>50</sub> 9,39 мкМ), но при этом у него появился дополнительный ингибирующий эффект на ASIC1a (IC<sub>50</sub> 6,72 мкМ) в электрофизиологических экспериментах. Решающее взаимодействие между остатком K23 пептида и остатком D355 в канале ASIC1a было предсказано молекулярным моделированием и подтверждено сайт-направленным мутагенезом. Однако пептид A23K показал значительное снижение анальгетических свойств по сравнению с диким типом Ugr9-1.

Таким образом, сложное взаимодействие между этими ASIC каналами необходимо учитывать при разработке активных молекул, нацеленных на каналы ASIC.

*Работа выполнена при поддержке РФФ грант № 22-75-10021.*

## PEPTIDE MODULATORS OF ASIC CHANNELS FROM VENOMS OF SEA ANEMONES

Ya.A. Andreev, T.A. Khasanov, D.I. Osmakov

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

Acid-sensing ion channels (ASICs) have attracted considerable attention as pharmacological targets. The ASIC1a isoform is widely expressed in neurons of the central nervous system and plays an important role in synaptic plasticity, anxiety, neurodegeneration, etc. In the peripheral nervous system, ASIC1a is expressed together with the ASIC3 channel, which is well known for its involvement in pain signaling, mechanical sensitivity, and inflammatory hyperalgesia. Interestingly, the exact functions of ASIC1a in the peripheral nervous system are not fully understood and require further study. Peptide ligands that can specifically alter the activity of ASICs are indispensable tools for analyzing the specific roles of ASICs. We isolated the first selective positive allosteric modulator of the ASIC1a channel from the venom of the sea anemone *Metridium senile*. The active compound is a peptide molecule named Ms13-1. The Ms13-1 peptide represents an entirely new type of peptide fold, which we named "Cys-ladder". Analysis of the effect of the substance in electrophysiological experiments on *X. laevis* oocytes showed that Ms13-1 has a high affinity for ASIC1a and can increase the amplitude of channel activation at nanomolar concentrations. Injection of Ms13-1 into the hind paw pads induced a stable and long-lasting pain behavior, which can be attenuated by an ASIC1a channel antagonist. Using molecular modeling, we obtained a peptide inhibitor of the ASIC1a channel from the sea anemone peptide Ugr9-1, originally acting only on the ASIC3 channel. This peptide (A23K) retained the inhibitory effect on ASIC3 (IC<sub>50</sub> 9.39 μM), but at the same time it acquired an additional inhibitory effect on ASIC1a (IC<sub>50</sub> 6.72 μM) in electrophysiological experiments. The crucial interaction between the Lys23 residue of the peptide and the Asp355 residue in the ASIC1a channel was predicted by molecular modeling and confirmed by site-directed mutagenesis. However, the A23K peptide showed a significant decrease in analgesic properties compared to the wild-type Ugr9-1.

Thus, the complex interaction between these channels should be considered when developing active molecules targeting ASIC channels.

*This work was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 22-75-10021.*

## СТРЕКАЮЩИЕ КАК ИСТОЧНИК ПЕРСПЕКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ГИПЕРГЛИКЕМИИ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Д.В. Попкова, Н.Ю. Отставных, О.В. Синцова, И.Н. Гладких, М.П. Исаева, Е.В. Лейченко

*Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток*

Поиск новых биологически активных молекул в наземных и морских организмах является актуальной биомедицинской задачей современности. Морские анемоны, принадлежащие к типу Стрекающие, представляют собой огромный источник перспективных фармакологических соединений. Особый интерес вызывают токсины белковой природы, представленные, как правило, в виде комбинаторных библиотек, и обладающие широким спектром действия в отношении мембранных липидов, ионных каналов, а также разнообразных ферментов, в том числе протеаз и  $\alpha$ -амилаз. Недавно в морских анемонах были обнаружены мощные ингибиторы  $\alpha$ -амилаз млекопитающих, структурно принадлежащие широко распространенному среди Стрекающих классу  $\beta$ -дефензинов, однако слабо охарактеризованному в отношении ингибиторов  $\alpha$ -амилаз.

С применением методов генетики и молекулярной биологии было исследовано разнообразие гомологов  $\beta$ -дефензин-подобных ингибиторов амилаз *Heteractis magnifica* и выявлено 7 природных изоформ магнификамида (44 а.о.). Впервые охарактеризована организация генов, кодирующих магнификамиды, и зафиксировано явление удержания интронов в кодирующей зрелый пептид области. В результате поиска в базах данных сервиса NCBI в муцинах морских анемонов выявлен домен (40 а.о.), сходный с  $\beta$ -дефензин-подобными ингибиторами  $\alpha$ -амилаз (44 а.о.). В ходе TBLASTN анализа в транскриптомах морских анемонов обнаружено 34 последовательности, кодирующие ингибиторы, и 14 последовательностей, кодирующих содержащие ингибиторный домен муцины. Последующий филогенетический анализ выявил две группы морских анемонов, транскриптомы которых содержат последовательности, кодирующие исключительно  $\beta$ -дефензин-подобные ингибиторы (1), или совместно с их доменами в составе муцинов (2). Высказано предположение, что однодоменные ингибиторы (pI 5–6) участвуют в регуляции активности  $\alpha$ -амилаз, тогда как ингибиторные домены в муцинах (pI около 9) – в защите углеводных групп от их гидролиза  $\alpha$ -глюкозидазами.

Доказанная *in vivo* способность магнификамидов поддерживать нормальный уровень глюкозы в крови у мышей с сахарным диабетом 1 и 2 типа, а также их устойчивость к действию широких значений pH, повышенных температур и протеолитических ферментов открывает возможности для создания на их основе новых эффективных препаратов для терапии сахарного диабета.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 21-74-20147).*

## CNIDARIANS AS A POTENTIAL SOURCE OF COMPOUNDS FOR THE TREATMENT OF HYPERGLYCEMIA IN DIABETES MELLITUS

D. Popkova, N. Otstavnykh, O. Sintsova, I. Gladkikh, M. Isaeva, E. Leychenko

*G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok*

The search for novel biologically active molecules in terrestrial and marine organisms is a critical current biomedical challenge. Sea anemones (Cnidaria) represent a vast source of promising pharmacological compounds. Of particular interest are protein-based toxins, which are typically presented in the form of combinatorial libraries and have a wide range of activity against membrane lipids, ion channels, and various enzymes, including proteases and  $\alpha$ -amylases. It has recently been demonstrated that potent inhibitors of mammalian amylases can be found in sea anemones. Structurally, these inhibitors belong to the  $\beta$ -defensin family, which is widespread among Cnidaria but poorly characterized in terms of its  $\alpha$ -amylase inhibitory activity.

The genetic and molecular biological methods were employed in the study of homologues of  $\beta$ -defensin-like inhibitors of  $\alpha$ -amylases in *Heteractis magnifica*, resulting in the identification of 7 natural isoforms of magnificamide (44 a.o.). For the first time, the organization of genes encoding magnificamides has been characterized and the phenomenon of intron retention in the region encoding a mature peptide has been documented. A search of the NCBI databases revealed the presence of a domain (40 a.o.) similar to  $\beta$ -defensin-like amylase inhibitors (44 a.o.) in sea anemone mucins. A TBLASTN analysis led to the identification of 34 sequences encoding inhibitors and 14 sequences encoding mucins containing an inhibitory domain. Subsequent phylogenetic analysis revealed the existence of two distinct groups of sea anemones, characterized by the presence of either exclusively  $\beta$ -defensin-like inhibitors (1), or the co-existence of these inhibitors and their domains within mucins (2). It has been proposed that single-domain inhibitors (pI 5-6) are involved in regulation of  $\alpha$ -amylase activity, while inhibitory domains in mucins (pI around 9) protect carbohydrate groups from hydrolysis by  $\alpha$ -glucosidases.

The verified *in vivo* ability of magnificamides to maintain normal blood glucose levels in mice with type 1 and type 2 diabetes mellitus, as well as their resistance to a wide range of pH values, high temperature and proteolytic enzymes, provides opportunities for the development of new effective drugs for the treatment of diabetes mellitus.

*The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation grant (project No. 21-74-20147).*

### **β-ДЕФЕНЗИН-ПОДОБНЫЕ ПЕПТИДЫ ИЗ МОРСКОЙ АНЕМОНЫ *HETERACTIS MAGNIFICA* КАК ИНГИБИТОРЫ α-АМИЛАЗ МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

**А.С. Меньшов<sup>1</sup>, А.С. Парамонов<sup>2</sup>, Д.В. Попкова<sup>1</sup>, О.В. Синцова<sup>1</sup>, З.О. Шенкарёв<sup>2</sup>, И.Н. Гладких<sup>1</sup>, Е.В. Лейченко<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток; <sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Поиск селективных ингибиторов α-амилаз для создания на их основе эффективных антигликемических препаратов является актуальным как для терапии и профилактики сахарного диабета, так и различных патологических состояний, связанных с повышенным уровнем глюкозы в крови.

Из морской анемоны *Heteractis magnifica* были выделены 44 а.о. пептиды, магнификамиды, способные ингибировать α-амилазы человека в пикомолярных концентрациях. В данной работе методом спектроскопии ЯМР установлена структура и оценена внутримолекулярная динамика (вода, 30°C, pH 6,0) магнификамида-2 - наиболее эффективного ингибитора α-амилаз, представляющего интерес в качестве возможного лекарственного препарата. Показано, что магнификамид-2 образует характерный для β-дефензин-подобных пептидов морских анемонов β-лист, состоящий из четырех β-тяжей. Ингибирующая петля магнификамида-2 (Y7-IYHGV-Y13) является конформационно подвижной в широком временном диапазоне, что, вероятно, необходимо для адаптации структуры пептида к сайту связывания фермента. Замена Y7A, Y9A, Y13A приводили к увеличению константы ингибирования свиной панкреатической α-амилазы магнификамидом-2 на несколько порядков, в то время как замена H10R не привела к ожидаемому, за счет увеличения электростатического взаимодействия между ингибитором и активным центром фермента, увеличению эффективности ингибирования. Вероятно, высокая аффинность магнификамида-2 определяется гидрофобным взаимодействием ингибирующей петли с преддверием сайта связывания α-амилазы.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (<https://rscf.ru/en/project/21-74-20147/>).

1. Sintsova O et al. Magnificamide, a β-defensin-like peptide from the mucus of the sea anemone *Heteractis magnifica*, is a strong inhibitor of mammalian α-amylases. *Mar Drugs* 2019, 17: 542. doi:10.3390/md17100542.

### **β-DEFENSIN-LIKE PEPTIDES FROM SEA ANEMONE *HETERACTIS MAGNIFICA* AS MAMMALIAN α-AMYLASE INHIBITORS**

**A.S. Menshov<sup>1</sup>, A.S. Paramonov<sup>2</sup>, D.V. Popkova<sup>1</sup>, O.V. Sintsova<sup>1</sup>, Z.O. Shenkarev<sup>2</sup>, I.N. Gladkikh<sup>1</sup>, E.V. Leychenko<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia;

<sup>2</sup>Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

The search of selective α-amylase inhibitors to create effective antiglycemic drugs on their basis is important for both the treatment and prevention of diabetes mellitus and various pathological conditions associated with elevated blood glucose levels.

Magnificamides, 44 aa peptides, isolated from the sea anemone *Heteractis magnifica*, were found to be able to inhibit human α-amylases at the picomolar concentrations. In this study, NMR spectroscopy was used to determine the structure and estimate intramolecular dynamics (water, 30°C, pH 6.0) of magnificamide-2, the most effective α-amylase inhibitor, which is of interest as a potential drug. It was shown that magnificamide-2 forms a β-sheet, consisting of four β-strands, which is characteristic of β-defensin-like peptides of sea anemones. The inhibitory loop of magnificamide-2 (Y7-IYHGV-Y13) is conformationally flexible over a wide time range, which is likely necessary for adaptation of the peptide structure to the enzyme binding site. Mutations Y7A, Y9A, Y13A resulted to an increase of the inhibition constant of porcine pancreatic α-amylase by magnificamide-2 by several orders of magnitude, while the replacement of side chain H10R did not result to the expected increase in inhibition efficiency due to an increase in the electrostatic interaction between the inhibitor and the enzyme active center. The high affinity of magnificamide-2 is likely due to the hydrophobic interaction of the inhibitory loop with the α-amylase binding site.

The study was supported by Russian Science Foundation (<https://rscf.ru/en/project/21-74-20147/>).

1. Sintsova O et al. Magnificamide, a β-defensin-like peptide from the mucus of the sea anemone *Heteractis magnifica*, is a strong inhibitor of mammalian α-amylases. *Mar Drugs* 2019, 17: 542. doi:10.3390/md17100542.

**ПОЛУЧЕНИЕ АЦЕТИЛХОЛИН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА *LYMNEA STAGNALIS* – СТРУКТУРНОГО АНАЛОГА  
ВНЕКЛЕТОЧНОГО ДОМЕНА НИКОТИНОВЫХ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ – В ЭКСПРЕССИОННОЙ СИСТЕМЕ  
LEXSY**

**Л.В. Сон, И.А. Иванов, Д.С. Кудрявцев, И.Е. Кашеверов**

*ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*

Ацетилхолин-связывающий белок (АХСБ), обнаруженный в нервной системе некоторых беспозвоночных, является секреторным белком, участвующим в регуляции холинергической нейротрансмиссии. АХСБ представляет интерес прежде всего как структурный аналог внеклеточного лиганд-связывающего домена никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (нАХР), одних из наиболее изученных ионных каналов. Кристаллические структуры данного белка в комплексе с различными холинергическими лигандами пролили свет на функционирование нАХР и позволили установить ключевые аминокислотные остатки, отвечающие за аффинность и специфичность различных подтипов нАХР. Получение АХСБ с целью структурных исследований актуально и на сегодняшний день. АХСБ имеет сложную третичную структуру, содержит посттрансляционные модификации (гликозилирование), и функционально активен в виде пентамера. Ранее АХСБ получали в дрожжах, клетках насекомых, млекопитающих или бактериях. Однако, все эти системы обладают определенными недостатками.

В данной работе для экспрессии АХСБ использовалась альтернативная коммерчески доступная система на основе простейших *Leishmania tarentolae* – LEXSY, которая является экономически более выгодной по сравнению с эукариотическими клеточными системами экспрессии, и дает возможность за более короткие сроки получать сложные функционально активные белки. Нами успешно были осуществлены все стадии данной экспрессионной работы в системе LEXSY: от получения штамма-продуцента до выделения очищенного белкового препарата АХСБ, структура и функциональная активность которого была подтверждена и охарактеризована с использованием хромато-масс-спектрометрического и радиолигандного анализа, соответственно.

**EXPRESSION OF THE ACETYLCHOLINE-BINDING PROTEIN FROM *LYMNEA STAGNALIS*, A STRUCTURAL ANALOGUE  
OF THE EXTRACELLULAR DOMAIN OF NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS IN THE LEXSY EXPRESSION SYSTEM**

**L.V. Son, I.A. Ivanov, D.S. Kudryavtsev, I.E. Kasheverov**

*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow*

The acetylcholine binding protein (AChBP), present in several invertebrates' nervous systems, is a secretory protein that regulates cholinergic neurotransmission. AChBP is of primary importance as a structural homolog of the extracellular ligand-binding domain of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), one of the most extensively studied ion channels. The crystal structures of this protein in association with diverse cholinergic ligands gave insight into nAChR activity and allowed the identification of critical amino acid residues responsible for the affinity and specificity of various nAChR subtypes. Obtaining AChBP for structural studies remains important today. AChBP has a complex tertiary structure, undergoes post-translational modifications (glycosylation), and functions as a pentamer. AChBP was previously isolated from bacteria, yeast, insects, or mammalian cells. However, all of these expression systems have certain drawbacks.

An alternate, commercially available system called LEXSY, which is based on the protozoan *Leishmania tarentolae*, was used in this work. Compared to eukaryotic expression cell systems, it enables the production of complex, functionally active proteins faster and at lower costs. From generating a producer strain to isolating the soluble homopentamer of AChBP, we have successfully completed all stages of this expression work in the LEXSY system. The structure and functional activity of the isolated protein were verified and characterized by means of liquid chromatography, mass spectrometry, and radioligand analysis, respectively.

### ВЗАИМОСВЯЗЬ ПРОЦЕССОВ СИНТЕЗА БИОЛОГИЧЕСКИЙ АКТИВНОГО ЛИПОПЕПТИДА СУРФАКТИНА И 6S РНК-ОПОСРЕДОВАННОЙ РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ В *BACILLUS SUBTILIS*

В.С. Трефилов<sup>1,2</sup>, О.Ю. Буренина<sup>3</sup>, Е.Ю. Линдин<sup>1</sup>, Е.А. Коркунова<sup>1</sup>, М.Б. Вирыасов<sup>2</sup>, М.Э. Зверева<sup>1</sup>, Е.А. Кубарева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Химический факультет и <sup>2</sup>НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова;

<sup>3</sup>Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

Сурфактин (SF) – поверхностно-активное вещество биологического происхождения, имеющее высокий потенциал практического применения. Сурфактин относится к классу липопептидов – он состоит из циклического гептапептидного фрагмента и остатка жирной кислоты. В настоящее время основным способом его получения является микробиологический синтез бактериями рода *Bacillus*. Повышение эффективности синтеза SF в них является актуальной задачей.

В работе использовали два штамма *Bacillus subtilis* – природный NCIB 3610 и лабораторный PY79. Объектами исследования были глобальные регуляторы транскрипции в *B. subtilis* – малые некодирующие 6S-1 и 6S-2 РНК, а предметом изучения – их влияние на биосинтез SF. Показано, что делеция гена 6S-1 РНК приводит к повышению уровня мРНК всех генов оперона *urfA*, кодирующего сурфактин-синтазу, в поздней стационарной фазе роста для обоих штаммов. Удаление гена 6S-2 РНК не влияет на эффективность транскрипции генов сурфактин-синтазы ни в одном штамме. Для штамма PY79 с нокаутом генов 6S-1 и 6S-2 РНК сохраняется активация транскрипции генов оперона *urfA* в поздней стационарной фазе роста, в то время как для штамма NCIB 3610 с двойным нокаутом активация не наблюдается. Содержание сурфактина в культуральной жидкости определяли методом ВЭЖХ с УФ-детектором. Для количественных расчетов применяли специально созданный алгоритм градуировки по сумме пиков изоформ SF.

Показано, что эффективность синтеза сурфактина не коррелирует с уровнем синтеза мРНК генов оперона *urfA*, а также генов факторов стимуляции и ингибирования продукции рассматриваемого биологически активного соединения, что определяет необходимость дальнейшего изучения этого процесса на молекулярном уровне.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект 24-24-00193.*

### THE RELATIONSHIP BETWEEN SYNTHESIS OF BIOLOGICAL ACTIVE LIPOPEPTIDE SURFACTIN AND 6S RNA-MEDIATED REGULATION OF GENE TRANSCRIPTION IN *BACILLUS SUBTILIS*

V.S. Trefilov<sup>1,2</sup>, O.Y. Burenina<sup>3</sup>, E.Y. Lindin<sup>1</sup>, E.A. Korkunova<sup>1</sup>, M.B. Viryasov<sup>2</sup>, M.I. Zvereva<sup>1</sup>, E.A. Kubareva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry and <sup>2</sup>Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University; <sup>3</sup>Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow

Surfactin (SF) is a biological surfactant that has a high potential for various applications. It is a lipopeptide, consisting of a cyclic heptapeptide fragment and a fatty acid residue. The main method of producing SF currently is microbiological synthesis in bacteria from the *Bacillus* genus. Improving the efficiency of this process is an important task of modern science.

Two strains of *Bacillus subtilis* were used in this study: natural NCIB 3610 and laboratory PY79. The focus of the research was on global regulators of transcription in *B. subtilis*, namely small non-coding 6S-1 and 6S-2 RNAs, and their influence on the SF biosynthesis. It was shown that the deletion of 6S-1 RNA leads to an increase in the mRNA level of all genes in the *urfA* operon, which encodes surfactin synthetase, during the late stationary phase of growth for both strains. The removal of the 6S-2 gene does not affect the transcription of the surfactin synthase genes in either strain. For the PY79 strain, which has knockout genes for both 6S-1 and 6S-2 RNAs, transcription of *urfA* operon remains activated in the late stationary phase of growth. In contrast, for strain NCIB 3610 with double gene knockout no activation is observed. The content of surfactin in the culture broth was analyzed using HPLC with UV detector. For quantitative calculations, we used a specially developed calibration algorithm for the sum of isoform peaks of SF.

It was found that the efficiency of surfactin synthesis is not correlated with the level of mRNA synthesis of the *urfA* operon genes, as well as the genes of stimulation and inhibition factors of SF production. This suggests the need for further investigation of this process at a molecular level.

*The work was carried out with financial support of RSF, project number 24-24-00193.*

## ПОИСК НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ БАКТЕРИАЛЬНЫХ РИБОСОМ СРЕДИ ЗАЩИТНЫХ ПЕПТИДОВ ЖИВОТНЫХ

**П.В. Пантелеев, В.Н. Сафронова, И.А. Болосов, Т.В. Овчинникова**

*ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*

Широкое распространение и эволюция антибиотикоустойчивых возбудителей инфекционных заболеваний является серьезной медицинской проблемой в XXI веке. Около половины известных антибиотиков нацелены на аппарат трансляции клеток-мишеней и до сих пор представляют важнейшее значение для медицины. Ингибиторы трансляции нового поколения должны обладать высокой эффективностью в отношении широкого спектра патогенов и отличными от известных антибиотиков механизмами действия, что снизит вероятность проявления перекрестной резистентности к ним. Одним из классов искомым соединений являются пролин-богатые антимикробные пептиды (ПБ-АМП) – защитные факторы врожденного иммунитета животных. Благодаря множественным контактам ПБ-АМП в выходном тоннеле и пептидилтрансферазном центре рибосомы риск бактериальной кросс-резистентности к ним минимален. В целом сравнительно низкая мембранотропная активность и сопутствующая невысокая цитотоксичность в отношении нормальных клеток млекопитающих позволяют рассматривать ПБ-АМП как перспективные молекулярные скаффолды для разработки антибиотиков. Даже имеющаяся весьма ограниченная информация о ранее обнаруженных ПБ-АМП указывает на их широкое распространение среди животных. Таким образом, отсутствие систематизированных данных о структурном разнообразии ПБ-АМП является актуальной научной проблемой.

В данной работе представлены результаты биоинформатического поиска и анализа биоразнообразия ПБ-АМП животных, в частности, у млекопитающих и морских беспозвоночных, а также приведены данные по изучению механизмов антибактериального действия представителей обнаруженных новых структурных семейств ПБ-АМП. Проведенный скрининг биологической активности широкой панели новых ПБ-АМП позволил идентифицировать пептиды, обладающие высокой селективностью в отношении ряда клинически значимых патогенов, в том числе микобактерий. Полученные данные демонстрируют высокую эффективность отобранных АМП на животных моделях бактериальных инфекций, что позволяет рассматривать эти молекулы в качестве прототипов антибиотиков нового поколения.

*Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (соглашение № 22-14-00380).*

## SEARCH FOR NOVEL INHIBITORS OF BACTERIAL RIBOSOMES AMONG ANIMAL HOST DEFENSE PEPTIDES

**P.V. Panteleev, V.N. Safronova, I.A. Bolosov, T.V. Ovchinnikova**

*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow*

The spread and evolution of antibiotic-resistant pathogens is a major 21st century medical problem. Approximately half of all known antibiotics target the translation machinery of bacterial cells and are still of vital importance in medicine. Next-generation translation inhibitors should be highly effective against a wide range of pathogens and have different mechanisms of action than known antibiotics, thereby reducing the likelihood of cross-resistance to them. One class of compounds being sought are proline-rich antimicrobial peptides (PrAMPs), which are host defense molecular factors of animal innate immunity. Due to the multiple contacts of PrAMPs in the exit tunnel and the peptidyl transferase center of the ribosome, the risk of bacterial cross-resistance to these molecules is minimal. Overall, the relatively low membranolytic activity and the concomitant low cytotoxicity against mammalian cells allow PrAMPs to be considered as promising molecular scaffolds for antibiotic development. Even the very limited information available on PrAMPs discovered so far indicates their wide distribution among animals. Thus, the lack of systematic data on the structural diversity of PrAMPs is an urgent scientific problem.

This work presents the results of bioinformatic search and analysis of animal PrAMP biodiversity, in particular in mammals and marine invertebrates, as well as data on the study of antibacterial action mechanisms of representatives of the discovered new structural families of PrAMPs. The screening of the biological activity of a wide panel of new PrAMPs allowed to identify peptides with high selectivity against a number of clinically important pathogens, including mycobacteria. The data obtained demonstrate high efficacy of the selected PrAMPs in animal models of bacterial infections, which allows us to consider these molecules as prototypes of new-generation antibiotics.

*The study was supported by the Russian Science Foundation (RSF project No 22-14-00380).*

## РЕГИОСПЕЦИФИЧНЫЙ МЕТОД СИНТЕЗА $\beta$ - ИЛИ $\gamma$ -РАЗВЕТВЛЁННЫХ ПЕПТИДОВ СОДЕРЖАЩИХ ДИКАРБОНОВУЮ АМИНОКИСЛОТУ

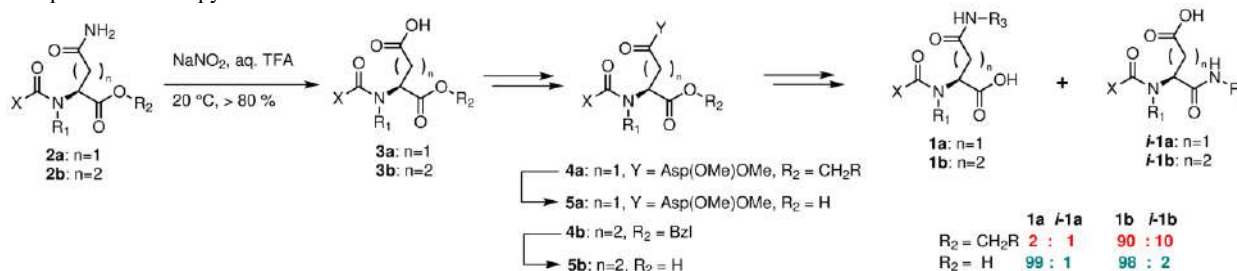
V.N. Azev<sup>1</sup>, L.K. Baidakova<sup>1</sup>, M.Y. Berzina<sup>2</sup>, A.N. Чулин<sup>1</sup>, V.N. Купцов<sup>3</sup>, A.I. Мирошников<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Филиал ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино; <sup>2</sup>ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; <sup>3</sup>АО АВВА РУС, Москва

$\beta$ - и  $\gamma$ -разветвлённые производные аспарагиновой и глутаминовой кислот находят применение в исследованиях мультвалентных взаимодействий углеводов с различными макромолекулами (в частности, соединение **1a**), а также используются в синтезе дендримерных карбоксилатных конструкций, изучаемых в качестве микробицидов. Кроме того, ряд таких веществ задействован в ковалентной модификации пептидных гормонов с целью оптимизации их фармакологических параметров, например, такая модификация присутствует в производном гормона GLP-1 (**1b**).

В ряде случаев стандартные методы получения обсуждаемых соединений малоэффективны, поскольку сопровождаются протеканием побочных реакций, в частности изомеризацией в линейные пептиды.

Нами предложен новый эффективный подход к получению ряда таких соединений, отличительными особенностями которого являются: 1) использованием амидной группы аспарагина (глутамина) в качестве временной защитной группы боковой цепи аспарагиновой или глутаминовой кислот с целью селективного введения защитной группы на  $\alpha$ -карбоксил (соединения **2**), 2) применение нового реагента (NaNO<sub>2</sub>/водная трифторуксусная кислота) для превращения защищенного производного аспарагина (глутамина) в соответствующую  $\alpha$ -защищенную дикарбоновую аминокислоту (**2** в **3**), 3) подавление образования аспартимида (глутаримида) в финальной стадии синтеза за счет электростатического эффекта. Практически-значимым результатом была демонстрация значительного снижения образования побочного продукта линейного строения (*i*-**1b**) в ходе химической модификации аналога гормона GLP-1 в случае применения в этом превращении производного глутаминовой кислоты (**5b**) со свободной  $\alpha$ -карбоксильной группой.



## REGIOSPECIFIC PREPARATION METHOD OF PEPTIDES CONTAINING $\beta$ - OR $\gamma$ -BRANCHED DICARBOXYLIC AMINO ACID

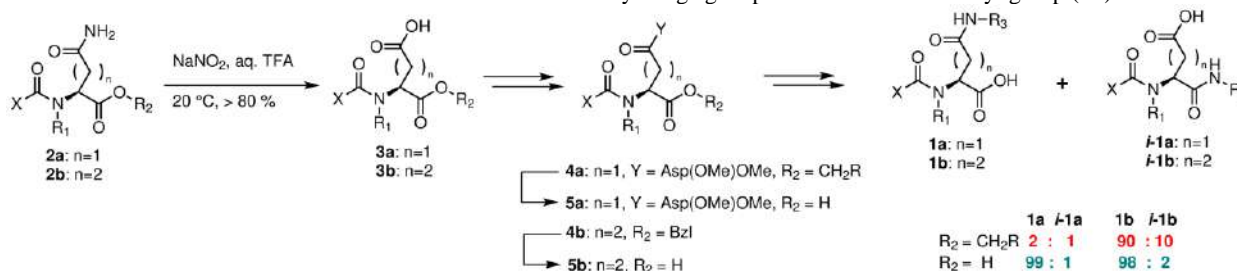
V.N. Azev<sup>1</sup>, L.K. Baidakova<sup>1</sup>, M.Y. Berzina<sup>2</sup>, A.N. Chulin<sup>1</sup>, V.N. Kuptsov<sup>3</sup>, A.I. Miroshnikov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Branch of Shemyakin & Ovchinnikov Bioorganic Chemistry Institute, RAS, Pushchino; <sup>2</sup>Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow; <sup>3</sup>AVVA RUS, Moscow

Derivatives of  $\beta$ -(or  $\gamma$ -) branched aspartic and glutamic acids have found application in the preparation of glycoconjugates and glycoclusters that are utilized in studies of polyvalent interactions of carbohydrates with carbohydrate-binding proteins, one of such derivatives is compound **1a**. The same derivatives are utilized in the chemical synthesis of dendrimeric polycarboxylate constructs possessing microbicidal properties. Also, some of these derivatives are used in peptide hormone modification aiming to ameliorate their pharmacological properties: for example, GLP-1 derivative **1b**.

Common synthetic approaches that are used for the preparation of some of the compounds under discussion often fail in terms of selectivity leading to the formation of substantial amounts of linear isomers.

We developed a novel approach for the preparation of a number of side-chain branched peptides. The distinctive features of the method developed include: 1) masking side-chain carboxylic group as an amide (compounds **2**); 2) an employment of a novel reagent (NaNO<sub>2</sub>/aq. TFA) for transformation of protected asparagine (glutamine) derivative into the suitably protected corresponding  $\alpha$ -protected aspartic (glutamic) acid (conversion of **2** into **3**); 3) aspartimide (glutaramide) formation suppression employing electrostatic effect in a final deprotection step. One of the notable applications of the method described herein was *ca.* ten-fold suppression of isomerisation side product (*i*-**1b**) formation in the GLP-1 chemical modification reaction when acylating agent possessed free  $\alpha$ -carboxyl group (**5b**).



## ПОДХОДЫ К ПОЛУЧЕНИЮ И ИССЛЕДОВАНИЮ БЕЛКОВ С САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКИМ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕМ

К.В. Перфилова<sup>1</sup>, А.А. Капитонова<sup>1</sup>, А.А. Антсон<sup>2</sup>, Р.Б. Кулей<sup>3</sup>, Н.Н. Случанко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия;

<sup>2</sup>Йоркская лаборатория структурной биологии, Химический факультет Йоркского университета, Йорк, Великобритания;

<sup>3</sup>Кафедра биохимии и биофизики, Государственный университет Орегона, Корваллис, США

Фосфорилирование – одна из самых распространенных посттрансляционных модификаций белков. Понимание того, какую роль играет фосфорилирование тех или иных участков в норме, при патологиях и инфекциях, особенно полезно для биомедицины. Трудности в получении белков, фосфорилированных по конкретному остатку, значительно замедляют развитие данной области. Популярный подход, заключающийся в введении замены целевого Ser/Thr на Glu или Asp, лишь отчасти имитирует pSer/pThr. Ферментативное фосфорилирование белка требует наличия нужной протеинкиназы и подбора условий реакции и сопряжено с побочным фосфорилированием других остатков в составе белка или с неполным фосфорилированием целевого участка. Наиболее перспективным инструментом для получения точно фосфорилированных белков является технология расширения генетического кода, которая обеспечивает сайт-направленное встраивание pThr или pSer в рекомбинантный белок в клетках *E. coli*. Кроме этого, недавно была разработана автономная система PermaPhos для ко-трансляционного включения негидролиземого аналога pSer – фосфометилаланина (PMA).

Белки NPM1 человека и N белок из SARS-CoV-2 подвергаются множественному фосфорилированию, что влияет на их функции. Используя классические и новые подходы, мы изучили роль фосфорилирования конкретных участков данных белков во взаимодействии с фосфопептид-связывающими белками 14-3-3. Для оценки силы связывания между 14-3-3 и интересующими нас фосфоучастками мы разработали универсальную методику получения коротких PMA-пептидов, которые являются функциональными эквивалентами синтетических фосфопептидов, но при этом не подвергаются дефосфорилированию. При сравнении констант диссоциации 14-3-3 и PMA-пептидов NPM1 вокруг остатков S48, S106 и S260 были сделаны выводы об иерархии данных фосфоучастков в их узнавании 14-3-3. В случае N белка мы сравнили параметры связывания между 14-3-3 и PMA-пептидами вокруг ключевого остатка T205, соответствующими фрагментам N белка уханьского варианта и с аминокислотными заменами, обнаруженными в более поздних вариантах SARS-CoV-2. Данные результаты соответствовали ожиданиям, основанным на структурных данных комплекса 14-3-3 и синтетического пептида N белка уханьского варианта SARS-CoV-2.

*Работа выполнена при частичной поддержке РФФ (грант № 24-74-00091).*

## APPROACHES TO OBTAINING AND STUDYING PROTEINS WITH SITE-SPECIFIC PHOSPHORYLATION

K.V. Perfilova<sup>1</sup>, A.A. Kapitonova<sup>1</sup>, A.A. Antson<sup>2</sup>, R.B. Cooley<sup>3</sup>, N.N. Sluchanko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>York Structural Biology Laboratory, Department of Chemistry, University of York, York, UK; <sup>3</sup>Department of Biochemistry

and Biophysics, Oregon State University, Corvallis, USA

Phosphorylation is a common protein post-translational modification. Therefore, understanding the role of phosphorylation of certain sites in health, pathologies and during infections is especially useful for biomedicine. Difficulties in obtaining proteins phosphorylated at a specific residue significantly slow down the development of this field. A popular approach, which consists of mutation of the target Ser/Thr to Glu or Asp, only partially imitates pSer/pThr. Enzymatic protein phosphorylation requires active protein kinase, selection of reaction conditions and is associated with side phosphorylation of other residues in the protein or with incomplete phosphorylation of the target site. The most promising tool for obtaining single phosphorylated proteins is the technology of genetic code expansion, which provides site-directed insertion of pThr or pSer into a recombinant protein in *E. coli*. In addition, an autonomous system PermaPhos was recently developed for co-translational incorporation of phosphonomethylalanine (PMA) – a non-hydrolyzable analogue of pSer.

Human NPM1 and SARS-CoV-2 N proteins undergo multiple phosphorylation, which affects their functions. We investigated the role of site-specific phosphorylation of these proteins in their interactions with phosphopeptide-binding proteins 14-3-3 using classical and novel approaches. To evaluate the binding affinities between 14-3-3 and the phosphopeptides, we developed an universal method for obtaining short PMA-peptides that are functional equivalents of synthetic phosphopeptides but are not subject to dephosphorylation. By comparing the K<sub>d</sub> between 14-3-3 and NPM1 PMA-peptides around S48, S106, and S260 residues, we revealed a hierarchy of 14-3-3 affinities toward these phosphosites. In the case of the N protein, we compared the binding parameters between 14-3-3 and PMA-peptides around the key T205 residue, corresponding to fragments of the N protein of the Wuhan variant or with amino acid substitutions found in later SARS-CoV-2 variants. These results were consistent with expectations based on the structural data of the 14-3-3 complex and the synthetic N protein peptide of the Wuhan variant of SARS-CoV-2.

*This work is partially supported by the Russian Scientific Foundation (project No. 24-74-00091).*



#### ФЕРМЕНТЫ БИОСИНТЕЗА ПОЛИКЕТИДА ГИСПИДИНА ИЗ КОФЕЙНОЙ КИСЛОТЫ

К.А. Палкина<sup>1,2</sup>, Т.А. Каратаева<sup>1,2</sup>, М.М. Перфилов<sup>1,2</sup>, Н.М. Маркина<sup>1,2</sup>, Е. Гарсия-Перез<sup>3</sup>, М. Вазкез-Вилар<sup>3</sup>, М. Родригез-Родригез<sup>3</sup>, Т. Митюшкина<sup>1,2</sup>, О.А. Белозерова<sup>2</sup>, С.И. Ковальчук<sup>2</sup>, А. Алекберова<sup>1,2</sup>, А. Балакирева<sup>1,2</sup>, Д. Орзаез<sup>3</sup>, И.В. Ямпольский<sup>1,2,4,5</sup>, А.С. Мишин<sup>1,2</sup>, К.С. Саркисян<sup>1,2,5,6,7</sup>

<sup>1</sup>ООО «Планта», Москва, Россия; <sup>2</sup>ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия; <sup>3</sup>Институт молекулярной и клеточной биологии растений (ИВМСР), Высший совет по научным исследованиям (CSIC), Политехнический университет Валенсии, Испания; <sup>4</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия; <sup>5</sup>Light Bio Inc, Кетчум, Айдахо, США; <sup>6</sup>Synthetic Biology Group, MRC London Institute of Medical Sciences, Лондон, Великобритания; <sup>7</sup>Institute of Clinical Sciences, Медицинский факультет, Имперский колледж Лондона, Лондон, Великобритания

Сегодня методы биоимаджинга, основанные на флуоресценции и биолюминесценции, широко применяются в науке и медицине. Расшифровка механизма биолюминесценции грибов позволила получить в распоряжение исследователей еще один потенциальный инструмент для разработки на его основе новых методов визуализации. Поликетид гиспидин – предшественник люциферина грибов. Оптимизация его биосинтеза позволит не только усовершенствовать биолюминесцентную систему грибов, но и исследовать поликетидсинтазы грибов и растений.

В ходе данной работы был произведен поиск генов-кандидатов гиспидинсинтаз среди генов поликетидсинтаз III типа среди растений. Нами было показано функционирование гибридного биолюминесцентного пути от кофейной кислоты в клетках дрожжей и млекопитающих для разных поликетидсинтаз III типа из растений. При этом для 8 поликетидсинтаз подтвержден биосинтез гиспидина из кофейной кислоты с помощью ВЭЖХ-МС/МС-анализ. Так, с использованием ферментов не только грибного, но и растительного происхождения, создан химерный биохимический путь, обеспечивающий автономную биолюминесценцию в клетках растений. Также было показано, что в растительных системах стадия биосинтеза гиспидина, катализируемая поликетидсинтазами III типа, лимитирует интенсивность свечения. Небольшой размер поликетидсинтаз растений в сравнении с ферментами из грибов, позволил добиться сокращения размера кодирующей генетической конструкции. Это сделало возможным ее доставку с помощью вирусных систем.

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-15-2023-610.

#### ENZYMES CATALYSING THE BIOSYNTHESIS OF POLYKETIDE HISPIDIN FROM CAFFEIC ACID

K.A. Palkina<sup>1,2</sup>, T.A. Karataeva<sup>1,2</sup>, M.M. Perfilov<sup>1,2</sup>, N.M. Markina<sup>1,2</sup>, E. Garcia-Perez<sup>3</sup>, M. Vazquez-Vilar<sup>3</sup>, M. Rodriguez-Rodriguez<sup>3</sup>, T. Mitiouchkina<sup>1,2</sup>, O.A. Belozerova<sup>2</sup>, S.I. Kovalchuk<sup>2</sup>, A. Alekberova<sup>1,2</sup>, A. Balakireva<sup>1,2</sup>, D. Orzaez<sup>3</sup>, I.V. Yampolsky<sup>1,2,4,5</sup>, A.S. Mishin<sup>1,2</sup>, K.S. Sarkisyan<sup>1,2,5,6,7</sup>

<sup>1</sup>Planta LLC, Moscow, Russia; <sup>2</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; <sup>3</sup>Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Universitat Politècnica de València, Spain; <sup>4</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia; <sup>5</sup>Light Bio Inc, Ketchum, Idaho, USA; <sup>6</sup>Synthetic Biology Group, MRC London Institute of Medical Sciences, London, UK; <sup>7</sup>Institute of Clinical Sciences, Faculty of Medicine, Imperial College London, London

Today, bioimaging techniques based on fluorescence and bioluminescence are extensively utilized in both scientific research and medical applications. The elucidation of the mechanism underlying fungal bioluminescence has provided researchers with a promising new tool for developing advanced imaging methods. The polyketide hispidin serves as a precursor to fungal luciferin, and optimizing its biosynthesis has the potential to enhance the bioluminescent system in fungi. Moreover, this optimization allows for the investigation of polyketide synthases in both fungi and plants.

In our research, we identified candidate genes for hispidin synthases by exploring type III polyketide synthase genes in plants. We successfully demonstrated the operation of a hybrid bioluminescent pathway originating from caffeic acid in yeast and mammalian cells, utilizing various type III polyketide synthases from plants. Through LCMS analysis, we confirmed hispidin biosynthesis from caffeic acid for eight distinct polyketide synthases. As a result, we established a hybrid biochemical pathway combining fungal and plant enzymes, enabling autonomous bioluminescence in plant cells. Our findings also revealed that in plant systems, the stage of hispidin biosynthesis catalyzed by type III polyketide synthases is a limiting factor in the luminescence process. Notably, the smaller size of plant polyketide synthases compared to their fungal counterparts allowed for a more compact genetic construct, facilitating delivery via viral systems.

This work was supported by the grant from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation No. 075-15-2023-610.

#### ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ I ИЗ *MASSILIA AUREA*

К.С. Бедрицких, А.А. Булыгин, Н.А. Кузнецов, А.А. Кузнецова

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

ДНК-полимеразы — это ферменты, отвечающие за репликацию и репарацию ДНК, отличающиеся структурой, точностью синтеза и специфическими свойствами. Они широко применяются в молекулярной биологии, диагностике и других областях. Ранее в Лаборатории исследования модификации биополимеров ИХБФМ СО РАН был выполнен филогенетический анализ ДНК-полимераз, принадлежащих к структурному семейству А, что позволило установить высококонсервативный консенсусный «слепок», включающий 62 высококонсервативных остатка, распределенных в структуре фермента [Булыгин А.А. и др. Мол. биол. 2023]. Набор этих консервативных остатков может выступать функциональным слепком, характеризующим ДНК-полимеразы семейства А в целом. Были проанализированы последовательности полимераз всех микроорганизмов Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур (КЭМТК) ИХБФМ СО РАН ([http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/emtc\\_collection](http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/emtc_collection)), обнаруженных в среде с температурой выше 50°C. Анализ более 4000 депонированных микроорганизмов, позволил отобрать ряд организмов, аминокислотная последовательность ДНК-полимераз которых обладала наибольшим сходством с «функциональным слепком» ферментов из рода *Thermus*. Установлено, что ДНК-полимеразы данных микроорганизмов в настоящее время не охарактеризованы, поэтому в данной работе было выполнено исследование ферментативных свойств ДНК-полимеразы одного из отобранных микроорганизмов, а именно *Massilia aurea* (ДНК-полимераза Mau). Данный микроорганизм был выделен из пробы термальной воды (74°C), Камчатка, Кальдера вулкана Узон. Детальное кинетическое исследование биохимических свойств ДНК-полимеразы Mau показало оптимальные условия работы фермента: 20 мМ KCl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub> при pH 8,8 (50 мМ Tris/HCl), а температурный оптимум составил около 30 °C. Фермент обладает 5'→3' и 3'→5' экзонуклеазными активностями. Определены кинетические параметры полимеразной реакции, катализируемой ДНК-полимеразой Mau. Полученные характеристики позволяют заключить, что данный фермент можно использовать в молекулярно-биологических методах в качестве аналога ДНК-полимеразы Кленова [Kuznetsova A.A. et al. Fermentation. 2023].

*Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования, соглашение № 075-15-2021-1085.*

#### DNA POLYMERASE I FROM *MASSILIA AUREA* CHARACTERISATION

K.S. Bedritskikh, A.A. Bulygin, N.A. Kuznetsov, A.A. Kuznetsova

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk*

DNA polymerases are enzymes responsible for DNA replication and repair, the structure of DNA polymerases is quite conserved but each one characterised different fidelity, thermostability and other properties. DNA polymerases are widely used in molecular biology, diagnostics and other fields. Earlier in the Laboratory of Biopolymer Modification Research of ICBFM SB RAS, a phylogenetic analysis of DNA polymerases belonging to the structural family A was performed, which allowed us to establish a “functional framework” containing 62 highly conserved residues distributed in the enzyme structure [Bulygin A.A. et al. Mol. Biol. 2023]. The “functional framework” is able to characterise DNA polymerases of the A family as a whole. The sequences of DNA polymerases from all microorganisms of the Collection of Extremophilic Microorganisms and Type Cultures (CEMTC, Novosibirsk, Russia) ([http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/emtc\\_collection](http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/emtc_collection)) collected from a medium with a high temperature (above 50°C) were analysed. Analysis of more than 4000 deposited microorganisms made it possible to select a number of organisms whose amino acid sequence of DNA polymerases had the greatest similarity to the “functional framework” of *Thermus* enzymes. It was found that DNA polymerases of these microorganisms have not been characterised at present, so in this study we investigated the enzymatic properties of the DNA polymerase of one of the selected microorganisms, namely *Massilia aurea* (DNA polymerase Mau). This microorganism was isolated from a thermal water sample (74°C), Kamchatka, Uzon Volcano Caldera, Russia. A detailed kinetic study of the biochemical properties of DNA polymerase Mau showed the optimal conditions for the enzyme: 20 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub> at pH 8.8 (50 mM Tris/HCl), and the temperature optimum was about 30°C. The enzyme possesses 5'→3' and 3'→5' exonuclease activities. The kinetic parameters of the polymerase reaction catalysed by DNA polymerase Mau were determined. The obtained parameters allow us to conclude that this enzyme can be used in molecular biological methods as an analogue of Klenow's DNA polymerase [Kuznetsova A.A. et al. Fermentation. 2023].

*This work was supported by the grant from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation No. 075-15-2021-1085.*

#### УНИКАЛЬНЫЕ КАРОТИНОИД-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ – ПИГМЕНТЫ ПРЯМОКРЫЛЫХ

Н.А. Егоркин<sup>1</sup>, И.А. Седлов<sup>1</sup>, Л.А. Варфоломеева<sup>2</sup>, К.М. Бойко<sup>2</sup>, Н.Н. Случанко<sup>2</sup>

<sup>1</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет; <sup>2</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Представители отряда Orthoptera, например кузнечики и саранчи, обладают окраской, которая может выполнять предупреждающую или маскирующую функцию. Окраска покровов животных нередко обусловлена присутствием каротиноидов, специфично связанных с белками. Известно, что водорастворимый бета-каротин-связывающий белок (ВВР) пустынной саранчи *Schistocerca gregaria* секретируется клетками эпителия самцов в период массовых миграций, обеспечивая яркую окраску тела, которая в дальнейшем в короткое время может быть изменена на пеструю маскирующую. Однако структура ВВР и его биохимические свойства не были охарактеризованы.

В данной работе был получен белок ВВР из нативного источника, а также продемонстрирована возможность образования функциональных окрашенных холоформ ВВР при экспрессии в клетках *E. coli*, продуцирующих каротиноиды. Продemonстрирована высокая специфичность ВВР к бета-каротину при крайне низкой эффективности связывания ликопина (предшественника синтеза бета-каротина). Также выявлена способность ВВР к лиганд-зависимой ренатурации, посредством которой были получены комплексы ВВР с другими каротиноидами (ксантофиллами зеаксантином, астаксантином, кантаксантином и эхиненоном). Для образующегося водорастворимого комплекса ВВР с бета-каротином была продемонстрирована высокая термостабильность и устойчивость к денатурирующим агентам. Более того, удалось получить раствор комплекса ВВР с бета-каротином в воде с концентрацией 200 мкМ и выше. Для объяснения механизма связывания каротиноида, селективности к бета-каротину и стехиометрии была получена кристаллическая структура комплекса ВВР с бета-каротином, которая является первой структурой бета-каротина в комплексе с каким-либо водорастворимым белком. Также было выявлено, что окраска другого представителя прямокрылых, певчего кузнечика *Tettigonia cantans* обусловлена накоплением негомологичного белка, образующего комплекс с каротиноидом и билином. Изучение каротиноид-связывающих белков – пигментов насекомых имеет как прикладное значение в сельском хозяйстве и биотехнологии, так и несет глубокий фундаментальный интерес.

#### UNIQUE WATER-SOLUBLE CAROTENOID-BINDING PROTEIN PIGMENTS OF ORTHOPTERA

N.A. Egorkin<sup>1</sup>, I.A. Sedlov<sup>1</sup>, L.A. Varfolomeeva<sup>2</sup>, K.M. Boyko<sup>2</sup>, N.N. Sluchanko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>M.V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology; <sup>2</sup>A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow

Representatives of the Orthoptera order such as grasshoppers and locusts can possess bright or camouflaging coloration. The coloration of the animal's coverings is often determined by the presence of carotenoids, specifically bound to proteins. It is known that the water-soluble beta-carotene-binding protein (BBP) of the desert locust *Schistocerca gregaria* is secreted by the epithelial cells of males during periods of mass migration, providing a bright body coloration that can subsequently change to a mottled camouflage in a short time. However, the structure and biochemical properties of BBP have not yet been characterized.

In this study, BBP was obtained from locust tissues and the possibility of forming functional colored holoproteins of BBP was demonstrated through expression in *E. coli* cells producing carotenoids. A high specificity of BBP for beta-carotene was shown, while the binding efficiency for lycopene (a precursor in the beta-carotene biosynthesis) was very low. The ability of BBP for ligand-dependent renaturation was also identified and through this ability complexes of BBP with other carotenoids (xanthophylls such as zeaxanthin, astaxanthin, canthaxanthin, and echinenone) were obtained. The resulting water-soluble complex of BBP with beta-carotene demonstrated high thermostability and resistance to denaturing agents. Moreover, a solution of the BBP-beta-carotene complex was obtained in water at concentrations of 200 μM and higher. To explain the mechanism of carotenoid binding, selectivity for beta-carotene, and stoichiometry, the crystal structure of the BBP-beta-carotene complex was obtained, which is the first structure of beta-carotene complexed with any water-soluble protein. It was also found that the coloration of another representative of the Orthoptera — the singing grasshopper *Tettigonia cantans* — is due to the accumulation of a non-homologous protein that forms a complex with carotenoid and bilins. The study of insect carotenoid-binding pigment-proteins has practical significance in agriculture and biotechnology, and is of deep fundamental interest.

## ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ПЕПТИДНО-БЕЛКОВОГО КОМПЛЕКСА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ГРИБА ЕЖОВИКА ГРЕБЕНЧАТОГО (*HERICIMUM ERINACEUS*)

А.А. Сысоева

*Институт проблем биорегуляции, Москва*

В различных тканях позвоночных животных, растений и грибов были обнаружены внеклеточно локализованные белково-пептидные биорегуляторы, которые тканеспецифично активируют восстановительные процессы в патологически измененных тканях. Такие биорегуляторы представляют собой структуры, состоящие из белково-пептидного комплекса (БПК), маннозида, глюкозамина и инозитольного якоря с жирными кислотами, за счет которого БПК взаимодействует с плазматической мембраной клетки и влияет на ее вязкоупругие свойства и на ее проницаемость.

В данной работе исследовали биорегулятор, выделенный из гриба ежевика гребенчатого (*Hericium erinaceus*). Полученный водный экстракт ежевика гребенчатого в  $\text{Ca}^{2+}$  содержащем растворе при  $4^\circ\text{C}$  фракционировали путем высаливания белков в насыщенном растворе сернокислого аммония. При высаливании тканевого экстракта происходило распределение белково-пептидного комплекса биорегулятора во фракцию супернатанта (надосадочная жидкость). Далее целевой компонент дополнительно очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. Анализ белкового состава фракции БПК методом электрофореза в ПААГ показал наличие белков с молекулярными массами около 65-70 кДа. Методом лазерного динамического светорассеяния изучено влияние температуры и денатурирующих агентов на пространственную организацию пептидно-белковой компоненты, выделенной из ежевика гребенчатого.

Показано, что комплекс обладает термостабильностью, а в водном растворе содержит наноразмерные частицы (120 нм). Кроме того, показано, что данный комплекс в диапазоне концентрации 1,2-1,4 мкг/мл ингибирует агрегацию бычьего сывороточного альбумина, индуцированную дитиотреитолом.

Таким образом, обладая свойствами ингибитора агрегации белков БПК участвует в восстановлении и репарации поврежденных белковых структур в качестве шаперона. Также важно отметить, что в водных растворах структура БПК образует термостабильные наноразмерные частицы, т.е. обладает способностью контролировать процесс фолдинга белков.

## STUDY OF THE PROPERTIES OF THE PEPTIDE-PROTEIN COMPLEX ISOLATED FROM THE FUNGUS *HERICIMUM ERINACEUS*

A.A. Sysoeva

*Institute of Bioregulation Problems, Moscow*

Extracellularly localized protein-peptide bioregulators that tissue-specific activate repair processes in pathologically altered tissues have been found in various tissues of vertebrate animals, plants, and fungi. Such bioregulators are structures consisting of protein-peptide complex (PPC), mannoside, glucosamine and inositol anchor with fatty acids, due to which PPC interacts with the cell plasma membrane and affects its viscoelastic properties and its permeability.

In this work, a bioregulator isolated from the *Hericium erinaceus* was investigated. The obtained aqueous extract of *Hericium erinaceus* in  $\text{Ca}^{2+}$  containing solution at  $4^\circ\text{C}$  was fractionated by protein precipitation in saturated ammonium sulfate solution. During salting of the tissue extract, the protein-peptide complex of the bioregulator was distributed into the supernatant fraction (supernatant). Then the target component was additionally purified by reversed-phase HPLC. Analysis of the protein composition of the PPC fraction by electrophoresis in PAGE showed the presence of proteins with molecular masses of about 65–70 kDa. The effect of temperature and denaturing agents on the spatial organization of the peptide-protein component isolated from *Hericium erinaceus*.

It is shown that the complex is thermostable and in aqueous solution contains nanosized particles (120 nm). In addition, it is shown that this complex in the concentration range of 1.2–1.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  inhibits the aggregation of bovine serum albumin induced by dithiothreitol.

Thus, having the properties of a protein aggregation inhibitor, PPC participates in the restoration and reparation of damaged protein structures as a chaperone. It is also important to note that in aqueous solutions, the PPC structure forms thermostable nanosized particles, i.e. has the ability to control the process of protein folding.

## ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БЕЛКОВО-ПЕПТИДНОГО КОМПОНЕНТА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ПЛОДОВ БРАЗИЛЬСКОГО ОРЕХА (*BERTHOLLETIA EXCELSA*)

Е.Г. Сinyaгина

*Институт проблем биорегуляции, Москва*

В различных тканях животных, растений и грибов присутствуют биорегуляторы, которые влияют на важнейшие биологические процессы – миграцию, адгезию, пролиферацию, дифференцировку клеток. Было установлено, что данный тип биорегуляторов локализован во внеклеточном пространстве, а их активность характеризуется наличием тканевой, но отсутствием видовой специфичности. Биорегуляторы стимулируют репаративные процессы в патологически измененных тканях, способствуют восстановлению их нарушенной структуры за счет дополнительной активации клеточных источников регенерации. Биорегуляторы представляют собой структуры, которые состоят из белково-пептидного комплекса (БПК), глюкозамина, маннозида и инозитального якоря с жирными кислотами, за счет которого БПК взаимодействует с плазматической мембраной клетки.

В данной работе, применив экспериментальный подход, разработанный ранее для биорегуляторов животного происхождения, был идентифицирован биорегулятор из плодовых тел бразильского ореха, который включал в себя получение экстракта в  $\text{Ca}^{2+}$  содержащем растворе при  $4^\circ\text{C}$ , высаливание сернокислым аммонием, очистку методами хроматографии. Идентификацию биорегулятора осуществляли с помощью метода биотестирования, в основе которого лежит определение мембранотропной активности. В ВЭЖХ-фракциях, выделенных из плодов бразильского ореха, были обнаружены белки с молекулярной массой 75 кДа и пептиды с молекулярными массами 5–10 кДа, которые проявляли мембранотропную активность. Методом лазерного динамического светорассеяния исследовано влияние денатурирующих агентов и температуры на пространственную организацию белково-пептидного комплекса, выделенного из плодов бразильского ореха. Выявлено, что данный белково-пептидный комплекс в диапазоне концентраций 2,5–2,75 мкг/мл ингибирует агрегацию бычьего сывороточного альбумина, индуцированную дитиотреитолом и проявляет свойства шаперона.

Таким образом, обладая свойствами ингибитора агрегации белков, БПК участвует в репарации поврежденных белковых структур в качестве шаперона. По этой причине биологическое действие БПК на поврежденные ткани можно объяснить способностью контролировать и/или направлять процесс фолдинга белков. Важно отметить, что в водном растворе БПК образуют термостабильные наноразмерные частицы.

## PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF PROTEIN-PEPTIDE COMPONENT ISOLATED FROM BRAZIL NUT (*BERTHOLLETIA EXCELSA*)

E.G. Sinyagina

*Institute of Bioregulation Problems, Moscow*

Bioregulators are present in various tissues of animals, plants and fungi, which affect the most important biological processes - migration, adhesion, proliferation, differentiation of cells. It was found that this type of bioregulators is localized in the extracellular space, and their activity is characterized by the presence of tissue specificity, but the absence of species specificity. Bioregulators stimulate reparative processes in pathologically altered tissues, contribute to the restoration of their damaged structure due to additional activation of cellular sources of regeneration. Bioregulators are structures that consist of a protein-peptide complex (PPC), glucosamine, mannoside and an inositol anchor with fatty acids, due to which the PPC interacts with the plasma membrane of the cell.

In this work, using the experimental approach previously developed for bioregulators of animal origin, a bioregulator from the Brazil nut was identified, which included obtaining an extract in a  $\text{Ca}^{2+}$ -containing solution at  $4^\circ\text{C}$ , salting out with ammonium sulfate, and purification by chromatography. The bioregulator was identified using a biotesting method based on the determination of membranotropic activity. In the HPLC fractions isolated from the Brazil nut, proteins with a molecular weight of 75 kDa and peptides with molecular weights of 5–10 kDa, which exhibited membranotropic activity, were found. The effect of denaturing agents and temperature on the spatial organization of the protein-peptide complex isolated from the Brazil nut was studied using the laser dynamic light scattering method. It was found that this protein-peptide complex in the concentration range of 2.5–2.75  $\mu\text{g}/\text{ml}$  inhibits the aggregation of bovine serum albumin induced by dithiothreitol and exhibits chaperone properties.

Thus, having the properties of a protein aggregation inhibitor, PPC participates in the reparation of damaged protein structures as a chaperone. For this reason, the biological effect of PPC on damaged tissues can be explained by the ability to control and/or direct the process of protein folding. It is important to note that in an aqueous solution, PPC forms thermostable nanosized particles.

**ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ТРЕХПЕТЕЛЬНЫХ ТОКСИНОВ TFT-VN И TFT-AZE2, ОБНАРУЖЕННЫХ В ЯДАХ ЗМЕЙ *VIPERA NICOLSKII* И *AZEMIOPS FEAЕ* СООТВЕТСТВЕННО ИЗ ШТАММА-ПРОДУЦЕТА *ESCHERICHIA COLI* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ УБИКВИТИН-ПОДОБНОГО SUMO-ДОМЕНА И АФФИННОЙ ГЕКСАГИСТИДИНОВОЙ МЕТКИ**

Д.А. Сухов, В.Ю. Кост, Г.А. Романенко, Ю.Н. Уткин, А.Л. Кандыба

ГНЦ ИБХ РАН, ДНК-Технология, РТУ МИРЭА, Москва, Россия

В настоящее время интерес к рекомбинантным белкам обусловлен их широким применением в различных областях биотехнологии и медицины. Однако сегодня существует проблема получения низкомолекулярных цистеин-богатых белков небактериального происхождения в прокариотических системах. Экспрессия данных белков затруднена ввиду образования нерастворимых белковых агрегатов - телец включения и неправильного замыкания дисульфидных связей, что приводит к процессу рефолдинга. Для увеличения стабильности и растворимости белка была создана, химерная генетическая конструкция, содержащая на N-конце аффинную метку 6xHis и SUMO-домен, позволяющая получать низкомолекулярные цистеин-богатые белки без стартового остатка при синтезе – формилметианина из штамм-продуцентов *Escherichia coli*. SUMO – малые убиквитин-подобные молекулы, состоящие из различных небольших белков для модификации функций других протеинов. После ковалентного присоединения к клеточным мишеням модификаторы SUMO регулируют растворимость и стабильность целевого белка. Поэтому подход введения данного домена может быть использован как полезный инструмент для увеличения экспрессии целевого белка в прокариотической системе, такой как *E. coli*. Однако стоит учитывать вклад данного домена и метки в структуру целевого соединения, ввиду влияния на биологическую активность посредством различного рода взаимодействий: ионных, гидрофобных и др. Поэтому перед проведением различных анализов необходимо удаление таких доменов и меток.

В данной работе продемонстрирован эффективный подход, который основан на получении двух рекомбинантных химерных трехпетельных токсинов TFT-VN и TFT-Aze2, обнаруженных в ядах гадюк *Vipera nicoskii* и *Azemiops feae* путем добавления sumo-домена и 6xHis-tag на N-конец, экспрессированных в *E. coli*. Для получения нативной формы токсинов была синтезирована высокоспецифичная sumo-протеаза, которая способна эффективно отщеплять SUMO-tag.

**PREPARATION OF RECOMBINANT THREE-LOOP TOXINS TFT-VN AND TFT-AZE2 FOUND IN SNAKE VENOMS *VIPERA NICOLSKII* AND *AZEMIOPS FEAЕ*, RESPECTIVELY, FROM THE *ESCHERICHIA COLI* PRODUCING STRAIN USING A UBIQUITIN-LIKE SUMO DOMAIN AND AN AFFINE HEXAHISTIDINE LABEL.**

D.A. Sukhov, V.Yu. Kost, G.A. Romanenko, Yu.N. Utkin, A.L. Kandyba

IBH RAS, DNA Technology, RTU MIREA, Moscow

Currently, the interest in recombinant proteins is due to their wide application in various fields of biotechnology and medicine. However, today there is a problem of obtaining low-molecular-weight cysteine-rich proteins of non-bacterial origin in prokaryotic systems. The expression of these proteins is difficult due to the formation of insoluble protein aggregates – inclusion bodies and improper closure of disulfide bonds, which leads to the refolding process. To increase the stability and solubility of the protein, a chimeric genetic construct was created containing an affinity label 6xHis and a SUMO domain at the N-terminus, which makes it possible to obtain low-molecular-weight cysteine-rich proteins without a starting residue during synthesis – formylmethanine from *Escherichia coli* producing strains. SUMO are small ubiquitin-like molecules composed of various small proteins to modify the functions of other proteins. After covalent attachment to cellular targets, SUMO modifiers regulate the solubility and stability of the target protein. Therefore, the approach of introducing this domain can be used as a useful tool to increase the expression of the target protein in a prokaryotic system such as *E. coli*. However, it is worth considering the contribution of this domain and label to the structure of the target compound, due to the effect on biological activity through various kinds of interactions: ionic, hydrophobic, etc. Therefore, before performing various analyses, it is necessary to remove such domains and labels.

In this work, an effective approach is demonstrated, which is based on the preparation of two recombinant chimeric three-loop toxins TFT-VN and TFT-Aze2, found in the venoms of *Vipera nicoskii* and *Azemiops feae* vipers by adding a sumo domain and 6xHis-tag at the N-terminus expressed in *E. coli*. To obtain the native form of toxins, a highly specific sumo protease was synthesized, which is able to effectively cleave off the SUMO-tag.

**НЕЙРОНЫ ГИПОТАЛАМУСА, ПОЛНОСТЬЮ ИЛИ ЧАСТИЧНО ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ БЕЛКИ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКОГО ФЕНОТИПА: ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ**

**М.В. Угрюмов, Т.С. Пронина**

*Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва*

Гипоталамус является ключевым звеном нейроэндокринной регуляции, которая обеспечивается нейропептидами и дофамином. До конца 1980-х годов считалось, что наряду с пептидергическими нейронами гипоталамус содержит дофаминергические нейроны. Со временем было показано, что помимо дофаминергических нейронов, экспрессирующих транспортер дофамина и ферменты синтеза дофамина — тирозингидроксилазы и декарбоксилазы ароматических L-аминокислот (ДАА), гипоталамус содержит нейроны, экспрессирующие только тирозингидроксилазу, только ДАА, оба фермента или только транспортер дофамина. Конечным секреторным продуктом в моноферментных нейронах, экспрессирующих только тирозингидроксилазу, является L-3,4-дигидроксифенилаланин, тогда как у нейронов, экспрессирующих только АADC, и в биферментных нейронах, лишенных транспортера, синтезируется дофамин. В онтогенезе, особенно в перинатальном периоде, в нейроэндокринных центрах гипоталамуса преобладают моноферментные нейроны. Показано, что L-3,4-дигидроксифенилаланин и дофамин выделяются в нейропиле, желудочки мозга и кровеносные сосуды, участвуя в регуляции дифференцировки клеток-мишеней в перинатальном периоде и функционировании клеток-мишеней во взрослом состоянии. Помимо гипоталамуса, нейроны, частично экспрессирующие дофаминергический фенотип, обнаружены и в других областях мозга, таких как полосатое тело и кора, и даже за пределами мозга – в спинном мозге, в норме и патологии. Примечательно, что при дегенерации дофаминергических нейронов при гиперпролактинемии и болезни Паркинсона, а также при травме спинного мозга количество моноферментных нейронов, экспрессирующих тирозингидроксилазу, существенно увеличивается. Это рассматривается как проявление нейропластичности, направленное на компенсацию функциональной недостаточности сохранившихся дофаминергических нейронов.

**HYPOTHALAMIC NEURONS FULLY OR PARTIALLY EXPRESSING PROTEINS OF THE DOPAMINERGIC PHENOTYPE: FUNCTIONING AND FUNCTIONAL SIGNIFICANCE IN NORM AND PATHOLOGY**

**M.V. Ugrumov, T.S. Pronina**

*Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow*

The hypothalamus is a key link in neuroendocrine regulations, which are provided by neuropeptides and dopamine. Until the late 1980s, it was believed that, along with peptidergic neurons, hypothalamus contains dopaminergic neurons. Over time, it has been shown that besides dopaminergic neurons expressing the dopamine transporter and dopamine-synthesizing enzymes - tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) - the hypothalamus contains neurons expressing only tyrosine hydroxylase, only AADC, both enzymes or only dopamine transporter. The end secretory product of monoenzymatic tyrosine hydroxylase-expressing neurons is L-3,4-dihydroxyphenylalanine, while that of AADC neurons and bienzymatic neurons lacking the dopamine transporter is dopamine. During ontogenesis, especially in the perinatal period, monoenzymatic neurons predominate in the hypothalamic neuroendocrine centers. It was shown that L-3,4-dihydroxyphenylalanine and dopamine are released into the neuropil, cerebral ventricles, and blood vessels, participating in the regulation of target cell differentiation in the perinatal period and the functioning of target cells in adulthood. In addition to the hypothalamus, neurons partially expressing the dopaminergic phenotype have been found in other brain regions such as the striatum and cortex, and even outside the brain – in the spinal cord, in norm and pathology. It is noteworthy that with the degeneration of dopaminergic neurons in hyperprolactinemia and Parkinson's disease, as well as at the spinal cord trauma, the number of monoenzymatic tyrosine hydroxylase-expressing neurons increases significantly. This is considered as a manifestation of neuroplasticity aimed at compensating for the functional deficiency of surviving dopaminergic neurons.

## ПРИРОДНЫЕ ПЕПТИДЫ И ИХ АНАЛОГИ КАК ИНСТРУМЕНТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ И ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ЛЕКАРСТВА

И.Е. Кашеверов<sup>1</sup>, Е.В. Крюкова<sup>1</sup>, Ань Ло<sup>2</sup>, Цзе Хэ<sup>2</sup>, Сулань Ло<sup>2</sup>, Д.С. Кудрявцев<sup>1</sup>, Е.А. Гондаренко<sup>1</sup>, Ю.Н. Уткин<sup>1</sup>, В.И. Цетлин<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Лаборатория специальной биомедицины Гуанси, Медицинский факультет, Университет Гуанси, Наньнин, Китай

Среди большого количества выделенных из различных природных источников соединений пептидной природы, мишенью действия которых являются никотиновые холинорецепторы (нХР), обширную группу составляют конотоксины (КТ) из яда хищных морских моллюсков рода *Conus*. Благодаря относительной простоте получения методами твердофазного пептидного синтеза и достаточно высокой класс селективности к определенным подтипам нХР, последние 40 лет КТ активно используются для структурной и функциональной характеристики многочисленных подтипов нХР из разных клеток, тканей и органов. КТ также рассматриваются как потенциальные агенты для создания лекарств в связи с участием нХР в различных мышечных и нейрональных заболеваниях, канцерогенезе, а также воспалительных и болевых процессах.

Совместно с рядом зарубежных лабораторий в течение последних 25 лет нами были проведены работы по получению десятков новых аналогов КТ, многие из которых показали улучшенное сродство и селективность к изучаемым подтипам нХР и были использованы для детальной структурной характеристики лиганд-связывающих участков этих рецепторов. На базе данных работ был создан новый класс холинергических лигандов – олигоаргинины и разработаны аналоги КТ с особыми кинетическими параметрами взаимодействия с некоторыми подтипами нХР. Ряд КТ и их аналогов были оценены в тестах *in vitro* и *in vivo* как перспективные анальгетические и антираковые соединения. Характерными примерами фундаментальных и ориентированных на клиническое применение исследований последних двух лет стало создание серии новых эффективных антагонистов  $\alpha 9\alpha 10$  подтипа нХР (задействованного в некоторых болевых процессах) на основе  $\alpha$ О-конотоксина GeXIVA (со сродством менее 1 нМ) с выявлением нескольких аргининов, определяющих анальгетические свойства этого пептида, а также обнаружение способности  $\alpha$ -конотоксинов RgIA и [L10A]PnIA заметно влиять на пролиферацию клеток глиобластомы. В частности, показано, что блокада этими КТ  $\alpha 9$  и  $\alpha 7$  нХР, соответственно, приводила к увеличению жизнеспособности клеток глиобластомы пациентов только в среде с добавлением фетальной сыворотки. Активация нХР агонистом в бессывороточной среде без добавления факторов роста, напротив, приводила к уменьшению жизнеспособности клеток, что контрастирует с ранее опубликованными данными.

## NATURAL PEPTIDES AND THEIR ANALOGUES AS RESEARCH TOOLS FOR CHOLINORECEPTORS AND POTENTIAL DRUGS

I.E. Kasheverov<sup>1</sup>, E.V. Kryukova<sup>1</sup>, An Luo<sup>2</sup>, Jie He<sup>2</sup>, Sulan Luo<sup>2</sup>, D.S. Kudryavtsev<sup>1</sup>, E.A. Gondarenko<sup>1</sup>, Y.N. Utkin<sup>1</sup>, V.I. Tsetlin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; <sup>2</sup>Guangxi Key Laboratory of Special Biomedicine, School of Medicine, Guangxi University, Nanning, China

Among the large number of peptide compounds isolated from various natural sources, the target of which are nicotinic receptors (nAChRs), an extensive group consists of conotoxins (CTs) from the venom of predatory marine mollusks of the genus *Conus*. Due to the relative simplicity of obtaining by methods of solid-phase peptide synthesis and sufficiently high selectivity to distinct nAChR subtypes, the CTs have been actively used for the last 40 years for the structural and functional characterization of these receptors in different cells, tissues and organs. The CTs are also considered as potential agents for the drug design because of the involvement of nAChRs in various muscular and neuronal diseases, carcinogenesis, inflammatory and pain processes.

In cooperation with a number of foreign laboratories over the past 25 years, we have carried out work to obtain dozens of new CT analogues, many of which showed improved affinity and selectivity to the studied nAChR subtypes and were used for detailed structural characterization of the ligand-binding sites of these receptors. Based on these studies, a new class of cholinergic ligands, oligoarginines, was revealed and the CT analogues with desired kinetic parameters of binding to distinct nAChRs were developed. A number of CTs and their analogues have been evaluated in *in vitro* and *in vivo* tests as promising analgesic and anticancer compounds. Typical examples of fundamental and clinical-oriented researches over the past two years have been the design of a series of new antagonists of the  $\alpha 9\alpha 10$  nAChR (involved in some pain processes) based on  $\alpha$ O-conotoxin GeXIVA (with an affinity of less than 1 nM) with the identification of several arginines that determine the analgesic properties of this peptide, as well as the detection of the ability of  $\alpha$ -conotoxins RgIA and [L10A]PnIA significantly affect the proliferation of glioblastoma cells. In particular, it was shown that the blockade of  $\alpha 9$  and  $\alpha 7$  nAChRs by these CTs led to an increase in the viability of patients' glioblastoma cells only in fetal serum supplemented medium. Activation of nAChR by agonist in a serum-free medium without the addition of growth factors, on the contrary, led to a decrease in cell viability, that contrasts with previously published data.



## ТРАНСМЕМБРАННЫЙ БЕЛОК — ПРЕДШЕСТВЕННИК В-АМИЛОИДА В ПАТОГЕНЕЗЕ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА И НЕ ТОЛЬКО

**Э.В. Бочаров**

*ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный*

Болезнь Альцгеймера — наиболее распространенное нейродегенеративное заболевание, которое приводит к тяжелой деменции. Генетические данные убедительно свидетельствуют о том, что аномальная генерация, агрегация и/или клиренс нейротоксичных пептидов амилоида- $\beta$  ( $A\beta$ ) являются ключевым фактором развития заболевания.  $A\beta$  пептиды аккумулируются в местах контакта нейронов в токсические олигомеры и фибриллы, образуя так называемые сенильные бляшки. Нормальная биологическая функция  $A\beta$  пептидов в значительной степени неизвестна, при этом изоформы  $A\beta$  различной длины обнаруживаются в мозгу здоровых людей независимо от возраста и, по-видимому, играют роль в сигнальных путях в головном мозге и обладают нейропротекторными свойствами при низких концентрациях.  $A\beta$  и родственные пептиды являются продуктами последовательного протеолиза трансмембранного белка-предшественника бета-амилоида (amyloid precursor protein, APP), дезрегуляция которого является одним из ключевых событий в развитии болезни Альцгеймера.

В докладе кратко освещаются результаты структурных исследований белка-предшественника  $\beta$ -амилоида и его фрагментов, участвующих в патогенезе болезни Альцгеймера, а также молекулярных механизмов, посредством которых перспективные терапевтические вещества могут влиять на выработку и нуклеацию  $A\beta$ . Например, D-энантиомерный пептид D3 и его производные были отобраны коллегами из университета г. Дюссельдорф (Германия) с помощью фагового дисплея для прямого разрушения цитотоксических агрегатов  $A\beta$ . В настоящее время одно из D3-подобных соединений проходит фазу II клинических испытаний. Полученные нами структурно-динамические данные свидетельствуют, что пептид D3 распознает амилоидогенный участок мембранного белка APP и его фрагментов –  $A\beta$  пептидов, ограничивая их конформационное разнообразие, не нарушая  $\alpha$ -спиральности и предотвращая образование межмолекулярных водородных связей. Это позволяет ингибировать ранние стадии перехода  $A\beta$  пептидов в  $\beta$ -конформацию с последующей токсической олигомеризацией, связанной с патогенезом болезни Альцгеймера.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-74-00024, <https://rscf.ru/project/23-74-00024/>.*

## TRANSMEMBRANE PROTEIN - AMYLOID PRECURSOR PROTEIN IN ALZHEIMER'S DISEASE PATHOGENESIS AND MORE

**E.V. Bocharov**

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow; Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny*

Alzheimer's disease is the most common neurodegenerative disorder that results in severe dementia. Genetic evidence strongly suggests that abnormal generation, aggregation, and/or clearance of neurotoxic amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) peptides are key drivers of the disease.  $A\beta$  peptides accumulate at neuronal contact sites into toxic oligomers and fibrils, forming so-called senile plaques. The normal biological function of  $A\beta$  peptides is largely unknown, but  $A\beta$  isoforms of varying lengths are found in the brains of healthy individuals regardless of age and appear to play a role in brain signaling pathways and have neuroprotective properties at low concentrations.  $A\beta$  and related peptides are products of sequential proteolysis of the transmembrane amyloid precursor protein (APP), the dysregulation of which is one of the key events in the development of Alzheimer's disease.

The report briefly presents the results of structural studies of the  $\beta$ -amyloid precursor protein and its fragments relevant to the pathogenesis of Alzheimer's disease, as well as the molecular principles by which advanced therapeutic agents may influence  $A\beta$  production and nucleation. For example, the D-enantiomeric peptide D3 and its derivatives were selected by colleagues from the University of Dusseldorf (Germany) using phage display for direct destruction of cytotoxic  $A\beta$  aggregates. Currently, one of the D3-like compounds is undergoing phase II clinical trials. The structural and dynamic data we obtained indicate that the D3 peptide recognizes the amyloidogenic region of the membrane protein APP and its fragments -  $A\beta$  peptides, limiting their conformational diversity, saving their  $\alpha$ -helicity and preventing the formation of intermolecular hydrogen bonds. This allows inhibition of the early stages of the transition of  $A\beta$  peptides to the  $\beta$ -conformation with subsequent toxic oligomerization associated with the pathogenesis of Alzheimer's disease.

*The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 23-74-00024, <https://rscf.ru/project/23-74-00024/>.*

### **МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ ПРОВСПАЛИТЕЛЬНЫХ РЕЦЕПТОРОВ TNFR1 И TREM-1 В АУТОИММУННОМ И ПРОТИВООПУХОЛЕВОМ ИММУННОМ ОТВЕТЕ (БЕЗ ТЕЗИСОВ)**

**Д.В. Яшин, Д.М. Юркина, Е.А. Романова, Л.П. Сащенко**

*Институт биологии гена РАН, Москва*

Провоспалительные рецепторы являются важными компонентами антибактериального и противоопухолевого иммунного ответа и аутоиммунных реакций. Наше исследование рецепторов TNFR1 (рецептора цитокина TNF) и TREM-1 (рецептора врожденного иммунитета) показало, что небольшие (7-15 аминокислот) пептидные фрагменты их лигандов – белка врожденного иммунитета Tag7 и цитокина TNF способны эффективно модулировать их активность. Были найдены пептиды, способные как ингибировать активацию данных рецепторов, так и активировать их. Пептиды, способные активировать провоспалительные рецепторы, могут вызывать непосредственную гибель опухолевых клеток, несущих TNFR1 рецептор, а также вызывать появление специфических клеток иммунной системы, способных убивать HLA отрицательные опухолевые клетки, избегающие адаптивного иммунного ответа. Изучение различных моделей аутоиммунных заболеваний у мышей позволяет заключить, что найденные ингибирующие провоспалительные рецепторы пептиды-миметики способны эффективно предотвращать гибель животных при сепсисе, разрушение костной и хрящевой ткани при аутоиммунном артрите и способствовать регенерации поврежденного костного мозга.

*Работа была поддержана грантом РФФ №23-14-00076.*

### **MECHANISMS OF TNFR1 AND TREM-1 PROINFLAMMATORY RECEPTORS ACTIVATION IN THE AUTOIMMUNE AND ANTITUMOR IMMUNE RESPONSE**

**D. Yashin, D. Yurkina, E. Romanova, L. Sashchenko**

*Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences. Moscow*

Pro-inflammatory receptors are important components of the antibacterial and antitumor immune response and autoimmune reactions. Our study of TNFR1 (TNF cytokine receptor) and TREM-1 (innate immunity receptor) receptors showed that small (7-15 amino acids) peptide fragments of their ligands, the innate immunity protein Tag7 and TNF cytokine, are able to effectively modulate their activity. Peptides have been found capable of both inhibiting the activation of these receptors and activating them. Peptides capable of activating proinflammatory receptors can cause the direct death of tumor cells carrying TNFR1 receptors. These peptides also cause the appearance of specific cells of the immune system capable of killing HLA negative tumor cells that avoid an adaptive immune response. The study of various models of autoimmune diseases in mice allows us to conclude that the mimetic peptides found inhibiting proinflammatory receptors are able to effectively prevent the death of animals with sepsis, the destruction of bone and cartilage tissue in autoimmune arthritis and promote the regeneration of damaged bone marrow.

*This work was supported by Russian Science Foundation Grant No 23-14-00076.*

## БАКТЕРИАЛЬНЫЕ АМИЛОИДЫ: ПАТОГЕНЕЗ И СЕТЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

А.А. Нижников<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург; <sup>2</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии (ВНИИСХМ), Пушкин

Амилоиды — упорядоченные белковые агрегаты с характерной пространственной структурой, называемой «кросс-β». Амилоиды широко известны благодаря своей связи с развитием десятков неизлечимых заболеваний, называемых амилоидозами, среди которых такие социально значимые как болезнь Альцгеймера. Однако последние два десятилетия исследований показали, что амилоиды представляют собой не только аномальные неправильно свернутые белковые агрегаты, но и действуют как функциональный вариант четвертичной структуры белка. У бактерий различными исследовательскими группами, включая нашу лабораторию, было идентифицировано более 30 различных амилоидных белков. Большинство бактериальных амилоидов участвуют в патогенных взаимодействиях бактерий с многоклеточными хозяевами, либо (i) выступая в качестве каркаса биопленки, либо (ii) модулируя активность бактериальных токсинов. Другая сторона функций бактериальных амилоидов была выявлена в ряде недавних исследований, которые продемонстрировали, что некоторые бактериальные амилоиды перекрестно индуцируют агрегацию патологических амилоидов человека. Учитывая, что изменения в составе кишечной микробиоты могут провоцировать нейродегенерацию, по крайней мере, в животных моделях, это показывает связь между бактериальными амилоидами и аномальной аккумуляцией белков в мозге. Более того, недавние исследования показали, что некоторые продукты питания, такие как семена растений, также содержат амилоидные белки, которые, как было обнаружено, влияют на агрегацию человеческих и бактериальных белков. Таким образом, человек как холобионт содержит трехкомпонентную амилоидную сеть, состоящую из: (i) патологических и функциональных амилоидов, структурные белки которых кодируются геномом человека; (ii) амилоиды, продуцируемые микробиотой, и (iii) амилоиды, которые попадают в наш организм из внешних источников, включая продукты питания. Эта сложная трехкомпонентная амилоидная сеть способна влиять на развитие и заболеваний человека, связанных с неправильной укладкой белков, включая нейродегенеративные заболевания.

*Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в соответствии с соглашением № 075-15-2022-320 от 20 апреля 2022 года о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета Российской Федерации. Грант предоставлен на государственную поддержку создания и развития Научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».*

## BACTERIAL AMYLOIDS: PATHOGENESIS AND NETWORK OF INTERACTIONS

AA. Nizhnikov<sup>1,2,</sup>

<sup>1</sup>St Petersburg State University; <sup>2</sup>All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology, St Petersburg

Amyloids are highly ordered protein aggregates with a characteristic spatial structure called ‘cross-β’. Amyloids are widely known for their involvement in the development of dozens incurable diseases called amyloidoses, among which is such a socially significant disorder as Alzheimer’s disease. However, the last two decades of extensive research demonstrated that amyloids represent not only abnormal misfolded protein aggregates but also act as a functional variant of quaternary protein structure. In Bacteria, more than 30 different amyloid-forming proteins have been identified by different research teams including our laboratory. Most bacterial amyloids are involved in pathogenic interactions of bacteria with multicellular hosts, either (i) acting as a biofilm scaffold or (ii) modulating the activity of bacterial toxins. Another side of the functions of bacterial amyloids has been revealed in a number of recent studies, which demonstrated that some bacterial amyloids cross-induce aggregation of human pathological amyloids. Given that alterations in the composition of gastrointestinal microbiota can trigger neurodegeneration at least in animal models, this provides a link between bacterial amyloids and abnormal protein deposition in the brain. Moreover, recent studies demonstrated that some foods like plant seeds also contain amyloid proteins that have been found to affect aggregation of human and bacterial proteins. Thus, humans as holobionts harbor a network of amyloids consisting of: (i) pathological and functional amyloids whose structural proteins are encoded by human genome; (ii) amyloids produced by microbiota, and (iii) amyloids that enter our body from external sources, including food. This complex three-component amyloid network is capable of modulating the development and progression of human disorders associated with protein misfolding, including neurodegenerative diseases.

*This study was performed with the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation in accordance with agreement № 075-15-2022-320, date 20 April 2022 on providing a grant in the form of subsidies from the Federal budget of Russian Federation. The grant was provided for state support for the creation and development of a World-class Scientific Center “Agrotechnologies for the Future”.*

## ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИНК-ЗАВИСИМЫХ КАСКАДОВ МЕЖКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ ПРИ ДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ СЕТЧАТКИ

Н.Г. Шебардина<sup>1</sup>, Т.К. Булгаков<sup>2</sup>, А.М. Мойсенович<sup>2</sup>, Д.В. Чистяков<sup>1</sup>, Е.Ю. Зерний<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского; <sup>2</sup>Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Нейроны сетчатки практически не способны к регенерации, в связи с чем частым исходом нейроофтальмологических заболеваний, таких как глаукома и возрастная макулярная дистрофия, является необратимая потеря зрения. Предполагается, что медиатором нейротоксических эффектов в сетчатке могут быть ионы секретируемого (мобильного) цинка. Работа посвящена исследованию сигнальных механизмов, опосредующих патологические эффекты мобильного цинка, на клеточных моделях сетчатки, включая линии пигментного эпителия, нейробластомы и ретинобластомы человека.

Мониторинг цитотоксических эффектов цинка осуществлялся с помощью клеточных тестов и проточной цитометрии. Изменения транскриптома регистрировалась секвенированием на платформе Illumina. Для дифференциально экспрессирующихся сигнальных белков определялся уровень секреции методом иммуноблоттинга, а также проводились клонирование, экспрессия, выделение и анализ аффинности к ионам цинка с использованием флуоресцентных зондов и атомно-адсорбционной спектрометрии. Эффекты цинка в отношении их сигнальной активности исследовались методами иммуноцитохимии и конфокальной микроскопии, а также путем исследования активации соответствующих рецепторов с применением таргетной масс-спектрометрии.

Установлено, что цинковый стресс вызывает гибель клеток сетчатки путем апоптоза. Этому предшествует подавление экспрессии ряда генов, ассоциированных с нейротропной активностью, при одновременном увеличении секреции соответствующих белков. Примечательно, что указанные белки способны напрямую координировать ионы цинка, что приводит к ингибированию их аксогенной, дифференцирующей и цитопротекторной функций за счет нарушения связывания со специфическими рецепторами.

Таким образом, повышение уровня мобильного внеклеточного цинка будет приводить к подавлению нейротропной активности, что может играть важную роль в развитии нейродегенеративных процессов в сетчатке. Соответственно, компенсация этой активности может рассматриваться в качестве перспективной терапии социально значимых заболеваний, затрагивающих эту ткань.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 21-15-00123 (эксперименты на клеточных моделях, средство нейротропных белков к цинку) и гранта РФФИ № 24-15-00171 (активность нейротропных белков в отношении рецепторов).*

## RESEARCH OF ZINC-DEPENDENT CASCADES OF INTERCELLULAR SIGNALING IN DEGENERATIVE RETINAL DISEASES

N.G. Shebardina<sup>1</sup>, T.K. Bulgakov<sup>2</sup>, A.M. Moisenovich<sup>2</sup>, D.V. Chistyakov<sup>1</sup>, E.Yu. Zernii<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Belozersky Research Institute of Physical and Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University; <sup>2</sup>Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow

Retinal neurons are practically incapable of regeneration. As a result, irreversible vision loss occurs in neuro-ophthalmological diseases such as glaucoma and age-related macular degeneration. It is assumed that the mediator of neurotoxic effects in the retina could be ions of secreted (mobile) zinc. The main goal of this study is to investigate the signaling mechanisms mediating the pathological effects of mobile zinc on retinal cell models, including human pigment epithelial, neuroblastoma, and retinoblastoma cell lines.

The monitoring of zinc cytotoxic effects was performed using cell viability assays and flow cytometry. Transcriptome changes were registered by sequencing on the Illumina platform. For differentially expressed signaling proteins, the secretion levels were determined by immunoblotting. Cloning, expression, purification, and analysis of zinc ion affinity were conducted using fluorescent probes and atomic absorption spectrometry. The effect of zinc on their signaling activity was researched by immunocytochemistry and confocal microscopy, and receptor activation analysis by targeted mass spectrometry.

It was found that zinc stress induces retinal cell death through apoptosis. This is preceded by the suppression of the expression of several genes associated with neurotrophic activity, along with an increase in the secretion of the corresponding proteins. Notably, these proteins can directly coordinate zinc ions, leading to the inhibition of their axogenic, differentiating, and cytoprotective functions due to disrupted binding to specific receptors.

Thus, an elevated level of mobile extracellular zinc will lead to the suppression of neurotrophic activity, which may play a critical role in the development of neurodegenerative processes in the retina. Consequently, compensating for this activity may be a promising therapy for socially significant diseases affecting this tissue.

*This work was supported by RSF grant № 21-15-00123 (experiments on cell models, affinity of neurotrophic proteins for zinc) and RSF grant № 24-15-00171 (activity of neurotrophic proteins towards receptors).*

## ИЗУЧЕНИЕ НЕЙРОПСИХОТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ ДИМЕРНОГО ДИПЕПТИДНОГО МИМЕТИКА 4-Й ПЕТЛИ НЕЙРОТРОФИНА-3

П.Ю. Поварнина, Д.М. Никифоров, Т.А. Гудашева

ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий, Москва

Нейротрофин-3 (NT-3) – белок семейства нейротрофинов, поддерживающих функционирование нервной системы. В отличие от других нейротрофинов, взаимодействующих с одним типом тирозинкиназных Trk рецепторов (TrkA, TrkB, TrkC), NT-3 активирует все эти рецепторы, связываясь с наибольшей аффинностью с TrkC. Известно о вовлеченности NT-3 в патогенез психических и нейродегенеративных заболеваний, таких как тревожные расстройства, депрессия, шизофрения, болезнь Альцгеймера и др. (Gu S. et al., 2009; de Miranda A.S. et al., 2020; Yan Z. et al., 2021). Клиническое применение NT-3 ограничено, как и в случае других нейротрофинов, низкой биодоступностью. Это ограничение можно преодолеть с помощью создания низкомолекулярных миметиков NT-3. В нашем Центре с использованием оригинальной технологии (Гудашева Т.А., 2010, 2012, 2022) получен дипептид на основе 4-й петли NT-3 (гексаметилендиамид бис-(N-γ-оксибутирил-L-глутамил-L-аспарагина)), соединение ГТС-302 (Tarasiuk A.V. et al., 2023). В экспериментах *in vitro* ГТС-302 активировал TrkC и TrkB рецепторы и оказывал нейропротекторное действие в концентрациях  $10^{-8}$ – $10^{-5}$  М (Tarasiuk A.V. et al., 2023).

Данная работа посвящена изучению *in vivo* фармакологических эффектов ГТС-302. Следует отметить, что, хотя миметики NT-3 разрабатываются рядом зарубежных исследовательских групп, в доступной литературе нет данных об их *in vivo* активности.

В тесте вынужденного плавания на мышах ГТС-302 проявлял антидепрессантоподобную активность при остром и субхроническом внутрибрюшинном (в/б) введении в дозах 0,5–10 мг/кг. В условиях экспериментальной депрессии на мышах, индуцированной хроническим социальным стрессом, дипептид (1 мг/кг, в/б, 10 дней) полностью противодействовал развитию агедонии (тест предпочтения раствора сахара) и снижению иммунореактивности к мозговому нейротрофическому фактору в гиппокампе (Вестерн-блот анализ). По выраженности антидепрессантоподобного эффекта ГТС-302 был сопоставим с классическим антидепрессантом Амитриптилином (10 мг/кг, в/б). У ГТС-302 была также выявлена анксиолитическая активность в приподнятом крестообразном лабиринте на мышах и мнемотропная активность в тесте распознавания нового объекта на крысах. Фармакологические эффекты дипептида сохранились при пероральном введении.

## STUDY OF THE NEUROPSYCHOTROPIC ACTIVITY OF A DIMERIC DIPEPTIDE NIMETIC OF THE 4TH LOOP OF NEUROTROPHIN-3

P.Yu. Povarnina, D.M. Nikiforov, T.A. Gudasheva

Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow

Neurotrophin-3 (NT-3) is a protein of the neurotrophin family, which supports the functioning of the nervous system. Unlike other neurotrophins that interact with a single type of tyrosine kinase Trk receptor (TrkA, TrkB, TrkC), NT-3 activates all these receptors, binding with the highest affinity to TrkC. NT-3 is known to be involved in the pathogenesis of psychiatric and neurodegenerative diseases, such as anxiety disorders, depression, schizophrenia, Alzheimer's disease, and others (Gu S. et al., 2009; de Miranda A.S. et al., 2020; Yan Z. et al., 2021). The clinical application of NT-3 is limited, as with other neurotrophins, by its low bioavailability. This limitation can be overcome by creating low-molecular-weight mimetics of NT-3. Using an original technology developed at our Center (Gudasheva T.A., 2010, 2012, 2022), a dipeptide based on the 4th loop of NT-3 (bis-(N-γ-oxobutyryl-L-glutamyl-L-asparagine) hexamethylenediamide), named GTS-302, has been obtained (Tarasiuk A.V. et al., 2023). *In vitro* was showed that GTS-302 activated TrkC and TrkB receptors and exhibited neuroprotective effects at concentrations of  $10^{-8}$ – $10^{-5}$  M (Tarasiuk A.V. et al., 2023).

This study is dedicated to investigating the *in vivo* pharmacological effects of GTS-302. It should be noted that although NT-3 mimetics are being developed by several foreign research groups, there are no available data on their *in vivo* activity.

In the forced swim test in mice, GTS-302 demonstrated antidepressant-like activity with acute and subchronic intraperitoneal (i.p.) administration at doses of 0.5–10 mg/kg. In a mouse model of experimental depression induced by chronic social stress, the dipeptide (1 mg/kg, i.p., for 10 days) completely counteracted the development of anhedonia (sucrose preference test) and the decrease in brain-derived neurotrophic factor immunoreactivity in the hippocampus (Western blot analysis). The antidepressant-like effect of GTS-302 was comparable to that of the classical antidepressant Amitriptyline (10 mg/kg, i.p.). GTS-302 also exhibited anxiolytic activity in the elevated plus maze in mice and nootropic activity in the novel object recognition test in rats. The pharmacological effects of the dipeptide were retained with oral administration.

## ВЛИЯНИЕ АКТИВАЦИИ РЕЦЕПТОРА RAGE НА ПРОИЗВОДСТВО СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ В НЕЙРОНАХ И АСТРОЦИТАХ

**А. Камынина<sup>1,2</sup>, Е. Серегина<sup>3</sup>, Д. Короев<sup>2</sup>, О. Вольпина<sup>2</sup>, А. Винокуров<sup>3</sup>, А. Абрамов<sup>3,4</sup>**

<sup>1</sup>Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия; <sup>2</sup>ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия; <sup>3</sup>Орловский государственный университет, Орел, Россия; <sup>4</sup>Институт неврологии, Лондон, Великобритания

Трансмембранный рецептор конечных продуктов гликозилирования (RAGE) представляет собой сигнальный рецептор для множества поврежденных и патоген-ассоциированных молекул. С активацией рецептора связано развитие воспаления и рост производства активных форм кислорода (АФК). Тем не менее, принимая во внимание многообразие целей, на которые могут быть направлены патоген-ассоциированные молекулы, механизм того, как RAGE запускает производство АФК, до сих пор неясен. В данном исследовании, используя срезы головного мозга крысы, а также первичные со-культуры нейронов и астроцитов, мы исследовали влияние трех синтетических пептидов, соответствующих фрагментам V-домена RAGE на производство свободных радикалов. В работе было показано, что лишь фрагмент последовательности (60-76) запускает производство АФК в астроцитах и нейронах в первичной культуре и на срезах головного мозга крыс. Данный эффект наблюдался за счет активации RAGE и мог быть заблокирован ингибитором RAGE. Было показано, что активация RAGE синтетическим фрагментом (60-76) запускает производство АФК ферментом НАДФН-оксидазой. Таким образом, мы показали, что специфическая активация RAGE запускает производство свободных радикалов опосредованно через фермент НАДФН-оксидазу, что может являться частью защитного механизма клеток.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-74-00024, <https://rscf.ru/project/23-74-00024/>.*

## IMPACT OF RAGE ACTIVATION ON THE PRODUCTION OF FREE RADICALS IN NEURONS AND ASTROCYTES

**A. Kamynina<sup>1,2</sup>, Y. Seryogina<sup>3</sup>, D. Koroev<sup>2</sup>, O. Volpina<sup>2</sup>, A. Vinokurov<sup>3</sup>, A. Abramov<sup>3,4</sup>**

<sup>1</sup>Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia; <sup>2</sup>Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia; <sup>3</sup>Orel State University, Orel, Russia; <sup>4</sup>UCL Institute of Neurology, London, UK

The transmembrane receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a signaling receptor for many damage- and pathogen-associated molecules. Activation of the RAGE is connected with inflammation and increase in reactive oxygen species (ROS) production. However, the way how RAGE induces ROS production is still not clear considering multiple targets of pathogen-associated molecules. Here, using the acute brain slices and primary co-culture of cortical neurons and astrocytes we studied the effects of three synthetic peptides corresponding to the fragments of the RAGE V-domain on redox signal. We have found that the synthetic fragment (60-76) induces activation of ROS production in astrocytes and neurons derived from the primary co-culture and acute brain slices. This effect was through activation of RAGE and could be blocked by the RAGE inhibitor. Activation of RAGE by the synthetic fragment (60-76) stimulates ROS production in NADPH oxidase. Thus, specific activation of RAGE induces redox signal through NADPH oxidase that can be a part of cell protective mechanism.

*The research was supported by Russian Science Foundation number 23-74-00024, <https://rscf.ru/project/23-74-00024/>.*

## **ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АННОТАЦИЯ И АНАЛИЗ ГЕНОМОВ НА ОСНОВЕ ИНФОРМАЦИИ О СТРУКТУРАХ БЕЛКОВ**

**И.Ю. Гушчин, А.А. Ремеева, А.А. Анучина, С.Д. Осипов, А.В. Власов**

*Московский физико-технический институт, Долгопрудный*

Количество известных геномов и кодирующих белки последовательностей продолжает стремительно увеличиваться, при этом даже в хорошо изученных модельных организмах значительное количество белков продолжает оставаться неисследованным. Развитие методов структурной биологии, в том числе на основе машинного обучения, открывает новые возможности по функциональной аннотации. В данном докладе будут представлены три примера того, как сочетание современных вычислительных и экспериментальных подходов позволяет эффективно раскрывать биологические функции белковых семейств. Будет описана идентификация новых бактериальных люцифераз, необычных энкапсулин-ассоциированных ферритиноподобных белков, и предсказание биоэнергетических свойств АТФ-синтаз – ключевых ферментов всех живых клеток. Представленные подходы могут быть распространены и на другие семейства.

*Исследования выполнены при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение 075-03-2024-117, номер темы FSMG-2021-0002).*

## **PROTEIN STRUCTURE-BASED FUNCTIONAL ANNOTATION AND GENOME MINING**

**I. Gushchin, A. Remeeva, A. Anuchina, S. Osipov, A. Vlasov**

*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*

The number of known genomes and protein-coding sequences continues to increase rapidly, while a significant number of proteins remains unexplored even for well-studied model organisms. Advances in methods of structural biology, including those based on machine learning, are opening up new possibilities for functional annotation. Here, we will present three examples of how the combination of state-of-the-art computational and experimental approaches can effectively reveal biological functions of protein families. Identification of novel bacterial luciferases, unusual encapsulin-associated ferritin-like proteins, and prediction of bioenergetic properties of ATP synthases, key enzymes in all living cells, will be described. Presented approaches can be applied to other protein families.

*The study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement 075-03-2024-117, project FSMG-2021-0002).*

## РНК-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ В ЖИЗНЕННОМ ЦИКЛЕ ПИКОРНАВИРУСОВ: ОТ CRISPR-СКРИНИНГА К ФУНКЦИИ

**С.Е. Дмитриев**

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

Пикорнавирусы – это (+)РНК-содержащие вирусы, вызывающие различные заболевания человека и животных. Для трансляции своих мРНК они используют участки внутренней посадки рибосом (IRES). Молекулярные механизмы, лежащие в основе работы этих элементов, и белки клетки-хозяина, участвующие в этих механизмах, изучены недостаточно. Мы провели нокаутные CRISPR/Cas-скрининги на устойчивость культивируемых клеток HEK293T к цитопатической инфекции, вызываемой несколькими представителями пикорнавирусов из разных групп: в частности, вирусом энцефаломиокардита (EMCV, кардиовирус), эховирусами и вирусами Коксаки (энтеровирусы ECV, CVA и CVB). Среди идентифицированных «хитов», необходимых для цитопатической инфекции, обнаружился ген РНК-связывающих белков: PA2G4 в случае EMCV и MBNL1 в случае ряда ECV и CVA. Белок PA2G4 был известен ранее как ITAF45 – фактор, необходимый для работы IRES-элемента вируса ящура в системе сборки 48S инициаторных комплексов из очищенных компонентов, однако для работы IRES-элемента вируса EMCV в этой системе он не требовался. Роль белка MBNL1 в вирусных инфекциях ранее не была показана, однако он является партнёром PTBP1, регулятора альтернативного сплайсинга, который известен как ITAF, необходимый для работы IRES-элементов ряда пикорнавирусов. Клетки, нокаутные по гену PA2G4, продемонстрировали полную устойчивость к заражению EMCV, а нокауты по MBNL1 оказались гораздо устойчивее к ECV6, ECV11, CVA9 и ряду других, но при заражении CVB3, CVB5 и полиовирусами PV1, PV2 и PV3 погибали так же быстро, как и клетки дикого типа. Устойчивые к вирусам клетки гораздо медленнее накапливали вирусные РНК и белки, подтверждая отсутствие продуктивной инфекции. Изучение роли белков PA2G4 и MBNL1 в IRES-зависимой трансляции, проведённое в культивируемых клетках дикого типа и в нокаутных клетках методом трансфекции репортерными мРНК, а также в бесклеточных трансляционных системах, изготовленных из этих клеток, показало сложный характер зависимости неканонической трансляции от присутствия данных белков.

*Работа поддержана грантом РФФ 23-14-00218.*

## RNA-BINDING PROTEINS IN THE PICORNAVIRUS LIFE CYCLE: FROM CRISPR-SCREENS TO FUNCTIONAL INSIGHTS

**S.E. Dmitriev**

*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

Picornaviruses are (+)RNA viruses that cause various diseases in humans and animals. To translate their mRNAs, they employ internal ribosome entry sites (IRES). The molecular mechanisms underlying the function of these elements, as well as the host cell proteins involved in these processes, are not yet fully understood. We conducted knockout CRISPR/Cas screenings to assess the resistance of cultured HEK293T cells to cytopathic infections caused by several representatives of picornaviruses from different groups, specifically the encephalomyocarditis virus (EMCV, a cardiovirus), echoviruses, and coxsackieviruses (enteroviruses ECV, CVA, and CVB). Among the identified "hits" essential for cytopathic infection, we discovered genes encoded RNA-binding protein: PA2G4 in the case of EMCV and MBNL1 for several ECV and CVA viruses. PA2G4 was previously known as ITAF45 – a factor necessary for the function of the IRES element of foot-and-mouth disease virus in the assembly of 48S initiation complexes from purified components; however, it was not required for the EMCV IRES element in this system. Although the role of MBNL1 in viral infections had not been previously established, it is a partner of PTBP1, an alternative splicing regulator recognized as an ITAF essential for the activity of IRES elements in several picornaviruses. PA2G4 knockout cells exhibited complete resistance to EMCV infection, while MBNL1 knockouts demonstrated significantly greater resistance to ECV6, ECV11, CVA9, and several others. However, when infected with CVB3, CVB5, and polioviruses PV1, PV2, and PV3, the knockout cells died at the same rate as wild-type cells. Virus-resistant cells accumulated viral RNA and proteins at a markedly slower rate, confirming the lack of productive infection. The investigation of the roles of PA2G4 and MBNL1 in IRES-dependent translation, conducted in wild-type cultured cells and knockout cells through the transfection of reporter mRNAs, as well as in cell-free translation systems prepared from these cells, revealed the complex nature of the dependence of non-canonical translation on the presence of these proteins.

*The study was supported by the RSF grant 23-14-00218.*



## РОЛЬ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ В АКТИВНОСТИ РИБОСОМЫ И ПОДДЕРЖАНИИ РЕПЕРТУАРА ТРАНСЛЯТОМА КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

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

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

Рибосомные белки как структурные компоненты рибосомы критически важны для её работоспособности. Мы определили аминокислотные остатки рибосомных белков eL42 и uL15 человека, расположенных в районе каталитического центра рибосомы, которые необходимы для его работы. Мы показали, что замены остатков Q45A, Q51A или K53A в белке eL42 приводят к остановке трансляции на первом цикле элонгации пептидной цепи, поскольку указанные остатки участвуют в удалении деацелированной тРНК из Е-сайта рибосомы, без чего невозможна транслокация тРНК на рибосоме. В белке uL15 остаток His39 в норме несёт посттрансляционную модификацию – гидроксильное.

Мы установили, что при отсутствии такой модификации у части общего пула рибосом эффективность клеточной трансляции падает в результате нарушения согласованного движения рибосом по мРНК. В результате преимущество в трансляции получают более короткие и распространённые мРНК перед более длинными и редкими, что приводит к разбалансировке клеточного протеома. Гены рибосомных белков являются одними из наиболее активных генов клетки, и наследственная гаплонедостаточность отдельных рибосомных белков, вызванная мутациями в одном из аллелей их генов, является причиной анемии Даймонда–Блэкфена в частности и других рибосомопатий в целом. Мы выполнили нокадаун рибосомных белков uL5, uS10 и eS26 в клетках HEK293T, и показали, что это приводит к дефициту рибосом – рибосомному голоданию. С помощью RNA-seq анализа общей клеточной мРНК и мРНК в полисомной фракции мы выявили существенные различия в ландшафтах транскриптома и транслятома в таких клетках по сравнению с клетками с нормальным уровнем рибосом. Анализируя физические параметры мРНК дифференциально экспрессируемых генов, мы установили, что изменение эффективности трансляции мРНК в клетках с дефицитом рибосом зависит от общего уровня мРНК, длины её кодирующей последовательности и GC-состава. Более распространённые мРНК в таких клетках с протяжёнными CDS и высоким GC-составом транслируются в таких условиях более эффективно, чем мРНК с противоположными характеристиками. Мы предположили, что снижение при рибосомном голодании уровня отдельных белков, необходимых для дифференциации клеток, может быть причиной рибосомопатий.

*Исследование поддержано грантом РФФИ № 22-14-00039.*

## THE ROLE OF RIBOSOMAL PROTEINS IN RIBOSOME ACTIVITY AND MAINTENANCE OF THE TRANSLATOME REPERTOIRE OF HUMAN CELLS

A.A. Malygin, E.S. Babaylova, K.N. Bulygin, E.A. Zolotenkova, A.V. Gopanenko, A.E. Tupikin, M.R. Kabilov, D.M. Graifer

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk*

Ribosomal proteins are critical structural components of the ribosome that are essential for its activity. We identified specific amino acid residues in human ribosomal proteins eL42 and uL15 that are located in the catalytic center of the ribosome and are necessary for its function. We showed that substitutions of residues Q45A, Q51A or K53A in the eL42 protein result in translation arrest during the first cycle of peptide chain elongation, because these residues are involved in the removal of deacylated tRNA from the E-site of the ribosome, which is essential for tRNA translocation on the ribosome. In the uL15 protein, the His39 residue typically undergoes a post-translational modification – hydroxylation.

We found that in the absence of this modification in a portion of the ribosome pool leads to a decrease in cellular translation efficiency. Ribosomes with different translation activities disrupts the coordinated movement of ribosomes along mRNA, favoring shorter and more abundant mRNAs over longer and rarer ones. This imbalance has significant implications for the cellular proteome. Ribosomal protein genes are among the most active genes in the cell, and inherited haploinsufficiency of individual ribosomal proteins caused by mutations in their genes causes ribosomopathies. We performed knockdown of ribosomal proteins uL5, uS10 and eS26 in HEK293T cells and showed that this leads to ribosome deficiency. Using RNA-seq analysis of total cellular and polysomal mRNA, we found significant differences in the transcriptome and translationome in ribosome-deficient cells compared to cells with normal ribosome level. By examining the parameters of mRNA of differentially expressed genes, we determined that the changes in mRNA translation efficiency in ribosome-deficient cells are influenced by mRNA abundance, coding sequence length and its GC content. In particular, more abundant mRNAs with extended CDS and high GC content are translated more efficiently in ribosome-deficient cell compared to mRNAs with opposite properties. We hypothesize that a decrease in the level of specific proteins necessary for cell differentiation during ribosome starvation may contribute to ribosomopathies.

*The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 22-14-00039.*

## **БЕЛКОВО-ПЕПТИДНЫЕ БИОРЕГУЛЯТОРЫ: СОСТАВ, СТРОЕНИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ**

**Е.В. Сидорский, А.П. Ильина, П.А. Елистратов, В.П. Ямскова**

*ООО "Институт проблем биорегуляции" Москва*

Ранее в различных тканях животных, растений, а также грибов были обнаружены биорегуляторы белково-пептидной природы, локализованные внеклеточно, которые в низких дозах тканеспецифично активируют восстановительные и репаративные процессы в паталогически измененных тканях. Данные биорегуляторы по общности физико-химических свойств и характеру биологического действия были объединены в группу мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов (МГТБ). МГТБ имеют сложный состав. Наиболее изученными оказались биорегуляторы, выделенные из тканей млекопитающих. Их основой является белково-пептидный комплекс (БПК), в состав которого входят биологически активные пептиды и белок, модулирующий их биологическое действие, в виде определенных изоформ сывороточного альбумина. Для нескольких пептидов, входящих в состав БПК, были определены N-концевые фрагменты полипептидной цепи, которые являлись продуктами протеолиза адгезивных, мембранных белков. Установлено, что в состав МГТБ также входят маннозид, глюкозамин, фосфотаноламин и инозитольный якорь с жирными кислотами, с использованием которого белково-пептидный комплекс взаимодействует с бислоем плазматической мембраны клетки и оказывает влияние на её вязкоупругие свойства. Исследование вторичной и третичной структуры БПК биорегулятора продемонстрировало, что в водных растворах МГТБ образует крупные термостабильные наноразмерные частицы и биорегулятор обладает свойствами ингибитора агрегации белков, участвует в восстановлении и репарации поврежденных белковых структур в качестве шаперонов. Поэтому биологическое действие биорегулятора на травмированные и паталогически изменённые ткани можно объяснить, способностью контролировать и/или направлять процесс фолдинга белков. В экспериментах по изучению биологической активности биорегуляторов, выделенных из различных тканей, было продемонстрировано, что данная группа биорегуляторов оказывает воздействие на плазматическую мембрану клеток и поддерживает адгезионные взаимодействия, пролиферацию, дифференцировку клеток. Предполагается, что МГТБ формируется в межклеточном пространстве тканей как отдельная макромолекулярная структура, влияющая на основные биологические процессы, которая образуется за счёт транспорта сывороточного альбумина через стенки капилляров.

## **PROTEIN-PEPTIDE BIOREGULATORS: COMPOSITION, STRUCTURE AND BIOLOGICAL FUNCTION**

**E.V. Sidorskii, A.P. Ilyina, P.A. Elistratov, V.P. Yamskova**

*Institute of Bioregulation Problems, LLC, Moscow*

Bioregulators of protein-peptide nature have been found in various tissues of mammals, plants and fungi, which are tissue-specifically activated restoration and reparative processes in pathologically altered tissues in low doses. These bioregulators, based on their common physicochemical properties and similarity of their biological action, were combined into a group named membranotropic homeostatic tissue-specific bioregulators (MHTB). The most studied bioregulators were those isolated from mammalian tissues. Their basis is a protein-peptide complex (PPC), which consists of certain isoforms of serum albumin and peptides – products of proteolysis of known membrane and adhesion proteins. In solutions, protein-peptide complexes are in the form of nanosized particles; this state is associated with the manifestation of protein-peptide complex biological activity. A possible mechanism of the protein-peptide complexes structure and its interaction with the cell plasma membrane is considered.

## ВЛИЯНИЕ УРОМОДУЛИНА НА БИОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РАСТВОРА ОПРЕДЕЛЯЕТ СТАБИЛЬНОСТЬ КОЛЛОИДА МОЧИ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Н.А. Верлов, С.Б. Ланда, В.С. Бурдаков, В.Л. Эмануэль

НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина

Уромодулин, основной белок, присутствующий в моче млекопитающих, экспрессируется исключительно в почечных канальцах. Его физиологические функции разнообразны и включают стабилизацию мочевого коллоида, предотвращение инфекций мочевыводящих путей и регуляцию функций почек. Способность уромодулина образовывать высокомолекулярные полимеры в широком диапазоне биофизических условий мочи (рН, ионная сила и концентрация белка) способствует эффективному выполнению широкого спектра физиологических функций. Белковые полимерные нити оказывают значительное влияние на свойства мочи, в первую очередь на способность к диффузии микро- и нано- размерных объектов. Прямые измерения вязкости модельных растворов мочи с различными концентрациями уромодулина (в диапазоне от 4 до 250 мг/л) не показали значительных различий по сравнению с вязкостью растворов без уромодулина. Однако при концентрации 125 мг/л и выше кристаллы оксалата кальция размером от 10 микрон и более не седиментируют в исследуемом растворе. Используя модифицированный метод анализа треков наночастиц, мы показали, что с увеличением концентрации белка от 250 мг/л изменяется подвижность флуоресцентных частиц в тестируемых растворах. Для частиц размером 150 нм подвижность снизилась в 3,5 раза, с 3,1 (2,7, 3,5) до 0,8 (0,6, 1,1) мкм<sup>2</sup>/с (медиана (IQR)), а для частиц размером 70 нм — в 2,7 раза, с 4,7 (3,9, 5,4) до 1,7 (1,1, 2,2) мкм<sup>2</sup>/с. В то же время подвижность квантовых точек размером 32 нм оставалась постоянной на уровне 12,8 (10,0, 15,6) мкм<sup>2</sup>/с при разных концентрациях уромодулина. Для частиц размером 70 и 150 нм наблюдался переход от одномодального к двумодальному распределению по подвижности.

Данные диффузиометрии позволяют предположить, что уромодулин предотвращает агрегацию и оседание первичных микрокристаллов (таких как оксалаты и фосфаты) и инфекционных агентов за счет формирования полимерной сети, размер ячеек которой уменьшается с увеличением концентрации уромодулина. Это предположение также подтверждается данными малоуглового рентгеновского рассеяния. Полученные результаты подчеркивают уникальные биофизические свойства растворов уромодулина, которые позволяют им выполнять широкий спектр физиологических функций как в нормальных, так и в патологических условиях у млекопитающих.

## THE EFFECT OF UROMODULIN ON BIOPHYSICAL PROPERTIES OF SOLUTION DETERMINES STABILITY OF URINE COLLOID FOR NORMA AND PATHOLOGY

N.A. Verlov, S.B. Landa, V.S. Burdakov, V.L. Emanuel

NRC «Kurchatov Institute» – PNPI, Gatchina

Uromodulin, the primary protein present in the urine of mammals, is exclusively expressed in renal tubules. Its physiological functions are diverse and include stabilization of the urinary colloid, prevention of urinary tract infections, and regulation of kidney functions. The ability of uromodulin to form high-molecular-weight polymers across a wide range of biophysical conditions in urine (pH, ionic strength, and protein concentration) contributes to the effective performance of a broad spectrum of physiological functions. Direct measurements of the viscosity of model urine solutions with varying uromodulin concentrations (ranging from 4 to 250 mg/L) showed no significant differences compared to the viscosity of solutions without uromodulin. However, at concentrations of 125 mg/L and above, calcium oxalate crystals of 10 microns or larger did not sediment in the test solution. Using a modified nanoparticle tracking analysis method, we demonstrated that, with an increase in protein concentration up to 250 mg/L, the mobility of fluorescent particles in the test solutions changes. For particles with a size of 150 nm, mobility decreased 3.5-fold, from 3.1 (2.7, 3.5) to 0.8 (0.6, 1.1)  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  (median (IQR)), while for particles with a size of 70 nm, mobility decreased 2.7-fold, from 4.7 (3.9, 5.4) to 1.7 (1.1, 2.2)  $\mu\text{m}^2/\text{s}$ . In contrast, the mobility of 32 nm quantum dots remained constant at 12.8 (10.0, 15.6)  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  across different concentrations of uromodulin. For particles of 70 and 150 nm, a transition from unimodal to bimodal mobility distribution was observed.

The diffusionometry data suggest that uromodulin prevents the aggregation and sedimentation of primary microcrystals (such as oxalates and phosphates) and infectious agents by forming a polymeric network, with the mesh size decreasing as the uromodulin concentration increases. This hypothesis is also supported by small-angle X-ray scattering data. The obtained results highlight the unique biophysical properties of uromodulin solutions, enabling them to perform a wide range of physiological functions under both normal and pathological conditions in mammals.

## ПЕРЕКЛЮЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ТРАНСМЕМБРАННЫХ И ПРИМЕМБРАННЫХ ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ХОЛЕСТЕРИНА

**М.В. Воловик, В.Д. Краснобаев, З.Г. Дениева, П.К. Гифер, Э.В. Бочаров, О.В. Батищев**

*Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва*

Амфипатические пептиды являются хорошо известным примером мембрано-активных соединений. Они способны как самостоятельно вызывать изменения структуры и физико-химических характеристик липидного матрикса клеточных мембран, так и регулировать активность более сложных белковых структур, присутствуя в качестве их примембранных участков. Несмотря на способность амфипатических пептидов к созданию пор в мембранах и самоорганизации в каналоподобные структуры, стабильная канальная активность проявляется, в основном, при наличии трансмембранных спиралей в структуре пептида.

В данной работе мы рассмотрели примеры двух пептидов, состоящих из трансмембранной и примембранной частей – белка E коронавируса SARS-CoV-2 и фрагмента 672-726 белка-предшественника бета-амилоида. Трансмембранный белок E вируса SARS-CoV-2 является виropорин, участвующем в основных процессах жизненного цикла вируса. Процессинг белка-предшественника амилоида (APP) в бета-амилоид зависит от расположения APP в мембране, состава липидов мембраны и, возможно, наличия липидных рафтов. Используя методы атомной силовой и оптической микроскопии, а также пэтч-кламп, мы показали, что, несмотря на очевидные различия в носителях и функциях данных пептидов, их взаимодействия с мембранами строятся по схожему механизму. При этом переходы между возможными состояниями пептидов и их комплексов регулируются количеством холестерина в составе липидного бислоя. Таким образом, эти результаты позволяют выдвинуть гипотезу о наличии общих механизмов регуляции мембранной активности пептидов, содержащих трансмембранные и примембранные фрагменты.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-13-00435).*

## SWITCHING OF ACTIVITY OF TRANSMEMBRANE AND JUXTAMEMBRANE PEPTIDES AND PROTEINS UNDER THE INFLUENCE OF CHOLESTEROL

**M.V. Volovik, V.D. Krasnobaev, Z.G. Denieva, P.K. Gifer, E.V. Bocharov, O.V. Batishchev**

*A.N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow*

Amphipathic peptides are a well-known example of membrane-active compounds. They are capable of both independently causing changes in the structure and physicochemical characteristics of the lipid matrix of cell membranes, and regulating the activity of more complex protein structures, being present as their juxtamembrane regions. Despite the ability of amphipathic peptides to form pores in membranes and self-organize into channel-like structures, stable channel activity is manifested mainly in the presence of transmembrane helices in the peptide structure.

In this work, we considered examples of two peptides consisting of transmembrane and juxtamembrane parts - the E protein of the SARS-CoV-2 coronavirus and the 672-726 fragment of the beta-amyloid precursor protein. The transmembrane E protein of the SARS-CoV-2 virus is a viroporin involved in the main processes of the virus life cycle. Processing of amyloid precursor protein (APP) to beta-amyloid depends on the location of APP in the membrane, the composition of membrane lipids and, possibly, the presence of lipid rafts. Using atomic force and optical microscopy, as well as patch clamp, we showed that, despite the obvious differences in the hosts and functions of these peptides, their interactions with membranes are based on a similar mechanism. Transitions between possible states of peptides and their complexes are regulated by the amount of cholesterol in the lipid bilayer. Thus, these results allow us to hypothesize the presence of common mechanisms regulating the membrane activity of peptides containing transmembrane and juxtamembrane fragments.

*The work was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 22-13-00435).*

## СЕНСОР ЛАТЕРАЛЬНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МЕМБРАННЫХ КОМПОНЕНТОВ НА ОСНОВЕ ГРАМИЦИДИНА А

**С.А. Акимов, О.В. Кондрашов**

*Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва*

Бислойные липидные мембраны являются основным структурным компонентом биологических мембран. Липидные и белковые компоненты мембран могут вызывать деформации за счет спонтанной кривизны, несоответствия длины гидрофобных частей молекул и толщины бислоя, латеральной конденсации при электростатическом связывании и т.д. Деформации распространяются в латеральном направлении на несколько нанометров. Перекрытие деформаций, индуцированных различными мембранными компонентами, приводит к их латеральному взаимодействию. Энергия взаимодействия, как правило, невелика, и на молекулярном уровне зарегистрировать его практически невозможно. Однако латеральное взаимодействие проявляется в изменении средних характеристик большого ансамбля взаимодействующих частиц. Удобным сенсором латеральных взаимодействий является грамицидин А (гА). Две молекулы гА, расположенные в противоположных монослоях мембраны, могут образовывать димер, который является катион-селективным ионным каналом. Длина димера гА меньше толщины типичной мембраны, что приводит к деформациям липидного бислоя. Состояния отдельных мономеров и проводящего димера гА стабильны и метастабильны, соответственно. Переход между ними происходит через состояние коаксиальной пары, соответствующего вершине энергетического барьера реакции. Измеряемыми характеристиками являются среднее время жизни и концентрация димеров гА. Во всех трех состояниях гА мембрана деформирована, и при латеральном взаимодействии с мембранными компонентами энергии этих состояний изменяются по-разному, что проявляется в изменении среднего времени жизни и концентрации димеров гА. Для расчета средних характеристик ансамбля гА и деформирующих мембрану включений вычисляется статусумма системы с учетом взаимодействия всех частиц. Для расчета статусуммы применяется кластерное разложение Майера. В рамках такого формализма мы рассмотрели и предсказали, каким образом должны изменяться среднее время жизни и средняя концентрация димеров гА при введении в мембрану амфипатических и трансмембранных пептидов, а также при адсорбции на мембрану БСА. Теоретические предсказания согласуются с имеющимися экспериментальными данными. Разработанная модель позволяет использовать гА в качестве сенсора латеральных взаимодействий мембранных компонентов.

## GRAMICIDIN A-BASED SENSOR FOR LATERAL INTERACTIONS OF MEMBRANE COMPONENTS

**S.A. Akimov, O.V. Kondrashov**

*A.N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow*

Bilayer lipid membranes are the main structural constituent of biological membranes. Lipids and proteins can cause deformations due to their spontaneous curvature, mismatch between the length of hydrophobic parts of molecules and the thickness of the bilayer, lateral condensation caused by electrostatic binding, etc. Deformations extend laterally by several nanometers. Overlapping deformations induced by different membrane components leads to their lateral interaction. The interaction energy is usually low, and it is almost impossible to register it at the molecular level. However, lateral interaction is manifested in a change in average characteristics of a large ensemble of interacting particles. Gramicidin A (gA) is a convenient sensor of lateral interactions. Two gA molecules located in opposite membrane monolayers can form a dimer, which is a cation-selective ion channel. The length of the gA dimer is less than the thickness of a typical membrane, which leads to deformations of the lipid bilayer. The states of individual monomers and the conducting gA dimer are stable and metastable, respectively. The transition between them occurs via the state of the coaxial pair corresponding to the top of the energy barrier of the reaction. The measured characteristics are the average lifetime and concentration of gA dimers. In all three gA states, the membrane is deformed, and lateral interactions with membrane components change the energies of these states differently. This is manifested in a change in the average lifetime and concentration of gA dimers. To calculate the average characteristics of the gA ensemble and membrane-deforming inclusions, the partition function of the system is calculated taking into account the interaction of all particles. The Mayer cluster expansion is used to calculate the partition function. Within the framework of such formalism, we considered and predicted how the average lifetime and average concentration of gA dimers should change upon introduction of amphipathic and transmembrane peptides into the membrane, as well as upon adsorption of BSA onto the membrane. Theoretical predictions are consistent with the available experimental data. The developed model allows using gA as a sensor of lateral interactions of membrane components.

## РЕОРГАНИЗАЦИЯ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН АМФИПАТИЧЕСКИМИ ПЕПТИДАМИ: РОЛЬ НЕБИСЛОЙНЫХ ЛИПИДОВ

М. Сумарокова<sup>1</sup>, Д. Ивченков<sup>1</sup>, В. Крамкова<sup>1</sup>, П. Кузьмин<sup>2</sup>, И. Лацис<sup>3</sup>, В. Лазарев<sup>3</sup>, П. Башкиров<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора; <sup>2</sup>Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН; ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина, Москва

Изменение формы мембраны - важнейший аспект различных клеточных процессов, включая внутриклеточный трафик, передачу сигналов, мембранный рекрутинг белков и регуляцию активности ферментов. Геометрическая форма мембраны контролируется специализированными белками, деятельность которых координируется в пространстве и времени. Белки, участвующие в регуляции геометрической кривизны мембраны, обычно содержат амфипатические спирали в домене, взаимодействующем с мембраной. Считается, что эти спирали, располагаясь на границе раздела гидрофобной и гидрофильной областей липидного бислоя, действует как "клинья", помогающие мембране изгибаться в их сторону. Однако последние исследования поставили под сомнение эту гипотезу. Было показано, что за изгиб мембраны в первую очередь отвечают стерические взаимодействия белков на ее поверхности, в то время как роль амфипатических спиралей сводится к закреплению белка в липидном бислое.

В данной работе мы провели подробное исследование способности амфипатического N-концевого H0 пептида ENTH домена белка эпсина, а также синтетических пептидов с аналогичной длиной и гидрофобным профилем вызывать изменение формы мембраны. Наши результаты показывают, что H0 и его аналоги демонстрируют значительную положительную спонтанную кривизну при встраивании в липидный монослой. Однако для реорганизации мембраны – спонтанной потери устойчивости плоской формы и формирования сильно искривленных структур – необходима высокая нефизиологическая поверхностная плотность пептидов. Наличие в мембране небислоиных липидов, имеющих коническую форму, значительно облегчает дестабилизацию ее плоской формы, снижая критическую плотность пептидов и увеличивая значение латерального натяжения, которое может противостоять реорганизации мембраны. Кроме того, радиусы формирующихся мембранных трубок зависят от концентрации небислоиных липидов: чем выше их содержание в мембране, тем тоньше образующиеся трубки. Чтобы объяснить синергизм небислоиных липидов и амфипатических пептидов в реорганизации мембран, мы разработали теоретическую модель, учитывающую локальную связь кривизны и мембранного состава.

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00265).*

## MEMBRANE REMODELLING BY AMPHIPATHIC HELICES: ROLE OF NON-BILAYER LIPIDS.

M. Sumarokova<sup>1</sup>, D. Ivchenkov<sup>1</sup>, V. Kramkova<sup>1</sup>, P. Kuzmin<sup>2</sup>, I. Latsis<sup>3</sup>, V. Lazarev<sup>3</sup>, P. Bashkirov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Institute for Systems Biology and Medicine; <sup>2</sup>A.N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry; <sup>3</sup>Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency, Moscow

Membrane remodeling plays a crucial role in various cellular functions such as intracellular trafficking, signal transduction, protein interaction, and enzyme regulation. Specialized proteins govern the dynamic changes in membrane shape through coordinated spatial and temporal activities. Proteins that drive membrane curvature often feature an amphipathic helix positioned to interact with the membrane, acting as a potential "wedge" to promote outward bending. However, recent studies have contested the traditional view that the amphipathic insertion alone drives curvature generation. Instead, it has been proposed that protein steric interactions, particularly crowding effects, play a central role in membrane bending, with the amphipathic helix primarily serving as a membrane anchor.

This study focuses on investigating the impact of the H0 helix from the epsin N-terminal homology domain (ENTH) and specially designed peptides with similar hydrophobic profiles on membrane shape transition. Our results reveal that while H0 and its analogs exhibit substantial positive spontaneous curvature in the lipid monolayer, they have minimal influence on the planar membrane shape. Spontaneous tubulation of the planar membrane requires a high peptide density and low lateral tension. Additionally, the presence of conical lipid phosphatidylethanolamine (PE) in the membrane significantly enhances membrane destabilization, lowering the critical peptide density required and increasing lateral tension resistance to shape transition. The tube radii formed exhibit a notable correlation with PE concentration, diminishing with higher PE levels. A theoretical model integrating curvature-composition interactions of both amphipathic peptides and conical lipids is proposed to elucidate their collaborative role in membrane remodeling.

*This study was supported by the Russian Science Foundation under grant #22-15-00265.*

## МЕМБРАННАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ: ТРАНСЛОКАЦИЯ И БЛОКИРОВКА ФОРМИРОВАНИЯ ПОР

**М.В. Воловик, О.В. Батищев**

*Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва*

Антимикробные пептиды (АМП) многие годы рассматриваются в качестве потенциальной замены существующим «классическим» антибиотикам. Тем не менее, в клиническую практику введены единицы АМП, а для системного воздействия они используются в исключительных случаях. Во многом, это связано с токсичностью, низкой селективностью и быстрой деградацией в организме для данных соединений. Попытки модифицировать их структуру упираются в отсутствие четкого понимания взаимосвязи структурных особенностей АМП и их воздействия на мембраны бактериальных и эукариотических клеток. Чтобы разобраться в основных физико-химических механизмах действия антимикробных пептидов на мембраны мы решили детально изучить ранние стадии пептид-липидных взаимодействий в низких концентрациях пептидов.

В качестве объектов исследования мы выбрали мелиттин и магаинин, представляющие собой альфа-спиральные амфипатические пептиды и отличающиеся лишь наличием пролиновой петли в структуре мелиттина. С помощью биоэлектрохимического метода компенсации внутримембранного поля мы изучили процесс адсорбции молекул АМП на липидных мембранах, а с помощью метода пэтч-кламп мы детально исследовали процесс формирования пор в мембранах под воздействием данных пептидов. В результате нам удалось установить, что структура формируемых пор, их время жизни, а также вероятность перехода пептидов через мембрану, во многом, определяются индуцируемым ими дисбалансом латерального давления и натяжения в липидных монослоях мембраны. Этот дисбаланс, в свою очередь, определяется той площадью, которую пептид привносит в мембрану, а также глубиной его погружения. Таким образом, нам удалось установить четкую связь между положением пептида в липидном бислое, определяемым его структурными особенностями, размерами молекулы пептида и его мембранной активностью.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2024-534).*

## MEMBRANE ACTIVITY OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES: TRANSLOCATION AND INHIBITION OF PORE FORMATION

**M.V. Volovik, O.V. Batishchev**

*A.N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow*

Antimicrobial peptides (AMPs) have been considered for many years as a potential replacement for existing "classical" antibiotics. However, only a few AMPs have been introduced into clinical practice, and they are used for systemic application in exceptional cases. This is largely due to toxicity, low selectivity, and rapid degradation in the body for these compounds. Attempts to modify their structure are hampered by the lack of a clear understanding of the relationship between the structural features of AMPs and their effect on the membranes of bacterial and eukaryotic cells. To understand the main physicochemical mechanisms of action of antimicrobial peptides on membranes, we decided to study in detail the early stages of peptide-lipid interactions at low peptide concentrations.

As objects of study, we chose melittin and magainin, which are alpha-helical amphipathic peptides and differ only in the presence of a proline loop in the structure of melittin. Using the bioelectrochemical method of intramembrane field compensation, we studied the process of adsorption of AMP molecules onto lipid membranes, and using the patch-clamp method, we investigated in detail the process of pore formation in membranes under the influence of these peptides. As a result, we were able to establish that the structure of the formed pores, their lifetime, as well as the probability of peptide translocation through the membrane, are largely determined by the imbalance of lateral pressure and tension in the lipid monolayers of the membrane induced by them. This imbalance, in turn, is determined by the area that the peptide brings to the membrane, as well as the depth of its immersion. Thus, we were able to establish a clear relationship between the position of the peptide in the lipid bilayer, determined by its structural features, the size of the peptide molecule and its membrane activity.

*The work was carried out with the financial support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement No. 075-15-2024-534).*

## БЕЛОК-ЛИПИДНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КАК МИШЕНЬ ДЛЯ НОВЫХ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

**З.Г. Дениева, О.В. Батищев**

*Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва*

Возбудителями многих социально значимых заболеваний являются оболочечные вирусы, такие как, например, вирус гриппа А, вирус иммунодефицита человека, коронавирусы, и многие другие. Их общим свойством является наличие липидной оболочки, захваченной вирусом при отпочковывании с поверхности инфицированной клетки. Помимо липидной оболочки, на поверхности вируса располагаются гликопротеины и ферменты, необходимые для его репликации. В большинстве случаев мишенями действия известных лекарственных препаратов и вакцин выступают именно эти компоненты вируса. Однако они являются высоко изменчивыми, из-за чего в терапии приходится комбинировать несколько веществ, что значительно осложняет процесс лечения.

Матриксные и капсидные белки вирусов являются наиболее консервативными и играют важную роль практически на всех этапах жизненного цикла вируса: проникновении вируса внутрь клетки, высвобождении вирусного генетического материала, сборке и высвобождении новой вирусной частицы. Тем не менее, особенности их функционирования изучены не до конца, из-за чего они до сих пор не выступают в качестве мишеней для разработки новых противовирусных препаратов. Используя междисциплинарный подход, мы изучили мембранную активность полипротеина Gag вируса иммунодефицита человека. Это наиболее консервативный элемент вируса, который отвечает за сборку и отпочковывание новых вирусных частиц с поверхности инфицированной клетки. В отличие от других белков вируса, он практически не несет новых мутаций после очередного цикла репликации вирусной частицы и может рассматриваться как потенциальная мишень для разработки противовирусных препаратов. Такое исследование механизмов белок-липидных взаимодействий может позволить предложить новые пути поиска возможных противовирусных препаратов, препятствующих самоорганизации вирусных белков и их активности при взаимодействии с мембранами инфицированной клетки до образования инфекционного вируса.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант РФФИ № 20-54-14006).*

## PROTEIN-LIPID INTERACTIONS AS A TARGET FOR NEW ANTIVIRAL DRUGS

**Z.G. Denieva, O.V. Batishchev**

*A.N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow*

Enveloped viruses, such as, for example, the influenza A virus, the human immunodeficiency virus, coronaviruses, and many others, are the causative agents of many socially significant diseases. Their common feature is the presence of a lipid membrane, which is captured by the virus during its budding from the surface of the infected cell. In addition to the lipid membrane, there are surface glycoproteins and enzymes necessary for viral replication. These components of the virus are targets for most known drugs and vaccines. However, they are highly variable, requiring the combination of several drugs in therapy and making treatment difficult.

Matrix and capsid proteins of viruses are the most conserved and play an important role in almost all stages of the viral life cycle: entry of the virus into the cell, release of viral genetic material, assembly and release of a new virion. However, the specifics of how they work are not fully understood, which is why they have not been used as targets for the development of new antiviral drugs. We used an interdisciplinary approach to study the membrane activity of the human immunodeficiency virus Gag polyprotein. This is the most conserved component of the virus, which is responsible for the assembly and budding of new viral particles from the surface of the infected cell. Unlike other viral proteins, it practically does not carry new mutations after the next cycle of virus replication and can be considered as a potential target for the development of antiviral drugs. Such a study of the mechanisms of protein-lipid interactions may suggest new ways to search for potential antiviral drugs that prevent the self-organization of viral proteins and their activity when interacting with the membranes of the infected cell prior to the formation of an infectious virus.

*The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant #20-54-14006).*



## ЛИПОСОМАЛЬНЫЕ ФОРМЫ ЭХИНОКАНДИНОВ: АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПОСОБ ДЕЙСТВИЯ И ПРЕОДОЛЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ

О.С. Остроумова<sup>1</sup>, А.И. Малыхина<sup>1</sup>, С.С. Ефимова<sup>1</sup>, Е.В. Водопьянова<sup>1</sup>, Н.Е. Грамматикова<sup>2</sup>, А.Н. Тевяшова<sup>2,3</sup>, А.Е. Щекотихин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; <sup>2</sup>НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва, Россия;

<sup>3</sup>Университет Констрактер, Бремен, Германия

Эхинокандины – противогрибковые циклические липопептиды, рекомендованные для лечения инвазивных кандидозов и аспергиллёзов. Механизмом их действия считается неконкурентное ингибирование (1,3)-бета-глюкансинтазы (ГС), что приводит к нарушению синтеза клеточной стенки грибов. Литературные данные свидетельствуют, что мутации в гене фермента, ассоциированные с возникновением устойчивости к эхинокандинам, затрагивают трансмембранную часть белка, а ряд мутаций в генах ферментов, участвующих в биосинтезе сфинголипидов в грибах, также ассоциирован с увеличением риска резистентности к эхинокандинам. Это указывает на возможную связь противогрибковой и мембранной активности эхинокандинов. В настоящей работе нами проанализированы молекулярные механизмы действия эхинокандинов (анидулафунгина, каспофунгина и микафунгина) на обогащенные стеринами липидные бислои, имитирующие мембраны клеток грибов и млекопитающих. С использованием комплексного подхода, включающего дифференциальную сканирующую микрокалориметрию фазовых переходов мембранообразующих липидов, методы молекулярной динамики, флуориметрию утечки маркера из липосом и конфокальную сканирующую микроскопию латеральной гетерогенности липидных везикул, установлено, что эхинокандины модифицируют плотность упаковки липидов, усиливая фазовую сегрегацию в мембране. С применением метода регистрации токов, протекающих через плоские липидные бислои, впервые обнаружена способность эхинокандинов индуцировать ион-проницаемые поры в стерин-содержащих мембранах. Таким образом, эхинокандины могут влиять на функционирование ГС путем изменения свойств липидного микроокружения фермента, а также увеличения проницаемости клеточной мембраны посредством образования ион-селективных каналов утечки. Нами показано, что потенцирование мембранной активности эхинокандинов путем включения в липосомальные формы усиливает противогрибковую активность соединений и снижает риск возникновения устойчивости к препаратам. Так, по сравнению со свободными эхинокандинами тестируемые липосомальные формы характеризуются значительно меньшими минимальными подавляющими концентрациями в отношении клинических изолятов *Candida* spp., в том числе флуконазол- и эхинокандин-устойчивых штаммов.

*Работа поддержана грантами РФФИ № 22-15-00417 и № 22-74-10023.*

## LIPOSOMAL FORMULATIONS OF ECHINOCANDINS: AN ALTERNATIVE MODE OF ACTION AND OVERCOMING FUNGAL RESISTANCE

O.S. Ostroumova<sup>1</sup>, A.I. Malykhina<sup>1</sup>, S.S. Efimova<sup>1</sup>, E.V. Vodopyanova<sup>1</sup>, N.E. Grammatikova<sup>2</sup>, A.N. Tevyashova<sup>2,3</sup>, A.E. Shchekotikhin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg; <sup>2</sup>Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>Constructor University, Bremen, Germany

Echinocandins are antifungal cyclic lipopeptides recommended for the treatment of invasive candidiasis and aspergillosis. Their mechanism of action is considered to be non-competitive inhibition of (1,3)-beta-glucan synthase (GS), which leads to disruption of fungal cell wall synthesis. Literature data indicate that mutations in the enzyme gene associated with resistance to echinocandins affect the transmembrane helices of the protein, and a number of mutations in the genes of enzymes involved in the biosynthesis of sphingolipids in fungi are also associated with an increased risk of resistance to echinocandins. This indicates a possible connection between the antifungal and membrane activity of echinocandins. Here we analyzed the molecular mechanisms of action of echinocandins (anidulafungin, caspofungin and micafungin) on sterol-enriched lipid bilayers mimicking fungal and mammalian cell membranes. Using an integrated approach including differential scanning microcalorimetry of phase transitions of membrane-forming lipids, molecular dynamics methods, fluorimetry of marker leakage from liposomes and confocal scanning microscopy of lateral heterogeneity of lipid vesicles, we found that echinocandins were able to modify the lipid packing density, enhancing phase segregation in the membrane. Using planar lipid bilayers and electrophysiological assay, the ability of echinocandins to induce ion-permeable pores in sterol-containing membranes was found. Thus, echinocandins might affect the functioning of GS by changing the properties of the lipid microenvironment of the enzyme, as well as increasing the permeability of the cell membrane through the formation of ion-selective leakage channels. We showed that potentiation of the membrane activity of echinocandins by inclusion in liposomal forms enhanced the antifungal activity of the compounds and reduced the risk of drug resistance. Thus, compared with free echinocandins, the tested liposomal forms were characterized by significantly lower minimum inhibitory concentrations in relation to clinical isolates of *Candida* spp., including fluconazole- and echinocandin-resistant strains.

*The work was supported by the grants of the Russian Science Foundation No. 22-15-00417 and No. 22-74-10023.*

### ЭФФЕКТ МУТАЦИОННОГО ДРЕЙФА SARS-CoV-2 НА ПРОЦЕССИНГ РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА ПРОТЕАСОМЫ

А.А. Кудряева<sup>1</sup>, И.О. Бутенко<sup>2</sup>, Г.А. Саратов<sup>1</sup>, Д.С. Матюшкина<sup>2</sup>, А.Г. Габиров<sup>1</sup>, В.М. Говорун<sup>2</sup>, А.А. Белогуров<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; <sup>2</sup>НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва

Коронавирусная инфекция (COVID-19), вызванная вирусом SARS-CoV-2, вызывает дисрегуляцию иммунной системы и индуцирует аномальную гипервоспалительную реакцию. Иммунологические исследования, оценивающие динамику SARS-CoV-2-реактивных Т-клеток и антител во время острой инфекции у пациентов, показали быстрое увеличение Т-клеток, продуцирующих IFN $\gamma$ , специфичных к различным белкам вируса, включая спайковый (S), мембранный (M), нуклеокапсидный (N), а также белки ORF3a и ORF7/8 у пациентов, успешно контролирующей репликацию вируса без развития тяжёлого заболевания. Напротив, у пациентов с затяжной инфекцией и тяжёлым течением COVID-19 наблюдался мощный антительный ответ, однако количество циркулирующих Т-клеток, специфичных к SARS-CoV-2, было снижено. На данный момент выявлено более 2 400 экспериментально подтверждённых Т-клеточных эпитопов, распознаваемых молекулами HLA классов I и II. В настоящем исследовании мы проанализировали индекс связывания 305 молекул HLA класса I с 821 пептидом – продуктами процессинга рецептор-связывающего домена пяти основных штаммов SARS-CoV-2 конститутивными и иммунопротеасомами человека. Наши данные свидетельствуют, что мутации в области RBD<sub>496-513</sub> штамма Omicron B.1.1.529, задействованной в связывании с hACE2, при гидролизе протеасомой привели к значительному увеличению количества двух ключевых эпитопов, распознаваемых молекулами HLA класса I. Глобальный анализ популяций по HLA гаплотипам, специфичным к этим пептидам, выявил снижение смертности среди выборок с высоким уровнем этих гаплотипов после декабря 2021 года, когда Omicron стал доминирующим штаммом. Важно отметить, что текущие варианты Omicron, такие как BA.2.86 и JN.1, не содержат мутаций в области RBD<sub>496-513</sub>. Анализ распространённости аллелей HLA класса I показал, что гаплотипы HLA-B07:02, -B08:01, -B15:01, -C01:02, -C06:02, -C07:02 и -C\*12:03 могут потенциально повышать устойчивость популяции к варианту Omicron.

*Работа поддержана проектом РНФ № 24-74-10107.*

### MODULATION OF RECEPTOR BINDING DOMAIN PROCESSING BY THE PROTEASOME DEPENDING OF SARS-CoV-2 MUTATIONAL DRIFT

А.А. Kudriaeva<sup>1</sup>, И.О. Butenko<sup>2</sup>, G.A. Saratov<sup>1</sup>, D.S. Matyushkina<sup>2</sup>, A.G. Gabibov<sup>1</sup>, V.M. Govorun<sup>2</sup>, A.A. Belogurov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences; <sup>2</sup>Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow

The infection caused by the SARS-CoV-2 virus, otherwise known as the Coronavirus (Covid-19), results in the dysregulation of the immune system and the induction of an abnormal hyperinflammatory response. Immunological studies have demonstrated that the dynamics of SARS-CoV-2-reactive T cells and antibodies during the acute phase of infection in patients exhibit a rapid increase in IFN $\gamma$ -producing T cells specific to various viral proteins, including those associated with the spike (S), membrane (M), nucleocapsid (N), and ORF3a and ORF7/8 proteins. This phenomenon has been observed in patients who have successfully controlled viral replication without developing severe disease. In contrast, patients with prolonged infection and severe disease had a robust antibody response, yet the number of circulating T cells specific to SARS-CoV-2 was diminished. To date, more than 2,400 T-cell epitopes that have been experimentally validated and recognized by HLA class I and II molecules have been identified. In the present study, we analyzed the binding index of 305 HLA class I molecules to 821 peptides, the products of receptor-binding domain processing of five major SARS-CoV-2 strains by constitutive and human immunoproteasomes. The data demonstrate that mutations in the RBD<sub>496-513</sub> region of the Omicron strain B.1.1.529, which are involved in hACE2 binding, upon hydrolysis by the proteasome, resulted in a significant increase in the number of two key epitopes that are recognized by HLA class I molecules. A global population analysis based on HLA haplotypes specific to the peptides in question revealed a decrease in mortality among samples with high levels of these haplotypes after December 2021, when the Omicron strain became dominant. It is noteworthy that the current Omicron variants, such as BA.2.86 and JN.1, do not possess the mutations in the RBD<sub>496-513</sub> region. The analysis of the prevalence of HLA class I alleles demonstrated that the haplotypes HLA-B07:02, -B08:01, -B15:01, -C01:02, -C06:02, -C07:02 and -C\*12:03 could potentially enhance population resistance to the Omicron variant.

*The work was supported by the grant of the Russian Science Foundation № 24-74-10107.*

### **ИЗМЕНЕННЫЙ ПРОТЕОМ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ АССОЦИИРОВАННОЙ С ETV6 ТРОМБОЦИТОПЕНИЕЙ СВЯЗАН С ФУНКЦИОНАЛЬНОСТЬЮ ТРОМБОЦИТОВ**

**И.П. Тесаков, А.Е. Болдова, Д.В. Федорова, А.И. Игнатова, М.Г. Згода, А.Н. Свешникова**

*НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, Москва*

Ассоциированная с ETV6 тромбоцитопения (ETV6-RT), возникает из-за мутаций зародышевой линии в гене EVT6, который кодирует фактор транскрипции ETV6. Несмотря на несколько известных мишеней ETV6, влияние на структуру и функцию тромбоцитов остается плохо изученным. С целью определения механизмов гемостатической дисфункции, вызванной отсутствием ETV6, в настоящей работе были изучены материалы от 9 пациентов из 5 неродственных семей с ETV6-RT в сравнении с группой здоровых доноров. Мы провели морфологическую и функциональную характеристику тромбоцитов и исследовали белковый состав тромбоцитов с помощью протеомного анализа. Функциональность тромбоцитов оценивалась с помощью проточной цитофлуориметрии живых клеток. Для оценки морфологии использовалась иммунофлуоресцентная микроскопия тромбоцитов. У большинства пациентов наблюдалась легкая или умеренная тромбоцитопения и легкая тенденция к кровотечению. Функциональные реакции тромбоцитов на сильную активацию были сопоставимы с контрольными показателями, но мобилизация кальция и связывание фибриногена при активации с АДФ были снижены. Форма тромбоцитов, концентрация кальция и уровень экспрессии P-селектина в покое указывали на возможную предварительную активацию тромбоцитов в кровотоке. Микроскопическое исследование выявило аномалии формы тромбоцитов и диффузное распределение  $\beta$ 1-тубулина. При протеомном анализе были выделены три основные группы белков (цитоскелет, везикулярный транспорт и митохондриальные белки), которые показали значительные изменения при ETV6-RT. Наши результаты показывают, что изменения в составе белков цитоскелета способствуют аномальным функциональным реакциям в ETV6-RT.

### **ALTERED PLATELET PROTEOME IN ETV6-RELATED THROMBOCYTOPENIA IS ASSOCIATED WITH PLATELET FUNCTIONALITY**

**I.P. Tesakov, A.E. Boldova, D.V. Fedorova, A.I. Ignatova, V.G. Zgoda, A.N. Sveshnikova**

*Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow*

ETV6-related thrombocytopenia (ETV6-RT) results from germline mutations in the EVT6 gene, which encodes the ETV6 transcription factor. Despite several known ETV6 targets, the impact on platelet structure and function remains poorly understood. We aimed to elucidate the mechanisms of hemostatic dysfunction in ETV6-RT by studying 9 patients from 5 unrelated families and healthy donors. We performed complex morphological and functional characterization of platelets and investigated platelet protein composition via proteomics analysis. Platelet continues and end-point flow cytometry together with fluorescent microscopy of platelets were utilized. Most patients exhibited mild-to-moderate thrombocytopenia and mild bleeding tendency. Platelet functional responses to strong activation were comparable to controls, but calcium mobilization and fibrinogen binding upon activation with ADP were diminished. Platelet shape, calcium concentration and P-selectin exposure indicated possible pre-activation of platelets in the blood stream. Microscopic examination revealed platelet shape abnormalities and diffuse  $\beta$ 1-tubulin distribution. Three major protein groups (cytoskeleton, vesicle transport, and mitochondrial proteins) showed significant expression alterations in ETV6-RT. Our findings indicate that changes in cytoskeleton protein composition in multiple cell lineages contribute to impaired cytoskeleton structure and abnormal functional responses in ETV6-RT.

### КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ VPg ВИРУСА Y КАРТОФЕЛЯ И eIF4E

V.V. Колесникова<sup>1,2</sup>, Е.Ю. Никонова<sup>1</sup>, В.В. Андрейцев<sup>1</sup>, В.А. Балобанов<sup>1</sup>, Н.В. Леконцева<sup>1</sup>, А.О. Михайлина<sup>1</sup>, Ф.Т. До<sup>3</sup>, О.С. Никон<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт белка РАН, Пушкино; <sup>2</sup>ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАН, Москва, Россия;

<sup>3</sup>Институт биотехнологии Вьетнамской академии наук и технологий, Ханой, Вьетнам

Эукариотический фактор инициации трансляции 4E (eIF4E) имеет важное значение не только для трансляции клеточных мРНК, но также и вирусных. Основными функциями eIF4E являются связывание кэп мРНК клетки и взаимодействие с eIF4G. Во многих организмах eIF4E представлен целым семейством белков. У растений, в том числе картофеля, в составе семейства белков eIF4E входят eIF4E 1 и eIF4E 2, а также характерный только для цветковых растений eIF(iso)4E. Растительные вирусы семейства Потивирусов, такие как PVY, TEV, TuMV, содержат белки VPg, которые взаимодействуют с eIF4E растений, что необходимо для осуществления жизненного цикла вируса. Однако VPg избирательно взаимодействует только с некоторыми из представителей семейства eIF4E. Молекулярный механизм такого взаимодействия не известен.

Растения томата и табака с нокаутными или мутантными формами eIF4E демонстрируют устойчивость к потивирусам. Определение механизма взаимодействия VPg и eIF4E позволит перейти к созданию устойчивых сортов к PVY. Мы используем разно-сторонний подход для реализации этой глобальной цели. Измерение кинетических параметров взаимодействия eIF4E и VPg позволяют определить, с какими из изоформ eIF4E лучше или хуже взаимодействует вирусный белок в условиях *in vitro*. Определение структур свободного eIF4E и его комплекса с VPg позволяет не только понять механизм взаимодействия данных белков, но и осуществить рациональный дизайн мутаций, препятствующих связыванию eIF4E с VPg. Нами уже проведена большая работа по анализу биоразнообразия VPg разных штаммов PVY, а также получению рекомбинантных белков семейства eIF4E картофеля в *E. coli*. Помимо этого, нами определен фрагмент eIF4G картофеля, содержащий два сайта связывания eIF4E, и создана генетическая конструкция для его наработки.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда: грант № 24-44-04007.*

### A COMPLEX APPROACH TO STUDY THE INTERACTION OF VPG OF POTATO Y VIRUS AND eIF4E

V.V. Kolesnikova<sup>1,2</sup>, Yu. Nikonova<sup>1</sup>, V.V. Andreitsev<sup>1</sup>, V.A. Balobanov<sup>1</sup>, N.V. Lekontseva<sup>1</sup>, A.O. Mikhailina<sup>1</sup>, F.T. Do<sup>3</sup>, O.S. Nikonov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino; <sup>2</sup>All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; <sup>3</sup>Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam

Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) is important as for the translation of cellular mRNAs, as viral ones. The main functions of eIF4E are the binding of the cell's cap mRNA and interaction with eIF4G. In many organisms, eIF4E is represented by a family of proteins. In plants, including potatoes, the eIF4E protein family includes eIF4E 1, eIF4E 2 and eIF(iso)4E, which is characteristic only for flowering plants. Plant viruses of the Potivirus family, such as PVY, TEV, TuMV, contain VPg proteins that interact with plant eIF4E, which is necessary for the realization of the virus life cycle. However, VPg selectively interacts with only some of the members of the eIF4E family. The molecular mechanism of this interaction is unknown.

Tomato and tobacco plants with knockout of eIF4E gene or with mutations in it demonstrate resistance to potiviruses. Determining the mechanism of the interaction between VPg and eIF4E will allow us to create resistant varieties of PVY. We use a multipurpose approach to achieve this global goal. Measuring the kinetic parameters of the interaction of eIF4E and VPg allows to determine which of eIF4E isoform interacts better or worse with the viral protein under *in vitro* conditions. The determination of the structures of free eIF4E and its complex with VPg allows not only to understand the mechanism of interaction of these proteins, but also to implement a rational design of mutations that prevent the binding of eIF4E to VPg. We have already done a lot of work on analyzing the VPg biodiversity of different PVY strains, as well as obtaining recombinant proteins of the potato eIF4E family in *E. coli*. In addition, we have identified a fragment of potato eIF4G containing two eIF4E binding sites, and created a genetic construct for induction of its synthesis.

*The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation: grant No. 24-44-04007.*

## МИР ПРОТЕАСОМ. НОВЫЕ ПОДХОДЫ И ДЕТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ ФОРМ ПРОТЕАСОМ В КЛЕТКЕ

**А.В. Морозов, В.Л. Карпов**

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

Убиквитин-протеасомная система (УПС) обеспечивает деградацию большинства внутриклеточных белков. Протеасомы являются центральными элементами УПС и представляют собой крупные (~ 15 нм) мультисубъединичные цилиндрические белковые комплексы, непосредственно осуществляющие деградацию белков до пептидов. Протеасомы многообразны. В частности, описаны формы протеасом, содержащие различные каталитические субъединицы и присоединенные регуляторы. Следует отметить, что после протеолиза белков часть пептидов презентуется на мембранах клеток в качестве антигенов. Значительную роль в расширении спектра генерируемых пептидов играют так называемые “неконститутивные” протеасомы (промежуточные и иммунные протеасомы). Эти протеасомы содержат специфические каталитические субъединицы и задействованы в клеточном ответе на стресс, иммунологических и аутоиммунных реакциях, а также участвуют в развитии нейродегенеративных и онкологических заболеваний. Однако, особенности функционирования таких комплексов малоизучены.

В данной работе методами редактирования генома были получены оригинальные клеточные линии, экспрессирующие меченые флуоресцирующими белками субъединицы конститутивных и неконститутивных протеасом. Используя полученные линии, нами были выявлены вещества, модулирующие экспрессию различных форм протеасом, показано изменение локализации отдельных форм протеасом в клетках. Кроме того, получены данные о роли протеасом, в том числе неконститутивных в центральной нервной системе (ЦНС) в норме и при развитии нейродегенеративных заболеваний. В ходе исследований выявлены значительные различия в экспрессии генов, кодирующих субъединицы протеасом между разными отделами ЦНС. Установлено, что несмотря на крайне небольшое количество неконститутивных протеасом в нейронах гиппокампа, ингибирование их активности приводит к нарушениям процессов, связанных с формированием памяти. Наблюдаемые эффекты коррелировали с дифференциальной экспрессией генов, участвующих в синаптической пластичности, глутаминэргическом синапсе и синаптической передаче сигналов. Показано, что развитие патологии, подобной боковому-амиотрофическому склерозу, сопровождается активацией экспрессии неконститутивных протеасом в коре головного мозга. При этом ингибирование неконститутивных протеасом приводит к улучшению параметров походки и двигательных функций животных.

В целом, результаты работы указывают на значимость разнообразия пула протеасом в клетках и тканях. Выявление роли отдельных форм протеасом может послужить основой для разработки терапевтических препаратов, направленных против широкого спектра заболеваний.

*Работа была поддержана грантом Министерства науки и высшего образования РФ соглашение No 075-15-2024-536 от 24 апреля 2024.*

## THE WORLD OF PROTEASOMES: NEW APPROACHES AND DETAILED STUDY OF INDIVIDUAL FORMS OF PROTEASOMES IN THE CELL

**A.V. Morozov, V.L. Karpov**

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow*

The ubiquitin-proteasome system (UPS) provides degradation of most intracellular proteins. Proteasomes are the central elements of the UPS and represent large (~ 15 nm) multi-subunit cylindrical protein complexes that directly degrade proteins to peptides. Proteasomes are diverse. In particular, proteasome forms containing various catalytic subunits and attached regulators have been described. It should be noted that after proteolysis, some peptides are presented on cell membranes as antigens. So-called “non-constitutive” proteasomes (intermediate and immune proteasomes) play a significant role in expanding the spectrum of generated peptides. These proteasomes contain specific catalytic subunits and are involved in the cellular response to stress, immunological and autoimmune reactions, as well as participate in the development of neurodegenerative and oncological diseases. However, the role of such complexes is still poorly understood.

In this study, genome editing methods were used to obtain original cell lines expressing subunits of constitutive and non-constitutive proteasomes labeled with fluorescent proteins. Using the obtained lines, we identified substances that modulated the expression of various forms of proteasomes, and showed changes in the localization of individual forms of proteasomes within cells. In addition, novel insights regarding the role of non-constitutive proteasomes, in the central nervous system (CNS) in normal conditions and during the development of neurodegenerative diseases were obtained. The studies revealed significant differences in the expression of genes encoding proteasome subunits between different parts of the CNS. It was found that despite the extremely small number of non-constitutive proteasomes in hippocampal neurons, inhibition of their activity leads to disruptions in processes associated with memory formation. The observed effects correlated with differential expression of genes involved in synaptic plasticity, glutaminergic synapse, and synaptic signaling. It was shown that the development of an amyotrophic lateral sclerosis-like pathology is accompanied by activation of expression of non-constitutive proteasomes in the cerebral cortex. At the same time, inhibition of non-constitutive proteasomes leads to improvement of gait parameters and motor functions of animals.

Taken together, obtained results indicate the importance of the proteasome pool diversity in cells and tissues. Identification of specific role of the individual forms of proteasomes can serve as a basis for the development of drugs aimed at a wide variety of diseases.

*This research was funded by a grant from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement No. 075-15-2024-536).*

## БЕЛКИ-МАРКЕРЫ НАРУШЕННОГО ЭМОЦИОНАЛЬНОГО ПОВЕДЕНИЯ У МЫШЕЙ С ТОЧЕЧНОЙ МУТАЦИЕЙ Q31L В ГЕНЕ *Disc1*

Т.Г. Амстиславская, К.В. Смирнова, С.О. Бородина, В.Л. Ярных, Л.П. Смирнова

НИИ нейронаук и медицины, Новосибирск

Белок DISC1 регулирует пролиферацию и дифференцировку нейрональных стволовых клеток, формирование синапсов и работу сигнальных каскадов внутри клетки, поэтому мутации в гене DISC1 являются ключевым предиктором развития психических расстройств. У мышей мутация в гене *Disc1* снижает связывание белка DISC1 с GSK-3 (гликоген синтаза киназа-3 альфа) и PDE4B (3',5'-циклическая АМФ фосфодиэстераза 4B), ускоряет деградацию белка BMAL1, связанного с развитием депрессивно-подобного поведения и изменением миелинизации. Поэтому, изучение распределения белка BMAL1 в областях мозга, вовлеченных в регуляцию поведения у мышей с мутацией Q31L в гене *Disc1* может выявить новые механизмы патогенеза аффективных расстройств.

В работе использовали самцов мышей C57BL/6 и с мутацией в гене *Disc1* Q31L из УНУ «Биологическая коллекция – генетические биомодели нейропсихических заболеваний» НИИИМ. Мышей содержали в стандартных условиях, при световом режиме 12:12 и исследовали поведение в тестах «открытое поле», «социальное предпочтение» и «принудительное плавание». Иммуногистохимический анализ проводили на замороженных срезах мозга с использованием первичных антител против BMAL1, и вторичных – Alexa fluor 488. У пациентов отделения аффективных состояний НИИ психического здоровья ТНИМЦ исследовали содержание миелина в белом веществе головного мозга с помощью МПФ (молекулярной протонной фракции). Диагнозы биполярное аффективное (БАР) и рекуррентное депрессивное расстройство (РДР) были поставлены врачами психиатрами. МРТ головного мозга проведено с использованием 1,5T МР-сканера (Ingenia Evolution, Philips, Netherlands). Карты МПФ были реконструированы с использованием программного обеспечения <https://www.macromolecularmri.org/>. Мыши Q31L проявляли признаки депрессивноподобного фенотипа и снижение иммунофлуоресценции белка BMAL1 в CA1 области гиппокампа и латеральной habenule. У больных БАР и РДР выявлено снижение миелинизации белого вещества головного мозга, а сам процесс гипомиелинизации носил диффузный характер. Полученные на мышах результаты свидетельствуют, что путь DISC1-GSK3-BMAL1 может быть потенциальным механизмом, регулирующим миелинизацию, посредством чего быть вовлеченным в патогенез аффективных расстройств.

*Исследование поддержано грантом РФФ № 23-75-00023.*

## POTENTIAL ROLE OF BMAL1 PROTEIN IN THE DEVELOPMENT OF HYPOMYELINATION AND AFFECTIVE DISORDERS

T.G. Amstislavskaya, K.V. Smirnova, S.O. Borodina, V.L. Yarnykh, L.P. Smirnova

Research Institute of Neuroscience and Medicine, Novosibirsk

DISC1 protein regulates proliferation and differentiation of neuronal stem cells, formation of synapses and signaling cascades inside the cell, therefore mutations in the DISC1 gene are a key predictor of development of mental disorders. Mutation in the *Disc1* gene reduces binding of DISC1 protein to GSK-3 (glycogen synthase kinase-3 alpha) and PDE4B (3',5'-cyclic AMP phosphodiesterase 4B), accelerates degradation of BMAL1 protein associated with development of depressive-like behavior and changes in myelination. Studying distribution of BMAL1 protein in brain areas involved in regulation of behavior in mice with Q31L mutation in the *Disc1* gene can reveal new mechanisms of pathogenesis of affective disorders.

The study involved male C57BL/6 mice and those with a mutation in the *Disc1* gene – Q31L from the USI "Biological Collection – Genetic Biomodels of Neuropsychiatric Diseases" of the SRINM. The mice were kept under standard conditions, with a 12:12 light regime, and their behavior was studied in the "open field", "social preference" and "forced swimming" tests. Immunohistochemical analysis was performed on brain sections using primary antibodies against BMAL1 and secondary ones - Alexa fluor 488. The myelin content in the white matter of the brain of patients of the Department of Affective States of the Research Institute of Mental Health of the TNRMС was studied using MPF (molecular proton fraction). The diagnoses of bipolar affective disorder and recurrent depressive disorder were made by psychiatrists. Brain MRI was performed using a 1.5T MR scanner (Ingenia Evolution, Philips, Netherland). Q31L mice showed signs of a depressive-like phenotype and decreased immunofluorescence of the BMAL1 protein in the CA1 region of the hippocampus and lateral habenula. In patients with bipolar disorder and recurrent dementia, decreased myelination of the white matter of the brain was detected, and the hypomyelination process itself was diffuse. The results indicate that the DISC1-GSK3-BMAL1 pathway may be a potential mechanism regulating myelination and, thus, is involved in the pathogenesis of affective disorders.

*The study is supported the Russian Science Foundation No. 23-75-00023.*

## ВЛИЯНИЕ ПРОФИБРОТИЧЕСКОГО ОКРУЖЕНИЯ НА ФОРМИРОВАНИЕ СЕНЕСЦЕНТНОГО ПРОФИЛЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

**М.С. Арбатский, М.А. Виговский, Н.А. Басалова, О.А. Григорьева, М.А. Кулебякина, Д.А. Бутузова, Д.Е. Баландин, А.В. Чуров, А.Ю. Ефименко**

*Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Российский геронтологический научно-клинический центр, Институт изучения старения, Москва; Медицинский научно-образовательный институт, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва*

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) являются участниками процессов регенерации и репарации поврежденных тканей. Их регуляторная функция во многом опосредована секрецией биоактивных молекул. Показана способность МСК предотвращать развитие фиброза в исходе повреждения тканей за счет действия своего секретомы. Однако, сигналы патологически измененной стромы при фиброзе могут влиять на секреторную активность МСК. Ранее мы показали, что профибротическое микроокружение изменяет транскриптомный профиль МСК в сторону паттерна, характерного для клеточной сенесценции. В работе было изучено, происходят ли подобные изменения в секретоме этих клеток. Для моделирования профибротических условий использовали внеклеточный матрикс дермальных фибробластов и TGFβ [Grigorieva et al., 2024] и методом протеомного анализа оценивали содержание белков, ассоциированных с сенесценцией, в секретоме МСК человека. В секретоме контрольных МСК было обнаружено 66 высокопредставленных секретируемых белков, из которых 8 ассоциированы с сенесценцией (EEF1A1, GSR, GSTP1, LMNA, MIF, PRDX1, SOD2 и UCHL1). Эти белки играют важную роль в антиоксидантной защите, поддержании клеточного протеостаза, структурной целостности клеток и регуляции воспалительных процессов. В секретоме МСК, культивированных в профибротических условиях, было обнаружено 75 высокопредставленных секретируемых белков, из них 5 белков ассоциированы с сенесценцией (CLU, GRN, IGFBP3, PAPPА и SERPINE1). Эти белки связаны с защитой от стресса, регуляцией воспаления, метаболизмом ростовых факторов и коагуляцией, а их продукция в МСК повышается под действием профибротических стимулов, что указывает на активизацию защитных механизмов и регуляторных процессов в условиях фиброза. Согласно полученным данным, в профибротических условиях в секретоме МСК не происходит явного сдвига профиля белков, связанных с сенесценцией. Наблюдаемые изменения представленности белков, ассоциированных с клеточным старением, скорее указывают на комплексную реакцию секреторной активности этих клеток, связанную с адаптацией к стрессовым условиям и фиброзу. Это подчеркивает необходимость дальнейшего изучения роли баланса конкретных белков в процессе старения стромальных клеток и их потенциала для разработки новых терапевтических стратегий.

## THE IMPACT OF A PRO-FIBROTIC ENVIRONMENT ON THE FORMATION OF THE SENESCENT PROFILE OF HUMAN MESENCHYMAL STROMAL CELLS

**M.S. Arbatsky, M.A. Vigovsky, N.A. Basalova, O.A. Grigoryeva, M.A. Kulebyakin, D.A. Butuzova, D.E. Balandin, A.V. Churov, A.Yu. Efimenko**

*Pirogov Russian National Research Medical University of the Ministry of Health of Russia, Branch 'Russian Scientific and Clinical Center for Gerontology', Institute of Aging Research, Moscow; Medical Scientific and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University, Moscow*

Multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are involved in the regeneration and repair of damaged tissues. Their regulatory function is largely mediated by the secretion of bioactive molecules. MSCs have been shown to prevent the development of fibrosis following tissue damage through their secretome. However, signals from pathologically altered stroma in fibrosis may affect the secretory activity of MSCs. Previously, we demonstrated that a pro-fibrotic microenvironment alters the transcriptomic profile of MSCs towards a pattern characteristic of cellular senescence. This study investigated whether similar changes occur in the secretome of these cells. To model pro-fibrotic conditions, we used extracellular matrix from dermal fibroblasts and TGFβ [Grigorieva et al., 2024], and assessed the content of senescence-associated proteins in the human MSC secretome using proteomic analysis. The secretome of control MSCs revealed 66 highly represented secreted proteins, of which 8 are associated with senescence (EEF1A1, GSR, GSTP1, LMNA, MIF, PRDX1, SOD2, and UCHL1). These proteins play critical roles in antioxidant defense, maintenance of cellular proteostasis, structural integrity of cells, and regulation of inflammatory processes. In the secretome of MSCs cultured under pro-fibrotic conditions, 75 highly represented secreted proteins were identified, with 5 associated with senescence (CLU, GRN, IGFBP3, PAPPА, and SERPINE1). These proteins are related to stress protection, inflammation regulation, growth factor metabolism, and coagulation, and their production in MSCs increases under the influence of pro-fibrotic stimuli, indicating the activation of protective mechanisms and regulatory processes in fibrosis conditions. According to the data obtained, pro-fibrotic conditions do not cause a clear shift in the profile of senescence-related proteins in the MSC secretome. The observed changes in the representation of senescence-associated proteins suggest a complex response of the secretory activity of these cells related to adaptation to stress conditions and fibrosis. This underscores the need for further investigation into the role of specific protein balances in the aging of stromal cells and their potential for developing new therapeutic strategies.

**НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ ИЗАТИНА И АФОБАЗОЛА В РОТЕНОВОЙ МОДЕЛИ ПАРКИНСОНИЗМА У КРЫС**  
**О.А. Бунеева<sup>1</sup>, И.Г. Капица<sup>1,2</sup>, В.Г. Згода<sup>1</sup>, А.Е. Медведев<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича; <sup>2</sup>Институт фармакологии им. В.В. Закусова, Москва

Паркинсонизм, вызванный введением крысам пестицида ротенона – одна из наиболее адекватных моделей болезни Паркинсона (БП). Эндогенный нейропротектор изатин (индолдион-2,3) – характеризуется широким спектром биологической активности, осуществляемой посредством множества изатин-связывающих белков. Подобно классическому противопаркинсоническому препарату L-депренилу, он ингибирует *in vivo* только моноаминоксидазу (МАО) типа В. Разработанный в НИИ фармакологии им. В.В. Закусова анксиолитик афобазол, являясь обратимым ингибитором МАО А, не действует на МАО В. Курсовое введение ротенона (7 дней) вызывало у крыс нарушения локомоторных функций, сохраняющиеся и через 5 дней после завершения курса нейротоксина. Однократное введение животным изатина перед последним введением ротенона, как и семидневное введение афобазола совместно с ротеноном, оказывало нейропротекторный эффект, при этом несколько по-разному влияя на различные поведенческие реакции. Введение нейротоксина и обоих нейропротекторов влияло на профиль и относительное содержание изатин-связывающих белков мозга. Данные протеомного исследования для изатин-связывающих белков различались как в случае белков, выявленных сразу после завершения курсового введения ротенона и через 5 дней после завершения курса, так и в случае белков, выявленных при введении различных нейропротекторов (изатина и афобазола). При этом практически все изатин-связывающие белки, относительное содержание которых изменялось в той или иной степени, ассоциированы с нейродегенерацией (многие – с болезнями Паркинсона и Альцгеймера).

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект No 23-25-00066).*

**NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF ISATIN AND AFOBAZOLE IN THE RAT ROTENONE MODEL OF PARKINSONISM**

**O.A. Buneeva<sup>1</sup>, I.G. Kapitsa<sup>1,2</sup>, V.G. Zgoda<sup>1</sup>, A.E. Medvedev<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Chemistry; <sup>2</sup>Zakusov Institute of Pharmacology, Moscow

Parkinsonism caused by administration of rotenone pesticide to rats is one of the most adequate models of Parkinson's disease (PD). An endogenous neuroprotector isatin (indole-2,3) is characterized by a wide range of biological activity carried on by numerous isatin-binding proteins. Isatin, like a classic antiparkinsonian drug L-deprenyl, inhibits *in vivo* only monoamine oxidase (MAO) B. Elaborated in Zakusov Institute of Pharmacology anxiolytic afobazole, which is reversible inhibitor of MAO A, does not affect MAO B. Treatment of rats with rotenone for 7 days caused pathological changes in the locomotor functions remaining after 5 days after the completion of the course of treatment. A single dose of isatin to animals before the last introduction of rotenone, like the seven-day administration of afobazole with rotenone, caused neuroprotective effect, affecting different behavioral responses in slightly different ways. Administration of neurotoxin and both neuroprotectors influenced the profile and relative content of brain isatin-binding proteins. The proteomic data of isatin-binding proteins differed both in the case of the proteins identified immediately after the administration of rotenone for 7 days and 5 days after the completion of the course of treatment, and in the case of the proteins identified by the injection of different neuroprotectors (isatin and afobazole). Almost all isatin-binding proteins, which relative contents changed to varying degrees, are associated with neurodegeneration (many of them with Parkinson's and Alzheimer's diseases).

*This work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 23-25-00066).*



## СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ЖЕЛАТИНА ИЗ РАЗНЫХ ПРИРОДНЫХ ИСТОЧНИКОВ

Ю.Ф. Зуев, С.Р. Деркач, Ю.А. Кучина, И.А. Седов

*Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия*

Желатин представляет собой полипептидные фрагменты фибриллярного белка коллагена - основы соединительной ткани животных организмов. Основная функция желатина гелеобразование, широко используемое в медицине, фармацевтической, косметической и пищевой промышленности. Аминокислотный состав желатина очень близок к коллагену, полипептидные цепи которого состоят из аминокислотных триад Gly-X-Y и примерно 50–60% из них содержат Pro(X) и Hyp(Y), которые отвечают за стабилизацию тройных спиралей водородными связями. Наряду с аминокислотным составом на свойства гелей влияют масса и молекулярно-массовое распределение биополимеров. Важным фактором, определяющим гелеобразование желатина, является температура, поскольку при понижении температуры происходит частичное восстановление тройных коллагеноподобных спиралей, действующих как зоны контактов и стабилизации пространственной сетки геля. Основной целью работы была характеристика структуры и функциональных свойств лабораторного рыбного желатина из кожи трески в сравнении с известными коммерческими желатинами рыб и млекопитающих. Желатины охарактеризованы по аминокислотному составу, молекулярно-массовому распределению и вторичной структуре полипептидных цепей в гелях (ИК-спектроскопия). Исследование базируется на сочетании расширенного набора взаимодополняющих физико-химических методов для изучения сходства и различия гидрогелей из традиционных и новых источников желатина. В данной работе мы сравнили морфологию (СЭМ), супрамолекулярную структуру (ЯМР, диэлектрическая спектроскопия, калориметрия) и коллоидные (реология) свойства двух коммерческих желатинов с желатином, полученным нами из кожи холодноводной трески в лабораторных условиях. Полученные результаты показали, что по таким параметрам, как термостабильность и прочность структурной сетки при изменении температуры, полученный нами рыбный желатин значительно ближе к желатину млекопитающих. Желатин, экстрагированный из кожи трески, образует гидрогели, схожие по своим основным характеристикам (прочность, модуль упругости, точке плавления и скорости гелеобразования) с желатином из млекопитающих и значительно превосходит коммерческий желатин из холодноводных рыб.

*Работа поддержана грантом РФФ 23-64-10020.*

## COMPARATIVE STUDY OF STRUCTURE AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF GELATIN FROM DIFFERENT NATURAL SOURCES

Yu.F. Zuev, S.R. Derkach, Yu.A. Kuchina, I.A. Sedov

*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS, Kazan*

Gelatin is a polypeptide fragment of fibrillar protein collagen, the basis of connective tissue of animal organisms. The main function of gelatin is gelation, widely used in medicine, pharmaceutical, cosmetic and food industries. The amino acid composition of gelatin is very close to collagen, the polypeptide chains of which consist of amino acid triads Gly-X-Y and approximately 50–60% of them contain Pro(X) and Hyp(Y), which are responsible for stabilizing of triple helices with hydrogen bonds. Along with amino acid composition, the properties of gels are influenced by molecular weight and weight distribution of biopolymers. An important factor determining the gelation of gelatin is temperature, since when temperature decreases, a partial recovery of triple collagen-like helices occurs, acting as contact zones stabilizing gel spatial network. The main goal of present study was to characterize the structure and functional properties of laboratory fish gelatin from cod skin in comparison with known commercial gelatins from fish and mammals. Gelatins were characterized by amino acid composition, molecular weight distribution and secondary structure of polypeptide chains in gels (IR spectroscopy). The research was based on the combination of expanded set of complementary physicochemical methods to study similarities and differences of hydrogels from traditional and new gelatin sources. In this work we compared the morphology (SEM), supramolecular structure (NMR, dielectric spectroscopy, calorimetry) and colloidal (rheology) properties of two commercial gelatins with the gelatin we obtained from the skin of cold-water cod under laboratory conditions. The results obtained have shown that in terms of parameters such as thermal stability and strength of structural network when changing temperature, our fish gelatin is much closer to mammalian gelatin. Gelatin extracted from cod skin forms hydrogels similar in their basic characteristics (strength, elastic modulus, melting point and gelation rate) to gelatin from mammals and is significantly superior to commercial gelatin from cold-water fish.

*The work was supported by the Russian Science Foundation grant 23-64-10020.*

## ИССЛЕДОВАНИЕ ИНТЕРАКТОМА СПЛАЙСИНГОВОГО ФАКТОРА SYNCRIP ПОД ВЛИЯНИЕМ ЦИСПЛАТИНА И ЕГО РОЛИ В УСЛОВИЯХ ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКА

**Л.К. Арзумян, О.М. Иванова, П.В. Шнайдер, М.М. Лукина, Г.П. Арапиди, В.О. Шендер**

*ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва*

Химиорезистентность является одной из главных проблем в лечении рака яичников, так как может привести к ограничению эффективности химиотерапевтических препаратов и возникновению рецидивов. Ранее нашей группой было показано, что погибающие под действием терапии опухолевые клетки могут секретировать во внеклеточное пространство сплайсосомные белки, что приводит к возникновению более агрессивного и устойчивого к химиотерапии фенотипа у реципиентных опухолевых клеток. Для исследования возможной роли сплайсосомных белков, секретируемых погибающими опухолевыми клетками, в формировании химиорезистентности был выбран белок SYNCRIP на основе проведенного ранее биоинформатического анализа.

Нами было показано, что сверхэкспрессия SYNCRIP повышает пролиферацию опухолевых клеток SKOV3 и их устойчивость к цисплатину. Сверхэкспрессия SYNCRIP индуцирует в клетках SKOV3 более длительное пребывание в G1-фазе клеточного цикла под действием цисплатина. Чтобы выяснить, как изменяются белки партнеры SYNCRIP под действием цисплатина, было проведено два типа иммунопреципитации этого белка из опухолевых клеток со сверхэкспрессией SYNCRIP с последующим масс-спектрометрическим анализом.

Нами было идентифицировано 203 белка-партнёра SYNCRIP, которые связываются с ним при обычных условиях и 49 белков-партнёров SYNCRIP, которые связываются с ним под действием цисплатина. Мы выяснили, что под действием цисплатина SYNCRIP усиливает связь с белками ДНК-репарации (MSH2, PAWR) и регуляции клеточного цикла (RFC5). При этом, теряется связь с хеликазой DHX9, которая отвечает за активацию иммунного ответа на чужеродную РНК в цитоплазме и способствует разрешению R-петель в ядре. Мы предположили, что SYNCRIP может предотвращать образование R-петель на хроматине в комплексе TDRD3/Top3b в тандеме с DHX9, что снижает репликативный стресс в клетках.

Полученные данные демонстрируют, что повышенная представленность сплайсосомного белка SYNCRIP помогает клеткам лучше справляться с терапевтическим стрессом.

*Работа поддержана грантом 075-15-2019-1669 Министерства науки и высшего образования РФ.*

## INTERACTOME RESEARCH OF THE SPLICING FACTOR SYNCRIP UNDER THE CISPLATIN AND ITS ROLE IN CONDITIONS OF CHEMORESISTANCE OF OVARIAN ADENOCARCINOMA

**L.K. Arzumanyan, O.M. Ivanova, P.V. Schneider, M.M. Lukina, G.P. Arapidi, V.O. Shender**

*Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow*

Chemoresistance is one of the main problems in the treatment of ovarian cancer, as it can lead to limited effectiveness of chemotherapy drugs and the occurrence of relapses. Previously, our group showed that dying tumor cells can secrete spliceosomal proteins into the extracellular space under the influence of therapy, which leads to the emergence of a more aggressive and chemotherapy-resistant phenotype in recipient tumor cells. To study the possible role of spliceosomal proteins secreted by dying tumor cells in the formation of chemoresistance, the SYNCRIP protein was selected based on a previously performed bioinformatics analysis.

We have shown that overexpression of SYNCRIP increases the proliferation of SKOV3 tumor cells and their resistance to cisplatin. Overexpression of SYNCRIP induces a longer stay in the G1 phase of the cell cycle in SKOV3 cells under the influence of cisplatin. To find out how SYNCRIP partner proteins change under the influence of cisplatin, two types of immunoprecipitation of this protein from tumor cells overexpressing SYNCRIP were carried out, followed by mass spectrometric analysis. We have identified 203 SYNCRIP partner proteins that bind to it under normal conditions and 49 SYNCRIP partner proteins that bind to it under the influence of cisplatin.

We found that under the influence of cisplatin, SYNCRIP enhances representation of proteins associated with DNA repair proteins (MSH2, PAWR) and cell cycle regulation (RFC5). In this case, the connection with the DHX9 helicase, which is responsible for activating the immune response to foreign RNA in the cytoplasm and promotes the resolution of R-loops in the nucleus, is lost. We hypothesized that SYNCRIP may prevent R-loop formation on chromatin in the TDRD3/Top3b complex in tandem with DHX9, thereby reducing replication stress in cells.

This findings show that increased abundance of the spliceosomal protein SYNCRIP can help to resist therapeutic stress.

*Work in custody Grant 15-075-2019-1669 of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.*

**C9Orf72 G4 ПРЕПЯТСТВУЕТ ОБРАЗОВАНИЮ ФИБРИЛЛ МУТАНТНОГО HNRNP A1 И НАРУШАЕТ РАЗДЕЛЕНИЕ ФАЗ HNRNP A1 С SRSF IN VITRO**

**Ю. Павлова, Т. Ведехина, Ю. Светлова, Н. Баринов, С. Алиева, Е. Малахова, П. Рубцов, А. Шторк, Д. Клинов, А. Варижук**

*ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва*

Аномальные внутриклеточные фазовые переходы мутантного hnRNP A1 лежат в основе развития ряда нейродегенеративных заболеваний. Риск этих заболеваний увеличивается при экспансии повторов в локусе C9Orf72 и накоплении соответствующей G4-РНК, однако связь между этой РНК и нарушением гомеостаза hnRNP A1 до конца не изучена. Нашей целью было прояснить действие C9Orf72 G4 на фазовые переходы hnRNP A1 in vitro. Используя различные оптические методы и атомно-силовую микроскопию, мы исследовали влияние G4-РНК на образование кросс-бета фибрилл мутантного прионоподобного домена (prion-like domain, PLD) hnRNP A1 и на разделение фаз немутантного hnRNP A1 и SR-богатого фрагмента факторов сплайсинга (SRSF), который управляет сборкой ядерных спеклов. Было показано, что G4 ограничивает образование фибрилл PLD hnRNP A1, предположительно посредством взаимодействия с RGG-мотивом, фланкирующим PLD. В то же время G4 нарушает разделение фаз hnRNP A1 с SRSF, что указывает на его возможный вклад в патологию посредством дисрегуляции сплайсинга.

*Работа выполнена при поддержке ГЗ «Шанерон» 17.002.24.800.*

**C9Orf72 G4 INHIBITS FIBRILLATION OF MUTANT HNRNP A1 AND CO-SEPARATION OF NON-MUTANT HNRNP A1 WITH SRSF IN VITRO**

**Iu. Pavlova, T. Vedekhina, Ju. Svetlova, N. Barinov, S. Alieva, E. Malakhova, P. Rubtsov, A. Shtork, D. Klinov, A. Varizhuk**

*Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow*

Abnormal intracellular phase transitions of mutant hnRNP A1 may underlie the development of several neurodegenerative diseases. The risk of these diseases is increased upon C9Orf72 repeat expansion and the accumulation of the corresponding G-quadruplex (G4)-forming RNA, but the link between this RNA and the disruption of hnRNP A1 homeostasis has not been fully explored so far. Our aim was to clarify the mutual effects of hnRNP A1 and C9Orf72 G4 in vitro. Using various optical methods and atomic force microscopy, we investigated the influence of the G4 on the formation of cross-beta fibrils by the mutant prion-like domain (PLD) of hnRNP A1 and on the co-separation of the non-mutant protein with a typical SR-rich fragment of a splicing factor (SRSF), which normally drives the assembly of nuclear speckles. The G4 was shown to restrict the fibrillation of the hnRNP A1 PLD, presumably through interactions with for the PLD-flanking RGG motif. At the same time, the G4 was shown to disrupt hnRNP A1 co-separation with SRSF, suggesting its possible contribution to pathology through splicing dysregulation.

*This research was supported by the State Assignment [Code: "Chaperone", 17.002.24.800, Russia].*

## НАРУШЕНИЯ МОРФОЛОГИИ И ФУНКЦИИ ЯДЕРНЫХ СПЕКЛОВ ПРИ АЦИДОЗЕ

**П.В. Рубцов, А.С. Шторк, А.В. Сурдина, А.М. Варижук**

*ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА, Москва*

Ядерные спеклы — это немембранные органеллы, содержащие SR-богатые факторы сплайсинга (SRSF), которые формируются через механизм разделения фаз "жидкость-жидкость" (LLPS). Они регулируют альтернативный сплайсинг, контролируя доступность и активность SRSF. В нормальных условиях спеклы представляют собой рыхлые образования, но при онкогенезе и ацидозе их морфология может изменяться. Прямые доказательства pH-чувствительности спеклов ранее не были представлены, хотя это важно для понимания патологических процессов в раковых клетках. Цель исследования — проверить pH-зависимость спеклов и секвестирование SRSF при ацидозе. Изменения морфологии спеклов отслеживались на клеточных линиях, зафиксированных в G2-фазе с помощью ингибитора CDK1 RO-3306. Закисление нуклеоплазмы подтверждалось оптическим pH-сенсором. Морфология спеклов оценивалась методом флуоресцентной микроскопии. Установлено, что слабокислая среда вызывает уплотнение спеклов, указывая на более эффективное LLPS, действуя аналогично дефосфорилированию SRSF. Предполагается, что уплотнение спеклов обусловлено протонированием остатков фосфосерина (pKa 6.5), что влияет на заряд SRSF. Для проверки этого механизма использовались синтетические пептиды — фрагменты SRSF и РНК смешанного состава. Набор включал фосфорилированный вариант, мутантный с заменами S/E и дефосфорилированный вариант. Методами турбидиметрии и микроскопии исследовали LLPS в растворах пептидов при различных pH. Установлено, что закисление до pH 6 стимулирует LLPS в системе с фосфорилированным пептидом. Дефосфорилирование оказывает аналогичный эффект. Протонирование остатков фосфосерина при ацидозе стимулирует LLPS, что ведет к уплотнению спеклов. Секвестирование SRSF в уплотненных спеклах вероятно вызывает нарушения сплайсинга.

*Исследование выполнено при поддержке РФФ [22-15-00129].*

## MORPHOLOGY AND FUNCTION DISORDERS OF NUCLEAR SPECKLES IN ACIDOSIS

**P.V. Rubtsov, A.S. Shtork, A.V. Surdina, A.M. Varizhuk**

*Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency, Moscow*

Nuclear speckles are non-membrane organelles containing SR-rich splicing factors (SRSFs) that are formed through a liquid-liquid phase separation (LLPS) mechanism. They regulate alternative splicing by controlling the accessibility and activity of SRSFs. Under normal conditions, speckles are loose formations, but their morphology can change during oncogenesis and acidosis. Direct evidence for the pH-sensitivity of speckles has not been previously reported, although it is important for understanding pathologic processes in cancer cells. The aim of this study was to verify the pH-dependence of speckles and the sequestration of SRSF under acidosis. Changes in speckle morphology were monitored on cell lines fixed in G2-phase using the CDK1 inhibitor RO-3306. Acidification of nucleoplasm was confirmed by an optical pH sensor. Speckle morphology was evaluated by fluorescence microscopy. It was found that a slightly acidic environment causes speckle compaction, indicating a more efficient LLPS, acting similarly to SRSF dephosphorylation. It is suggested that speckle compaction is caused by protonation of phosphoserine residues (pKa 6.5), which affects the charge of SRSF. Synthetic SRSF fragments and random RNA were used to test this mechanism. A phosphorylated variant, a mutant variant with S/E substitutions, and a dephosphorylated variant were tested. LLPS in peptide solutions at different pHs were examined by turbidimetry and microscopy methods. Acidification to pH 6 was found to stimulate LLPS in the system with the phosphorylated peptide. Dephosphorylation has a similar effect. Protonation of phosphoserine residues under acidosis stimulates LLPS, leading to speckle compaction. Sequestration of SRSF in compacted speckles likely causes splicing dysregulation.

*The study was supported by RSF [22-15-00129]*

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АРХИТЕКТУРНЫХ БЕЛКОВ *DROSOPHILA MELANOGASTER* С ХРОМАТИНОМ НА РАЗЛИЧНЫХ ЭТАПАХ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

Г. Саллум<sup>1,2</sup>, К.С. Кудряшова<sup>1</sup>, О.Г. Максименко<sup>1</sup>, П.Г. Георгиев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии гена РАН, Москва; <sup>2</sup>Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный

Транскрипционные факторы (ТФ) — это белки, участвующие в регуляции транскрипции путем связывания с хроматином. Существует понятие *Mitotic bookmarking*, процесс связывания и удержания ТФ на хроматине во время митоза, когда большинство ДНК-взаимодействующих белков диссоциирует. Это явление играет важную функциональную роль, поскольку ТФ, остающиеся на хроматине в ходе митоза, служат "закладками", которые отмечают участки ДНК, где транскрипция должна быстро возобновиться после завершения митоза.

Среди ТФ важную роль в организации хроматина играют архитектурные белки (АБ), способные напрямую при помощи цинковых пальцев С2Н2-типа связываться с ДНК. АБ определяют работу многих регуляторных элементов генома, организуют дистанционные контакты между ними. Поэтому интересна потенциальная способность АБ оставаться в связанном с хроматином состоянии в процессе митоза. В работе были исследованы такие белки дрозофилы (Pita, dCTCF, M1BP и CP190). С помощью иммуноокрашивания эмбрионов дрозофилы было изучено распределение белков в ядрах. CP190 локализуется в центросомах и частично в матрике веретена деления, но не митотических хромосомах, что соответствует ранее опубликованным данным. В то же время для белков Pita, dCTCF и M1BP впервые методами микроскопии показана их связь с хромосомами во время митоза. Кроме этого, Pita и dCTCF, но не M1BP, локализуются в центросомных областях, возможно, за счет их прямого взаимодействия с CP190.

В работе также были исследованы трансгенные линии дрозофилы, в которых Pita, dCTCF и M1BP экспрессировались под контролем промотора гена убиквитина. Обнаружено, что при гиперэкспрессии изучаемые ТФ склонны к образованию ядерных агрегатов различного размера. Предполагается, что образование агрегатов ТФ при гиперэкспрессии отражает нативную склонность белков к мультимеризации и может свидетельствовать о наличии депо ТФ в ядре, которое может эффективно использоваться в процессе митозов. Для Pita и dCTCF способность образовывать агрегаты и сохраняться на митотических хромосомах была подтверждена при помощи прижизненной конфокальной микроскопии на трансгенных линиях дрозофилы, экспрессирующих Pita и dCTCF, тагированные флуоресцентными белками mCherry и eGFP.

*Работа выполнена за счет средств грантов Миннауки РФ № 075-15-2019-1661 и РФФИ № 19-74-30026-П.*

## THE STUDY OF THE ARCHITECTURAL PROTEINS' INTERACTION WITH CHROMATIN AT VARIOUS STAGES OF THE CELL CYCLE IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Gh. Salloum<sup>1,2</sup>, K.S. Kudryashova<sup>1</sup>, O.G. Maximenko<sup>1</sup>, P.G. Georgiev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow; <sup>2</sup>Moscow Institute for Physics and Technology, Dolgoprudny

Transcription factors (TFs) are proteins that regulate transcription by binding to chromatin. During mitosis, most DNA-binding proteins dissociate, but some TFs remain attached to chromatin in a process called mitotic bookmarking. This allows them to act as "bookmarks," marking key DNA regions where transcription must quickly resume after mitosis ends, ensuring efficient reactivation of gene expression. Among TFs, architectural proteins (APs) play a key role in chromatin organization by directly binding to DNA via C2H2-type zinc fingers. APs regulate genomic elements and facilitate long-distance interactions between them. Therefore, their potential ability to remain chromatin-bound during mitosis is intriguing. This study examined *Drosophila* proteins such as Pita, dCTCF, M1BP, and CP190. Immunostaining of *Drosophila* embryos was used to study the distribution of proteins in nuclei. CP190 localizes to centrosomes and partially to the spindle matrix but not to mitotic chromosomes, consistent with previous data. In contrast, microscopy revealed for the first time that Pita, dCTCF, and M1BP associate with chromosomes during mitosis. Additionally, Pita and dCTCF, but not M1BP, localize to centrosomal areas, possibly due to their direct interaction with CP190. The study also examined transgenic *Drosophila* lines where Pita, dCTCF, and M1BP were expressed under the control of the ubiquitin gene promoter. It was found that hyperexpression of these transcription factors leads to the formation of nuclear aggregates of varying sizes. This suggests that aggregate formation may reflect the proteins' native tendency for multimerization and may indicate the presence of TF depots in the nucleus, potentially utilized during mitosis.

The ability of Pita and dCTCF to form aggregates and remain on mitotic chromosomes was confirmed using live confocal microscopy on transgenic *Drosophila* lines expressing Pita and dCTCF tagged with mCherry and eGFP fluorescent proteins.

*The work was funded by grants from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (No. 075-15-2019-1661) and the Russian Science Foundation (No. 19-74-30026-P).*

### ФОТОИНДУЦИРОВАННЫЙ ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНЫЙ ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНА В КОНЬЮГАТЕ ТЕТРАПЕПТИД/БЕНЗОФЕНОН HIS-GLN(BP)-TYR-GLY ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ВНЕШНЕГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ

Н.Н. Фишман, О.Б. Морозова, И.В. Жуков, А.В. Юрковская

*Международный томографический центр СО РАН, Новосибирск*

В работе изучается влияние внешних магнитных полей на фотоиндуцированный внутримолекулярный перенос электронов в конъюгате тетрапептид/бензофенон, в частности His-Gln(BP)-Tyr-Gly, где 4-аминобензофенон действует как акцептор электронов, а His или Tyr являются донорами электронов. Изучение конъюгатов пептид/фотосенсибилизатор важно, поскольку они служат биомиметическими моделями, которые имитируют ключевые аспекты переноса электронов в белках и ферментах. Использование таких конъюгатов позволяет контролировать исследование таких факторов, как расстояние донор-акцептор, аминокислотные последовательности и влияние магнитных полей, предоставляя ценные модельные данные, имеющие отношение к биологическим системам. В результате работы было показано, что эволюция состояния с разделенными зарядами в конъюгате пептида существенно зависит от внешнего магнитного поля, которое влияет на квантовый выход фотореакции, изменяя скорости рекомбинации синглетного и триплетного состояний. Для изучения этих эффектов мы использовали разрешенную во времени и зависящую от поля химическую поляризацию ядер (ХПЯ) – высокочувствительный метод обнаружения короткоживущих радикальных промежуточных соединений. ХПЯ позволяет наблюдать ядерную спиновую поляризацию, возникающую в результате рекомбинации спин-коррелированных радикальных пар, предоставляя детальное представление о магнитных взаимодействиях и кинетике реакции, которые в противном случае было бы сложно зафиксировать с помощью обычных спектроскопических методов. В результате работы были получены доказательства образования короткоживущих бирадикалов с различной реакционной способностью в зависимости от pH, что подчеркивает роль протонированных состояний и расстояний между радикальными центрами. Также была получена информация о механизмах реакции при сравнении данных ХПЯ для конъюгата с данными, полученными для эталонного тетрапептида без бензофеноновой группы, тем самым было продемонстрировано различие при влиянии магнитного поля на внутримолекулярные и межмолекулярные процессы переноса электронов.

*Исследование было поддержано грантом РФФ № 23-73-10103.*

### PHOTOINDUCED INTRAMOLECULAR ELECTRON TRANSFER IN A TETRAPEPTIDE/BENZOPHENONE CONJUGATE His-Gln(BP)-Tyr-Gly DRIVEN BY AN EXTERNAL MAGNETIC FIELD

N.N. Fishman, O.B. Morozova, I.V. Zhukov, A.V. Yurkovskaya

*International Tomography Center, Novosibirsk*

This study investigates the influence of external magnetic fields on photoinduced intramolecular electron transfer (PET) in a tetrapeptide/benzophenone conjugate, specifically His-Gln(BP)-Tyr-Gly, where 4-aminobenzophenone acts as an electron acceptor, and His or Tyr act as electron donors. Studying peptide/photosensitizer conjugates is important because they serve as biomimetic models that mimic key aspects of electron transfer in proteins and enzymes. These conjugates allow for controlled exploration of factors such as donor-acceptor distances, amino acid sequences, and the role of magnetic fields, providing valuable mechanistic insights relevant to biological systems. We demonstrate that the charge separation state evolution in our peptide conjugate is significantly affected by magnetic field interactions, which influence the quantum yield of the photoreaction by altering the rates of singlet and triplet state recombination. To study these effects, we employed time-resolved and field-dependent chemically induced dynamic nuclear polarization (CIDNP), a highly sensitive technique for detecting short-lived radical intermediates. CIDNP allows the observation of nuclear spin polarization resulting in the recombination of spin-correlated radical pairs, providing detailed insights into the magnetic interactions and reaction kinetics that are otherwise challenging to capture with conventional spectroscopic methods. Our results reveal the formation of short-lived biradicals with distinct reactivities depending on pH, highlighting the roles of protonation states and radical center distances. We provide insights into the underlying mechanisms by comparing the behavior of the conjugate with a reference tetrapeptide without the benzophenone moiety, demonstrating the distinct magnetic influences on intramolecular versus intermolecular electron transfer processes. These findings contribute to a deeper understanding of PET dynamics in biomimetic systems and underscore the potential of magnetic fields to modulate electron transfer in biological and synthetic systems.

*This work was supported by the Russian Science Foundation (project #23-73-10103).*

## К МЕХАНИЗМУ ДЕЙСТВИЯ НЕЙРОПЕПТИДА ЦИКЛО-L-ПРОЛИЛГЛИЦИНА

К.Н. Колясникова, А.Г. Аляева, Т.А. Гудашева, В.Л. Дорофеев

*ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий*

Цикло-L-пролилглицин (ЦПГ) – циклический дипептид, сконструированный и синтезированный как топологический аналог пирacetам на основании оригинальной гипотезы о пептидергическом механизме действия этого препарата (Гудашева и др., 1989), а в дальнейшем идентифицированный как эндогенное соединение в головном мозге грызунов (Gudasheva et al., 1996). Спектр фармакологических эффектов ЦПГ включает не только ноотропную, но и другие характерные для пирacetам виды активности. Недавно нами было показано, что фармакологические эффекты ЦПГ обусловлены стимуляцией BDNF/TrkB сигналинга вследствие активации AMPA-рецепторов (Гудашева и др., 2016). Данное исследование посвящено доказательству вовлеченности глутаматных AMPA-рецепторов и BDNF/TrkB системы в реализацию эффектов ЦПГ.

Ингибиторный фармакологический анализ проводили с использованием блокаторов AMPA-рецепторов DNQX и GYKI 52466, а также антагониста Trk-рецепторов K252A. Вовлеченность AMPA- и Trk-рецепторов в проявление анксиолитической активности изучали в тесте приподнятого крестообразного лабиринта, а в проявление антигипоксической – в тесте нормобарической гипоксии с гиперкапнией на мышцах BALB/c. Вовлеченность AMPA- и Trk-рецепторов в проявление нейропротекторной активности изучали на клеточной культуре линии HT-22 в условиях окислительного стресса.

Показано, что и блокатор AMPA-рецепторов DNQX (10 мг/кг в/б), и блокатор Trk K-252A (25 мг/кг в/б), введенные совместно с ЦПГ (1 мг/кг в/б), препятствовали проявлению его анксиолитической активности. Введение блокатора AMPA-рецепторов (DNQX или GYKI 52466) в дозе 10 мг/кг в/б совместно с ЦПГ (1 мг/кг в/б), также как и блокатора Trk, K-252A (25 мг/кг в/б), препятствовало проявлению его антигипоксического действия. Показано, что внесение H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,5 мМ) снижало жизнеспособность клеток по сравнению с контролем. ЦПГ (10<sup>-6</sup> М) достоверно восстанавливал жизнеспособность клеток. Внесение как K-252A (0,4 мкМ), так и DNQX (20 мкМ) или GYKI 52466 (100 мкМ) совместно с ЦПГ полностью устраняло его нейропротекторное действие.

Результаты данного исследования демонстрируют вовлеченность AMPA- и TrkB- рецепторов в фармакодинамические механизмы анксиолитического, антигипоксического и нейропротекторного действия нейропептида цикло-пролилглицина.

## ON THE MECHANISM OF ACTION OF THE NEUROPEPTIDE CYCLO-L-PROLYLGLYCINE

K.N. Koliashnikova, A.G. Alyaeva, T.A. Gudasheva, V.L. Dorofeev

*Federal State Budgetary Scientific Institution "Federal Research Center For Innovator And Emerging Biomedical And Pharmaceutical Technologies"*

Cyclo-L-prolyl glycine (CPG) is a cyclic dipeptide designed and synthesized as a topological analogue of piracetam based on the original hypothesis of the peptidergic mechanism of action of this drug (Gudasheva et al., 1989), and later identified as an endogenous compound in the rodent brain (Gudasheva et al., 1996). The spectrum of pharmacological effects of CPG includes not only nootropic, but also other types of activity characteristic of piracetam. We have recently shown that the pharmacological effects of CPG are due to the stimulation of BDNF/TrkB signaling due to the activation of AMPA receptors (Gudasheva et al., 2016).

This study is devoted to proving the involvement of glutamate AMPA receptors and the BDNF/TrkB system in the implementation of the effects of CPG. Inhibitory pharmacological analysis was performed using AMPA receptor blockers DNQX and GYKI 52466, as well as Trk receptor antagonist K252A. The involvement of AMPA and Trk receptors in the manifestation of anxiolytic activity was studied in the elevated plus maze test, and in the manifestation of antihypoxic activity – in the normobaric hypoxia test with hypercapnia on BALB/c mice. The involvement of AMPA and Trk receptors in the manifestation of neuroprotective activity was studied on the HT-22 cell culture under oxidative stress.

It was shown that both the AMPA receptor blocker DNQX (10 mg/kg i.p.) and the Trk blocker K-252A (25 mg/kg i.p.), administered together with CPG (1 mg/kg i.p.), prevented the manifestation of its anxiolytic activity. Administration of the AMPA receptor blocker (DNQX or GYKI 52466) at a dose of 10 mg/kg i.p. together with CPG (1 mg/kg i.p.), as well as the Trk blocker, K-252A (25 mg/kg i.p.), prevented the manifestation of its antihypoxic effect. It was shown that the introduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.5 mM) decreased cell viability compared to the control. CPG (10<sup>-6</sup> M) reliably restored cell viability. The introduction of both K-252A (0.4 μM) and DNQX (20 μM) or GYKI 52466 (100 μM) together with CPG completely eliminated its neuroprotective effect.

The results of this study demonstrate the involvement of AMPA and TrkB receptors in the pharmacodynamic mechanisms of the anxiolytic, antihypoxic and neuroprotective effects of the neuropeptide cycloprolyl glycine.

## ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ГЕНА ПРОТЕАЗЫ S НА ИНСЕКТОТОКСИЧНОСТЬ БАКТЕРИИ *PHOTORHABDUS LAUMONDII*

М.А. Карасева, А.О. Светлова, И.В. Демидюк

НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Протеаза S (PrtS) из энтомопатогенной бактерии *Photorhabdus laumondii* относится к группе протеализинподобных протеаз (ППП). Эти ферменты широко распространены у бактерий, встречаются у архей и грибов, однако биологические функции ППП неясны. Считается, что ППП вовлечены во взаимодействие микроорганизмов с животными и растениями. Так, показано, что индивидуальная PrtS обладает инсектотоксичностью, вызывает меланизацию у насекомых и *in vitro* способна гидролизовать белки гемолимфы, в том числе участвующие в иммунном ответе. Поэтому PrtS рассматривается как фактор патогенности *P. laumondii*, при этом вклад протеазы в бактериальную инфекцию не изучен.

Целью данной работы была оценка *in vivo* вклада PrtS в инсектотоксичность *P. laumondii* spp. *laumondii* TT01 (WT) при инфекции насекомых. Нами были получены бактерии с делецией генов протеазы *prtS* и ее эндогенного ингибитора *phin* ( $\Delta$ *prtS*+*phin*) или только ингибитора ( $\Delta$ *phin*), а также вариант с комплементацией двойного нокаута (C). Инсектотоксичность полученных вариантов бактерий была проанализирована на модели личинок большой восковой моли *Galleria mellonella*. Все варианты демонстрировали высокую инсектотоксичность – через 30 ч после введения бактерий погибало 100% насекомых. Однако в случае  $\Delta$ *prtS*+*phin* гибель половины животных происходила на 1,5 ч позже (к 26 ч) по сравнению с WT и  $\Delta$ *phin* (24.5 ч). В то же время анализ действия культуральной среды (КС) бактерий на *G. mellonella* показал, что делеция *prtS* привела к значительному увеличению ее инсектотоксичности. Так, через 72 ч после введения КС, смертность личинок составила 80% для  $\Delta$ *prtS*+*phin*, по сравнению с 20% для WT, C и  $\Delta$ *phin*. Обработка КС  $\Delta$ *prtS*+*phin* активной рекомбинантной PrtS снизила ее инсектотоксичность до уровня КС WT. Поскольку PrtS является основным белком секрета *P. laumondii* (~20% по массе), можно предположить, что наблюдаемый эффект связан с действием активной PrtS на неизвестные пока внеклеточные белки.

Таким образом, PrtS не оказывает значительного влияния на гибель насекомых при инфекции *P. laumondii*. В то же время впервые показано, что PrtS влияет на инсектотоксичность культуральной среды бактерии. Этот эффект может быть важен на ранних стадиях инфекции и, вероятно, влияет на динамику ее развития.

Работа выполнена в рамках проекта РФФ № 24-24-00122.

## EFFECT OF PROTEASE S GENE KNOCKOUT ON THE INSECTOTOXICITY OF THE BACTERIUM *PHOTORHABDUS LAUMONDII*

М.А. Karaseva, A.O. Svetlova, I.V. Demidyuk

NRC "Kurchatov Institute", Moscow

Protease S (PrtS) from the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus laumondii* belongs to the group of protealysin-like proteases (PLP). PLP are widely spread in bacteria, but the biological functions of PLP are unclear. It is believed that PLPs are involved in the interaction of microorganisms with animals and plants. It has been shown that PrtS exhibits toxicity to insects, causes melanization and is capable of hydrolyzing hemolymph proteins *in vitro*, including those involved in the immune response. Therefore, PrtS is considered a pathogenicity factor for *P. laumondii*, while the contribution of the protease to bacterial infection has not been studied.

The aim of this work was to evaluate *in vivo* the contribution of PrtS to the insectotoxicity of *P. laumondii* spp. *laumondii* TT01 (WT) during insect infection. We obtained bacteria with a deletion of the genes *prtS* and its endogenous inhibitor *phin* ( $\Delta$ *prtS*+*phin*) or only the *phin* ( $\Delta$ *phin*), as well as a variant with double knockout complementation (C). The insectotoxicity (IT) of the bacterial variants was analyzed using the model of the greater wax moth larvae *Galleria mellonella*. All variants demonstrated high IT. However, in the case of  $\Delta$ *prtS*+*phin*, the death of half of the animals occurred by 26 h compared to 24.5 h for WT and  $\Delta$ *phin*. At the same time, the analysis of the effect of the bacterial culture medium (CM) on *G. mellonella* showed that the *prtS* deletion led to a significant increase in its IT. Thus, 72 h after the introduction of CM, the mortality of larvae was 80% for  $\Delta$ *prtS*+*phin*, compared to 20% for WT, C and  $\Delta$ *phin*. Treatment of CM  $\Delta$ *prtS*+*phin* with active recombinant PrtS reduced its IT to the level of WT CM. Since PrtS is the main protein of the *P. laumondii* secretome (~20% by weight), it can be assumed that the observed effect is associated with the action of active PrtS on extracellular proteins.

Thus, PrtS does not have a significant effect on the death of insects during *P. laumondii* infection. At the same time, it has been shown for the first time that PrtS affects the IT of the bacterial culture medium. This effect may be important in the early stages of infection and probably affects the dynamics of its development.

The work was carried out within the framework of the RFS project No. 24-24-00122.



## КОНДЕНСАТЫ НА ОСНОВЕ АТФ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ ДЛЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ДОСТАВКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Т.С. Ведехина, С.Э. Алиева, В.С. Ануфриев, А.М. Варижук

ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА; РТУ МИРЭА, Москва

Разработка подходов для внутриклеточной доставки ДНК/РНК-терапевтических средств остается актуальной областью молекулярной медицины, несмотря на достижения в области липоплексов, металлических наночастиц и других носителей, все из которых имеют ограничения с точки зрения стабильности, эффективности или токсичности. Конденсаты на основе пептидов недавно появились как многообещающая альтернатива существующим системам доставки. Они предлагают несколько преимуществ, включая легкое включение ДНК/РНК, низкую токсичность и проникновение через клеточные мембраны. Их основным недостатком является неэффективная распаковка внутри клетки. Для решения этой проблемы была предложена модификация, которая делает пептиды, образующие конденсат, чувствительными к внутриклеточному глутатиону. Однако это представляет собой проблему, поскольку требует более сложного синтеза. Здесь мы описываем новый подход к программируемому высвобождению лекарств из конденсатов на основе пептидов. Он был вдохновлен АТФ-управляемой распаковкой конденсатоподобных нуклеокапсидов коронавируса и аналогичными фазовыми переходами нескольких человеческих рибонуклеопротеинов. Мы использовали ранее описанные внутренне неупорядоченные пептиды, богатые гистидином, в качестве каркасов конденсата и ввели АТФ-чувствительный модуль в середину их последовательности. АТФ-модуль представлял собой консенсусный мотив, обогащенный человеческими киназами. Пептиды были получены путем автоматического синтеза и очищены с помощью ЖХ-МС. Конденсаты были собраны путем смешивания пептидов с РНК случайной последовательности и модельными олигодезоксирибонуклеотидами (ОДН) в псевдофизиологическом буфере. Использование флуоресцентно меченых смесей пептидов/ОДН позволило контролировать образование и динамику конденсата с помощью флуоресцентной микроскопии. Мы показали, что конденсаты относительно стабильны в средах без АТФ и подвергаются перестройкам с частичным высвобождением ОДН в присутствии АТФ. Мы также показали, что они проникают в клетки HEK293 в течение четырех часов и высвобождают ОДН в цитоплазму в течение 20 ч. Наши предварительные результаты подтверждают возможность использования АТФ-чувствительных конденсатов в качестве систем доставки лекарств.

*Это исследование было поддержано РФФ (24-25-00441).*

## ATP-SENSITIVE PEPTIDE-BASED CONDENSATES FOR INTRACELLULAR DELIVERY OF THERAPEUTIC OLIGNONUCLEOTIDES

T.S. Vedekhina, S.E. Aliyeva, V.S. Anufriev, A.M. Varizhuk

Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency; MIREA – Russian Technological University, Moscow

The development of robust approaches for intracellular delivery of DNA/RNA-therapeutics remains a relevant area of molecular medicine despite the advances in the fields of lipoplexes, metal-based nanoparticles, and other carriers, all of which have limitations in terms of stability, efficiency, or toxicity. Peptide-based condensates have recently emerged as a promising alternative to existing delivery systems. They offer several advantages, including facile incorporation of DNA/RNA, low toxicity, and excellent penetration through cellular membranes. Their primary disadvantage is inefficient unpackaging within the cell. To address this issue, a modification that renders condensate-scaffolding peptides sensitive to intracellular glutathione has been proposed. However, it presents a challenge in terms of high-throughput manufacturing, as it requires a more elaborate synthesis. Here, we describe a novel approach to programmed drug release from peptide-based condensates. It was inspired by the ATP-driven unpackaging of condensate-like nucleocapsids of coronaviruses and analogous phase transitions of several human ribonucleoproteins. We used previously reported intrinsically disordered histidine-rich peptides as condensate scaffolds and introduced an ATP-sensitive module in the middle of their sequence. The ATP module was a consensus motif enriched in human kinases. The peptides were obtained by automated synthesis and purified by LC-MS. The condensates were assembled by mixing the peptides with random-sequence RNA and model oligodeoxyribonucleotides (ODNs) in a pseudo-physiological buffer. The use of fluorescently labeled peptide/ODN admixtures enabled the monitoring of condensate formation and dynamics by fluorescence microscopy. We showed that the condensates are relatively stable in ATP-free media and undergo rearrangements with partial ODN release in the presence of ATP. We also showed them to enter HEK293 cells within four hours and release ODNs into cytoplasm within 20 hours. To summarize, our preliminary results support the usability of ATP-sensitive condensates as drug delivery systems.

*This research was supported by the Russian Science Foundation (24-25-00441).*

## СВЯЗЫВАЮЩИЕ БРОМОДОМЕНЫ BRD4 ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ И ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ

М.С. Юдин<sup>1,2</sup>, В.Б. Цветков<sup>1,2</sup>, В.В. Северов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва; <sup>2</sup>Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный

Активаторы транскрипции семейства BET рассматриваются как потенциальные терапевтические мишени для терапии различных онкологических заболеваний и состояний, связанных с хроническим воспалением. Способность белков BET, включая BRD4, облегчать транскрипцию посредством ремоделирования нуклеосом и привлечения других активаторов к промоторам/энхансерам зависит от сродства бромодоменов BET (BD) к ацетилированным вариантам гистонов с мотивами KacXXK/KacXXKac. Структурные аналоги этих мотивов могут конкурировать с ацетилированными гистонами за взаимодействие с белками BET, тем самым функционируя как ингибиторы BET (BETis). В поисках альтернативных стратегий для дизайна BETi мы рассмотрели мотив ДНК, который перепредставлен в занятых BET геномных областях, как потенциального конкурента связывания гистонов. Этот мотив, (G3A)3G3 (M1), принимает вторичную структуру G-квадруплекса и обычно обнаруживается в пиках BRD4 ChIP-seq. M1 сравнивали с ацетилированным фрагментом H3K18ac, который также обогащен в пиках BRD4 ChIP-seq, с точки зрения сродства к BRD4 BD *in silico* и *in vitro*. Случайная последовательность dsDNA использовалась в качестве отрицательного контроля. Исследования *in silico* включали стыковку ацетилированного пептида/M1/dsDNA с BRD4 BD. Полученные комплексы ранжировали на основе функции подсчета очков. Стабильность комплексов с наивысшей оценкой, полученных в результате стыковки, была подтверждена методом молекулярной динамики (MD). Пептид H3K18ac продемонстрировал сильное взаимодействие с гидрофобным карманом связывания Kac, образованным межспиральными петлями BD и проксимальными остатками BD в MD-симуляциях. Сайт связывания M1 был смещен к границе кармана, а энергия связывания была немного ниже, чем у пептида. Контрольная двухцепочечная ДНК не показала сродства к BRD4. Эти результаты были подтверждены *in vitro* с помощью микромасштабного термофореза (MST) и поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Анализы MST выявили константу диссоциации BRD4-M1 (Kd)  $10,3 \pm 0,5$  мкМ (немного ниже, чем для ацетилированного пептида), в то время как контрольная ДНК показала Kd > 100 мкМ. Данные SPR качественно согласуются с данными MST и прогнозами *in silico*. Мы пришли к выводу, что G-квадруплексная ДНК перспективна для разработки аптамеров, нацеленных на BRD4.

Данное исследование выполнено при поддержке гранта РФФ № 24-25-00431.

## TARGETING BRD4 BROMODOMAINS WITH PEPTIDES AND OLIGONUCLEOTIDES

M.S. Iudin<sup>1,2</sup>, V.B. Tsvetkov<sup>1,2</sup>, V.V. Severov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency, Moscow;

<sup>2</sup>Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny

Transcription activators of the BET family are regarded as potential therapeutic targets for the treatment of various oncological diseases and conditions associated with chronic inflammation. The ability of BET proteins, including BRD4, to facilitate transcription through the remodeling of nucleosomes and the recruitment of other activators to promoters/enhancers is reliant on the affinity of BET bromodomains (BDs) for acetylated histone variants with KacXXK/KacXXKac motifs. Structural analogues of these motifs may compete with acetylated histones for interactions with BET proteins, thereby functioning as BET inhibitors (BETis). In the pursuit of alternative strategies for BETi design, we considered a DNA motif that is overrepresented in BET-occupied genomic regions as a potential histone competitor. This motif, (G3A)3G3 (M1), adopts a G-quadruplex secondary structure and is typically found in nucleosome-free BRD4 ChIP-seq peaks. M1 was compared to the acetylated fragment of H3K18ac, which is also enriched in BRD4 ChIP-seq peaks, in terms of the affinity for BRD4 BDs *in silico* and *in vitro*. A random dsDNA sequence was used as a negative control. The *in silico* studies included docking of the acetylated peptide/M1/dsDNA to BRD4 BDs. The resulting complexes were ranked based on the scoring function. The stability of the top-scoring complexes obtained from docking was verified by molecular dynamics (MD).

The H3K18ac peptide exhibited a strong interaction with the Kac-binding hydrophobic pocket formed by interhelical BD loops and the proximal BD residues in MD simulations. The binding site of M1 was shifted to the pocket boundary, and the binding energy was slightly inferior to that of the peptide. The control dsDNA showed no affinity for BRD4. These results were verified *in vitro* by microscale thermophoresis (MST) and surface plasmon resonance (SPR)-based assays. MST assays revealed a BRD4-M1 dissociation constant (Kd) of  $10.3 \pm 0.5$   $\mu$ M (slightly inferior to that reported for the acetylated peptide), while control DNA showed Kd > 100  $\mu$ M. SPR data agreed qualitatively with MST data and *in silico* predictions. We conclude that G-quadruplex DNA holds promise for the development of BRD4-targeting aptamers but can hardly outperform peptide-based BET inhibitors.

The work was supported by Russian Science Foundation grant 24-25-00431.

### ЭНДОПЕПТИДАЗА IdeZ КАК ИНСТРУМЕНТ ИССЛЕДОВАНИЯ АБЗИМОВ

**Л.П. Смирнова, Д.В. Казанцева, В.С. Воронина, С.В. Константинова, И.С. Бокша**

*НИИ психического здоровья Томского НИМЦ, Томск; Сибирский государственный медицинский университет, Томск; НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва; Научный центр психического здоровья, Москва*

Существование в организме человека иммуноглобулинов класса G, обладающих ферментативной активностью (абзимов), открыто в конце XX века, причем обнаружено значимое изменение их активности при ряде патологий, включая психические. Наличие оксидоредуктазных активностей (каталазной, супероксиддисмутазной) показано у целых молекул IgG, однако, локализация активного центра, ответственного за проявление ферментативной активности, не определена. Целью работы было изучение оксидоредуктазной активности целых молекул IgG и их Fab- и Fc-фрагментов, расщепленных рекомбинантной эндопептидазой IdeZ. В экспериментах использовалась сыворотка крови здоровых доноров. Поликлональные IgG из сыворотки выделяли на колонке с Protein-G-Sepharose. Затем полученные препараты IgG подвергались протеолизу IdeZ (эндопептидазой, полученной в НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи) в соотношении по концентрации белка 1:0,5 в течение 1,5 ч при 37°C. После этого продукты протеолиза (фрагменты IgG) отделяли на Protein-G-Sepharose от IdeZ. Фрагменты IgG визуализировали методом электрофореза в градиентном 4-18% ПААГ. Удельную абзимную каталазную и супероксиддисмутазную активность целых молекул IgG и фрагментов IgG измеряли спектрофотометрическими методами. По результатам электрофореза подтверждено образование фрагментов IgG молекулярной массой 110 кДа (предположительно Fab-фрагменты, соединенные дисульфидной связью) и 25 кДа (предположительно разведенные Fc-фрагменты). При хроматографии на Protein-G-Sepharose фрагменты IgG связывались с сорбентом и элюировались отдельно от IdeZ, что позволило изучить их абзимную активность. Полученные фрагменты IgG обладали собственной каталазной активностью, уровень которой оказался в 1,5 раза ниже, чем у целых молекул IgG. Супероксиддисмутазная активность фрагментов IgG наоборот, была в 1,5 раза выше активности целых IgG. Таким образом, после протеолиза IdeZ произошло расщепление IgG на фрагменты, обладающими ферментативными активностями, сравнимыми с активностью целых молекул IgG. IdeZ может помочь в локализации активных центров, отвечающих за каталитические свойства IgG человека.

### ENDOPEPTIDASE IdeZ AS A TOOL FOR STUDYING ABZYMES

**L.P. Smirnova, D.V. Kazantseva, V.S. Voronina, S.V. Konstantinova, I.S. Boksha**

*Research Institute of Mental Health TNMC, Tomsk; Siberian State Medical University, Tomsk; N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow; Mental Health Research Centre, Moscow*

The presence of IgG with enzymatic activity (abzymes) in the human body was discovered at the end of the 20th century, and significant change in their activity was found in a number of pathologies, including mental illness. The presence of enzymatic activities (catalase, superoxide dismutase) was shown in whole IgG molecules, however, the active site responsible for the enzymatic activity has not been localized. The aim of the work was to study the oxidoreductase activity of whole IgG molecules and their Fab- and Fc-fragments cleaved by IdeZ, the recombinant endopeptidase. Blood serum of healthy donors was used in the experiments. Polyclonal IgG pool from the serum was isolated on a column with Protein-G-Sepharose. The obtained IgG preparations were then subjected to proteolysis by IdeZ (the endopeptidase produced at the Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology), at the protein concentration ratio of 1:0.5 for 1.5 h at 37°C. After that, the proteolysis products (IgG fragments) were separated from IdeZ on Protein-G-Sepharose. IgG fragments were visualized by electrophoresis in a gradient 4-18% PAGE. The specific abzyme catalase and superoxide dismutase activities in whole IgG molecules and IgG fragments were measured spectrophotometrically. The PAGE results confirmed the formation of IgG fragments with a molecular weight of 110 kDa (presumably Fab fragments linked by a disulfide bond) and 25 kDa (presumably Fc fragments). During chromatography on Protein-G-Sepharose, IgG fragments bound to the sorbent and eluted separately from IdeZ, which allowed us to study their abzyme activity. The resulting IgG fragments had their own catalase activity, the level of which was 1.5 times lower than that of whole IgG molecules. Superoxide dismutase activity of IgG fragments, on the contrary, was 1.5 times higher than the activity of whole IgG. Thus, after proteolysis of IdeZ, IgG was split into fragments with enzymatic activities comparable to the activity of whole IgG molecules. IdeZ can help in localizing the active sites responsible for the catalytic properties of human IgG.

## АНАЛИЗ ПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ БЕЛКОВ МИКРОБИОТЫ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В КРОВОТОКЕ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЖКТ

В.А. Косс<sup>1</sup>, В.А. Веселовский<sup>1</sup>, Е.И. Олехнович<sup>1</sup>, К.М. Климина<sup>1</sup>, В.М. Говорун<sup>2</sup>, Г.П. Арапиди<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА; <sup>2</sup>НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора;

<sup>3</sup>ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Молекулярный уровень взаимодействия человека с его микробиомом все сильнее интересует исследователей. Вероятным посредником между бактериями кишечника и организмом человека могут быть пептидные продукты деградации бактериальных белков, которые благодаря своим малым размерам могут проникать сквозь эпителий желудочно-кишечного тракта в кровоток. Далее, распространяясь по разным тканям и органам, они могут влиять на физиологические функции организма. Это позволяет нам рассматривать микробиомные пептиды как кандидатов на роль регуляторов внекишечного взаимодействия между бактериальной флорой и организмом человека. В рамках исследования были проанализированы 123 образца плазмы крови от здоровых доноров, пациентов с язвенным колитом, болезнью Крона, синдромом раздраженного кишечника или колоректальным раком. Анализ пептидов, выделенных по ранее описанной методике, был проведен методом LC-MS/MS на масс-спектрометре Q Exactive HF-X Hybrid Quadrupole-Orbitrap и соотнесен с базой данных аннотированных белков микробиоты человека согласно Human Microbiome Project. Среди наиболее представленных и воспроизводимых пептидов для каждой группы пациентов были выявлены фрагменты белков-предшественников, консервативных для разных бактерий, и более специфичные, относящиеся к конкретной группе бактерий. Например, у пациентов с колоректальным раком были идентифицированы фрагменты FAD-зависимой оксидоредуктазы бактерии *Delftia acidovorans*, опубликованного ранее, потенциально нового маркера колоректального рака. Также были проанализированы бактерии, чьи пептиды были обнаружены: 38 таксонов бактерий являются абсолютно уникальными для пациентов с заболеваниями ЖКТ. При сопоставлении результатов LC-MS/MS идентификации пептидов кровотока и анализа метабенома по данным секвенирования гена 16S рРНК было показано совпадение по нескольким уникальным таксонам бактерий, которые, по литературным данным, связаны с патогенезом соответствующих заболеваний ЖКТ. Так, например, у пациентов с болезнью Крона были обнаружены пептиды кровотока и 16S рРНК бактерий отряда Burkholderiales, описываемого в литературе как частый при воспалительных заболеваниях ЖКТ.

## ANALYSIS OF PEPTIDE FRAGMENTS OF MICROBIOTA PROTEINS CIRCULATING IN THE BLOODSTREAM OF HEALTHY DONORS AND PATIENTS WITH VARIOUS GI DISEASES

V.A. Koss<sup>1</sup>, V.A. Veselovsky<sup>1</sup>, E.I. Olekhovich<sup>1</sup>, K.M. Klimina<sup>1</sup>, V.M. Govorun<sup>2</sup>, G.P. Arapidi<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency;

<sup>2</sup>Research Institute for Systems Biology and Medicine; <sup>3</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

The interaction between humans and their microbiome on a molecular level is of rising interest to researchers. Degradation products of bacterial proteins are peptides, which due to their small size can penetrate through the epithelium of the gastrointestinal tract into the bloodstream, and may likely be a mediator between the gut microbiome and the human body. Then, spreading to different tissues and organs, they can influence physiological functions of the organism. This allows us to consider microbiome peptides as candidates for the role of regulators of extraintestinal interaction between bacterial flora and the human body. Our study analyzed 123 blood plasma samples from healthy donors, patients with ulcerative colitis, Crohn's disease, irritable bowel syndrome and colorectal cancer. The peptides isolated by the previously described methodology were analyzed by LC-MS/MS on a Q Exactive HF-X Hybrid Quadrupole-Orbitrap mass spectrometer and were correlated with the Human Microbiome Project database of annotated human microbiota proteins. We identified the most represented and reproducible fragments of precursor proteins for each patient group, among which there were both peptides conserved across various bacterial groups and peptides more specific for particular bacterial taxons. For instance, samples of patients with colorectal cancer contained fragments of the FAD-dependent oxidoreductase of the bacterium *Delftia acidovorans*, which has previously been shown as a novel marker of colorectal cancer. We also analyzed the bacteria whose peptides were detected: 38 bacterial taxa were completely unique to patients with one of GI diseases. Upon comparison between the results of LC-MS/MS identification of bloodstream peptides and metagenome analysis by 16S rRNA gene sequencing data, there was shown an overlap for several unique bacterial taxa that have been reported to be associated with the pathogenesis of the respective GI diseases. For example, in patients with Crohn's disease there are both bloodstream peptides and 16S rRNA from bacteria of the Burkholderiales order, a taxon which is described in literature as frequent in inflammatory GI diseases.

## АНАЛИЗ ПРОТЕОМА БАКТЕРИИ *HELICOBACTER CINAEDI* В КУЛЬТУРАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ И ПОСЛЕ КОНТАКТА С МАКРОФАГАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ

А.К. Воронина<sup>1,2</sup>, Б.А. Ефимов<sup>3</sup>, М.В. Малахова<sup>2,1</sup>, М.Е. Богомякова<sup>2</sup>, П.В. Шнайдер<sup>1,2</sup>, О.М. Иванова<sup>1,2</sup>,  
М.А. Лагарькова<sup>1,2</sup>, В.О. Шендер<sup>2,4</sup>, Г.П. Арапиди<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России; <sup>2</sup>ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России; <sup>3</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ; <sup>4</sup>ГНЦ Институт биорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

По данным ВОЗ, сердечно-сосудистые заболевания являются лидирующей причиной смертности во всем мире, причем наибольший вклад в смертность вносит атеросклероз. Согласно липопротеидной теории патогенеза, атеросклероз может быть индуцирован нерегулируемым захватом модифицированных липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) и очень низкой плотности неповрежденным эндотелием стенки сосудов. Опубликовано ряд исследований, согласно которым нарушение метаболизма ЛПНП в макрофагах может быть вызвано внутриклеточным патогеном, микроорганизмом *Helicobacter cinaedi*, однако его роль в развитии патологии окончательно не доказана. *Helicobacter cinaedi* – спиралевидная грамотрицательная бактерия, энтерогапатический представитель рода *Helicobacter*. На сегодняшний день *H. cinaedi* является малоизученным организмом, однако в последние годы появляются сообщения о все более разнообразных патологиях, связанных с данной бактерией, и о ее распространении в различных регионах земного шара. В литературе описано только три фактора вирулентности *H. cinaedi*: cytotolethal distending toxin (Cdt), alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) и *Helicobacter cinaedi* autotransporter protein (HcaA). Поэтому целью нашего исследования является выявление белковых факторов, которые могут способствовать патогенезу данной бактерии. Поскольку на данный момент для *H. cinaedi* не опубликовано протеомных исследований, для достижения поставленной цели мы провели детальное изучение на масс-спектрометре Q Exactive HF-X Hybrid Quadrupole-Orbitrap протеома *H. cinaedi* штамма BAA-847 до и после контакта с макрофагами типа M1. В результате анализа протеома бактерии мы обнаружили, что после контакта с макрофагальными клетками значительно увеличивается присутствие белка HcaA, фактора патогенности, отвечающего за адгезию и инвазию. Присутствие двух других известных факторов патогенности – Cdt и AhpC – после контакта с макрофагами наоборот снизилось. Кроме описанных в литературе факторов патогенности, был выявлен ряд белков, вовлеченных в механизмы адаптации к неблагоприятным условиям.

## *HELICOBACTER CINAEDI* BACTERIUM PROTEOME ANALYSIS IN CULTURE CONDITIONS AND AFTER THE CONTACT WITH MACROPHAGE CELLS

A.K. Voronina<sup>1,2</sup>, B.A. Efimov<sup>3</sup>, M.V. Malakhova<sup>2</sup>, M.E. Bogomyakova<sup>2</sup>, P.V. Schneider<sup>1,2</sup>, O.M. Ivanova<sup>1,2</sup>,  
M.A. Lagarkova<sup>1,2</sup>, V.O. Shender<sup>2,4</sup>, G.P. Arapidi<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Centre for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency; <sup>2</sup>Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency; <sup>3</sup>N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Russian Ministry of Health; <sup>4</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

According to WHO statistics, cardiovascular disease is the leading cause of mortality worldwide, with atherosclerosis being the greatest contributor of mortality. Lipoprotein theory of pathogenesis suggests that atherosclerosis may be induced through unregulated uptake of modified low-density lipoproteins (LDL) and very low-density lipoproteins (VLDL) by the intact endothelium of the vascular wall. A number of studies have been published according to which disruption of LDL metabolism in macrophages may be caused by an intracellular pathogen, the microorganism *Helicobacter cinaedi*, but its role in the development of pathology has not been definitively proven. *Helicobacter cinaedi* is a spiral-shaped Gram-negative bacterium, an enterohepatic representative of the genus *Helicobacter*. To date, *H. cinaedi* is a poorly studied organism, but in recent years there have been reports of increasingly diverse pathologies associated with this bacterium and its distribution in various regions of the globe. Only three *H. cinaedi* virulence factors have been described in the literature: cytotolethal distending toxin (Cdt), alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) and *Helicobacter cinaedi* autotransporter protein (HcaA). Therefore, the aim of our study is to identify protein factors that may contribute to the pathogenesis of this bacterium. Since no proteomic studies have been published for *H. cinaedi* to date, to achieve our goal, we performed a detailed study on a Q Exactive HF-X Hybrid Quadrupole-Orbitrap mass spectrometer of the proteome of *H. cinaedi* strain BAA-847 before and after contact with M1-type macrophages. Analyzing the bacterial proteome, we found that the presence of HcaA protein, a pathogenicity factor responsible for adhesion and invasion, was significantly increased after contact with macrophage cells. Conversely, the presence of two other known pathogenicity factors, Cdt and AhpC, decreased after contact with macrophages. In addition to the pathogenicity factors described in the literature, a number of proteins involved in the mechanisms of adaptation to unfavorable conditions were identified.

## ПЕПТИД Hsp70- НОВЫЙ ЛИГАНД РЕЦЕПТОРА TREM-1, СПОСОБНЫЙ АКТИВИРОВАТЬ ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ ЛИМФОЦИТЫ, УБИВАЮЩИЕ МНС-НЕГАТИВНЫЕ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

Д.М. Юркина, Д.В. Яшин., Е.А. Романова, Л.П. Сащенко

*Институт биологии гена РАН, Москва*

В ИБГ РАН было показано, что основным белок теплового шока Hsp70 является новым лигандом рецептора TREM-1. Hsp70 связывается с TREM-1, что приводит к продукции провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF $\alpha$  и стимуляции образования цитотоксических лимфоцитов. Целью данного исследования было выявить эпитопы белка Hsp70, ответственные за проведение TREM-1-зависимых внутриклеточных сигналов.

Был проведен ограниченный триптический гидролиз белка Hsp70, далее были выявлены и синтезированы пептиды, обладающие TREM-1-зависимой активностью. Методом микромасштабного термофореза показана высокая аффинность связывания пептида Hsp70 с TREM-1- экспериментально получена константа диссоциации равная  $KD=1,24e-9$  М. Взаимодействие пептида Hsp70 и TREM-1 на клеточной поверхности было показано с помощью метода конфокальной микроскопии (70% колокализации) и инкубации пептида Hsp70 в присутствии сшивающего агента на моноцитах с последующим 12% SDS-PAGE и вестерн-блотом.

С помощью иммуоферментного анализа была получена зависимость освобождения растворимого sTREM-1 от концентрации пептида Hsp70, что свидетельствует об активации и димеризации рецептора TREM-1. Установлено, что активация рецептора TREM-1 пептидом Hsp70 приводит к увеличению экспрессии провоспалительных цитокинов: TNF $\alpha$ , IL-6 и IL-1 $\beta$ . Инкубация пептида Hsp70 с PBMC также приводит к образованию цитотоксических Т-лимфоцитов, которые убивают HLA-отрицательные опухолевые клетки посредством взаимодействия FasL–Fas, вызывая в них альтернативные цитотоксические процессы: апоптоз и некроптоз. Ингибиторный анализ с использованием специфических ингибиторов TREM-1 подтверждает, что пептид Hsp70 индуцирует TREM-1-зависимую активность.

Таким образом, был выявлен эпитоп основного белка теплового шока Hsp70, который активирует TREM-1-зависимую передачу внутриклеточных сигналов и является лигандом TREM-1.

Исследование взаимодействия этого пептида с рецептором TREM-1 позволит более детально понять механизмы функционирования противоопухолевого иммунитета, и может быть рассмотрено в перспективе использования в противоопухолевой терапии.

*Работа была выполнена при поддержке гранта РНФ 23-14-00076.*

## Hsp70 PEPTIDE IS A NOVEL LIGAND FOR TREM-1 RECEPTOR, CAPABLE OF ACTIVATING CYTOTOXIC LYMPHOCYTES KILLING MHC-NEGATIVE TUMOR CELLS.

D.M. Yurkina, D.V. Yashin, E.A. Romanova, L.P. Sashchenko

*Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow*

It was shown at the Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences that the main heat shock protein Hsp70 is a novel ligand for the TREM-1 receptor. Hsp70 binds to TREM-1, which leads to the production of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF $\alpha$  and stimulation of the formation of cytotoxic lymphocytes. The aim of this study was to identify the Hsp70 protein epitopes responsible for transmitting TREM-1-dependent intracellular signals.

Limited tryptic hydrolysis of the Hsp70 protein was performed, then peptides with TREM-1-dependent activity were identified and synthesized. The high affinity of binding of the Hsp70 peptide to TREM-1 was shown by the method of microscale thermophoresis - a dissociation constant equal to  $KD=1.24e-9$ M was experimentally obtained. The interaction of the Hsp70 peptide and TREM-1 on the cell surface was shown using confocal microscopy (70% colocalization) and incubation of the Hsp70 peptide in the presence of a crosslinking agent on monocytes, followed by 12% SDS-PAGE and Western blot.

Using enzyme immunoassay, the dependence of the release of soluble sTREM-1 on the concentration of the Hsp70 peptide was obtained, which indicates the activation and dimerization of the TREM-1 receptor. It was found that activation of the TREM-1 receptor by the Hsp70 peptide leads to an increase in the expression of proinflammatory cytokines: TNF $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$ . Incubation of the Hsp70 peptide with PBMC also leads to the formation of cytotoxic T lymphocytes, which kill HLA-negative tumor cells via FasL-Fas interaction, inducing alternative cytotoxic processes in them: apoptosis and necroptosis. Inhibitory analysis using specific TREM-1 inhibitors confirms that the Hsp70 peptide induces TREM-1-dependent activity.

Thus, the epitope of the main heat shock protein Hsp70 was identified, which activates TREM-1-dependent intracellular signal transmission and is a ligand of TREM-1. The study of the interaction of this peptide with the TREM-1 receptor will allow us to understand in more detail the mechanisms of functioning of antitumor immunity, and can be considered in the future for use in antitumor therapy.

*This work was supported by the grant of the Russian National Science Foundation 23-14-00076.*

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ SINGLE-CELL PCR БЕЛКОВОГО СПЕКТРА ЗЕЛЕННЫХ ПАЛОЧЕК СЕТЧАТКИ АМФИБИЙ

**О.В. Чернышкова, Д.А. Николаева, Д.А. Мешалкина, В.И. Ни, М.Л. Фирсов**

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург*

У ряда бесхвостых амфибий в сетчатке имеется уникальный дополнительный тип палочек – «зеленые» палочки. Они обладают более коротковолновым спектром поглощения по сравнению с обычными, «красными» палочками сетчатки, и их количество существенно меньше, чем число «красных» палочек. Функция «зеленых» палочек не до конца понятна, и есть основания полагать что они могут работать при сверхнизких уровнях освещенности, недоступных обычным палочкам сетчатки. Основой работы каждой фоторецепторной клетки является каскад фототрансдукции. Он включает в себя примерно 10 различных белков. Предполагается, что номенклатура белков одинакова для всех фоторецепторных клеток позвоночных, однако разные клетки могут содержать разные изоформы этих белков. В частности, разные функциональные свойства «зеленых» и «красных» палочек могут быть объяснены наличием в их каскадах фототрансдукции разных изоформ ключевых белков. Настоящая работа посвящена созданию и апробации методики, призванной провести прямую экспериментальную проверку этого предположения. Нами создана экспериментальная процедура, позволяющая селективно отбирать из общего пула палочек сетчатки лягушки *Pelophylax ridibundus* и жабы *Bufo bufo* «зеленые» или «красные» палочки в количестве, достаточном для проведения single-cell PCR анализа. Целью анализа было установление типа изоформы ряда белков каскада фототрансдукции и ассоциация этих изоформ с «зеленым» или «красным» типом палочки. Основу методики составляет возможность регистрации тока одиночной палочки и достоверная идентификация ее спектрального типа при помощи быстрого автоматического набора тестовых стимулов. После идентификации, палочка изолируется от сетчатки и криофиксируется в жидком азоте для предотвращения гидролитических процессов. При накоплении достаточного количества материала, производится single-cell PCR анализ по заданной номенклатуре белков.

*Работа поддержана грантом РФФ №24-24-00484.*

## ISOLATION AND INVESTIGATION OF THE PROTEIN SPECTRUM OF GREEN ROD CELLS IN AMPHIBIAN RETINAS USING SINGLE-CELL PCR

**O. Chernyshkova, D. Nikolaeva, D. Meshalkina, V. Ni, M. Firsov**

*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg*

The retinas of certain anuran amphibians contain a unique additional type of rod photoreceptor – the "green" rods. These rods have a shorter wavelength absorption spectrum than the conventional "red" rods and are significantly fewer in number. The function of the "green" rods is still unclear, but it is thought that they may function in extremely low light conditions, beyond the capabilities of typical rod cells.

The fundamental process in every photoreceptor cell is the phototransduction cascade, which involves about ten different proteins. While the protein nomenclature is thought to be the same in all vertebrate photoreceptor cells, different cells may contain different isoforms of these proteins. In particular, the different functional properties of "green" and "red" rods could potentially be explained by the presence of different isoforms of key proteins in their respective phototransduction cascades. The aim of this study is to develop and test a methodology to directly validate this hypothesis experimentally. We have developed an experimental procedure that allows the selective isolation of either "green" or "red" rods from the total pool of rod cells in the retinas of *Pelophylax ridibundus* and *Bufo bufo* in quantities sufficient for single-cell PCR analysis. The aim of this analysis is to determine the isoform types of several proteins of the phototransduction cascade and to associate these isoforms with either the "green" or "red" rod type. The technique is based on the ability to record the current from a single rod and reliably identify its spectral type using a rapid, automated set of test stimuli. Once identified, the rod is isolated from the retina and cryofixed in liquid nitrogen to prevent hydrolytic processes. Once a sufficient amount of material has been collected, single-cell PCR analysis is performed using the specified protein nomenclature.

*This work is supported by the Russian Science Foundation (RSF), grant No. 24-24-00484.*

## ИНФАРКТ МИОКАРДА ОКАЗЫВАЕТ ОТСРОЧЕННОЕ ВЛИЯНИЕ НА СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА P16<sup>INK4A</sup> В ЯДРЕ И ОКОЛОЯДЕРНОМ ПРОСТРАНСТВЕ В КАРДИОМИОЦИТАХ И ФИБРОБЛАСТАХ ЖЕЛУДОЧКОВ СЕРДЦА

А.А. Матюхин<sup>1</sup>, И.Б. Цорин<sup>2</sup>, И.А. Мирошкина<sup>2</sup>, С.А. Крыжановский<sup>2</sup>, С.И. Шрам<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИЦ «Курчатовский институт»; <sup>2</sup>ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий, Москва

Белок p16<sup>INK4A</sup> является известным ингибитором циклин-зависимых киназ, участвующих в регуляции клеточного цикла. В последнее время появились сведения о его возможной роли в патогенезе ряда возрастных заболеваний. В этой связи представляет особый интерес изучение его вовлеченности в развитие такой распространенной патологии как хроническая сердечная недостаточность (ХСН). Целью работы было определить содержание белка p16 в кардиомиоцитах и фибробластах желудочков сердца, а также установить характер его внутриклеточного распределения на разных сроках после воспроизведения инфаркта миокарда (ИМ) у лабораторных крыс.

ИМ левого желудочка у крыс вызывали перманентной окклюзией коронарной артерии путем ее лигирования. Иммунофлуоресцентный анализ p16 проводили на фиксированных парафинизированных гистологических срезах толщиной 5 мкм через 1,5, 3 и 9 мес после ИМ. Было обнаружено, что как в фибробластах, так и в кардиомиоцитах p16 распределяется преимущественно в области ядер (ок. 75–90%) и околоядерного пространства (ок. 10–25%) в виде компактных субклеточных образований с четкими границами. При этом ядерные и околоядерные компартменты p16, как правило, тесно контактируют друг с другом. По своей морфологии и локализации они напоминают внутриядерные и юкстануклеарные компартменты контроля качества INQ/JUNQ. Однако выяснение природы этих образований требует проведение отдельного исследования. Показано, что через 9 мес после ИМ общий уровень p16 в фибробластах левого желудочка в среднем в 2 раза меньше чем в контроле (группа ложнопериорированных животных), но соотношение белка в ядре и околоядерном пространстве было таким же. В тоже время в кардиомиоцитах левого желудочка на этом сроке общее содержание p16 практически не отличалось от контроля, но доля белка в околоядерном пространстве была в среднем в 1,5 раза выше.

Полученные результаты демонстрируют наличие отдаленного влияния ИМ на содержание и распределение белка p16 в клетках миокарда, что указывает на целесообразность дальнейшего исследования вовлеченности p16 в формирование фенотипических и функциональных изменений, происходящих на клеточном и тканевом уровне при развитии ХСН.

*Исследования проведены в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».*

## MYOCARDIAL INFARCTION HAS A DELAYED EFFECT ON THE CONTENT OF P16<sup>INK4A</sup> PROTEIN IN THE NUCLEUS AND JXTANUCLEAR REGION IN HEART MYOCYTES AND FIBROBLASTS OF THE CARDIAC VENTRICLES

A.A. Matyukhin<sup>1</sup>, I.B. Tsorin<sup>2</sup>, I.A. Miroshkina<sup>2</sup>, S.A. Kryzhanovsky<sup>2</sup>, S.I. Shram<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Research Centre “Kurchatov Institute”; <sup>2</sup>Federal Research Center for Original and Advanced Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow

The p16<sup>INK4A</sup> protein is a known inhibitor of cyclin-dependent kinases involved in cell cycle regulation. Recently, information has emerged about its possible role in the pathogenesis of a number of age-related diseases. In this regard, it is of particular interest to study its involvement in the development of such a common pathology as chronic heart failure (CHF). The aim of the work was to determine the level of p16 protein in heart myocytes and fibroblasts of the cardiac ventricles, as well as to determine the pattern of its intracellular distribution at different terms after reproduction of myocardial infarction (MI) in laboratory rats.

Left ventricular MI in rats was induced by permanent occlusion of the coronary artery by its ligation. Immunofluorescence analysis of p16 was performed on fixed paraffin-embedded histological sections of 5 μm thickness at 1.5, 3 and 9 months after MI. It was found that in both fibroblasts and cardiomyocytes p16 is distributed predominantly in the region of nuclei (75–90%) and juxtannuclear region (10–25%) in the form of compact subcellular formations with clear boundaries. At the same time, nuclear and juxtannuclear compartments of p16, as a rule, are in close contact with each other. In their morphology and localisation, they resemble intranuclear and juxtannuclear quality control compartments INQ/JUNQ. It was shown that 9 months after MI the total level of p16 in left ventricular fibroblasts was on average 2-fold lower than in the control (group of sham operated animals), but the ratio of protein in the nucleus and juxtannuclear region was the same. At the same time, in cardiomyocytes of the left ventricle at this term the total content of p16 practically did not differ from the control, but the proportion of protein in the juxtannuclear region was on average 1.5 times higher.

The results obtained demonstrate the presence of remote influence of MI on the content and distribution of p16 protein in myocardial cells, which indicates the expediency of further investigation of p16 involvement in the formation of phenotypic and functional changes occurring at the cellular and tissue level during the development of CHF.

*The research was carried out according to the state assignment of NRC “Kurchatov Institute”.*



## ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИИ БЕЛКА WhiA В КОНТЕКСТЕ МИНИМАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Е.А. Цой, Д.В. Евсютина, Г.Ю. Фисунов, В.М. Говорун

НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва

Микоплазмы (Класс Mollicutes) – это уникальные бактерии, которые способны к самостоятельному воспроизведению, несмотря на существенную редукцию. Приспособление микоплазм к паразитическому образу жизни привело к сильному упрощению или исчезновению множества клеточных систем и молекулярных механизмов. К примеру, у этих бактерий отсутствует клеточная стенка, большинство биосинтетических путей отсутствуют, а системы регуляции экспрессии генов сокращены до нескольких транскрипционных факторов. Как следствие, они обладают минимальным геномом (от 580 до 2200 тыс пар оснований) по сравнению с большинством бактерий. Все это способствовало тому, что микоплазмы стали рассматриваться как хорошие модели минимальной клетки. В 2016 году миру была представлена бактерия с минимальным синтетическим геномом - JCVI-syn3.0. Искусственно сконструированный и дополнительно упрощённый геном *Mycoplasma mycoides* был пересажен в цитоплазму *Mycoplasma capricolum*. Геном созданной бактерии состоит всего из 531 тысячи пар оснований, кодирующих 473 гена, включая ген кодирующий белок WhiA, что говорит о его важности. Несмотря на то, что он присутствует во многих бактериях, его функция плохо изучена. Было показано, что в *Streptomyces* WhiA участвует в регуляции спорообразования и клеточном делении, а в *B. subtilis* задействован в сегрегации и поддержании целостности хромосом. Для *Streptomyces* был идентифицирован сайт связывания WhiA (GACAC). Роль WhiA в процессе жизнедеятельности микоплазм остается не ясна.

В данной работе мы исследовали белок WhiA из *Mycoplasma gallisepticum*. Нами было продемонстрировано, что у микоплазм данный белок регулирует транскрипцию оперона rplJ, кодирующего гены рибосомных и некоторых других белков домашнего хозяйства. Мы показали, что WhiA чувствителен к изменениям концентрации нуклеозид-трифосфатов, т.е. состоянию энергизации клетки. Полученные нами мутанты с нокаутом гена WhiA (методом CRISPR-интерференции) демонстрируют сниженную скорость роста и увеличенную экспрессию шаперонов, что может говорить о системном нарушении организации протеома. Кроме того, мы синтезировали ген рН-сенсора SypHer3s с кодонным составом, оптимальным для микоплазм. Были получены двойные трансформанты – с нокаутом WhiA и экспрессией SypHer3s.

Работа финансировалась по заданию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в рамках темы «Создание искусственных клеточных систем» рег. № 122030900107-3.

## THE STUDY OF WhiA PROTEIN FUNCTION IN THE CONTEXT OF MINIMAL CELL

E.A. Tsoy, D.V. Evsyutina, G.Y. Fisunov, V.M. Govorun

Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow

Mycoplasmas (Mollicutes) are unique bacteria that are capable of self-replication on growth medium despite significant reduction. Adaptation to parasitic lifestyle resulted in drastic simplification of multiple cellular systems and molecular mechanisms. In particular mycoplasmas lack cell wall and the majority of metabolic pathways. The transcription control systems are reduced to a few of transcription factors. As a result, mycoplasmas feature minimal genomes (580 – 2200 Kb) compared to the majority of bacteria. These features made mycoplasmas a good model of minimal cell.

In 2016 a synthetic bacterium with minimal artificial genome JCVI-syn3.0 has been created. The artificially synthesized reduced genome of *Mycoplasma mycoides* was transferred to the cytoplasm of *Mycoplasma capricolum*. The minimal artificial genome consists of 531 Kb and encompasses 473 genes including the gene coding for WhiA protein, which indicates its importance. Despite WhiA protein had been found in multiple bacteria its role was not completely understood. It has been shown that in *Streptomyces* WhiA plays role in sporulation and cell division. In *B. subtilis* WhiA takes part in chromosome segregation and integrity maintenance. The binding site of WhiA (GACAC) has been identified in *Streptomyces*. The function of WhiA in mycoplasmas remains obscure.

In current work we focused on WhiA protein from *Mycoplasma gallisepticum*. We demonstrated that it regulated transcription of rplJ operon, which codes for ribosomal and some other housekeeping proteins. We show that WhiA is sensitive to NTP concentration. The obtained mutants with WhiA knockdown demonstrate lower growth rate and increased expression of chaperones. We synthesized pH-sensor SypHer3s with mycoplasma codon composition and obtained double transformants with WhiA knockdown and SypHer3s expression.

The work was funded by Federal Service for Surveillance on Consumer Right Protection and Human Wellbeing "Construction of artificial cellular systems" No 122030900107-3.

### ДОМЕН DPF СУБЪЕДИНИЦЫ PHF10 КОМПЛЕКСА PBAF, РЕМОДЕЛИРУЮЩЕГО ХРОМАТИН, ОТВЕЧАЕТ ЗА СПЕЦИФИЧЕСКОЕ ЧТЕНИЕ МЕТКИ H3K14AC

Д.О. Байрамова, Н.В. Сошникова

*Институт молекулярной биологии им. Энгельгардта РАН, Москва*

Комплекс PBAF – это член семейства SWI/SNF – ремоделеров хроматина, субъединичный состав которого варьируется, определяя специфичность связывания комплекса с определенным типом хроматина и, соответственно, специфичность ремоделируемых генов. Одной из специфичных субъединиц PBAF является PHF10. Транскрипты PHF10 убиквитарно экспрессируются, начиная с гаструляции, а его нокаут приводит к гибели организма на ранних эмбриональных стадиях. Существует 2 типа изоформ белка PHF10: P-изоформы (содержат домен DPF на C-конце) и S-изоформы (не содержат DPF). Изоформы альтернативно включаются в PBAF комплекс, по-разному влияя на специфичность PBAF, а смена одной изоформы на другую в комплексе сопровождает процесс дифференцировки клетки и изменение транскрипционных паттернов. DPF домен ранее был описан у пяти гомологов PHF10 как домен, связывающий H3K4me3, H3K9ac, H3K14ac/cr, H4 и H4K5ac/K8ac/K12ac/K16ac модификации гистонов. На основании моделирования по гомологии, выполненного ранее нашей группой, было выяснено, что PHF10-DPF имеет характерные структурные особенности, отличающие его от других DPF. В соответствии с этим была выдвинута гипотеза, что DPF домен PHF10 должен связывать H3K14ac и активно «выталкивать» H3K4me3 модификации гистонов. Мы проверили данную гипотезу *in vitro*. Экспрессировали человеческий вариант DPF в бактериальной системе и очистили его с помощью аффинной, ион-обменной хроматографии и гель-фильтрации. Далее мы измерили теплоту связывания DPF и хвостов гистонов методом изотермической титрационной калориметрии с последующим вычислением термодинамических параметров, включая константу диссоциации KD. Мы протестировали модифицированные N-концевые участки гистонов H3 и H4 (15 вариантов) и обнаружили, что DPF PHF10 связывает исключительно H3K14ac. Далее мы мутировали единичные аминокислоты в последовательности домена и выявили одну ключевую для взаимодействия с H3K14ac аминокислоту. Так, имеется возможность "выключить" функцию узнавания комплексом PBAF метки хроматина H3K14ac, сохранив при этом целый комплекс в клетке, что позволяет детально изучить роль H3K14ac в клетке, в частности, в транскрипции.

### DPF DOMAIN OF CHROMATIN REMODELING COMPLEX PBAF PHF10 SUBUNIT IS RESPONSIBLE FOR SPECIFIC READING OF H3K14AC MARK

D.O. Bayramova, N.V. Soshnikova

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow*

The PBAF complex is a member of the SWI/SNF family of chromatin remodelers, the subunit composition of which varies, determining the specificity of binding of the complex to a certain type of chromatin and, accordingly, the specificity of the remodeled genes. One of the specific PBAF subunits is PHF10. PHF10 transcripts are expressed ubiquitously starting from gastrulation, and its knockout leads to death of the organism at early embryonic stages. There are 2 types of PHF10 protein isoforms: P-isoforms (containing a DPF domain at the C-terminus) and S-isoforms (do not contain DPF). Isoforms are alternatively included in the PBAF complex, differently affecting the specificity of PBAF, and the change from one isoform to another in the complex accompanies the process of cell differentiation and changes in transcriptional patterns. The DPF domain has been previously described in five PHF10 homologues as a domain binding H3K4me3, H3K9ac, H3K14ac/cr, H4, and H4K5ac/K8ac/K12ac/K16ac histone modifications. Based on homology modeling previously performed by our group, it was found that PHF10-DPF has characteristic structural features that distinguish it from other DPFs. Accordingly, it was hypothesized that the DPF domain of PHF10 should bind H3K14ac and actively "push out" H3K4me3 histone modifications. We tested this hypothesis *in vitro*. We expressed the human DPF variant in a bacterial system and purified it using affinity, ion exchange chromatography, and gel filtration. We then measured the heat of binding of DPF and histone tails using isothermal titration calorimetry, followed by calculation of thermodynamic parameters, including the dissociation constant KD. We tested modified N-terminal regions of histones H3 and H4 (15 variants) and found that DPF PHF10 binds exclusively to H3K14ac. We then mutated single amino acids in the domain sequence and identified one amino acid that is key to interaction with H3K14ac. Thus, it is possible to "switch off" the recognition function of the PBAF complex of the H3K14ac chromatin mark, while preserving the entire complex in the cell, which allows us to study in detail the role of H3K14ac in the cell, in particular, in transcription.

## S-НИТРОЗИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ И УЧАСТИЕ В ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

**В.И. Муронец<sup>1,2</sup>, М.В. Медведева<sup>1,2</sup>, Е.В. Шмальгаузен<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и <sup>2</sup>Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Одной из проблем, возникающей при биоинженерии белков, является их посттрансляционная модификация. Например, из-за таких модификаций сложно получать эукариотические рекомбинантные белки с близкими к нативным белкам свойствами при их экспрессии в бактериальных системах. Условия культивирования клеток также могут приводить к трудно предсказуемым изменениям характеристик рекомбинантных белков. Наиболее подвержены разнообразным модификациям, прежде всего окислению и S-нитрозилированию, сульфгидрильные группы (SH-группы) белков. Нами было изучено S-нитрозилирование сульфгидрильных групп ферментов, участвующих в каталитическом акте, взаимосвязь S-нитрозилирования с окислением и глутатионилированием SH-групп, а также роль этих процессов в обратимой и необратимой инактивации фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. Была выявлена взаимосвязь таких модификаций с нарушениями энергетического обмена и развитием патологических процессов. Полученную информацию о механизмах модификации SH-групп необходимо учитывать при получении рекомбинантных белков и, особенно, ферментов. Высокая реакционная способность обычно характерна для сульфгидрильных групп, участвующих в катализе. По этой причине именно они подвергаются окислению и S-нитрозилированию в первую очередь. Эксперименты показывают, что замена аминокислотных остатков, увеличивающих реакционную способность SH-групп, позволяет защитить их от модификации при незначительном изменении каталитической активности. В некоторых работах для стабилизации ферментов вводят дополнительные SH-группы с целью образования внутримолекулярных дисульфидных связей. Однако такой прием иногда вызывает противоположный эффект из-за окисления, в том числе необратимого, SH-групп, приводящего к разрыву дисульфидных связей. Особую опасность представляет появление неспаренных SH-групп из-за образования межполипептидных сшивок. Таким образом, изучение механизмов посттрансляционных модификаций сульфгидрильных групп важно не только для понимания патологических процессов, но и для создания рекомбинантных белков с оптимальными свойствами.

*Работа была выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект No 24-44-20003).*

## S-NITROSYLATION OF PROTEINS: MOLECULAR MECHANISMS AND INVOLVEMENT IN PATHOLOGICAL PROCESSES

**V.I. Muronetz<sup>1,2</sup>, M.V. Medvedeva<sup>1,2</sup>, E.V. Schmalhausen<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Belozersky Research Institute of Physical and Chemical Biology and <sup>2</sup>Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, Moscow

One of the problems arising in the bioengineering of proteins is their posttranslational modification. For example, such modifications make it difficult to obtain eukaryotic recombinant proteins with properties close to native proteins when they are expressed in bacterial systems. Cell culture conditions can also lead to unpredictable changes in the characteristics of recombinant proteins. Sulfhydryl groups (SH-groups) of proteins are the most susceptible to various modifications, primarily oxidation and S-nitrosylation. We have studied S-nitrosylation of sulfhydryl groups of enzymes involved in the catalysis, the relationship of S-nitrosylation with oxidation and glutathionylation of SH-groups, and the role of these processes in reversible and irreversible inactivation of the enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. The interrelation of such modifications with disturbances of energy metabolism and the development of pathological processes was revealed. The obtained information on the mechanisms of SH-group modification should be taken into account when obtaining recombinant proteins and, especially, enzymes. High reactivity is usually characteristic of sulfhydryl groups involved in catalysis. For this reason, they are readily subjected to oxidation and S-nitrosylation. Experiments show that substitution of amino acids increasing the reactivity of SH-groups makes it possible to protect enzymes from modification with insignificant change in catalytic activity. In some works, additional SH-groups are introduced to stabilize enzymes by formation of intramolecular disulfide bonds. However, such a technique sometimes causes the opposite effect due to oxidation (including irreversible) of SH-groups, which prevents the formation of disulfide bonds. A presence of unpaired SH-groups is especially dangerous due to the formation of inter-polypeptide cross-links. Thus, the study of mechanisms of posttranslational modifications of sulfhydryl groups is important not only for understanding pathological processes, but also for creating recombinant proteins with optimal properties.

*The work was funded by Russian Science Foundation, Project No 24-44-20003.*

## МУТАНТЫ КРАСНОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА TagRFP С ПОНИЖЕННОЙ ИММУНОГЕННОСТЬЮ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ВО ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ МОДЕЛЯХ

И.Г. Меерович, Н.К. Марынич, А.В. Гавшина, А.П. Савицкий

Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Генетически-кодируемые сенсоры на основе цветных флуоресцентных белков (ФБ) на протяжении двух десятилетий являются признанным инструментом для эффективного неинвазивного мониторинга в экспериментальной онкологии. Однако при использовании флуоресцирующих опухолевых моделей у иммунокомпетентных мышей необходимо учитывать, что многие ФБ могут вызывать иммунный ответ организма-хозяина, особенно в результате противоопухолевой терапии. Это может как повлиять на корректность оценки эффективности противоопухолевой терапии опухоли и ее отдаленных метастазов, так и привести к невозможности моделирования рецидива заболевания. Одним из подходов к решению этой проблемы может служить генно-инженерная модификация ФБ, которая бы уменьшала его иммуногенность для экспериментальных животных, одновременно не изменяя его основных физико-химических свойств, например, спектральных.

Мы оценили аминокислотную последовательность белка TagRFP в отношении наличия потенциальных эпитопов Т-клеток мышей линии BALB/c при помощи интернет-ресурса NetMHC-4.0. Из них были выбраны наиболее успешно расположенные, исходя из влияния возможных аминокислотных замен на фолдинг белка и созревание флуорофора; в первую очередь, это эпитопы, расположенные на С-конце за пределами  $\beta$ -бочонка ФБ.

На основании аланинового сканирования выявленных эпитопов с высокой аффинностью были выбраны положения, в которых замена аминокислоты приводила к существенному уменьшению аффинности, при этом не появлялось новых потенциальных эпитопов. В соответствии с результатами расчетов был проведен сайт-направленный мутагенез белка TagRFP в положениях 225 (Tyr в исходном белке) и 228 (Leu в исходном белке). Новые белки были экспрессированы в *E. coli*, наработаны и очищены. Было показано, что произведенные замены не оказали существенного влияния на спектральные свойства белков.

Полученные после двукратной иммунизации мышей BALB/c белком TagRFP «дикого типа» (TagRFP-WT) и его мутантными формами сыворотки крови были оценены при помощи ИФА в отношении связывания с белком TagRFP-WT. В частности, было показано, что связывание мышиной сыворотки после иммунизации мутантом TagRFP с заменой Leu на Ala в 228 положении уменьшается более чем в 5 раз по сравнению с сывороткой после иммунизации TagRFP-WT.

*Работа поддержана грантом РФФ № 24-24-00550.*

## RED FLUORESCENT PROTEIN TagRFP MUTANTS WITH REDUCED IMMUNOGENICITY FOR USING IN FLUORESCENT TUMOR MODELS

I.G. Meerovich, N.K. Marynich, A.V. Gavshina, A.P. Savitsky

A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology", Russian Academy of Sciences, Moscow

Genetically encoded sensors based on color fluorescent proteins (FPs) have been for two decades a recognized tool for effective non-invasive monitoring in experimental oncology. However, when using fluorescent tumor models in immunocompetent mice, it must be taken into account that many FPs can trigger the host immune response, especially as a result of antitumor therapy. This can both affect the correctness of estimation of the effectiveness of antitumor therapy of the tumor and its distant metastases, and lead to the impossibility of disease recurrence modeling. One of the approaches to solving this problem could be a genetic engineering modification of FP, which would reduce its immunogenicity for experimental animals, while would not changing its basic physicochemical properties, for example, spectral.

We estimated the aminoacid sequence of the TagRFP protein for the presence of potential epitopes of T cells of BALB/c mice using the Internet resource NetMHC-4.0. The most successfully located ones were selected based on the effect of possible amino acid substitutions on protein folding and fluorophore maturation; first of all, these are epitopes located at the C-terminus outside the  $\beta$ -barrel of the FP.

Based on the alanine scanning of identified high-affinity epitopes, positions were selected where the amino acid's substitution resulted in a significant decrease in affinity without introducing of new potential epitopes. In accordance with these calculation results, site-directed mutagenesis of the TagRFP was carried out at positions 225 (Tyr in the original protein) and 228 (Leu in the original protein). New proteins were expressed in *E. coli*, produced and purified. It was shown that the substitutions made did not have a significant effect on the spectral properties of the proteins.

Blood sera obtained after double immunization of BalB/C mice with the «wild-type» protein TagRFP (TagRFP-WT) and its mutant forms were estimated for binding to the TagRFP-WT protein by ELISA. In particular, it was shown that the binding of mice serum after immunization with a mutant of the TagRFP protein with the replacement of Leu by Ala at position 228 decreases by more than 5 times compared to serum after TagRFP-WT immunization.

*The research was supported by the Russian Science Foundation (RSF), grant No. 24-24-00550.*

## РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЙ ПРОИЗВОДСТВА РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ- ПРОБЛЕМЫ ПРОМЫШЛЕННОЙ АДАПТАЦИИ И МАСШТАБИРОВАНИЯ

**А.В. Липкин, С.Ю. Филькин, А.О. Макарова, Е.В. Морозкина, Д.С. Шлыкова, Д.Д. Ахременко, И.Ю. Волков, М.С. Юркова, Н.С. Плеханова, А.Н. Федоров**

*ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва*

Рекомбинантные белки – важный инструмент современной биотехнологии. На основе рекомбинантных белков есть возможность создавать продукты для таких областей промышленности, как пищевая, текстильная, спиртовая, целлюлозно-бумажное производство и сельское хозяйство. В основе получения успешной продукции лежит множество факторов. Самый основной из них – выбор и модификация биопродукента. Однако технология производства рекомбинантных белков многоступенчатая и многофакторная. Первым этапом является создание идеального биопродукента, отвечающего всем требованиям конечного производства (наличие или отсутствие антибиотикорезистентности у штамма-продукента, простота выделения и чистота конечного продукта, отсутствие примесей нуклеиновых кислот, состав конечного биопрепарата и условия хранения). На втором этапе осуществляется подбор оптимальных условий культивирования для получения максимальных выходов целевого продукта. Третий этап посвящен разработке технологии выделения, очистки и хранения целевого продукта, основанной на минимальном количестве этапов, простоте, дешевизне процесса, позволяющего получать продукт с минимальными потерями, максимальным выходом и соблюдением требований по качеству и количеству. Каждый рекомбинантный белок уникален. Разработанный алгоритм позволяет работать с любым белком.

*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).*

## DEVELOPMENT OF TECHNOLOGIES FOR THE PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEINS - PROBLEMS OF INDUSTRIAL ADAPTATION AND SCALING

**A.V. Lipkin, S.Yu. Filkin, A.O. Makarova, E.V. Morozkina, D.S. Shlykova, D.D. Akhremenko, I.Yu. Volkov, M.S. Yurkova, N.S. Plekhanova, A.N. Fedorov**

*Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology», Russian Academy of Sciences, Moscow*

Recombinant proteins are an important tool of modern biotechnology. Based on recombinant proteins, it is possible to create products for such industries as food, textile, alcohol, pulp and paper production and agriculture. There are many factors that underlie obtaining successful products. The most basic of them is the selection and modification of the bioproducer. However, the technology of producing recombinant proteins is multi-stage and multi-factorial. The first stage is the creation of an ideal bioproducer that meets all the requirements of the final production (the presence or absence of antibiotic resistance in the producer strain, ease of isolation and purity of the final product, the absence of nucleic acid impurities, the composition of the final biopreparation and storage conditions). At the second stage, the selection of optimal cultivation conditions is carried out to obtain maximum yields of the target product. The third stage is devoted to the development of a technology for the isolation, purification and storage of the target product, based on a minimum number of stages, simplicity, low cost of the process, allowing to obtain the product with minimum losses, maximum yield and compliance with quality and quantity requirements. Each recombinant protein is unique. The developed algorithm allows to work with any protein.

*This study was funded by a grant from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement #075-15-2021-1071).*

### ЭКСПРЕССИЯ НЕФУНКЦИОНАЛЬНОГО ВАРИАНТА $\alpha 7$ -nAChR ОПОСРЕДУЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ КЛЕТОК МЕТАСТАТИЧЕСКИХ МЕЛАНОМ К ПРОТИВООПУХОЛЕВОМУ БЕЛКУ SLURP-1

А.В. Кириченко, М.Л. Бычков, Д.С. Кульбацкий, М.А. Шулепко, О.В. Шлепова, И.Н. Михайлова, О.С. Бурова, И.А. Медяник, К.С. Яшин, М.П. Кирпичников, Е.Н. Люкманова

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

Меланома – агрессивная опухоль, прогрессия которой сопровождается снижением экспрессии трехпальцевого белка SLURP-1 семейства Ly6/uPAR (Bergqvist et al., 2018). Данный белок регулирует гомеостаз эпителия путем аллостерического ингибирования никотиновых ацетилхолиновых рецепторов типа альфа 7 ( $\alpha 7$ -nAChR) (Lyukmanova et al., 2016).

В данной работе была изучена применимость восполнения дефицита SLURP-1 рекомбинантным аналогом (rSLURP-1) для контроля гомеостаза клеток меланомы. Мы показали, что количество эндогенного SLURP-1 в плазме пациентов с меланомой снижено по сравнению со здоровыми донорами. rSLURP-1 ингибировал миграцию клеток, полученных от пациентов с метастатической меланомой, посредством  $\alpha 7$ -nAChR и подавления промигранционного фактора транскрипции SNAI1. Однако клетки метастатической меланомы, устойчивые к rSLURP-1, обладали более высоким уровнем экспрессии химерного нефункционального варианта  $\alpha 7$ -nAChR, называемого dupa7 (Di Lascio et al., 2022). Снижение экспрессии dupa7 в клетках, устойчивых к rSLURP-1, вызывала чувствительность к белку, тогда как увеличение экспрессии dupa7 в чувствительных клетках превращало их в резистентные. rSLURP-1 не связывался с dupa7 и не действовал на рецепторы, образуемые при совместной экспрессии dupa7 с  $\alpha 7$ -nAChR в ооцитах *Xenopus laevis*. Мы предполагаем, что небольшое количество сайтов связывания SLURP-1 и dupa7 не влияет на взаимодействие и функцию rSLURP-1 в клетках меланомы, но повышение уровня dupa7 вызывает более явное уменьшение сайтов взаимодействия рецептора с rSLURP-1 и приводит к потере чувствительности клеток к модулятору. Таким образом, наши результаты показывают, что таргетирование  $\alpha 7$ -nAChR с помощью rSLURP-1 может быть многообещающей стратегией терапии меланомы и указывает на важную роль dupa7 в регуляции холинергической системы в раковых клетках.

Учет экспрессии dupa7 для разработки лечения меланомы, нацеленного на  $\alpha 7$ -nAChR, имеет большое значение при разработке новых терапевтических стратегий.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект №23-74-00040).*

### EXPRESSION OF A NONFUNCTIONAL VARIANT OF $\alpha 7$ -nAChR MEDIATES RESISTANCE OF METASTATIC MELANOMA CELLS TO THE ANTITUMOR PROTEIN SLURP-1

A.V. Kirichenko, M.L. Bychkov, D.S. Kulbatskii, M.A. Shulepko, O.V. Shlepova, I.N. Mikhaylova, O.S. Burova, I.A. Medyanik, K.S. Yashin, M.P. Kirpichnikov, E.N. Lyukmanova

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences

Melanoma is an aggressive tumor, the progression of which is accompanied by a decrease in the expression of the three-finger protein SLURP-1 of the Ly6/uPAR family (Bergqvist et al., 2018). This protein regulates epithelial homeostasis by allosteric inhibition of nicotinic acetylcholine receptors of the alpha 7 type ( $\alpha 7$ -nAChR) (Lyukmanova et al., 2016).

In this work, we studied the applicability of SLURP-1 deficiency replenishment with a recombinant analogue (rSLURP-1) to control melanoma cell homeostasis. We showed that the amount of endogenous SLURP-1 in the plasma of melanoma patients is reduced compared to healthy donors. rSLURP-1 inhibited migration of patient-derived metastatic melanoma cells via  $\alpha 7$ -nAChR and downregulation of the pro-migration transcription factor SNAI1. However, rSLURP-1-resistant metastatic melanoma cells had higher levels of expression of a chimeric non-functional variant of  $\alpha 7$ -nAChR called dupa7 (Di Lascio et al., 2022). Decreased dupa7 expression in rSLURP-1-resistant cells rendered them sensitive to the protein, whereas increased dupa7 expression in sensitive cells rendered them resistant. rSLURP-1 did not bind to dupa7 or act on receptors formed by co-expression of dupa7 and  $\alpha 7$ -nAChR in *Xenopus laevis* oocytes. We suggest that the small number of SLURP-1 and dupa7 binding sites does not affect the interaction and function of rSLURP-1 in melanoma cells, but an increase in dupa7 levels causes a more pronounced decrease in the receptor interaction sites with rSLURP-1 and leads to a loss of cell sensitivity to the modulator. Thus, our results indicate that targeting  $\alpha 7$ -nAChR with rSLURP-1 may be a promising strategy for melanoma therapy and indicate an important role of dupa7 in the regulation of the cholinergic system in cancer cells.

Taking into account dupa7 expression for the development of melanoma treatment based on targeting  $\alpha 7$ -nAChR is of great importance in the development of new therapeutic strategies.

*The work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 23-74-00040).*

## ВЛИЯНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ КОДОНОВ НА УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

**К.С. Зайцев, Н.С. Богатырева**

*ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва*

Возможность настраивать уровень экспрессии белка в клетке имеет особую важность в современной биотехнологии. В связи с этим было разработано множество алгоритмов для предсказания экспрессии генов на основании их нуклеотидных последовательностей. Самым известным и наиболее популярным из них является Codon Adaptation Index (CAI), основанный на определении оптимальных кодонов на основании набора хорошо экспрессируемых генов. Мы проанализировали экспериментальные данные уровней экспрессии 1688 генов *Escherichia coli* ATCC 25922, полученные методом количественной протеомики. Основываясь на этих данных, мы разработали два новых индекса: Codon Expression Index (CEI) и Codon Productivity (CP), показывающих степень влияния каждого из отдельных кодонов на интегральный уровень экспрессии генов. Индексы основаны исключительно на статистических методах и анализируют частоты встречаемости кодонов в генах с разными уровнями экспрессии.

Полученные индексы были применены для предсказания экспрессии и показали уровень корреляции  $r=0.7$  между предсказанными и экспериментально измеренными значениями экспрессии, что превосходит любые ранее предложенные методы (CAI на том же наборе данных показал корреляцию  $r=0.63$ ). Расчет Codon Expression Index и Codon Productivity, а также предсказание уровней экспрессии генов с использованием этих метрик можно выполнить при помощи модуля «cei» для Python, доступному в PyPI по адресу <https://pypi.org/project/cei/>.

*Работа была выполнена при частичной финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках программы по развитию генетических технологий на 2019-2027 гг. (Соглашение № 075-15-2021-1071).*

## INDIVIDUAL CODON INFLUENCE ON GENE EXPRESSION

**K.S. Zaytsev, N.S. Bogatyreva**

*Federal Research Centre 'Fundamentals of Biotechnology', Russian Academy of Sciences, Moscow*

An ability to adjust protein production of a gene is of particular importance for modern biotechnology. Therefore a number of algorithms for prediction of protein expression from the nucleotide sequences of corresponding genes were developed. The most popular and well known of them all is Codon Expression Index (CAI), which is based on determining organism's preferred codons for each amino acid from their occurrence in well-expressed genes. We analysed experimental quantitative proteomic values for 1688 genes from *Escherichia coli* ATCC 25922. Based on this data we developed two new statistical indices: Codon Expression Index (CEI) and Codon Productivity (CP), which demonstrate the influence of each individual codon in the gene on the overall expression level of the encoded protein. These indices are based on the differences in codon frequencies between genes with different expression levels.

Both indices were used for expression prediction and achieved a correlation coefficient of  $r=0.7$  between the predicted and experimentally measured expression values, which is superior to any previously proposed methods (CAI achieves a correlation level of  $r=0.63$ ). Codon Expression Index and Codon Productivity as well as expression prediction with these indices can be achieved with the "cei" module for Python, which is available from PyPI at <https://pypi.org/project/cei/>.

*This study was partially funded by a grant from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement № 075-15-2021-1071).*

## ВЛИЯНИЕ ПРОЦЕССОВ НЕ-АЦЕТИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ НА РЕГУЛЯЦИЮ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПОТОКОВ В *ESCHERICHIA COLI*

Н.С. Плеханова<sup>1</sup>, М.С. Юркова<sup>1</sup>, И.Б. Альтман<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; <sup>2</sup>МИРЭА – Российский технологический университет, Москва

Ацетилирование остатков лизина является глобальным регуляторным механизмом, который влияет на большинство клеточных процессов. В данной работе мы изучили влияние ацетилирования и деацетилирования на активность белков глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) *E. coli* дикого типа и мутантных форм. Наши результаты показали, что обработка фермента ГАФД дикого типа основной и наиболее охарактеризованной ацетилтрансферазой *E. coli* PatZ *in vitro* приводила к двукратному увеличению ферментативной активности, в то время как последующее деацетилирование снижало активность фермента до уровня, близкого к исходному. В случае мутантных форм фермента было показано, что появление дополнительных сайтов ацетилирования существенно изменяло влияние процессов ацетилирования/деацетилирования на активность ГАФД. Также нами были выбраны широко используемые штаммы MG1655 (*E. coli* K12) и BL21(DE3) (*E. coli* B), которые показали свою эффективность при получении на их основе продуцентов биологически активных веществ. Показатели удельной активности ГАФД, кодируемой хромосомной копией гена *gapA* в штаммах MG1655 и BL21(DE3), значительно различаются. При полной идентичности аминокислотных последовательностей белков в обоих штаммах, показатель удельной активности белкового препарата ГАФД в штамме MG1655 линии K-12 на 35% превышает удельную активность того же белка в штамме линии B. Для того, чтобы оценить влияние ацетилирования на активность ГАФД *in vivo*, была создана плаزمид, несущая ген *patZ*, подходящая для коэкспрессии в штаммах *E. coli* K и B. Показатели активности фермента, как и в случае ацетилирования *in vitro*, увеличивались вдвое при совместной экспрессии двух плазмид, несущих гены *gapA* и *patZ*, в штамме MG1655, что не наблюдалось в штамме BL21(DE3), где уровень удельной активности ГАФД мало изменялся в присутствии гена ацетилтрансферазы. Для того чтобы прояснить причины столь существенного различия в активности фермента в разных штаммах, с помощью масс-спектрометрического анализа были идентифицированы ацетилированные аминокислотные остатки лизина в белках ГАФД, синтезированных в штаммах MG1655 и BL21(DE3). Аминокислотные остатки в белках ацетилированы по-разному, что демонстрирует корреляцию этих процессов с особенностями метаболизма штаммов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках программы по развитию генетических технологий на 2019–2027 гг. (Соглашение No 075-15-2021-1071).

## EFFECT OF NE-ACETYLATION OF PROTEINS ON ON THE REGULATION OF METABOLIC PATHWAY IN *ESCHERICHIA COLI*

N.S. Plekhanova<sup>1</sup>, M.S. Yurkova<sup>1</sup>, I.B. Altman<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology»; <sup>2</sup>MIREA – Russian Technological University, Moscow

Acetylation of lysine residues is a global regulatory mechanism that affects most cellular processes. In this work, we studied the effect of acetylation and deacetylation on the activity of wild-type and mutant *E. coli* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) proteins. Our results showed that treatment of the wild-type GAPDH enzyme with the main and best-characterized *E. coli* acetyltransferase PatZ *in vitro* led to a two-fold increase in enzymatic activity, while subsequent deacetylation decreased the enzyme activity to a level close to the initial one. In the case of mutant forms of the enzyme, it was shown that the appearance of additional acetylation sites significantly changed the effect of acetylation/deacetylation processes on GAPDH activity. We also selected the widely used strains MG1655 (*E. coli* K12) and BL21(DE3) (*E. coli* B), which have shown their effectiveness in obtaining producers of biologically active substances on their basis. The specific activity indices of GAPDH, encoded by the chromosomal copy of the *gapA* gene in the strains MG1655 and BL21(DE3), differ significantly. With complete identity of the amino acid sequences of proteins in both strains, the specific activity of the protein preparation GAPDH in the MG1655 strain of the K-12 line is 35% higher than the specific activity of the same protein in the B strain. In order to assess the effect of acetylation on the activity of GAPDH *in vivo*, a plasmid carrying the *patZ* gene suitable for co-expression in *E. coli* strains K and B was created. The enzyme activity indices, as in the case of acetylation *in vitro*, doubled upon co-expression of two plasmids carrying the *gapA* and *patZ* genes in the MG1655 strain, which was not observed in the BL21(DE3) strain, where the level of specific activity of GAPDH changed little in the presence of the acetyltransferase gene. In order to clarify the reasons for such a significant difference in enzyme activity in different strains, acetylated amino acid residues of lysine in GAPDH proteins synthesized in strains MG1655 and BL21(DE3) were identified using mass spectrometric analysis. Amino acid residues in proteins are acetylated differently, which demonstrates the correlation of these processes with the metabolic features of the strains.

This study was partially funded by a grant from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement #075-15-2021-1071).



## РОЛЬ ГИДРОФОБНЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ В ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ КОЛЛАГЕНОВ

А.В. Ефимов<sup>1</sup>, О.В. Мещерякова<sup>2</sup>, М.А. Богданов<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт белка РАН, Пущино; <sup>2</sup>ФИЦ Карельский научный центр РАН, Петрозаводск; <sup>3</sup>Лаборатория интеллектуальных сервисов и приложений Университета ИТМО, Санкт-Петербург

Исследована роль гидрофобных аминокислотных остатков в поддержании термостабильности коллагенов. Для этого была собрана база данных, включающая около 1200 записей коллагенов, выделенных из различных видов животных. В нее вошли сведения из рецензируемых работ начиная 1959 года, по 340 видам животных различных филогенетических и экологических групп. В каждую запись включались данные: наименование животного, орган и условия экстракции коллагена, тип выделенного коллагена, субъединичный состав, параметры термостабильности (температура денатурации (Td) и/или температура плавления (Tm), максимальная температура перехода (Tmax), температура усадки (Ts)), метод определения термостабильности (круговой дихроизм (КД), дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК), вискозиметрия и др.), условия измерения (тип буфера, pH, скорость нагрева). Для изучения зависимости температурной стабильности коллагенов от содержания в них гидрофобных остатков было отобрано около 600 коллагенов, для которых в соответствующих работах был установлен аминокислотный состав, и на основе этого были рассчитаны доли гидрофобных аминокислотных остатков  $f$  (%) в их молекулах. К ним относили Ala, Cys, Hyp, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Tyr, Val. Для построения зависимостей Tm/Td от величины  $f$ , % использовали данные дифференцированных по методам определения термостабильности (CD, DSC или вискозиметрией), условиям их измерения, типу коллагена, субъединичному составу и условиям его экстракции. Наилучшими считали выборки данных, полученных в одном эксперименте. Установлена зависимость между Tm или Td коллагенов и долей гидрофобных аминокислотных остатков в их молекулах ( $f$ ). Чем больше гидрофобных остатков, тем выше температурная стабильность коллагена. Установленная зависимость линейная в рамках физиологических температур. Обнаружены различия для теплокровных и хладнокровных организмов: при одной и той же гидрофобности температурная стабильность у теплокровных на 5-10°C выше, чем у хладнокровных. Таким образом, гидрофобные взаимодействия вносят такой же существенный вклад в устойчивость фибриллярных тройных спиралей коллагенов, как и в устойчивость глобулярных белков. Результаты могут быть использованы для создания коллагено-подобных молекул с заданными свойствами термостабильности.

## THE IMPORTANCE OF HYDROPHOBIC AMINO ACID RESIDUES IN THE THERMAL STABILITY OF COLLAGENS

A.V. Efimov<sup>1</sup>, O.V. Meshcheryakova<sup>2</sup>, M.A. Bogdanov<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino; <sup>2</sup>Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk; <sup>3</sup>Laboratory of Intellectual Services and Applications, ITMO University, St Petersburg

The role of hydrophobic amino acid residues in maintaining the thermal stability of collagens was studied. For this purpose, a database was compiled that included about 1200 records of collagens isolated from various animal species. It included information from peer-reviewed papers since 1959, on 340 animal species of various phylogenetic and ecological groups. Each record included: animal name, organ and collagen extraction conditions, type, subunit composition, thermal parameters (denaturation temperature (Td) and/or melting temperature (Tm), maximum transition temperature (Tmax) etc.), method for determining thermal stability (CD, DSC, viscosimetry, etc.), measurement conditions (buffer type, pH, heating rate). To study the relationship between the melting temperature (Tm) or denaturation temperature (Td) of collagens and the fraction of hydrophobic residues ( $f$ ) in their molecules about 600 collagens were selected, for which the amino acid composition was established in the relevant works, and on this basis the proportions of hydrophobic amino acid residues ( $f$  %) in their molecules were calculated. These included Ala, Cys, Hyp, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Tyr, Val. To construct the Tm/Td dependencies on the  $f$  value, %, we used data differentiated by the methods of determining thermal stability (CD, DSC or viscosimetry), the conditions of their measurement, the type of collagen, the subunit composition and the conditions of its extraction. The data samples obtained in one experiment were considered the best. A relationship has been established between Tm or Td of collagens and the proportion of hydrophobic residues in their molecules ( $f$ ). The more hydrophobic residues, the higher the temperature stability of collagen. The established relationship is linear within physiological temperatures. Differences have been found for warm-blooded and cold-blooded organisms: with the same hydrophobicity, the temperature stability of warm-blooded organisms is 5-10 °C higher than that of cold-blooded organisms. Thus, hydrophobic interactions make the same significant contribution to the stability of fibrillar triple helices of collagens as of globular proteins. The results can be used to create collagen-like molecules with specified thermal stability properties.

#### ОБМЕН СУБЪЕДИНИЦАМИ КО-ШАПЕРОНИНА GroES

**В.В. Марченков<sup>1</sup>, А.К. Сурин<sup>1,2</sup>, Н.В. Котова<sup>1</sup>, Н.Ю. Марченко<sup>1</sup>, А.Н. Федоров<sup>3</sup>, А.В. Финкельштейн<sup>1</sup>, В.В. Филимонов<sup>1</sup>, Г.В. Семисотнов<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт белка РАН, Пуцзино; <sup>2</sup>Филиал ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пуцзино; <sup>3</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Олигомерные белки, несмотря на значительную стабильность их четвертичных структур, могут кратковременно диссоциировать и обмениваться субъединицами. Изучение такого обмена вносит вклад в понимание процессов стабильности и динамики белковых структур. В данной работе мы показываем влияние pH, концентрации белка и мочевины на эффективность обмена субъединицами гептамера GroES (GroES7). Эквимолярную смесь GroES7 дикого типа (WT) и его мутанта Ala97Cys, модифицированного йодуксусной кислотой (97-карбоксиметилцистеин или СМС-GroES7) для внесения дополнительного отрицательного заряда, инкубировали в различных условиях и подвергали изоэлектрическому фокусированию в полиакриламидном геле, при котором белки распределяются в геле в соответствии со своей изоэлектрической точкой. Эта методика позволяет визуализировать и проанализировать распределения исходных и гибридных олигомеров GroES в результате обмена субъединицами. Стабильность белка оценивали с помощью электрофореза в поперечном градиенте мочевины. При pH 8.0 полувремя уменьшения доли исходных гептамеров (отражающее скорость обмена субъединицами) составляет (23±2) мин. Обмен субъединицами ослабляется с уменьшением pH и сильно затруднен при pH 5,2, по-видимому, из-за протонирования групп с pK~6,3, стабилизирующих четвертичную структуру белка. Дестабилизация четвертичной структуры белка, вызванная повышением pH, снижением концентрации белка или увеличением концентрации мочевины, ускоряет обмен субъединицами GroES. Данное исследование позволяет визуализировать обмен субъединиц в олигомерных белках и подтверждает его прямую связь со стабильностью четвертичной структуры белка.

#### CO-CHAPERONIN GroES SUBUNIT EXCHANGE

**V.V. Marchenkov<sup>1</sup>, A.K. Surin<sup>1,2</sup>, N.V. Kotova<sup>1</sup>, N.Y. Marchenko<sup>1</sup>, A.N. Fedorov<sup>3</sup>, A.V. Finkelstein<sup>1</sup>, V.V. Filimonov<sup>1</sup>, G.V. Semisotnov<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino; <sup>2</sup>Branch of Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Pushchino; <sup>3</sup>Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow

Despite the considerable stability of their quaternary structures, oligomeric proteins are able to transiently dissociate and exchange their subunits. The study of such an exchange process contributes to our understanding of the stability and dynamics of protein structures. In this work, we investigate the effects of pH, protein concentration, and urea on the subunit exchange efficiency of the GroES heptamer (GroES7). An equimolar mixture of the wild-type (WT) GroES7 protein and its Ala97Cys mutant modified with iodoacetic acid to introduce an additional negative charge (97-carboxymethylcysteine or CMC-GroES7), was incubated under different conditions and then subjected to isoelectric focusing (IEF) in a polyacrylamide gel. Using the IEF technique causes proteins to distribute in the gel based on their isoelectric points. This method allows the visualization and analysis of the distribution of the original and hybrid GroES oligomers resulting from subunit exchange. The protein stability is evaluated using the transverse urea gradient gel electrophoresis. At pH 8.0, the half-life of the decrease in the initial heptamer fraction (reflecting the rate of subunit exchange) was (23±2) minutes. The subunit exchange becomes weaker as the pH decreases and is greatly hindered at pH 5.2. This is likely due to the protonation of groups with a pK value around 6.3, stabilizing the quaternary structure of the protein. The destabilization of the quaternary structure of the protein caused by increasing pH, decreasing protein concentration, or increasing urea concentration accelerates the exchange of GroES subunits. This study allows visualizing the subunit exchange in oligomeric proteins and confirms its direct connection with the stability of the protein's quaternary structure.

### **Sm-ПОДОБНЫЕ БЕЛКИ КАК ОСНОВА ДЛЯ МОДУЛЬНОЙ БЕЛКОВОЙ ИНЖЕНЕРИИ: ВАРИАНТЫ, РЕЗУЛЬТАТЫ, ОГРАНИЧЕНИЯ**

**В.А. Балобанов, А.Р. Хайретдинова, Н.Б. Ильина, Н.В. Леконцева, В.В. Марченков, О.С. Никонов, А.О. Михайлина**  
*Институт белка РАН, Пушкино*

Получение новых белков путём перестановки и комбинации уже существующих доменов один из основных путей эволюции белков. Этот же путь один из самых популярных в белковой инженерии. Наша работа посвящена проектированию и получению белков на основе кольцевых гомоолигомерных Sm-подобных белков. В работе рассмотрены несколько новых белков. Базовый модуль у них сходный, а присоединяемые модули весьма разнообразны. Это амилоидный пептид А-бета, мономерный домен белка L1, кольцевой олигомерный апикальный домен шаперона GroEL и полипептид, образующий трансмембранный канал. Логика работы для каждого белка была сходная: 1) идея, 2) подбор модулей, 3) анализ структур, 4) проектирование линкера, 5) генная инженерия, 6) получение и очистка белка, 7) экспериментальная проверка. Имеющаяся у нас коллекция Sm-подобных белков позволяет подобрать основу с необходимым количеством мономеров в кольце. Мы использовали гексамерный белок Hfq из *P. aeruginosa* и гептамерный Sm белок из *S. acidocaldarius*. Присоединяемые модули перечислены выше. Структура модулей была проанализирована с целью определения необходимой длины и структуры линкеров. Для трансмембранного белка также была определена геометрические параметры получаемого канала. Получение генетических конструкций было проведено стандартными генно-инженерными методами. В соответствии с особенностями физико-химических свойств получаемых белков были подобраны системы синтеза и методики выделения и очистки.

Мы исследовали процесс сворачивания полученных белков. Для этого были использованы методы КД, флуоресценции и динамического рассеяния света. Полученные белки обладают способностью к самоорганизации. Причём, за счёт значительной разницы стабильностей базового модуля и присоединённых доменов, это сворачивание происходит поэтапно – сначала база затем довесок. Активность новых белков была исследована подходящими функциональными тестами.

Проделанная работа позволила оценить возможности и ограничения Sm-подобных белков как базового модуля для белковой инженерии. Проектирование достаточно просто и не требует значительных вычислительных мощностей. Полученные результаты открывают хорошие перспективы для применения используемых нами Sm-подобных белков как модуля в белковой инженерии.

*Работа поддержана грантом РФФ 22-24-00934.*

### **Sm-LIKE PROTEINS AS A BASIS FOR MODULAR PROTEIN ENGINEERING: OPTIONS, RESULTS, LIMITATIONS.**

**V.A. Balobanov, A.R. Khairtadinova, N.B. Ilina, N.V. Lekontseva, V.V. Marchencov, O.S. Nikonov, A.O. Mikhaylina**  
*Institute of Protein Research, Pushchino*

Obtaining new proteins by rearranging and combining of existing domains is one of the main ways of protein evolution. This way is also one of the most popular in protein engineering. Our work is devoted to the design of new proteins based on ring homooligomeric Sm-like proteins. Several new proteins are considered in the work. They have a similar basic module, and the attached modules are very diverse. These are amyloid peptide A-beta, monomeric domain of protein L1, ring oligomeric apical domain of chaperone GroEL and a polypeptide that forms a transmembrane channel. The logic of the work for each protein was similar: 1) idea, 2) module selection, 3) structure analysis, 4) linker design, 5) genetic engineering, 6) protein production and purification, 7) experimental verification. Our collection of Sm-like proteins allows us to select the required number of monomers in the base ring. We used the hexameric Hfq protein from *P. aeruginosa* and the heptameric Sm protein from *S. acidocaldarius*. The attached modules are listed above. The structure of the modules was analyzed to determine the required length and structure of the linkers. The geometric parameters of the resulting channel were also determined for the transmembrane protein. Genetic constructs were obtained using standard methods. Synthesis systems, isolation and purification methods were selected in accordance with the physicochemical properties of the proteins obtained.

We studied the folding process of the obtained proteins. For this, CD, fluorescence and dynamic light scattering methods were used. The obtained proteins have the ability to self-organize. Moreover, due to the significant difference in the stabilities of the basic module and the attached domains, this folding occurs in stages - first the base, then the appendage. We also investigated the functional activity of these proteins.

The work performed allowed us to evaluate the capabilities and limitations of Sm-like proteins as a basic module for protein engineering. The design is quite simple and does not require significant computing power. The results obtained open up good prospects for the use of Sm-like proteins used by us as a module in protein engineering.

*The work was supported by the Russian Science Foundation grant: 22-24-00934.*

#### РАЗРАБОТКА МУЛЬТИМОДАЛЬНЫХ ГИБРИДНЫХ БЕЛКОВЫХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ КОМПЛЕКСНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ОПУХОЛИ И ОПУХОЛЕВОЕ МИКРООКРУЖЕНИЕ

А.В. Яголович<sup>1,2</sup>, А.А. Исакова<sup>1,2</sup>, Е.В. Куковьякина<sup>1</sup>, М.П. Кирпичников<sup>1,2</sup>, М.Э. Гаспарян<sup>1</sup>, Д.А. Долгих<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; <sup>2</sup>Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Комплексное воздействие не только непосредственно на опухолевые клетки, но и на опухолевое микроокружение является перспективным направлением терапии солидных опухолей. Известно, что важную роль в формировании опухолевой стромы играет активация рецепторов фактора роста фибробластов FGF, в первую очередь FGFR1. При этом активация сигнальных путей цитокина TRAIL, компонента иммунологического надзора, в опухолевых клетках приводит к избирательной элиминации трансформированных клеток путем апоптоза при связывании с рецепторами смерти, в первую очередь с рецептором DR5. Цель работы заключалась в разработке биспецифических гибридных белковых конструкций на основе агониста рецептора DR5, рецептор-селективного варианта цитокина TRAIL DR5-B, содержащих антагонистический пептид, блокирующий взаимодействие FGF/FGFR1. Новые рекомбинантные белковые конструкции были экспрессированы в виде единой полипептидной цепи в *E. coli* и очищены с помощью металл-аффинной и ионообменной хроматографии. Аффинность к рецепторам-мишеням была показана с помощью иммуноферментного анализа. Новые белковые конструкции сохраняли стабильность в растворе и обладали высокой цитотоксической активностью на линиях клеток солидных опухолей человека различного происхождения *in vitro*. Дальнейшие исследования на ксенографтных мышинных моделях солидных опухолей человека *in vivo* покажут возможность применения новых биспецифических белковых конструкций для комплексного ингибирования опухолевого роста.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-14-00250, <https://rscf.ru/project/24-14-00250/>.*

#### DEVELOPMENT OF MULTIMODAL FUSION PROTEINS FOR COMPLEX EFFECTS ON TUMORS AND THE TUMOR MICROENVIRONMENT

A.V. Yagolovich<sup>1,2</sup>, A.A. Isakova<sup>1,2</sup>, E.V. Kukovyakina<sup>1</sup>, M.E. Gasparian<sup>1</sup>, M.P. Kirpichnikov<sup>1,2</sup>, D.A. Dolgikh<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences; <sup>2</sup>Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow

A complex effect not only directly on tumor cells, but also on the tumor microenvironment is promising for the treatment of solid tumors. It is known that activation of fibroblast growth factor (FGF) receptors, primarily FGFR1, plays an important role in the formation of tumor stroma. At the same time, activation of the signaling pathways of the cytokine TRAIL, a component of immunosurveillance, in tumor cells leads to the selective elimination of transformed cells by apoptosis upon binding to death receptors, primarily the DR5 receptor. The aim of the work was to develop bispecific fusion protein constructs based on the DR5 receptor agonist, a receptor-selective TRAIL variant DR5-B, containing an antagonistic peptide that blocks the FGF/FGFR1 interaction. The novel recombinant protein constructs were expressed in *E. coli* and purified by consecutive metal affinity and ion exchange chromatography. Affinity for target receptors was investigated using enzyme-linked immunosorbent assay. The novel protein constructs remained stable in solution and obtained high cytotoxic activity *in vitro* on the cell lines of human solid tumors of various origin. Further studies on xenograft mouse models of human solid tumors will show the ability of the novel bispecific protein constructs to inhibit tumor growth *in vivo*.

*The study was supported by a grant from the Russian Science Foundation No. 24-14-00250, <https://rscf.ru/project/24-14-00250/>.*

## ВЛИЯНИЕ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН В НЕЙРОГЛОБИНЕ И ЦИТОХРОМЕ С НА РЕАКЦИЮ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНА МЕЖДУ НИМИ

М.А. Семенова<sup>1</sup>, Ж.В. Бочкова<sup>2</sup>, О.М. Смирнова<sup>1</sup>, Н.А. Браже<sup>2</sup>, Г.В. Максимов<sup>2</sup>, М.П. Кирпичников<sup>1,2</sup>, Д.А. Долгих<sup>1,2</sup>, Р.В. Чертова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; <sup>2</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва

Нейроглобин (Ngb) и цитохром с (Cyt c) – гемсодержащие белки, взаимодействие которых считается одним из возможных механизмов нейропротекторной функции Ngb. При взаимодействии данных белков происходит перенос электрона от Ngb к Cyt c, что приводит к блокированию запуска апоптоза по Cyt c-зависимому пути, т.к. восстановленный Cyt c не способен взаимодействовать с апоптоз-активирующим фактором-1 с последующим образованием апоптосомы. При этом механизм взаимодействия Ngb с Cyt c на данный момент изучен недостаточно, структура комплекса неизвестна. Поэтому представляется актуальным изучение влияния аминокислотных замен на реакцию переноса электрона между данными белками, что в последующем может стать основой для рационального дизайна препаратов для терапии различных заболеваний, ассоциированных с гибелью нейрональных клеток. Нами были сконструированы и получены мутантные Ngb (E60K, K67E, E87K, K95E, E60K/E87K) и Cyt c (K25E, K72E, K25E/K72E) с заменами в предполагаемом интерфейсе их взаимодействия, а также с заменами в красной петле Cyt c (T78S/K79P (M2) и P76I/G77L/I81L/F82L (M4) и универсальном сайте связывания Cyt c (K8E/K27E/K72E/K86E/K87E/E62K/E69K/E90K – 8Mut).

Мы исследовали реакцию переноса электрона между вариантами (дикий тип и мутанты) Ngb и Cyt c с использованием разработанной нами ранее методики на основе спектроскопии комбинационного рассеяния. Было показано, что происходит нарушение либо замедление реакции переноса электрона для следующих пар: NgbWT-Cyt cK25E, NgbWT-Cyt c M2, NgbWT-Cyt c 8Mut, NgbE60K-Cyt cWT, NgbE60K/E87K-Cyt cWT. Полученные результаты предположительно связаны как с локальным изменением заряда аминокислотного остатка на противоположный, т.е. с нарушением электростатических взаимодействий между белками, так и с изменениями параметров гема, вызванными аминокислотными заменами. Так, белковое окружение гемов NgbE60K, NgbE60K/E87K, Cyt cK25E, Cyt c M2, Cyt c 8Mut можно охарактеризовать как более жесткое, по сравнению с таковым в белках дикого типа. В связи с этим, может быть нарушена подстройка гемов для эффективного переноса электрона от Ngb к Cyt c, что приводит к частичному или полному нарушению исследуемой окислительно-восстановительной реакции.

*Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант 22-24-00985).*

## AMINO ACID SUBSTITUTIONS IN NEUROGLOBIN AND CYTOCHROME C AFFECT THE ELECTRON TRANSFER REACTION BETWEEN THEM

М.А. Semenova<sup>1</sup>, Z.V. Bochkova<sup>2</sup>, O.M. Smirnova<sup>1</sup>, N.A. Brazhe<sup>2</sup>, G.V. Maksimov<sup>2</sup>, M.P. Kirpichnikov<sup>1,2</sup>, D.A. Dolgikh<sup>1,2</sup>, R.V. Chertkova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS; <sup>2</sup>Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow

Neuroglobin (Ngb) and cytochrome c (Cyt c) are heme proteins, their interaction is considered to be one of the possible mechanisms of the Ngb neuroprotection. The electron transfer from Ngb to Cyt c prevents the initiation of apoptosis along the Cyt c-dependent pathway, since ferrous Cyt c is unable to interact with apoptotic protease activating factor-1 with the subsequent formation of an apoptosome. However, the mechanism of Ngb-Cyt c interaction remain poorly understood to this day, the structure of the complex is unknown. Therefore, it seems relevant to study the effect of amino acid substitutions on the electron transfer reaction between these proteins, which can subsequently become the basis for the rational design of drugs for the treatment of various diseases associated with the neurons death.

We designed and obtained mutant Ngb (E60K, K67E, E87K, K95E, E60K/E87K) and Cyt c (K25E, K72E, K25E/K72E) with substitutions in the putative interaction surface, as well as with substitutions in the red loop of Cyt c (T78S/K79P (M2) and P76I/G77L/I81L/F82L (M4) and the universal binding site of Cyt c (K8E/K27E/K72E/K86E/K87E/E62K/E69K/E90K – 8Mut). We studied the electron transfer reaction between the variants (wild type and mutants) of Ngb and Cyt c using a previously developed technique based on Raman spectroscopy. It was shown that the reaction is disrupted or slowed down electron transfer for the following pairs: NgbWT-Cyt cK25E, NgbWT-Cyt c M2, NgbWT-Cyt c Mut, NgbE60K-Cyt cWT, NgbE60K/E87K-Cyt cWT. The obtained results are presumably associated with both local change in the charge of the amino acid residue to the opposite, i.e. with a disruption of electrostatic interactions between proteins, and with changes in the heme parameters caused by amino acid substitutions. Thus, the protein environment of the hemes of NgbE60K, NgbE60K/E87K, Cyt cK25E, Cyt c M2, Cyt c 8Mut can be characterized as more rigid, compared to that in the wild type proteins. In this regard, the heme adjustment for efficient electron transfer from Ngb to Cyt c may be disrupted, which leads to partial or complete disruption of the studied oxidation-reduction reaction.

*This research was funded by the Russian Science Foundation, grant number 22-24-00985.*

## МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ НЕОРГАНИЧЕСКАЯ ПИРОФОСФАТАЗА: СТРУКТУРНЫЙ ВЗГЛЯД НА КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И РЕГУЛЯЦИЮ

Е.В. Родина, Е.Ю. Безпала, С.А. Курилова, Н.Н. Воробьева

Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова; НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Биаллельные мутации в ядерном гене *ppa2*, кодирующем митохондриальную изоформу неорганической пирофосфатазы PPA2, вызывают серьезную дисфункцию митохондрий и приводят к кардиопатологиям [1]. Этот фермент гомологичен цитоплазматическим пирофосфатазам микроорганизмов, однако, в отличие от них, недостаточно изучен. Из данных литературы известно, что PPA2 играет важную роль в аэробном метаболизме дрожжей и животных и, возможно, способен взаимодействовать с мембранными комплексами митохондрий [2-3], однако точная метаболическая роль этого фермента до сих пор не охарактеризована. Для выяснения молекулярных основ данного заболевания необходимо более полное понимание метаболической роли PPA2, ее регуляции в клетке, а также влияния конкретных мутаций на структуру и функцию фермента. Данная работа направлена на структурную и функциональную характеристику *in vitro* рекомбинантной PPA2 человека (hPPA2) и ряда ее мутантных вариантов, соответствующих природным патогенным вариантам. Структура белка в динамике исследована для модельной структуры hPPA2 и ее мутантных вариантов методом симуляции молекулярной динамики. Анализ полученных результатов проливает свет на некоторые функциональные особенности фермента, например, формирование центра связывания субстрата в холоферменте, аллостерические эффекты, влияние патогенных мутаций на свойства PPA2 и др. В результате работы обнаружены ранее неизвестные эффекторы фермента, в числе которых NADH и глутатион, и исследованы возможные механизмы их действия. В структуре и последовательности hPPA2 проанализированы структурные детерминанты, отличающие митохондриальную изоформу от цитоплазматических пирофосфатаз, и высказаны предположения об их возможной роли.

1. Kennedy H et al. Sudden cardiac death due to deficiency of the mitochondrial inorganic pyrophosphatase PPA2. *Am J Human Genetics* 2016, 99: 674–682.
2. Lundin M, Baltscheffsky H, Ronne H. Yeast PPA2 gene encodes a mitochondrial inorganic pyrophosphatase that is essential for mitochondrial function. *J Biol Chem.* 1991, 266: 12168–12172.
3. Volk SE, Baykov AA, Kostenko EB, Avaeva SM. Isolation, subunit structure and localization of inorganic pyrophosphatase of heart and liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1983, 744: 127–134.

## MITOCHONDRIAL INORGANIC PYROPHOSPHATASE: STRUCTURAL INSIGHT INTO CATALYTIC PROPERTIES AND REGULATION

E. Rodina, E. Bezpalaya, S. Kurilova, N. Vorobyeva

Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia; A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow, Russia

Biallelic mutations in the nuclear gene *ppa2* coding mitochondrial inorganic pyrophosphatase PPA2 cause serious mitochondrial disorders and lead to cardio pathology [1]. This enzyme is homologous to cytoplasmic pyrophosphatases from microorganisms but, in contrast to the latter, is poorly characterized. According to the literature data, PPA2 is essential for the aerobic metabolism in yeast and animals and can be involved in the protein complexes in mitochondrial membranes [2, 3]. However, the exact metabolic role of PPA2 is not established. Characterization of the molecular basis of this pathology requires further understanding of the metabolic role of PPA2 and its regulation in the cell, as well as how particular mutations affect PPA2 structure and function. The present work is aimed at the structural and functional characterization *in vitro* of recombinant human PPA2 (hPPA2) and a number of its mutant variants corresponding to the natural pathogenic variants. Protein structure in dynamics is studied for the model structure of hPPA2 and its mutant variants using simulation of molecular dynamics. Analysis of the results sheds light to some functional properties of the enzyme like a formation of a substrate binding site in holoenzyme, allosteric effects, effects of pathogenic mutations on PPA2 structure and function, etc. One of the results of this work is the finding of novel effectors of PPA2 including NADH and glutathione. Possible mechanisms of their action is discussed. Structure and sequence analysis of hPPA2 are analyzed to establish structural determinants of a mitochondrial isoform in comparison with cytoplasmic pyrophosphatases, and their possible role is discussed.

1. Kennedy H et al. Sudden cardiac death due to deficiency of the mitochondrial inorganic pyrophosphatase PPA2. *Am J Human Genetics* 2016, 99: 674–682.
2. Lundin M, Baltscheffsky H, Ronne H. Yeast PPA2 gene encodes a mitochondrial inorganic pyrophosphatase that is essential for mitochondrial function. *J Biol Chem.* 1991, 266: 12168–12172.
3. Volk SE, Baykov AA, Kostenko EB, Avaeva SM. Isolation, subunit structure and localization of inorganic pyrophosphatase of heart and liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1983, 744: 127–134.

**РАЗРАБОТКА СОРБЕНТА ПРОТЕИН-А СЕФАРОЗЫ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ ФРАГМЕНТОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ IgG, ОБРАЗУЮЩИХСЯ ПРИ РАСЩЕПЛЕНИИ IgG ЭНДОПЕПТИДАЗАМИ**

**С.В. Константинова, В.Г. Лунин, И.С. Бокша, А.М. Лящук, О.В. Сергиенко, В.П. Даценко, К.Е. Никитин**  
*НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи; Научный центр психического здоровья, Москва*

С применением разработанной авторами оригинальной методики получены партии сферических частиц поперечно-сшитой агарозы с введенными активными карбоксильными группами. Методом клонирования и гетерологической экспрессии в *E. coli* получен белок А *Staphylococcus aureus* с оригинальной мутацией между альфа-спиральными участками, благодаря которой связывание с ним иммуноглобулинов IgG человека происходит при pH 7,5 так же эффективно, как и с белком А без мутаций, но диссоциация происходит в диапазоне pH 4,0–4,5, более близком к физиологическим условиям, чем в случае белка А без мутаций. Получены и отобраны наиболее удачные опытные образцы сорбента протеин А-сефарозы с максимальной способностью к связыванию IgG человека в диапазоне pH 7,5–7,7 и их диссоциации с сорбента при снижении pH до 4,0–4,5. Методом клонирования и гетерологической экспрессии в *E. coli* получены эндопептидазы различных микроорганизмов, в том числе IdeZ и IdeS *Streptococcus*, специфически расщепляющие тяжелые цепи IgG человека вблизи шарнирной области [1]. При расщеплении IgG эндопептидазами в растворе образовывались продукты расщепления IgG, из которых только Fc-фрагменты связывались с протеин А-сефарозой и элюировались с неё при снижении pH. В случае, когда с сорбентом сначала связывали нативные IgG, а затем их (в связанном состоянии) расщепляли IdeZ, часть Fc-фрагментов вместе с другими продуктами расщепления оказывалась во фракции, не связавшейся с сорбентом, а часть – элюировалась при снижении pH. Это свидетельствует о различии конформации Fc-фрагментов в составе нативных полипептидов IgG и в отщепленном состоянии. Таким образом, получены инструменты для молекулярных исследований IgG человека.

1. Бокша И.С., Лунин В.Г., Данилова Т.А. и др. Рекомбинантные эндопептидазы IdeS и IdeZ и возможный потенциал их применения. *Биохимия* 2023, 88(6): 900–912, DOI: 10.31857/S0320972523060027.

**DEVELOPMENT OF PROTEIN-A SEPHAROSE AND CHROMATOGRAPHY SEPARATION OF IGG FRAGMENTS FORMED AFTER THEIR CLEAVAGE BY IgG-DEGRADING ENDOPEPTIDASES**

**S.V. Konstantinova, V.G. Lunin, I.S. Boksha, A.M. Lyashchuk, O.V. Sergienko, V.P. Datsenko, K.E. Nikitin**  
*N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation; Mental Health Research Centre, Moscow*

Applying the original technique developed by the authors, spherical particles of cross-linked agarose with introduced active carboxyl groups were obtained. *Staphylococcus aureus* protein A with an original mutation between the alpha-helical regions was cloned and produced by heterologous expression in *E. coli*. The mutation endows the mutant protein A binding to human immunoglobulins IgG at pH 7.5 as effectively as wild type protein A, but dissociation occurs in the pH range of 4.0–4.5, that is closer to physiological conditions than in the case of the wild type protein A. The most successful experimental samples of protein A-sepharose sorbent were obtained and selected with the maximum ability to binding human IgG at pH 7.5–7.7, whereas the IgG dissociation from the sorbent occurred with lowering pH to 4.0–4.5. Endopeptidases from various microorganisms, including IdeZ and IdeS from *Streptococcus*, specifically cleaving human IgG heavy chains near the hinge region were obtained by cloning and heterologous expression in *E. coli* [1]. When IgG were cleft by the endopeptidases the IgG cleavage products were formed in solution, of which only Fc fragments bound to protein A-sepharose and were eluted when the pH was decreased. Alternatively, when native IgG were first bound to the sorbent and then cleaved (in the bound state) by IdeZ, some of the Fc fragments, together with other cleavage products, appeared in the fraction that was not bound to the sorbent, and some were consequently eluted when the pH was lowered. This indicates a difference in the conformation of the Fc fragments being a part of native IgG polypeptides and in their cleaved state. Thus, tools for molecular studies of human IgG have been obtained.

1. Boksha IS, Lunin VG, Danilova TA et al. Recombinant endopeptidases IdeS and IdeZ and their possible potential for use. *Biochemistry* 2023, 88(6): 900–912, DOI: 10.31857/S0320972523060027.

### **БИОКОМПОЗИТ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ДЛЯ ДОСТАВКИ L-АСПАРАГИНАЗЫ К КЛЕТКАМ МЕЛАНОМЫ**

**А.Н. Шишпарёнок, С.А. Королёва, Н.В. Добрякова, Е.В. Кудряшова, Ю.А. Гладилина, Д.Д. Жданов**

*НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва*

Фермент L-аспарагиназа (L-АСНаза) применяется для терапии острых лимфобластных лейкозов. Механизм терапевтического действия основан на гидролизе важной для лейкозных клеток аминокислоты L-аспарагина до аммиака и L-аспарагиновой кислоты. Нормальные здоровые клетки способны синтезировать L-аспарагин, а лейкозные не способны и зависят от поступления этой аминокислоты из микроокружения. Известно, что чувствительностью к L-АСНазе обладают не только клетки рака крови, но и клетки некоторых других солидных опухолей, прежде всего, некоторые клетки рака кожи меланомы. Основным препятствием для терапии данного типа рака L-АСНазой является короткое время полувыведения и быстрая инактивация фермента при внутривенном введении. Для решения данной проблемы предложен биоконкомпозит на основе плёнки бактериальной целлюлозы и иммобилизованной на ней L-АСНазой *Erwinia carotovora*. Различная продолжительность культивирования штамма продуцента *Komagataeibacter hansenii* (VKPM № В-11239) позволила получить плёнки бактериальной целлюлозы с различной толщиной и пористостью. Эти показатели определяют содержание воды и способность плёнки адсорбировать и высвободить L-АСНазу. Инфракрасная спектроскопия подтвердила адсорбцию фермента на плёнках бактериальной целлюлозы. Суммарную активность адсорбированной L-АСНазы и ее высвобождение исследовали для плёнок, выращенных в течение 48, 72 или 96 ч. Плёнки, выращенные в течение 96 ч, показали наиболее продолжительное высвобождение, описываемое кинетической моделью нулевого порядка и моделью Корсмейера-Пеппаса. Высвобождение характеризовалось контролируемой диффузией, при которой терапевтический фермент высвобождался с постоянной скоростью. Плёнки бактериальной целлюлозы с иммобилизованным ферментом обладали цитотоксичностью по отношению к клеткам меланомы человека линии А875. При дальнейшем изучении и развитии методов иммобилизации L-АСНазы на плёнках бактериальной целлюлозы, данный подход может стать эффективной стратегией доставки противоопухолевых препаратов к поверхностным опухолям.

*Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021-2030 годы) (№ 122022800499-5).*

### **BACTERIAL CELLULOSE BIOCOMPOSITE FOR L-ASPARAGINASE DELIVERY TO MELANOMA CELLS**

**A.N. Shishparenok, S.A. Koroleva, N.V. Dobryakova, E.V. Kudryashova, Y.A. Gladilina, D.D. Zhdanov**

*Institute of Biomedical Chemistry, Moscow*

L-asparaginase (L-ASNase) is an enzyme utilized in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. The mechanism of action is based on the hydrolysis of the amino acid L-asparagine, which is essential for leukemic cells, to ammonia and L-aspartic acid. Normal, healthy cells are able to synthesize L-asparagine, while leukemic cells are unable to do so and depend on the supply of this amino acid from the microenvironment. It is established that L-ASNase is effective against not only blood cancer cells but also cells of some other solid tumors, most notably some melanoma skin cancer cells. The main challenge in treating this type of cancer with L-ASNase is the relatively short half-life and rapid inactivation of the enzyme after intravenous administration. A biocomposite based on a film of bacterial cellulose and immobilized L-ASNase from *Erwinia carotovora* is proposed to overcome this limitation. By varying the cultivation period of the producer strain *Komagataeibacter hansenii* (VKPM № В-11239), we were able to produce bacterial cellulose films with varying thicknesses and porosities. These parameters determine the water content and the ability of the film to adsorb and release L-ASNase. Infrared spectroscopy demonstrated that the enzyme was successfully adsorbed onto the bacterial cellulose films. The total activity of adsorbed L-ASNase and its release were studied for films grown for 48, 72, or 96 hours. The results demonstrated that films grown for 96 hours exhibited the most prolonged release, which was described by the zero-order kinetic model and the Korsmeyer-Peppas model. The release was characterized by controlled diffusion, in which the therapeutic enzyme was released at a constant rate. Bacterial cellulose films with immobilized enzyme demonstrated cytotoxicity to human melanoma cells A875. With further investigation and development of methods for immobilization of L-ASNase on bacterial cellulose films, this approach may be an effective strategy for delivery of antitumor drugs to superficial tumors.

*The work was done in the framework of the Russian Federation fundamental research program for the long-term period (2021-2030) (№ 122022800499-5).*



### БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ПЕПТИДЫ ИЗ МИДИЙ (*MYTILUS EDULIS* L.) БАРЕНЦЕВА МОРЯ

С.Р. Деркач, Ю.А. Кучина, П.П. Кравец, А.Ю. Глухарев, О.С. Тюкина, В.В. Бордиян, П.Г. Приймак, С.С. Малавенда, С.О. Лунева, В.В. Мищенко, Д.С. Колотова

*Мурманский арктический университет, Мурманск*

В настоящее время разведение морских моллюсков в прибрежных аквахозяйствах активно развивается и является важным направлением аквакультуры. Аквакультура относится к быстрорастущим производствам продуктов питания в мире и в настоящее время отвечает более чем за половину мирового производства различных морепродуктов. Среди двусторчатых моллюсков наиболее распространенными являются мидии. Актуальность работы связана с перспективами успешного развития аквакультуры мидий в Мурманской области на побережье Баренцева моря. Мясо мидий является диетическим продуктом, содержащим белок, полиненасыщенные жирные кислоты, витамины и различные микроэлементы. Однако до настоящего времени не уделялось достаточного внимания использованию мелкоразмерных (некондиционных) мидий, которые могут служить прекрасным сырьем для получения белковых гидролизатов и биологически активных пептидов. Конкретная задача, поставленная в работе, состоит в определении перспективных районов на побережье Баренцева моря для культивирования мидий (*Mytilus edulis* L.) и создании ресурсосберегающих безотходных технологий получения биологически активных пептидов из некондиционных мидий в качестве ценных пищевых ингредиентов. В рамках выполнения работы составлены карты распределения численности и биомассы мидий в районах западного побережья Баренцева моря (губы Печенга и Ура). Собрана информация о состоянии водной среды и оценена возможность и перспективы промысла и организации аквахозяйств по выращиванию мидий на данных участках.

Получены белковые гидролизаты и биологически активные пептиды из мидий методами кислотного и ферментативного гидролиза с использованием в качестве фермента протозима. Изучены физико-химические свойства пептидов; определена антиоксидантная активность гидролизатов и пептидов. Показано, что ферментативный гидролизат демонстрирует высокую антиоксидантную активность и обладает потенциалом для использования в качестве компонента при производстве функциональных пищевых продуктов и биомедицинских препаратов. Разработаны рекомендации по совершенствованию технологий функциональных и лечебно-профилактических продуктов питания с использованием биологически активных пептидов из морских мидий.

*Работа поддержана грантом РФФИ, проект 22-16-20046 и Минобр Мурманской области (Соглашение 103).*

### BIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDES FROM *MYTILUS EDULIS* L. MUSSELS OF THE BARENTS SEA

S.R. Derkach, Yu.A. Kuchina, P.P. Kravets, A.Yu. Glukharev, O.S. Tyukina, V.V. Bordiyan, P.G. Priymak, S.S. Malavenda, S.O. Luneva, V.V. Mishchenko, D.S. Kolotova

*Murmansk Arctic University, Murmansk*

Currently, the cultivation of marine mollusks is actively developing and is an important area of aquaculture industry. Aquaculture is one of the fastest growing food productions in the world and is currently responsible for more than half of the world's production of various seafood. Among bivalves, mussels are the most common. The relevance of the work is associated with the prospects for the successful development of mussel aquaculture in the Murmansk region on the coast of the Barents Sea. Mussels are a dietary product containing protein, polyunsaturated fatty acids, vitamins and various microelements. However, until now, insufficient attention has been paid to the use of small-sized (substandard) mussels, which can serve as excellent raw materials for obtaining protein hydrolysates and biologically active peptides. The specific task set in the work is to identify promising areas on the coast of the Barents Sea for cultivation of mussels (*Mytilus edulis* L.) and to create resource-saving waste-free technologies for obtaining biologically active peptides from substandard mussels as valuable food ingredients. As part of this work, distribution maps of the number and biomass of mussels in the areas of the western coast of the Barents Sea (Pechenga and Ura Bays) were compiled. Information on the state of the aquatic environment was collected and the possibility and prospects of fishing and organizing aquaculture farms for growing mussels in these areas were assessed.

Protein hydrolysates and biologically active peptides from mussels were obtained by acid and enzymatic hydrolysis methods using protozyme as an enzyme. The physicochemical properties of the peptides; the antioxidant activity of the hydrolysates and peptides was determined. It was shown that the enzymatic hydrolysate exhibits high antioxidant activity and has the potential for use as a component in the production of functional foods and biomedical preparations. Recommendations were developed for improving the technologies of functional and therapeutic and prophylactic food products using biologically active peptides from sea mussels.

*This research was funded the Russian Science Foundation (project 22-16-20046), and the Ministry of Education and Science of the Murmansk Region (agreement no. 103).*

### СКРИНИНГ *E. COLI* ПРОДУЦЕНТОВ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ МЕТОДОМ MALDI-TOF MS

И.Н. Кравцов, А.И. Соловьёв, Е.А. Потёмкина, А.В. Карташова, К.В. Данилова, И.Л. Тутыхина, Н.Б. Поляков, Д.А. Егорова

*НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва*

В данной работе предлагаем быстрый и простой метод полуколичественного скрининга клонов продуцентов рекомбинантных белков методом MALDI-TOF. Обычно скрининг заключается в анализе продукции рекомбинантного белка с помощью SDS-PAGE, вестерн блота. Материалы и методы. Гены бактериальных белков IHFa, IHFb, HU, фагового белка GP46, антитела VHH, sfGFP были клонированы в плазмиды для бактериальной экспрессии и трансформированы в клетки штамма BL21(DE3). Трансформанты рассеяны на чашки Петри с агаризованной средой LB и инкубировались при температуре 37°C 12 часов. Изолированные колонии субкультивировали на чашках Петри с/без IPTG в течение 4 часов, после чего колонии переносились на мишень. Экстракцию белков проводили на мишени путем добавления 1 мкл 70% муравьиной кислоты и 1 мкл 20 мг/мл ДНВ в 70% ацетонитриле. Съёмка спектров производилась на UltrafleXtreme™ Bruker Daltonics Inc, спектры обрабатывались в FlexAnalysis.

Специфичность оценивалась сравнением спектров продуцентов с исходным штаммом BL21(DE3). Во всех случаях характерный для каждого рекомбинантного белка пик отсутствовал в BL21(DE3). Для оценки линейной модели образцы колоний BL21(DE3) процессировались по описанной методике с нанесением раствора sfGFP (4, 2, 1, 0.25 нг).  $R^2 = 0,81$ . Для оценки возможности скрининга были проанализированы по 50 клонов продуцентов белков IHFa, IHFb, HU, GP46, VHH в контрольных и экспериментальных условиях. Изменение профиля экспрессии в 78% случаев сопровождалось увеличением сигнала в 6–200 раз относительно средней интенсивности детектируемых пиков целевого белка клонов без индукции.

Характеризация бактерий методом MALDI-TOF широко используется в микробиологии. Также масс-спектрометрия применяется для идентификации белков после их очистки из бактериальных лизатов, на практике такой подход не применим для скрининга. Предложенный метод является компромиссом между точностью определения уровня экспрессии, затратами на анализ и производительностью. MALDI-TOF не зависит от присутствия у белков аффинных меток и белок-специфичных подходов. Более того, предполагаем, что данный метод может быть использован для подтверждения подлинности качественных характеристик депонируемых штаммов генно-инженерных продуцентов терапевтически препаратов.

### SCREENING OF *E. COLI* RECOMBINANT PROTEIN PRODUCERS BY MALDI-TOF MS METHOD

I.N. Kravtsov, A.I. Solovyov, E.A. Potemkina, A.V. Kartashova, K.V. Danilova, I.L. Tutykhina, N.B. Polyakov, D.A. Egorova

*N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow*

In our study we propose a fast and simple method for semi-quantitative screening of recombinant protein producers with MALDI-TOF MS. Screening approach traditionally includes detection of recombinant protein by SDS-PAGE and western blot.

The genes of bacterial proteins IHFa, IHFb, HU, phage protein GP46, antibody VHH, and sfGFP were cloned into plasmids for bacterial expression and transformed into *E. coli* BL21 (DE3) strain. Individual transformants were plated onto the LB agar plate and incubated at 37°C for 12 hours. Isolated colonies were sub-cultured on a LB agar plates +/- IPTG for four hours, then transferred to target for MS. Proteins were extracted on target with 1  $\mu$ l of 70% formic acid then 1  $\mu$ l of 20 mg/mL DHB in 70% acetonitrile were added. Analysis was performed on a Bruker Daltonics Inc UltrafleXtreme™ and spectra were processed in FlexAnalysis.

Specificity was evaluated by comparing the spectra of the products with those of the original BL21(DE3). In all cases, a peak reflecting each recombinant protein was absent in parental BL21(DE3). To determine an efficacy of linear model, a solution of sfGFP (4, 2, 1, 0.25 ng) was mixed with BL21(DE3) on target and processed in accordance with the established protocol. The calculated  $R^2$  was 0.81. To evaluate the possibility of large-scale screening, at least 50 clones producing IHFa, IHFb, HU, GP46, or VHH proteins were analyzed. In 78% of cases the alteration of the expression profile in the presence of IPTG was accompanied by a 6-200-fold increase in signal intensity in comparison with the average intensity of detectable peaks of the target protein in clones without induction.

Characterization of the expression profile by MALDI-TOF is a well-known practice in bacteriology. However, previously MALDI-TOF was not adopted for screening purpose. The proposed method is a compromise between the accuracy of expression level detection, the cost and throughput of analysis. MALDI-TOF screening is independent of the presence of affinity tags and specific detection approaches for each recombinant protein. Additionally, we suggest that this method can be used to authenticate the quality characteristics of deposited strains of genetically engineered therapeutic drug producer strains.

### ДИЗАЙН И ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ЭПИТОПОВ SARS-CoV-2

**Н.П. Румянцева, А.С. Черкашина, В.Г. Акимкин**

*ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва*

Цель работы – разработка компонентов иммуноферментного анализа (ИФА) для выявления у человека антител IgM и IgG к вирусу SARS-CoV-2. Научно обоснованно, что объектом для подобных исследований могут быть как полноразмерные белки, так и отдельные эпитопы вирусных белков. В данной работе была создана панель рекомбинантных белков, аминокислотные последовательности которых отражают участки эпитопов гликопротеина S SARS-CoV-2. При дизайне рекомбинантных белков учитывались вторичная и третичная структуры нативного S-белка SARS-CoV-2. Предполагается, что сохранение целостности исходных вторичных структур эталонного белка приведёт к эффективной упаковке биосинтезированного эпитопа в третичную структуру, что в конечном итоге повысит выход белков в растворимой форме. Также для повышения растворимости полученных белков рекомбинантный эпитоп сливался в одну молекулу с мальтозасвязывающим белком (MBP) (модифицированный вектор pET-28b(+)). Все полученные белки содержали 8x-гистидин метки на N-конце. Экспрессию белка проводили в штамме *E. coli* BL21 pLysS. Условия индукции: 1 мМ изопропил-β-D-тиогалактопиранозида, температура культивирования 28°C, 24 ч. Полученную биомассу разрушали ультразвуковыми волнами с амплитудой 30% и импульсом каждую секунду, в течении 20 минут в условиях ледяной бани. Супернатанты разрушенных биомасс очищали с помощью хроматографической колонки HiTrap-Ni в условиях буферной системы Tris-HCl 50 мМ pH 8,0. Элюцию белков осуществляли буфером Tris-HCl 50 мМ pH 8,0 в градиенте концентрации имидазола от 0 до 500 мМ. В результате были получены 6 рекомбинантных эпитопов SARS-CoV-2. Эпитопы были наработаны в препаративных количествах с чистотой более 90%. Оптимизация структуры эпитопов с учетом вторичной и третичной структуры нативного S-белка SARS-CoV-2 привела к повышению выхода белков в растворимой форме и упрощению протокола очистки белков (очистка в одну стадию без дополнительных манипуляций). Запланировано исследование аффинного связывания полученных эпитопов с антителами к SARS-CoV-2 в сыворотках крови пациентов с диагнозом COVID-19.

### DESIGN AND PRODUCTION OF RECOMBINANT EPITOPES SARS-CoV-2

**N.P. Rumyantseva, A.S. Cherkashina, V.G. Akimkin**

*Central Research Institute of Epidemiology, Moscow*

The aim of the work is to develop components of enzyme immunoassay (ELISA) for the detection of IgM and IgG antibodies to the SARS-CoV-2 virus in humans. It is scientifically proven that the epitopes of viral proteins become the object of such developments. In this work, a panel of recombinant proteins was created. Recombinant proteins contain amino acid sequences of epitope sites of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. Recombinant proteins have been created that preserve the secondary and tertiary structure of the native SARS-CoV-2 spike protein. It is assumed that maintaining the integrity of the initial secondary structures of the reference protein will lead to effective packaging of the biosynthesized epitope into the tertiary structure, which increases the yield of proteins in soluble form. In addition, to increase the solubility of the obtained proteins, the recombinant epitope was merged into one molecule with a maltose binding protein (MBP) (modified vector pET-28b(+)). All the obtained proteins contained 8x-histidine tags at the N-terminus. Protein expression was performed in the *E. coli* BL21 pLysS strain. Induction conditions: 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, cultivation temperature 28°C for 24 hours. The resulting biomass was destroyed by ultrasonic waves with an amplitude of 30% and a pulse every second for 20 minutes in ice. Supernatants were purified using a HiTrap-Ni chromatographic column under conditions of buffer system Tris-HCl 50 mM and pH 8.0. Protein elution was carried out with a Tris-HCl buffer of 50 mM pH 8.0 in an imidazole concentration gradient from 0 to 500 mM. As a result, 6 recombinant SARS-CoV-2 epitopes were obtained. The epitopes were produced in preparative quantities with a purity of more than 90%. Optimization of the epitope structure allowed to increase the yield of proteins in soluble form and simplified the protein purification protocol (purification in one stage without additional manipulations). This was achieved by taking into account the secondary and tertiary structures of the native SARS-CoV-2 S-protein. It is planned to study the affinity binding of the obtained epitopes with antibodies to SARS-CoV-2 in the blood sera of patients diagnosed with COVID-19.

## ПОРАЗИТЕЛЬНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ СТРУКТУР ЛЁД-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ

**А.В. Финкельштейн<sup>1,2</sup>, С.А. Гарбузинский<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Институт белка РАН, Лаборатория физики белка, Пущино; <sup>2</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва*

Биосинтез связывающих лёд белков является одним из важных способов выживания различных организмов при низких температурах. Накопленные данные показывают экстремальное разнообразие структур лёд-связывающих белков, наблюдаемых в природе. Их размеры варьируют от коротких пептидов до огромных белково-углеводно-липидных комплексов на мембранах живых клеток, а разнообразие пространственных структур сравнимо с разнообразием таковых всех вообще белков. Функции лёд-связывающих белков в различных организмах сильно варьируют: от остановки роста кристаллов льда и изменения их формы и размера – до стабилизации льда; от предотвращения образования зародышей льда □ до, наоборот, облегчения их образования. Наряду с существованием горизонтального переноса генов некоторых лёд-связывающих белков от одних организмов к другим, даже близкородственные организмы порой обладают совершенно различными по структуре лёд-связывающими белками, независимо произошедшими от различных предшественников, имевших самые разные функции, не связанные с взаимодействием со льдом.

## AMAZING DIVERSITY OF STRUCTURES OF ICE-BINDING PROTEINS

**A.V. Finkelstein<sup>1,2</sup>, S.O. Garbuzynskiy<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Laboratory of Protein Physics, Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino;*

*<sup>2</sup>Biology Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow*

Biosynthesis of ice-binding proteins is one of the important ways of survival of various organisms at low temperatures. The functions of ice-binding proteins in different organisms vary greatly: from stopping the growth of ice crystals and changing their shape and size – to stabilizing ice; from preventing the formation of ice nuclei - to, on the contrary, facilitating their formation. Accumulated data show an extreme diversity of structures of ice-binding proteins observed in nature. Their sizes vary from short peptides to huge protein-carbohydrate-lipid complexes on the membranes of living cells, and the diversity of their spatial structures is comparable to the diversity of all proteins in general. Along with the existence of a horizontal transfer of genes of some ice-binding protein from one organism to another, even closely related organisms sometimes possess ice-binding proteins of completely different structures that evolved independently from different progenitors with very different functions not associated with interaction with ice.

**КРИСТАЛЛОГРАФИЯ, СПЕКТРОСКОПИЯ И МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ФЛАВИН-СВЯЗЫВАЮЩИХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ: ЧТО НЕ ПРЕДСКАЖЕТ ALPHAFOLD**

**И.Ю. Гушчин, А.С. Николаев, А.А. Ремеева, О.Ю. Семенов, А.С. Кузьмин**

*Московский физико-технический институт, Долгопрудный*

Флави́н-связывающие белки на основе доменов LOV являются перспективными генетически кодируемыми флуоресцентными метками и оптогенетическими инструментами. Их уникальные преимущества обусловлены фотохимическими и фотофизическими свойствами их хромофоров-флавинов. Недавно, нами был обнаружен термостабильный LOV-домен-содержащий белок-рецептор из термофилов *Chloroflexus aggregans*, который оказался отличным объектом для структурных и механистических исследований. Для этого белка, получившего название CagLOV, нами были получены кристаллические структуры высокого разрешения, раскрывшие механизмы как его фотоактивации, так и радиационных повреждений во время рентгеноструктурных экспериментов. Получение серии структур мутантов CagLOV позволило нам объяснить механизмы его спектральной настройки и разработать палитру вариантов для многоцветной визуализации. В целом, полученные результаты показывают, что рентгеновская кристаллография, в сочетании со спектроскопией, остается предпочтительным методом для детальных исследований белков на атомарном уровне, в отличие от вычислительных подходов.

*Исследования были поддержаны Российским научным фондом, грант № 21-64-00018.*

**CRYSTALLOGRAPHY, SPECTROSCOPY AND MOLECULAR MODELING OF FLAVIN-BINDING FLUORESCENT PROTEINS: WHAT WON'T BE PREDICTED BY ALPHAFOLD**

**I. Gushchin, A. Nikolaev, A. Remeeva, O. Semenov, A. Kuzmin**

*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*

LOV domain-based flavin-binding proteins are promising genetically encoded fluorescent tags and optogenetic tools. Their unique advantages follow from photochemical and photophysical properties of their flavin chromophores. Recently, we discovered a thermostable LOV domain-containing receptor protein in *Chloroflexus aggregans*, which proved an excellent framework for structural and mechanistic studies. We obtained high resolution crystal structures of the protein, dubbed CagLOV, which revealed both the mechanisms of its photoactivation and of radiation damage, enriching our understanding of flavin photochemistry. Then, obtaining a series of structures of CagLOV mutants allowed us to explain its mechanisms of color tuning and to develop a palette of variants for multicolor imaging. Our results highlight the notion that X-ray crystallography, complemented by spectroscopy, remains the method of choice for detailed investigations of proteins at the atomistic level, as compared to computational approaches.

*The study was supported by the Russian Science Foundation, grant number 21-64-00018.*

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ДОМЕНОВ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ 1 И 2 ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИОНОВ $Zn^{2+}$

В. Лушпа<sup>1,2</sup>, М. Гончарук<sup>1</sup>, С. Лин<sup>3</sup>, С. Гончарук<sup>1,2</sup>, А. Арсеньев<sup>1</sup>, В. Борщевский<sup>2,4,5</sup>, Х. Ванг<sup>3,6</sup>, К. Минеев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия; <sup>2</sup>Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия; <sup>3</sup>Чанчуньский институт прикладной химии Китайской академии наук, Чанчунь, Цзилинь, Китай; <sup>4</sup>Институт обработки биологической информации, ООО Исследовательский центр Юлих, Германия; <sup>5</sup>Центр структурной биологии Юлих, ООО Исследовательский центр Юлих, Германия; <sup>6</sup>Кафедра прикладной химии и инжиниринга, Китайский университет науки и технологий, Хэфэй, Китай

Белки семейства Toll-подобных рецепторов (TLR) играют ключевую роль в системе врожденного иммунитета человека. В организме человека представлены 10 различных типов TLR (TLR1-10). Активация этих рецепторов инициирует запуск врожденного иммунного ответа и воспалительных процессов. Установлено, что TLR в разной степени задействованы в развитии инфекционных, аутоиммунных и нейродегенеративных заболеваний.

TLR характеризуются типичной для трансмембранных белков 1 типа структурой, включающей обширные внеклеточные и внутриклеточные домены, а также один трансмембранный  $\alpha$ -спиральный участок. Известно, что при связывании с компартаментами бактерий, грибов или вирусов данные рецепторы димеризуются и путем сборки миддосомы передают сигнал для последующего развития иммунного ответа. Несмотря на многочисленные исследования TLR, остается ряд нерешенных вопросов относительно структурной организации их внутриклеточных доменов и механизма их активации при передаче сигнала для запуска иммунного ответа.

В рамках работы были подобраны условия продукции и разработаны протоколы очистки внутриклеточных доменов TLR1 и 2. Определена пространственная структура и получены данные о динамике в растворе для внутриклеточного домена TLR1. Установлены различия между пространственными структурами TLR1 TIR, полученными в растворе и кристалле. Также проведены работы по анализу металлсвязывающей активности TLR1 TIR. Было выявлено образование дисульфидной связи между C667 и C686 при добавлении ионов меди и кобальта к образцу TLR1 TIR. В случае титрования внутриклеточных доменов TLR1 и 2 ионами цинка наблюдалось образование комплексов белок-металл с наномолярными константами связывания. В рамках работы выявлена роль цистеинов рассматриваемых белков в связывании ионов цинка, также определена их функциональная значимость в процессе активации полноразмерного рецептора.

## STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHANGES IN THE INTRACELLULAR DOMAINS OF TOLL-LIKE RECEPTORS 1 AND 2 UNDER THE INFLUENCE OF $Zn^{2+}$ IONS

V. Lushpa<sup>1,2</sup>, M. Goncharuk<sup>1</sup>, C. Lin<sup>3</sup>, S. Goncharuk<sup>1,2</sup>, A. Arseniev<sup>1</sup>, V. Borchevskiy<sup>2,4,5</sup>, X. Wang<sup>3,6</sup>, K. Mineev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; <sup>2</sup>Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia; <sup>3</sup>Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun, Jilin, China; <sup>4</sup>Institute of Biological Information Processing (IBI-7: Structural Biochemistry), Research Center Juelich GmbH, Juelich, Germany; <sup>5</sup>JuStruct: Juelich Center for Structural Biology, Research Center Juelich GmbH, Juelich, Germany; <sup>6</sup>Department of Applied Chemistry and Engineering, University of Science and Technology of China, Hefei, China

The Toll-like receptor (TLR) family proteins play a key role in the human innate immune system. There are 10 different TLRs (TLR1-10) present in the human body. Activation of these receptors initiates the innate immune response and inflammatory processes. It has been established that TLRs are involved to varying degrees in the development of infectious, autoimmune and neurodegenerative diseases.

TLRs are characterized by a typical type 1 transmembrane protein structure, including extensive extracellular and intracellular domains, as well as a single transmembrane  $\alpha$ -helical region. It is known that upon binding to bacterial, fungal or viral components, these receptors dimerize and through the assembly of a myddosome, transmit a signal for the subsequent development of an immune response. Despite numerous studies on TLRs, there remains a number of unresolved questions regarding the structural organization of their intracellular domains and the mechanism of their activation in signal transmission for triggering the immune response.

As part of this work, the conditions for production and purification protocols for the intracellular domains of TLR1 and 2 were developed. The spatial structure of the intracellular domain of TLR1 was determined, and data on its dynamics in solution were obtained. Differences were established between the spatial structures of the TLR1 TIR domain obtained in solution and in the crystal. Work was also carried out to analyze the metal-binding activity of the TLR1 TIR domain. The formation of a disulfide bond between C667 and C686 was observed upon addition of copper and cobalt ions to the TLR1 TIR sample. In the case of titrating the intracellular domains of TLR1 and 2 with zinc ions, the formation of protein-metal complexes with nanomolar binding constants was observed. This work revealed the role of the cysteine residues of the proteins under consideration in the binding of zinc ions, and also determined their functional significance in the activation process of the full-length receptor.

## ГОМО- И ГЕТЕРО- ТЕТРАМЕРНЫЕ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫЕ КАЛИЕВЫЕ КАНАЛЫ Kv1 В КЛЕТКАХ ЭУКАРИОТ И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ПОРОВЫМИ БЛОКАТОРАМИ

**А.В. Фефанов, А.А. Игнатова, Н.А. Орлов, А.В. Ефременко, Е.В. Крюкова, О.В. Некрасова**

*ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва*

Разработан общий подход к созданию аналитических клеточных систем для изучения гомо- и гетеро-тетрамерных потенциал-зависимых Kv1-каналов и их взаимодействий с пептидными блокаторами в клетках млекопитающих. Данный подход включает в себя: биоинженерное конструирование флуоресцирующих каналов с высокой экспрессией в плазматической мембране и высокоаффинных флуоресцирующих лигандов этих каналов; методики анализа распределения каналов в клетках, измерения констант диссоциации комплексов этих каналов с флуоресцирующими лигандами и изучаемыми пептидами-блокаторами на основе конфокальной микроскопии; электрофизиологические методики анализа функциональных свойств каналов и способности пептидов к блокированию поры канала. Обсуждаются свойства созданных систем на основе гомотетрамерных каналов Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3 и гетеротетрамерных каналов Kv1.1-Kv1.2, высокоаффинных флуоресцирующих лигандов этих каналов на основе хонготоксина 1 и изученных пептидных токсинов из яда скорпионов. Созданные системы, флуоресцирующие лиганды и селективные блокаторы Kv1-каналов расширяют возможности изучения функционирования Kv1-каналов, их участия в клеточных процессах в норме и при патологии, а также возможности разработки эффективной терапии заболеваний, связанных с каналопатиями.

*Исследования поддержаны грантом РФФ № 22-14-00406.*

## HOMO- AND HETERO-TETRAMERIC VOLTAGE GATED POTASSIUM KV1 CHANNELS IN EUKARYOTIC CELLS AND THEIR INTERACTIONS WITH PORE BLOCKERS

**A.V. Feofanov, A.A. Ignatova, N.A. Orlov, A.V. Efremenko, E.V. Kryukova, O.V. Nekrasova**

*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry; M.V. Lomonosov Moscow State University, Biological Faculty, Moscow*

A general approach has been developed for the creation of analytical cellular systems to study homo- and hetero-tetrameric voltage-gated Kv1 channels and their interactions with peptide blockers in mammalian cells. This approach includes: bioengineering of fluorescent channels with high expression in the plasma membrane and high affinity fluorescent ligands of these channels; confocal microscopy methods for analyzing the distribution of channels in cells, measuring the dissociation constants of complexes of these channels with fluorescent ligands and studied peptide blockers; electrophysiological methods for analyzing the functional properties of channels and the pore-blocking ability of peptides. The properties of the created systems based on homotetrameric channels Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3 and heterotetrameric channels Kv1.1-Kv1.2, high-affinity fluorescent ligands of these channels based on hongotoxin 1 and studied peptide toxins from scorpion venom are discussed. The created systems, fluorescent ligands and selective Kv1 channel blockers expand the possibilities for studying the functioning of Kv1 channels and their role in cellular processes under normal and pathological conditions, as well as the possibility of developing effective therapies for diseases associated with channelopathies.

*The research was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 22-14-00406).*

### СВЯЗАН ЛИ УСПЕХ АльфаФолда С ЕГО ПОНИМАНИЕМ ФИЗИКИ СВОРАЧИВАНИЯ БЕЛКА?

**М. Пак<sup>1</sup>, А. Финкельштейн<sup>2,3</sup>, Д. Иванков<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Центр молекулярной и клеточной биологии Сколковского института науки и технологий, Москва; Институт белка РАН<sup>2</sup>, Пущино; <sup>3</sup>Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва*

Программа глубокого машинного обучения АльфаФолд успешно решила задачу предсказания трёхмерной структуры белка по его аминокислотной последовательности. Этот прорыв побуждает задуматься: связан ли впечатляющий успех АльфаФолда с более глубоким пониманием физики процесса сворачивания белка? Для анализа этого вопроса мы применяем критерий ранжирования белковых структур, широко используемый для оценки эффективности методов протягивания. Наши результаты показывают, что АльфаФолд действительно превосходит лучшие программы протягивания в ранжировании далёких структур. Однако, в то же время АльфаФолд не демонстрирует преимущества в ранжировании близких белковых структур. Более того, мы обнаруживаем, что критерий ранжирования неприменим к программам, использующим что-либо, кроме явной функции свободной энергии. Таким образом, лучшее ранжирование АльфаФолд не является доказательством более глубокого понимания физики сворачивания белка.

### IS THE SUCCESS OF ALPHAFOLD DUE TO A BETTER UNDERSTANDING OF PROTEIN FOLDING?

**M. Pak<sup>1</sup>, A. Finkelstein<sup>2,3</sup>, D. Ivankov<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Center for Molecular and Cellular Biology, Skolkovo Institute of Science and Technology; <sup>2</sup>Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino; <sup>3</sup>Biology Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow*

The deep learning program AlphaFold has successfully solved the problem of predicting the 3D structure of a protein from its amino acid sequence. This breakthrough raises the question: is AlphaFold's impressive success related to a better understanding of the physics of protein folding? To analyze this question, we apply a protein structure ranking criterion widely used to evaluate the performance of threading methods. Our results show that AlphaFold indeed outperforms the best threading program in ranking distant structures. However, at the same time, AlphaFold shows no power in ranking very close protein structures. Moreover, we find that the ranking criterion is not applicable to programs that use anything other than an explicit free energy function. Thus, AlphaFold's superior ranking does not provide evidence of a better understanding of the physics of protein folding.



## ОТ БЕЛКОВОГО СОСТАВА ЯДЕР КЛЕТОК К ПОНИМАНИЮ РАБОТЫ ГЕНОМОВ

А.К. Грибкова, А.К. Шайтан

МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Хроматин – это комплекс ДНК, РНК и белков в ядрах эукариотических клеток, в котором белки играют ключевую роль в регуляции функционирования генома и осуществлении ряда важных процессов: ремоделирование хроматина, выпетливание хроматина для организации трехмерной структуры генома, транскрипция, разделении фаз жидкость–жидкость. Несмотря на значительные достижения в изучении отдельных белков хроматина, целостное представление о качественном и количественном составе хроматома остается не вполне удовлетворительным. Целью данной работы было описание множества белков хроматина путем критического анализа различных типов источников информации о белках ядра и хроматина, а также посредством биоинформатического анализа разнообразия, количества и свойств белков хроматина человека. В ходе работы проведен критический анализ источников информации о локализации ядерных белков и белков хроматина (базы данных, хроматомы по данным масс-спектрометрии очищенных белковых фракций хроматина). Для более детального анализа белкового состава хроматина разработана упрощенная классификация белков хроматина человека, которая систематизирует белки по их функциям, процессам, геномной локализации и физико-химическим свойствам. Собранные наборы белков позволили провести сравнительный анализ белков хроматина и белков цитоплазмы, и выявить их особенности по ряду параметров, таких как: длины белков, длины и количество неупорядоченных фрагментов, заряд белков, распределение аминокислотного состава. В результате исследования были найдены отличительные признаки различных функциональных групп белков хроматина с точки зрения их физико-химических свойств и с учетом представленности в клетках человека.

Результаты данного исследования дают всестороннее представление о хроматоме человека. Проведенный анализ позволяет лучше понять особенности белкового состава хроматина, механизмы его работы. Результаты могут способствовать разработке новых подходов для изучения и регуляции молекулярных процессов в ядрах клеток.

*Работа была поддержана грантом Российского научного фонда № 19-74-30003.*

## FROM ANALYSIS OF PROTEIN CONTENT IN THE NUCLEUS TO UNDERSTANDING GENOME FUNCTIONING

A.K. Gribkova, A.K. Shaytan

Lomonosov Moscow State University, Moscow

Chromatin is a complex of DNA, RNA, and proteins in the nucleus of eukaryotic cells, in which proteins play a key role in the regulation of genome function and in the implementation of a number of important processes: chromatin remodeling, chromatin looping to organize the three-dimensional structure of the genome, transcription, and liquid-liquid phase separation. Despite significant progress in the study of individual chromatin proteins, a holistic view of the qualitative and quantitative composition of the chromatome remains incomplete. The aim of this work was to describe the diversity of chromatin proteins by critically analyzing nuclear and chromatin protein information sources and by bioinformatically analyzing the diversity, abundance and properties of human chromatin proteins. In the course of this work, a critical analysis of sources of information on the localisation of nuclear proteins and chromatin proteins (databases, chromatomes from mass spectrometry data of purified chromatin protein fractions) was performed. For a more detailed analysis of chromatin protein composition, a simplified classification of human chromatin proteins was developed, which systematizes proteins according to their functions, processes, genomic localisation and physicochemical properties. The collected sets of proteins allowed a comparative analysis of chromatin proteins and cytoplasmic proteins and revealed their peculiarities by a number of parameters, such as: protein lengths, lengths and number of disordered fragments, protein charge, distribution of amino acid composition. As a result of the study, distinctive features of different functional groups of chromatin proteins were found in terms of their physicochemical properties and in terms of their abundance in human cells.

The results of this study provide a comprehensive view of the human chromatome. The analyses allow a better understanding of the peculiarities of the protein composition of chromatin and the mechanisms of its operation. The results may contribute to the development of new approaches for the study and regulation of molecular processes in cell nuclei.

*This research was funded by the Russian Science Foundation grant #19-74-30003.*

## ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСПОРТА КЛЕТОЧНЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Е.Д. Белицкая, Е.В. Сливка, Е.М. Рапопорт, А.Б. Тузиков, А.В. Залыгин, В.А. Олейников

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

Микровезикулы (МВ) образуются из плазматической мембраны эукариотических клеток и транспортируют биомолекулы к другим клеткам. МВ активно исследуются как средства для доставки биомолекул (белков, липидов, РНК) и лекарственных препаратов. Однако, многие аспекты их жизненного цикла остаются недостаточно изученными из-за сложности выделения, неудобных размеров (100–1000 нм), гетерогенности и их сходства с другими внеклеточными везикулами. В этой работе из супернатанта клеток были выделены два типа микровезикул. МВ1 – из супернатанта клеток, в которые предварительно был встроены флуоресцентный липидный конструктор и МВ2 – в которые тот же липид встраивали непосредственно в выделенные микровезикулы.

Метод на основе Ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET) широко применяется для изучения биологических процессов, таких как белок-белковые взаимодействия, активация ферментов,  $Ca^{2+}$ -сигнализация, исследование нуклеиновых кислот и анализ ПЦР в реальном времени. Этот метод позволяет визуализировать организацию клеток и отслеживать перемещение белков внутри них.

В данном исследовании мы применили метод Ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET) для анализа пространственного расположения липидных конструкторов в мембране микровезикул.

Цель данной работы заключалась в изучении геометрии встраивания липидных конструкторов в структуру внеклеточных микровезикул с использованием метода флуоресцентной спектроскопии на основе FRET. Были синтезированы функциональные липидные конструкторы CMG2-DOPE с флуоресцентными метками Cy5-CMG2-DOPE и Cy3-CMG2-DOPE. Выделены и модифицированы два типа МВ с липидами Cy5-CMG2-DOPE и Cy3-CMG2-DOPE. В мембране микровезикул, МВ1, наблюдалось равномерное распределение липидных конструкторов, а также достаточное удаление между ними, что подтверждается отсутствием Ферстеровского переноса энергии (FRET). В МВ2 наблюдалось почти полное гашение флуоресценции липидного конструктора Cy3-CMG2-DOPE, что свидетельствует о близком расположении липидного конструктора Cy5-CMG2-DOPE к функциональной части предварительно встроенных липидных конструкторов. Основываясь на этих результатах, можно сделать предположение о том, что в МВ2, липидные конструкторы не встраиваются в мембрану микровезикул, а находятся на их поверхности.

## INVESTIGATION OF CELLULAR MICROVESICLE TRANSPORT BY PHYSICOCHEMICAL METHODS

E.D. Belitskaya, E.V. Slivka, E.M. Rapoport, A.B. Tuzikov, A.V. Zalygin, V.A. Oleinikov

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

Microvesicles (MVs) are formed from the plasma membrane of eukaryotic cells and transport biomolecules to other cells. MVs are actively investigated as vehicles for the delivery of biomolecules (proteins, lipids, RNA) and drugs. However, many aspects of their life cycle remain poorly understood due to their difficulty of isolation, awkward size (100-1000 nm), heterogeneity and their similarity to other extracellular vesicles. In this work, two types of microvesicles were isolated from cell supernatant. MV1 - from cell supernatant in which a fluorescent lipid construct was pre-embedded and MV2 - in which the same lipid was incorporated directly into the isolated microvesicles.

The method based on Ferster resonance energy transfer (FRET) is widely used to study biological processes such as protein-protein interactions, enzyme activation,  $Ca^{2+}$  signalling, nucleic acid studies and real-time PCR analysis. This method allows us to visualise the organisation of cells and track the movement of proteins within them.

In this study, we applied the Ferster resonance energy transfer (FRET) method to analyse the spatial arrangement of lipid constructs in the microvesicle membrane. The aim of this work was to study the geometry of lipid constructs embedded in the structure of extracellular microvesicles using FRET-based fluorescence spectroscopy. Functional CMG2-DOPE lipid constructs with fluorescent tags Cy5-CMG2-DOPE and Cy3-CMG2-DOPE were synthesised. Two types of MVs with Cy5-CMG2-DOPE and Cy3-CMG2-DOPE lipids were isolated and modified. In the microvesicle membrane, MV1, an even distribution of lipid constructs was observed, as well as sufficient removal between them, as evidenced by the absence of Ferster energy transfer (FRET). In MV2, almost complete quenching of the fluorescence of the Cy3-CMG2-DOPE lipid construct was observed, indicating the close proximity of the Cy5-CMG2-DOPE lipid construct to the functional part of the pre-embedded lipid constructs. Based on these results, it can be inferred that in MV2, the lipid constructs are not embedded in the membrane of microvesicles, but are located on their surface.

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВ - РНК-ШАПЕРОНОВ С РНК: МОДЕЛИРОВАНИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТ

А.Д. Никулин, П.Ю. Панкратова, Н.А. Смольянова, Н.В. Леконцева

*Институт белка РАН, Пушкино*

Регуляция экспрессии генов на уровне трансляции некодирующими малыми регуляторными РНК (мРНК) позволяет быстро и эффективно отвечать на внешние стрессы и адаптироваться к изменениям внешней среды. мРНК могут существенно изменять продукцию белков ингибируя или активируя трансляцию мРНК, включая сигма-факторы РНК-полимеразы, белков внешней мембраны и вирулентности. В бактериях имеется особый класс РНК-связывающих белков, способствующих взаимодействию мРНК с мРНК, называемый РНК-шаперонами, классические представители которых – белки Hfq и ProQ. Предполагается, что мРНК находится в динамическом равновесии с энергетически менее выгодным состоянием, содержащим короткоживущие неспаренные участки. Такие «приоткрытые» участки мРНК взаимодействуют с неспаренными участками мРНК, что приводит к формированию дуплексов мРНК-мРНК. РНК-шапероны связываются с одноцепочечными участками мРНК и стабилизируют их, способствуя нахождению мРНК партнера и формированию дуплекса этих двух РНК. В бактерии *Mycobacterium tuberculosis* выявлено большое количество малых нетранслируемых РНК, которые потенциально могут выполнять функции мРНК. Из них менее десяти функционально охарактеризованы как играющие существенную роль в адаптации *M. tuberculosis* к иммунной системе человека и развитию патогенности. Однако в микобактериях не обнаружены классические бактериальные РНК-шапероны Hfq и ProQ. Претендентами на роль РНК-шаперонов в *M. tuberculosis* могут быть белки с доменом холодового шока Csp, которые выполняют широкий спектр биологических функций в клетках различных организмов. Кроме того, поиском структурных гомологов в БД PDB был найден белок DUF3107, схожий по структуре с белком Hfq. Мы провели моделирование взаимодействия белков CspA, CspB и DUF3107 из *M. tuberculosis* с различными вариантами одноцепочечных и двуцепочечных участков мРНК. В результате был обнаружен новый потенциальный участок связывания РНК на поверхности белка CspA и предложена модель взаимодействия белка CspB с мРНК. Взаимодействие белков с короткими шпильчатыми участками и полноразмерными мРНК было охарактеризовано различными экспериментальными методами, что позволило проверить достоверность предложенных моделей РНК-белковых комплексов.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №24-24-00071.*

## INTERACTION OF RNA CHAPERONES WITH RNA: MODELING AND EXPERIMENT

A.D. Nikulin, P.Yu. Pankratova, N.A. Smolyanova, N.V. Lekontseva

*Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino*

Regulation of gene expression at the translation level by noncoding small regulatory RNAs (sRNAs) allows for a rapid and effective response to external stresses and adaptation to environmental changes. sRNA can significantly alter protein production by inhibiting or activating mRNA translation, including RNA polymerase sigma factors, membrane proteins, and virulence. Bacteria have specific RNA-binding proteins (RNA chaperones) that facilitate the interaction of sRNA with mRNA. Hfq and ProQ are the classic representatives of them. It is assumed that sRNA is in dynamic equilibrium with an energetically less favorable state containing short-lived unpaired regions. Such "open" regions of sRNA interact with unpaired sites of mRNA, which leads to the formation of sRNA-mRNA duplexes. RNA chaperones bind to single-stranded regions of sRNA and stabilize them, facilitating the finding of a partner mRNA and the formation of a sRNA-mRNA duplex. A large number of small untranslated RNAs that can potentially function as sRNA have been identified in *Mycobacterium tuberculosis*. Of these, less than ten have been functionally characterized as playing a significant role in the adaptation of *M. tuberculosis* to the immune system and the development of pathogenicity. However, the classical bacterial RNA chaperones Hfq and ProQ have not been found in mycobacteria. Proteins with the cold shock domain Csp, which perform a wide range of biological functions in the cells of various organisms, may be candidates for the role of RNA chaperones in *M. tuberculosis*. In addition, a search for structural homologues in the PDB database revealed the DUF3107 protein, similar in structure to the Hfq protein. We modeled the interaction of CspA, CspB, and DUF3107 from *M. tuberculosis* with various variants of single-stranded and double-stranded regions of sRNA. As a result, a new potential RNA binding site on the surface of the CspA protein was discovered and a model of the interaction of the CspB protein with sRNA was proposed. The interaction of proteins with short hairpin regions and full-length sRNA was characterized by various experimental methods, which allowed us to verify the reliability of the proposed models of the RNA-protein complexes.

*The work is supported by the RSF grant 24-24-00071.*

## ТРАНСПОРТ ПРОТИВОВИРУСНОГО ПЕПТИДА PB1(6-14) ЧЕРЕЗ МИМЕТИЧЕСКУЮ МЕМБРАНУ

Ю.Е. Горшкова, Я.А. Забродская, В.В. Егоров

Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

Пептидный препарат PB1(6-14) – активная субстанция с выраженным противовирусным эффектом. Ранее было показано, что пептид PB1(6-14) воздействует на N-концевой участок субъединицы PB1 полимеразного комплекса вируса гриппа А, вызывая изменение его конформации. Это приводит к нарушению структуры нативного полимеразного комплекса вируса гриппа, что, в свою очередь, делает невозможной репликацию вируса, обуславливая тем самым противовирусный эффект пептида [1, 2].

В работе рассмотрен механизм проникновения пептида PB1(6-14) внутрь модельной насыщенной мембраны DMPC/DMPG (1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхлорид/1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфатидилглицерин) [3]. Методами малоуглового рассеяния нейтронов, атомно-силовой микроскопии и динамического светорассеяния установлено, что при увеличении соотношения пептид/липид увеличивается внутренний диаметр везикул с 50 до 57 нм и уменьшается толщина липидного бислоя с 3,8 до 3,2 нм. При этом дзета-потенциал изменяется незначительно. Подобный факт свидетельствует о том, что при взаимодействии пептида с поверхностью мембраны только небольшая часть пептида адсорбируется на поверхности мембраны PC/PG, тогда как большая его часть включается внутрь липосомы. Однако при замене в липидном бислое PG на PE (1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-этилглицерин) взаимодействие пептид-липид ограничивается адсорбцией пептида PB1(6-14) на внешнем липидном бислое PC/PE.

Для изучения проникновения пептида PB1(6-14) в клетки использовали клетки A549 (карциномы легкого человека) как наиболее адекватную модель для изучения функционирования вируса гриппа, поражающего именно эпителиальные клетки дыхательных путей. Клетки инкубировали с FITC-меченым пептидом. По данным проточной цитофлуориметрии и конфокальной микроскопии установлено, что пептид проникает в клетки между 5-й и 15-й минутами инкубации. Данный временной интервал является приемлемым для использования исследуемого пептида в дальнейшем в качестве лекарственно препарата.

1. Zabrodskaya YA, Lebedev DV, Egorova MA et al. *Biophys Chem.* 2018, 234: 16.
2. Egorov VV, Matusевич OV, Shaldzhyan AA et al. *Int J Pep.* 2013, <https://doi.org/10.1155/2013/370832>.
3. Zabrodskaya YA, Gorshkova YE, Shyrigina A-PS et al. *Crystallography Rep.* 2021, 66(6): 1013–1022.

## TRANSPORT OF THE ANTIVIRAL PEPTIDE PB1(6-14) THROUGH A MIMETIC MEMBRANE

Y.E. Gorshkova, Y.A. Zabrodskaya, V.V. Egorov

Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia

The peptide drug PB1(6-14) is an active substance with a pronounced antiviral effect. It has been previously shown that the PB1(6-14) peptide can affect the N-terminal of the PB1 subunit of the polymerase complex of influenza virus A and change its conformation. It leads to violation of the structure of the native polymerase complex of influenza virus, which, in turn, hinders virus replication and causes antiviral effect of the peptide [1,2].

The mechanism of penetration of the PB1(6-14) peptide into a model saturated DMPC/DMPG membrane (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidyl chloride/1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerol) is considered in the work [3]. Using small-angle neutron scattering, atomic force microscopy and dynamic light scattering methods, it was found that with an increase in the peptide/lipid ratio, the internal diameter of vesicles increases from 50 to 57 nm and the thickness of the lipid bilayer decreases from 3.8 to 3.2 nm. In this case, the zeta potential changes insignificantly. This fact indicates that when the peptide interacts with the membrane surface, only a small part of the peptide is adsorbed on the surface of the PC/PG membrane, while most of it is included inside the liposome. However, when PG is replaced by PE in the lipid bilayer, the peptide-lipid interaction is limited by the adsorption of the PB1(6-14) peptide on the outer PC/PE lipid bilayer.

To study the penetration of the PB1(6-14) peptide into cells, A549 cells (human lung carcinoma) were used as the most adequate model for studying the functioning of the influenza virus, which specifically affects the epithelial cells of the respiratory tract. The cells were incubated with the FITC-labeled peptide. According to flow cytofluorimetry and confocal microscopy data, it was found that the peptide penetrates into cells between the 5th and 15th minutes of incubation. This time interval is acceptable for the use of the studied peptide in the future as a medicinal product.

1. Zabrodskaya YA, Lebedev DV, Egorova MA et al. *Biophys Chem.* 2018, 234: 16.
2. Egorov VV, Matusевич OV, Shaldzhyan AA et al. *Int J Pep.* 2013, <https://doi.org/10.1155/2013/370832>.
3. Zabrodskaya YA, Gorshkova YE, Shyrigina A-PS et al. *Crystallography Rep.* 2021, 66(6): 1013–1022.

## ДАННЫЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ КАК ИСТОЧНИК ДАННЫХ ДЛЯ ПРЕДСКАЗАНИЯ СВОЙСТВ ПЕПТИДОВ

**В.С. Скворцов**

*НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва*

Протеомные эксперименты по масс-спектрометрической идентификации белков обычно преследуют достаточно конкретную и чётко определенную цель. В тоже время, в зависимости от схемы эксперимента данные, которые были получены, можно использовать и используют и для решения других задач. Это могут быть как задачи, непосредственно связанные с планированием протеомных экспериментов (например, предсказание времени удержания пептида на хроматографической колонке, распределение ионов при ионизации, предсказание интенсивности пиков и др), так и более общие. В частности, речь идёт о предсказании таких свойств пептидов как значение изоэлектрической точки и гидрофобности. Кроме того, некоторые из предсказанных свойств в свою очередь можно использовать как основу для предсказания более сложных свойств пептидов. Нередко, при использовании протеомных данных специалистами в области компьютерных вычислений это делается механистически. Наиболее распространённые проблемы: использование данных с большим уровнем ошибок идентификации, ошибки при описании входных параметров из-за плохой аннотация данных авторами эксперимента, некритическое отношение к стандартным протоколам. В то же время, если дизайн эксперимента учитывает последующее использование данных для предсказания свойств пептидов, то становится возможным предсказание свойств и зависимостей, которые обычно не рассматриваются (например, зависимость от температуры или состава растворителя). В презентации приводится ряд практических примеров, иллюстрирующих вышесказанное.

## DATA FROM MASS SPECTROMETRY EXPERIMENTS AS A SOURCE OF DATA FOR THE PREDICTION OF PEPTIDE PROPERTIES

**V.S. Skvortsov**

*Institute of Biomedical Chemistry, Moscow*

Proteomics experiments for the mass spectrometric identification of proteins usually have a specific and well-defined goal. At the same time, depending on the design of the experiment, the data obtained can and have been used for other tasks. These can be tasks directly related to the design of proteomic experiments (e.g. prediction of peptide retention time on a chromatographic column, ion distribution during ionization, prediction of peak intensity, etc.), as well as more general tasks. In particular, we are talking about the prediction of peptide properties such as isoelectric point value and hydrophobicity. In addition, some of the predicted properties can in turn be used as a basis for predicting more complex peptide properties. When proteomic data are used by computational scientists, it is often in a mechanistic way. The most common problems are: the use of data with a high level of identification errors, errors in the description of input parameters due to poor annotation of the data by the experiment authors, and an uncritical attitude towards standard protocols. At the same time, if the design of the experiment takes into account the subsequent use of the data to predict peptide properties, it becomes possible to predict properties and dependencies that are not usually considered (e.g., dependence on temperature or solvent composition). The presentation provides a number of practical examples to illustrate the above.

## СТРУКТУРНЫЕ ОСНОВЫ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА ПОСРЕДСТВОМ ТРАНСМЕМБРАННОГО ДОМЕНА БИТОПНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

**Э.В. Бочаров**

*ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный*

Биологическая функция битопных мембранных белков, имеющих только один трансмембранный сегмент, обеспечивается сетью разнообразных межмолекулярных взаимодействий в клеточной мембране. К этому классу белков принадлежат рецепторы типа I, которые принимают непосредственное участие в развитии и поддержании гомеостаза тканей организма человека. Рецепторные тирозинкиназы и подобные рецепторы служат удобными моделями рецепторов типа I, чтобы показать, как лиганд-индуцированные конформационные перестройки и специфическая димеризация внеклеточных и трансмембранных доменов приводят к аллостерической активации цитоплазматических доменов при передаче сигнала через мембрану клетки. В то же время, например, болезнь Альцгеймера представляет собой возрастную патологию, связанную с накоплением  $\beta$ -амилоидных пептидов, - продуктов ферментативного расщепления секретазы битопного белка-предшественника  $\beta$ -амилоида. Нарушения функционирования данных битопных белков приводят к развитию ряда патологий, а их ингибиторы являются одними из самых успешных примеров таргетной терапии онкологических и нейродегенеративных заболеваний на сегодняшний день. За последние годы были выяснены многие важные аспекты передачи сигналов битопными рецепторами на молекулярном уровне. Тем не менее, остаётся ряд нерешённых вопросов, включая особую роль трансмембранного домена и гибких примембранных участков в переключении активности рецептора. В течение ряда лет мы определили альтернативные конформации примембранных и трансмембранных сегментов целого ряда битопных белков в имитирующих мембрану средах, используя ЯМР-спектроскопию высокого разрешения в сочетании с другими методами структурной биологии. Нами показано, что функционирование данных битопных белков обуславливается не только специфическими белок-белковыми и белок-липидными взаимодействиями, но и физическим состоянием липидного окружения, как одного из главных компонентов самосогласованной системы биологической мембраны. Это позволило нам раскрыть принципы, лежащие в основе передачи сигнала через мембрану клетки и распознавания субстрата мембранными белками, а также механизмы действия ряда патогенных мутаций. *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-74-00024, <https://rscf.ru/project/23-74-00024/>.*

## STRUCTURAL BASIS OF SIGNAL TRANSDUCTION VIA THE TRANSMEMBRANE DOMAIN OF BITOPIC RECEPTORS

**E.V. Bocharov**

*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow; Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny*

The biological function of bitopic membrane proteins, which have only one membrane-spanning segment, is provided by a network of diverse intermolecular interactions in the cell membrane. This class of proteins includes receptors of type I, which are directly involved in the development and maintenance of tissue homeostasis in the human body. Receptor tyrosine kinases and relative receptors serve as convenient models of type I receptors to show how ligand-induced conformational rearrangements and specific dimerization of extracellular and transmembrane domains lead to allosteric activation of cytoplasmic domains during signal transduction across the membrane. At the same time, for example, Alzheimer's disease is an age-related pathology associated with the accumulation of  $\beta$ -amyloid peptides – products of enzymatic cleavage of the bitopic  $\beta$ -amyloid precursor protein by secretases. Disruptions in the functioning of these bitopic proteins lead to the development of a number of pathologies, and their inhibitors are among the most successful examples of targeted therapy for oncological and neurodegenerative diseases today. In recent years, many important aspects of signaling by bitopic receptors have been elucidated at molecular level. However, a number of unresolved issues remain, including the special role of the transmembrane domain and flexible juxtamembrane regions in switching receptor activity. Over the years, we have identified alternative conformations of juxtamembrane and transmembrane segments of a number of receptors in membrane-mimicking environments using high-resolution NMR spectroscopy in combination with other structural biology methods. We have shown that the functioning of these bitopic proteins is determined not only by protein-protein and protein-lipid interactions, but also by the physical state of the lipid environment, as one of the main components of the self-consistent system of biological membrane. This has allowed us to uncover the principles underlying signal transduction across the cell membrane and substrate recognition by membrane proteins, as well as the mechanisms of action of a number of pathogenic mutations.

*The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 23-74-00024, <https://rscf.ru/project/23-74-00024/>.*

## СТРУКТУРА СУПРАМЕРОВ, ОБРАЗОВАННЫХ АМФИФИЛЬНЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ЦИКЛОДЕКСТРИНОВ

A.V. Zalygin, I.S. Vaskan, V.A. Dimitreva, V.A. Oleinikov

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

На сегодняшний день существует проблема плохой растворимости химиотерапевтических агентов в воде, что приводит к низкой эффективности действия лекарств. Одним из способов преодоления описанной проблемы является разработка наночастиц для применения в качестве контейнеров в адресной доставке. В данной работе предложено использование производных циклодекстринов. Присутствие циклодекстринов в наночастицах может увеличить растворимость и биодоступность лекарств, улучшить стабильность и снизить побочные эффекты наночастиц. Однако циклодекстрины обладают высокой агрегативностью и самоорганизуются в беспорядочные структуры. С целью контроля самосборки молекул и увеличения доступности циклодекстриновых колец было предложено создание функциональных спейсерных липидов на основе циклодекстринов. Основной задачей является изучение структуры образующихся комплексов циклодекстринов на молекулярном уровне, что может быть достигнуто путем применения подхода, основанного на комбинации экспериментальных методов с молекулярным моделированием. В ходе работы изучена морфология наночастиц, состоящих из CD-CMG-DOPE (DOPE – 1,2-О-диолеил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин; CMG – повторяющийся глицил-глицил-N-карбоксиметилглицильный мотив). Используя методы микроскопии и динамического рассеяния света изучены размер и форма мицеллоподобных наночастиц, образованных из производных циклодекстринов. Методом спектрофлуорометрии определена критическая концентрация мицеллообразования, которая является показателем стабильности наночастиц. Получены данные о структуре наночастиц с использованием метода малоуглового рентгеновского рассеяния. Проведено сравнение экспериментальных данных с результатами молекулярно-динамического моделирования. По полученным моделям установлено, что циклодекстриновые кольца молекул локализируются преимущественно на поверхности наночастицы и доступны для связывания с лигандом.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант №23–24–10046.*

## THE STRUCTURE OF SUPRAMERS FORMED BY AMPHIPHILIC DERIVATIVES OF CYCLODEXTRINS

A.V. Zalygin, I.S. Vaskan, V.A. Dimitreva, V.A. Oleinikov

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

To date, there is a problem of poor solubility of chemotherapeutic agents in water, which leads to low efficacy of drugs. One of the ways to overcome this problem is to develop nanoparticles for use as containers in targeted delivery. In this paper, the use of cyclodextrin derivatives is proposed. The presence of cyclodextrins in nanoparticles can increase the solubility and bioavailability of drugs, improve stability and reduce the side effects of nanoparticles. However, cyclodextrins are highly aggregative and self-assemble into disordered structures. In order to control the self-assembly of molecules and increase the availability of cyclodextrin rings, it was proposed to create functional spacer lipids based on cyclodextrins. The main task is to study the structure of the resulting cyclodextrin complexes at the molecular level, which can be achieved by applying an approach based on a combination of experimental methods with molecular modeling. The morphology of nanoparticles consisting of CD-CMG-DOPE (DOPE – 1,2-O-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine; CMG – repeating glycyglycyl-N-carboxymethylglycyl motif) was studied. The size and shape of micelle-like nanoparticles formed from cyclodextrin derivatives have been studied using microscopy and dynamic light scattering methods. The critical concentration of micelle formation, which is an indicator of the stability of nanoparticles, has been determined by spectrofluorometry methods. Data on the structure of nanoparticles were obtained using the small-angle X-ray scattering method. The experimental data are compared with the results of molecular dynamic modeling. Based on the obtained models, it was found that cyclodextrin rings of molecules are localized mainly on the surface of the nanoparticle and are available for binding to the ligand.

*The work was funded by the Russian Science Foundation (project no. 23-24-10046).*

### ТРИЦИКЛИЧЕСКИЕ АНТИДЕПРЕССАНТЫ КАК НОВЫЙ КЛАСС ЛИГАНДОВ, ПРЕДОТВРАЩАЮЩИХ АМИЛОИДНУЮ ТРАНСФОРМАЦИЮ $\alpha$ -СИНУКЛЕИНА

И.А. Седов, Б.И. Хайрутдинов, Д.Р. Хайбрахманова, Е.Р. Сидорова, Е.В. Лейси, В.И. Муронец, Ю.Ф. Зуев

Казанский федеральный университет, Казань; Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, Казань; НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Соединения, обладающие аффинностью к внутренне неупорядоченным белкам, играющим решающую роль в возникновении и развитии амилоидных нейродегенеративных заболеваний, могут быть использованы для их профилактики и лечения. В частности, связывание таких лигандов с  $\alpha$ -синуклеином может привести к предотвращению его патологической трансформации при болезни Паркинсона и других синуклеинопатиях. С помощью ЯМР-экспериментов WaterLOGSY нами проведен скрининг небольшого набора известных лекарственных препаратов на аффинность к мономеру  $\alpha$ -синуклеина. Данные, полученные для двух представителей класса трициклических антидепрессантов, имипрамина и amitриптилина, свидетельствуют об их микромолярной аффинности, в то время как для остальных веществ связывания не наблюдалось. На основании анализа данных о возмущениях химических сдвигов в двумерных ЯМР-спектрах  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC было установлено наличие взаимодействий исследованных лигандов с отдельными аминокислотными остатками белка. Возмущения наблюдаются в основном для остатков A107–A140, находящихся в подвижном С-концевом домене  $\alpha$ -синуклеина. Спектрофлуориметрические эксперименты с тиофлавином Т показали ингибирование фибриллообразования  $\alpha$ -синуклеина в присутствии исследуемых лигандов. Методом молекулярного докинга к структурам из конформационного ансамбля  $\alpha$ -синуклеина, полученного в литературе, найдено множество возможных поз связывания молекулы имипрамина, из которых были отобраны имеющие контакты с остатками в соответствии с данными ЯМР. Лучшие позы были использованы как исходные для молекулярно-динамического моделирования конформационного ансамбля синуклеина в присутствии лиганда.

Следует отметить, что протеканию болезни Паркинсона часто сопутствуют депрессии, из-за чего антидепрессанты, включая рассмотренные нами соединения, используются среди прочих препаратов в терапии пациентов. Исходя из полученных нами данных, можно предположить, что трициклические антидепрессанты могут дополнительно облегчать течение болезни благодаря их антиамилоидному эффекту. Полученные результаты открывают возможность рационального дизайна более аффинных к синуклеину веществ этого класса, которые могут представлять потенциальный фармакологический интерес благодаря их двойному действию.

*Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (Приоритет-2030).*

### TRICYCLIC ANTIDEPRESSANTS AS A NEW CLASS OF LIGANDS PREVENTING AMYLOID TRANSFORMATION OF $\alpha$ -SYNUCLEIN

I.A. Sedov, B.I. Khairutdinov, D.R. Khaibrakhmanova, E.R. Sidorova, E.V. Leisi, V.I. Muronetz, Yu.F. Zuev

Kazan Federal University, Kazan; Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS, Kazan; Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow

Compounds with affinity to intrinsically disordered proteins, which play a crucial role in the onset and development of amyloid neurodegenerative diseases, can be used for their prevention and treatment. In particular, binding of such ligands to  $\alpha$ -synuclein may lead to the prevention of its pathological transformation in Parkinson's disease and other synucleinopathies. A small set of known drugs was screened for affinity to the  $\alpha$ -synuclein monomer using WaterLOGSY NMR experiments. The data obtained for two representatives of the tricyclic antidepressant class, imipramine and amitriptyline, indicate that they possess micromolar affinity, whereas no binding was observed for the remaining substances. The analysis of chemical shift perturbation in two-dimensional  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC NMR spectra revealed the existence of interactions between the studied ligands and a number of amino acid residues of the protein. The observed perturbations are primarily concentrated within the residue range A107–A140 located in mobile C-terminal domain of  $\alpha$ -synuclein. Spectrofluorimetric thioflavin T assay showed inhibition of  $\alpha$ -synuclein fibril formation in the presence of the studied ligands. Using molecular docking to the structures of  $\alpha$ -synuclein from its conformational ensemble obtained in the literature, a number of imipramine binding poses were identified. The poses with protein contacts in accordance with the NMR data were filtered. The most favorable poses were employed as the input for the molecular dynamics simulations of the conformational ensemble of synuclein in the presence of the ligand.

It is important to note that depression is a common comorbid condition associated with Parkinson's disease. Consequently, antidepressant medications, including the compounds under consideration, are frequently employed in conjunction with other drugs in the treatment of patients with this condition. Based on the findings presented here, it can be suggested that tricyclic antidepressants may additionally alleviate the course of the disease due to their anti-amyloid effect. These results open the possibility of rational design of tighter synuclein-binding compounds of this class, which may be of potential pharmacological interest due to their dual action.

*This work has been supported by the Kazan Federal University Strategic Academic Leadership Program (Priority-2030).*



## КАРТИРОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТИ МИЦЕЛЛОПОДОБНЫХ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ ОЦЕНКИ ИХ СВОЙСТВ, ВАЖНЫХ ДЛЯ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ

**В.А. Димитрева, И.С. Васкан, В.А. Олейников, А.В. Залыгин**

*ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*

Одним из перспективных методов в фармацевтике является использование наночастиц в качестве контейнеров для адресной доставки лекарств. Такой подход способствует уменьшению побочных эффектов, снижению токсичности и увеличению эффективности. Одним из основных препятствий на пути разработки такого вида препаратов является формирование биомолекулярной короны на поверхности наночастицы. Данный процесс происходит на малых временных и размерных масштабах и не может быть полностью описан только экспериментальными методами. В данной работе применен метод молекулярной динамики для изучения структуры поверхности наночастиц типа ядро-оболочка, самоорганизующихся из функциональных спейсеров-липидных конструкций в зависимости от плотности биотинового лиганда и карбоксиметилглицинового спейсера. Получены топографические карты поверхности ядра и оболочки наночастицы. Чтобы получить топографию ядра и оболочки каждой наночастицы, атомы были извлечены из координат молекулярной динамики, полученных в результате расчета GROMACS. Показано, что независимо от плотности спейсера и лиганда гидрофобное ядро принимает форму уплощенного сфероида и имеет карманы на поверхности, способные удерживать небольшие гидрофобные лекарства.

Также показано, что увеличение плотности спейсера с 0,5 до 1 мотива на мономер приводит к более шероховатой поверхности и увеличению средней толщины оболочки. Биотиновый лиганд в основном локализуется на поверхности ядра. Высокая плотность биотина приводит к уменьшению динамической изменчивости оболочки и подвижности лиганда, что может негативно сказаться на биологической судьбе наночастиц. Для предотвращения агрегации биотина и обеспечения его равномерного распределения на поверхности достаточно плотности 0,2 остатка на мономер.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, грант №23–24–00149.*

## MAPPING THE SURFACE OF MICELLE-LIKE NANOPARTICLES TO ASSESS THEIR PROPERTIES IMPORTANT FOR TARGETED DRUG DELIVERY

**V.A. Dimitreva, I.S. Vaskan, V.A. Oleinikov, A.V. Zalygin**

*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow*

One of the promising methods in pharmaceuticals is the use of nanoparticles as containers for targeted drug delivery. This approach helps to reduce side effects, reduce toxicity and increase effectiveness. One of the main obstacles to the development of this type of drugs is the formation of a biomolecular corona on the surface of a nanoparticle. This process occurs on small time and dimensional scales and cannot be fully described only by experimental methods. In this work, the molecular dynamics method is used to study the surface structure of core-shell nanoparticles, self-organizing from functional spacers-lipid structures depending on the density of the biotin ligand and carboxymethylglycine spacer. Topographic maps of the surface of the core and shell of the nanoparticle have been obtained. To obtain the topography of the core and shell of each nanoparticle, the atoms were extracted from the molecular dynamics coordinates obtained by the GROMACS calculation.

It has been shown that, regardless of the density of the spacer and ligand, the hydrophobic core takes the form of a flattened spheroid and has pockets on the surface capable of holding small hydrophobic drugs. It is also shown that an increase in the spacer density from 0.5 to 1 motif per monomer leads to a more rough surface and an increase in the average thickness of the shell. The biotin ligand is mainly localized on the surface of the nucleus. The high density of biotin leads to a decrease in the dynamic variability of the shell and ligand mobility, which can negatively affect the biological fate of nanoparticles. To prevent biotin aggregation and ensure its uniform distribution over the surface, a density of 0.2 residues per monomer is sufficient.

*The work was funded by the Russian Science Foundation (project no. 23-24-00149).*

## ИССЛЕДОВАНИЕ РНК-СВЯЗЫВАЮЩИХ СВОЙСТВ CSPB ИЗ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* И ЕГО МУТАНТНЫХ ФОРМ

**Н.В. Леконцева, А.Д. Никулин**

*Институт белка РАН, Пущино*

Представители семейства белков холодового шока (Csp) играют важную роль в регуляции экспрессии генов многих бактерий. Белки данного семейства сверхэкспрессируются в ответ на холодовой стресс и действуют как РНК-шапероны, предотвращая формирование вторичных структур РНК при низких температурах. Они представляют собой  $\beta$ -бочонок, состоящий из пяти антипараллельных  $\beta$ -тяжей. Белок CspB из *Mycobacterium tuberculosis*, помимо домена холодового шока, имеет С-концевую  $\alpha$ -спираль. Вероятно, именно она способствует формированию димера белка, который участвует во взаимодействии с малыми регуляторными РНК (мРНК). Мы решили проверить эту гипотезу и получили мутантные формы белка с разными вариантами делеции этой  $\alpha$ -спирали. Полученные генетические конструкции были экспрессированы в клетках штаммов-суперпродуцентов, был разработан протокол выделения данных мутантных форм. Сродство исследуемых белков с мРНК было исследовано с помощью методов электрофоретического анализа связывания (EMSA) и аналитической эксклюзионной хроматографии.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФ №24-24-00071.*

## STUDY OF RNA-BINDING PROPERTIES OF CSPB FROM *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* AND ITS MUTANT FORMS

**N.V. Lekontseva, A.D. Nikulin**

*Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino*

Cold shock protein (Csp) family play an important role in the regulation of gene expression in many bacteria. Proteins of this family are overexpressed in response to cold stress and act as RNA chaperones, preventing the formation of RNA secondary structures at low temperatures. They form a  $\beta$ -barrel consisting of five antiparallel  $\beta$  strands. CspB from *Mycobacterium tuberculosis* has a C-terminal  $\alpha$ -helix in addition to the cold shock domain. It is likely that this contributes to the formation of the protein dimer, which is involved in the interaction with small RNAs (sRNAs). We decided to test this hypothesis and obtained mutant forms of the protein with different deletion variants of this  $\alpha$ -helix. The obtained genetic constructs were expressed in *E. coli* strains and a purification protocol was developed. RNA-protein binding affinities were tested by electrophoretic mobility shift assay and size-exclusion chromatography.

*The work was supported by RSF # 24-24-00071.*

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ g-ФАКТОРОВ И РАСПРЕДЕЛЕНИЯ СПИНОВОЙ ПЛОТНОСТИ В КОРОТКОЖИВУЩИХ РАДИКАЛАХ ДИПЕПТИДОВ КАРНОЗИНА, АНСЕРИНА И АМИНОКИСЛОТЫ ГИСТИДИНА МЕТОДОМ ХИМИЧЕСКОЙ ПОЛЯРИЗАЦИИ ЯДЕР С ВРЕМЕННЫМ РАЗРЕШЕНИЕМ И В ПЕРЕКЛЮЧАЕМОМ МАГНИТНОМ ПОЛЕ**

**О.Б. Морозова, И.В. Жуков, Н.Н. Фишман, Ю.С. Журавлева, А.В. Юрковская**

*МТЦ СО РАН, Новосибирск*

Дипептиды карнозин ( $\beta$ -аланил-L-гистидин) и ансерин ( $\beta$ -аланил-L-N<sub>1</sub>-метилгистидин) выполняют роль антиоксидантов, нейтрализуя активные формы кислорода и другие высоко реакционноспособные частицы в мышечных тканях и тканях мозга позвоночных. Однако, поскольку у различных позвоночных соотношение между концентрациями ансерина и карнозина значительно отличаются, остаётся неизвестным, имеются ли отличия в реакционной способности этих пептидов. Цель работы состояла в изучении свойств радикалов и механизма антиоксидантного действия указанных пептидов. Метод химической поляризации ядер (ХПЯ) является высокочувствительным методом косвенного детектирования короткоживущих радикалов по спектрам ЯМР продуктов реакции. Этим методом с микросекундным временным разрешением были изучены кинетики обратимой фотоиндуцированной реакции окисления карнозина, ансерина и гистидина с триплетно-возбуждённым 2,2'-дипиридиллом. Установлено, что в нейтральном водном растворе тушение триплетно-возбуждённого дипиридила ансеринном происходит по механизму переноса электрона, а в тушение карнозином – по механизму переноса атома водорода. Исследование pH зависимости скорости тушения триплетов указывает, что протонированное состояние аминокислотного остатка  $\beta$ -аланила существенно влияет на структуру и реакционную способность радикала ансерина, а для радикала карнозина это влияние выражено меньше или отсутствует. На основе анализа интенсивностей линий в спектрах ХПЯ геминальных продуктов рекомбинации радикалов были определены константы электрон-ядерного сверхтонкого взаимодействия (СТВ) для протонов короткоживущих радикалов дипептидов. При моделировании кинетики ХПЯ были определены времена ядерной парамагнитной релаксации поляризованных протонов в радикалах, и были выявлены различия анизотропии тензоров СТВ. Изучение зависимости эффекта ХПЯ от магнитного поля при различных pH также выявило существенное различие g-факторов радикалов карнозина и ансерина, что в совокупности с данными о распределении СТВ указывает на различную структуру образующихся радикалов. При этом g-факторы и константы СТВ на протонах карнозина и гистидина оказались близкими. Полученные данные указывают на взаимодействие нейтральной аминокислотной группы радикала ансерина с радикальным центром, локализованным на имидазольном кольце гистидина в дипептиде.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-73-01101, <https://rscf.ru/project/23-73-01101/>.*

**DETERMINATION OF g-FACTORS AND SPIN DENSITY DISTRIBUTION IN SHORT-LIVED RADICALS OF THE DIPEPTIDES CARNOSINE, ANSERINE AND THE AMINO ACID HISTIDINE BY TIME-RESOLVED AND MAGNETIC FIELD-CYCLING CHEMICALLY INDUCED DYNAMIC NUCLEAR POLARISATION**

**O.B. Morozova, I.V. Zhukov, N.N. Fishman, Y.S. Zhuravleva, A.V. Yurkovskaya**

*ITC SB RAS, Novosibirsk*

The dipeptides carnosine ( $\beta$ -alanyl-L-histidine) and anserine ( $\beta$ -alanyl-L-N<sub>1</sub>-methylhistidine) have been demonstrated to act as antioxidants, neutralizing highly reactive particles in the muscle and brain tissues of vertebrates. However, it remains unclear whether there are differences in the reactivity of these peptides. The objective of this study was to examine the radical properties and the mechanism of antioxidant action of the aforementioned peptides. Chemically Induced Dynamic Nuclear Polarization (CIDNP) is a highly sensitive indirect detection method for studying short-lived radicals, utilizing NMR spectroscopy. This method was used to investigate the kinetics of the reversible photoinduced oxidation reaction of carnosine, anserine and histidine with triplet-excited 2,2'-dipyridyl, with microsecond time resolution. It was found that in a neutral aqueous solution, the quenching of triplet-excited dipyridyl by anserine occurs via the electron transfer, whereas the quenching by carnosine occurs via the transfer of hydrogen atom. The study of the pH dependence of the triplet quenching rate indicates that the protonation state of the amino group at the  $\beta$ -alanyl residue has a marked effect on the reactivity of the anserine radical, whereas this influence is less pronounced or absent for the carnosine radical. The electron-nuclear hyperfine interaction constants (HFCs) for the protons of short-lived dipeptide radicals were determined by analyzing the line intensities in the CIDNP spectra of recombination products. The nuclear paramagnetic relaxation times of polarized protons in radicals have been determined, and differences in the anisotropy of the HFC tensors have been revealed through the modelling of CIDNP kinetics. The study of the CIDNP field dependence at different pH also revealed a significant difference in the g-factors of carnosine and anserine radicals. This, together with the data on the HFC distribution, indicates a different structure of the formed radicals. In turn, the g-factors and HFC constants for the protons of carnosine and histidine are similar. The data obtained suggest the interaction of the neutral amino group of the anserine radical with the radical center localized on the imidazole ring of histidine in the dipeptide.

*The research work was supported by the Russian Science Foundation under the grant № 23-73-01101, <https://rscf.ru/project/23-73-01101/>.*

### ТОЧКИ ИНТЕРАКЦИИ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ КРОВИ С МИНЕРАЛЬНЫМ ГОМЕОСТАЗОМ ПРИ ОПУХОЛЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Л.М. Обухова, Т.В. Копытова, А.А. Кустова, И.А. Медяник, И.И. Евдокимов, Т.И. Сторожева, А.С. Гришин, И.Д. Капранова

*ПИМУ, кафедра биохимии им. Г.Я. Городисской, Нижний Новгород, Россия*

Цель – анализ взаимосвязей макро- и микроэлементов с особенностями обмена белков при глиомах.

Изучали кровь 20 пациентов (39-61 лет) с глиомами до лечения. Диагноз установлен по классификации ВОЗ опухолей ЦНС (Louis, 2016). Контроль – кровь 10 практически здоровых людей (31-60 лет). Разделение белков осуществляли методом электрофореза с помощью УЭФ-01-«АСТРА». Анализ уровня элементов проводили атомно-эмиссионной спектрометрией на спектрометре iCAP6300Duo (Thermo Scientific, США). Статистическая обработка данных проводилась с помощью AnalystSoft Inc., StatPlus.

Не было выявлено значимых отличий во фракциях при начальных степенях анаплазии глиом от таковых у здоровых людей. При более поздних степенях анаплазии – значимые изменения содержания  $\alpha 1$ -глобулинов; снижение на 13,33% при Grade 3 и 4 увеличения на 12,12% при Grade 4. Изучение профиля белков в 50% случаев при Grade 1,2 глиом и в 50% и 70% при Grade 3 и 4 показало дополнительные пики в  $\alpha 1$  и  $\beta$  глобулиновых фракциях. Вероятно, в дополнительной фракции находится глиальный фибриллярный кислый протеин (GFAP). Этот белок – важный маркер глиом. По характеристикам он может принадлежать к бета-глобулинам. Уровни GFAP у больных выше по сравнению со здоровыми людьми и другими патологиями (Любимова и др., 2016). При опухолях значимо растает уровень Na, Ca, Mg, P, S, уровень K – снижается. Также показан значимый рост содержания железа, цинка, лития. Уровень Se, Mo, Al, Co, Cr, V и Ni – снижается по сравнению с практически здоровыми людьми. Выявлена выраженная корреляционная связь между дополнительными пиками в электрофореграмме и уровнем Na (Rho=0,559), K (Rho=-0,560), P (Rho=0,538), Co (Rho=-0,661), Se (Rho=0,536), Zn (Rho=-0,463). GFAP участвует в регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Возможно, транспорт данных элементов зависит от функционирования GFAP, поскольку показана связь между повышением содержания GFAP в крови и нарушением проницаемости ГЭБ при глиомах.

Закономерности электрофореграмм и минерального гомеостаза позволят после дополнительных исследований найти способ ранней диагностики глиом.

### POINTS OF INTERFERENCE OF BLOOD ELECTROPHORETIC PROFILE WITH MINERAL HOMEOSTASIS IN BRAIN TUMORS

L.M. Obukhova, T.V. Kopytova, A.A. Kustova, I.A. Medyanik, I.I. Evdokimov, T.I. Storozheva, A.S. Grishin, I.D. Kapranova  
*PRMU, G.Ya. Gorodisskaya Department of Biochemistry, Nizhny Novgorod*

Objective: to analyze the relationships between macro- and microelements and the features of protein metabolism in gliomas.

The blood of 20 patients (39-61 years old) with gliomas was studied before treatment. The diagnosis was established according to the WHO classification of CNS tumors (Louis, 2016). Control - the blood of 10 practically healthy people (31-60 years old). Proteins were separated by electrophoresis using UEF-01-ASTRA. The level of elements was analyzed by atomic emission spectrometry on an iCAP6300Duo spectrometer (Thermo Scientific, USA). Statistical processing was carried out using AnalystSoft Inc., StatPlus.

No significant differences were found in the fractions at the initial stages of glioma anaplasia from those in healthy people. At later stages of anaplasia – significant changes in the content of  $\alpha 1$ -globulins; a decrease of 13.33% at Grade 3 and 4 an increase of 12.12% at Grade 4. The study of the protein profile in 50% of cases at Grade 1,2 gliomas and in 50% and 70% at Grade 3 and 4 showed additional peaks in the  $\alpha 1$  and  $\beta$  globulin fractions. Probably, the glial fibrillary acidic protein (GFAP) is in the additional fraction. This protein is an important marker of gliomas. According to its characteristics, it may belong to beta globulins. GFAP levels in patients are higher compared to healthy people (Lyubimova et al., 2016). In tumors, the level of Na, Ca, Mg, P, S significantly increases, the level of K decreases. A significant increase in the content of iron, zinc, lithium is also shown. The level of Se, Mo, Al, Co, Cr, V and Ni decreases compared to practically healthy people. A pronounced correlation was found between additional peaks in the electrophoregram and the level of Na (Rho=0.559), K (Rho=-0.560), P (Rho=0.538), Co (Rho=-0.661), Se (Rho=0.536), Zn (Rho=-0.463). GFAP is involved in the regulation of the permeability of the blood-brain barrier (BBB). It is possible that the transport of these elements depends on the functioning of GFAP, since a relationship has been shown between an increase in the GFAP content and impaired BBB permeability in gliomas.

Regularities in electrophoregrams and mineral homeostasis may allow us to find a way to diagnose gliomas early.

## SLOW EQUILIBRIA IN HUMAN BUTYRYL CHOLINESTERASE AT WORK: PHYSIOLOGICAL AND PHARMACO-TOXICOLOGICAL RELEVANCE?

P. Masson<sup>1</sup>, Z. Shaihutdinova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Biochemical Neuropharmacology lab, Kazan Federal University; <sup>2</sup>Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan

Cholinesterases, acetyl- and butyryl-cholinesterases (AChE and BChE), are widespread enzymes that play key roles in the cholinergic system. In addition, BChE participates in the metabolism of numerous drugs and endogenous substrates [1]. Both enzymes display structural and catalytic complexities. In particular, slow-binding kinetics and hysteretic behaviors (temporal cooperativity or allokaity) with certain substrates and inhibitors have been described [2].

Slow enzymatic processes are physiologically important in metabolism regulation and are also involved in toxicological and pharmacological responses to drugs and toxicants. These processes can be described either by slow conformational equilibria between enzyme forms with ligand selection by one form, and alternatively by rapid initial binding of ligand followed by slow ligand-induced fit of enzyme forms [3].

In the present work, human BChE-catalyzed hydrolysis of 2 poor medicinal substrates, atropine (a bulky carboxyl-ester) and mirabegron (an aryl-acylamide substrate) was investigated. Kinetic and molecular modeling studies of the mechanisms of binding and slow hydrolysis of racemic atropine, showed that the L-isomer slowly reacts with the enzyme while the enantiomer D is not hydrolyzed. This mechanism was interpreted according to the theory of hysteretic enzymes where two catalytically distinct enzyme forms, E and E', are in slow equilibrium. The two enzyme forms were kinetically identified by time-dependent selective irreversible inhibition by an organophosphate and subsequent monitoring of the remaining activity, using atropine as the reporter substrate [4]. On the other hand, hydrolysis of mirabegron showed a long burst preceding establishment of the steady state [5]. This hysteretic behavior indicates that the slow equilibrium between E and E' is progressively shifted toward E', the less active form that displays the highest affinity for the substrate.

Although the intimate molecular mechanism of BChE-catalyzed hydrolysis of these substrates has not yet been investigated, it likely fits with the mechanism involving a flip of the histidine ring of the catalytic triad [6]. The functional significance of BChE hysteretic mechanisms is puzzling especially since the physiological role(s) of this enzyme remain(s) poorly understood even in the postgenomic era. In particular, BChE as a promiscuous enzyme, hydrolyzing several known physiological substrates with  $k_{cat}/K_m$  differing by several orders of magnitudes, may work under different chemical reaction order conditions, and shows partial activation or inhibition by excess substrates and modulators [7].

*This work was supported by the program "Prioritet 2030" of Kazan Federal University.*

1. Masson P., Shaihutdinova Z., Lockridge O. *Biochem Pharmacol.* 2023, 218: 115910.
2. Masson P., Lushchekina S. *Arch Biochem Biophys.*, 2016, 596: 60.
3. Masson P. *Biokhimiya* 2012, 77: 1383.
4. Mukhametgalieva A. *Molecules* 2024, 29: 2140.
5. Shaihutdinova Z. *Molecules* 2024, 18: 12450.
6. Lushchekina S. *J Mol Neuroscience* 2014, 52: 434.
7. Masson P, Mukhametgalieva A. *Int J Mo. Sci.* 2023, 24: 12973.

### АПУРИН-АПИРИМИДИНОВЫЕ САЙТЫ: АХИЛЛЕСОВА ПЯТА ДНК

Д.О. Жарков

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

Из всех химических связей в молекуле ДНК N-гликозидная связь нуклеотидов в водном растворе наименее стабильна. В результате каждый день в геноме человека спонтанно образуется 20000–50000 апурин-апириமிдиновых (АП-) сайтов — звеньев ДНК с утерянным основанием. Кроме того, АП-сайты возникают как интермедиаты действия системы эксцизионной репарации оснований ДНК (ЭРО). Сами по себе АП-сайты высокомутагенны и цитотоксичны, поскольку неспособны направлять включение нуклеотидов по принципу комплементарности и блокируют действие ДНК-полимераз. Поэтому они должны быстро подвергаться репарации, что обычно происходит по пути ЭРО, где их узнают ферменты АП-эндонуклеазы, которые гидролизуют ДНК с 5'-стороны от АП-сайта.

АП-сайты химически нестабильны и склонны к  $\beta$ -элиминированию с образованием 3'-концевого ненасыщенного альдегидного производного дезоксирибозы при одноцепочечном разрыве ДНК. В последние годы выяснилось, что АП-сайты легко окисляются и охотно реагируют с нуклеофильными группами в клетке, образуя новые аддукты, чей цитотоксичный и мутагенный потенциал и способы репарации служат предметом активного изучения. Так, аддукты АП-сайтов с белками полностью блокируют ДНК-полимеразы, а для их репарации необходим протеолиз белка до достаточно коротких пептидных аддуктов. В свою очередь аддукты АП-сайтов с пептидами и с природными полиаминами могут частично преодолеваться с включением напротив них dAMP и dGMP. У бактерий и низших эукариот такие аддукты репарируются с участием системы ЭРО, в то время как в клетках человека механизм репарации пока неизвестен. Некоторые аддукты АП-сайтов с низкомолекулярными соединениями, в частности, с алкоксиаминами, оказались устойчивы к действию АП-эндонуклеаз, в связи с чем такие молекулы находятся в разработке как сенситизаторы раковых клеток к генотоксичным видам терапии. Использование модифицированных АП-сайтов, устойчивых к действию АП-эндонуклеаз, также позволило открыть запасные пути репарации, основанные на негидролитическом расщеплении ДНК ферментами класса АП-лиаз. Наконец, ингибиторы бактериальных АП-эндонуклеаз увеличивают чувствительность патогенных микроорганизмов к действию многих бактерицидных и бактериостатических соединений и рассматриваются как потенциальные компоненты для комбинированной антибиотикотерапии.

*Работа поддержана Министерством науки и высшего образования РФ (FSUS-2020-0035).*

### ABASIC SITES: THE ACHILLES' HEEL OF DNA

D.O. Zharkov

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk*

Of all chemical bonds in the DNA molecule, the N-glycosidic bond of nucleotides is the least stable in water. As a result, 20,000–50,000 apurinic-apyrimidinic (AP) sites, DNA units with a base lost, are spontaneously formed in the human genome every day. In addition, AP sites arise as intermediates in the DNA base excision repair (BER) pathway. AP sites themselves are highly mutagenic and cytotoxic, since they are unable to direct the incorporation of nucleotides according to the principle of complementarity and block DNA polymerases. Therefore, they must be quickly repaired, usually via the BER pathway, where they are recognized by AP endonucleases, enzymes that hydrolyze DNA 5' of the AP site.

AP sites are chemically unstable and prone to  $\beta$ -elimination with the formation of a 3'-terminal unsaturated aldehyde remnant of deoxyribose at the single-strand DNA break. In recent years, it became clear that AP sites are easily oxidized and readily react with nucleophilic groups in the cell, forming new adducts, whose cytotoxic and mutagenic potential and repair are the subject of active study. For example, AP site adducts with proteins completely block DNA polymerases, and their repair requires proteolysis to sufficiently short peptide adducts. In turn, adducts of AP sites with peptides and with natural polyamines can be partially bypassed with incorporation of dAMP and dGMP. In bacteria and lower eukaryotes, such adducts are repaired by BER, while in human cells the repair mechanism is still unknown. Some AP site adducts with low-molecular-weight compounds, e. g., with alkoxyamines, are resistant to AP endonucleases, and therefore such molecules are under development as sensitizers of cancer cells to genotoxic interventions. The use of modified AP sites resistant to AP endonucleases also helped to discover backup repair pathways based on non-hydrolytic cleavage of DNA by AP lyase enzymes. Finally, inhibitors of bacterial AP endonucleases increase the sensitivity of pathogenic microorganisms to many bactericidal and bacteriostatic treatments and are considered as potential components for combination antibiotic therapy.

*The work was supported by Russian Ministry of Science and Higher Education (FSUS-2020-0035).*

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗРЫВА P-O СВЯЗИ В АКТИВНЫХ ЦЕНТРАХ ФЕРМЕНТОВ

**М.Г. Хренова, Т.И. Мулашкина, А.М. Кулакова, И.В. Поляков**

*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва*

Разрыв P-O связи относится к числу важнейших ферментативных реакций. Механизмы этих химических реакций разнообразны и, согласно принятой классификации, делятся на диссоциативный и ассоциативный. Ассоциативный механизм предполагает, что образование новой связи предшествует разрыву, тогда как для диссоциативного механизма разрыв связи происходит первым. В данной работе мы рассматриваем ферменты из разных классов, включая АТФазы, ГТФазы, аденилатциклазы, киназы, дигуанилатфосфодиэстеразы и фосфотриэстеразы.

Мы собрали все доступные экспериментальные и теоретические данные о механизмах реакций в активных центрах этих ферментов, чтобы выявить теоретические основы их различий. Для всех рассмотренных ферментов мы изучаем полноатомные фермент-субстратные комплексы и проводим расчеты методом молекулярной динамики (МД) с использованием комбинированных потенциалов квантовой механики /молекулярной механики (КМ/ММ), а также рассчитываем равновесные геометрические конфигурации. Далее мы анализируем геометрические параметры и дескрипторы, основанные на электронной плотности, в различных кадрах МД траекторий и стационарных точках на поверхности потенциальной энергии. Два основных расстояния, которые определяют тип механизма реакции, – это расстояние нуклеофильной атаки и длина разрываемой связи P-O. В фермент-субстратных комплексах ферментов, работающих по ассоциативному механизму, расстояние нуклеофильной атаки, как правило, больше, чем в системах с диссоциативным типом реакции, а разрываемая связь короче. Это также проявляется в особенностях электронной плотности в области разрываемой связи: связь ослаблена и более подготовлена к разрыву для систем с диссоциативным типом механизма, что видно на графиках лапласиана электронной плотности.

Таким образом, особенности структуры фермент-субстратного комплекса, электронной плотности и динамики определяют механизм реакции.

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 19-73-20032).*

## MOLECULAR MECHANISMS OF THE P-O BOND CLEAVAGE IN ACTIVE SITES OF ENZYMES

**M.G. Khrenova, T.I. Mulashkina, A.M. Kulakova, I.V. Polyakov**

*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow*

The P-O bond cleavage is among important enzymatic reactions. The mechanisms of this chemical reaction are diverse. According to the classification, those can happen via dissociative or associative mechanisms. Associative mechanism presumes that the bond formation precedes bond cleavage, whereas for dissociative mechanism the bond cleavage happens first. In this study we consider enzymes from different classes including ATPases, GTPases, adenylate cyclases, kinases, diguanylate phosphodiesterases and phosphotriesterases.

We collect available experimental and theoretical data on the reaction mechanisms in the active sites of these enzymes to reveal theoretical basis of their differences. For all considered enzymes we prepare full atom enzyme-substrate complexes and perform molecular dynamic (MD) simulations with the combined quantum mechanics / molecular mechanics (QM/MM) potentials as well as QM/MM geometry optimization. Following, we analyze geometry features and electron density-based descriptors at different MD frames and equilibrium geometry configurations. Two main distances that are responsible for the reaction mechanism type are cleaving and forming P-O bonds. In enzyme-substrate complexes that follow associative mechanism the distance of the nucleophilic attack is generally larger than for systems with the dissociative mechanisms. The cleaving P-O bond is longer in complexes with enzymes operating via dissociative mechanism. It is also pronounced in the electron density peculiarities in the cleaving bond region: the bond is weakened and more prepared for cleavage for systems with the dissociative type of mechanism that is seen on the Laplacian of electron density maps.

Thus, the peculiarities of the enzyme-substrate complex structure, electron density features and dynamics determine the reaction mechanism.

*This study is supported by the Russian Science Foundation (project 19-73-20032).*

## МОЛЕКУЛЯРНО-КИНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ БИОКАТАЛИЗА И КОНТРОЛЯ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

**Н.А. Кузнецов**

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

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

В ходе исследований использована комплексная методология регистрации и анализа конформационной динамики ферментов и субстратов в процессе их взаимодействия в режиме реального времени, основанная на кинетическом, термодинамическом и мутационном анализе изменений конформации ферментов и их субстратов. Разработанный подход апробирован на большом числе ДНК-процессирующих ферментов, включая ДНК-гликозилазы и AP-эндонуклеазы, репликативные и репарационные ДНК-полимеразы и нуклеотидилтрансферазы.

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

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 21-64-00017.*

## MOLECULAR KINETIC MECHANISMS OF BIOCATALYSIS AND CONTROL OF SUBSTRATE SPECIFICITY OF ENZYMES

**N.A. Kuznetsov**

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk*

Currently, the understanding of the mechanisms of enzymatic reactions is based on static structural data, data from classical steady state kinetics and analysis of the structure of intermediates and products of substrate transformation. The key principle in enzymatic catalysis, according to the induced fit model, is the assumption that the enzyme and substrate molecules undergo conformational changes necessary to achieve a catalytically competent state. Therefore, the analysis of conformational dynamics, that is the connecting link of all approaches to studying the mechanisms of action of enzymes, makes it possible to reveal the sequence of molecular structure transformations leading to the formation of a catalytic complex and control the specificity of the enzyme.

During the research, a comprehensive methodology was used to record and analyze the conformational dynamics of enzymes and substrates during their interaction in real time, based on kinetic, thermodynamic and mutational analyzes of changes in the conformation of enzymes and their substrates. The developed approach was tested on a large number of DNA-processing enzymes, including DNA glycosylases and AP endonucleases, replicative and repair DNA polymerases and nucleotidyl transferases.

Systematic analysis of a large number of enzymes has made a significant contribution to the understanding of the mechanisms of specific recognition of substrates and/or specific sites by the studied enzymes. Taken together, the results obtained suggest that kinetic analysis of conformational changes is an important source of data necessary for integrating the results and constructing the mechanism of action of a wide variety of enzymes, as well as applying these results for the rational design and creation of enzymes with altered properties.

*The work was supported by the Russian Science Foundation grant № 21-64-00017.*



## БЕЛКОВЫЙ ФАКТОР HPF1 СТИМУЛИРУЕТ АКТИВНОСТЬ PARP1 И PARP2 В КОНТЕКСТЕ НУКЛЕОСОМ

Т.А. Кургина, Н.А. Моор, М.М. Кутузов, А.А. Украинцев, О.И. Лаврик

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

Ферменты поли(ADP-рибоза)полимеразы (PARP) катализируют посттрансляционную модификацию белков, называемую поли(ADP-рибозил)ированием или PAR-илированием. PAR-илирование играет ключевую роль в регуляции различных клеточных процессов, включая репарацию ДНК, организацию структуры хроматина, экспрессию генов, репликацию ДНК, процессинг РНК и биогенез рибосом [1]. Основные ферменты, катализирующие PAR-илирование в ядре и синтез протяженного, заряженного отрицательно полимера поли(ADP-рибозы) (PAR), – два ДНК-зависимых фермента семейства PARP: PARP1 и PARP2 [2]. Функции этих ферментов в регуляции репарации ДНК существенно пересекаются, оба фермента участвуют в эксцизионной репарации оснований (BER) [3]. Несмотря на то, что изучение синтеза PAR и ферментов PARP началось еще в 60-е годы XX века, только недавно был обнаружен новый белок-партнёр PARP1 и PARP2 — фактор PAR-илирования гистонов 1 (HPF1), который регулирует активность и специфичность PARP1 и PARP2 и образует с ними временный совместный активный центр. HPF1 переключает специфичность PAR-илирования на остатки серина и играет важную роль в катализируемом PARP1 и PARP2 PAR-илировании гистонов [4]. Общая картина взаимодействия HPF1 с PARP только начинает проясняться. В представленном исследовании мы демонстрируем, что HPF1 может стимулировать авто-PAR-илирование PARP1/2 и гетеро-PAR-илирование гистонов в контексте нуклеосом. HPF1 более эффективно стимулирует PARP2 по сравнению с PARP1, и эффект стимуляции зависит от структуры повреждения ДНК. Полученные результаты открывают новые перспективы конструирования ингибиторов PARP 1/2 как препаратов для лечения онко-и нейродегенеративных заболеваний.

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

1. Kraus WL. PARPs and ADP-ribosylation: 60 years on. *Genes Dev.* 2020.
2. Wei H, Yu X. Functions of PARylation in DNA damage repair pathways. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2016.
3. Vasil'eva IA et al. Dynamic light scattering study of base excision DNA repair proteins and their complexes. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 2019.
4. Sun FH et al. HPF1 remodels the active site of PARP1 to enable the serine ADP-ribosylation of histones. *Nat Commun.* 2021.

## PROTEIN FACTOR HPF1 STIMULATES PARP1 AND PARP2 ACTIVITY IN THE CONTEXT OF NUCLEOSOMES

Т.А. Кургина, Н.А. Моор, М.М. Кутузов, А.А. Украинцев, О.И. Лаврик

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk*

Poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs) are enzymes that catalyze the post-translational modification of proteins called poly(ADP-ribosylation) or PARylation. This process plays a crucial role in various cellular processes such as DNA repair, chromatin organization, gene expression, DNA replication, RNA processing, and ribosome biogenesis. The main enzymes responsible for PARylation in the nucleus are PARP1 and PARP2, which are both DNA-dependent PARP family members. These enzymes have overlapping functions in DNA re-pair, particularly in base excision repair (BER). Although research on PAR synthesis and PARP enzymes began in the 1960s, a new protein partner of PARP1 and PARP2, called histone PARylation factor 1 (HPF1), was only recently discovered. HPF1 regulates the activity and specificity of PARP1 and PARP2 by forming a temporary active site with them. It switches the PARylation specificity from aspartate and glutamate to serine residues, playing an important role in the PARP1/2-catalyzed PARylation of histones. The overall picture of the interaction between HPF1 and PARPs is still emerging. In this study, we show that HPF1 stimulates the auto-PARylation of PARP1/2 and the hetero-PARylation of histones within nucleosomes. It is more effective at stimulating PARP2 than PARP1, and its stimulatory effect depends on the structure of DNA damage. The results obtained open up new possibilities for the development of PARP1/2 inhibitors as potential drugs for the treatment of oncological and neurodegenerative diseases.

*The study is supported by the RFFS grant # 21-64-00017.*

1. Kraus WL. PARPs and ADP-ribosylation: 60 years on. *Genes Dev.* 2020.
2. Wei H, Yu X. Functions of PARylation in DNA damage repair pathways. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2016.
3. Vasil'eva IA et al. Dynamic light scattering study of base excision DNA repair proteins and their complexes. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 2019.
4. Sun FH et al. HPF1 remodels the active site of PARP1 to enable the serine ADP-ribosylation of histones. *Nat Commun.* 2021.

## ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА БЕЛКОВ PARP С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

**Д.К. Нилов**

*МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва*

Семейство поли(ADP-рибозо)полимераз (PARP) включает 17 белков, выполняющих разнообразные клеточные функции в здоровом организме и при ряде патологий. В частности, PARP-1, 2, 5a и 5b важны для пролиферации раковых клеток и являются мишенями для разработки противоопухолевых препаратов. Экспериментальное исследование молекулярного механизма действия белков PARP осложнено ввиду комплексного строения субстратов и продуктов катализируемой реакции. В представленном докладе рассмотрена возможность использования методов молекулярного моделирования, метадинамики и квантовой химии для описания каталитического механизма белков PARP, понимание которого необходимо для дизайна новых, более эффективных лекарственных препаратов. На примере PARP-1 впервые продемонстрировано детальное моделирование механизма элонгации синтезируемого полимера - поли(ADP-рибозы). Показано, что реакция протекает по SN1-подобному механизму через образование иона оксокарбения. Примечательно, что нуклеофильная 2'-ОН группа субстрата-акцептора активируется общим основанием Glu988 не напрямую, а с помощью системы передачи протона, включающей соседнюю 3'-ОН группу.

## STUDYING THE MECHANISM OF PARP PROTEINS USING MOLECULAR MODELING

**D.K. Nilov**

*Lomonosov Moscow State University, Moscow*

The poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) family includes 17 proteins that perform a variety of cellular functions in a healthy organism and in a number of pathologies. In particular, PARP-1, 2, 5a and 5b are important for cancer cell proliferation and are targets for the development of anticancer drugs. Experimental study of the molecular mechanism of action of PARP proteins is complicated due to the complex structure of the substrates and products of the catalyzed reaction. The presented report examines the possibility of using methods of molecular modeling, metadynamics, and quantum chemistry to describe the catalytic mechanism of PARP proteins, an understanding of which is necessary for the design of new, more effective drugs. On the example of PARP-1, detailed modeling of the elongation mechanism of the synthesized polymer, poly(ADP-ribose), was demonstrated for the first time. The reaction was shown to proceed via an SN1-like mechanism through the formation of an oxocarbenium ion. Notably, the nucleophilic 2'-OH group of the acceptor substrate is activated by the general base Glu988 not directly but through a proton relay system including the adjacent 3'-OH group.

## ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ И S-АДЕНОЗИЛМЕТИОНИНА: СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

**А.Р. Хомутов**

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

Замена карбоксильной группы аминокислот на кислый фосфорсодержащий фрагмент приводит к обширному семейству аналогов. Однако только однозарядный фосфонистый фрагмент, представляющий собой сплюснутый тетраэдр, способен продуктивно моделировать плоскую однозарядную карбоксильную группу. Поэтому некоторые аминифосфонистые кислоты способны претерпевать субстратоподобные ферментативные превращения, приводящие к новым фосфорорганическим метаболитам. Соответственно, биологической активностью обладают не только аминифосфонистые кислоты, но и их, возникающим *in situ*, фосфорсодержащие производные. Синтезирован набор фосфорорганических аналогов S-аденозилметионина, S-аденозилгомоцистеина, глутаминовой кислоты и ее дипептидов. Обсуждается взаимодействие синтезированных фосфорорганических аналогов с некоторыми ферментами метаболизма глутаминовой кислоты и S-аденозилметионина, а также антибактериальная активность в отношении *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* и штаммов *Klebsiella pneumoniae*, обладающих множественной устойчивостью к антибиотикам.

*Работа поддержана грантом РФФ № 22-14-00291.*

1. De Biase D et al. *Commun Chem.* 2020, 3: 1121.
2. Demiankova et al. *Molecules* 2023, 28, 1234.
3. Filonov VL et al. *Mol Biol (Moscow)* 2023, 57: 747-754.
4. Khomutov MA et al. *Biomolecules* 2023, 13: 1451.
5. Rudenko AYU et al. *Front Chem.* 2024, 12: 1448747.

## PHOSPHORUS ANALOGUES OF GLUTAMIC ACID AND S-ADENOSYLMETHIONINE: SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY

**A.R. Khomutov**

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow*

The replacement of the carboxyl group of amino acids with an acidic phosphorus containing group(s) gives rise to a big family of the compounds, but only single-charged phosphorus containing group of amino-H-phosphinic acids ( $X=H$ ) is a flattened tetrahedron and a mimetic of a planar single-charged carboxyl group. Therefore, some amino-H-phosphinic acids can undergo substrate-like transformations producing new phosphorus-containing metabolites. Respectively, biological activity of amino-H-phosphinic acids may be attributed to these analogues, or to the *in situ* formed phosphorus-containing metabolites. Phosphorus containing analogues of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, glutamate, and dipeptides of the last were synthesized. The interaction of these analogues with some enzymes of glutamate and S-adenosylmethionine metabolism is discussed, as well as the antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*.

*Supported by the Russian Science Foundation grant no. 22-14-00291.*

1. De Biase D et al. *Commun Chem.* 2020, 3: 1121.
2. Demiankova et al. *Molecules* 2023, 28, 1234.
3. Filonov VL et al. *Mol Biol (Moscow)* 2023, 57: 747-754.
4. Khomutov MA et al. *Biomolecules* 2023, 13: 1451.
5. Rudenko AYU et al. *Front Chem.* 2024, 12: 1448747.

### ПРОТЕАЗА S ИЗ *PHOTORHABDUS LAUMONDII*: НА ПУТИ К ВЫЯСНЕНИЮ БИОЛОГИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ

М.А. Карасева, И.В. Демидюк

НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Протеаза S (PrtS) из энтомопатогенной бактерии *Photorhabdus laumondii* относится к группе протеализинподобных протеаз (ППП). Эти ферменты широко распространены у бактерий, однако их биологические функции неясны. В то же время имеющиеся данные указывают на то, что ППП участвуют во взаимодействии бактерий с другими организмами и, вероятно, вовлечены в патогенез. Таким образом, изучение ППП не только способно дать новую информацию о физиологии бактерий, но и открыть новые пути противобактериальной терапии.

Для исследования функций PrtS нами получен высокоочищенный рекомбинантный фермент и исследовано его действие на большую восковую моль *Galleria mellonella*. Кроме того, сконструирован вариант *P. laumondii* subsp. *laumondii* TT01 с нокаутом генов протеазы и ее эндогенного ингибитора, и охарактеризованы действие мутантной бактерии на *G. mellonella*, а также ее подвижность и способность формировать биопленки. Показано, что инсектотоксичность PrtS существенно ниже по сравнению с протеазами того же семейства, но происходящими из неэнтомопатогенных бактерий. Продемонстрировано, что PrtS способна расщеплять в гемолимфе насекомых белки, функции которых предположительно связаны с иммунным ответом. Нокаут гена протеазы вызвал существенное увеличение инсектотоксичности секрета *P. laumondii*, что, однако, не влияло значительно на развитие инфекции. Было обнаружено, что мутантные бактерии обладают сниженной способностью к роению и формированию биопленок. Полученные данные впервые позволяют сделать вывод о том, что токсическое действие PrtS не является существенным для бактериальной инфекции. В то же время, действуя на белки гемолимфы, PrtS, вероятно, модулирует противобактериальный иммунный ответ насекомых, что может быть специфической функцией, не характерной для других ППП. Напротив, выявленное нами влияние PrtS на подвижность бактерий и формирование ими биопленок может отражать функцию общую для всех ферментов группы.

Таким образом, наши результаты позволяют предположить, что бактериальные ППП являются многофункциональными белками, одни биологические функции которых являются общими и не зависят от конкретной бактерии, а другие – адаптированы к экологической нише частного продуцента.

*Работа выполнена в рамках государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».*

### PROTEASE S FROM *PHOTORHABDUS LAUMONDII*: ON THE WAY TO UNRAVELING BIOLOGICAL FUNCTIONS

М.А. Karaseva, I.V. Demidyuk

NRC «Kurchatov Institute», Moscow

Protease S (PrtS) from the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus laumondii* belongs to the group of protealysin-like proteases (PLPs). These enzymes are widely spread in bacteria, but their biological functions are unclear. At the same time, evidence suggests that PLPs are involved in the interaction of bacteria with other organisms and are likely to be involved in pathogenesis. Thus, the study of PLPs can not only provide new information about bacterial physiology, but also open new avenues of antibacterial therapy.

To investigate the functions of PrtS, we obtained a highly purified recombinant enzyme and studied its effect on the greater wax moth *Galleria mellonella*. In addition, we constructed a variant of *P. laumondii* subsp. *laumondii* TT01 with knockout of the protease gene and its endogenous inhibitor gene, and characterised the effect of the mutant bacterium on *G. mellonella*, as well as its motility and ability to form biofilms. The insectotoxicity of PrtS was shown to be significantly lower compared to enzymes of the same family but originating from non-entomopathogenic bacteria. It has been demonstrated that PrtS is capable of cleaving proteins in insect haemolymph whose functions are presumably related to the immune response. Knockout of the protease gene caused a significant increase in the insectotoxicity of the *P. laumondii* secretome, but this had no significant effect on the development of infection. The mutant bacteria were found to have a reduced ability to swarm and form biofilms. The data obtained allow us to conclude for the first time that the toxic effect of PrtS is not essential for bacterial infection. At the same time, acting on haemolymph proteins, PrtS probably modulates the antibacterial immune response of insects, which may be a specific function not characteristic of other PLPs. On the contrary, the effect of PrtS on bacterial motility and biofilm formation may reflect a function common to all enzymes of the group.

Thus, our results suggest that bacterial PLPs are multifunctional proteins, some biological functions of which are general and do not depend on a particular bacterium, and others are adapted to the ecological niche of a specific producer.

*The work was carried out within the state assignment of NRC «Kurchatov Institute».*

## АРХИТЕКТУРА СВЕТОСОБИРАЮЩИХ КОМПЛЕКСОВ LH2 ИЗ ПУРПУРНОЙ СЕРНОЙ БАКТЕРИИ *ECTOTHIORHODOSPIRA HALOALKALIPHILA*

К.М. Бойко<sup>1</sup>, А.Д. Бурцева<sup>1,2</sup>, Т.Н. Баймухаметов<sup>3</sup>, М.А. Большаков<sup>4</sup>, В.О. Попов<sup>1</sup>, А.А. Ашихмин<sup>4</sup>

<sup>1</sup>ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; <sup>2</sup>Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный; <sup>3</sup>НИЦ «Курчатовский институт», Москва; <sup>4</sup>Институт фундаментальных проблем биологии РАН, ФИЦ «Пушчинский научный центр биологических исследований» РАН, Пушчино

Фотосинтез является одним из важнейших процессов биосферы, в ходе которого происходит превращение энергии света в энергию химических связей. Одной из наиболее простых и стабильных систем для сбора и эффективной трансформации солнечной энергии обладают фотосинтезирующие бактерии. Основными компонентами фотосинтетического аппарата бактерий являются светособирающие пигмент-белковые комплексы (LH – Light-harvesting complexes) и фотохимически активный реакционный центр, в котором происходит первичное запасание энергии. По расположению относительно реакционного центра светособирающие комплексы разделяют на прицентровые (LH1) и периферийные (LH2) комплексы.

Для пурпурных бактерий характерны светособирающие комплексы с круговой организацией из одинаковых субъединиц, содержащих полипептиды, бактериохлорофилл (БХл), а также каротиноиды. Последние играют важную роль в функционировании комплекса, обеспечивая фотозащитную и структурную функции, а также передачу возбуждения. Известно всего несколько видов фотосинтезирующих бактерий, для которых биосинтез каротиноидов можно ингибировать на 95–99%, сохранив при этом полный набор светособирающих комплексов, не содержащих каротиноиды. К таким бактериям относится серная пурпурная бактерия *Ectothiorhodospira haloalkaliphila*, для которой был получен бескаротиноидный комплекс LH2, пространственная организация которого представляет фундаментальный интерес. Кроме того, на сегодняшний день, в отличие от несерных пурпурных бактерий, для серных бактерий установлена единственная пространственная структура LH2 с высоким разрешением. Методом криоэлектронной микроскопии нами получены пространственные структуры LH2 (дикий тип и бескаротиноидный вариант) из пурпурной серной бактерии *E. haloalkaliphila* с атомным разрешением, что позволило с высокой степенью достоверности идентифицировать структуру компонентов комплекса. Проведенный сравнительный анализ с единственной известной структурой LH2 из пурпурной серной бактерии *Marichromatium purpuratum* выявил ряд уникальных отличий.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-74-00062).

## ARCHITECTURE OF LIGHT-HARVESTING LH2 COMPLEXES FROM THE PURPLE SULFUR BACTERIA *ECTOTHIORHODOSPIRA HALOALKALIPHILA*

К.М. Boyko<sup>1</sup>, A.D. Burtseva<sup>1,2</sup>, T.N. Baimukhametov<sup>3</sup>, M.A. Bolshakov<sup>4</sup>, V.O. Popov<sup>1</sup>, A.A. Ashikhmin<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow; <sup>2</sup>Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny; <sup>3</sup>National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow; <sup>4</sup>Institute of Fundamental Problems of Biology of the Russian Academy of Sciences, FRC "Pushchino Scientific Center for Biological Research", Russian Academy of Sciences, Pushchino

Photosynthesis is one of the most important processes in the biosphere, during which light energy is converted into the energy of chemical bonds. Photosynthetic bacteria have one of the simplest and most stable systems for collecting and effectively transforming solar energy. The main components of the photosynthetic apparatus of bacteria are light-harvesting pigment-protein complexes (LH – Light-harvesting complexes) and a photochemically active reaction center, in which the primary storage of energy occurs. According to their location relative to the reaction center, light-harvesting complexes are divided into central (LH1) and peripheral (LH2) complexes.

Purple bacteria possess LH-complexes with a circular organization composed of identical subunits containing polypeptides, bacteriochlorophyll (BChl), and carotenoids. The latter play an important role in the functioning of the complex, providing photoprotective and structural functions, as well as excitation transmission. There are only a few known species of photosynthetic bacteria for which carotenoid biosynthesis can be inhibited by 95–99% while retaining a full set of carotenoid-free light-harvesting complexes. These bacteria include the purple sulfur bacterium *Ectothiorhodospira haloalkaliphila*, for which a carotenoid-free complex LH2 was obtained and which structural organization is of fundamental interest. In contrast to non-sulfur purple bacteria, to date only one 3D structure of LH2 from sulfur bacteria has been established with high resolution. Using cryo-electron microscopy, we obtained 3D structures of LH2 (wild type and carotenoid-free variant) from the purple sulfur bacterium *E. haloalkaliphila* at atomic resolution, which allowed us to identify the fine structure of the complex components with a high degree of reliability. A comparative analysis with the only known structure of LH2 from the purple sulfur bacterium *Marichromatium purpuratum* revealed a number of unique differences.

This work was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 23-74-00062).

### СТРУКТУРНЫЕ ОСНОВЫ ОКИСЛЕНИЯ ТИОЦИАНТА В ТРЕХЪЯДЕРНОМ МЕДНОМ ЦЕНТРЕ ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Л.А. Варфоломеева<sup>1</sup>, А.Ю. Соловьева<sup>1</sup>, Н.С. Шипков<sup>1</sup>, Н.И. Дергоусова<sup>1</sup>, М.Г. Хренова<sup>2</sup>, К.М. Бойко<sup>1</sup>, Т.В. Тихонова<sup>1</sup>, В.О. Попов<sup>1,3</sup>

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; <sup>2</sup>Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; <sup>3</sup>Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Некоторые сероокисляющие микроорганизмы из экстремальных сред обитания демонстрируют способность использовать тиоцианат как единственный источник азота и/или энергии. Ключевой фермент этого метаболического пути, катализирующий реакцию окисления тиоцианата с образованием цианата и элементарной серы, был охарактеризован и получил название тиоцианат-дегидрогеназа (ТсДН, ЕС 1.8.2.7). Каталитическая реакция окисления тиоцианата протекает в трехъядерном медном центре, архитектура которого характерна только для данного класса ферментов. На протяжении нескольких лет не удавалось детально описать устройство трехъядерного медного центра ТсДН и происходящие в нем в процессе катализа изменения в связи с недостаточным качеством дифракционных данных и отсутствием структур комплексов с ингибиторами. Для ответа на эти вопросы были установлены структуры ТсДН из бактерии *Pelomicrobium methylophilum* с атомным разрешением, что позволило различить несколько состояний трехъядерного медного центра и продвинуться в понимании механизма каталитической реакции. Новые структуры свободного фермента и комплексов с ингибиторами, тиомочевинной и селеноцианатом, наряду с биохимическими и расчетными данными позволили уточнить и сформулировать первые этапы каталитического процесса.

*Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 23-74-30004.*

### STRUCTURAL BASIS OF THIOCYANATE OXIDATION IN THE TRINUCLEAR COPPER CENTER OF THIOCYANATE DEHYDROGENASE

L.A. Varfolomeeva<sup>1</sup>, A.Y. Solovieva<sup>1</sup>, N.S. Shipkov<sup>1</sup>, N.I. Dergousova<sup>1</sup>, M.G. Khrenova<sup>2</sup>, K.M. Boyko<sup>1</sup>, T.V. Tikhonova<sup>1</sup>, V.O. Popov<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology», RAS; <sup>2</sup>Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University; <sup>3</sup>Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Mosco

Some sulfur-oxidizing microorganisms from extreme environments demonstrate the ability to use thiocyanate as a sole source of nitrogen and/or energy. The key enzyme of this metabolic pathway, catalyzing the oxidation of thiocyanate to cyanate and elemental sulfur, has been characterized and named thiocyanate dehydrogenase (TcDH, EC 1.8.2.7). The catalytic reaction of thiocyanate oxidation occurs in a trinuclear copper center, the architecture of which is characteristic only for this class of enzymes. For several years, it was not possible to describe in detail the structure of the trinuclear copper center of TcDH and the changes that occur in it during catalysis due to insufficient quality of diffraction data and the lack of structures of complexes with inhibitors. To answer these questions, the atomic-resolution structures of TcDH from the bacterium *Pelomicrobium methylophilum* were established, which allowed us to distinguish several states of the trinuclear copper center and advance our understanding of the mechanism of the catalytic reaction. New structures of the free enzyme and complexes with inhibitors, thiourea and selenocyanate, along with biochemical and computational data allowed us to clarify and formulate the first stages of the catalytic process.

*The work is supported by the Russian Science Foundation grant № 23-74-30004.*

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ И КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИЗОТОПНО-МЕЧЕННЫХ СТАНДАРТОВ И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ MALDI-TOF/TOF**

**М.А. Константинов, А.С. Афошин, И.В. Кудрякова, Н.В. Васильева, И.Ю. Торопыгин**

*НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва*

Изучение кинетических параметров протеолитических ферментов важно для понимания их механизма действия, определения специфичности, оптимальных условий работы, для разработки антибактериальных препаратов на их основе. Традиционные методы определения кинетических параметров, такие как спектрофотометрические, требуют использования специальных ненативных субстратов, которые могут быть недостаточно специфичными и иметь низкую чувствительность, что может привести к серьезным ошибкам в определении активности ферментов.

В качестве альтернативы предложен метод количественной масс-спектрометрии с использованием изотопно-меченых стандартов, который позволяет определить концентрацию продукта, полученного в результате ферментативного гидролиза. Такой подход позволяет определять протеолитическую активность фермента, с высокой чувствительностью и точностью, по конкретными пептидным связям и без необходимости использования специальных субстратов. В качестве примера были определены кинетические параметры трипсина с использованием нативного субстрата – белка казеина. Количественный масс-спектрометрический анализ проводился с использованием пептида сравнения, который был получен путем гидролиза казеина трипсином и дальнейшей очистки с помощью ВЭЖХ. Затем полученный пептид высушивали и инкубировали в воде  $H_2^{18}O$  для получения на его основе стандарта, содержащего метку  $^{18}O$ . Для определения концентрации пептида-продукта использовался масс-спектрометр MALDI-TOF/TOF. Данный подход к определению специфичности является универсальным, быстрым, чувствительным, не требует дорогостоящих реактивов и легко адаптируется для определения активности различных протеаз.

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

**DETERMINATION OF SPECIFICITY AND KINETIC PARAMETERS OF PROTEOLYTIC ENZYMES USING ISOTOPE-LABELED STANDARDS AND MALDI-TOF/TOF MASS SPECTROMETRY**

**M. Konstantinov, A. Afoshin, I. Kudryakova, N. Vasilyeva, I. Toropygin**

*Institute of Biomedical Chemistry, Moscow*

The study of kinetic parameters of proteolytic enzymes is important for understanding their molecular mechanism, specificity, optimal working conditions, for the development of antibacterial drugs based on them. Traditional methods for determining kinetic parameters, such as spectrophotometric, require the use of special non-native substrates that may be insufficiently specific and have low sensitivity, which can lead to major errors in determining enzyme activity.

As an alternative, a method of quantitative mass spectrometry using isotope-labeled standards is proposed, which allows determining the original product obtained as a result of enzymatic hydrolysis. This approach allows the determination of the proteolytic activity of the enzyme with high sensitivity and accuracy by specific peptide bonds without the need to use synthetic substrates. As an example, the kinetic parameters of trypsin were determined using a native substrate – casein protein. Quantitative mass spectrometry analysis was carried out using a reference peptide, which was obtained by hydrolysis of casein with trypsin and subsequent purification by HPLC. The resulting peptide was then dried out and incubated in  $H_2^{18}O$  to obtain a standard with  $^{18}O$  label. A MALDI-TOF/TOF mass spectrometer was used to determine concentration of the peptide product. This approach to determining specificity is universal, rapid, sensitive, does not require a lot of reagents and is easily adapted to determine the activity of various proteases.

*The work was performed within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021–2030) (No. 122030100168-2).*

### НАНОТЕЛО E9 КАК ИНСТРУМЕНТ ИЗУЧЕНИЯ СТРУКТУРЫ И РЕГУЛЯЦИИ Lon-ПРОТЕАЗЫ *ESCHERICHIA COLI*

А.Г. Андрианова<sup>1</sup>, А.М. Куджаев<sup>1</sup>, А. Гущина<sup>2</sup>, И. Ратхор<sup>2</sup>, А. Влодавер<sup>2</sup>, И.В. Смирнов<sup>1</sup>, Т.В. Ротанова<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>National Cancer Institute, Frederick, MD, США

Lon-протеазы – это мультидоменные гомоолигомерные AAA+-белки (АТФ-азы, ассоциированные с другими клеточными активностями), играющие ключевую роль в системе контроля качества клеточного протеома во всех доменах жизни. Lon-протеаза *E. coli* (далее – Lon) – исторически первая обнаруженная в своем семействе AAA+-протеаза, отличительной особенностью которой является пролонгированная N-концевая область, демонстрирующая высокую степень подвижности, что усложняет определение структуры полноразмерного фермента. Для уточнения структуры этой области и изучения регуляции Lon использовано рекомбинантное нанотело E9 альпаки, полученное к N-концевому фрагменту Lon(1-283). Методом ELISA подтверждено образование комплекса Lon-E9. Установлено, что E9 эффективно ингибирует АТФ-зависимый процессивный гидролиз Lon-протеазой модельного белкового субстрата – казеина. Кроме того, E9 подавляет АТФ-азную активность фермента и гидролиз им низкомолекулярного пептидного субстрата. Присутствие казеина активизирует и АТФ-азную и пептидазную функции Lon. В этих условиях в первом случае наблюдается ослабление ингибиторного действия нанотела на гидролиз АТФ, а во втором – наличие E9 приводит к утрате ферментом способности к активации как нуклеотидом, так и белком-субстратом. При этом даже при высоких концентрациях E9 сохраняется остаточная ферментативная активность Lon-протеазы. Структурное исследование Lon методом крио-ЭМ показало формирование ферментом спектра олигомерных форм: дека-, ундека- и додекамеров. Установлено, что в присутствии нанотела преобладающей формой становится декамер, образованный двумя комплексами пентамер-E9, взаимодействие которых опосредовано областью контакта E9 с N-концевым фрагментом Lon. Полученные результаты позволяют рассматривать нанотело E9 как перспективный инструмент для углубленного изучения структуры и регуляции Lon-протеазы.

*Поддержано проектом РФФ № 21-74-20154 и программы NIH.*

### NANOBODY E9 AS A TOOL FOR STUDYING THE STRUCTURE AND REGULATION OF *ESCHERICHIA COLI* LON PROTEASE

A.G. Andrianova<sup>1</sup>, A.M. Kudzhaev<sup>1</sup>, A. Gustchina<sup>2</sup>, I. Rathore<sup>2</sup>, A. Wlodawer<sup>2</sup>, I.V. Smirnov<sup>1</sup>, T.V. Rotanova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow, Russia; <sup>2</sup>National Cancer Institute, Frederick, MD, USA

Lon proteases are multidomain homooligomeric AAA+ proteins (ATPases associated with different cellular activities) that play a key role in the protein quality control system in all domains of life. *E. coli* Lon protease (further Lon) is historically the first AAA+ protease to be discovered. Its distinctive feature is a prolonged highly dynamic N-terminal region, the presence of which complicates definition of the full-length enzyme structure. To study the modes of regulation of Lon in structural terms, we utilized a recombinant nanobody E9, originally raised in alpaca. E9 was shown to interact with the Lon N-fragment (1-283). The formation of the Lon-E9 complex was confirmed by ELISA. It was found that E9 effectively inhibits ATP-dependent processive hydrolysis of the model protein substrate, casein, by Lon protease. In addition, E9 suppresses the Lon's ATPase activity and hydrolysis of the low-molecular peptide substrate. The presence of casein activates both the ATPase and peptidase functions of Lon. Under these conditions, in the first case, the inhibitory effect of the nanobody on ATP hydrolysis is weakened, and the presence of E9 in the second case leads to the loss of the enzyme's ability to be activated by both the nucleotide and the protein substrate. At the same time, even at high concentrations of E9, the residual enzymatic activities of Lon protease are preserved. Structural study by the cryo-EM showed the formation of a spectrum of the Lon oligomeric forms: deca-, undeca- and dodecamers. In the presence of the nanobody, the predominant Lon form was found to become the decamer that is formed by two pentamer-E9 complexes. Interaction of these complexes is mediated by the contact region of E9 with the Lon N-terminal fragment. The results obtained allow us to consider the E9 nanobody as a promising tool for in-depth study of the structure and regulation of Lon protease.

*Supported by the RSF project No. 21-74-20154 and NIH programs.*



## ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ НОВЫХ СТАБИЛЬНЫХ АНАЛОГОВ S-АДЕНОЗИЛ-L-ГОМОЦИСТЕИНА В РЕАКЦИЯХ С ГАЛИД МЕТИЛТРАНСФЕРАЗАМИ

А.Ю. Руденко<sup>1,2</sup>, С.С. Марьясина<sup>1,2,3</sup>, А.К. Болихова<sup>1</sup>, П.В. Сергиев<sup>1</sup>, В.И. Польшаков<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова; <sup>2</sup>Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова; <sup>3</sup>Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Алкилирование представляет собой химическую модификацию, способную существенно изменять биологические и физические свойства соединений. Например, введение метильной группы в молекулу может многократно повышать активность лекарственного препарата, а также изменять его растворимость и метаболическую устойчивость. Процесс алкилирования может осуществляться с использованием метилтрансфераз (МТаз), при этом в качестве доноров алкильных групп применяются аналоги кофактора S-аденозил-L-метионина (SAM). Использование аналогов SAM, содержащих функциональные заместители позволяет изучать свойства МТаз и их субстратов. Одним из недостатков, ограничивающих применение МТаз в синтетических целях, является необходимость использования стехиометрических количеств дорогостоящего SAM (или его аналога), который в ходе реакции превращается в S-аденозил-L-гомоцистеина (SAH). Для снижения расхода SAM разрабатываются подходы по его регенерации из SAH в реакционной смеси. Для этого используются галидметилтрансферазы (HMT), регенерирующие аналоги SAM при помощи алкилиодида. В результате реализуется циклический каталитический процесс переноса алкильного заместителя с алкилиодида на целевой субстрат через образование промежуточного аналога SAM в каталитических количествах.

Эффективность таких каталитических циклов во многом зависит от стабильности аналогов SAM и эффективности их синтеза под действием HMT. Однако в литературе представлено ограниченное количество экспериментальных данных, характеризующих субстратные свойства различных HMT. В рамках настоящего исследования проведен синтез аналогов SAH, содержащих модификации в аминокислотной и/или рибозной частях молекулы. Выполнен систематический анализ свойств HMT из различных организмов в реакциях образования аналогов SAM из соответствующих производных SAH. Для полученных производных SAM оценена их стабильность и способность участвовать в реакциях метилирования в присутствии катехол-O-MТазы (COMT).

*Работа выполняется при финансовой поддержке РФФ, проект 24-14-00048.*

## STUDY OF PROPERTIES OF NEW STABLE ANALOGUES OF S-ADENOSYL-L-HOMOCYSTEINE IN REACTIONS WITH HALIDE METHYLTRANSFERASES

A.Yu. Rudenko<sup>1,2</sup>, S.S. Mariasina<sup>1,2,3</sup>, A.K. Bolikhova<sup>1</sup>, P.V. Sergiev<sup>1</sup>, V.I. Polshakov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University; <sup>2</sup>Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University; <sup>3</sup>Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow

Alkylation is a chemical modification that can significantly alter the biological and physical properties of compounds. For example, adding a methyl group to a molecule can dramatically increase the activity of a drug, as well as alter its solubility and metabolic stability. The alkylation reaction can be carried out using methyltransferase (MTases), with analogues of the cofactor S-adenosyl-L-methionine (SAM) being used as alkyl group donors. The use of SAM analogues containing functional substituents makes it possible to study the properties of MTases and their substrates. One of the main limitations for using MTases in synthetic applications is the need to use stoichiometric amounts of expensive SAM (or its analogue), which is converted to S-adenosyl-L-homocysteine (SAH) during the reaction. To reduce the consumption of SAM, approaches are being developed to regenerate it from SAH in the reaction mixture. For this purpose, halidmethyltransferases (HMT) are used to regenerate SAM analogues with the help of alkyl iodide. This results in a cyclic catalytic process of transferring the alkyl substituent from the alkyl iodide to the target substrate through the formation of the SAM intermediate analogue in catalytic amounts.

The efficiency of such catalytic cycles depends largely on the stability of SAM analogues and the efficiency of their synthesis under the action of HMT. However, limited experimental data characterizing the substrate properties of various HMTs have been reported in the literature. In the present study, we synthesized SAH analogues containing modifications in the amino acid and/or ribose parts of the molecule. A systematic analysis of the properties of HMTs from different organisms in the formation reactions of SAM analogues from the corresponding SAH derivatives was performed. Their stability and ability to participate in methylation reactions in the presence of catechol-O-MTase (COMT) were evaluated for the obtained SAM derivatives.

*Russian Science Foundation (grant 24-14-00048) supported the study.*

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЕРМЕАБИЛИЗОВАННЫХ АДГЕЗИРОВАННЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭФФЕКТОРОВ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ ФУНКЦИИ ПОЛИ(АДФ-РИБОЗА)-ПОЛИМЕРАЗ

Т.А. Щербакова<sup>1</sup>, М.С. Смирновская<sup>1</sup>, А.И. Баландина<sup>2</sup>, Р.Г. Багиров<sup>2,3</sup>, Д.К. Нилов<sup>1</sup>, С.И. Шрам<sup>2</sup>

<sup>1</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова; <sup>2</sup>НИЦ «Курчатовский институт»; <sup>3</sup>МИРЭА – Российский технологический университет, Москва

Поли(АДФ-рибозил)ирование (ПАРилирование) гистонов и других ядерных белков, катализируемое поли(АДФ-рибоза)-полимеразой (ПАРП), способствует выживанию клеток в условиях постоянного воздействия на ДНК различных генотоксических агентов. Ингибиторы ПАРП рассматриваются в качестве перспективных фармакологических средств для терапии онкологических, сердечно-сосудистых, аутоиммунных и др. заболеваний. Каталитическая активность ПАРП в клетке регулируется взаимодействием его с ДНК/другими белками, посттрансляционными модификациями, а также низкомолекулярными клеточными метаболитами и ксенобиотиками. В данной работе для детального исследования механизмов регуляции каталитической активности ПАРП в клетке и для поиска новых ингибиторов предложен оригинальный подход, основанный на использовании необратимо пермеабилizованных адгезированных клеток. Исследования проводились на культурах кардиомиобластов крысы (линия H9c2). Активность ПАРП оценивали по иммунофлуоресценции образующегося продукта реакции – поли(АДФ-рибозы). В качестве пермеабилizующего агента использовали дигитонин, способный избирательно удалять холестерин из внешней плазматической мембраны. Особенность предложенного метода заключается в том, что перед пермеабилizацией клеточный ПАРП переводится в ДНК-связанное состояние в условиях, препятствующих раннему запуску каталитической реакции. Применение нашего протокола позволяет беспрепятственно доставлять в ядро различные эффекторы фермента (субстрат – НАД<sup>+</sup>, небольшие белковые факторы, ингибиторы и др.) в строго заданных количествах. В докладе приводятся примеры использования разработанного метода для исследования выявленных ранее ингибиторов ПАРП.

Предложенный подход открывает новые перспективы для изучения механизмов регуляции активности ПАРП в клетке и может быть использован для поиска новых ингибиторов фермента.

*Исследования проведены в рамках государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».*

## USE OF PERMEABILIZED ADHERENT CELLS TO STUDY EFFECTORS OF CATALYTIC FUNCTION OF POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASES

T.A. Shcherbakova<sup>1</sup>, M.S. Smirnovskaya<sup>1</sup>, A.I. Balandina<sup>2</sup>, R.G. Bagirov<sup>2,3</sup>, D.K. Nilov<sup>1</sup>, S.I. Shram<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Lomonosov Moscow State University; <sup>2</sup>National Research Centre “Kurchatov Institute”; <sup>3</sup>MIREA – Russian Technological University, Moscow

Poly(ADP-ribosyl)ation (PARylation) of histones and other nuclear proteins catalyzed by poly(ADP-ribose) polymerases (PARP) promotes cell survival under conditions of permanent exposure of DNA to various genotoxic agents. PARP inhibitors are considered as promising pharmacological agents for the therapy of cancer, cardiovascular, autoimmune and other diseases. The catalytic activity of PARP in the cell is regulated by its interaction with DNA/other proteins, post-translational modifications, as well as low molecular weight cellular metabolites and xenobiotics. In this work, an original approach based on the use of irreversibly permeabilized adherent cells was proposed to study in detail the mechanisms of regulation of PARP catalytic activity in the cell and to search for new inhibitors. The studies were performed on cultures of rat cardiomyoblasts (line H9c2). PARP activity was assessed by immunofluorescence of the formed reaction product, poly(ADP-ribose). Digitonin, capable of selectively removing cholesterol from the outer plasma membrane, was used as a permeabilizing agent. The peculiarity of the proposed method is that before permeabilization, cellular PARP is converted to a DNA-bound state under conditions that prevent early initiation of the catalytic reaction. The application of our protocol allows unhindered delivery of various enzyme effectors (substrate - NAD<sup>+</sup>, small protein factors, inhibitors, etc.) to the nucleus in strictly defined amounts. The report provides examples of using the developed method to investigate previously identified PARP inhibitors.

The proposed approach opens up new prospects for studying the mechanisms of PARP activity regulation in the cell and may be used to search for new inhibitors of the enzyme.

*The research was carried out according to the state assignment of NRC “Kurchatov Institute”.*

## ВЛИЯНИЕ КООПЕРАТИВНЫХ ЭФФЕКТОВ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОСТАГЛАНДИН-Н-СИНТАЗЫ С ИНГИБИТОРАМИ

А.В. Кривошей, П.В. Вржешч

МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Димерный фермент простагландин-Н-синтаза (PGHS) играет ключевую роль в синтезе простагландинов из арахидоновой кислоты (АА). Фермент ингибируется нестероидными противовоспалительными препаратами (НПВП). Считается, что PGHS взаимодействует с ингибиторами по двухстадийному механизму: в ходе быстрой обратимой стадии образуется фермент-ингибиторный комплекс (EI), а в ходе медленной стадии изменяется его конформация (E\*I), и связывание становится более прочным. При этом до конца не установлено, как влияет димерная структура фермента на его взаимодействие с НПВП. В предыдущих работах (Filimonov et al., 2018; Krivoshey et al., 2020) мы показали, что для медленной стадии взаимодействия PGHS с ингибиторами напроксеном, ибупрофеном и толметинном наблюдаются кооперативные эффекты. Это согласуется с нашей работой (Krivoshey et al., 2021), где показано наличие кооперативных эффектов при взаимодействии фермента с субстратом (АА).

В настоящем исследовании мы проверяли наличие кооперативных эффектов для быстрой и медленной стадий взаимодействия PGHS с ингибиторами (индометацин, напроксен, ибупрофен). Для кинетических экспериментов использовали изоформу PGHS-1 из везикулярных желёз барана. Циклооксигеназную активность фермента определяли амперометрическим методом по изменению концентрации растворённого кислорода. Полученные данные анализировали с помощью Origin Pro и MATLAB.

Быструю стадию взаимодействия PGHS с ингибиторами измеряли в режиме инициации реакции ферментом. Было показано, что для всех исследованных ингибиторов полученные данные адекватно описываются простой моделью, и нет необходимости учитывать кооперативные эффекты. Для измерения медленной стадии предварительно инкубировали фермент с ингибитором в реакционной системе до инициации реакции субстратом. Время инкубации соответствовало времени наступления практического равновесия в реакционной системе. Для индометацина данные адекватно описываются простой моделью, а для напроксена и ибупрофена данные гораздо лучше описываются моделью, где учитываются кооперативные взаимодействия между мономерами при переходе комплексов EI и E\*I друг в друга.

*Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета.*

## THE INFLUENCE OF COOPERATIVE EFFECTS ON PROSTAGLANDIN H SYNTHASE INTERACTION WITH INHIBITORS

A.V. Krivoshey, P.V. Vrzeshch

Lomonosov Moscow State University, Moscow

Dimeric enzyme prostaglandin H synthase (PGHS) plays a key role in the synthesis of prostaglandins from arachidonic acid (AA). PGHS can be inhibited by non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). PGHS is believed to interact with inhibitors via two-step mechanism. During the fast reversible step an enzyme-inhibitor complex (EI) is formed, and during the slow step the complex conformation changes (E\*I), and the binding of PGHS and the inhibitor becomes tightly. Nowadays, it is still poorly understood how dimeric structure of PGHS influences PGHS interaction with NSAIDs. In our previous publications (Filimonov et al., 2018; Krivoshey et al., 2020) we showed that cooperative effects can be observed for the slow step of PGHS interaction with such inhibitors as naproxen, ibuprofen and tolmetin. These data are in agreement with our results (Krivoshey et al., 2021) where we demonstrated the existence of cooperative effects during PGHS interaction with the substrate (AA).

In this work, we checked cooperative effects for slow and fast steps of PGHS interaction with some inhibitors such as indomethacin, naproxen and ibuprofen. We used PGHS-1 isoform extracted from sheep vesicular glands for kinetic experiments. The cyclooxygenase reaction was detected amperometrically from the consumption of dissolved molecular oxygen. The data obtained were analyzed with Origin Pro and MATLAB software.

The fast step of PGHS interaction with the inhibitor was measured for reaction initiation by enzyme. We showed that for all inhibitors the data obtained are in agreement with a simple model so taking cooperative effects into account is not necessary. For slow step, we previously incubated PGHS with the inhibitor in the reaction system before reaction initiation by the substrate. The incubation time was in agreement with the moment of equilibrium in the reaction system. For indomethacin, the data are correctly described by simple model, but for naproxen and ibuprofen the best model involves cooperative interactions between monomers of PGHS that take place when EI complex goes E\*I and vice versa.

*The work was performed with the equipment purchased via the Moscow State University Development Program.*

### РАЗЛИЧНЫЕ МОДИФИКАЦИИ Bst-ПОЛИМЕРАЗЫ В ПРИЛОЖЕНИИ К ПЕТЛЕВОЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ

А.С. Черкашина, О.О. Михеева, Ю.В. Федакова, М.И. Пика, Е.Д. Соловьёва, Е.А. Дедаева, Т.Л. Замотаева, Е.А. Черкашин, В.Г. Акимкин

*ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва*

В последние годы активно развиваются методы изотермической амплификации, как диагностический инструмент. Преимущество таких методов – повышение скорости анализа при сохранении чувствительности и специфичности системы на уровне ПЦР. Один из наиболее активно развивающихся методов – петлевая изотермическая амплификация LAMP. В основе метода лежит использование специфического фермента – Bst-полимеразы с вытесняющей активностью. Цель работы – получение фермента с улучшенными свойствами и разработка и масштабирование методик выделения и очистки фермента в полупромышленных объемах. В нашей работе получены различные модификации Bst-полимеразы в бактериальной системе экспрессии на основе клеток *E. coli*: фермент дикого типа с повышенным выходом культивирования в растворимой форме, химерный фермент с ДНК-связывающим доменом, точечные мутанты с улучшенными свойствами. Разработаны протоколы культивирования, выделения и очистки ферментов. Показано, что оптимизация нуклеотидной последовательности фермента дикого типа приводит к повышению выхода белка в растворимой форме (до 20% от клеточной массы), что позволяет эффективно масштабировать методику получения фермента, а также приводит к повышению его удельной каталитической активности. Показано, что введение точечных замен приводит к необходимости оптимизации методик культивирования, выделения и очистки мутантных форм.

Каталитические свойства полученных ферментов охарактеризованы в модельной системе для выявления РНК-мишени в формате LAMP в сравнении с коммерческими ферментами Bst 2.0 ДНК-полимераза и Bst 3.0 ДНК-полимераза (NEB, США). Протестирована устойчивость полученных ферментов к некоторым типичным ингибиторам.

Показано, что разработанные масштабируемые протоколы культивирования, выделения и очистки ферментов позволяют получить ферментативные препараты не уступающие коммерческим аналогам. Используемые модификации ферментов: добавление ДНК-связывающего домена, точечные мутации позволяют получить ферменты с улучшенными свойствами.

### VARIOUS MODIFICATIONS OF Bst-POLYMERASE IN APPLICATION TO LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION

A.S. Cherkashina, O.O. Mikheeva, Y.V. Fedakova, M.I. Pika, E.D. Solovyova, E.A. Dedyeva, T.L. Zamotaeva, E.A. Cherkashin, V.G. Akimkin

*Central Research Institute of Epidemiology of Rosпотребнадзор, Moscow*

In recent years, isothermal amplification methods have been actively developing as a diagnostic tool. The advantage of such methods is an increase in the speed of analysis while maintaining the sensitivity and specificity of the system at the PCR level. One of the most actively developing methods is loop isothermal amplification LAMP. The method is based on the use of a specific enzyme – Bst polymerase with displacing activity. The goal of the work is to obtain an enzyme with improved properties and to develop and scale up methods for isolating and purifying the enzyme in semi-industrial volumes. In our work, various modifications of Bst polymerase were obtained in a bacterial expression system based on *E. coli* cells: a wild-type enzyme with an increased yield of cultivation in soluble form, a chimeric enzyme with a DNA-binding domain, point mutants with improved properties. Protocols for culturing, isolating and purifying enzymes have been developed. It is shown that optimization of the nucleotide sequence of the wild-type enzyme leads to an increase in the yield of protein in soluble form (up to 20% of the cell mass), which allows for effective scaling of the enzyme production method, and also leads to an increase in its specific catalytic activity. It is shown that the introduction of point substitutions leads to the need to optimize the methods of culturing, isolating and purifying mutant forms.

The catalytic properties of the obtained enzymes are characterized in a model system for identifying target RNA in the LAMP format in comparison with commercial enzymes Bst 2.0 DNA polymerase and Bst 3.0 DNA polymerase (NEB, USA). The stability of the obtained enzymes to some typical inhibitors is tested.

It is shown that the developed scalable protocols for culturing, isolating and purifying enzymes make it possible to obtain enzymatic preparations that are not inferior to commercial analogues. The enzyme modifications used: addition of a DNA-binding domain, point mutations make it possible to obtain enzymes with improved properties.

## ПОНИЖЕННЫЙ УРОВЕНЬ В2 И И ПОВЫШЕННЫЙ УРОВЕНЬ В12 В ПЛАЗМЕ КРОВИ СВЯЗАНЫ С ПОВЫШЕННЫМ РИСКОМ РАЗВИТИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА В КАЗАХСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

**И.В. Войцеховский**

*Казахский национальный университет аль-Фараби, Алматы, Казахстан*

Метаболический синдром (МС), который поражает примерно 25% населения мира, характеризуется кластером метаболических нарушений, которые повышают риск сердечно-сосудистых заболеваний и диабета. Митохондриальная дисфункция влияет на окисление глюкозы и энергетический обмен веществ. Исследование изучает профили витаминов группы В у людей с МС. Метаболические изменения, связанные с витаминами группы В и МС, специфичные для этнической принадлежности, были оценены в когорте казахского населения. Исследование случая-контроль сравнивало уровни витаминов группы В у пациентов с МС и здоровых лиц. Были проанализированы основные показатели уровня МС и витаминов группы В. Высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией количественно определила концентрации витаминов группы В. Статистический анализ изучал взаимосвязь между витаминами группы В, метаболическим синдромом и маркерами преддиабета. Окончательный анализ включал данные 112 казахов с преддиабетом и 55 без преддиабета в возрасте 36–65 лет.

Пониженный уровень В2 и повышенный уровень В12 в плазме крови связаны с повышенным риском МС. Уровни на нижней границе нормы уровни В2 plasma levels Q1 0,564–1,651 ng/ml; Q2 1,651–2,151 ng/ml; Q3 2,151–2,939 ng/ml; Q4 2,939–12,882 ng/ml. Среди 196 участников 44,71% имели нормальный уровень В12, в то время как 55,29% имели повышенный уровень; только 4,08% имели нормальный уровень В2.

Низкие уровни В2 и повышенные В12 связаны с повышенным риском МС, вопреки существующей литературе. Рибофлавин и цианокобаламин играют важную роль в митохондриальных процессах. Аномальные уровни витамина В могут указывать на митохондриальную дисфункцию. Мы предполагаем, что аномальные значения уровня витамина В в сыворотке могут указывать на лежащую в основе митохондриальную дисфункцию, потенциально усугубленную метаболическими путями, специфичными для этнической принадлежности. Это исследование подчеркивает значимость профилей витаминов В в контексте МС, с необходимостью дальнейшим исследованиям для определения этих взаимосвязей и их последствий для целевых вмешательств.

## LOW PLASMA B2 AND ELEVATED PLASMA B12 LEVELS ARE ASSOCIATED WITH INCREASED RISK OF METABOLIC SYNDROME IN THE KAZAKH POPULATION

**I. Voitsekhovskiy**

*Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan*

Metabolic syndrome (MS), which affects approximately 25% of the world's population, is characterized by a cluster of metabolic abnormalities that increase the risk of cardiovascular disease and diabetes. Mitochondrial dysfunction affects glucose oxidation and energy metabolism. The study examines B vitamin profiles in individuals with MS. Ethnicity-specific metabolic changes associated with B vitamins and MS were assessed in a cohort of Kazakhs. A case-control study compared B vitamin levels in patients with MS and healthy controls. Key parameters of MS and B vitamin levels were analyzed. High-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry quantified B vitamin concentrations. Statistical analysis examined the relationship between B vitamins, metabolic syndrome, and prediabetes markers. The final analysis included data from 112 Kazakhs with prediabetes and 55 without prediabetes aged 36-65 years.

Low plasma B2 and high plasma B12 levels were associated with an increased risk of MS. Levels at the lower limit of normal were B2 plasma levels Q1 0.564–1.651 ng/ml; Q2 1.651–2.151 ng/ml; Q3 2.151–2.939 ng/ml; Q4 2.939–12.882 ng/ml. Among 196 participants, 44.71% had normal B12 levels, while 55.29% had elevated levels; only 4.08% had normal B2 levels.

Low B2 and elevated B12 levels are associated with an increased risk of MS, contrary to the existing literature. Riboflavin and cyanocobalamin play important roles in mitochondrial processes. Abnormal levels of vitamin B may indicate mitochondrial dysfunction. We hypothesize that abnormal serum vitamin B values may indicate underlying mitochondrial dysfunction, potentially exacerbated by ethnicity-specific metabolic pathways. This study highlights the relevance of vitamin B profiles in the context of MS, with further research needed to define these relationships and their implications for targeted interventions.

## К МЕХАНИЗМАМ ДЕЙСТВИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ЛИГАНДОВ РЕЦЕПТОРОВ НЕЙРОТРОФИНОВ

Ю.В. Вахитова, Л.Ф. Зайнуллина, А.Ю. Луста, Т.А. Гудашева, С.Б. Середенин

*ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий, Москва*

Нейротрофический фактор мозга (BDNF) - ключевой регулятор роста нейронов, их дифференцировки, нейропротекции и синаптической пластичности. Нарушения BDNF/TrkB-зависимого сигналинга являются одним из основных механизмов патогенеза неврологических, нейродегенеративных и психических заболеваний. Однако системное применение BDNF ограничивается его неудовлетворительными фармакокинетическими свойствами и побочными эффектами. В НИИ фармакологии им. В.В. Закусова в период 2005–2023 гг. синтезирован и фармакологически изучен ряд низкомолекулярных миметиков нейротрофинов (Середенин С.Б., Гудашева Т.А., Патент РФ № 2410392, 2010). Соединение ГСБ-106 – димерный дипептидный миметик 4-й петли BDNF в скрининговых экспериментах показал защитный эффект в моделях повреждения клеток. Исследования *in vivo* выявили антидепрессивные и нейропротекторные свойства ГСБ-106. При изучении механизмов действия установлено, что ГСБ-106 имитирует клеточные эффекты эндогенного BDNF, поддерживая жизнеспособность клеток SH-SY5Y в условиях сывороточной депривации. ГСБ-106 подавляет апоптоз клеток, опосредованный активацией TrkB-регулируемых механизмов: инактивирует проапоптотический белок BAD и подавляет активность каспаз 9 и 3/7. Нейропротекция при сывороточной депривации, обеспечиваемая ГСБ-106, зависит от транзientной активации TrkB, о чем судили по увеличению фосфорформ Tyr706/707, Tyr515 и Tyr816 и активации Ras/MAPK и PI3K/Akt сигналинга. При этом фосфорилирование Tyr515 при действии ГСБ-106 было более выраженным по сравнению с BDNF. Фосфорилирование TrkB по Tyr706/707 и Tyr816 почти полностью блокировалось ингибитором K252a, уровень фосфо-Tyr515 сохранялся при действии BDNF, и ГСБ-106, позволяя предполагать, что нейропротективные свойства обусловлены механизмами, независимыми от TrkB. Полученные результаты указывают, что выживаемость клеток в отсутствии сыворотки обеспечивается собственной трофической активностью ГСБ-106, сопоставимой с эффектами BDNF, и согласуются с развешиваемой гипотезой о достаточности минимальной димеризованной дипептидной последовательности, имитирующей  $\beta$ -изгиб 4-й петли BDNF, для проявления BDNF-подобной трофической активности.

*Исследование выполнено в рамках Государственного задания № FGFG-2022-0001.*

## ON THE MECHANISMS OF ACTION OF LOW-MOLECULAR LIGANDS OF NEUROTROPHIN RECEPTORS

Yu.V. Vakhitova, L.F. Zaynullina, A.Yu. Lusta, T.A. Gudashева, S.B. Seredenin

*Federal Research Center of Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow*

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is involved in the regulation of neuronal cell growth, differentiation, neuroprotection and synaptic plasticity. Although aberrant BDNF/TrkB signaling is implicated in several neurological, neurodegenerative and psychiatric disorders, neurotrophin-based therapy is challenging and is limited by improper pharmacokinetic properties of BDNF. Over 2005–2023, a number of low-molecular mimetics of neurotrophins were synthesized and pharmacologically studied at Zakusov Research Institute of Pharmacology (Seredenin S.B., Gudashева T.A., Patent RU № 2410392, 2010). Compound GSB-106 (bis-(N-monosuccinyl-L-seryl-L-lysine)hexamethylenediamide) is a dimeric dipeptide mimetic of the 4th loop of BDNF has shown to protect cells in various damaging models. Animal studies uncovered antidepressive and neuroprotective properties of GSB-106. Current study shows that GSB-106 acts similarly to BDNF, promoting survival of serum-deprived neuronal-like SH-SY5Y cells. Protective properties of GSB-106 arise from its ability to counteract cell apoptosis via activation of TrkB-dependent pro-survival mechanisms: inactivation of pro-apoptotic BAD protein and suppression of caspases 9 and 3/7. Neuroprotection of serum-deprived cells, provided by GSB-106 was shown to be dependent on a transient TrkB receptor activation, which was assayed by phosphorylation at Tyr706/707. GSB-106 increased TrkB phosphorylation at Tyr515 and Tyr816 and promoted activation of Ras/MAPK and PI3K/Akt pathways. Intriguingly, Tyr515 phosphorylation was affected by GSB-106 more significantly, than that induced by BDNF. While TrkB Tyr706/707 and Tyr816 phosphorylation were almost completely eliminated by K252a, a residual Tyr515 phosphorylation has retained upon both BDNF and GSB-106 treatment, hence, suggesting the contribution of non-TrkB-dependent mechanisms. Thus, our study has characterized neurotrophic activity of small dimeric compound GSB-106, which mimics certain biological functions of BDNF and neurotrophin-specific protective mechanisms.

*This work was conducted under the government contracts of the Ministry of Science and Higher Education No FGFG-2022-0001.*

### НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЙ И НЕЙРОРЕГЕНЕРАТОРНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ РЕГУЛЯТОРНОГО ПЕПТИДА Pro-Gly-Pro В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VITRO*

З.В. Бакаева<sup>1,2</sup>, М.М. Гончаров<sup>3</sup>, Ф.А. Фролов<sup>2</sup>, И.А. Красильникова<sup>1</sup>, Е.Г. Сорокина<sup>1</sup>, В.Г. Пинелис<sup>1</sup>, А.М. Сурин<sup>4</sup>, Л.А. Андреева<sup>5</sup>, Н.Ф. Мясоедов<sup>5</sup>

<sup>1</sup>НМИЦ здоровья детей Минздрава России, Москва, Россия; <sup>2</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Россия; <sup>3</sup>Университетский медицинский центр Шлезвиг-Гольштейн (UKSH), Киль, Германия; <sup>4</sup>НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия; <sup>5</sup>НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

Scratch-test был использован в качестве экспериментальной модели механической травмы первичной нейроглиальной культуры для изучения механизмов гибели и выживания клеток в поврежденных и неповрежденных областях. Было показано участие NMDA-рецепторов в процессах, приводящих к отсроченной (через несколько дней после нанесения травмы) гибели нейронов, вследствие нарушения регуляции кальция и синхронной деполяризации митохондрий. В данной работе мы исследовали нейропротекторный и нейрорегенераторный потенциал Pro-Gly-Pro (PGP) – эндогенного регуляторного пептида с противовоспалительным и мягким хемоаттрактантным эффектом. Методами флуоресцентной микроскопии было обнаружено, что механическое повреждение (царапина) первичной клеточной культуры корковых нейронов новорожденных крысят линии Wistar вызывало острое нарушение гомеостаза кальция и функции митохондрий. Гибель нейронов сопровождалась изменением профиля нейроглиальных маркеров (BDNF, NSE и GFAP). Субтоксическая доза глутамата (Glu, 33 мкМ) вызывало ярко выраженные отсроченные изменения  $[Ca^{2+}]_i$  и  $\Delta\Psi_m$  в клетках поврежденных нейроглиальных культур. Процент клеток, восстановивших исходный уровень  $[Ca^{2+}]_i$ , и скорость восстановления  $\Delta\Psi_m$  были снижены по сравнению с неповрежденными клетками. Применение PGP (100 мкМ, однократно) в момент нанесения царапины предотвращало рост  $[Ca^{2+}]_i$  и резкое падение митохондриального потенциала  $[\Delta\Psi_m]$ . Добавление PGP (30 мкМ) в течение 3 или 6 дней после нанесения царапины снижало отсроченные Glu-индуцированные нарушения гомеостаза кальция и гибель клеток. В постглутаматный период выжившие нейроны эффективнее восстанавливали исходные уровни  $[Ca^{2+}]_i$  и  $\Delta\Psi_m$ . На фоне действия пептида PGP восстановление поврежденной нейронной сети происходило быстрее за счет уменьшения гипертрофии астроцитов и усиления миграции нейронов в зону царапины, что сопровождалось повышением внутриклеточного уровня BDNF и снижением внеклеточного уровня NSE. Таким образом, пептид PGP повышает выживаемость нейронов в условиях механической травмы за счет снижения перегрузки клеток кальцием и предотвращения митохондриальной дисфункции. Кроме того, пептид PGP ограничивает посттравматические последствия: уменьшает реактивный астроглиоз и способствует быстрой регенерации нейрональной сети.

### NEUROPROTECTIVE AND NEUROREGENERATIVE POTENTIAL OF THE REGULATORY PEPTIDE Pro-Gly-Pro IN EXPERIMENTS *IN VITRO*

Z.V. Bakaeva<sup>1,2</sup>, M.M. Goncharov<sup>3</sup>, F.A. Frolov<sup>2</sup>, I.A. Krasilnikova<sup>1</sup>, E.G. Sorokina<sup>1</sup>, V.G. Pinelis<sup>1</sup>, A.M. Surin<sup>4</sup>, L.A. Andreeva<sup>5</sup>, N.F. Myasoedov<sup>5</sup>

<sup>1</sup>National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russia; <sup>2</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia; <sup>3</sup>University Medical Center Schleswig-Holstein, Kiel, Germany; <sup>4</sup>Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia; <sup>5</sup>National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow, Russia

The scratch-test was used as an experimental *in vitro* model of mechanical damage to primary neuronal cultures to study the mechanisms of cell death in damaged and undamaged areas. The involvement of NMDA receptors in processes leading to delayed neuronal death, due to calcium dysregulation and synchronous mitochondrial depolarization, has been previously demonstrated. In this study, we explored the neuroprotective and neuroregenerative potential of the Pro-Gly-Pro (PGP) – an endogenous regulatory peptide with antiinflammatory property and mild chemoattractant effect. Fluorescence microscopy showed that mechanical injury to the primary cell culture of cortical neurons of newborn Wistar rats in the form of a scratch caused acute disruption of calcium homeostasis and mitochondrial functions. This was accompanied by neuronal death alongside changes in the profile of neuronal markers (BDNF, NSE and GFAP). Under subtoxic doses of glutamate (Glu, 33  $\mu$ M), delayed changes in  $[Ca^{2+}]_i$  and  $\Delta\Psi_m$ , i.e., several days after scratch application, were more pronounced in cells of damaged neuroglial cultures. The percentage of cells that restored the initial level of  $[Ca^{2+}]_i$  and the rate of recovery of  $\Delta\Psi_m$  were decreased compared with undamaged cells. Prophylactic application of PGP (100  $\mu$ M, once) prevented the increase in  $[Ca^{2+}]_i$  and the sharp drop in mitochondrial potential  $[\Delta\Psi_m]$  at the time of scratching. Treatment with PGP (30  $\mu$ M, 3 or 6 days) reduced the delayed Glu-induced disturbances in calcium homeostasis and cells death. In the postglutamate period, the surviving neurons more effectively restored the initial levels of  $[Ca^{2+}]_i$  and  $\Psi_m$ . PGP also increased intracellular levels of BDNF and reduced extracellular NSE. When exposed to the PGP peptide, restoration of the damaged neural network occurred faster due to a decrease in astrocyte hypertrophy and increased migration of neurons to the scratch area. Thus, the peptide PGP has a neuroprotective effect, increasing the survival of neuroglial cells after mechanical trauma *in vitro* by reducing cellular calcium overload and preventing mitochondrial dysfunction. Additionally, the tripeptide limits post-traumatic consequences of mechanical damage: it reduces astrogliosis and promotes neuronal regeneration.

## ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНАЯ ТЕРАПИЯ – ПЕПТИДЫ В ЦИТОСТАТИЧЕСКОМ ПОДХОДЕ К ЛЕЧЕНИЮ ГЛИОБЛАСТОМЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

Г.В. Павлова<sup>1,2</sup>, В.А. Колесникова<sup>1</sup>, И.Н. Пронин<sup>2</sup>, Д.Ю. Усачев<sup>2</sup>, А.М. Копылов<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН; <sup>2</sup>НМИЦ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко Минздрава России; <sup>3</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Глиома состоит из опухолевых стволовых клеток и их «дочерних опухолевых клеток» – незрелых клеток-предшественников. Цель работы - используя цитостатическое воздействие 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 bi(AID-1-T), способного блокировать пролиферацию опухолевых клеток, в комбинации с последующим добавлением молекул-индукторов, управляющих каскадами нейрогенеза - SB431542, LDN-193189, Purmorphamine, BDNF. Аптамер bi(AID-1-T) обладает цитостатическим действием и останавливая деление опухолевых клеток на некоторое время, позволяет опухолевой клетке стать чувствительной к другим воздействиям. 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, CD133-позитивных клеток, устойчивых к химиотерапии и лучевой терапии. Исследования на клеточных культурах глиом пациентов высокой степени злокачественности показали эффективность подобного подхода *in vitro*. Сформировав оптимальную и эффективную комбинацию аптамера и факторов, мы провели исследования *in vivo* с использованием животной модели (крыса) с имплантированной тканевой глиобластомой 101/8. Нами было обнаружено, что при использовании комбинации факторов дифференцировочной терапии *in vivo* необходима корректировка введения факторов. Было показано, что после корректировки последовательности катетерного введения факторов дифференцировочной терапии достигается либо полное исчезновение опухоли, либо размер ее оказывался незначителен. Пилотные исследования на животной модели с глиобластомой *in vivo* показали перспективность данного метода. Таким образом, разработана технология последовательного воздействия на опухолевые клетки глиомы высокой степени злокачественности для достижения дифференцировки опухолевых клеток и стабильного снижения их пролиферативного потенциала.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (грант № 075–15-2024–561).*

## DIFFERENTIATION THERAPY – PEPTIDES IN CYTOSTATIC APPROACH TO TREATMENT OF HUMAN BRAIN GLIOMAS

G.V. Pavlova<sup>1,2</sup>, V.A. Kolesnikova<sup>1</sup>, I.N. Pronin<sup>2</sup>, D.Yu. Usachev<sup>2</sup>, A.M. Kopylov<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences; <sup>2</sup>N.N. Burdenko Neurosurgery Research Center, Ministry of Health of the Russian Federation; <sup>3</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow

Glioma consists of tumor stem cells and their "daughter tumor cells" – immature precursor cells. The aim of the work is to stimulate the "maturation" of tumor cells using cytostatic action, which should lead to the loss of their proliferative potential. We have proposed a fundamentally new approach to the treatment of glioma – "differentiation therapy", which is based on the cytostatic effect on cells of the aptamer bi (AID-1-T), capable of blocking the proliferation of tumor cells, in combination with the subsequent addition of inducer molecules that control neurogenesis cascades – SB431542, LDN-193189, Purmorphamine, BDNF. Aptamer bi (AID-1-T) has a cytostatic effect and, stopping the division of tumor cells for some time, allows the tumor cell to become sensitive to other effects. With a temporary decrease in the proliferative activity of tumor cells after exposure to the aptamer, inducer molecules are able to direct the differentiation of tumor cells to a mature state. Differentiation therapy is also effective for tumor stem cells Nestin, CD133-positive cells resistant to chemotherapy and radiotherapy. Studies on cell cultures of high-grade gliomas from patients have shown the effectiveness of this approach *in vitro*. Having formed an optimal and effective combination of aptamer and factors, we conducted *in vivo* studies using an animal model (rat) with implanted tissue glioblastoma 101/8. We found that when using a combination of differentiation therapy factors *in vivo*, it is necessary to adjust the administration of factors. It was shown that after adjusting the sequence of catheter administration of differentiation therapy factors, either complete disappearance of the tumor is achieved, or its size was insignificant. Pilot studies on an animal model with glioblastoma *in vivo* have shown the promise of this method. Thus, a technology has been developed for sequential exposure to tumor cells of high-grade glioma to achieve differentiation of tumor cells and a stable decrease in their proliferative potential.

*The work was carried out with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia (grant No. 075–15-2024–561).*



## ПЕПТИДНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ПУРИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ ЯДА ПАУКОВ, КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ОБЕЗБОЛИВАЮЩИЕ И ПРОТИВОКАШЛЕВЫЕ СРЕДСТВА

**А.А. Василевский**

*ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ООО «Анальгетики будущего», Москва*

В докладе будут представлены данные о семействе пептидов, полученных из яда пауков и получивших название «пуротоксины». Эти соединения с высокой аффинностью и селективностью воздействуют на пуриновые рецепторы. В частности, пептиды PT1 и PT6 в низких наномолярных концентрациях ингибируют рецепторы P2X3, служащие важной мишенью во многих болевых синдромах и хроническом кашле. При этом они не угнетают близкую изоформу P2X2 или гетеромер P2X2/3, исключая нежелательное побочное действие на восприятие вкуса. В структурном отношении пуротоксины представлены мотивом цистинового узла, что обуславливает их высокую стабильность; при этом PT6 выступает «уменьшенной оптимизированной» версией PT1. В настоящее время проведены развернутые доклинические исследования PT6. Показана его высокая активность в ряде животных моделей, превосходящая активность традиционных анальгетиков. PT6 демонстрирует привлекательные фармакокинетические параметры и является лидерным соединением в ведущейся разработке инновационного лекарственного средства.

## SPIDER VENOM-DERIVED PEPTIDES ARE INHIBITORS OF PURINOCEPTORS AND PROMISING PAINKILLERS AND ANTI-TUSSIVES

**A. Vassilevski**

*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences; Future Analgesics Ltd, Moscow*

I will present data on a family of peptides obtained from spider venom and called "purotoxins". These compounds act on purinoceptors with high affinity and selectivity. In particular, peptides PT1 and PT6 at low nanomolar concentrations inhibit P2X3 receptors, which serve as an important target in many pain syndromes and chronic cough. At the same time, they do not suppress the closely related isoform P2X2 or the heteromer P2X2/3, excluding the undesirable side effect on taste perception. Structurally, purotoxins are represented by the cystine knot motif, which determines their high stability; PT6 is a "minimized and optimized" version of PT1. Currently, extensive preclinical studies of PT6 have been conducted. Its high activity in a number of animal models has been shown, exceeding the activity of traditional analgesics. PT6 exhibits attractive pharmacokinetic parameters and is the lead compound in the ongoing development of an innovative drug.

#### АНТИПАРКИНСОНИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ПЕПТИД HLDF-6-H В ЭКСПЕРИМЕНТЕ И КЛИНИКЕ

Ю.А. Золотарев<sup>1</sup>, Д.Д. Марков<sup>1</sup>, С.И. Шрам<sup>1</sup>, А.К. Дадаян<sup>1</sup>, Н.В. Кост<sup>2</sup>, О.Ю. Соколов<sup>2</sup>, С.А. Зозуля<sup>2</sup>, Н.В. Баймеева<sup>2</sup>, Е.Н. Шубина<sup>3</sup>, О.В. Долотов<sup>4</sup>

<sup>1</sup>НИЦ «Курчатовский институт»; <sup>2</sup>Научный центр психического здоровья,

<sup>3</sup>БФ «Движение-жизнь»/ООО «Нейропротекция»; <sup>4</sup>Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

В докладе обсуждаются вопросы изучения нейропротекторной активности пептида HLDF-6-H на MPTP модели болезни Паркинсона (БП) и эффекты коррекции моторных и немоторных симптомов этого заболевания при хроническом интраназальном применении пептидного препарата пациентами, в качестве средства дополнительной терапии БП.

Синтетический инновационный нейропротекторный пептид HLDF-6-H (Thr-Gly-Glu-Hse-His-Arg-NH<sub>2</sub>) является аналогом шестичленного фрагмента 41 – 46 присутствующего в центральной нервной системе белкового фактора Human Leukemia Differentiation Factor (HLDF). При этой модификации пептида полностью сохранились его аффинность при связывании с мембранами клеток коры головного мозга крыс и физиологическая активность в экспериментальной модели БП. Установлено антидепрессантное, нейропротекторное и противовоспалительное действие HLDF-6-H при развитии депрессии на экспериментальной модели досимптомной стадии БП. Хроническое применение HLDF-6-H приводит к нормализации локомоторной активности, измененных уровней моноаминов, нейротрофинов и цитокинов в отделах мозга, уровней стероидов в кровяном русле и сопровождается снижением воспалительных реакций.

На основе созданного нами пептида HLDF-6-H был зарегистрирован регенерирующий бальзам, который в качестве средства дополнительной терапии показал способность добиться ремиссии и снижение выраженности патологических симптомов БП. В результате хронического интраназального применения пептида HLDF-6-H, с использованием упрощенной формы унифицированной шкалы оценки болезни Паркинсона Международного общества расстройств движений (MDS-UPDRS) было установлено, что в значительной мере происходит ослабление выраженности патологических моторных и немоторных симптомов БП у всех пациентов, принимавших пептидный бальзам в качестве дополнительной терапии. Если при традиционном лечении БП происходит неуклонное нарастание патологических симптомов, то при использовании в качестве дополнительной терапии пептида HLDF-6-H происходит ремиссия и снижение выраженности патологических симптомов БП (тремор, ригидность, тревожно-депрессивное состояние, галлюцинации, нарушения когнитивных функций). Полученные результаты свидетельствуют о перспективности дальнейших исследований пептида HLDF-6-H в качестве средства дополнительной терапии БП.

#### ANTIPARKINSONIAN EFFECT OF PEPTIDE HLDF-6-H IN EXPERIMENT AND CLINIC

Y.A. Zolotarev<sup>1</sup>, D.D. Markov<sup>1</sup>, S.I. Shram<sup>1</sup>, A.K. Dadayan<sup>1</sup>, N.V. Kost<sup>1</sup>, O.Y. Sokolov<sup>2</sup>, S.A. Zozulya<sup>2</sup>, N.V. Baymееva<sup>2</sup>, E.N. Shubina<sup>3</sup>, O.V. Dolotov<sup>4</sup>

<sup>1</sup>NRC «Kurchatov Institute»; <sup>2</sup>FSBSI «Mental Health Research Centre»; <sup>3</sup>All-Russian Charitable Foundation «Movement – life»/Neuroprotectia Co Ltd; <sup>4</sup>Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow

The molecular mechanisms of the neuroprotective activity of the HLDF-6-H peptide in the MPTP model of Parkinson's disease (PD) and the effects of correction of motor and non-motor symptoms of this disease with chronic intranasal use of the peptide drug by patients as an additional therapy for PD are discussed.

Synthetic innovative neuroprotective peptide HLDF-6-H (Thr-Gly-Glu-Hse-His-Arg-NH<sub>2</sub>) is an analogue of the six-membered fragment 41–46 of the protein factor Human Leukemia Differentiation Factor (HLDF) present in the central nervous system. With this modification of the peptide, its affinity for binding to the membranes of rat cerebral cortex cells and physiological activity in the experimental model of PD are completely preserved. Antidepressant, neuroprotective and anti-inflammatory effects of HLDF-6-H have been established in the development of depression in an experimental model of the pre-symptomatic stage of PD. Chronic use of HLDF-6-H leads to normalization of locomotor activity, altered levels of monoamines, neurotrophins and cytokines in brain regions, steroid levels in the bloodstream and is accompanied by a decrease in inflammatory reactions.

Based on the peptide HLDF-6-H created by us, the regenerating balm “Rhinohealing” was registered, which as a means of additional therapy showed the ability to achieve remission and a decrease in the severity of pathological symptoms of PD. Using a simplified form of the unified Parkinson's disease rating scale of the International Movement Disorders Society (MDS-UPDRS), it was found that chronic intranasal use of the HLDF-6-H peptide resulted in a significant reduction in the severity of pathological motor and non-motor symptoms of PD in all patients taking “Rhinohealing” as additional therapy. If with traditional treatment of PD there is a steady increase in pathological symptoms, then with the use of the peptide HLDF-6-H as an additional therapy, remission and a decrease in the severity of pathological symptoms of PD (tremor, rigidity, anxiety-depressive state, hallucinations, cognitive impairment and sleeping) occur. The obtained results indicate the prospects for further studies of the HLDF-6-H peptide as an additional therapy for PD.

**РАЗРАБОТКА ПЕПТИДНЫХ АЛЛОСТЕРИЧЕСКИХ МОДУЛЯТОРОВ НЕЙРОРЕЦЕПТОРОВ НА ПРИМЕРЕ РАЗРАБОТКИ ТЕТРАПЕПТИДА WPPW – ПОТЕНЦИАЛЬНОГО АЛЛОСТЕРИЧЕСКОГО МОДУЛЯТОРА АМПА РЕЦЕПТОРОВ ГЛУТАМАТА**

**Т.В. Вьюнова<sup>1,2</sup>, А.А. Бутылин<sup>1</sup>, Л.А. Андреева<sup>2</sup>, К.В. Шевченко<sup>2</sup>, И.Ю. Нагаев<sup>2</sup>, М.И. Лавров<sup>3</sup>, Н.Ф. Мясоедов<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Лаборатория нейрореабилитационных технологий, ООО «Лифт-центр»; <sup>2</sup>НИЦ «Курчатовский институт»; <sup>3</sup>Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Проблема поиска лекарственных препаратов, действующих таргетно на определенные рецепторные мишени в нервной системе, но не вызывающих при этом большого числа нежелательных побочных эффектов очень остро стоит сегодня перед современной медициной и фармакологией. Наилучшим выбором с точки зрения безопасности для пациента являются препараты на основе регуляторных пептидов. Они близки по структуре к природным молекулам, оказывают минимальное давление на ферментные системы, не оставляют токсичных метаболитов. В работе будет представлен подход к разработке таких препаратов на примере разработки тетрапептида WPPW и его защищенного аналога Boc-WPPW. Это потенциальные аллостерические модуляторы АМПА рецепторов глутамата, с перспективой дальнейшего применения при лекарственной терапии нейродегенеративных заболеваний, например, болезни Альцгеймера, различных форм деменции и др. В докладе будут представлены различные этапы предложенного подхода, например: дизайн структуры молекулы, молекулярное моделирование взаимодействия с потенциальной мишенью, синтез соединений, исследования энзиматической устойчивости, исследования лиганд-рецепторных взаимодействий с помощью меченных изотопами водорода соединений (в том числе, оценка эффективности используемых в качестве радиолиганда соединений методами электрофизиологии). Будет дано подробное описание каждого из этапов, анализ корреляции результатов различных подходов, применяемых при разработке и оценке эффективности соединений, приведены результаты, полученные для тетрапептида WPPW и его защищенного аналога Boc-WPPW.

*Работа проведена при поддержке ООО «Лифт-центр» и НИЦ «Курчатовский институт».*

**THE DESIGN OF PEPTIDE ALLOSTERIC MODULATORS OF NEURORECEPTORS, AN EXAMPLE OF TETRAPEPTIDE WPPW, A POTENTIAL ALLOSTERIC MODULATOR OF AMPA-GLUTAMATE RECEPTORS**

**T.V. Vyunova<sup>1,2</sup>, A.A. Butylin<sup>1</sup>, L.A. Andreeva<sup>2</sup>, K.V. Shevchenko<sup>2</sup>, I.Yu. Nagaev<sup>2</sup>, M.I. Lavrov<sup>3</sup>, N.F. Myasoedov<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratory of Neurorehabilitation Technologies, LLC "LIFT Center"; <sup>2</sup>National Research Center "Kurchatov Institute";

<sup>3</sup>Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University; Moscow

The issue of designing drugs that target specific receptors in the nervous system without causing a large number of unwanted side effects is a major challenge in modern medicine and pharmacology today. From a patient safety perspective, regulatory peptides-based drugs are the best option. These drugs are structurally similar to natural molecules, have minimal impact on enzyme systems, and leave no toxic metabolites. This paper will discuss an approach to developing such drugs using tetrapeptide WPPW and its protected analog Boc-WPPW as examples. These molecules are potential allosteric modulators of AMPA glutamate receptors and have the potential to be used in the treatment of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and various forms of dementia. The report will present the various stages of the proposed approach. These include: design of the molecule's structure, molecular modeling of its interaction with a potential target, synthesis of compounds, studies on enzymatic stability, and studies of ligand-receptor interactions using labeled compounds (including the evaluation of the effectiveness of compounds as radioligands using electrophysiological methods). A detailed description of each stage will be provided, as well as an analysis of the correlation between the results of the different approaches used in developing and evaluating the effectiveness of the compounds. The results obtained for the tetrapeptide WPPW and its protected analogue Boc-WPPW will also be presented.

*The work was supported by LLC "LIFT Center" and the National Research Center "Kurchatov Institute".*

### ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДНЫХ ЭКСТРАКТОВ НА КОНЦЕНТРАЦИЮ ЭНДОГЕННЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ МОЗГА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ САМЦОВ КРЫС ПРИ СВЕТОВОМ ДЕСИНХРОНОЗЕ

А.В. Шарабанов<sup>1</sup>, Е.Г. Батоцыренова<sup>2,3</sup>, В.А. Кашуро<sup>3,4,5</sup>, М.Т. Гасанов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России, Московская обл., п. Светлые горы; <sup>2</sup>Научно-клинический центр токсикологии им. С.Н. Голикова ФМБА России, Санкт-Петербург; <sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет Минздрава России, Санкт-Петербург; <sup>4</sup>Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург; <sup>5</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

Десинхроноз – патологическое состояние организма, характеризующееся нарушением биоритмов. Фармакологическое решение проблем десинхроноза малоэффективно и часто связано с побочными эффектами, такими как головная боль, головокружение, тошнота, спутанность сознания и амнезия. Таким образом, существует необходимость в эффективных и безопасных средствах для коррекции десинхроноза.

В данном исследовании изучалось влияние пептидных экстрактов (ЭПП) из эпифиза-гипофиза северного оленя (*Rangifer tarandus*), на эндогенные регуляторные белки мозга связанные с десинхронозом (HIF1a, PPARg, PCK1) и Мелатонин. Моделирование светового десинхроноза выполнялось на двухмесячных лабораторных белых беспородных крысах-самцах массой 180±20 г в количестве 144 особи. Животные методом рандомизации были разделены на три основные группы: I группа — контрольная, II группа содержалась в режиме постоянного освещения; III группа содержалась в режиме постоянной темноты. Формирование светового десинхроноза осуществлялось в течение 30 дней, первые 14 дней крысам вводили исследуемые вещества, по 10 мкг/кг, интраназально.

Показано, что ЭПП статистически значимо влияли на концентрацию регуляторных белков в сыворотке крови животных от 40 до 344 % по сравнению с контролем, что подтверждает влияние ЭПП на регуляторные белки мозга, в условиях светового десинхроноза. При этом, существует дозозависимость эффектов ЭПП. Таким образом пептидные экстракты из эпифиза-гипофиза северного оленя (*Rangifer tarandus*) являются многообещающим кандидатом на роль средства для коррекции светового десинхроноза.

### EFFECT OF PEPTIDE EXTRACTS ON THE CONCENTRATION OF ENDOGENOUS REGULATORY PROTEINS OF THE BRAIN IN THE BLOOD SERUM OF MALE RATS UNDER PHOTODESYNCHRONOSIS

A.V. Sharabanov<sup>1</sup>, E.G. Batotsyrenova<sup>2,3</sup>, V.A. Kashuro<sup>3,4,5</sup>, M.T. Gasanov<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>Scientific Center of Biomedical Technologies, Federal Medical and Biological Agency, Moscow region; <sup>2</sup>Golikov Scientific and Clinical Center of Toxicology, Federal Medical and Biological Agency, St Petersburg; <sup>3</sup>St Petersburg State Pediatric Medical University; <sup>4</sup>Herzen Russian State Pedagogical University, St Petersburg; <sup>5</sup>St Petersburg State University

Desynchronosis is a pathological condition of the body characterized by disruption of biorhythms. Pharmacological solutions to desynchronosis problems are ineffective and often associated with side effects such as headache, dizziness, nausea, confusion, and amnesia. Thus, there is a need for effective and safe means to correct desynchronosis. In this study, we investigated the effects of modified-release peptide extracts (MRE) from the pineal gland of reindeer (*Rangifer tarandus*) and a delta-sleep-inducing peptide as a reference drug on endogenous brain regulatory proteins, considered as neurotrophic factors, in the serum of male rats under conditions of light desynchronosis.

In this study, the effect of peptide extracts (PEP) from the pineal gland-pituitary gland of reindeer (*Rangifer tarandus*) on endogenous regulatory proteins of the brain associated with desynchronosis (HIF1a, PPARg, PCK1) and Melatonin was investigated. Modeling of light desynchronosis was performed on two-month laboratory white outbred male rats weighing 180±20 g in the amount of 144 individuals. The animals were randomly divided into three main groups: Group I – control, Group II was kept in a mode of constant illumination; Group III was kept in a mode of constant darkness. The formation of light desynchronosis was carried out for 30 days, the first 14 days the rats were administered the studied substances, 10 µg/kg, intranasally.

It was shown that EPP statistically significantly affected the concentration of regulatory proteins in the blood serum of animals from 40 to 344% compared to the control, which confirms the effect of EPP on regulatory proteins of the brain under conditions of light desynchronosis. At the same time, there is a dose dependence of the effects of EPP. Thus, peptide extracts from the pineal gland-pituitary gland of reindeer (*Rangifer tarandus*) are a promising candidate for the role of a means for correcting light desynchronosis.

#### УНИВЕРСАЛЬНЫЙ ПОДХОД К СИНТЕЗУ ПЕПТИДОВ С S-S СВЯЗЬЮ

**Д.В. Авдеев, М.В. Овчинников, М.Г. Медведев, А.С. Молокоедов, М.В. Сидорова**

*НМИЦ кардиологии им. Е.И. Чазова МЗ РФ, Москва*

Современные тренды развития пептидного фармацевтического рынка направлены на создание лекарственных препаратов для заболеваний, не имеющих доступных методов эффективной терапии/диагностики. Многие из этих соединений имеют в структуре внутримолекулярную дисульфидную связь. При химическом синтезе циклических дисульфидов именно стадия замыкания S-S связи является основополагающей, особенно при их крупномасштабном получении. Нами разработан новый подход к замыканию внутримолекулярной дисульфидной связи в регуляторных пептидах на полимерном носителе, который отличается простотой проведения эксперимента, воспроизводимостью результатов, и может быть применим для получения фармакопейных препаратов в промышленных масштабах. Изучены и оптимизированы условия замыкания S-S мостика на полимере для аналогов соматостатина и нейрогипофизарных гормонов, многие из которых входят в «перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения». Экспериментально и с помощью молекулярного моделирования показано влияние свободной и Boc-защищенной N-концевой аминогруппы в пептиде на выход твердофазной циклизации. Так, модификация N-концевой аминогруппы существенно облегчает замыкание дисульфидного мостика, что открывает возможность простого получения циклических пептидов, конъюгированных с соединениями непептидной природы: хелаторами, хромофорами, биотином и т.п., которые находят широкое применение в медико-биологических исследованиях. Разработанный метод пригоден для синтеза флуоресцентных зондов, предшественников радиофармацевтических препаратов на основе пептидов, бифункциональных конъюгатов для адресной доставки лекарственных препаратов к клеточным мишеням. Этот подход является универсальным и может быть применим для синтеза дисульфидов различной структуры, включая тирозин и триптофан и различным размером S-S цикла, как в лабораторных, так и промышленных масштабах.

#### UNIVERSAL METHOD TO THE SYNTHESIS OF PEPTIDES WITH S-S BOND

**D.V. Avdeev, M.V. Ovchinnikov, M.G. Medvedev, A.S. Molokoedov, M.V. Sidorova**

*Chazov National Medical Research Center for Cardiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow*

Current trends in the development of the peptide pharmaceutical market are aimed at creating drugs for diseases that do not have available methods of effective therapy/diagnosis. Many of these compounds have an intramolecular disulfide bond in their structure. In the chemical synthesis of cyclic disulfides, it is the stage of closing the S-S bond that is fundamental, especially in their large-scale production. We have developed a new approach to the closure of intramolecular disulfide bonds in regulatory peptides on a polymer carrier, which is characterized by ease of experimentation, reproducibility of results, and can be used for the production of pharmacopoeial drugs on an industrial scale. The conditions for closing the S-S bridge on the polymer for somatostatin and neurohypophyseal hormone analogues, many of which are included in the “list of vital and essential drugs for medical use,” have been studied and optimized. The influence of the free and Boc-protected N-terminal amino group in the peptide on the yield of solid-phase cyclization was demonstrated experimentally and using molecular modeling. Thus, modification of the N-terminal amino group significantly facilitates the closure of the disulfide bridge, which opens up the possibility of simple preparation of cyclic peptides conjugated with compounds of non-peptide nature: chelators, chromophores, biotin, etc., which are widely used in biomedical research. The developed method is suitable for the synthesis of fluorescent probes, precursors of peptide-based radiopharmaceuticals, and bifunctional conjugates for targeted delivery of drugs to cellular targets. This approach is universal and can be applied to the synthesis of disulfides of various structures, including tyrosine and tryptophan and various sizes of the S-S ring, both on a laboratory and industrial scale.

## АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ КАК ФАКТОРЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА И ПРОТОТИПЫ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ БОРЬБЫ С АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

Т.В. Овчинникова

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

Антимикробные пептиды (АМП) – эволюционно древние факторы системы врождённого иммунитета многоклеточных организмов, играющие ключевую роль в их защите от инфекции. АМП активны в отношении широкого спектра патогенных микроорганизмов, в том числе антибиотикорезистентных. Молекулярные механизмы действия АМП разнообразны и включают не только нарушение барьерной функции мембран бактериальных клеток, но и взаимодействие с молекулярными мишенями внутри клетки. Исследование механизмов действия АМП позволяет более глубоко понять закономерности функционирования системы врождённого иммунитета, а также отобрать природные пептиды и сконструировать их искусственные аналоги в качестве кандидатных соединений для создания новых противоиных лекарственных средств. В докладе приводятся результаты структурно-функциональных исследований ряда АМП беспозвоночных животных, в том числе новых пептидов морских полихет и их аналогов – аренцинов из *Arenicola marina*, абареницинов из *Abarenicola pacifica*, капителлацина из *Capitella teleta*, никомичинов из *Nicomache minor* и др. Проведен сравнительный анализ структурных характеристик и биологической активности ряда АМП отряда китопарнокопытных (Cetartiodactyla) млекопитающих, в том числе кателицидинов козы *Capra hircus*, кашалота *Physeter catodon* и др. Определена антимикробная активность исследуемых АМП в условиях *in vitro* и *in vivo*, в том числе в отношении клинически значимых антибиотикорезистентных микроорганизмов. Изучены основные механизмы действия АМП и проанализированы причины их селективности. Проведена оценка влияния АМП на процессы формирования биоплёнок, а также их воздействия на сформированные биоплёнки. Проведен анализ индукции резистентности к исследуемым АМП. Показано, что благодаря своим структурно-функциональным характеристикам АМП могут стать прототипами новых антибиотиков широкого спектра действия для борьбы с антибиотикорезистентными инфекциями.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 22-14-00380, <https://rscf.ru/project/22-14-00380>.

## ANTIMICROBIAL PEPTIDES AS INNATE IMMUNITY FACTORS AND DRUG PROTOTYPES TO COMBAT ANTIBIOTIC-RESISTANT INFECTIONS

T.V. Ovchinnikova

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

Antimicrobial peptides (AMPs) are evolutionarily ancient factors of the innate immune system of multicellular organisms, playing a key role in their defense against infection. AMPs are active against a wide range of pathogenic microorganisms, including antibiotic-resistant ones. The molecular mechanisms of action of AMPs are diverse and include not only disruption of the barrier function of bacterial cell membranes, but also interaction with molecular targets inside the cell. The study of mechanisms of action of AMPs will allow to better understand functioning of the innate immune system, as well as to select natural peptides and design their analogues as candidate compounds for the development of new anti-infective drugs. The talk presents structural and functional studies of a number of AMPs from invertebrate animals, including new peptides from marine polychaetes and their analogues – arenicins from *Arenicola marina*, abarenicins from *Abarenicola pacifica*, capitellacin from *Capitella teleta*, nicomicins from *Nicomache minor*, etc. A comparative analysis of the structural characteristics and biological activity of a number of AMPs from mammals of the order Cetartiodactyla, including cathelicidins from the goat *Capra hircus*, the sperm whale *Physeter catodon*, etc., was carried out. Antimicrobial activity of the studied AMPs was determined *in vitro* and *in vivo*, including those against antibiotic-resistant microorganisms. Mechanisms of action of AMPs were studied, and the reasons for their selectivity were analyzed. The influence of AMPs on the processes of biofilm formation, as well as their impact on formed biofilms, was assessed. Analysis of induction of resistance to the studied AMPs was carried out. It was shown that due to their structural and functional characteristics, AMPs might become prototypes of new broad-spectrum antibiotics to combat antibiotic-resistant infections.

The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 22-14-00380, <https://rscf.ru/en/project/22-14-00380>.

## СОЗДАНИЕ НОВЫХ ПРОТОТИПОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ТЕРАПИИ РАНЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ НА ОСНОВЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И ИХ СТРУКТУРНЫХ МОДИФИКАЦИЙ

**О.В. Шамова, И.Е. Елисеев, Е.В. Владимирова, М.С. Сухарева, Р.В. Сметанин, А.С. Комлев, М.С. Гальянова, М.С. Жаркова, М.А.Ф. Ботрос, А.Ю. Артамонов, М.М. Хайдукова, Т.А. Филатенкова, Д.С. Орлов**

*Институт экспериментальной медицины, НЦМУ "Центр персонализированной медицины", Санкт-Петербург*

Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП), в том числе раневые инфекции, являются серьезной проблемой в наши дни, так как в стационарах бактерии быстро приобретают резистентность к антибиотикам, и такие заболевания тяжело поддаются терапии. Поэтому поиск средств для эффективной борьбы с ИСМП является актуальной задачей биомедицины. Антимикробные пептиды (АМП) врожденного иммунитета могут стать такими лекарственными средствами, так как обладают быстрым антимикробным действием, а также спектром других биологических свойств. Для ряда АМП описано ранозаживляющее действие, обусловленное взаимодействием пептидов с белками, участвующими в репаративных процессах; предположены различные механизмы реализации ранозаживляющей активности пептидов, зависящие от структуры каждого АМП. Целью данного исследования явилась разработка прототипов новых антимикробных/ранозаживляющих средств, эффективных против антибиотикорезистентных бактерий группы ESKAPE, на основе синтетических аналогов природных АМП. Синтезирована линейка аналогов природных пептидов разной структуры, исследованы их антимикробные свойства и цитотоксичность для клеток человека. Для повышения эффективности препаратов и снижения действующих концентраций, и, соответственно, нивелирования побочных эффектов, использованы различные комбинации пептидов с другими антимикробными соединениями (антибиотики, антисептики, наноматериалы), выявлены комбинации, в которых имеет место выраженный синергизм антимикробного действия в отношении мультирезистентных клинических изолятов (моно- и смешанных культур) – как для планктонных бактерий, так и для формирующих биопленки. Исследованы двойные комбинации, а также более сложные - включающие три и более различных компонентов, определены наиболее активные сочетания. Проведены эксперименты *in vivo* (модель инфицированной кожной раны у мышей), отобраны наиболее перспективные комбинированные препараты (на основе бета-шипилечных пептидов протегрин 1, мицелилин, пролин-богатых бактенецинов). Полученные данные подтверждают целесообразность исследований, направленных на создание новых, эффективных средств для применения в терапии раневых инфекций на основе АМП.

*Работа выполнялась при финансовой поддержке Минобрнауки России (Соглашение № 075-15-2022-302 от 20.04.2022).*

## CREATION OF NEW PROTOTYPES OF MEDICATIONS FOR THE TREATMENT OF WOUND INFECTIONS BASED ON ANTIMICROBIAL PEPTIDES OF ANIMAL ORIGIN AND THEIR STRUCTURAL MODIFICATIONS

**O.V. Shamova, I.E. Eliseev, E.V. Vladimirova, M.S. Sukhareva, R.V. Smetanin, A.S. Komlev, M.S. Galyanova, M.S. Zharkova, M.A.F. Botros, A.Yu. Artamonov, M.M. Khaydukova, T.A. Filatenkova, D.S. Orlov**

*Institute of Experimental Medicine, World Class Research Center "Centre for Personalized Medicine", St Petersburg*

Healthcare-associated infections (HCAI), including wound infections, are a serious problem of nowadays, since bacteria that spread in hospitals quickly become resistant to antibiotics and cause difficult-to-treat infections. Therefore, the search for means to effectively combat HCAI is an urgent task of biomedicine. Antimicrobial peptides (AMPs) of innate immunity can serve as such drugs, because they have a rapid antimicrobial effect, as well as a range of other biological properties. For a number of AMPs, a wound-healing effect is described due to their interaction with proteins involved in reparative processes; various mechanisms for the implementation of wound-healing activity of peptides, depending on the structure of each AMP, are proposed. The purpose of this study was to develop prototypes of new antimicrobial/wound healing agents based on synthetic analogues of natural AMPs effective against antibiotic-resistant bacteria of the ESKARE group. A set of analogues of natural peptides of different structures has been synthesized, their antimicrobial properties and cytotoxicity for the host cells have been studied. To increase the effectiveness of AMPs and reduce their active concentrations, therefore diminishing side effects, various combinations of the peptides with other antimicrobial compounds (antibiotics, antiseptics, nanomaterials) have been explored. We found the combinations demonstrated a pronounced synergism of the antimicrobial action against multidrug-resistant clinical isolates (mono- and mixed cultures) – for planktonic bacteria and for microbial biofilms. Double combinations have been studied, as well as more complex ones involving three or more different components, and the most active combinations were identified. *In vivo* experiments were also conducted (on a model of an infected skin wound in mice), the most promising combined drugs were selected (based on beta-hairpin peptides protegrin 1, mycelicin, proline-rich bactenecins). The data obtained confirm the prospect of research aimed at creating new, effective AMPs-based drugs for application in the treatment of wound infections.

*The work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2022-302 from 04.20.2022).*

## УНИВЕРСАЛЬНЫЕ АНТИТРОМБОТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ ПЕПТИДОВ ГЛИПРОЛИНОВОГО РЯДА ПРИ СТРЕССЕ

Л.А. Ляпина<sup>1</sup>, М.Г. Григорьева<sup>1</sup>, Т.Ю. Оберган<sup>1</sup>, Л.А. Андреева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова; <sup>2</sup>НИЦ Курчатовский институт, Москва

К антитромботическим средствам относятся антиагреганты, антикоагулянты, фибринолитики. При кратковременном стрессе активируется функция противосвертывающей системы, тогда как при продолжительном повышается свертываемость крови. Цель заключалась в изучении антитромботических эффектов средств на основе пептидов глипролинового ряда.

Применялись стандартные коагулологические методы, характеризующие активность факторов свертывания, их активаторов и ингибиторов. Использовались пептиды глипролинового ряда, полученные в НИЦ «Курчатовский институт», при интраназальном введении. Антитромботические свойства глипролинов послужили основанием к их исследованию в условиях экспериментальной гиперкоагуляции при стрессе (однократная иммобилизация, принудительное плавание, однократная иммобилизация крыс с метаболическим синдромом).

Показано, что при однократном иммобилизационном стрессе пептиды RPGP, PG и PGP снижают свертываемость крови (по данным АЧТВ) и подавляют агрегацию тромбоцитов на 59% (RPGP) и 38% (PG и PGP). По влиянию на фибринолиз пептид RPGP, его комплекс с гепарином и GP повышают фибринолитические свойства плазмы в большей степени, чем PG и PGP. В тесте принудительного плавания установлен антитромботический эффект RPGP, характеризующийся увеличением фибринолиза на 20-45%, повышением АЧТВ на 54% и снижением агрегации тромбоцитов на 20%. Сочетание однократного стрессогенного иммобилизационного воздействия и нарушений метаболизма у крыс вызывало более выраженное снижение всех видов фибринолиза, антикоагулянтной активности крови и усиление агрегации тромбоцитов (в 1,5 раза по отношению к норме). RPGP на этом фоне проявлял комплексное противосвертывающее действие.

При нарушениях свертывания крови, возникающих в результате стрессогенного воздействия на организм, различные по структуре пролинсодержащие пептиды обладают уникальным сочетанным действием на показатели плазменного и тромбоцитарного гемостаза, препятствуя тромбообразованию и способствуя растворению образующихся в организме фибриновых сгустков. Универсальные модулирующие эффекты глипролинов приобретают особую актуальность для расширения сферы их применения как препаратов комбинированного действия для предупреждения и лечения постстрессорных нарушений в организме.

## UNIVERSAL ANTITHROMBOTIC EFFECTS OF DRUGS BASED ON GLYPROLINE PEPTIDES UNDER STRESS

L.A. Lyapina<sup>1</sup>, M.G. Grigorieva<sup>1</sup>, T.Y. Obergan<sup>1</sup>, L.A. Andreeva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Lomonosov Moscow State University; <sup>2</sup>National Research Center Kurchatov Institute, Moscow

Antithrombotic agents include antiplatelet agents, anticoagulants, fibrinolytics. With short-term stress, the function of the anticoagulation system is activated, while with prolonged stress, blood clotting increases. The aim was to study the antithrombotic effects of drugs based on glyproline peptides.

Standard coagulological methods characterizing the activity of coagulation factors, their activators and inhibitors were used. Glyproline peptides obtained at the National Research Center "Kurchatov Institute" were used for intranasal administration. swimming, single immobilization of rats with metabolic syndrome). Outcomes. It has been shown that under a single immobilization stress, the peptides RPGP, PG and PGP reduce blood coagulation (according to the APTT) and inhibit platelet aggregation by 59% (RPGP) and 38% (PG and PGP). In terms of the effect on fibrinolysis, the RPGP peptide, its complex with heparin and GP increase the fibrinolytic properties of plasma to a greater extent than PG and PGP. characterized by a 20-45% increase in fibrinolysis, a 54% increase in APTT, and a 20% decrease in platelet aggregation. The combination of a single stressful immobilization effect and metabolic disorders in rats caused a more pronounced decrease in all types of fibrinolysis, anticoagulant activity of blood and an increase in platelet aggregation (1.5 times in relation to the norm). Against this background, RPGP showed a complex anti-clotting effect.

In blood coagulation disorders resulting from stressful effects on the body, proline-containing peptides of various structures have a unique combined effect on the indicators of plasma and platelet hemostasis, preventing thrombosis and contributing to the dissolution of fibrin clots formed in the body. The universal modulating effects of glyprolines are of particular relevance for expanding the scope of their use as drugs of combined action for the prevention and treatment of post-stress disorders in the body.



### ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ПЕПТИД ЛАКТАПТИН УСИЛИВАЕТ ПРОТИВООПУХОЛЕВУЮ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ВИРУСА VV-GMCSF-LACT

В.А. Рихтер<sup>1</sup>, Е.В. Кулигина<sup>1,2</sup>, О.А. Коваль<sup>1</sup>, Г.В. Кочнева<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; <sup>2</sup>ООО Онкостар, Сколково, Москва;

<sup>3</sup>ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область

Рекомбинантный вирус осповакцины VV-GMCSF-Lact сконструирован на основе отечественного штамма Л-ИВП вируса осповакцины. Для повышения противоопухолевой эффективности в геном вируса был встроены ген, кодирующий онкотоксический пептид лактаптин. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* продемонстрирована высокая цитотоксическая активность и противоопухолевая эффективность вируса в отношении опухолевых клеток человека различного происхождения. Кроме того, показана способность вируса подавлять развитие метастазов. Доклинические исследования препарата, созданного на основе VV-GMCSF-Lact, подтвердили его безопасность и фармакологическую эффективность на животных моделях рака молочной железы. Препарат был рекомендован для клинических исследований.

В ноябре 2021 года получено разрешение Минздрава РФ на проведение первой фазы клинических исследований по Протоколу Oncolact2020 «Открытое мультикогортное исследование I фазы безопасности, переносимости и фармакокинетики лекарственного препарата на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины, раствор для инъекций, замороженный, у пациенток с рецидивирующим и/или рефрактерным метастатическим раком молочной железы в последовательных когортах с эскалацией дозы при однократном и многократном введении». Это первый российский препарат на основе онколитического вируса, получивший разрешение на проведение клинических исследований.

В докладе представлены результаты I фазы клинических исследований, а также данные о высокой эффективности препарата в отношении опухолей головного мозга на животных моделях. Обсуждаются вопросы проведения клинических исследований 1/2 фазы на пациентах с глиомами.

Исследование выполняется при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 24-14-00390, <https://rscf.ru/project/24-14-00390/>.

### CYTOTOXIC PEPTIDE LACTAPTIN ENHANCES ANTITUMOR EFFICACY OF THE ONCOLYTIC VV-GMCSF-LACT VIRUS

V.A. Richter<sup>1</sup>, E. V. Kuligina<sup>1,2</sup>, O.A. Koval<sup>1</sup>, G.V. Kochneva<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk;

<sup>2</sup>Oncostar LLC, Skolkovo, Moscow; <sup>3</sup>Vector State Research Center of Virology and Biotechnology of Rospotrebnadzor, Koltsovo

The recombinant vaccinia virus VV-GMCSF-Lact is constructed on the basis of the domestic strain L-IVP of the vaccinia virus. To increase antitumor effectiveness, a gene encoding the oncotoxic peptide lactaptin was inserted into the virus genome. *In vitro* and *in vivo* experiments demonstrated high cytotoxic activity and antitumor effectiveness of the virus against human tumor cells of various origins. In addition, the ability of the virus to suppress the development of metastases was demonstrated.

Preclinical studies of the drug created on the basis of VV-GMCSF-Lact confirmed its safety and pharmacological effectiveness in animal models of breast cancer. The drug was recommended for clinical trials. In November 2021, permission was received from the Ministry of Health of the Russian Federation to conduct the first phase of clinical trials under the Oncolact2020 Protocol "An open-label, multi-cohort phase I study of the safety, tolerability and pharmacokinetics of a drug based on the recombinant strain VV-GMCSF-Lact of the vaccinia virus, injection solution, frozen, in patients with recurrent and/or refractory metastatic breast cancer in sequential cohorts with dose escalation with single and multiple administration." This is the first Russian drug based on an oncolytic virus to receive permission to conduct clinical trials.

The report presents the results of phase I clinical trials, as well as data on the high efficacy of the drug against brain tumors in animal models. Issues of conducting phase 1/2 clinical trials in patients with gliomas are discussed.

The study is supported by the grant of the Russian Science Foundation No. 24-14-00390, <https://rscf.ru/project/24-14-00390/>.

#### ПРИНЦИПЫ КОНСТРУИРОВАНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ КОНЬЮГАТОВ АНТИТЕЛ

**В.А. Коршун, Е.Л. Гуляк, Т.Д. Никитин, В.А. Алфёрова, В.А. Брылёв, А.В. Устинов, К.А. Сапожникова**

*ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*

Таргетная доставка терапевтических веществ с помощью антител получила широкое распространение: в настоящее время имеется 14 одобренных для терапии конъюгатов антитело–препарат (все – для опухолевых заболеваний) и более сотни таких конъюгатов находятся на различных стадиях доклинических/клинических исследований. Многие десятки разработанных препаратов так и не получили одобрения, а некоторые были отозваны. Терапевтический конъюгат антитело–препарат (antibody–drug conjugate, ADC) состоит из полноразмерного антитела (IgG), линкера и молекулы полезной нагрузки. Антитела в ADC направлены на наиболее популярные опухолевые антигены, а терапевтические молекулы направлены на различные мишени внутри опухолевой клетки. Для линкера, соединяющего антитело с терапевтической молекулой, важна длина, гидрофильность и место присоединения к антителу: присоединение нагрузки не должно значительно влиять на аффинность антитела и параметры его циркуляции в кровотоке. Для терапевтического конъюгата преимуществом является гомогенность, поэтому в последнее время имеются тенденции применения ферментативных реакций для сайт-специфической модификации антител в противоположность статистической химической модификации. Мы проанализировали литературные данные о структуре и свойствах как одобренных конъюгатов, так и ADC, по различным причинам не получивших одобрения для клинического применения. Найденные закономерности помогут конструировать линкеры для ADC, которые с большей вероятностью покажут пригодные для терапии соотношения активности и токсичности, а также фармакокинетические и фармакодинамические свойства.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2024-536).*

#### PRINCIPLES OF CONSTRUCTION OF THERAPEUTIC ANTIBODY CONJUGATES

**V.A. Korshun, E.L. Gulyak, T.D. Nikitin, V.A. Alferova, V.A. Brylev, A.V. Ustinov, K.A. Sapozhnikova**

*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow*

Targeted delivery of therapeutic agents via antibodies has become widespread: there are currently 14 antibody–drug conjugates (ADCs) approved for clinical use (all for tumor diseases) and over a hundred such conjugates are in various stages of preclinical/clinical studies. Dozens of developed drugs have not been approved and some have been withdrawn. A therapeutic antibody–drug conjugate consists of a full-size antibody (IgG), a linker and the payload molecule. The antibodies in the ADC are directed against the most popular tumor antigens, and the therapeutic molecules are directed at various targets within the tumor cell. For the linker connecting an antibody to a therapeutic molecule, the length, hydrophilicity and attachment site of the antibody are important: attaching the payload should not significantly affect the affinity of the antibody and its bloodstream circulation parameters. For a therapeutic conjugate, homogeneity is an advantage, so a recent trend is to use enzymatic reactions for site-specific modification of antibodies as opposed to statistical chemical modification. We analyzed literature data on the structure and properties of approved ADCs, as well as ADCs that have not been approved for clinical use for various reasons. The patterns found in the data will help design ADC linkers that are more likely to result therapeutically suitable ADC activity and toxicity ratios and pharmacokinetic and pharmacodynamic properties.

*This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement No. 075-15-2024-536).*

## РАЗРАБОТКА БМКП ДЛЯ ТЕРАПИИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ ПУТЕМ ЭКСПОНИРОВАНИЯ НА КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНЕ ЗАЩИТНЫХ ПЕПТИДОВ

А.К.Ю. Масленникова, А.В. Творогова, Я.В. Червякова

Институт биологии гена РАН, Москва

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) является социально-значимым патогеном. Антиретровирусная терапия не позволяет добиться полной эрадикации вируса из организма, при этом для ВИЧ характерно развитие устойчивости к препаратам. В нашей лаборатории ведется разработка биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) для терапии ВИЧ-инфекции. Для придания клеткам устойчивости к инфицированию ВИЧ в геном с помощью лентивирусной трансдукции вносится последовательность для GPI-заякоривания на клеточной мембране защитных С-пептидов. С-пептиды – это короткие пептиды из С-концевого гептадного повтора белка слияния ВИЧ, ингибирующие проникновение ВИЧ в клетку [1].

Поскольку в основе патогенеза синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД) – терминальной стадии ВИЧ-инфекции лежит дефицит CD4<sup>+</sup> лимфоцитов, целью разрабатываемого подхода является формирование у инфицированного пациента резервуара устойчивых к проникновению ВИЧ CD4<sup>+</sup> лимфоцитов.

Для этого разрабатывается два варианта БМКП: 1. на основе аутологичных CD4<sup>+</sup> лимфоцитов, 2. на основе CD34<sup>+</sup> гемопоэтических стволовых клеток.

Для первого варианта БМКП разработан лабораторный протокол, позволяющий получать с  $\approx 50\%$  эффективностью первичные CD4<sup>+</sup> лимфоциты, обладающие  $\approx 99\%$  устойчивостью к инфицированию ВИЧ не зависимо от тропизма. Для второго варианта дополнительно разработана генетическая конструкция на основе гена *CXCR4*, усиливающая хемотаксис клеток под действием лиганда SDF-1, что по литературным данным способствует их хомингу в костный мозг и приживлению [2]. Тестирование разработанного вектора на модельной клеточной линии показало помимо высокой защищенности от инфицирования ВИЧ, усиление активности хемотаксиса более чем в два раза.

Исследование выполнено при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации №075-15-2019-1661.

1. Maslennikova A et al. Engineering T-cell resistance to HIV-1 infection via knock-in of peptides from the heptad repeat 2 domain of gp41," *MBio* 2022, 13(1), doi: 10.1128/mbio.03589-21.
2. Hongjie Wang et al. In vivo HSC transduction in rhesus macaques with an HDAd5/3+ vector targeting desmoglein 2 and transiently overexpressing cxcr4. *Blood Adv.* 2022, 6(15): 4360–4372. doi: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.202>

## DEVELOPMENT OF BIOMEDICAL CELL PRODUCTS FOR THE TREATMENT OF HIV INFECTION BY EXPOSING PROTECTIVE PEPTIDES ON THE CELL MEMBRANE

А.К.Ю. Масленникова, А.В. Творогова, Я.В. Червякова

Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow

The human immunodeficiency virus (HIV) is a socially significant pathogen. Antiretroviral therapy does not allow for complete eradication of the virus from the body, while HIV is characterized by the development of drug resistance. Biomedical cell products for the treatment of HIV infection are being developed in our laboratory. To make cells resistant to HIV infection, a sequence for GPI-anchoring of protective C peptides on the cell membrane is introduced into the genome using lentiviral transduction. C-peptides are short peptides from the C-terminal heptad repeat of the HIV fusion protein that inhibit the penetration of HIV into the cell [1].

Since the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), the terminal stage of HIV infection, is based on CD4<sup>+</sup> lymphocyte deficiency, the aim of the developed approach is to form a reservoir of HIV-resistant CD4<sup>+</sup> lymphocytes in an infected patient. Two variants are being developed for this purpose: 1. based on autologous CD4<sup>+</sup> lymphocytes, 2. based on CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells.

For the first variant has been developed a laboratory protocol, that allows obtaining primary CD4<sup>+</sup> lymphocytes with  $\approx 50\%$  efficiency, having  $\approx 99\%$  resistance to HIV infection regardless of tropism.

For the second variant has been additionally developed a genetic construct, based on the *CXCR4* gene, which enhances the chemotaxis of cells under the action of the SDF-1 ligand, which, according to literature data, promotes their homing into the bone marrow and engraftment [2]. Testing of the developed vector on a model cell line showed, in addition to high protection against HIV infection, an increase in chemotaxis activity by more than two times.

The study was supported by a grant from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation No. 075-15-2019-1661.

1. Maslennikova A et al. Engineering T-cell resistance to HIV-1 infection via knock-in of peptides from the heptad repeat 2 domain of gp41," *MBio* 2022, 13(1), doi: 10.1128/mbio.03589-21.
2. Hongjie Wang et al. In vivo HSC transduction in rhesus macaques with an HDAd5/3+ vector targeting desmoglein 2 and transiently overexpressing cxcr4. *Blood Adv.* 2022, 6(15): 4360–4372. doi: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.202>

### ФОТОИММУНОКОНЬЮГАТЫ ДЛЯ ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

К.А. Сапожникова, Е.Л. Гуляк, Т.Д. Никитин, В.А. Коршун

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

Онкологические заболевания являются одной из лидирующих причин смертности и инвалидизации населения по всему миру. Для борьбы с ними тратятся огромные ресурсы. Тем не менее, не существует идеальной терапии, особенно солидных опухолей, отличающихся высокой гетерогенностью, выраженным гипоксическим состоянием, способностью подавлять иммунную систему, а также склонностью к метастазированию и выработке резистентности к лечению. Фотоиммуноконъюгаты, то есть конъюгаты антител с фотосенсибилизаторами, сочетающие в себе эффективность иммунотерапии и фотодинамической терапии (ФДТ), могут быть перспективны в качестве терапевтических средств для лечения опухолей. Их действие направлено напрямую на опухолевую клетку, в результате чего происходит иммуногенная гибель клетки из-за повреждения активными формами кислорода, генерируемыми фотосенсибилизатором после облучения лазером. Это может привести к развитию абскопального эффекта, т.е. активации иммунной системы организма против опухолевых антигенов и элиминации отдаленных метастазов. Этот эффект наблюдается достаточно редко в случае ФДТ-терапии и радиотерапии опухолей, однако он показан в случае фотоиммуноконъюгатов в испытаниях *in vivo*. Несмотря на перспективность технологии, она начала активно разрабатываться только в последние годы, и существует множество нерешенных задач, связанных с разработкой оптимальной конструкции фотоиммуноконъюгатов. В частности, это дизайн фотосенсибилизирующих красителей, способных генерировать синглетный кислород при облучении красным светом, проходящим сквозь ткани. Большинство известных ФДТ-препаратов и разработанных для конъюгации фотоактивных красителей снижают свою активность после конъюгации с антителом. Кроме того, остро стоит вопрос их гидрофобности, а следовательно, и биодоступности конъюгата. Также многие из ФДТ-препаратов лишены какой-либо селективности по отношению к опухоли и распределяются по организму статистически. Это приводит к увеличению терапевтической дозы, а также к фототоксичности. Все эти проблемы могут быть решены при получении фотоиммуноконъюгатов, удачно объединяющих в себе плюсы иммунотерапии и ФДТ, что несомненно делает задачу значимой и актуальной.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ (Проект № 24-75-00151).*

### PHOTOIMMUNOCONJUGATES FOR THE THERAPY OF ONCOLOGICAL DISEASES

K.A. Sapozhnikova, E.L. Gulyak, T.D. Nikitin, V.A. Korshun

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

Cancer is one of the leading causes of death and disability worldwide. Huge resources are spent to fight them. Nevertheless, there is no ideal therapy, especially for solid tumors, which are characterized by high heterogeneity, a pronounced hypoxic state, the ability to suppress the immune system, as well as a tendency to metastasize and develop resistance to treatment. Photoimmunoconjugates, i.e., conjugates of antibodies with photosensitizers, combining the effectiveness of immunotherapy and photodynamic therapy (PDT), may be promising as therapeutic agents for tumor treatment. Their action is directed directly at the tumor cell, resulting in immunogenic cell death due to damage by reactive oxygen species generated by the photosensitizer after laser irradiation. This may lead to the development of abscopal effect, i.e. activation of the body's immune system against tumor antigens and elimination of distant metastases. This effect is observed quite rarely in the case of PDT therapy and radiotherapy of tumors, but it has been shown in the case of photoimmunoconjugates in *in vivo* trials. Despite the promising nature of the technology, it has only started to be actively developed in recent years, and there are many unresolved problems related to the development of optimal design of photoimmunoconjugates. This includes the design of photosensitizing dyes capable of generating singlet oxygen upon irradiation with red light passing through the tissue. Most of the known PDT drugs and photoactive dyes developed for conjugation decrease their activity after conjugation with an antibody. In addition, their hydrophobicity and hence the bioavailability of the conjugate is an acute issue. Also, many of the PDT drugs lack any selectivity towards the tumor and are distributed statistically throughout the body. This leads to an increase in the therapeutic dose as well as phototoxicity. All these problems can be solved by obtaining photoimmunoconjugates that successfully combine the advantages of immunotherapy and PDT, which undoubtedly makes the task significant and relevant.

*The study was financially supported by the Russian Science Foundation (Project No. 24-75-00151).*

## **ВИОРГОНЫ И ВИОФТАНЫ – БЕЛКОВО-ПЕПТИДНЫЕ БИОРЕГУЛЯТОРЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И РЕАБИЛИТАЦИИ**

**П.А. Елистратов, Е.В. Сидорский, В.П. Ямскава**

*ООО "Институт проблем биорегуляции", Москва*

В различных тканях млекопитающих, а впоследствии, в тканях растений и плодовых тел грибов, были обнаружены белково-пептидные комплексы, локализованные внеклеточно, которые в низких дозах оказывали влияние на такие важные биологические процессы, как адгезия, миграция, апоптоз, дифференцировка и пролиферация клеток. На основании общности физико-химических свойств и тканеспецифического характера биологического действия данные биорегуляторы белково-пептидной природы были объединены в одну группу мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов (МГТБ), основной функцией которых является поддержание и активация процессов регенерации в организме. Разработанные на основе данных биорегуляторов пищевые добавки и глазные бальзамы (товарные знаки Виоргоны и Виофтаны, соответственно), на протяжении долгого времени исследовались и в данное время успешно применяются с целью профилактики и восстановления функции органов и тканей после заболеваний. В частности, Виофтаны образуют уникальную «линейку» глазных бальзамов, представляющих собой средства профилактики и реабилитации после распространенных глазных заболеваний, не имеющих аналогов в мировой практике применения нутрицевтиков-регенерантов.

Виоргоны и Виофтаны представляют собой стерильные водно-солевые растворы, содержащие белково-пептидные биорегуляторы в низких концентрациях, предназначенные для сублингвального, перорального, интраназального и конъюнктивального применения. В процессе исследования биоспецифических свойств Виоргонов и Виофтано́в была продемонстрирована способность данных препаратов восстанавливать структуру и функции травмированных и патологически измененных тканей за счет дополнительной активации собственных клеточных источников регенерации организма.

Важнейшим свойством Виоргонов и Виофтано́в является их полная безопасность для отдельных тканей и организма в целом: они абсолютно безвредны, не проявляют никаких побочных эффектов, не вызывают привыканий и аллергических реакций. Их применение сочетается с любыми медицинскими препаратами и способами лечения и способствует быстрому и эффективному восстановлению организма после перенесенных заболеваний и предотвращают возникновение рецидивов и новых патологий в организме человека и млекопитающих.

## **VIORGONS AND VIOFTANS – PROTEIN-PEPTIDE BIOREGULATORS IN PREVENTION A REHABILITATION**

**P.A. Elistratov, E.V. Sidorski, V.P. Yamskova**

*Institute of Bioregulation Problems, LLC, Moscow*

In various tissues of mammals, and subsequently, in the tissues of plants and fungal fruiting bodies, protein-peptide complexes localized extracellularly were discovered, which in low doses influenced such important biological processes as adhesion, migration, apoptosis, differentiation and proliferation of cells. Based on the common physicochemical properties and tissue-specific nature of the biological action, these bioregulators of protein-peptide nature were combined into one group of membrane-tropic homeostatic tissue-specific bioregulators (MHTB), the main function of which is to maintain and activate regeneration processes in the body. Food supplements and eye balms developed on the basis of these bioregulators (trademarks Viorgon and Vioftan, respectively) have been studied for a long time and are now successfully used for the purpose of preventing and restoring the function of organs and tissues after diseases. In particular, Vioftans form a unique “line” of eye balms, which are means of prevention and rehabilitation after common eye diseases, which have no analogues in the world practice of using regenerative nutraceuticals.

Viorgons and Vioftans are sterile aqueous-salt solutions containing protein-peptide bioregulators in low concentrations, intended for sublingual, oral, intranasal and conjunctival use. In the process of studying the biospecific properties of Viorgons and Vioftans, the ability of these drugs to restore the structure and function of injured and pathologically altered tissues was demonstrated through additional activation of the body's own cellular sources of regeneration.

The most important property of Viorgons and Vioftans is their complete safety for individual tissues and the body as a whole: they are absolutely harmless, do not exhibit any side effects, do not cause addiction or allergic reactions. Their use is combined with any medications and methods of treatment and contributes to the rapid and effective recovery of the body after illnesses and prevents the occurrence of relapses and new pathologies in the body of humans and mammals.

## АНТИГЕН СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ ДЛЯ СУБЪЕДИНИЧНОЙ ВАКЦИНЫ: СОВРЕМЕННОЕ ОРУЖИЕ ПРОТИВ ДРЕВНЕГО ВРАГА

Д.Л. Грановский, Е.М. Рябчевская, Е.А. Евтушенко, Н.А. Никитин, О.В. Карпова

МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Сибирская язва – инфекционное заболевание, вызываемое бактерией *Bacillus anthracis*. Недостатки лицензированных вакцин против сибирской язвы обуславливают необходимость разработки новой, эффективной и стабильной рекомбинантной вакцины.

При разработке рекомбинантной вакцины против сибирской язвы наиболее перспективным подходом является использование протективного антигена *B. anthracis* (РА). РА является одним из трёх компонентов токсина сибирской язвы и опосредует проникновение в клетку остальных компонентов токсина. В отсутствие последних РА абсолютно безопасен, при этом антител к нему достаточно для формирования протективного иммунного ответа. Низкий уровень стабильности РА является основной преградой на пути к созданию рекомбинантной вакцины против сибирской язвы.

В настоящей работе были исследованы два подхода к стабилизации РА: внесение аминокислотных замен в первичную последовательность белка и использование платформы-стабилизатора. Известно, что основными причинами деградации РА являются протеолиз и спонтанное дезаминирование ряда остатков аспарагина. В данном исследовании в полномасштабном рекомбинантном РА впервые одновременно были произведены как замены в сайтах, чувствительных к фуруину и к химонтрипсину, так и замены ключевых подверженных спонтанному дезаминированию остатков аспарагина на глутамины. Полученный белок был назван rPA83m. Внесённые модификации позволили добиться более чем десятикратного увеличения стабильности белка. Для дополнительной стабилизации rPA83m были использованы сферические частицы (СЧ), полученные из вируса табачной мозаики (ВТМ). Было показано, что СЧ в качестве платформы-носителя значительно повышают стабильность rPA83m. При этом адсорбция на поверхности СЧ ВТМ не привела к изменению антигенной специфичности rPA83m.

Иммунизация композицией rPA83m и СЧ ВТМ обеспечила защиту морских свинок от полностью вирулентного штамма *B. anthracis* 81/1. Состаривание данного вакцинного кандидата не оказало негативного влияния на его протективность. Таким образом, комплексный подход, сочетающий внесение аминокислотных замен и использование СЧ ВТМ в качестве платформы-носителя, позволил получить стабильный протективный антиген *B. anthracis*, продемонстрировавший эффективность в качестве основы для рекомбинантной вакцины против сибирской язвы.

## STABLE RECOMBINANT ANTHRAX PROTECTIVE ANTIGEN FOR A SUBUNIT VACCINE: A MODERN WEAPON AGAINST AN ANCIENT ENEMY

D.L. Granovskiy, E.M. Ryabchevskaya, E.A. Evtushenko, N.A. Nikitin, O.V. Karpova

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Anthrax is an infectious disease caused by the bacterium *Bacillus anthracis*. The shortcomings of licensed anthrax vaccines necessitate the development of a new, effective and stable recombinant vaccine.

The most promising approach for the development of a recombinant anthrax vaccine is to use the protective antigen of *B. anthracis* (PA). PA is one of the three components of the anthrax toxin and mediates the transport of the other components of the toxin into the cell. In the absence of two other toxin components, PA is completely safe, and antibodies to it are sufficient to form a protective immune response. The low stability of PA is the main obstacle to the development of a recombinant anthrax vaccine.

In this work, two approaches to PA stabilization were evaluated: introduction of amino acid substitutions and the use of a stabilizer platform. It is known that the main causes of PA degradation are proteolysis and spontaneous deamination of several asparagine residues. In this study, for the first time in full-length recombinant PA, substitutions at furin- and chymotrypsin-sensitive sites and replacements of key asparagine residues susceptible to spontaneous deamination with glutamines were combined. The resulting protein was named rPA83m. The introduced modifications led to a more than tenfold increase in protein stability. Spherical particles (SPs) obtained from tobacco mosaic virus (TMV) were used as an additional stabilizer for rPA83m. It was shown that SPs as a carrier platform significantly increase the stability of rPA83m. At the same time, adsorption on the surface of TMV SPs did not cause the alteration of the antigenic specificity of rPA83m.

Immunization with the rPA83m and TMV SP composition provided protection of guinea pigs against the fully virulent *B. anthracis* 81/1 strain. Aging of this vaccine candidate did not affect its protective properties. Thus, an integrated approach combining amino acid substitutions and the use of TMV SPs as a carrier platform allowed us to obtain a stable *B. anthracis* protective antigen that demonstrated its effectiveness as a basis for a recombinant anthrax vaccine.

## АНТИАТЕРОГЕННАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПЕПТИДНОГО ПРЕПАРАТА СЛАВИНОРМ НА МОДЕЛИ АТЕРОСКЛЕРОЗА КРОЛИКОВ

Д.А. Борозденко<sup>1</sup>, К.Л. Козлов<sup>2</sup>, А.Н. Муравьев<sup>2</sup>, В.О. Полякова<sup>2</sup>, Е.Ю. Кажарская<sup>1</sup>, О.В. Репникова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ООО «Пептид Про», Москва; <sup>2</sup>Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России, Санкт-Петербург

Атеросклероз – причина многих сердечно-сосудистых заболеваний, являющихся ведущей причиной смерти в мире. К основным хирургическим методам лечения атеросклероза относятся стентирование и баллонная ангиопластика сосудов. Однако частыми послеоперационными осложнениями становятся рестеноз, тромбоз и неоатеросклероз стентированной области. Цель исследования: оценить антиатерогенную активность и возможность снижения риска рестеноза после стентирования и баллонной ангиопластики при применении пептидного ангиопротектора Славинорм на модели атеросклероза у кроликов.

23 кролика породы советская шиншилла в течение месяца получали холестериновую диету; животных разделили на 5 групп: 1- только диета (N=3), 2 – стентирование без терапии (N=5), 3- стентирование + Славинорм в/м 0,22мг/кг в течение 10 дней (N=5), 4 – баллонная ангиопластика + Славинорм в/м 0,22мг/кг в течение 10 дней (N=5) и 5 – баллонная ангиопластика без терапии (N=5). Через месяц после операции оценивали липидный профиль, морфологические изменения сосудов и методом ИГХ следующие маркеры:  $\alpha$ -гладкомышечный актин (aSMA), ангиотензин II (Ang II), TGF- $\beta$ , эндотелин-1 (ET-1), CD 31, эндотелиальная NO синтаза (e-NOS), C-kit.

Применение Славинорма снижало индекс атерогенности после стентирования в 2,5 раза (2,3vs6,0), после баллонной ангиопластики – в 1,5 раза (3,0vs4,5), что доказывает антиатерогенный эффект. При морфометрическом анализе, Славинорм достоверно снижал размер атеросклеротических бляшек в сосудах по сравнению со стентированными животными (20%vs29%), что подтверждает снижение риска неоатеросклероза. По данным ИГХ постановка баллона и стента приводила к увеличению экспрессии ET-1, маркера повреждения эндотелия и TGF- $\beta$ . Применение Славинорма на фоне стентирования увеличивало экспрессию C-kit, снижая риск рестеноза, снижало aSMA, увеличивая регенерацию эндотелия. Применение Славинорма после баллонной ангиопластики снижало ET-1 и e-NOS, корректируя тонус сосудов.

Применение препарата Славинорм после хирургического лечения атеросклероза оказывает выраженный антиатерогенный эффект, снижая индекс атерогенности на 60%, уменьшая размеры атеросклеротической бляшки на треть, снижает риски рестеноза и неоатеросклероз за счет коррекции эндотелиальной дисфункции.

## ANTIATHEROGENIC EFFECTIVENESS OF THE PEPTIDE DRUG SLAVINORM IN A RABBIT MODEL OF ATHEROSCLEROSIS

Д.А. Борозденко<sup>1</sup>, К.Л. Козлов<sup>2</sup>, А.Н. Муравьев<sup>2</sup>, В.О. Полякова<sup>2</sup>, Е.Ю. Кажарская<sup>1</sup>, О.В. Репникова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Peptid PRO, Moscow; <sup>2</sup>St Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, Ministry of Health of the Russian Federation, St Petersburg

Atherosclerosis is the cause of many cardiovascular diseases, which are the leading cause of death in the world. The main surgical methods for treating atherosclerosis include stenting and balloon angioplasty. Restenosis, thrombosis and neoatherosclerosis of the stented area become frequent postoperative complications. Purpose of the study: to evaluate the antiatherogenic activity and the possibility of reducing the risk of restenosis after stenting and balloon angioplasty using the peptide angioprotector Slavinorm on a model of atherosclerosis in rabbits.

23 Soviet chinchilla rabbits received a cholesterol diet for a month; the animals were divided into 5 groups: 1 - diet only (N=3), 2 - stenting without therapy (N=5), 3 - stenting + Slavinorm IM 0.22 mg/kg for 10 days (N=5), 4 – balloon angioplasty + Slavinorm IM 0.22 mg/kg for 10 days (N=5) and 5 – balloon angioplasty without therapy (N=5). One month after surgery, the lipid profile and morphological changes in blood vessels were assessed. The following markers were examined using IHC:  $\alpha$ -smooth muscle actin (aSMA), angiotensin II (Ang II), TGF- $\beta$ , endothelin-1 (ET-1), CD 31, endothelial NO synthase (e-NOS), C-kit.

The use of Slavinorm reduced the atherogenic index after stenting by 2.5 times (2.3vs6.0), after balloon angioplasty - by 1.5 times (3.0vs4.5), which proves antiatherogenic effect. In morphometric analysis, Slavinorm reduced the size of atherosclerotic plaques in vessels compared to stented animals (20%vs29%), which confirms a reduced risk of neoatherosclerosis. By IHC, balloon and stent placement increased the expression of ET-1, a marker of endothelial damage, TGF- $\beta$ . The use of Slavinorm during stenting increased the expression of C-kit, reducing the risk of restenosis, and decreased aSMA, increasing endothelial regeneration. The use of Slavinorm after balloon angioplasty reduced ET-1 and e-NOS, correcting vascular tone.

The use of the drug Slavinorm after surgical treatment of atherosclerosis has a pronounced anti-atherogenic effect, reducing the atherogenicity index by 60%, reducing the size of the atherosclerotic plaque by a third, and reduces the risks of restenosis and neoatherosclerosis due to the correction of endothelial dysfunction.

#### **ПЕПТИДНЫЙ СИНТЕЗ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НАБОРОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ПРОТЕОМИКЕ**

**Е.Н. Николаев, А.А. Ларкин-Кондров, О.А. Ковалёва**

*Сколковский институт науки и технологий, Москва*

Рассматриваются актуальные методы, используемые для создания пептидных наборов для применения в протеомике, включая твердофазный синтез пептидов по Fmoc-стратегии, твердофазную экстракцию, препаративную ВЭЖХ, капиллярный зонный электрофорез, масс-Спектрометрию для контроля качества и аминокислотного анализа, полуавтоматическое смешивание пептидных наборов при помощи управляемой Python API станции дозирования. Обсуждается дальнейшее развитие наборов для изучения протеома человека.

#### **PEPTIDE SYNTHESIS FOR PRODUCTION OF KITS USED IN PROTEOMICS**

**E.N. Nikolaev, A. Larkin-Kondrov, O. Kovaleva**

*Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow*

Actual methods used for producing peptide kits developed for proteomic applications are observed, including Fmoc strategy solid phase peptide synthesis, solid phase extraction, preparative HPLC, Capillary Zone Electrophoresis, Mass-Spectrometry for both QC and Amino-Acid Analysis, and semi-automated mixing of peptide kits using open source Python API liquid handler. Further development of kits for studying human proteome are being discussed.



### ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ОСМОЛЯЛЬНОСТИ НА СОДЕРЖАНИЕ ФОРМ ДАРБЭПОЭТИНА-АЛЬФА С С-КОНЦЕВЫМ АРГИНИНОМ

Е.М. Миронова, Е.А. Пономаренко, А.К. Белов, А.О. Грюк, Р.А. Марыгин, Е.В. Воронина, Ю.А. Серегин  
 ООО «Фармапарк», Москва

Культивирование продуцента на основе клеток *CHO* осуществляли в режиме fed-batch на среде PowerCHO-2CD (Lonza, Швейцария) с внесением подпитки EX-CELL Advanced CHO Feed 1 (Merck, США) и хлорида натрия по схеме, представленной на рисунке 1. Анализ содержания форм дарбэпоэтина-альфа с С-концевым аргинином проводили методом пептидного картирования. Концентрацию белка определяли методом обратнотазовой ВЭЖХ на колонке С4. В рамках обработки экспериментальных данных ежедневно измеряли концентрацию живых клеток и рассчитывали суммарное значение за все дни процесса. Осмоляльность определяли в культуральной жидкости ежедневно после внесения всех добавок, рассчитывали среднее за весь процесс.

Результаты показали, что рост осмоляльности в первые дни культивирования вызывает ухудшение культуральных и продуктивных свойств клеток (колбы №2, 3, 6 и 8). Увеличение среднего значения от 435 мОсм/кг приводит к неудовлетворительным результатам для интерпретации (колбы №3 и 8).

Попытка изменить осмоляльность путем повышения количества подпитки (колбы №1, 6 и 7) оказалась неэффективной по сравнению с показателями эксперимента, где использовали только хлорид натрия. При этом различия по содержанию формы с аргинином в колбах №1, 6 и 7 оказались несущественными, учитывая схожие результаты по среднему значению осмоляльности.

По данным, полученным для колб №4 и 5, можно сделать вывод, что повышение осмоляльности приводит к увеличению содержания форм дарбэпоэтина-альфа с С-концевым аргинином. Наряду с этим наблюдали и существенное снижение концентрации продукта в культуральной жидкости на последний день.

Учитывая полученные результаты, в рамках культивирования продуцента использовали разбавленную водой до 15% среду для культивирования, тем самым снизив осмоляльность на первые дни эксперимента, и наблюдали сокращение форм дарбэпоэтина-альфа с С-концевым аргинином в два раза по сравнению с контролем.

Таким образом, считаем, снижение осмоляльности при культивировании продуцента на основе *CHO* помогает уменьшить количество форм белка с С-концевым аргинином.

номер колбы	0 день	1 день	подпитка, 3 день и далее	Arginine, %	Суммарное количество клеток за fed-batch, млн кл/мл	Концентрация белка, г/л	Осмоляльность, среднее, мОсм/кг
6	Ex-Cell 12%	Ex-Cell 12%	Ex-Cell 3%	13,65	67,52	0,158	344
7			Ex-Cell 8%	13,23	75,50	0,196	347
1	контроль		Ex-Cell 3%	11,37	76,10	0,213	348
4			Ex-Cell 3% NaCl 30 mM (4 и 5 дни)	14,73	67,57	0,180	368
5			Ex-Cell 3% NaCl 30 mM (4 и 5 дни)	18,32	57,91	0,153	406
2	NaCl 30 mM	NaCl 30 mM	Ex-Cell 3%	19,32	37,28	0,118	435
3	NaCl 60 mM	NaCl 60 mM	Ex-Cell 3%	22,37	11,29	0,053	502
8	NaCl 100 mM	NaCl 100 mM	Ex-Cell 3%	-	4,41	0,029	576

Рисунок 1. Схема культивирования и результаты эксперимента

### STUDY OF THE EFFECT OF OSMOLALITY ON THE CONTENT OF FORMS OF DARBEPOETIN-ALPHA WITH C-TERMINAL ARGININE

Е.М. Mironova, Е.А. Ponomarenko, А.К. Belov, А.О. Gryuk, Р.А. Marygin, Е.В. Voronina, Y.A. Seregin  
 Pharmapark LLC, Moscow

The *CHO* cells were cultured in fed-batch mode on PowerCHO-2CD medium (Lonza, Switzerland) with EX-CELL Advanced CHO Feed 1 (Merck, USA) and sodium chloride according to the procedure shown in Figure 1. The content of darbepoetin-alpha forms with C-terminal arginine was analyzed by peptide mapping. Protein concentration was determined by reverse-phase HPLC on a C4 column. As part of the experimental data processing, the concentration of living cells was measured daily and the total value for all days of the process was calculated. Osmolality was determined in the culture broth daily after all supplements were added and the average for the whole process was calculated.

The results showed that an increase in osmolality during the first days of cultivation causes deterioration of culture and productive properties of cells (flasks #2, 3, 6 and 8). Raising the mean value from 435 mOsm/kg leads to insufficient results for interpretation (flasks #3 and 8).

An attempt to alter osmolality by increasing the amount of supplements (flasks #1, 6 and 7) was ineffective compared to the data of the experiment where only sodium chloride was used. At the same time, the differences in the content of the form with arginine in flasks #1, 6 and 7 were not significant, given the similar results for the mean value of osmolality.

According to the data obtained for flasks №4 and 5, we can conclude that the increase in osmolality leads to an upshift in the content of darbepoetin-alpha forms with C-terminal arginine. Along with this, a significant decline in the concentration of the product in the culture broth on the last day was also observed.

Taking into account the obtained results, within the cultivation of the producer cells we used the culture medium diluted with water up to 15%, thereby decreasing the osmolality on the first days of the experiment, and noticed a twofold diminution in the forms of darbepoetin-alpha with C-terminal arginine in comparison with the control.

Thus, we believe that reduction of osmolality when culturing a CHO-based producer helps to minimize the number of protein forms with C-terminal arginine.

Flask number	0 day	1 day	Supplementation, day 3 onwards	Arginine, %	Total cell mass per fed-batch process, mln cells/mL	Protein concentration, g/l	Osmolality, mean, mOsm/kg
6	Ex-Cell 12%	Ex-Cell 12%	Ex-Cell 3%	13,65	67,52	0,158	344
7			Ex-Cell 8%	13,23	75,50	0,196	347
1	control		Ex-Cell 3%	11,37	76,10	0,213	348
4			Ex-Cell 3% NaCl 30 mM (4 & 5 days)	14,73	67,57	0,180	368
5			Ex-Cell 3% NaCl 30 mM (4 & 5 days)	18,32	57,91	0,153	406
2	NaCl 30 mM	NaCl 30 mM	Ex-Cell 3%	19,32	37,28	0,118	435
3	NaCl 60 mM	NaCl 60 mM	Ex-Cell 3%	22,37	11,29	0,053	502
8	NaCl 100 mM	NaCl 100 mM	Ex-Cell 3%	-	4,41	0,029	576

Figure 1: Cultivation scheme and experimental results

## РАСШИРЕНИЕ СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА АПИДЕЦИНА: КОНЪЮГАЦИЯ С АЛКИЛТРИФЕНИЛФОСФОНИЕВЫМ КАТИОНОМ

Ф.Р. Бажутов, А.Г. Терещенков, Е.А. Разумова, И.А. Волюнкина, Д.А. Ипатова, Д.А. Лукьянов, Н.В. Сумбатян

МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Антимикробные пептиды представляют собой класс природных соединений, способных эффективно уничтожать широкий спектр патогенов, включая бактерии, вирусы и грибы. Апидецин (Api) – перспективный пролин-богатый антимикробный 18-членный пептид, обладающий крайне редким механизмом действия. Он ингибирует синтез бактериальных белков путём одновременного связывания с рибосомой и фактором терминации на заключительной стадии трансляции. Однако спектр действия Api ограничен грамотрицательными бактериями.

Целью нашей работы было молекулярное моделирование, синтез, изучение антибактериальной активности и исследование механизма действия конъюгатов Api и алкилтрифенилфосфониевого катиона (TPP). В ходе работы было проведено компьютерное моделирование широкого ряда конъюгатов TPP-Api, которые отличались длиной алкильного линкера и величиной остатков последовательности Api. Соединения, отобранные по результатам молекулярного докинга, были синтезированы методом твердофазного пептидного синтеза и очищены с помощью ВЭЖХ. Методом конкурентного связывания в присутствии флуоресцентно меченного пептида было показано, что введение TPP-остатка на N-конец Api приводит к увеличению аффинности соединений к рибосоме. Способность ингибировать бактериальную трансляцию *in vitro* у полученных конъюгатов также оказалась выше исходного пептида. С помощью анализа ингибирования биосинтеза белка по удлинению праймера (toe-printing), а также исследования прочтения стоп-кодонов в репортерной системе было показано, что механизм действия синтезированных веществ оказался аналогичным Api. Изучение антибактериальной активности выявило, что модифицированные соединения проявляют антимикробный эффект не только к грамотрицательным, но и грамположительным бактериям. Некоторые из производных оказались активны в отношении резистентных к Api штаммов *E. coli*, имеющих делеции генов транспортного белка SbmA и порина OmpF. Кроме того, исследуемые соединения не токсичны по отношению к клеткам эукариот по результатам МТТ-теста. Таким образом, полученные конъюгаты TPP-Api сохранили исходный механизм действия и благодаря алкил-TPP группировке расширили спектр антибактериальной активности, что может позволить приблизить клиническое применение соединений этого класса.

## EXPANDING THE ANTIMICROBIAL SPECTRUM OF APIAECIN: CONJUGATION WITH ALKYLTRIPHENYLPHOSPHONIUM CATION

F.R. Bazhutov, A.G. Tereshchenkov, E.A. Razumova, I.A. Volynkina, D.A. Ipatova, D.A. Lukianov, N.V. Sumbatyan

Lomonosov Moscow State University, Moscow

Antimicrobial peptides represent a class of natural compounds capable of effectively destroying a wide range of pathogens, including bacteria, viruses, and fungi. Apidaecin (Api) is a promising proline-rich antimicrobial 18-residue peptide with a very rare mechanism of action. It inhibits bacterial protein synthesis by simultaneously binding to the ribosome and the termination factor at the final stage of translation. However, the spectrum of action of Api is limited to Gram-negative bacteria. The aim of our work was molecular modeling, synthesis, study of antibacterial activity, and investigation of the mechanism of action of conjugates of Api and alkyltriphenylphosphonium cation (TPP). During the study, computer modeling was conducted on a wide range of TPP-Api conjugates that differed in the length of the alkyl linker and the size of the Api sequence. Compounds selected based on molecular docking results were synthesized using solid-phase peptide synthesis and purified by HPLC. Competitive binding assay in the presence of fluorescently labeled peptide demonstrated that the introduction of a TPP residue at the N-terminus of Api increases the affinity of the resulting compounds for the ribosome. The ability to inhibit bacterial translation *in vitro* for the obtained conjugates was also found to be higher than that of the original peptide. Using toe-printing and stop-codon readthrough assays, it was shown that the mechanism of action of the synthesized compounds is similar to that of Api. The study of antibacterial activity revealed that the modified compounds exhibit antimicrobial effects not only against Gram-negative but also Gram-positive bacteria. Some derivatives were active against Api-resistant strains of *E. coli* that have deletions in the genes encoding transport protein SbmA and porin OmpF. Furthermore, the investigated compounds were found to be non-toxic to eukaryotic cells according to MTT assay results. Thus, the obtained TPP-Api conjugates preserved the original mechanism of action and, due to the alkyl-TPP group, expanded the spectrum of antibacterial activity, which may facilitate the advancement of clinical applications for compounds in this class.

## ИНТРАНАЗАЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ БЕЛКА GRP78 ПРЕПЯТСТВУЕТ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ И УМЕНЬШАЕТ СТРЕСС ЭР В МОДЕЛИ ХРОНИЧЕСКОГО ОГРАНИЧЕНИЯ СНА У КРЫС

**М.Б. Пази**

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург*

Хроническое ограничение сна (ОС) широко распространено в современном обществе. Данные научной литературы указывают, ОС приводит к необратимым нейродегенеративным изменениям в головном мозге и развитию серьезных нервно-психических дисфункций. Оценка ОС-опосредованных патологических изменений в головном мозге и поиск фармакологических агентов, способных ослабить повреждающее действие ОС, являются актуальными задачами современной биомедицины. Глюкоза-регулируемый белок GRP78, является основным шапероном эндоплазматического ретикулума (ЭР) и регулятором стресса ЭР, который способствует выживанию нейронов при развитии нейродегенеративной патологии. Острое ОС усиливает экспрессию GRP78 и инициирует стресс ЭР в коре головного мозга мыши (Naidoo et al., 2005). Целью настоящего исследования было выяснить, приводит ли хроническое ОС к развитию проапоптотической реакции стресса ЭР и нейродегенерации, а также оценить способность профилактического интраназального введения белка GRP78 ослаблять вышеупомянутые дисфункции.

Модель ОС была создана с использованием циклов 3-часовой ОС и 1-часового восстановительного периода непрерывно в течение 5 дней на орбитальном шейкере (170 оборотов в минуту). GRP78 вводили интраназально за 2 дня до ОС и в течение всего периода ОС. Для оценки патологических изменений, вызванных ОС, и защитных свойств GRP78 в модели ОС были использованы методы иммуногистохимии и иммуноблоттинга. Для оценки биодоступности белка GRP78, введенного интраназально, применена конфокальная микроскопия. Статистическая обработка данных - двухфакторная ANOVA.

Модель ОС характеризовалась дегенерацией моноаминергических структур (МА) (голубое пятно, компактная часть черной субстанции, вентральная тегментальная область) головного мозга, которая была сопряжена с индукцией PERK/CHOP-зависимой проапоптотической ветви стресса ЭР. Белок GPR78 быстро усваивался МА нейронами после его интраназального введения и ослаблял как нейродегенерацию, так и проапоптотический каскад стресса ЭР.

Полученные данные свидетельствуют, что нейродегенерация, вызванная ОС, обусловлена, по крайней мере частично, PERK/CHOP-каскадом стресса ЭР, и что белок GRP78 защищает структуры мозга от повреждающего воздействия ОС благодаря модуляции стресса ЭР.

## INTRANASAL ADMINISTRATION OF GRP78 PROTEIN COUNTERACTS THE NEURODEGENERATION AND DIMINISHES ER-STRESS IN A MODEL OF CHRONIC SLEEP RESTRICTION IN RATS

**M. Pazi**

*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St Petersburg*

Chronic sleep restriction (SR) is highly prevalent in modern society. Recent data indicates that SR causes irreversible neurodegenerative changes in the brain and serious neuropsychiatric dysfunctions. Assessment of SR-induced pathological changes in the brain and search for possible pharmacological agents that can attenuate damaging effects of SR are pressing issues for modern biomedicine. Glucose-regulated protein 78 (GRP78) protein is the main chaperone of endoplasmic reticulum (ER) lumen and main regulator of the ER-stress response, contributing to the survival of neurons in different neurodegenerative pathologies. Short SR enhances GRP78 expression and initiates ER-stress in the mouse cerebral cortex (Naidoo et al., 2005). The aim of the present study was to find out whether chronic SR leads to the development of proapoptotic ER-stress response and neurodegeneration, and to assess the ability of preventive intranasal administration of GRP78 protein to weaken the aforementioned dysfunctions.

The SR model was created using cycles of 3 h of sleep deprivation and 1 h of sleep opportunity continuously for 5 days on the orbital shaker (170 rpm). GRP78 was delivered intranasally 2 days before SR and during the SR period. Immunohistochemistry and immunoblotting were used to evaluate SR-induced pathological changes and the protective properties of GRP78. Confocal microscopy was used to assess intranasally administered GRP78 protein bioavailability. Two-factor ANOVA was used for statistical data processing.

CSR model was characterized by degeneration in monoaminergic (MA) structures (locus coeruleus, substantia nigra pars compacta, ventral tegmental area) of the brain associated with rapid induction of apoptotic PERK/CHOP branch of ER-stress. GPR78 protein was rapidly internalized by MA neurons following its intranasal administration and attenuated both neurodegeneration and apoptotic ER-stress response.

The findings suggest that SR-induced neurodegeneration is conditioned, at least in part, by PERK/CHOP ER-stress branch and that GRP78 protein protects brain structures from damaging effects of SR via its ability to modulate ER stress.



Российская биотехнологическая компания,  
основанная в 2000 г.

Основные направления деятельности: выполнение работ и производство наборов и реактивов, широко используемых для рутинных задач в научных лабораториях, биотехнологических и фармацевтических компаниях.

## Наборы

Выделение и очистка  
нуклеиновых кислот

Полимеразы  
и готовые смеси для ПЦР

Синтез кДНК и ОТ-ПЦР

Клонирование ДНК

Выявление  
контаминации микоплазмой



## Сервисы

Синтез  
олигонуклеотидов

Секвенирование  
по методу Сэнгера

Синтез генов

Сайт-направленный  
мутагенез

Синтез  
органических соединений

Синтез олигонуклеотидов по новой шкале! 0.02 мкмоль — 30 руб. за одно основание

[order@evrogen.ru](mailto:order@evrogen.ru) | [www.evrogen.ru](http://www.evrogen.ru) | +7 (495) 784-70-84

Superior Solutions and Service for Science

Компания "Квадрос-Био" является поставщиком комплексных решений для национальных медицинских исследовательских центров, федеральных и региональных научно-исследовательских институтов, университетов, R&D лабораторий, медицинских организаций и фармкомпаний.

Портфель компании включает современное лабораторное оборудование и расходные материалы ведущих зарубежных и российских производителей по следующим направлениям:



Преаналитика



Молекулярная генетика



Биобанкинг



Клеточные технологии



Общелабораторное оборудование

Многолетний опыт работы и высококвалифицированные специалисты позволяют нам оказывать широкий спектр услуг на самом высоком уровне – от подбора оборудования под конкретные задачи, проведения обучающих мероприятий, до проектирования лабораторий в соответствии с международными стандартами.

Компания "Квадрос-Био"  
г. Москва, Петровско-Разумовский проезд д.29, стр. 4  
e-mail: [info@qvadrosbio.ru](mailto:info@qvadrosbio.ru), [www.qvadrosbio.ru](http://www.qvadrosbio.ru)  
тел. 8 (495)22-800-80

QVADROS  Bio

# Лаборатория «Литех»

лидер в лабораторной диагностике более 25 лет

- Лаборатория предлагает более 1500 видов исследований.
- Сотрудничество с более чем 600 медучреждениями.
- Высокая скорость выполнения анализов, большинство за 1 рабочий день.
- Инновационные технологии и многоуровневый контроль качества.



Узнайте больше на сайте  
[analyz24.ru](http://analyz24.ru) или по телефону  
**+7 (495) 260 11 26**

ООО «Лаборатория Литех», г. Москва, ул. Малая Семеновская 3Ас2

## АВИАНДР®



**ОРИГИНАЛЬНЫЙ  
 УНИКАЛЬНЫЙ\* АНКСИОЛИТИК  
 С ТРОЙНЫМ ДЕЙСТВИЕМ:**

- ПРОТИВОТРЕВОЖНОЕ
- АНТИАСТЕНИЧЕСКОЕ
- МЯГКОЕ АНТИДЕПРЕССИВНОЕ



ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ МЕДИЦИНСКИХ  
 И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ РАБОТНИКОВ

\*По действующему веществу.  
 URL: <https://grls.rosminzdrav.ru/GRLS.aspx> на 23.10.2023

СХЕМА НАЗНАЧЕНИЯ АВИАНДРА



## НЕЙРОБИОЛОГИЯ ПОЖИЗНЕННОЙ ТРАВМАТИЧЕСКОЙ ПАМЯТИ

**К.В. Анохин**

*МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва*

Травматические воспоминания глубоко влияют на поведение человека часто сохраняясь в течение многих лет жизни. Чтобы исследовать нервные механизмы такой сопоставимой с продолжительностью жизни памяти требуется наличие надежной экспериментальной модели на животных. Мы разрабатываем модель подобной устойчивой долговременной памяти у мышей на основе индукции у них посттравматического стрессового расстройства (ПТСР) одиночного эпизода сильного неизбежного электрошокового раздражения лап. Наши исследования показали, что в данной модели ассоциативная память о травматическом воздействии сохраняется в течение многих месяцев. Кроме того, такой однократный травматический опыт надолго изменяет спонтанное поведение животных, вызывая повышенную тревожность и снижение исследовательской активности в безопасных условиях домашних клеток. Поведение в тестах на обусловленный страх и сенсibilизацию также изменялось, и эти изменения могли быть нарушены блокадой синтеза белка во время приобретения травматического опыта. Ингибирование синтеза белка также приводило в норму, выявляемую по картированию экспрессии c-Fos мозговую активность, и структуру сетей покоя у животных с травматической памятью. Наши результаты показывают, что травматический опыт может надолго изменять спонтанное поведение, вызванную и спонтанную активность мозга перестраивая паттерны функциональных связей в нейронных сетях в состоянии покоя еще долгое время после травмирующего эпизода. Мы предполагаем, что эти изменения отражают многократные повторные off-line проигрывания нейронных ансамблей прошлого травматического опыта, ведущие не только к его стабилизации, но и к долговременной перестройке функционального коннектома мозга.

## NEUROBIOLOGY OF LIFE-LONG TRAUMATIC MEMORY

**K. Anokhin**

*Lomonosov Moscow State University, Moscow*

Traumatic memories deeply affect human behavior, persisting for many years, often for a lifetime. In order to investigate the neural mechanisms of such lifelong traumatic memory, a reliable experimental animal model is required. We are developing a model of such stable long-term memory based on the induction of post-traumatic stress disorder (PTSD) in mice by a single episode of a strong unavoidable footshock. In this model, memory of traumatic event persists for many months being resistant to normal extinction. In addition, such traumatic experience alters the spontaneous behavior of animals, causing increased anxiety and decreased exploratory activity in the safe conditions of home cages. Behavior in the conditioned fear and sensitization tests is also changed, these changes could be disrupted by the blockade of protein synthesis and DNA methylation processed during the acquisition of traumatic experience. Inhibition of protein synthesis can also normalize brain activity, and the structure of resting state networks in animals with traumatic memory. Our results show that traumatic experiences can alter not only spontaneous behavior, but also patterns of induced and spontaneous brain activity by rearranging resting-state functional networks for a long time after a traumatic episode. We hypothesize that these changes reflect multiple replays of neural ensembles of past traumatic experience, leading not only to their long-term stabilization, but also to a restructuring of the functional connectome.

## ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЙ КЛЕТЧНОГО РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ К ИЗУЧЕНИЮ ФЕНОМЕНА СЕЛЕКТИВНОЙ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ

**В.А. Вигонт<sup>1</sup>, Д.А. Грехнев<sup>1</sup>, О.С. Лебедева<sup>2,3</sup>, А.Н. Богомазова<sup>2,3</sup>, М.А. Лагарькова<sup>2,3</sup>, Е.В. Казначеева<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; <sup>2</sup>ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва; <sup>3</sup>Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва

Развитие технологий клеточного репрограммирования привело к существенному прогрессу в изучении нейродегенеративных заболеваний, поскольку стало возможным изучение молекулярных основ их патогенеза на клеточном уровне. Успехи в области разработки протоколов направленной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSCs) в различные типы нейронов позволяют изучать нейродегенеративные заболевания именно на тех клетках, для которых наблюдается массовая гибель при данных патологиях. Ожидается, что сравнение патофизиологических проявлений заболеваний на разных типах нейронов – устойчивых и уязвимых, поможет прояснить причины феномена селективной нейродегенерации и разработать высокоспецифичные методы терапии. В нашей работе мы использовали iPSCs, специфичные для пациентов со спиноцереbellарными атаксиями 1-го (SCA1) и 17-го (SCA17) типов, болезнями Хантингтона (HD) и Паркинсона (PD), а также для здоровых доноров. Данные iPSCs были дифференцированы в ГАМК-ергические шипиковые нейроны стриатума (MSNs), являющиеся наиболее уязвимыми при HD и SCA17, но слабо подверженными дегенерации при PD, и в дофаминергические нейроны (DNs), которые, напротив, являются основной мишенью при PD, но устойчивы к HD и SCA17. Для SCA1 оба исследуемых типа нейронов являлись малоуязвимыми. Проведенные электрофизиологические исследования продемонстрировали четкую корреляцию между уязвимостью нейронов и патологическим увеличением депо-управляемого входа кальция (SOCE), в то время как наблюдаемые при этих патологиях нарушения потенциал-управляемого входа кальция не зависели от типа нейронов. Несмотря на схожую картину нарушений SOCE для каждой из патологий были выявлены различные молекулярные причины его повышения. Так для HD аномальный SOCE в MSNs был связан с повышенным уровнем белка активатора депо-управляемых каналов STIM2; увеличение уровня его гомолога STIM1 было ответственным за повышенный SOCE в PD-специфичных DNs, а для SCA17-специфичных MSNs было показано увеличение количества каналообразующего белка TRPC1. Полученные данные позволяют предположить важную роль нарушений SOCE в избирательной дегенерации нейронов при различных патологиях и еще раз подчеркивают необходимость индивидуальных таргетных подходов к их терапии.

*Работа поддержана грантом РФФ № 22-14-00218.*

## APPLICATION OF IPSCS TECHNOLOGIES TO THE STUDY OF THE PHENOMENON OF SELECTIVE NEURODEGENERATION

**V.A. Vigont<sup>1</sup>, D.A. Grekhnev<sup>1</sup>, O.S. Lebedeva<sup>2,3</sup>, A.N. Bogomazova<sup>2,3</sup>, M.A. Lagarkova<sup>2,3</sup>, E.V. Kaznacheyeva<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St Petersburg; <sup>2</sup>Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency, Moscow; <sup>3</sup>Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency, Moscow

The development of cellular reprogramming technologies resulted in significant progress in the study of neurodegenerative diseases and studying the molecular mechanisms underlying their pathogenesis at the cellular level. Development of protocols for differentiation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) into various types of neurons allows modelling neurodegenerative diseases specifically on highly vulnerable cells. It is expected that a comparison of pathophysiological manifestations of diseases on different types of neurons - resistant and vulnerable - will help clarify the causes of the selective neurodegeneration and develop specific methods of therapy. Here, we used iPSCs specific for patients with spinocerebellar ataxia types 1 (SCA1) and 17 (SCA17), Huntington's disease (HD) and Parkinson's disease (PD), as well as for healthy donors. These iPSCs were differentiated into GABAergic striatal medium spiny neurons (MSNs), which are known to be the most vulnerable in HD and highly vulnerable in SCA17, but are relatively resistant in PD, and into dopaminergic neurons (DNs), which, on the contrary, are the main target in PD, but are resistant in HD and SCA17. For SCA1, both studied neuron types were slightly vulnerable. The electrophysiological studies demonstrated a strong correlation between the vulnerability of neurons and the pathological increase in store-operated calcium entry (SOCE), while the disturbances of voltage-gated calcium entry did not depend on the neuronal types. Despite the similar pattern of SOCE disturbances, we showed the different molecular reasons for the enhanced SOCE in these pathologies. Thus, abnormal SOCE in HD-specific MSNs was associated with an increased level of STIM2 (well-known activator of the store-operated calcium channels); an increased level of its homologue STIM1 was responsible for the abnormal SOCE in PD-specific DNs, and the overexpression of the channel-forming protein TRPC1 was maintained the enhanced SOCE in SCA17-specific MSNs. The data obtained suggest an important role of SOCE alterations in selective neurodegeneration and emphasize the development of the individual targeted therapeutic approaches.

*The work was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 22-14-00218).*



#### МОДЕЛИРОВАНИЕ СЛОЖНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА НА РЫБАХ ЗЕБРАДАНИО

**А.В. Калуев, Т.Г. Амстиславская, Л. Янг, Дж. Цуй, Ю. Жанг, Я. Лин, Ч. Жао, Дж. Ванг, Я. Цзиян, В. Блэй, Х. Цай, К. Хе, Ш. Хе, И. Чин, Х. Фенг, Ю. Лиу, Р. Ли, Ч. Ванг**

*Школа наук, Университет Шиан-Жаотонг-Ливерпуль, Сучжоу, Китай, ИТБМ СПбГУ, Санкт-Петербург, МФТИ, Москва, НИИ Нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия*

Рыбы зебраданио (zebrafish, *Danio rerio*) стали ценной и широко используемой животной моделью в биомедицинских исследованиях. В настоящее время они являются вторым (после мышей) наиболее часто используемым модельным организмом в биомедицине, имеют высокую генетическую и физиологическую гомологию с человеком, а также сложную нервную систему с широким спектром поведенческих ответов, которые имеют отношение к моделированию сложных психических расстройств человека. Зебраданио представляют собой перспективный модельный организм для изучения хронического стресса, тревоги, депрессии, зависимости и скрининга лекарств для центральной нервной системы (ЦНС). В докладе будут обсуждаться последние результаты нашей российско-китайской лаборатории по молекулярным механизмам хронического стресса, с акцентом на нейрогеномное профилирование конечного мозга, моделирование черепно-мозговой травмы (ЧМТ), вызванной хирургически и лазерной абляцией конечного мозга и обонятельных луковиц, а также опыт использования методов искусственного интеллекта (ИИ) в нейрофармакологических исследованиях на зебраданио с целью расширения возможностей инновационного моделирования заболеваний ЦНС и скрининга лекарственных препаратов.

#### ZEBRAFISH MODELS RELEVANT TO COMPLEX HUMAN BRAIN DISORDERS

**A.V. Kaluev (Kalueff), T.G. Amstislavskaya, L. Yang, J. Cui, Yu. Zhang, Ya. Lin, C. Zhao, J. Wang, J. Jiang, V. Bley, H. Cai, K. He, Sh. He, Y. Qin, H. Feng, Yu. Liu, R. Li, Ch. Wang**

*School of Sciences, Xi'an Jiatong-Liverpool University, Suzhou, China, ITBM, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Moscow; Institute of Physics and Technology, Moscow, Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk, Russia*

Zebrafish (*Danio rerio*) have become a valuable and widely used animal model in biomedical research. Presently second (after mice) most used model organism in biomedicine, zebrafish have high genetic and physiological homology to humans, and a complex nervous system with a wide range of behaviors that are relevant to mimicking complex human psychiatric disorders. Zebrafish represent a promising model organism for studying chronic stress, anxiety, depression, addiction, and screening central nervous system (CNS) drugs, including large-scale screening and CNS drug discovery. This talk will discuss recent findings from our Russian-Chinese laboratory on molecular underpinning of chronic stress, with a focus on neurogenomic profiling of telencephalon, modeling traumatic brain injury (TBI) evoked by surgical and laser ablation of telencephalon and olfactory bulbs, as well as using artificial intelligence (AI) tools in zebrafish neurobehavioral and neuropharmacological research, aiming to empower innovative CNS disease modeling and drug screening.

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВ Ly6/uPAR В МОЗГЕ

М.Л. Бычков, Д.С. Кульбацкий, А.Б. Исаев, М.П. Кирпичников, Е.Н. Люкманова

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

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR) – это лиганд-зависимые ионные каналы, участвующие в различных физиологических процессах, включая обучение, память и поведенческие реакции. Дерегуляция работы nAChR мозга связана с неврологическими и психиатрическими заболеваниями. В наших исследованиях мы сфокусировались на эндогенных белках семейства Ly6/uPAR, с характерной трехпальцевой пространственной структурой. Некоторые из них (мембранозаякоренные нейромодуляторы Lynx1, Lynx2, PSCA, Lypd6 Lypd6b и секретлируемые белки SLURP-1 и SLURP-2) регулируют работу nAChR. Мы показали, что нарушение экспрессии или функции этих белков характерна для патологий мозга, сопровождающихся дисфункцией холинергической системы.

Для исследования роли и механизмов действия этих модуляторов nAChR в нервной системе нами были получены их водорастворимые рекомбинантные аналоги. На клеточном уровне, изучаемые нейромодуляторы по-разному влияют на синаптическую пластичность. Lynx1 и SLURP-1 увеличивают, а Lypd6 и Lypd6b – уменьшают количество пеньковидных и грибовидных дендритных шипиков в культивируемых *in vitro* нейронах гиппокампа. PSCA и белок SLURP-2 уменьшают только количество пеньковидных дендритных шипиков. Негативное влияние Lypd6 и Lypd6b на плотность дендритных шипиков подтверждается *in vivo*. Lypd6 и Lypd6b уменьшают экспрессию разных субъединиц nAChR в мозгу мышей. Lynx1 в нейронах и астроцитах гиппокампа со-локализуется с  $\alpha 4$ ,  $\beta 2$  и  $\alpha 7$  nAChR и стимулирует никотин-индуцированные токи в нейронах. Инкубация астроцитов с Lynx1 увеличивает экспрессию коннексинов 30 и 43, снижает секрецию провоспалительных факторов ICAM-1, PSGL-1, VCAM-1 и подавляет секрецию CD44, NCAM и факторов адгезии, ингибирующих синаптическую пластичность. Lynx1 усиливает секрецию астроцитами дендритного активатора роста ALCAM и регулятора нейрогенеза E-селектина. Также, Lynx1 компенсирует когнитивные функции при нарушении работы  $\alpha 7$ -nAChR *in vivo*, а Lypd6 и Lypd6b, наоборот, ухудшают когнитивную функцию и способствуют проявлению тревожности у мышей.

Таким образом, трехпальцевые белки семейства Ly6/uPAR играют важную роль в регуляции работы холинергической системы мозга на клеточном и молекулярном уровнях. Их действие в организме выражается в регуляции когнитивной функции и памяти в норме и при патологиях.

## MOLECULAR AND CELLULAR MECHANISMS OF ACTION OF Ly6/uPAR PROTEINS IN THE BRAIN

M.L. Bychkov, D.S. Kulbatskii, A.B. Isaev, M.P. Kirpichnikov, E.N. Lyukmanova

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow

Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are ligand-gated ion channels involved in various physiological processes such as learning, memory, and behavior. Different neurological and psychiatric diseases are associated with dysfunction of brain nAChRs. In our studies, we focused on endogenous proteins from the Ly6/uPAR family, with a characteristic three-finger spatial structure. Some of these proteins (membrane-anchored modulators Lynx1, Lynx2, PSCA, Lypd6 Lypd6b, secreted proteins SLURP-1 and SLURP-2) regulate nAChR function. We showed that changes in the expression or function of these proteins is characteristic for the brain pathologies accompanied by dysfunction of the cholinergic system.

To study the role and mechanisms of action of these nAChR modulators in the nervous system, we obtained their water-soluble recombinant analogues. At the cellular level, the neuromodulators possess different effects on synaptic plasticity. Lynx1 and SLURP-1 increase, while Lypd6 and Lypd6b decrease the number of stub and mushroom dendritic spines in the hippocampal neurons *in vitro*. PSCA and SLURP-2 decrease the number of stub dendritic spines. The negative effect of Lypd6 and Lypd6b on dendritic spines is confirmed *in vivo*. Lypd6 and Lypd6b reduce the expression of different nAChR subunits in the mouse brain. Lynx1 colocalizes with  $\alpha 4$ ,  $\beta 2$ , and  $\alpha 7$  nAChRs in the hippocampal neurons and astrocytes and stimulates nicotine-induced currents in neurons. In astrocytes, Lynx1 increases the expression of connexins 30 and 43, reduces the secretion of pro-inflammatory factors ICAM-1, PSGL-1, VCAM-1 and suppresses the secretion of CD44, NCAM and adhesion factors that inhibit synaptic plasticity. Lynx1 enhances the secretion by astrocytes of the dendritic growth activator ALCAM and the neurogenesis regulator E-selectin. Lynx1 compensates cognitive function upon impaired function of  $\alpha 7$ -nAChR *in vivo*, while Lypd6 and Lypd6b, contrarily, worsen cognitive function and promote anxiety in mice.

Thus, three-finger proteins of the Ly6/uPAR family play an important role in regulation of the cholinergic system of the brain at the cellular and molecular levels. Their action in the brain is manifested in the regulation of cognitive function and memory in normal state and in pathologies.

## ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЕ РЕДОКС-БИОСЕНСОРЫ ДЛЯ *IN VIVO* ИССЛЕДОВАНИЙ

Д.С. Билан

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

Биохимические процессы в клетках, как в норме, так и при развитии патологий, сопровождаются образованием высокореакционноспособных соединений, среди которых, например, активные формы кислорода, серы и галогенов. Такие соединения характеризуются высокой способностью взаимодействовать с различными внутриклеточными мишенями, модифицируя их. Они могут образовываться в клетках направленно, реализуя протекание внутриклеточных сигнальных путей, или вызывать повреждения в случае их неконтролируемых концентраций. Время жизни таких высокореактивных соединений во внутриклеточной среде составляет секунды или даже менее. Практически сразу после своего образования в клетке они практически сразу вступают в окислительно-восстановительные реакции, что всегда вызывало трудности в их регистрации с использованием классических подходов аналитической химии. Наша команда занимается разработкой генетически кодируемых биосенсоров на основе флуоресцентных белков, а также их применением в различных биологических моделях. Биосенсор, являясь белковой молекулой по своей природе, вступает в специфические окислительно-восстановительные взаимодействия с целевым аналитом, что отражается изменением флуоресцентного сигнала. Гены таких биосенсоров могут быть доставлены в определенные типы клеток, например, нервной системы лабораторных животных. Используя подобные генетически кодируемые инструменты, мы исследовали динамику некоторых окислительно-восстановительных параметров в тканях мозга грызунов в режиме реального времени во время развития ишемического инсульта *in vivo*. Традиционно исследования мозга *in vivo* проводятся на мелких лабораторных млекопитающих. Однако рыба *Danio rerio* приобретает все большую популярность благодаря прозрачности своих тканей для оптических методов, а также простоте манипуляций, включая создание трансгенных линий. Разработка новых типов биосенсоров и новых подходов к их применению имеет широкие перспективы для современных медико-биологических исследований.

*При поддержке грантов РФФ (22-15-00299; 23-75-30023).*

## GENETICALLY ENCODED FLUORESCENT REDOX BIOSENSORS FOR *IN VIVO* STUDIES

D.S. Bilan

M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Biochemical processes in cells, both under normal conditions and during the development of pathologies, are accompanied by the generation of highly reactive compounds, including, for example, reactive oxygen, sulfur, and halogens species. Such compounds are characterized by a high ability to interact with various intracellular targets, causing their modifications. They can be formed in cells in a targeted manner, implementing intracellular signaling pathways, or can cause damage when their concentrations are uncontrolled. The lifetimes of highly reactive compounds in the intracellular environment are seconds or less. Almost immediately after their formation, they undergo redox reactions, which has always caused difficulties in their detection using classical approaches of analytical chemistry. Our team is engaged in the development of genetically encoded biosensors based on fluorescent proteins and their application in various biological models. The biosensor, being a protein molecule, enters into specific redox interactions with the target analyte, which is reflected in a change in the fluorescence signal. Genes of such biosensors can be delivered to specific cell types, such as the nervous system of laboratory animals. Using such genetically encoded tools, we investigated the real-time dynamics of some redox parameters in rodent brain tissues during the development of ischemic stroke *in vivo*. Traditionally, *in vivo* brain studies are performed on small laboratory mammals. However, the fish *Danio rerio* is gaining popularity due to its tissue transparency for optical methods and ease of manipulation, including the creation of transgenic lines. The development of new types of biosensors and new approaches to their application have broad prospects in modern medical and biological research.

*Supported by the Russian Science Foundation Grants (22-15-00299; 23-75-30023).*

### ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ МОЗГА *IN VIVO* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОСПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

Н.А. Браже<sup>1,2</sup>, К.И. Морозова<sup>1</sup>, А.Б. Тяглик<sup>1,2</sup>, А.А. Федотова<sup>1,2</sup>, А.Р. Браже<sup>1,2</sup>, М.С. Шестопалова<sup>2</sup>, Ю.В. Храмова<sup>1,2</sup>, А.В. Залыгин<sup>2</sup>, А.А. Быков<sup>3</sup>, Г.Н. Мартынов<sup>4</sup>, В.А. Олейников<sup>2</sup>, Д.С. Билан<sup>2</sup>, А.В. Семьянов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова; <sup>2</sup>ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; <sup>3</sup>Научно-технологический центр уникального приборостроения РАН; <sup>4</sup>Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Метаболизм, а также сигнальные процессы в нейронах и астроцитах тесно взаимосвязаны с локальной оксигенацией крови. Активность синтеза АТФ должна точно соответствовать текущим энергетическим потребностям клеток, а поступление O<sub>2</sub> в ткань мозга должно соответствовать скорости восстановления O<sub>2</sub> на комплексе IV в дыхательной (электронтранспортной, ЭТЦ) цепи митохондрий. Кроме обеспечения клеток АТФ, дыхательная цепь митохондрий определяет редокс-состояние клеток, образуя супероксид-анион радикал O<sub>2</sub><sup>-</sup> на комплексах I и III. В клетках мозга и, в особенности, в астроцитах, генерация O<sub>2</sub><sup>-</sup> с последующим образованием других активных форм кислорода (АФК) может использоваться в сигнальных процессах или приводить к развитию окислительного стресса. Для понимания взаимосвязи редокс-состояния митохондрий с локальным кровотоком и образованием АФК в мозге необходимы подходы, позволяющие *in vivo* оценить локальную оксигенацию крови, редокс-состояние ЭТЦ митохондрий и детектировать генерацию АФК в нейронах и глиальных клетках.

Мы разработали подход, основанный на микроспектроскопии комбинационного рассеяния (КР), для оценки степени заполненности ЭТЦ электронами в идентифицированных нейронах и астроцитах, а также для количественного определения локальной оксигенации крови в артериолах и венулах соматосенсорной коры мозга бодрствующих мышей. Было установлено, что при физической активности мышей ЭТЦ митохондрий астроцитов заполняется электронами, что сопровождается генерацией H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. В нейронах, напротив, снижалось относительное содержание восстановленных переносчиков электронов и не изменялась продукция H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. При этом мы наблюдали расширение сосудов и увеличение локальной оксигенации крови в венулах и в меньшей степени в артериолах. Мы установили, что при старении и при болезни Альцгеймера изменяется локальная оксигенация крови и ее регуляция в ответ на движение, а также изменяется редокс-состояние дыхательной цепи нейронов и астроцитов. Мы предполагаем, что в норме перекись водорода, образующаяся в астроцитах, необходима для сигнальных процессов между астроцитами и другими компонентами мозга. Предложенный подход может быть успешно использован для исследования редокс-процессов, протекающих в мозге при различных функциональных воздействиях и патологиях.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 23-44-00015 и 23-74-00006).*

### METABOLIC BRAIN IMAGING WITH RAMAN MICROSCOPY *IN VIVO*

N.A. Brazhe<sup>1,2</sup>, K.I. Morozova<sup>1</sup>, A.B. Tiaglik<sup>1,2</sup>, A.A. Fedotova<sup>1,2</sup>, A.R. Brazhe<sup>1,2</sup>, M.S. Shestopalova<sup>2</sup>, Yu.V. Khramova<sup>1,2</sup>, A.V. Zalygin<sup>2</sup>, A.A. Bykov<sup>3</sup>, G.N. Martynov<sup>4</sup>, V.A. Oleinikov<sup>2</sup>, D.S. Bilan<sup>2</sup>, A.V. Semyanov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University; <sup>2</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences; <sup>3</sup>Scientific and Technological Center of Unique Instrumentation, Russian Academy of Sciences; <sup>4</sup>Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Moscow

Metabolism and signaling processes in neurons and astrocytes are closely related to local hemodynamic response. The activity of ATP synthesis must precisely match the current energy needs of cells, and the oxygen supply to brain tissue must correspond the rate of O<sub>2</sub> reduction at complex IV in the mitochondrial respiratory chain (electron transport chain, ETC). Mitochondrial ETC activity also affects the redox state of cells due to the generation of superoxide-anion radical O<sub>2</sub><sup>-</sup> in complexes I and III. In brain cells (in astrocytes, in particular) the generation of O<sub>2</sub><sup>-</sup> with subsequent formation of other reactive oxygen species (ROS) can be used in signaling processes or can lead to the development of oxidative stress. To understand the relationship of mitochondria activity with ROS generation and with hemodynamic response in brain, methods are needed for *in vivo* assessment of local blood oxygenation, investigation of the ETC redox state and monitoring of ROS generation in neurons and glial cells. We developed an approach based on Raman microscopy to estimate ETC loading with electrons in identified neurons and astrocytes and to monitor quantitatively blood oxygenation in arterioles and venules of somatosensory cortex of awake mice. We demonstrated that during physical activity of mice, the relative amount of reduced electron carriers in ETC of astrocytes increased and accompanied by the generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In neurons, on the contrary, the ETC loading with electrons was decreased and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production did not change. At the same time, we observed vasodilation and the increase in local blood oxygenation in venules and, to a lesser extent, in arterioles. We found that local blood oxygenation and its regulation in response to movements change with aging or under Alzheimer disease. We also observed changes in the redox state of ETC in neurons and astrocytes. We assume that under normal conditions hydrogen peroxide formed in astrocytes is necessary for signaling processes between astrocytes and other components of the brain. The proposed approach can be successfully used to study metabolic processes and hemodynamic response in brain under physiological stimuli and various pathologies.

*We acknowledge financial support from RSF (grants 23-44-00015, 23-74-00006).*

### УВЕЛИЧЕННОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДЕЙТЕРИЯ ДО 300 ppm ПРИВОДИТ К УСИЛЕНИЮ КАЛЬЦИЕВОЙ ПЕРЕГРУЗКИ И МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДЕПОЛЯРИЗАЦИИ В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ КОРКОВЫХ НЕЙРОНОВ КРЫСЫ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ГЛУТАМАТА

И.А. Красильникова<sup>1</sup>, В.С. Перельгина<sup>2</sup>, М.А. Шишмаков<sup>1,2</sup>, Д.П. Бояркин<sup>1</sup>, А.С. Чернопятко<sup>3</sup>, З.В. Бакаева<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>НМИЦ здоровья детей Минздрава России, Москва; <sup>2</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; <sup>3</sup>ООО «Лёгкая вода», Москва;

<sup>4</sup>Калмыцкий государственный университет им. Б.Б. Городовикова, Элиста

В природной воде на нашей планете содержание дейтерия (D) составляет в среднем один атом на 6400 атомов водорода (156 частей на миллион, parts per million – 156 ppm). Изменение его содержания в питьевой воде может влиять на проявления некоторых заболеваний. При многих заболеваниях мозга наблюдается длительное и затяжное воздействие нейромедиатора глутамата (Glu), приводящее к избыточному поступлению в цитозоль ионов  $Ca^{2+}$ .

Целью данной работы было изучение влияния увеличенного содержания D до 300 ppm на развитие  $Ca^{2+}$  перегрузки и митохондриальной деполяризации в первичной культуре корковых нейронов крысы при токсическом воздействии Glu.

Флуоресцентно-микроскопические измерения выполнены на инвертированном микроскопе Nikon Ti2 (Япония). Буфер состоял из 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM  $CaCl_2$ , 1 mM  $MgCl_2$ , 20 mM HEPES, и 5 mM глюкозы (pH 7,4), который готовили на воде, содержащей 142 ppm D (контрольная группа) и 300 ppm D. Для измерения внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) клетки нагружали зондом Fura-FF/AM, для изменения митохондриального потенциала ( $\Delta\Psi_m$ ) – Rhodamine 123.

Действие Glu 100 мкМ в течение 15 мин на корковые нейроны возраста 10–12 дней от момента приготовления приводило к массивному входу  $Ca^{2+}$  в клетки. Отсроченная кальциевая дисрегуляция (ОКД, двухфазный подъём  $Ca^{2+}$  в ответ на Glu) рассматривается в литературе как процесс, связанный с гибелью нейронов. Доля клеток, ответивших на Glu с развитием ОКД, в контрольной группе составила  $47,6 \pm 6\%$ , тогда как в группе с D 300 ppm –  $59,1 \pm 9\%$ . Также при действии Glu на нейроны в буфере, приготовленном на воде с увеличенным содержанием D, Lag-период (время от начала действия Glu до вторичного подъёма  $Ca^{2+}$ ), уменьшался на  $80,1 \pm 19$  с в сравнении с группой контроля.

Добавка Glu наряду с изменениями  $[Ca^{2+}]_i$  приводила к синхронным изменениям в  $\Delta\Psi_m$ . Увеличенное содержание D до 300 ppm вызывало достоверно более резкое падение  $\Delta\Psi_m$  при действии Glu в сравнении с группой контроля, что может говорить о снижении митохондриальных функций. Анализ площадей под кривой флуоресценции Rhodamine 123 показал разницу в ~1,5 раза.

Таким образом, увеличение содержания D со 142 ppm до 300 ppm приводит к увеличению клеток, ответивших на токсическое воздействие Glu развитием ОКД с синхронным возникновением митохондриальной деполяризации.

### INCREASING THE DEUTERIUM CONTENT TO 300 ppm LEADS TO INCREASED CALCIUM OVERLOAD AND MITOCHONDRIAL DEPOLARIZATION IN THE PRIMARY CULTURE OF RAT CORTICAL NEURONS UNDER THE TOXIC EFFECTS OF GLUTAMATE

I.A. Krasilnikova<sup>1</sup>, V.S. Perelygina<sup>2</sup>, M.A. Shishmakov<sup>1,2</sup>, D.P. Boyarkin<sup>1</sup>, A.S. Chernopyatko<sup>3</sup>, Z.V. Bakaeva<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>National Medical Research Center of Children's Health, Moscow; <sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow; <sup>3</sup>Light Water, LLC, Moscow; <sup>4</sup>B.B. GorodovikovKalmyk State University, Elista

In natural water on our planet, the content of deuterium (D) is on average one atom per 6,400 hydrogen atoms (156 parts per million, parts per million – 156 ppm). Changes in its content in drinking water can affect the manifestations of some diseases. In many brain diseases, there is a long-term and protracted effect of the neurotransmitter glutamate (Glu), leading to an excess of  $Ca^{2+}$  ions in the cytosol.

The aim of this work was to study the effect of an increased D content of up to 300 ppm on the development of  $Ca^{2+}$  overload and mitochondrial depolarization in the primary culture of rat cortical neurons under the toxic effect of Glu.

Fluorescence microscopic measurements were performed on an inverted microscope Nikon Ti2 (Japan). The buffer consisted of 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM  $CaCl_2$ , 1 mM  $MgCl_2$ , 20 mM HEPES, and 5 mM glucose (pH 7.4), which was prepared in water containing 142 ppm D (control group) and 300 ppm D. To measure the intracellular  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ), the cells were loaded with the Fura-FF/AM probe, and to change the mitochondrial potential ( $\Delta\Psi_m$ ), Rhodamine 123.

The effect of 100  $\mu$ M Glu for 15 min on cortical neurons aged 10–12 days from the moment of preparation led to a massive entry of  $Ca^{2+}$  into the cells. Delayed calcium dysregulation (DCD, a 2-phase increase in  $Ca^{2+}$  in response to Glu) is considered in the literature as a process associated with neuronal death. The proportion of cells that responded to Glu with the development of DCD in the control group was  $47.6 \pm 6\%$ , while in the group with D 300 ppm –  $59.1 \pm 9\%$ . Also, when Glu acted on neurons in a buffer prepared with water with an increased content of D, the Lag period (the time from the onset of Glu action to the secondary rise in  $Ca^{2+}$ ) decreased by  $80.1 \pm 19$  sec compared to the control group.

The addition of Glu along with changes in  $[Ca^{2+}]_i$  led to synchronous changes in  $\Delta\Psi_m$ . An increased content of D to 300 ppm caused a significantly sharper drop in  $\Delta\Psi_m$  under the action of Glu compared to the control group, which may indicate a decrease in mitochondrial functions. Analysis of the areas under the fluorescence curve of the Rhodamine 123 showed a difference of ~1.5 times.

Thus, an increase in the D content from 142 ppm to 300 ppm leads to an increase in cells that responded to the toxic effect of Glu by developing DCD with the synchronous occurrence of mitochondrial depolarization.

## ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДИКИ ПРЯМОГО РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ ДЛЯ ПАЦИЕНТ-СПЕЦИФИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА

**П.С. Парфенова, Н.А. Красковская**

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург*

Болезнь Хантингтона (БХ) представляет собой нейродегенеративное заболевание, лечение которого сводится к поддерживающей терапии. Известно, что данная патология ассоциирована с мутацией в гене хантингтин (mHtt), которая заключается в экспансии CAG повторов в mHtt, кодирующих полиглутаминовый тракт. Исследования на посмертных образцах и трансгенных животных показали агрегацию и накопление белка mHTT, что связывают с развитием патологических изменений на молекулярном уровне. Однако, чтобы добиться проявления симптомов и полной клинической картины на мышцах с вставкой mHtt, необходимо увеличивать количество CAG повторов до 150 и более триплетов. Кроме того, поскольку полученные результаты тестирования потенциальных лекарственных средств на животных моделях БХ не показали успеха в доклинических испытаниях, в последние годы появилась тенденция исследования БХ на клетках человека. Это стало возможным с появлением методов дедифференцировки соматических клеток в индуцированные плюрипотентные клетки, а также прямого репрограммирования, позволяющего получить нейрон-подобные клетки, минуя стадию плюрипотентности, и сохранив, таким образом, эпигенетический возраст, который стоит учитывать при моделировании возраст-ассоциированных заболеваний. Данная работа посвящена применению методики прямого репрограммирования фибробластов пациентов с БХ и здоровых доноров в индуцированные нейроны стриатума (иНС) для моделирования патогенеза БХ. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о нарушениях морфологии иНС фибробластов пациентов с БХ: снижение общего количества дендритов, их разветвленности и длины. Также, согласно литературным данным, на клеточном уровне БХ приводит к диссоциации комплексов МАМ (митохондрия-ассоциированная мембрана ЭПР) и нарушению функциональности митохондрий: иНС фибробластов пациентов демонстрируют полиглутамин-зависимое увеличение колокализации белков ЭПР и митохондрий – Grp75 и Grp78, а также снижение активности митохондрий относительно контрольной группы. Модель прямого репрограммирования отражает основные патологические изменения на клеточном уровне и может быть использована для исследования болезни Хантингтона и потенциальных лекарственных средств в качестве доклинических испытаний.

*Исследование поддержано грантом БРК№ 075-15-2021-1063.*

## THE APPLICATION OF DIRECT REPROGRAMMING METHOD FOR PERSONALIZED MODELING OF HUNTINGTON'S DISEASE

**P.S. Parfenova, N.A. Kraskovskaya**

*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St Petersburg*

Huntington's Disease (HD) is a progressive neurological disorder that currently has no cure. This pathology is known to be associated with a mutation in the huntingtin gene (mHtt), which results in an expansion of CAG repeats within the mHtt gene, encoding the polyglutamine tract. Studies using postmortem tissue samples and transgenic animal models have shown the aggregation and accumulation of mHtt proteins, which are associated with the development of molecular-level pathological changes. However, to induce symptoms and a full clinical picture in mice with an mHtt insert, it is necessary to increase the number of CAG repeats to 150 or more. Additionally, due to the lack of success in preclinical trials with potential drug treatments on animal models of HD, there has recently been a shift towards studying this disease in human cells. This became possible with the advent of methods for reprogramming somatic cells to induced pluripotent stem cells, as well as direct reprogramming method, which allow the generation of neuron-like cells by bypassing the pluripotent stage, thus preserving the epigenetic state that should be considered when modeling age-related diseases. This study focuses on the use of a method for directly reprogramming fibroblasts from patients with HD and healthy donors into induced striatal neurons (iNS). The aim is to simulate the pathology of HD, and the results indicate morphological changes in the iNS cells from patients with HD. Specifically, there is a decrease in the number of dendrites and their branching and length, which is consistent with literature reports of HD. At the cellular level, HD also leads to a disruption of mitochondria-associated ER membranes (MAMs) and impaired mitochondrial function. The iNS of HD patients show a polyglutamine-dependent increase in the colocalization of ER and mitochondrial proteins, such as Grp75 and Grp78. Additionally, mitochondrial activity is reduced compared to the control group. The direct reprogramming method reflects the main pathological changes seen at the cellular level and could be used for studying HD and potential treatments in preclinical trials.

*The study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement no. 075-15-2021-1063).*

## СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РИБОСОМ ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ И ДРОЖЖЕЙ

**К.С. Усачев, М.М. Юсупов**

ФИЦ «Казанский научный центр РАН», Казань; НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Рибосомы – ключевой элемент аппарата синтеза белка, который является мишенью для многих антибиотиков. Одной из важнейших задач современной фармакологии является повышение селективности антибиотиков в отношении патогенных микроорганизмов, что, в свою очередь, требует проведения структурных исследований компонентов аппарата синтеза белка с атомным разрешением. С помощью криоэлектронной микроскопии мы определили структуру 70S рибосом патогенной бактерии *Staphylococcus aureus* [1, 2] и 80S рибосом патогенных дрожжей *Candida albicans* [3]. Кроме того, с помощью методов интегративной структурной биологии были раскрыты детали механизмов ответа на стресс и созревания рибосом [4-8]. Мы надеемся, что эти результаты дадут возможность выявить мишени для разработки новых антибактериальных и противогрибковых препаратов.

1. Golubev A et al. *FEBS Letters* 2020, 594: 3551-3567.
2. Zgadzay Y et al. *Sci Adv.* 2022, 8: eabn1062.
3. Khusainov I et al. *EMBO J.* 2017, 36: 2073-2087.
4. Golubev A et al. *FEBS Open Bio* 2020, 10: 1342-1347.
5. Khusainov I et al. *Nat Comm.* 2020, 11: 1656.
6. Usachev et al. *J Struct Biol.* 2020, 209: 107408.
7. Bikmullin et al. *Int J Mol Sci.* 2023, 24: 2118.
8. Garaeva et al. *Structure* 2023, 32: 74-82.

## STRUCTURAL INSIGHTS INTO THE RIBOSOMES OF PATHOGENIC BACTERIA AND YEAST

**K.S. Usachev, M.M. Yusupov**

FRC "Kazan Scientific Center of RAS", Kazan; FRC "Kurchatov Institute", Moscow

Ribosomes are a key element of the protein synthesis apparatus, which is the target of many antibiotics. One of the most important tasks of modern pharmacology is to increase the selectivity of antibiotics against pathogenic microorganisms, which in turn requires atomic resolution structural studies of components of the protein synthesis apparatus. We have determined the structure of the 70S ribosomes of the pathogenic bacterium *Staphylococcus aureus* [1, 2] and the 80S ribosomes of the pathogenic yeast *Candida albicans* [3] by cryo-electron microscopy. In addition, integrative structural biology techniques were used to reveal details of the mechanisms of stress response and ribosome maturation [4-8]. We hope that these findings will identify targets for the development of new antibacterial and antifungal drugs.

1. Golubev A et al. *FEBS Letters* 2020, 594: 3551-3567.
2. Zgadzay Y et al. *Sci Adv.* 2022, 8: eabn1062.
3. Khusainov I et al. *EMBO J.* 2017, 36: 2073-2087.
4. Golubev A et al. *FEBS Open Bio* 2020, 10: 1342-1347.
5. Khusainov I et al. *Nat Comm.* 2020, 11: 1656.
6. Usachev et al. *J Struct Biol.* 2020, 209: 107408.
7. Bikmullin et al. *Int J Mol Sci.* 2023, 24: 2118.
8. Garaeva et al. *Structure* 2023, 32: 74-82.

## СТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СФИНГОЗИН-ФОСФНОГО И ЦИСТЕИНИЛ-ЛЕЙКОТРИЕНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ КЛАССА GPCR ДЛЯ РАЦИОНАЛЬНОГО ДИЗАЙНА ЛЕКАРСТВ

А. Лугинина, В. Борщевский, А. Мишин

*Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный*

Рецепторы, сопряженные с G-белками (GPCR), составляют крупнейший класс мембранных белков в человеческом геноме, передавая сигналы внутрь клетки в ответ на внеклеточные стимулы и участвуя в большинстве физиологических процессов. GPCR являются основными мишенями в фундаментальных и прикладных медицинских и фармацевтических исследованиях: на них действуют до 40% современных лекарств. Однако GPCR представляют собой крайне сложные мишени для исследований, так как они являются трансмембранными белками с низким уровнем экспрессии, высокой конформационной подвижностью и низкой стабильностью. Структурная биология является важным инструментом для создания более эффективных и специфичных медикаментов. Эти знания являются ключевым фактором в дорогостоящем и длительном процессе разработки лекарств.

Рецептор сфингозин-1-фосфата S1P<sub>5</sub> широко распространен в центральной нервной системе и влияет на натуральные киллеры, таким образом служа мишенью для разработки лекарств против большой гранулярной лимфомы и нескольких нейродегенеративных заболеваний. Рецепторы лейкотриенов CysLT<sub>1-2</sub> стимулируют бронхоспазм, привлекают иммунные клетки, увеличивают сосудистую проницаемость и активируют секрецию слизи. Поэтому эти белки играют ключевую роль в развитии заболеваний, таких как астма, аллергический ринит и крапивница, а также в патогенезе нескольких орфанных типов рака, таких как увеальная меланома. В настоящее время на фармацевтическом рынке нет селективных лигандов для CysLT<sub>2</sub> и S1P<sub>5</sub>, а антагонисты рецептора CysLT<sub>1</sub> имеют ряд побочных эффектов.

Пространственные структуры высокого разрешения рецепторов CysLT<sub>1</sub>, CysLT<sub>2</sub> и S1P<sub>5</sub> были получены с использованием рентгеновской кристаллографии, что проливает свет на специфичность подтипов белков, их механизмы активации и аллостерическую модуляцию этих рецепторов. Это послужило основой для поиска новых соединений-хитов, действующих на данные GPCR.

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 24-74-10020).*

## SPHINGOSINE-PHOSPHATE AND CYSTEINYL LEUKOTRIENE GPCR RECEPTORS STRUCTURAL INVESTIGATION FOR RATIONAL DRUG DESIGN

A. Luginina, V. Borshchevskiy, A. Mishin

*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*

G protein-coupled receptors (GPCRs) compose the largest class of membrane proteins in human genome, transmitting signals inside the cell in response to extracellular stimuli and participating in most physiological processes. GPCRs are primary targets in fundamental and applied medical and pharmaceutical investigations: up to 40% of modern drugs act on them. However, GPCRs are extremely complex targets for research, as they are transmembrane proteins with low expression levels, high conformational flexibility, and low stability. Structural biology is an important tool for creating more effective and specific drugs. This knowledge is a crucial factor in the costly and lengthy drug development process.

The sphingosine-1-phosphate receptor S1P<sub>5</sub> is prevalent in the central nervous system and affects natural killer cells, thus serving as a target for drug development against large granular lymphocytic lymphoma and several neurodegenerative diseases. The leukotriene CysLT<sub>1-2</sub> receptors stimulate bronchoconstriction, attract immune cells, increase vascular permeability, and activate mucus secretion. Therefore, these proteins play a key role in the development of diseases such as asthma, allergic rhinitis, and urticaria, as well as in the pathogenesis of several orphan types of cancer, such as uveal melanoma. Currently, there are no selective ligands for CysLT<sub>2</sub> and S1P<sub>5</sub> on the pharmaceutical market, and antagonists of the CysLT<sub>1</sub> receptor have various side effects.

High-resolution spatial structures for the CysLT<sub>1</sub>, CysLT<sub>2</sub>, and S1P<sub>5</sub> receptors have been obtained using X-ray crystallography, shedding light on subtype specificity of the proteins, their activation mechanisms, and the allosteric modulation of these receptors. These results formed a basis for the new pool of hit compounds acting on those GPCRs reveal.

*The work was supported by Russian Science Foundation (project 24-74-10020).*



**ТОКСИНЫ ПАУКОВ, ДЕЙСТВУЮЩИЕ НА ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫЕ ИОННЫЕ КАНАЛЫ, РЕГУЛИРУЮТ АКТИВАЦИЮ НЕЧУВСТВИТЕЛЬНОГО К ПОТЕНЦИАЛУ КАНАЛА TRPA1 ПОСРЕДСТВОМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С S1-S4 ДОМЕНАМИ**

Е.Н. Люкманова<sup>1</sup>, А.Д. Иванников<sup>2</sup>, М.В. Кочаровская<sup>2</sup>, П.А. Миронов<sup>2</sup>, Е.А. Коваленко<sup>2</sup>, С.Д. Орешков<sup>2</sup>, Д.С. Кульбацкий<sup>2</sup>, А.С. Парамонов<sup>2</sup>, М.М. Заиграев<sup>2</sup>, М.А. Шулепко<sup>1</sup>, А.В. Кузнецов<sup>1</sup>, З.О. Шенкарев<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Факультет биологии, Университет МГУ–ППИ в Шэньчжэне, Шэньчжэнь, Китай; <sup>2</sup>ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Ионные каналы из семейства каналов, содержащих П-петлю, имеют модульное строение и состоят из четырех потенциал-чувствительных доменов (VSLD), образованных четырьмя трансмембранными спиралями (S1-S4), и центрального порового домена. VSLD потенциал-зависимых каналов являются мишенями для токсинов пауков, влияющих на активацию и инактивацию каналов, и атакующих каналы со стороны липидного бислоя. TRPA1 – это нечувствительный к потенциалу канал, содержащий П-петлю, участвующий в ноцицепции. Этот канал является сенсором различных электрофильных лигандов, включая экзогенные химические раздражители и эндогенные медиаторы воспаления. Активация TRPA1 приводит к воспалению, вызывая боль и зуд, что делает его потенциальной мишенью для новых анальгетиков. В ядах пауков обнаружено несколько токсинов, одновременно действующих на потенциал-зависимые каналы и на TRPA1. Протоксин-1 (ProTx-I) из *Thrixopelma pruriens* ингибирует Na<sup>+</sup> каналы и канал TRPA1, а Pha1β (PnTx3-6) из *Phoneutria nigriventer* ингибирует Ca<sup>2+</sup> каналы, положительно модулирует TRPA1 и демонстрирует анальгетический эффект *in vivo*. Оба токсина содержат мотив ингибирующего цистеинового узла, проявляют сродство к мембранам и вероятно атакуют ионные каналы со стороны липидного бислоя. Сайт связывания токсинов пауков на нечувствительном к потенциалу канале TRPA1 остается неизвестным.

Для изучения механизма действия токсинов пауков на канал TRPA1 мы исследовали комплексы ProTx-I и Pha1β с TRPA1 человека с использованием различных методов структурной биологии. Исследование методом крио-ЭМ показало, что ProTx-I связывается с петлями S1-S2 и S3-S4 VSLD полноразмерного канала TRPA1 в составе нанодиска и одновременно взаимодействует с поверхностью мембраны. Полученный комплекс схож с комплексами, которые наблюдались для других токсинов пауков и потенциал-зависимых Na<sup>+</sup> каналов. ЯМР исследование Pha1β позволило наблюдать связывание токсина с изолированным VSLD TRPA1 в среде мицелл детергента. Структура комплекса Pha1β с полноразмерным каналом TRPA1 в мембране была получена методами молекулярного моделирования, используя комбинацию докинга и молекулярной динамики и экспериментальные данные ЯМР. В предложенном комплексе Pha1β одновременно взаимодействует с внеклеточным интерфейсом VSLD и поровым доменом.

**SPIDER TOXINS ACTING ON VOLTAGE-GATED ION CHANNELS REGULATE ACTIVATION OF THE VOLTAGE-INSENSITIVE CHANNEL TRPA1 THROUGH INTERACTION WITH THE S1-S4 DOMAINS**

Е.Н. Lyukmanova<sup>1</sup>, А.Д. Ivannikov<sup>2</sup>, М.В. Kocharovskaya<sup>2</sup>, Р.А. Mironov<sup>2</sup>, Е.А. Kovalenko<sup>2</sup>, С.Д. Oreshkov<sup>2</sup>, Д.С. Kulbatskii<sup>2</sup>, А.С. Paramonov<sup>2</sup>, М.М. Zaigraev<sup>2</sup>, М.А. Shulepko<sup>1</sup>, А.В. Kuznetsov<sup>1</sup>, З.О. Shenkarev<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Biology, MSU-BIT Shenzhen University, Shenzhen, China; <sup>2</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow, Russia

P-loop channels have a modular structure and consist of four homologous voltage-sensitive like domains (VSLDs), formed by four transmembrane helices (S1-S4), and a central pore domain. VSLDs of voltage-gated channels are targets for gating-modifying spider toxins, which, block or promote the channel activation by binding to membrane-embedded domain regions. TRPA1 is the voltage insensitive P-loop channel involved in nociception. This channel is a sensor for various electrophilic ligands, including external chemicals and endogenous inflammatory mediators. Activation of TRPA1 leads to inflammation, causing pain or itch, making it a potential target for new analgesics. Several promising TRPA1 ligands have been found in spider venoms. These toxins simultaneously act on voltage-gated channels and TRPA1. Prototoxin-1 (ProTx-I) of *Thrixopelma pruriens* inhibits Na<sup>+</sup> channels and the TRPA1 channel, and Pha1β (PnTx3-6) of *Phoneutria nigriventer* inhibits Ca<sup>2+</sup> channels, positively modulates TRPA1 and demonstrates analgesic effect *in vivo*. Both toxins contain an inhibitory cysteine knot motif, exhibit membrane affinity, and are likely capable of attacking ion channels from the membrane bound state. The binding site of spider toxins at the voltage insensitive TRPA1 channel remain unknown.

To study the mechanism of action of spider toxins on TRPA1, we examined the complexes of ProTx-I and Pha1β with the human channel using various structural biology methods. Cryo-EM revealed binding of ProTx-I to the S1-S2 and S3-S4 loops of the VSLD from the membrane bound state in a manner similar to the gating-modifying spider toxins. Similarly, NMR revealed binding of Pha1β to isolated TRPA1 VSLD in micellar media. The complex of Pha1β with membrane-embedded full-length TRPA1 was modelled using NMR data and a combined docking/molecular dynamics protocol. Simultaneous toxin interaction with the extracellular interface of VSLD and pore domain was proposed.

## СПЕКТРОСКОПИЯ ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА КАК КОМПЛЕМЕНТАРНЫЙ МЕТОД КРИО-ЭМ В ИССЛЕДОВАНИИ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ РИБОСОМНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЧЕЛОВЕКА

О.А. Крумкачева<sup>1</sup>, Е.Г. Багрянская<sup>2</sup>, М.В. Федин<sup>1</sup>, Д.М. Грайфер<sup>3</sup>, А.К. Малыгин<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт «Международный томографический центр» СО РАН; <sup>2</sup>Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН; <sup>3</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Изучение структурной организации сложных надмолекулярных комплексов, таких как рибосомы человека, является фундаментальной задачей современных наук о живом. Структуры эукариотических рибосом уже определены методами крио-ЭМ и рентгеновской кристаллографии. Эти данные раскрывают особенности взаимодействия между субъединицами рибосом и служат основой для новых экспериментов, направленных на изучение механизмов трансляции. Однако основным результатом крио-ЭМ и рентгеновской кристаллографии является 3D-модель, усреднённая по ансамблю молекул. В результате такого усреднения может потеряться информация о специфических характеристиках отдельных составляющих этого ансамбля как и о структуре лабильных комплексов и элементов, обладающих повышенной подвижностью.

Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) в комбинации с селективным спин-мечением является ценным методом структурной биологии для изучения сложных биологических систем благодаря возможности определения полной функции распределения по расстояниям внутри всего ансамбля. Эта особенность позволяет ЭПР существенно дополнять результаты, полученные крио-ЭМ и рентгеновской кристаллографии. В докладе будут представлены результаты исследования структурной организации комплексов рибосом человека на этапах элонгации и терминации трансляции с использованием методов импульсной ЭПР-спектроскопии. В работе получен ряд важных результатов, дополняющих атомарные модели рибосомных комплексов и понимание молекулярных механизмов трансляции у млекопитающих. [1-3] Мы показали, что мРНК в связывающем канале рибосомы существует в двух альтернативных конформациях, соотношение которых различается в посттранслокационных, претранслокационных и терминационных комплексах. Кроме того, впервые напрямую зарегистрирован и подробно исследован лабильный комплекс неструктурированной РНК с 80S рибосомой вне мРНК-связывающего канала. На примере полученных результатов будут представлены основные возможности и ограничения импульсной ЭПР-спектроскопии в качестве комплементарного метода к крио-ЭМ и рентгеновской кристаллографии.

1. *Comp Struc Biotech J.* 2021, 19: 4702-4710.
2. *Nucl Acids Res.* 2019, 47(22): 11850-11860
3. *Nucl Acids Res.* 2018, 46(2): 89

## ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY AS A USEFUL COMPLEMENTARY METHOD TO CRYO-EM IN STUDYING THE STRUCTURAL ORGANIZATION OF HUMAN RIBOSOME COMPLEXES

O.A. Krumkacheva<sup>1</sup>, E.G. Bagryanskaya<sup>2</sup>, M.V. Fedin<sup>1</sup>, D.M. Graifer<sup>3</sup>, A.K. Malygin<sup>3</sup>

<sup>1</sup>International Tomographic Centre, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; <sup>2</sup>Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; <sup>3</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

The study of the structural organization of complex supramolecular assemblies, such as human ribosomes, is a fundamental task in modern life sciences. The structures of eukaryotic ribosomes have been determined by cryo-electron microscopy and X-ray crystallography. These data reveal the unique interactions between ribosome subunits and serve as a basis for new experiments aimed at studying translation mechanisms. However, the main outcome of these methods is a 3D model averaged over an ensemble of molecules. This averaging can, in some cases, result in the loss of information about the specific characteristics of individual components, as well as the structure of labile complexes and elements with increased mobility.

Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy, combined with selective spin-labeling, is a valuable structural biology technique for studying complex biological systems due to its ability to determine the complete distance distribution function within an ensemble. This capability allows EPR to complement results obtained by cryo-EM and X-ray crystallography. In this talk, I will present the results of a study on the structural organization of human ribosome complexes at the elongation and translation termination stages using pulsed EPR spectroscopy methods. We obtained several important results that complement atomic models of ribosomal complexes and enhance the understanding of molecular mechanisms of translation in mammals. [1-3] Particularly, we demonstrated that mRNA in the ribosome binding channel exists in two alternative conformations, with the ratio differing in posttranslocation, pretranslocation, and termination complexes. Additionally, for the first time, a labile complex of unstructured RNA with the 80S ribosome outside the mRNA-binding channel has been directly recorded and studied in detail. The main benefits and limitations of pulsed EPR spectroscopy as a complementary method to cryo-electron microscopy and X-ray crystallography will be presented using the obtained results.

1. *Comp Struc Biotech J.* 2021, 19: 4702-4710.
2. *Nucl Acids Res.* 2019, 47(22): 11850-11860
3. *Nucl Acids Res.* 2018, 46(2): 89

## **БЕЛКИ С АМИЛОИДНЫМИ СВОЙСТВАМИ, НЕКОВАЛЕНТНО ЗАКРЕПЛЁННЫЕ НА КЛЕТочНОЙ ПОВЕРХНОСТИ ДРОЖЖЕЙ: СТРУКТУРА, ФУНКЦИИ, ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ**

**Т.С. Калебина, В.В. Рекстина**

*МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра молекулярной биологии, Москва*

Биоинформатический анализ выявил наибольшую представленность белков с амилоидными свойствами в клеточной стенке (КС) дрожжей – наружном компартменте клеточной поверхности их клеток. Некоторые из этих белков, в частности Bgl2p и Gas1p, являются полисахарид-ремоделирующими ферментами и прочно закреплены в клеточной стенке без участия ковалентных связей. Чье присутствие в КС было показано для многих видов грибов, включая патогенные виды. Можно предположить, что эти белки играют важную роль в вирулентности патогенных дрожжей. Они представляют собой наиболее конформационно лабильные ферменты КС, которые играют центральную роль в ее биогенезе. Исследования авторов в совокупности с данными, опубликованными в литературе, демонстрируют, что отсутствие ковалентного закрепления и конформационная подвижность позволяет этим белкам находиться на поверхности клетки там и тогда, где и когда это необходимо, а также, несмотря на прочное закрепление в КС, выходить во внешнюю среду в процессе роста дрожжей и взаимодействовать с поверхностью клеток высших эукариот с высокой степенью вероятности индуцируя патологические состояния у животных и человека. Данные, представленные в литературе убедительно свидетельствуют о том, что антитела к Bgl2p являются прогностическим фактором при оценке состояния пациентов с заболеванием системным кандидозом. Исследования последних лет позволяют нам выдвинуть гипотезу о роли белков с амилоидными свойствами в формировании контактов дрожжей с клетками млекопитающих.

*Работа выполнена в рамках темы государственного задания № 121032300088-6.*

## **PROTEINS WITH AMYLOID PROPERTIES NONCOVALENTLY ATTACHED TO THE CELL SURFACE OF YEAST: STRUCTURE, FUNCTIONS, AND SIGNIFICANCE FOR MEDICINE**

**T.S. Kalebina, V.V. Rekstina**

*Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Molecular Biology Department, Moscow*

Bioinformatic analysis reveals the highest representation of proteins with amyloid properties in yeast cell wall (CW), the outer compartment of the cell surface. Some of these proteins, in particular Bgl2p and Gas1p, are polysaccharide-remodeling enzymes that are firmly anchored in the yeast CW with no covalent bonds, whose presence in CW has been shown for many fungi species including pathogenic ones. It can be assumed that these proteins play an important role in the virulence of pathogenic yeast. They represent the most conformationally labile enzymes of CW, which play a central role in its biogenesis. The authors' studies along with the data published in the literature demonstrate that the lack of covalent attachment and conformational mobility allows these proteins to be located on the cell surface when and where necessary, and, despite being firmly anchored in CW, to enter the external environment during yeast growth and interact with the cell surface of higher eukaryotes with a high degree of probability of inducing pathological conditions in animals and humans. The data presented in the literature strongly suggest that antibodies to Bgl2p are a prognostic factor in the evaluation of patients with systemic candidiasis. Recent studies allow us to hypothesize the role of proteins with amyloid properties in the formation of yeast contacts with mammalian cells.

*The research was carried out within the framework of the State Budget Project of Moscow State University No. 121032300088-6.*

### КРИО-ЭМ И *IN SILICO* ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ S-БЕЛКА ВИРУСА SARS-CoV-2 С НЕЙТРАЛИЗУЮЩИМИ АНТИТЕЛАМИ

З. Шенкарев<sup>1</sup>, М. Кочаровская<sup>1</sup>, Э. Пичкур<sup>2</sup>, Д. Нольде<sup>1</sup>, Д. Дормешкин<sup>3</sup>, М. Шапиро<sup>3</sup>, В. Борщевский<sup>4</sup>, А. Варижук<sup>5</sup>, Е. Люкманова<sup>6</sup>

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

<sup>2</sup>НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия; <sup>3</sup>Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь;

<sup>4</sup>Московский центр перспективных исследований, Москва, Россия; <sup>5</sup>ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России,

Москва, Россия; <sup>6</sup>Университет МГУ-ППИ в Шэньчжэне, Китай

Знание того, как нейтрализующие антитела распознают различные варианты вируса SARS-CoV-2, имеет решающее значение для разработки на их основе вакцин и терапевтических средств.

Мы получили 2,5 Å крио-ЭМ структуру полноразмерного тримерного S-белка Delta варианта вируса SARS-CoV-2 в комплексе с рекомбинантным аналогом Fab коммерческого антитела REGN10987. Интерфейсы взаимодействия рецептор-связывающего домена (RBD)/Fab были локально уточнены до 3,2–3,4 Å. Два RBD S-белка находились в нижнем положении, в то время как третий RBD принял конформацию «вверх». Fab взаимодействовал с RBD в обеих конформациях, занимая часть рецептор-связывающего мотива (RBM) и блокируя распознавание ACE2. Анализ 3D-изменчивости выявил высокую подвижность областей RBD/Fab. Способность REGN10987 связывать RBD вариантов Omicron BA.1 и Delta с несколькими мутациями была протестирована с помощью термфореза и проанализирована с помощью молекулярной динамики и расчетов свободной энергии связывания ( $\Delta G$ ). Показано, что падение активности REGN10987 по отношению к Omicron варианту вируса является комбинированным эффектом двух мутаций, N440K и G446S. Эти остатки расположены на интерфейсе связывания RBD/Fab, и обе мутации демонстрируют примерно одинаковое влияние на  $\Delta G$ . Примечательно, что вариация рассчитанных значений  $\Delta G$  из-за изменчивости траекторий молекулярной динамики превысила разницу в значениях  $\Delta G$  между мутантами. Однако, учет весов по Больцману обеспечил приемлемую корреляцию с экспериментальными данными. Наше исследование дает структурное представление о роли мутаций RBD Omicron и других вариантов вируса SARS-CoV-2 в их распознавании антителом REGN10987. Также мы получили 2,9 Å крио-ЭМ структуру S-белка Delta варианта вируса в комплексе с синтетическим наноантителом (Nb). В этом случае два RBD находились в конформации «вверх», а третий RBD находился в нижнем положении. Локальное уточнение привело к 3,9 Å структуре RBD/Nb в верхнем положении и 4,1 Å структуре RBD/Nb в нижнем положении. В зависимости от концентрации, Nb был способен связываться в двух различных неперекрывающихся участках на поверхности RBD: в области RBM и в боковой части RBD. Примечательно, что Nb связывается в области RBM в виде димера.

Полученные данные будут полезны для разработки новых терапевтических антител.

### CRYO-EM AND *IN SILICO* STUDY OF SARS-CoV-2 S-PROTEIN INTERACTION WITH NEUTRALIZING ANTIBODIES

Z. Shenkarev<sup>1</sup>, M. Kocharovskaya<sup>1</sup>, E. Pichkur<sup>2</sup>, D. Nolde<sup>1</sup>, D. Dormeshkin<sup>3</sup>, M. Shapiro<sup>3</sup>, V. Borshchevskiy<sup>4</sup>, A. Varizhuk<sup>5</sup>, E. Lyukmanova<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup>Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; <sup>2</sup>National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, Russia; <sup>3</sup>Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus; <sup>4</sup>Moscow Center for Advanced Studies, Moscow, Russia; <sup>5</sup>Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia; <sup>6</sup>Shenzhen MSU-BIT University, China

Knowledge how neutralizing antibodies recognize various SARS-CoV-2 virus variants is critical for design of vaccines and antibody-based therapeutics.

Here, we reported the 2.5 Å cryo-EM structure of full-length trimeric S-protein of the Delta variant of SARS-CoV-2 virus in complex with recombinant analogue of Fab of commercial REGN10987 antibody. The receptor-binding domain (RBD)/Fab regions were locally refined to 3.2–3.4 Å. Two RBDs of the S-protein were in the 'down' state, while third RBD adopted the 'up' conformation. Fab interacted with RBDs in both conformations occupying a part of the receptor-binding motif and blocking ACE2 recognition. 3D variability analysis revealed high mobility of the RBD/Fab regions. Ability of REGN10987 analogue to bind RBDs of Omicron BA.1 variant and Delta variants with several mutations was tested by microscale thermophoresis and assayed by molecular dynamics simulations and  $\Delta G$  calculations via umbrella sampling simulations and potential of mean force. The REGN10987 evasion of the Omicron variant was found to be a combined effect of two mutations, N440K and G446S. These residues are located at the RBD/Fab binding interface, and both mutations demonstrate approximately the same effect on the binding free energy ( $\Delta G$ ). Notably, the variation in calculated  $\Delta G$  values due to variability in the MD trajectories exceeded the difference in  $\Delta G$  values between the mutants. However, Boltzmann weighting provided an acceptable correlation with the experimental data. Our study provides a structural insight into the role of RBD mutations of the Omicron and other SARS-CoV-2 variants in the REGN10987 evasion. Also, we obtained 2.9 Å cryo-EM structure of the Delta S protein in complex with a synthetic nanoantibody (Nb). In this case, two RBDs were in the 'up' conformation and third RBD was in the 'down' state. Local flexible refinement resulted in 3.9 Å RBD-up/Nb structure and 4.1 Å RBD-down/Nb structure. Depending on a concentration, Nb was capable to bind at two different non-overlapped sites at the RBD surface: in the RBM region and in the side part of RBD. Notably, Nb binds in the RBM region in the form of a dimer.

The data obtained will be useful for development of new therapeutic antibodies.

## АНАЛИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ; ПЕРСПЕКТИВА ВЫБОРА ЛУЧШЕГО КЛОНА ДЛЯ ЦЕЛЕЙ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

**В.В. Гурский, И.Э. Неганова**

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург*

В последние годы применение пациент-специфичных человеческих индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) в области персонализированной медицины значительно возросло. Однако проблема выбора «истинного» клона для клинических испытаний по-прежнему остается острой. Это связано с тем, что не все клоны ИПСК способны дифференцироваться в желаемом направлении с одинаковой эффективностью. Наша группа давно интересуется разработкой моделей выбора лучших клонов ИПСК на основе их морфологических параметров с помощью методов машинного обучения. Одним из возможных решений для такой оценки является создание фазово-контрастных изображений колоний, обработка морфологических параметров («морфологический портрет»), привязка этой информации к фенотипу колонии и запуск автоматизированного протокола для выбора колонии. Мы используем методы машинного обучения, чтобы найти эффективную модель для классификации колоний в соответствии с их морфологическим фенотипом («хороший» или «плохой»), используя данные морфологических параметров в качестве предикторов. Созданная нами модель основана на сочетании клеточных и колониальных морфологических параметров. Когда морфологические параметры колоний использовались в качестве предикторов, логистическая регрессия была наиболее эффективным методом классификации (средняя точность 75%). Объединение морфологических параметров клеток и колоний привело к получению наиболее эффективной модели (99%). Случайный лес был наиболее эффективным методом классификации для объединенных данных, указывая на то, что истинный морфологический портрет, связанный непосредственно с плюрипотентностью ИПСК, должен быть собран как из морфологических параметров клеток колонии, так и из параметров колонии в целом. Когда клеточные и колониальные параметры были объединены, колониальный диаметр Ферета (Ferret's diameter), колониальный минимальный диаметр Ферета и колониальный фактор формы оказали наибольшее влияние на классификацию. Наше исследование показало важность метода машинного обучения для автоматизированного прогнозирования фенотипа ИПСК.

Мы рассматриваем наше исследование как первый шаг к разработке аналитических инструментов с программным управлением, которые автоматизируют выбор лучшего клона ИПСК человека.

*РНФ № 21-75-20132.*

## ANALYSIS OF THE HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS USING MACHINE-LEARNING METHODS; THE PROSPECT OF THE BEST CLONE SELECTION FOR PURPOSE OF REGENERATIVE MEDICINE

**V. Gursky, I. Neganova**

*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St Petersburg*

In last years, the application of patient-specific human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) in the field of personalized medicine has increased significantly. Banks of iPSCs have been created around the world, but the problem of choosing the best or the “true” clone for clinical trials is still acute. This is due to the fact that not all generated hiPSCs clones are able to differentiate in the desired tissue-specific direction with equal efficiency. Our group has a long-standing interest in developing of machine learning models for the best clone recognition based on it morphological parameters. One possible solution for such label-free, noninvasive assessment is to make phase-contrast images and/or videos of growing stem cell colonies, process the morphological parameters (‘morphological portrait’, or signal), link this information to the colony phenotype, and initiate an automated protocol for the colony selection. We employ machine learning methods to find an effective model for classifying the colonies according to their morphological phenotype (‘good’ or ‘bad’), using data of morphological parameters as predictors. The created model is based on the combination of cellular and colonial morphological parameters. When morphological parameters of colonies were used as predictors, logistic regression was the most effective classification method (75% average accuracy). Combining the morphological parameters of cells and colonies resulted in the most effective model, with a 99% average accuracy of phenotype prediction. Random forest was the most efficient classification method for the combined data, indicating that the true morphological portrait associated directly with the hiPSC pluripotency should be assembled from both the morphological parameters of cells of the colony and the parameters of the colony as a whole. When the cellular and colonial parameters were combined, colonial Feret's diameter, colonial Minimal Feret's diameter, and colonial Shape factor had the greatest impact on classification. We consider our research as the first step towards developing software-guided analytical tools that will automate the selection of the best hiPSCs clones.

*Russian Science Foundation Grant # 21-75-20132.*

## МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ И ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ НИХ МИКРОВЕЗИКУЛЫ ДЛЯ ТЕРАПИИ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА И НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Я.О. Мухамедшина<sup>1</sup>, Э.Ф. Давлетшин<sup>1</sup>, М.А. Мухамедьяров<sup>2</sup>, А.А. Ризванов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет; <sup>2</sup>Казанский государственный медицинский университет, Казань

Необходимость повышения эффективности доступных терапевтических протоколов, используемых в неврологии, привела к появлению ряда различных подходов. Однако нейродегенеративные заболевания и травматические повреждения нервной ткани по-прежнему представляют собой проблему вследствие низкого регенераторного потенциала центральной нервной системы. Клеточная терапия рассматривается как один из перспективных способов преодоления последствий повреждения нервной ткани. Однако с учетом полученных данных, подтверждающих паракринную гипотезу протективного и регенераторного воздействия стволовых клеток, пришло осознание возможности применения их внеклеточных микровезикул (ВМ). Основными компонентами ВМ являются белки, липиды и нуклеиновые кислоты, включая микроРНК и мРНК, влияющие на различные клеточные процессы, такие как пролиферация, дифференцировка и апоптоз.

В наших исследованиях мы использовали метод получения ВМ из мезенхимных стволовых клеток (МСК-ВМ) при помощи цитохалазина В. Нами впервые было проанализировано влияние инъекций МСК-ВМ с терапевтической целью на структуру и функцию нервной ткани в случае моделирования травмы спинного мозга (крысы) или развития бокового амиотрофического склероза (мышь). Дополнительно был проведен анализ дозозависимых эффектов с учетом способа инъекции (аппликация на область повреждения совместно с фибриновым матриксом или системный вариант введения). Кроме того, был оценен терапевтический потенциал многократных интраклеточных инъекций МСК-ВМ, полученных из аутологичных клеток, в подостром периоде травмы спинного мозга у свиней. В данном исследовании мы наблюдали частичное восстановление двигательной активности за счет стимуляции ремиелинизации аксонов и своевременной реперфузии нервной ткани. Описанный терапевтический подход на модели трансгенной линии мышей ΔFUS обеспечивал увеличение продолжительности жизни животных, способствуя облегчению двигательных симптомов, коррекции процессов экзо- и эндоцитоза синаптических везикул в двигательных нервных окончаниях, снижению нейровоспаления в спинном мозге при ретроорбитальной инъекции МСК-ВМ.

*Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Проект № FZSM-2023-0011.*

## MESENCHYMAL STEM CELLS AND DERIVED MICROVESICLES FOR THERAPEUTIC ADVANCES IN SPINAL CORD INJURY AND NEURODEGENERATIVE DISEASES

Y.A. Mukhamedshina<sup>1</sup>, E.F. Davletshin<sup>1</sup>, M.A. Mukhamedyarov<sup>2</sup>, A.A. Rizvanov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kazan (Volga Region) Federal University; <sup>2</sup>Kazan State Medical University, Kazan

Need to improve the efficacy of available therapeutic protocols used in neurology has led to the emergence of a number of different approaches. However, neurodegenerative diseases and traumatic neural tissue injury remain a challenge due to the low regenerative potential of the central nervous system. Cell therapy is considered as one of the promising ways to overcome the consequences of neural tissue injury. However, taking into account the obtained data confirming the paracrine hypothesis of protective and regenerative effect of stem cells, the possibility of using their extracellular microvesicles (EV) has been realized. The main components of EV are proteins, lipids and nucleic acids, including microRNAs and mRNAs, which influence various cellular processes such as proliferation, differentiation and apoptosis.

In our studies, we used a method to generate EV from mesenchymal stem cells (MSC-EV) using cytochalasin B. We first analyzed the effect of MSC-EV injections with therapeutic purpose on the structure and function of neural tissue in case of modeling spinal cord injury (rats) or development of amyotrophic lateral sclerosis (mice). Additionally, dose-dependent effects were analyzed with regard to the route of injection (application to the injury area together with fibrin matrix or systemic administration). In addition, the therapeutic potential of multiple intrathecal injections of autologous cell-derived MSC-EV in the subacute period of spinal cord injury in pigs was evaluated. In this study, we observed partial recovery of motor activity due to stimulation of axon remyelination and timely reperfusion of nerve tissue. The described therapeutic approach on the model of transgenic line of ΔFUS mice provided an increase in the life expectancy of animals, contributing to the relief of motor symptoms, correction of the processes of exo- and endocytosis of synaptic vesicles in motor nerve endings, reduction of neuroinflammation in the spinal cord by retroorbital injection of MSC-EV.

*The study was funded by the subsidy allocated to Kazan Federal University for the state assignment № FZSM-2023-0011 in the sphere of scientific activities.*

## РОЛЬ ТАНДЕМНОПОВТОРЯЮЩЕЙСЯ КДНК В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ И ФОРМИРОВАНИИ ОПУХОЛЕВОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ

**Н.И. Енукашвили, Н.В. Пономарцев, Е.А. Гуца, В.В. Волков**

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург*

Формирование опухоли (туморогенез) – процесс, сочетающий в себе процессы как превращения клетки в опухолевую, так и формирование окружающей эти клетки среды (микроокружения), поддерживающей пролиферацию опухолевых клеток и защищающей их. В состав микроокружения входят клетки стромы (фибробласты), иммунной системы, сосудов и т.д., а также, внеклеточный матрикс и растворимые факторы. Изучение механизмов взаимодействия между ними дает возможность создавать новые лекарственные препараты. Геном человека содержит более 60% повторяющимися последовательностями, разбросанных по геному (диспергированные повторы, транспозоны, ТЕ), или кластеризованных (тандемные повторы, ТП, сателлитная ДНК). Показано многократное увеличение транскрипционной активности ТП и ТЕ в опухолях. Цель исследования: оценить уровень экспрессии и физиологическую роль ТП и ТЕ в аденокарциноме легкого. При анализе опубликованных транскриптомов опухоли показано увеличение транскрипции прицентромерных и центромерных ТП, а также некоторых ТЕ, в частности HERVH, играющего важную роль в поддержании плюрипотентности. При анализе транскриптомов одиночных клеток выявлены различия в наборе повторяющихся последовательностей между различными кластерами клеток. Выявлены последовательности прицентромерной ТП РНК сателлита 2/3 (HS2/3), селективно транскрибируемые в опухоль-ассоциированной строме. Их транскрипция индуцировалась факторами, индуцирующими переход фибробластов микроокружения к опухоль-ассоциированному фенотипу (TGF- $\beta$ , IL1 $\alpha$ , присутствием опухолевых клеток). Инактивация выявленных транскриптов HS2/3 приводила к снижению выраженности проинфламаторного фенотипа фибробластов. При сокультивировании фибробластов с опухолевыми клетками аденокарциномы в последних также наблюдали повышение уровня транскрипции HS2/3. Транфекция конструкцией, избыточно экспрессирующей HS2/3, или индукция экспрессии HS2/3 в опухолевых клетках приводила к активации эпителиально-мезенхимного перехода (ЭМТ) в клетках аденокарциномы. При инактивации экспрессии, напротив, снижался уровень экспрессии генов-маркеров ЭМТ. Проведенные исследования подтверждают роль тандемных и диспергированных повторов в формировании опухоли.

*Работа поддержана Министерством науки и высшего образования РФ (Соглашение № 075-15-2021-1075).*

## TANDEMLY REPEATED RNA: ROLE IN CARCINOGENESIS AND TUMORIGENESIS

**N.I. Enuakashvily, N.V. Ponomartsev, E.A. Gushcha, V.V. Volkov**

*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St Petersburg*

Tumor formation (tumorigenesis) is a process that combines both cell transformation into a tumor cell and the formation of an environment (microenvironment) that supports and protects the proliferation of tumor cells. The microenvironment includes cells of the stroma (fibroblasts), the immune system, blood vessels, etc., as well as the extracellular matrix and soluble factors. Studying the mechanisms of interaction between them enables the development of new drugs. The human genome contains more than 60% of repetitive sequences scattered throughout the genome (interspersed repeats, transposons, TE) or clustered (tandem repeats, TP, satellite DNA). A multiple increase in the transcriptional activity of TPs and TEs has been demonstrated in tumors. Objective: To evaluate the expression level and physiological role of TPs and TEs in lung adenocarcinoma. Analysis of published tumor transcriptomes showed an increase in transcription of pericentromeric and centromeric TPs as well as some TEs, in particular HERVH, which plays an important role in maintaining pluripotency. Analysis of single cell transcriptomes revealed differences in the set of repetitive sequences between different cell clusters. Sequences of the pericentromeric TR RNA satellite 2/3 (HS2/3) were identified that were selectively transcribed in the tumor-associated stroma. Their transcription was induced by factors that induce the transition of microenvironmental fibroblasts to a tumor-associated phenotype (TGF- $\beta$ , IL1 $\alpha$ , the presence of tumor cells). Inactivation of the identified HS2/3 transcripts led to a decrease in the expression of the proinflammatory phenotype of fibroblasts. When fibroblasts were co-cultured with adenocarcinoma tumor cells, an increase in the level of HS2/3 transcription was also observed in the tumor cells. Transfection with a construct overexpressing HS2/3 or induction of HS2/3 expression in tumor cells led to activation of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) in adenocarcinoma cells. Inactivation of HS2/3 expression decreased the expression of EMT marker genes. These studies confirm the role of tandem and dispersed repeats in tumorigenesis.

*The work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2021-1075).*

## ПОЛУЧЕНИЕ И ПОДДЕРЖАНИЕ СТАТУСА ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МАКАК-РЕЗУСА

**А.С. Рябченко, В.К. Абдыев, Е.А. Воротеляк, А.В. Васильев**

*Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва*

Нечеловекообразные приматы являются удобной и воспроизводимой моделью в таких областях, как регенеративная и трансляционная медицина, тестирование лекарственных препаратов, исследования заболеваний и эмбрионального развития. Макак-резус (*Macaca mulatta*) является одним из наиболее распространенных и доступных видов нечеловекообразных приматов для исследований. Кроме того, макак-резусы филогенетически близки к человеку и не обременены этическими и юридическими ограничениями. Как известно, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) обладают способностью к дифференцировке в различные типы клеток организма и также являются перспективным объектом исследований. Тем не менее, получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток нечеловекообразных приматов является сложной задачей, так как эти клетки по сравнению с клетками человека менее эффективно поддаются репрограммированию, а из-за видовых различий имеют иные условия культивирования и поддержания плюрипотентности. Мультипотентные стволовые клетки жировой ткани макак-резуса были репрограммированы эписомальными векторами при воздействии вальпроевой кислоты и бутирата натрия. Колонии клеток с морфологией ИПСК были обнаружены к 17 дню репрограммирования, а первые колонии отобраны на 21 день репрограммирования. Предположительно, применение ингибиторов деацетилазы гистонов увеличило эффективность репрограммирования. Однако следующей задачей является поддержание статуса плюрипотентности ИПСК макак-резуса. Оказалось, что применение сред для культивирования ИПСК человека негативно влияет на плюрипотентный статус и пролиферативную способность ИПСК макак-резуса. Для решения данной проблемы проводится тестирование различных условий культивирования ИПСК макак-резуса.

*Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение № 075-15-2021- 1063 от 28.09.2021 г.*

## GENERATION AND MAINTENANCE RHESUS MACAQUE INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS

**A.S. Ryabchenko, V.K. Abdyev, E.A. Vorotelyak, A.V. Vasiliev**

*Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow*

Non-human primates are a convenient and reproducible model in areas such as regenerative and translational medicine, drug testing, disease research, and embryonic development. The rhesus macaque (*Macaca mulatta*) is one of the most common and accessible non-human primate species for research. In addition, rhesus macaques are phylogenetically close to humans and have less ethical and legal restrictions. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) are known to have the ability to differentiate into various cell types in the organism and are also a promising object for research. However, obtaining induced pluripotent stem cells from non-human primates is a difficult task, since these cells are less effectively reprogrammed than human cells and have different conditions for culturing and maintaining the state of pluripotency. Rhesus macaque adipose tissue-derived multipotent stem cells were reprogrammed with episomal vectors upon exposure to valproic acid and sodium butyrate. Colonies of cells with iPSC morphology were detected by day 17 of reprogramming, and the first colonies were selected on day 21 of reprogramming. Presumably, the use of histone deacetylase inhibitors increased the reprogramming efficiency. However, the next task to maintain rhesus macaque iPSCs in a pluripotent state. It turned out that the use of human iPSC culture medium affects the pluripotent state and proliferative capacity of rhesus macaque iPSCs. To address this issue, we are testing various culture conditions for rhesus macaque iPSCs.

*The work was performed with the financial support of a grant within the framework of the the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Agreement No. 075-15-2021-1063*



## ФУЗАРИОЗНОЕ УВЯДАНИЕ ЛЬНА: ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РАСТЕНИЯ–ХОЗЯИНА И ПАТОГЕНА

М. Самсонова<sup>1</sup>, А. Канапин<sup>1</sup>, Т. Рожмина<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург; <sup>2</sup>Федеральный научный центр лубяных культур, Торжок

Фузариозное увядание – одно из наиболее экономически опасных заболеваний льна. Возбудитель этой болезни – гриб *Fusarium oxysporum f. sp. lini* обладает строгой специфичностью к растению–хозяину, т.е. поражает только лен. Механизмы устойчивости льна к фузариозному увяданию до конца так и не поняты, хотя устойчивые сорта были получены путем селекции. Здесь мы применили анализ геномных данных, а также GWAS и BSA (совместный анализ сегрегантов), чтобы 1) выполнить сборку генома гриба на уровне хромосом и выявить его сложную организацию, 2) построить пангеном для оценки геномного разнообразия штаммов *Fusarium oxysporum f. sp. lini* и 3) картировать несколько генов устойчивости, идентифицированных ранее методами классической генетики, на рефересный геном льна. Мы обнаружили значительные хромосомные перестройки в индивидуальных геномах гриба. Более того, наше данные указывают на то, что изоляты *F. oxysporum f. sp. lini* используют различные факторы вирулентности при заражении, что позволяет им эффективно обходить защитные механизмы растения. Самое главное, наши результаты четко демонстрируют отсутствие взаимосвязи между содержанием генов *SIX*, кодирующих единственно экспериментально доказанный класс эффекторов у *Fusarium oxysporum*, и вирулентностью, что углубляет наше понимание роли генов *SIX* в патогенности. Однако анализ репертуара коровых и вспомогательных генов указывает на открытое состояние пангенома *F. oxysporum f. sp. lini* и подчеркивает важность дальнейших исследований, включающих секвенирование новых штаммов из разных географических регионов. Анализ пангенома *F. oxysporum f. sp. lini* и изучение его разнообразия – важный и обязательный первый шаг на пути к раскрытию механизмов, лежащих в основе взаимодействия гриба и льна, а также к разработке новых стратегий борьбы с фузариозным увяданием.

Благодарности. Работа поддержана грантом РФФ 23–16–00037.

## FUSARIUM WILT OF FLAX: A CASE STUDY OF THE PLANT–FUNGAL INTERACTION

M. Samsonova<sup>1</sup>, A. Kanapin<sup>1</sup>, T. Rozhmina<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Peter the Great Polytechnic University, St Petersburg; <sup>2</sup>Federal Research Center for Bast Crops, Torzhok

Fusarium wilt is one of the most dangerous flax diseases. The causative agent, a fungus *Fusarium oxysporum f. sp. lini* is one of the top fungal plant pathogens. It shows a strict specificity in choosing the host. The mechanisms of flax resistance to Fusarium wilt have never been fully understood, although resistance to the disease was developed by selection. Here we applied the analysis of genomics data, as well as GWAS and BSA to 1) perform chromosome-level assembly of the fungus genome, 2) construct the pangenome to assess the genomic diversity of *Fusarium oxysporum f. sp. lini* strains and 3) map several resistance genes identified previously by classical genetics methods to reference flax genome. We discovered significant chromosomal rearrangements that are specific to individual genomes. Moreover, our study provides strong support for the hypothesis that *F. oxysporum* isolates utilize different virulence factors during crop infection, allowing them to evade plant defense mechanisms efficiently. Most importantly, our findings clearly demonstrate no relationship between the *SIX* gene content and virulence, which enhances our understanding of the role of *SIX* genes in pathogenicity. However, analysis of the core and accessory pangenome gene repertoire of *Fusarium oxysporum f. sp. lini* indicates the open state of the genome and highlights the importance of further research that includes sequencing of new diverse strains from different regions. Charting the *Fusarium oxysporum f. sp. lini* pangenome blueprint and studying its diversity is an essential and imperative initial step towards uncovering the mechanisms that underlie plant-fungal interactions, and devising new strategies for controlling diseases.

Acknowledgements. This research was funded by the Russian Science Foundation, grant number 23–16–00037.

### ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ЖАСМОНАТНОЙ СИСТЕМЫ ПШЕНИЦЫ

**Т.В. Савченко<sup>1</sup>, Д.Н. Мирошниченко<sup>1,2</sup>, А.В. Пиголев<sup>1</sup>, Е.А. Дегтярев<sup>1</sup>, С.В. Долгов<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Пушчинский научный центр биологических исследований, Институт фундаментальных проблем биологии РАН;

<sup>2</sup>Филиал Института биоорганической химии РАН им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Пушкино

Защитные функции фитогормонов жасмонатов в условиях биотических и абиотических стрессов продемонстрированы на модельном растении *Arabidopsis thaliana* и многих сельскохозяйственных культурах. Накопленные в литературе данные говорят в пользу того, что стимулирование защитных ответов, регулируемых жасмонатами, может стать хорошей стратегией для повышения устойчивости растений. Для того, чтобы получить растения пшеницы с измененным содержанием жасмонатов мы трансформировали растения гексаплоидной и тетраплоидной пшеницы векторами для сверхэкспрессии ключевых генов пути биосинтеза жасмонатов, гена АЛЛЕНОКСИДСИНТАЗЫ, кодирующего локализованный в хлоропластах белок, и гена 12-ОКСОФИТОДИЕНОАТРЕДУКТАЗЫ, кодирующего локализованный в пероксисомах фермент. Сверхэкспрессия указанных генов привела к значительным изменениям фенотипа роста и устойчивости растений. Высота растений ряда трансгенных линий ниже нетрансгенных, их листья короче, эти трансгенные растения более устойчивы к воздействию низких температур и дефициту воды, но более чувствительны к действию некротрофных патогенов. Созданные трансгенные растения – ценный инструмент для выяснения особенностей функционирования жасмонатной системы у пшеницы.

*Работа поддержана Российским научным фондом грант № 22-16-00047.*

### GENETIC MODIFICATION OF THE JASMONATE SYSTEM OF WHEAT

**T.V. Savchenko<sup>1</sup>, D.N. Miroshnichenko<sup>1,2</sup>, A.V. Pigolev<sup>1</sup>, E.A. Degtyarev<sup>1</sup>, S.V. Dolgov<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Pushchino Scientific Center for Biological Research, Institute of Fundamental Problems of Biology, Russian Academy of Sciences;

<sup>2</sup>Branch of Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Pushchino

The protective functions of phytohormones jasmonates under biotic and abiotic stresses have been demonstrated in the model plant *Arabidopsis thaliana* and many agricultural crops. A growing body of evidence from the modern literature suggests that stimulating jasmonate-regulated defense responses may be an effective strategy for enhancing plant resistance. In order to obtain wheat plants with altered jasmonate content, we transformed hexaploid and tetraploid wheat plants with vectors for overexpression of key genes of the jasmonate biosynthesis pathway, specifically the ALLENE OXIDE SYNTHASE gene, which encodes a chloroplast-localized protein, and the 12-OXOPHYTODIENOATE REDUCTASE gene, which encodes an enzyme localized in peroxisomes. The overexpression of the aforementioned genes resulted in notable alterations in the phenotype, particularly in terms of plant growth and resistance. Several transgenic lines exhibited reduced plant height compared to the non-transgenic lines, accompanied by shorter leaves. These transgenic plants demonstrated enhanced resilience to low temperatures and water deficit but exhibited increased sensitivity to the necrotrophic pathogens. The transgenic plants developed are a valuable tool for elucidating the functioning of the jasmonate system in wheat.

*This work was supported by the Russian Science Foundation, project no. 22-16-00047.*

### ПЕПТИДОМ РАСТЕНИЙ – СЛОЖНАЯ И МНОГОКОМПОНЕНТНАЯ СИСТЕМА ПОДДЕРЖАНИЯ БАЛАНСА “РОСТ-СТРЕССОВЫЙ ОТВЕТ”

**А.С. Мамаева, И.С. Ляпина, Д.Р. Ганаева, Р.А. Азаркина, А.Н. Князев, Д.М. Харлампиева, А.А. Галыш, А.Д. Майборода, В.Н. Лазарев, Е.А. Рогожин, И.А. Фесенко**

*ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*

Пептиды— обширная группа преимущественно регуляторных соединений, контролирующих практически все аспекты существования живых организмов. Нативные пептидомы живых организмов – это многокомпонентная система, включающая фрагменты функциональных белков, пептидные гормоны, антимикробные пептиды и продукты трансляции коротких рамок считывания (кОРС). Однако выявление и функциональный анализ биологически активных пептидов – сложная и амбициозная задача, поскольку кОРС часто пропускаются при аннотации геномов, а также эндогенные пептиды плохо идентифицируются при использовании стандартных протеомных подходов. Целью нашего исследования является поиск семейств пептидов, участвующих в регуляции устойчивости растений к стрессовым факторам. Используя биоинформатические, транскриптомные, протеомные и пептидомные подходы, мы выявили спектр новых эволюционно-консервативных стресс-регулируемых пептидов, а также проанализировали функции известных пептидных семейств, таких как RALF, EPFL и PSY. Эволюционная консервативность таких пептидов указывает на высокую функциональную значимость, а исследование их роли у представителя отдела древнейших наземных растений – *Physcomitrium patens*, – может позволить провести аналогии, лежащие в основе поддержания баланса “рост-стрессовый ответ” у наземных растений. Дальнейший функциональный анализ компонентов пептидома растений выявил пептиды, участвующие в контроле скорости роста клеток, накопления активных форм кислорода, модуляции ответа на стрессовые факторы разной природы и обладающие антимикробной активностью. Таким образом, регуляторные пептиды – важный компонент системы контроля баланса между ростовыми процессами и защитными реакциями.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-74-10048).*

### PLANT PEPTIDOME IS A COMPLEX AND MULTICOMPONENT SYSTEM FOR BALANCING BETWEEN THE GROWTH AND STRESS RESPONSES

**A. Mamaeva, I. Lyapina, D. Ganaeva, A. Knyazev, R. Azarkina, D. Kharlampieva, A. Galysh, A. Maiboroda, V. Lazarev, E. Rogozhin, I. Fesenko**

*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow*

Peptides are a large group of mainly regulatory compounds that control all aspects of the existence of living organisms. Native peptidomes of living organisms are a multicomponent system that includes fragments of functional proteins, peptide hormones, antimicrobial peptides, and products of translation of short reading frames (sORFs). Identification and functional analysis of biologically active peptides is a complex and ambitious task, since sORFs are often missed during genome annotation, and endogenous peptides are poorly identified using standard proteomic approaches. The aim of our study is searching for peptide families involved in the regulation of plant stress resistance. Using bioinformatics, transcriptomics, proteomics and peptidomic approaches, we identified a spectrum of the new evolutionary conservative stress-regulated peptides and also analyzed the functions of known peptide families such as RALF, EPFL and PSY. The evolutionary conservatism of such peptides indicates a high functional significance, and the study of their role in a representative of the division of the most ancient land plants, *Physcomitrium patens*, may allow us to draw analogies underlying the maintenance of balancing between the growth and stress responses in land plants. Further functional analysis of the components of the plant peptidome revealed peptides involved in the control of cell growth rate, accumulation of reactive oxygen species, modulation of the response to stress factors and possessing antimicrobial activity. Thus, regulatory peptides are an important component of the system controlling the balance between growth processes and defense reactions.

*The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (project No. 23-74-10048).*

### **ФАГОТЕРАПИЯ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ: ДОСТИЖЕНИЯ, ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ**

**К.А. Мирошников, А.А. Лукьянова, А.Д. Токмакова**

*ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*

Фитопатогенные бактерии наносят значительный ущерб ключевым сельскохозяйственным культурам, снижая урожайность, качество и сохранность полученной продукции. Латентная инфекция часто приводит к полной непригодности зараженных семян для посева. Использование бактериофагов (вирусов бактерий) считается перспективным и экологически безопасным методом биологической защиты растений от бактериозов. Однако, в силу узкой специфичности действия бактериофагов, их применение требует точной диагностики целевых фитопатогенов и оптимизации формуляций и методов применения биопрепаратов. В представленном докладе рассмотрены успешные случаи применения препаратов бактериофагов для контроля бактериозов картофеля, зернобобовых культур и сои, вызванных бактериями родов *Pectobacterium*, *Pseudomonas* и *Curtobacterium*. В зависимости от характера инфекции и способа применения препарата на растениях достигается снижение бактериальной популяции ниже симптоматического предела и уменьшению частоты проявления и интенсивности симптомов бактериозов. Обсуждаются ключевые принципы поиска и описания индивидуальных бактериофагов и их коктейлей, компоновки препаратов с дополнительными активными веществами, их использование в различных биологических моделях, а также проблемы масштабирования производства и сертификации препаратов. При наличии коллекций предварительно охарактеризованных фагов и информации о преобладающих видах и штаммах фитопатогенов представляется возможным создание рациональных фаговых препаратов как для профилактического, так и терапевтического применения в растениеводстве.

### **PHAGE THERAPY FOR CROPS: PROGRESS, PROBLEMS AND PROSPECTS**

**K.A. Miroshnikov, A.A. Lukianova, A.D. Tokmakova**

*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow*

Phytopathogenic bacteria inflict a substantial damage to essential crops, reducing plant productivity, yield and quality of the harvest. Latent infections often disqualify the seed material. Implementation of bacteriophages (bacterial viruses) is considered as a prospective, safe and environmentally friendly method of biological protection of plants from bacterial diseases. However, because of narrow host range of the phages, their use requires precise diagnostics of the target pathogens and optimal formulations and application techniques of the preparations. The presentation reviews successful applications of the use of bacteriophage preparations to control bacterial diseases of potatoes, legumes and soybeans caused by *Pectobacterium*, *Pseudomonas* and *Curtobacterium*. Dependent on the infection type and method of application we have reached the reduction of bacterial population several orders of magnitude, below the symptomatic threshold, and limited the spread and severity of the disease. We discuss the key principles of the search and characterization of individual bacteriophages, their combination into phage cocktails, helpful additives, and their use in various biological models. Problems of production scaling and certification are also considered. The formation of the collection of preliminarily characterized bacteriophages and monitoring of circulating phytopathogenic strains can promote the construction of phage preparations suitable for preventive and therapeutic application in agriculture.

## СОВРЕМЕННЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ БОРЬБЫ С ПРОДУЦЕНТАМИ МИКОТОКСИНОВ

А.А. Стахеев, М.Э. Тальянский, С.К. Завриев

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

Микотоксины являются вторичными метаболитами грибов, опасными для здоровья человека и животных. Основными продуцентами микотоксинов являются грибы родов *Fusarium* и *Aspergillus*, способные к синтезу таких соединений, как афлатоксины, трихотечены, фумонизины, зезараленон, и некоторые другие. Потребление продуктов, загрязнённых микотоксинами, приводит к ингибированию биосинтеза белка у эукариот, а также к другим негативным эффектам. Афлатоксины и фумонизины являются канцерогенами, относимыми Международным агентством по изучению рака к 1 и 2 группам опасности, соответственно. Кроме того, микотоксины, прежде всего дезоксиниваленол (ДОН), являются факторами агрессивности гриба по отношению к растению-хозяину.

Экономическое и медицинское значение микотоксинов, а также заболеваний, вызываемых их продуцентами, делает необходимым разработку методов высокоэффективной борьбы с ними. Для реализации этих подходов необходима информация о видовом составе патогенов, присутствующих на той или территории, либо в конкретном образце. Для решения этих задач на основании данных мультилокусного филогенетического анализа грибов рода *Fusarium* и поиска полиморфных видоспецифических участков маркерных генов были разработаны высокочувствительные системы ПЦР-диагностики, позволяющие быстро и точно определять наличие ключевых продуцентов микотоксинов в образцах зерна. С помощью разработанных систем был проведён мониторинг зараженности образцов зерна из различных регионов России, определены наиболее часто встречающиеся виды. По результатам проведенного исследования впервые на территории России выявлены виды *Fusarium torulosum* и *F. coffeatum*. Для последнего вида впервые определена структура полного генома, а также показана способность к синтезу микотоксинов фумонизиновой группы. На основе современного метода подавления активности генов с помощью РНК-интерференции предложены подходы, позволяющие ингибировать экспрессию генов, связанных с биосинтезом микотоксинов и снижать накопление токсических метаболитов в среде.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 23-74-30003.*

## MODERN MOLECULAR TECHNOLOGIES TO COMBAT MYCOTOXIN PRODUCERS

A.A. Stakheev, M.E. Taliansky, S.K. Zavriev

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

Mycotoxins are secondary metabolites of fungi, dangerous to human and animal health. The main mycotoxin producers are fungi of *Fusarium* and *Aspergillus* genus, able to synthesize such compounds as aflatoxins, trichothecenes, fumonisins, zearalenone and others. Consumption of mycotoxin-contaminated products lead to protein synthesis inhibition in eukaryotes as well as to other negative effects. Aflatoxins and fumonisins are carcinogens, belonging to 1 and 2 danger groups, according to International agency for research on cancer. Moreover, mycotoxins, first of all deoxynivalenol (DON) are factors of aggressiveness of fungi against host plant.

Economic and medical significance of mycotoxins, as well as their producers-caused diseases, makes it necessary to develop highly efficient ways for combating them. To implement these approaches, the information on pathogens' species composition in a certain territory or in a sample is necessary. To address these tasks, high-sensitive PCR-based assays, based on the data of multilocus phylogeny and searching for species-specific fragments of marker genes, were developed. Using these assays, the monitoring of grains samples from different regions of Russia was performed, allowing to estimate the most widespread species. The species *F. torulosum* and *F. coffeatum* were identified in Russia for the first time. For the latter species, the first whole-genome sequence was obtained, and the ability to produce fumonisin mycotoxins was shown. Based on the modern method of gene silencing, the approaches to inhibit mycotoxin biosynthesis-related gene expression and decrease toxin accumulation in a media.

*The research was carried out with support of Russian Science Foundation (grant # 23-74-30003)*

#### ЭФФЕКТИВНОЕ МУЛЬТИАЛЛЕЛЬНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР

Д.Н. Мирошниченко<sup>1,2</sup>, В.Р. Тимербаев<sup>1,2</sup>, М.Г. Дивашук<sup>2</sup>, А.С. Пушин<sup>1,2</sup>, В.В. Алексеева<sup>1</sup>, В.И. Дегтярева<sup>1</sup>,  
О.А. Шульга<sup>2</sup>, М. Самарина<sup>2</sup>, А. Ермолаев<sup>2</sup>, П.Ю. Крупин<sup>2</sup>, Г.И. Карлов<sup>2</sup>, С.В. Долгов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Филиал ГНЦ ФГБНУ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино;

<sup>2</sup>Курчатовский геномный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва

Редактирование генома растений путем внесения специфических модификаций ДНК, таких как замена, вставка или делеция нуклеотидов или отдельных последовательностей, может ускорить создание новых форм и сортов сельскохозяйственных культур. С использованием CRISPR/Cas9 подхода нами успешно разработана биотехнология редактирования генома полиплоидных зерновых культур – полбы, пшеницы и тритикале, потребность в которой растет с каждым годом, как в России, так и за рубежом. После баллистической доставки полицистронных векторов в морфогенные клетки, нами получены растения, несущие единичные и множественные целевые мутации в последовательностях генов тритикале и пшеницы, участвующих в формировании крахмала зерна злаков, а именно GBSSI (гранулированная синтаза крахмала), SBEIIa (фермент ветвления крахмала), SSIIa (синтаза крахмала), ISAI (фермент разветвления крахмала изоамилазы) и RSR1 (регулятор синтеза крахмала 1). Наличие различных типов мутаций, включая моно- и биаллельные варианты, а также одновременное редактирование двух, трех и четырех целевых генов подтверждено генотипированием с помощью методов NGS (Next-Generation Sequencing) и HRFA (High-Resolution Fragment Analysis). В зависимости от используемого набора гидовых РНК, эффективность редактирования субгеномных (AA, BB и RR) гомологов целевых генов варьировала от 25 до 46%. Используя трио гидовых РНК для каждого целевого гена, мы успешно получили панель новых мутаций, не описанных у сортов пшеницы и тритикале ранее.

Полученные нами растения являются перспективными донорами для селекционного пирамидирования нокаутных генов участвующих в биосинтезе крахмала, с целью создания сортов пшеницы и тритикале, обладающих коммерческим потенциалом, с измененным составом крахмала в зерне.

#### EFFICIENT TARGETED MULTIALLELIC GENOME EDITING OF POLYPLOID CEREALS

D. Miroshnichenko<sup>1,2</sup>, V. Timerbaev<sup>1,2</sup>, M. Divashuk<sup>2</sup>, A. Pushin<sup>1,2</sup>, V. Alekseeva<sup>1</sup>, V. Degtyaryova<sup>1</sup>, O. Shulga<sup>2</sup>,  
M. Samarina<sup>2</sup>, A. Ermolaev<sup>1</sup>, P. Kroupin<sup>2</sup>, G. Karlov<sup>2</sup>, S. Dolgov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Pushchino;

<sup>2</sup>All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow

Editing the plant genome by introducing specific DNA modifications, such as substitution, insertion or deletion of nucleotides, can accelerate the breeding of new varieties of agricultural crops. Using the CRISPR/Cas9 approach, we have successfully developed biotechnological protocols for genome editing of polyploid cereals crops, such as emmer wheat, common wheat and triticale, highly demanded every year, both in Russia and abroad. After biolistic delivery of polycistronic vectors to morphogenic cells, we obtained plants carrying single and multiple target mutations in triticale and wheat genes, which involved in the cereal grain starch biosynthesis, namely granule bound starch synthase (GBSSI), starch synthase (SSIIa), starch debranching enzyme (isoamylase, ISAI), starch regulator 1 (RSR1) and starch branching enzyme (SBEIIa). The presence of various types of mutations, including mono- and biallelic variants, as well as simultaneous editing of two, three and four target genes was confirmed by genotyping using NGS and HRFA. Depending on the set of guide RNAs applied, the editing efficiency of target genes located in various subgenomes (AA, BB and RR) varied from 25 to 46%. Using a trio of guide RNAs for each target gene, we successfully obtained a panel of new mutations that have not been described in wheat and triticale varieties previously.

The genome edited plants we obtained are promising donors for pyramiding of knockout genes involved in starch biosynthesis in order to breed wheat and triticale varieties with commercial potential that exhibit altered starch composition in grain.

**ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ФИТОГОРМОНОВ НА БИОСИНТЕЗ И РОСТОВЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ:  
РОЛЬ МИКРОБИОМА И НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА В ПРОЦЕССЕ ИНДУКЦИИ.**

**Т.А. Козлова, А.В. Карташев, А. Крапивина, П. Зайцев, О.В. Чивкунова, К. Скарилкина, А.Е. Соловченко**

*Тамбовский государственный университет им. Г.Р. Державина, Тамбов*

Экзогенные фитогормоны, включая абсцизовую кислоту (АВА) и 3-индолуксусную кислоту (ИАА), в концентрациях, соответствующих концентрациям в сточных водах гидропоники, зарекомендовали себя как сильные индукторы продуктивности биомассы микроводорослей и биосинтеза ценных молекул. Основной целью данного исследования была оценка влияния фитогормона АВА на физиологию *C. zofingiensis* в неасептическом периодическом эксперименте. АБК одновременно стимулировала деление клеток *C. zofingiensis*, производство биомассы, а также биосинтез хлорофилла, каротиноидов и липидов. Зависимость между концентрацией экзогенной АБК и величиной наблюдаемых эффектов была нелинейной, за исключением роста клеток и образования биомассы. Накопление жирных кислот и их состав зависели от тестируемой концентрации АБК. Метагеномный анализ показал, что экзогенная АБК вызвал внушительные изменения в основных компонентах микробиома культуры *C. zofingiensis*. Так, численность представителей рода *Rhodococcus* резко возрастала с увеличением концентрации АВА, тогда как численность представителей родов *Reyranella* и *Bradyrhizobium* снижалась. Также было исследовано влияние наночастиц серебра отдельно и совместно с гормоном на физиологию микроводоросли *Scenedesmus rubensis*. Наши данные указывают на влияние наночастиц на физиологию микроводорослей, а также на индукционную активность ИУК. Однако, необходимы дополнительные исследования комбинированного действия наночастиц и фитогормонов.

**THE EFFECT OF EXOGENOUS PHYTOHORMONES ON THE BIOSYNTHESIS AND GROWTH PARAMETERS OF MICROALGAE:  
THE INFLUENCE OF THE MICROBIOME AND SILVER NANOPARTICLES ON THE INDUCTION PROCESS**

**T.A. Kozlova, A.V. Kartashov, A. Krapivina, P. Zaytsev, O.B. Chivkunova, K. Skarilkina, A.E. Solovchenko**

*G.R. Derzhavin Tambov State University, Tambov*

Exogenous phytohormones, including abscisic acid (ABA) and 3-indole acetic acid (IAA), at concentrations relevant to that in hydroponic wastewater, have proven themselves as strong inducers of microalgae biomass productivity and biosynthesis of valuable molecules. The main goal of this research was to evaluate the influence of phytohormone ABA on the physiology of *C. zofingiensis* in a non-aseptic batch experiment. ABA simultaneously stimulated *C. zofingiensis* cell division, biomass production, as well as chlorophyll, carotenoid, and lipid biosynthesis. The relationship between exogenous ABA concentration and the magnitude of the observed effects was non-linear, with the exception of cell growth and biomass production. Fatty acid accumulation and composition depended on the concentration of ABA tested. Metagenomic Analysis revealed that exogenous ABA induced spectacular changes in the major components of the culture microbiome of *C. zofingiensis*. Thus, the abundance of the representatives of the genus *Rhodococcus* increased drastically with an increase in ABA concentration, whereas the abundance of the representatives of *Reyranella* and *Bradyrhizobium* genera declined. The effect of silver nanoparticles separately and together with the hormone on the physiology of the microalgae *Scenedesmus rubensis* was also studied. Our data indicate the influence of nanoparticles on the physiology of microalgae, as well as on the induction activity of IAA. Although more research on the co-influence of NPs and phytohormones are needed.

#### ПРОТЕОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ДЛЯ КОНТРОЛЯ СОСТАВА ТРАВЯНЫХ СМЕСЕЙ

И.К. Чудинов<sup>1,2</sup>, А.В. Лукина-Гронская<sup>1</sup>, Д.А. Петухова<sup>1</sup>, В.Д. Гремячева<sup>1</sup>, А.А. Креницына<sup>3</sup>, М.И. Антипин<sup>3</sup>,  
Е.В. Корнеенко<sup>1</sup>, И.О. Бутенко<sup>1</sup>, А.С. Сперанская<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва; <sup>2</sup>Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный; <sup>3</sup>МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

Производственная фальсификация состава продуктов питания может приводить к неблагоприятным последствиям для человека, поэтому важно развивать методы контроля качества и состава продуктов питания. Признанным методом определения биологических компонентов является высокопроизводительное секвенирование генетических маркеров (ДНК-баркодов). Для идентификации видов растений чаще всего используют внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS1 и ITS2), но деградация нуклеиновых кислот и различия в GC-составе последовательности ITS могут приводить к неверной оценке представленности компонент. Протеомный анализ проб на наличие белков организмов, выявленных при анализе данных секвенирования ДНК-баркодов, предположительно, можно использовать для подтверждения выводов.

В настоящей работе были проанализированы 8 фиточаев российских производителей, в составе которых был заявлен Иванчай (Кипрей узколистный, *Chamaenerion angustifolium*), популярное растение, которое широко используется для приготовления травяных напитков. Ранее было показано, что Иванчай может подвергаться фальсификации, путем замены на *Lythrum salicaria* (Дербенник иволистный), который является лекарственным растением и имеет ряд противопоказаний к применению.

По результатам анализа последовательностей ITS1 и ITS2 (с применением секвенирования второго поколения, MGI), у половины образцов были выявлены значительные расхождения с составом, заявленным производителем. В 2 из 8 проанализированных травяных напитков был выявлен *L. salicaria*. Для подтверждения выводов и сравнения использовали также секвенирование на Oxford Nanopore Technologies. Результаты, полученные методами секвенирования, подтвердили с помощью панорамного протеомного анализа. Идентификация проводилась против вырожденного набора белков хлоропластов, соответствующих таксономическим группам, определенным по результатам метагеномного анализа. Выводы, полученные с помощью молекулярных методов, были подтверждены с помощью классического морфологического анализа.

Таким образом, гибридный метод идентификации биологических компонент путем секвенирования ДНК-баркодов с последующим протеомным анализом можно признать перспективным направлением для определения фальсификатов в продуктах питания.

Работа выполнена в рамках государственного задания No. 12203090069-4.

#### PROTEOGENOMIC ANALYSIS FOR CONTROLLING THE COMPOSITION OF HERBAL MIXTURES

I.K. Chudinov<sup>1,2</sup>, A.V. Lukina-Gronskaya<sup>1</sup>, D.A. Petukhova<sup>1</sup>, V.D. Gremyacheva<sup>1</sup>, A.A. Krinitsina<sup>3</sup>, M.I. Antipin<sup>3</sup>,  
E.V. Korneenko<sup>1</sup>, I.O. Butenko<sup>1</sup>, A.S. Speranskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Institute for Systems Biology and Medicine; <sup>2</sup>Moscow Institute of Physics and Technology; <sup>3</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow

It is important to develop methods to control the quality and composition of food products because fraudulent production of food components can have serious adverse effects on human health. High-throughput sequencing of genetic markers (DNA barcodes) is an accepted method for the identification of biological components. Internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) are most commonly used to identify plant species, but nucleic acid degradation and differences in GC composition of the ITS sequence can lead to incorrect estimation of component representation. Proteomic analysis of samples for proteins of organisms identified by analysis of DNA barcode sequencing data can presumably be used to confirm the conclusions.

In the present study, 8 phytoteas from Russian manufacturers were analyzed and claimed to contain Ivan tea (Cypress narrow-leaved, *Chamaenerion angustifolium*), a popular plant widely used for herbal beverages. It has previously been shown that Ivan-tea can be adulterated by replacing it with *Lythrum salicaria* (Derbennik willow-leaved), a medicinal plant with a number of contraindications for use.

Based on the results of ITS1 and ITS2 sequence analysis (using second-generation sequencing, MGI), half of the samples showed significant discrepancies with the composition declared by the manufacturer. *L. salicaria* was detected in 2 of the 8 herbal beverages analyzed. Sequencing at Oxford Nanopore Technologies was also used for confirmation and comparison. The results obtained by sequencing were confirmed by panoramic proteomic analysis. Identification was performed against a degenerate set of chloroplast proteins corresponding to the taxonomic groups determined by metagenomic analysis. The conclusions obtained by molecular methods were confirmed by classical morphological analysis.

Thus, the hybrid method of identification of biological components by sequencing of DNA barcodes followed by proteomic analysis can be recognized as a promising direction for the detection of adulterants in food products.

Supported by state project No. 12203090069-4.



#### АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКИ-АКТИВНЫХ МЕТАБОЛИТОВ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ МЕТОДАМИ ИЗОТОПНОГО ОБМЕНА СОВМЕСТНО С ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЕЙ

А.И. Вишневская, А.А. Башилов, С.В. Осипенко, А.Ф. Киреев, Ю.И. Костюкевич

Сколковский институт науки и технологий, Москва

Растения и водоросли – это уникальные фабрики, производящие широкий спектр химических веществ, включая биологически активные вторичные метаболиты. В прошлых работах была показана возможность использования комбинации высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией высокого разрешения (ВЭЖХ-МС) и введением стабильных изотопных меток  $^{18}\text{O}$  и  $\text{D}$  для изучения метаболизма в растительных организмах.<sup>1</sup> В этой работе мы демонстрируем, что этот подход также эффективен не только изучения высших растений, но и цианобактериальных микроводорослей.

Использование масс-спектрометрии с изотопным обменом позволяет идентифицировать вещества с помощью как ВЭЖХ-МС, так и газовой хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ-МС). В микроводорослях мы обнаружили широкий спектр метаболитов, включая жирные кислоты, изопреноиды, сахара и аминокислоты. В частности, используя методы газовой хроматографии нашлось более 95 различных соединений, продуцируемых цианобактериальной микроводорослью *Leptolyngbya* sp. (IPPAS B-1204), а интерпретация масс-спектров найденных молекул позволила определить предположительные места вхождения изотопной метки в молекулу, что позволяет изучать пути биосинтеза и скорость метаболизма разных соединений. Данный подход, дополняющий геномные данные, особенно ценен при изучении малоизученных организмов. В будущем планируется использовать этот метод для исследования других биологических объектов, являющихся источниками биологически активных веществ.

1. Osipenko Set al. Investigating the metabolism of plants germinated in heavy water,  $\text{D}_2\text{O}$ , and  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ -enriched media using high-resolution mass spectrometry. *Int J Mol Sci.* 2023, 24(20): 15396.

#### ANALYSIS OF BIOLOGICALLY ACTIVE METABOLITES OF MICROALGAE BY ISOTOPE LABELED METHODS IN CONJUNCTION WITH CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

A.I. Vishnevskaya, A.A. Bashilov, S.V. Osipenko, A.F. Kireev, Yu.I. Kostyukevich

Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow

Plants and algae are unique factories that produce a wide range of chemicals, including biologically active secondary metabolites. Previous studies have shown the possibility of using a combination of high-performance liquid chromatography with high-resolution mass spectrometry (HPLC-MS) and the introduction of stable isotope labels  $^{18}\text{O}$  and  $\text{D}$  to study metabolism in plant organisms.<sup>1</sup> In this work, we demonstrate that this approach is also effective not only in studying higher plants, but also cyanobacterial microalgae.

The use of isotope exchange mass spectrometry makes it possible to identify substances using both HPLC-MS and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). In microalgae, we found a wide range of metabolites, including fatty acids, isoprenoids, sugars and amino acids. In particular, using gas chromatography methods, more than 95 different compounds produced by the cyanobacterial microalgae *Leptolyngbya* sp were found. (IPPAS B-1204), and the interpretation of the mass spectra of the found molecules made it possible to determine the estimated places of entry of the isotope label into the molecule, which makes it possible to study the pathways of biosynthesis and the metabolic rate of various compounds. This approach, which complements genomic data, is especially valuable in the study of poorly studied organisms. In the future, it is planned to use this method to study other biological objects that are sources of biologically active substances.

1. Osipenko Set al. Investigating the metabolism of plants germinated in heavy water,  $\text{D}_2\text{O}$ , and  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ -enriched media using high-resolution mass spectrometry. *Int J Mol Sci.* 2023, 24(20): 15396.

## ЭНДОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ ФИТАСПАЗЫ РАСТЕНИЯ *NICOTIANA BENTHAMIANA* И СООТВЕТСТВУЮЩИЕ ЕЙ БЕЛКИ А.И. Барсукова, С.В. Трусова

Университет МГУ-ППИ в Шэньчжэне, Шэньчжэнь, Китай

Защитные механизмы растений определяют их восприимчивость или устойчивость к неблагоприятным факторам, таким как заражение патогенами, нападение растительноядных насекомых, засуха, жара, засоление. Молекулярно-биологические аспекты этих механизмов являются объектом пристального интереса современной молекулярной биологии растений. Одной из таких защитных молекул является белок фитаспаза, растительная протеаза, принадлежащая семейству субтилизин-подобных протеаз. Фитаспазы идентифицированы и охарактеризованы для таких растений, как табак (Chichkova, 2010), рис (Chichkova, 2010), томат (Reichardt, 2020), арабидопсис (Chichkova, 2018). Мы поставили цель идентифицировать фитаспазу растения *Nicotiana benthamiana*, которое является одним из модельных организмов в молекулярной биологии растений и в то же время выступает перспективной платформой для биотехнологических применений. Известные экспериментальные данные о наличии протеазной активности, характерной для фитаспаз, в листьях *N. benthamiana* (Trusova, 2019), и биоинформатический анализ генома этого растения (Kourelis, 2019) позволяют нам заключить, что фитаспазы бентамианы существуют, но недостаточно изучены. В данной работе мы связываем активность эндогенной фитаспазы бентамианы с соответствующим ей белком. Для этого мы выделили из листьев бентамианы пептидазную (протеазную) активность, распознающую мотив VEID во флуорогенном пептидном субстрате. После нескольких этапов очистки препарат белка был проанализирован методом масс-спектрометрии. Также мы изучили некоторые свойства этого фермента, такие как субстратные предпочтения, pH-оптимум, олигомерная структура. Оказалось, что по субстратной специфичности фитаспаза бентамианы близка к ранее охарактеризованной фитаспазе табака, и так же, как фитаспаза табака, не формирует димеры. Однако экспериментально найденная молекулярная масса фитаспазы из листьев *N. benthamiana* оказалась выше расчетной, что может быть указанием на посттрансляционные модификации белка и открывает простор для дальнейших исследований.

Результаты настоящего исследования были получены при финансовой поддержке Правительства г. Шэньчжэня и Университета МГУ-ППИ в Шэньчжэне.

1. Chichkova et al. *EMBO J.* 2010, 296: 1149-1161.
2. Chichkova et al. *Funct Plant Biol.* 2018, 452: 171-179.
3. Kourelis et al. *BMC Genomics* 2019, 20: 722.
4. Reichardt et al. *Science* 2020, 3676485: 1482-1485.
5. Trusova et al. *Front Plant Sci.* 2019, 10: 873.

## ENDOGENOUS PHYTASPASE ACTIVITY AND CORRESPONDING PROTEINS FROM *NICOTIANA BENTHAMIANA* LEAVES A. Barsukova, S. Trusova

Shenzhen MSU-BIT University, Shenzhen, China

Plant defense mechanisms provide their resistance or susceptibility to various unfavorable factors, such as viral or agrobacterial infections, herbivorous insect attacks, drought, heat, and salinity; molecular biological aspects of these mechanisms are the central point of attention of modern plant molecular science. One such defense molecule is phytaspase, a plant protease with apoplasmic localization under normal conditions, which belongs to the family of subtilisin-like proteases. Phytaspases of various plants have been previously characterized, e.g. for tobacco (Chichkova, 2010), rice (Chichkova, 2010), tomato (Reichardt, 2020), and arabidopsis (Chichkova, 2018). Here, we aimed to purify and characterize the phytaspase of the plant *Nicotiana benthamiana*, which is the model organism in plant molecular biology and, at the same time, is a promising platform for biotechnological applications. Known experimental data on characteristic phytaspase activity in *N. benthamiana* leaves (Trusova, 2019) and bioinformatics analysis of this plant genome (Kourelis, 2019) allow us to conclude that *N. benthamiana*'s phytaspases do exist but have been insufficiently studied. In the current, we relate the activity of endogenous *N. benthamiana*'s phytaspase and the belonging protein. We isolate and purify the endogenous peptidase (protease) activity that specifically hydrolyses the VEID motif in the peptide fluorogenic substrate. After several purification steps, the protein preparation is analyzed by mass spectrometry. We also study some properties of this enzyme, such as substrate preferences, pH optimum, and oligomeric structure. It turned out that *N. benthamiana*'s phytaspase is similar to the previously characterized tobacco phytaspase in substrate specificity and, like tobacco phytaspase, it does not form dimers. However, the found molecular weight of *N. benthamiana*'s phytaspase was higher than the calculated one, which may indicate post-translational modifications of the protein and opens the scope for further research.

The reported study was funded by Shenzhen Municipal Government and Shenzhen MSU-BIT University

1. Chichkova et al. *EMBO J.* 2010, 296: 1149-1161.
2. Chichkova et al. *Funct Plant Biol.* 2018, 452: 171-179.
3. Kourelis et al. *BMC Genomics* 2019, 20: 722.
4. Reichardt et al. *Science* 2020, 3676485: 1482-1485.
5. Trusova et al. *Front Plant Sci.* 2019, 10: 873.



## НАБОРЫ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

- ИНФЕКЦИИ ПЕРЕДАЮЩИЕСЯ ПОЛОВЫМ ПУТЁМ (ИППП)
- ДИСБИОЗЫ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА
- ВПЧ
- ГЕРПЕС – ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ
- ВИРУСНЫЕ ГЕПАТИТЫ
- ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА
- БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ИНФЕКЦИИ РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА
- НЕЙРОИНФЕКЦИИ
- ИНФЕКЦИИ ЖКТ
- ГЕНЫ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ
- АНАЭРОБНЫЕ ИНФЕКЦИИ
- ГЕНЕТИКА ЧЕЛОВЕКА
- ПИЩЕВАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ
- ВЕТЕРИНАРИЯ



Вдохновляем  
на научные  
открытия!



SkyGen

8(800)333-12-26  
sales@skygen.com



## АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Абасов Р.Х. 133, 134  
Абдраймова Н.К. 201  
Абдрахманова И.И. 239  
Абдулхаков С.Р. 217  
Абдыев В.К. 398  
Аблеев А.Н. 112  
Абрамов А. 268  
Авдеев Д.В. 363  
Авдеева А.С. 228  
Аверина О.А. 10  
Аверинская Д. 170  
Аверьянов А. 169  
Агапкина Ю.Ю. 136  
Агафонова М.Н. 45  
Агеевец В.А. 200  
Адаманская Е.-И. 234, 235  
Ажикина Т.Л. 157  
Азаркина Р.А. 401  
Азев В.Н. 253  
Акбердин И.Р. 23  
Акимкин В.Г. 204, 321, 354  
Акимов С.А. 275  
Акимова Д.Б. 122  
Аксенова Т.А. 101  
Алекберова А. 255  
Алексанкин А.П. 228  
Алексеева В.В. 404  
Алексеев И.В. 39  
Алексенко М.Ю. 134  
Алесенко А.В. 241  
Алехина О.М. 35  
Алехнович А.В. 199  
Алешина Ю.А. 193  
Алешкин А.В. 199  
Алиева С. 289  
Алиева С.Э. 295  
Алфёрова В.А. 189, 368  
Альтман И.Б. 310  
Аляева А.Г. 293  
Амстиславская Т.Г. 284, 383  
Анацкая О.В. 181  
Андреев Я.А. 247  
Андреева Е.Н. 176, 183  
Андреева Л.А. 357, 361, 366  
Андрейцев В.В. 282  
Андрианова А.Г. 350  
Анисенко А.Н. 136  
Анисимова К.А. 153  
Анохин К.В. 381  
Антипин М.И. 406  
Антонов И. 126  
Антонов И.В. 135  
Антонова О.В. 110  
Антропов Д.Н. 64  
Ануфриев В.С. 295  
Ануфриева К.С. 19, 164, 225, 226, 238
- Анучина А.А. 269  
Апполонова С.А. 74, 114, 118  
Апт А.С. 157  
Арапиди Г.П. 15, 19, 21, 35, 38, 56, 164, 225, 226, 232, 238, 242, 288, 298, 299  
Арбатский М.С. 285  
Арбузова Т.В. 198  
Арзуманян В.А. 100, 137, 147, 168  
Арзуманян Л.К. 288  
Аристова А.О. 216  
Арсеньев А. 324  
Артамонов А.Ю. 365  
Артеменко Е.О. 34  
Архипова А.Л. 191  
Арчаков А.И. 94, 106, 112, 113, 117, 184  
Афонников Д.А. 17, 33  
Афошин А.С. 349  
Ахременко Д.Д. 307  
Ашихмин А.А. 347
- Бабайлова Е.С. 271  
Бабаков В.Н. 54  
Бабенко В. 148  
Багиров Р.Г. 352  
Багрянская Е.Г. 392  
Баженов С.В. 58  
Бажутов Ф.Р. 377  
Байгазиева Д.А. 231, 241  
Байдакова Л.К. 253  
Баймеева Н.В. 360  
Баймухаметов Т.Н. 347  
Байне М.С. 229  
Байрамова Д.О. 304  
Бакаева З.В. 357, 387  
Балакин К.В. 42, 50  
Балакирева А. 255  
Балан О.В. 211  
Баландин Д.Е. 285  
Баландина А.И. 352  
Балашова Е.Е. 113, 117  
Балбек К.Д. 70  
Балобанов В.А. 282, 313  
Балыкова А.Н. 202  
Баранова А.А. 189  
Барановский Д.С. 178  
Бардашева А.В. 213  
Баринов Н. 289  
Барсукова А.И. 408  
Басалова Н.А. 285  
Басханова С.Н. 118  
Батищев О.В. 274, 277, 278  
Батоцыренова Е.Г. 362  
Бачева А.В. 90  
Башарова К.С. 48  
Башилов А.А. 119, 152, 407
- Башкиров П.В. 25, 276  
Баюрова Е.О. 196  
Бедрицких К.С. 256  
Безбородова О.А. 39  
Безпалая Е.Ю. 316  
Безрукова А.И. 48  
Бекбаева И.В. 164, 232  
Белицкая Е.Д. 328  
Белобородова Н.В. 115  
Белов А.К. 375  
Белогуров А.А. 170, 280  
Белозерова О.А. 255  
Белокопытова П. 123, 124  
Белоусов А.С. 61  
Белухина С. 94  
Белько Н.В. 59  
Беляева Е. 123  
Березина Н.Я. 130  
Берзина М.Я. 253  
Берулава Е.Т. 153  
Бершацкий Я.В. 35  
Беспярых Д.А. 201  
Биджиева М.С. 214  
Бизюкова Н.Ю. 81, 195  
Бизяев С.Н. 51, 213  
Билан Д.С. 385, 386  
Блохин В.Е. 241  
Бобков Д. 219  
Бовин Н.В. 111  
Богатырева Н.С. 77, 309  
Богачев М. 190, 219  
Богданов А.А. 56  
Богданов М.А. 311  
Богомазова А.Н. 21, 382  
Богомоллов П.О. 196  
Богомякова М.Е. 299  
Богословская О.А. 151  
Бойко К.М. 257, 347, 348  
Бокша И.С. 297, 317  
Болдин А.А. 74  
Болдова А.Е. 281  
Болихова А.К. 10  
Болихова А.К. 138, 351  
Болосов И.А. 252  
Большаков М.А. 347  
Бондаренко Е.В. 101, 116  
Боненбергер Г. 229  
Бордиян В.В. 319  
Бородай Ю.Р. 108  
Бородина С.О. 284  
Борозденко Д.А. 373  
Борушко Н. 68  
Борщевский В. 324, 390, 394  
Ботрос М.А.Ф. 365  
Боцманов Е.И. 130  
Бочаров Г.А. 16

- Бочаров Э.В. 35, 263, 274, 332  
Бочкова Ж.В. 315  
Бояркин Д.П. 387  
Боярских У. 123  
Боярчук Н.Г. 133  
Браже А.Р. 386  
Браже Н.А. 315, 386  
Бражников М.Ю. 103  
Брезгин С.А. 196  
Бржозовский А.Г. 102, 139, 160, 167, 169  
Британова О.В. 237  
Брылёв В.А. 368  
Бугрова А.Е. 102  
Бугрова А.Е. 139, 160, 169  
Буеверов А.О. 196  
Бужилова А.П. 130  
Букатин А.С. 112  
Булгаков Т.К. 266  
Булыгин А.А. 256  
Булыгин К.Н. 271  
Бунеева О.А. 286  
Буракова Е.А. 51, 213  
Бурдаков В.С. 62, 273  
Буренина О.Ю. 251  
Бурнакова Н.А. 115  
Бурова О.С. 308  
Бурцев М. 124  
Бурцева А.Д. 347  
Бутенко И.О. 25, 27, 90, 101, 166, 216, 280, 406  
Бутузова Д.А. 285  
Бутылин А.А. 361  
Буян А.И. 10, 138  
Быков А.А. 386  
Быченко О.С. 157  
Бычков М.Л. 308, 384
- Вавилов Н.Э. 94, 108  
Валиев Э. 123  
Варижук А.М. 289, 290, 295, 394  
Варфоломеева Л.А. 257, 348  
Василевский А.А. 359  
Василевский Д.И. 153  
Васильев А.В. 398  
Васильева Е.А. 25, 27  
Васильева Н.В. 349  
Васильева О.С. 45, 55  
Васипов В.В. 120  
Васкан И.С. 333, 335  
Ваулин Н.В. 112  
Вахитова Ю.В. 356  
Вахрушев И.В. 137, 168  
Введенский А.В. 75  
Ведехина Т.С. 289, 295  
Вепхвадзе Т.Ф. 108, 109  
Верлов Н.А. 62, 273  
Веселовский В.А. 15, 148, 154, 298  
Виговский М.А. 108, 285  
Вигонт В.А. 382  
Викляйн Д. 229
- Виноградов А.Е. 181  
Виноградова А.В. 112  
Виноградова Д.С. 140  
Винокуров А. 268  
Вирысов М.Б. 251  
Вишневская А.И. 152, 407  
Владимирова Е.В. 365  
Владыкина М.В. 246  
Власов А.В. 58, 269  
Влодавер А. 350  
Водопьянова Е.В. 279  
Водясова Е.А. 31  
Войтенко Д.А. 82  
Войцеховский И.В. 171, 355  
Волков В.В. 397  
Волков И.Ю. 307  
Волницкий А.В. 62  
Воловик М.В. 274, 277  
Вологжанникова А.А. 22  
Володин В.В. 196  
Волынкина И.А. 377  
Вольпина О. 268  
Воробьева Н.Н. 316  
Воронина А.К. 15  
Воронина А.К. 299  
Воронина В.С. 297  
Воронина Е.В. 375  
Воронина Т.А. 47  
Воротеляк Е.А. 398  
Вржещ П.В. 353  
Высоких М.Ю. 90  
Вьюнова Т.В. 361  
Вяхирева Ю.В. 122
- Габибов А.Г. 222, 280  
Гаврилова С.И. 102  
Гавшина А.В. 306  
Галатенко А. 230  
Галатенко В. 230  
Галыш А.А. 401  
Гальянова М.С. 365  
Ганаева Д.Р. 401  
Гао Ч. 213  
Гаптулбарова Е.А. 224  
Гараева Л.А. 60, 62  
Гарбузинский С.А. 322  
Гарибова Л.А. 165  
Гасанов М.Т. 362  
Гаспарян М.Э. 314  
Гаур С. 234  
Генатуллина А.И. 158  
Генерозов Э.В. 109  
Георгиев П.Г. 291  
Георгиева С. 8  
Герашенко Т.С. 159  
Гетте М.С. 58  
Гецина М.Л. 206  
Гифер П.К. 274  
Гладилина Ю.А. 318  
Гладких А.С. 198
- Гладких И.Н. 248, 249  
Глухарев А.Ю. 319  
Глущенко Н.Н. 151  
Говорун В.М. 15, 19, 25, 27, 29, 32, 35, 36, 38, 90, 177, 225, 232, 238, 280, 298, 303  
Гондаренко Е.А. 262  
Гончаров А.О. 225, 238  
Гончаров А.О. 56, 167  
Гончаров М.М. 324, 357  
Гончарук С. 324  
Гопаненко А.В. 144, 271  
Гоптарь И.А. 196  
Горбунов К.С. 101, 177, 179  
Горбунов К.С. 78  
Горбунова Ю.Н. 228  
Гордейчук И.В. 196  
Городилова А.В. 239  
Горонкова О.В. 133  
Горшков А.В. 151  
Горшков М.В. 99, 105, 145, 165  
Горшкова Ю.Е. 330  
Государкина С.Н. 159  
Готтих М.Б. 137  
Грайфер Д.М. 271, 392  
Грамматикова Н.Е. 279  
Грановский Д.Л. 371  
Грачев А.А. 62  
Гребенников Д.С. 16  
Гремячева В.Д. 101, 166, 406  
Грехнев Д.А. 382  
Грибкова А.К. 327  
Григорьев А.С. 157  
Григорьева Е. 123  
Григорьева М.Г. 366  
Григорьева О.А. 108  
Григорьева О.А. 285  
Григорьева Т.В. 156, 217  
Гридина М. 26, 123  
Гриненко Т.С. 220  
Грицева А.С. 198  
Гришин А.С. 338  
Грушина В.А. 141  
Грюк А.О. 375  
Грядунов Д.А. 110  
Губани Д. 170  
Гудашева Т.А. 47, 267, 293, 356  
Гужова И.В. 60  
Гуляк Е.Л. 368, 370  
Гуржиханова М.Х. 126, 133, 134  
Гуров С.А. 210  
Гурский В.В. 395  
Гутнер У.А. 241  
Гуща Е.А. 397  
Гущин И.Ю. 20, 269, 323  
Гущина А. 350
- Давитадзе М.С. 175  
Давлетшин Э.Ф. 396  
Давыденко К.А. 122

- Дадаян А.К. 360  
Даниленко В. 148  
Данилова К.В. 320  
Даценко В.П. 317  
Дегтярев Е.А. 400  
Дегтярева В.И. 404  
Дедков В.Г. 28, 198  
Дедаева Е.А. 354  
Деев С.М. 6  
Деменева У. 90  
Демидюк И.В. 294, 346  
Демина Н. 123  
Дениева З.Г. 274, 278  
Денисов Е.В. 159  
Дергоусова Н.И. 348  
Держаев А. 94  
Деркач С.Р. 287, 319  
Дерягина А. 128  
Джелад С.С. 222  
Дзеранова Л.К. 187  
Дивашук М.Г. 404  
Димитрева В.А. 333, 335  
Дмитриев А.В. 195  
Дмитриев С.Е. 88,175, 270  
Дмитриева Е.М. 104  
Добрякова Н.В. 318  
Долгашева Д.С. 224  
Долгих Д.А. 314, 315  
Долгов С.В. 31, 400, 404  
Долгова А.С. 28  
Долинер Н.Д. 199  
Долотов О.В. 360  
Донцова О.А. 7, 10, 90, 138, 214  
Дормешкин Д. 394  
Дорофеев В.Л. 47, 293  
Драчева К.В. 153  
Дьяков И.Н. 221  
Дьяченко И.А. 246  
Дьячкова Е. 169
- Евдокимов И.И. 338  
Евсютина Д.В. 29, 303  
Евтушенко Е.А. 371  
Егоркин Н.А. 257  
Егоров А.М. 67, 188  
Егоров В.В. 330  
Егорова Д.А. 320  
Егорова Н.С. 246  
Елакад О. 229  
Елисеев И.Е. 365  
Елистратов П.А. 272, 371  
Елмуратов А.У. 181  
Емекеева Д.Д. 103, 142, 151  
Емельянов А.К. 48  
Емельянова М.А. 10, 110  
Емельянова С.С. 60, 62  
Енукашвили Н.И. 397  
Епифанова Л.А. 246  
Еремеев А.В. 53  
Еремин А. 92
- Ермакова С.П. 161  
Ермолаев А. 404  
Ерошенко Г.А. 202, 203  
Ефименко А.Ю. 108, 285  
Ефимов А.В. 311  
Ефимов Б.А. 299  
Ефимова С.С. 279  
Ефременко А.В. 325
- Жарков Д.О. 91, 340  
Жаркова М.С. 365  
Жданов Д.Д. 318  
Жернов Ю.В. 139  
Жигалина Д.И. 159  
Жигалова М.С. 209  
Жигач А.Н. 151  
Житкевич А.С. 196  
Жиянов А. 170  
Жуков И.В. 292, 337  
Журавлева Ю.С. 337
- Заббарова В.Р. 90  
Забродская Я.А. 330  
Заварькина Т.М. 231, 241  
Завриев С.К. 403  
Завьялова М.Г. 104  
Заиграев М.М. 391  
Заигрин И. 126  
Зайнуллин К.Ф. 22  
Зайнуллина Л.Ф. 356  
Зайцев К.С. 309  
Зайцев П. 405  
Залыгин А.В. 25, 328, 333, 335, 386  
Замотаева Т.Л. 354  
Заседателей А.С. 110  
Захаревич Н.В. 143,148  
Захарова М.Н. 222  
Захарова Н. 169  
Захарова Н.В. 102  
Зверева М.Э. 92, 158, 251  
Згода В.Г. 18, 93, 94, 106, 108, 137, 286  
Згода М.Г. 281  
Зеркаленкова Е.А. 132  
Зерний Е.Ю. 266  
Зиборов В.С. 112  
Зименков Д.В. 110  
Зозуля С.А. 360  
Золотарев Ю.А. 360  
Золотёнок Е.А. 144, 271  
Зорук П.Ю. 148, 154  
Зубкова Е.С. 199  
Зубкова О.А. 21  
Зуев Ю.Ф. 287, 334  
Зуева И.В. 46  
Зятыков Н.Ю. 24
- Ибрагимова М.К. 224  
Иванков Д.Н. 77, 326
- Иванников А.Д. 391  
Иванов И.А. 250  
Иванов М.В. 105, 145, 165  
Иванов Р.А. 17  
Иванов С.М. 195  
Иванов Ю.Д. 106, 112, 184  
Иванова А.О. 130  
Иванова Е.А. 47  
Иванова О.М. 15, 19, 164, 167, 225, 226,  
232, 238, 288, 299  
Иванова С.А. 104  
Иванова Т.И. 178  
Ивановская Е.В. 82  
Иванченко М.В. 180  
Иващенко А.А. 43  
Иващенко А.В. 43  
Ивченков Д. 276  
Игнатова А.А. 325  
Игнатова А.И. 281  
Игнатьева А.В. 242  
Иззи А.Р. 10  
Измаилова А.М. 246  
Изосимова А.В. 237  
Изюмченко А.Д. 153  
Иконникова А.Ю. 110  
Ильгисонис Е.В. 71, 93, 95, 106, 147, 149  
Ильина А.П. 272  
Ильина Е.Н. 75, 150, 177, 191, 197, 208  
Ильина Н.Б. 313  
Ильинский В. 147  
Ильясова К.Р. 132  
Имянитов Е.Н. 5  
Индейкина М.И. 102, 169  
Ионов Н.С. 195  
Иоутси В.А. 101, 187  
Ипатова Д.А. 377  
Исаев А. 94  
Исаев А.Б. 172, 384  
Исаева М.П. 248  
Исакова А.А. 314  
Итцштайн М. 229
- Кабанихин С.И. 24  
Кабилев М.Р. 144, 271  
Кажарская Е.Ю. 373  
Казакова А.Н. 132, 226  
Казакова Е.М. 145, 151  
Казанцев Ф.В. 37  
Казанцева Д.В. 297  
Казначеева Е.В. 382  
Калебина Т.С. 393  
Калинина И.И. 132  
Калиш С.В. 178  
Калуев А.В. 383  
Калякулина А.И. 180  
Камальдинова Д.Р. 146  
Каминский Г.Д. 24  
Кампе-Немм Е.А. 54  
Камынина А. 268  
Канаева В.А. 73

- Канапин А. 399  
Канапьянов Б. 171  
Кандинов И.Д. 110  
Кандыба А.Л. 260  
Капина М.А. 157  
Капитонова А.А. 254  
Капица И.Г. 286  
Капранова М.А. 231, 241  
Капранова И.Д. 338  
Капрельянц А.С. 59  
Карабельский А.В. 52  
Карамов Б.И. 111  
Карасев Д.А. 69, 195  
Карасева М.А. 294, 346  
Каратаева Т.А. 30, 255  
Кардымон О. 124  
Каримова С. 69  
Карлов Г.И. 404  
Кароли М. 123  
Карпов В.Л. 283  
Карпова О.В. 372  
Карташев А.В. 405  
Карташова А.В. 320  
Касацкий П.С. 87, 140  
Кашеварова А. 123  
Кашеверов И.Е. 245, 246, 250, 262  
Кашуро В.А. 362  
Каюмов А.Р. 190, 216, 219  
Кечин А. 123  
Ким Я.С. 100, 168  
Киреев А.Ф. 119, 407  
Киреева Т.Н. 159  
Кириллов И. 170  
Кириченко А.В. 308  
Кирпичников М.П. 308, 314, 315, 384  
Киселев В.В. 209  
Киселев И.Н. 23  
Киселева И.А. 199  
Киселева О. 147  
Киселева О.И. 93, 100, 137, 168  
Кисляк И.А. 227  
Кициловская Н.А. 101, 166  
Клабенкова К.В. 51, 213  
Клименко А.И. 33, 207  
Климина К. 148  
Климина К.М. 143  
Климина К.М. 15, 73, 154, 201, 298  
Климина К.С. 21, 56  
Климук Е.И. 125, 126, 129, 130  
Климчук О. 128  
Клинов Д. 289  
Ключникова А.А. 71  
Ключникова Е.О. 198  
Князев А.Н. 401  
Князев Д.И. 237  
Ковалёва О.А. 139, 374  
Коваленко А.В. 101  
Коваленко А.Э. 152  
Коваленко Е.А. 391  
Коваль О.А. 367  
Ковальчук С.И. 255  
Ковальчук С.Н. 191  
Кожевникова Е.О. 178  
Кожемякин Г.Л. 166  
Козлов К.Л. 373  
Козлова А.С. 71, 93, 149  
Козлова Т.А. 405  
Козобкова Н.В. 59  
Козырева А.И. 85  
Козырко Е.В. 231, 241  
Кокшарова Г. 123  
Колдман В.А. 148, 154  
Колдман С.Д. 148, 154  
Колесникова В.А. 358  
Колесникова В.В. 282  
Колесникова И. 234  
Колмыков С.К. 23  
Колобов Александр А. 54  
Колобов Алексей А. 54  
Колотова Д.С. 319  
Колпаков Ф.А. 23  
Колчанов Н.А. 33  
Колыхалов И.В. 102  
Колясникова К.Н. 293  
Комарова Е.Ю. 60  
Комлев А.С. 365  
Конанов Д.Н. 75, 150, 191  
Кондратов И.Г. 205  
Кондратьева С.А. 39  
Кондрахин П.Ю. 23  
Кондрашов О.В. 275  
Конева А.Л. 140  
Конева А.Л. 60, 62, 87, 214  
Конишин А.С. 102, 139, 160, 167, 169  
Конради Л.-К. 229  
Константинов В. 26  
Константинов М.А. 349  
Константинова С.В. 297, 317  
Копейкина А.С. 103, 105  
Копылов А. 92  
Копылов А.М. 358  
Копытова А.Э. 48  
Копытова Т.В. 338  
Коркунов Е.А. 251  
Корнеев Е.В. 75, 150, 191, 208, 406  
Корниенко М.А. 201  
Коробейникова А.А. 159  
Короев Д. 268  
Королев С.П. 136  
Королёва С.А. 318  
Коршун В.А. 189, 368, 370  
Корягина М.С. 90  
Косс В.А. 15, 298  
Кост В.Ю. 260  
Кост Н.В. 360  
Костюкевич Ю.И. 53, 119, 152, 407  
Костюшев Д.С. 196  
Костюшева А.П. 196  
Котова Н.В. 312  
Кох Н. 123  
Кочаровская М.В. 391, 394  
Кочнева Г.В. 367  
Кравец П.П. 319  
Кравцов Д.В. 110  
Кравцов И.Н. 320  
Кравцова Е.А. 224  
Кравченко Т.В. 189  
Крамкова В. 276  
Краморенко Н.В. 80  
Крапивина А. 405  
Красикова А. 26  
Красильникова И.А. 357, 387  
Красковская Н.А. 388  
Краснобаев В.Д. 274  
Краузе Л. 229  
Кривицкая А.В. 67  
Кривонос Д.В. 75, 208  
Криворотко О.И. 24  
Кривошей А.В. 353  
Кригс М. 229  
Криницына А.А. 406  
Крицкий А.А. 130  
Кропочев А.И. 207  
Крумкачева О.А. 392  
Крупин П.Ю. 404  
Крыжановский С.А. 302  
Крюкова Е.В. 245, 246, 262, 325  
Крюкова П.А. 100  
Кубарева Е.А. 251  
Куджаев А.М. 350  
Кудрявский В.В. 167  
Кудрявцев Д.С. 245, 250, 262  
Кудряева А.А. 170, 280  
Кудрякова И.В. 349  
Кудряшова Е.В. 318  
Кудряшова К.С. 291  
Кузнецов А.А. 242  
Кузнецов А.В. 391  
Кузнецов Н.А. 256, 342  
Кузнецова А.А. 256  
Кузнецова С. 235  
Кузьменко Н.Б. 134  
Кузьмин А.С. 323  
Кузьмин П. 276  
Кузьмина Ю.Е. 22  
Куканов В.Ю. 78  
Куклин А.И. 58  
Куковьякина Е.В. 314  
Кулаков И.А. 62  
Кулакова А.М. 341  
Кулебякина М.А. 285  
Кулемин Н.А. 120  
Кулигина Е.В. 367  
Куликова О.М. 76  
Куликова Т. 26  
Кульбацкий Д.С. 308, 384, 391  
Кульбачинский А.В. 96  
Куляшов М.А. 23  
Кумейко В.В. 61  
Куприкова К.Ю. 130

- Куприянова О.В. 217  
Купцов В.Н. 253  
Куратов Ю. 124  
Курбатов И.Ю. 147, 168  
Курбатов Л.К. 100  
Кургина Т.А. 343  
Курилова О.В. 179  
Курилова С.А. 316  
Куропаткина Т.А. 83  
Курочкин И. 169  
Курочкина Н.С. 108, 109  
Кусаинова Т.Т. 151  
Кусков М.Л. 151  
Кустова А.А. 338  
Кутузов М.М. 343  
Кутумова Е.О. 23  
Кутырев В.В. 202, 203  
Кучина Ю.А. 287, 319  
Кьелдсен Ф. 151
- Лаврик О.И. 173, 343  
Лавров А.И. 90  
Лавров М.И. 361  
Лагарькова М.А. 19, 21, 225, 232, 238, 299, 382  
Лагунов Т. 26, 123  
Лазарев В. 276, 401  
Лазарева А.А. 25, 27, 32  
Лайков А.В. 156  
Ланге Т. 229  
Ланда С.Б. 273  
Ларин А. 148  
Ларина И.М. 107  
Ларкин-Кондров А.А. 374  
Лахова Т.Н. 37  
Лацис И. 276  
Лашин С.А. 17, 33, 37, 207  
Лашкин А.И. 164, 232  
Лебедев Д.В. 112  
Лебедев И. 123  
Лебедева О.С. 382  
Левашова А.И. 152  
Леднев Е.М. 108, 109  
Лейси Е.В. 334  
Лейченко Е.В. 248, 249  
Леконцева Н.В. 282, 313, 329, 336  
Линге И.А. 157  
Линдин Е.Ю. 251  
Липатников А.Д. 111  
Липкин А.В. 307  
Лисица А.В. 93, 94, 106  
Лисовская С.А. 190  
Литвинова С.А. 47  
Литвяков Н.В. 224  
Лихоманова Р. 219  
Логунова Н.Н. 157  
Ломакин Я.А. 222  
Ломскова П.К. 231, 241  
Лопаткина М. 123  
Лохов П.Г. 113, 117
- Лугинина А. 390  
Луговский А.П. 59  
Лужина Е.А. 231, 241  
Лукачева А. 219  
Лукашев А.Н. 193, 196, 197  
Лукина М.М. 56, 167, 225, 226, 232, 238, 288  
Лукина-Гронская А.В. 406  
Лукьянов Д.А. 377  
Лукьянова А.А. 402  
Лукьянова Т. 123  
Лунева С.О. 319  
Лунегова Д.А. 20  
Лунин В.Г. 317  
Луста А.Ю. 356  
Лушпа В. 324  
Люкманова Е.Н. 308, 384, 391, 394  
Лямина С.В. 178  
Ляпина И.С. 401  
Ляпина Л.А. 366  
Лящук А.М. 317
- Маар Х. 229  
Мазур А.М. 10  
Майборода А.Д. 401  
Майоров К.Б. 157  
Макаров А.А. 102  
Макарова А.О. 307  
Макарюк А. 90  
Максименко О.Г. 22, 291  
Максимов Г.В. 315  
Максимова Н.В. 186  
Максимова Ю. 123  
Малавенда С.С. 319  
Маланьева А.Г. 55  
Малахов Г.С. 63  
Малахова Е. 289  
Малахова М.В. 299  
Мальгин А.А. 144, 271, 392  
Мальхина А.И. 279  
Мальшев Д. 92  
Мальшев Д.П. 158  
Мальцева Д. 170, 240  
Мальцева Д.В. 229, 230  
Мамаева А.С. 401  
Манахов А. 123  
Манолов А.И. 177, 210  
Манских В.Н. 10  
Манухов И.В. 58  
Маргулис Б.А. 60  
Марина В.И. 214  
Маркевич П.С. 199  
Маркелова М.И. 146, 156, 216, 217  
Маркин П.А. 118  
Маркина Н.М. 30, 255  
Марков Д.Д. 360  
Маркова Г.А. 228  
Маркова Ж. 123  
Мартини Б.А. 157  
Мартынов Г.Н. 386
- Марченко Н.Ю. 312  
Марченков В.В. 312, 313  
Марыгин Р.А. 375  
Марынич Н.К. 306  
Марьясина С.С. 10  
Марьясина С.С. 138, 236, 351  
Масленникова А.К.Ю. 369  
Маслов Д.Л. 113, 117  
Масчан А.А. 132  
Масчан М.А. 131–134  
Матросова А. 123  
Матушкин Ю.Г. 17, 33  
Матюхин А.А. 302  
Матюшкина Д.С. 25, 27, 32, 90, 280  
Махновский П.А. 108  
Медведев А.Е. 286  
Медведев М.Г. 363  
Медведева М.В. 305  
Медяник И.А. 308, 338  
Меерович И.Г. 306  
Мелерзанов А.В. 70  
Мелешко Д. 128  
Мельниченко Г. 89  
Мельниченко Г.А. 183  
Меньшов А.С. 249  
Меняйло М.Е. 159  
Мехтиев Э.Р. 199  
Мешалкина Д.А. 301  
Мещерякова О.В. 311  
Миков А.Н. 35, 36, 38  
Миличкина А.М. 129  
Минеев К. 324, 246  
Миннихметов И.Р. 116  
Миньженкова М. 123  
Миронов П.А. 391  
Миронова А.В. 190  
Миронова Е.М. 375  
Мирошкина И.А. 302  
Мирошников А.И. 253  
Мирошников К.А. 402  
Мирошникова В.В. 153  
Мирошниченко Д.Н. 400, 404  
Миткевич В.А. 102  
Митькевич В.А. 182  
Митюшкина Т. 30, 255  
Михайлина А.О. 282, 313  
Михайлова И.Н. 308  
Михайлова Ю.В. 204  
Михеев Р.К. 183  
Михеева О.О. 354  
Мишин А. 390  
Мишин А.С. 30, 255  
Мишуков А. 234, 235  
Мищенко В.В. 319  
Мойсенович А.М. 266  
Мокров Г.В. 47  
Мокрышева Н.Г. 116  
Молокоедов А.С. 363  
Молчанова М.В. 210  
Монахова А. 126



- Монахова А.С. 129, 135  
Моор Н.А. 343  
Морозкина Е.В. 307  
Морозов А.В. 283  
Морозов М. 148  
Морозов М.Д. 154  
Морозова К.И. 386  
Морозова О.Б. 292, 337  
Москалев А.В. 155  
Москалева Н.Е. 114, 118  
Мошковский С.А. 167  
Мулашкина Т.И. 341  
Мулюкина А.С. 21  
Муравьев А.Н. 373  
Мурунец Л.Ю. 31  
Муронец В.И. 305, 334  
Мусатова Е. 123  
Мухамедшина Я.О. 396  
Мухамедьяров М.А. 396  
Мухин А.М. 37  
Мухин И.С. 112  
Мушарова О.С. 126, 129  
Мюге Л.Н. 121  
Мюге Н.С. 121  
Мялик Д.С. 233, 237  
Мясоедов Н.Ф. 357, 361
- Нагаев И.Ю. 361  
Назаренко Л. 123  
Наконечная Н.О. 237  
Насонов Е.Л. 228  
Неведрова Е.Д. 112  
Невинский Г.А. 64  
Неганова И.Э. 395  
Некрасова О.В. 325  
Нерсисян С. 229  
Нерябова Е.С. 161  
Ни В.И. 301  
Нижников А.А. 265  
Низамутдинов И.И. 135  
Никитеев И.А. 22, 166  
Никитин К.Е. 317  
Никитин М.П. 11  
Никитин Н.А. 371  
Никитин Т.Д. 368, 370  
Никитина Т.В. 159  
Никифоров А.А. 97  
Никифоров Д.М. 267  
Никишин Д.А. 90  
Николаев А.С. 20, 323  
Николаев Е. 169  
Николаев Е.Н. 53, 102, 107, 119, 139, 160, 167, 374  
Николаева Д.А. 301  
Никонов О.С. 282, 313  
Никонова Е.Ю. 282  
Никулин А.Д. 329, 336  
Нилов Д.К. 344, 352  
Новиков С.Н. 23  
Новикова И.И. 76
- Новикова С.Е. 18  
Новичкова Г.А. 132  
Новосад В.О. 229  
Нокель А.Ю. 111  
Нольде Д. 394  
Норкин Р.Р. 215  
Носов М.С. 166  
Нуралиева Н.Ф. 174  
Нуриддинов М. 123  
Нурисламов А. 26, 123  
Нуртазина А. 171
- Оберган Т.Ю. 366  
Обухова Л.М. 338  
Обыденный С.И. 34  
Овчинников М.В. 363  
Овчинникова Л.А. 222  
Овчинникова Т.В. 252, 364  
Огарков О.Б. 205  
Оглодин Е.Г. 203  
Оджомоко Л.О. 246  
Одорская М. 148  
Оконечников К.В. 40  
Олейников В.А. 328, 333, 335, 386  
Олехнович Е.И. 15, 73, 143, 148, 154, 298  
Ольховская И.П. 151  
Ольшанская Ю.В. 132  
Орешков С.Д. 391  
Орлов Д.С. 365  
Орлов Н.А. 325  
Орлов О.И. 107  
Орлов Ю.Н. 83  
Орлов Я.А. 20  
Орлова Е.А. 205  
Орлова М.А. 108  
Осипенко С.В. 53, 119, 152, 407  
Осипов С.Д. 269  
Осмаков Д.И. 247  
Осолодкин Д.И. 49  
Остерман И.А. 214  
Остроумова О.С. 279  
Отставных Н.Ю. 248  
Ощепков Д.Ю. 37
- Павельев Р.С. 45  
Павленко А.В. 208  
Павлова А.В. 130  
Павлова Г.В. 358  
Павлова Ю. 289  
Павлюков М.С. 19  
Пази М.Б. 378  
Пак М. 326  
Палкина К.А. 30, 255  
Панасенко С. 68  
Панафидина Т.А. 228  
Панкратова П.Ю. 329  
Панова В.В. 210  
Панова Т. 92  
Пантелеев А.А. 98, 186
- Пантелеев М.А. 34  
Пантелеев П.В. 252  
Панченко С.И. 211  
Парамонов А.С. 249, 391  
Парфенова П.С. 388  
Патлай А.А. 61  
Патрушев Д.Э. 51, 213  
Паутова А.К. 115  
Паширова Т.Н. 55  
Пензар Д. 124  
Перевозчикова А.А. 130  
Перелыгин Ф.С. 193  
Перелыгина В.С. 387  
Пермяков О.А. 10  
Перфилов М.М. 30, 255  
Перфилова К.В. 254  
Петров К.А. 46  
Петрусенко Ю.С. 129, 172  
Петухов М. 68  
Петухова Д.А. 85, 406  
Пигарова Е.А. 187  
Пиголов А.В. 400  
Пика М.И. 354  
Пинелис В.Г. 357  
Пинтус С.С. 141  
Пичкур Е.Б. 87  
Пичкур Э. 394  
Плеханова Н.С. 307, 310  
Плешакова Т.О. 94, 106, 184  
Побожьева И.А. 153  
Поварнина П.Ю. 267  
Поверенная Е.В. 100, 137, 147, 168  
Погодин П.В. 63  
Подлесный П.Р. 35  
Подлесный П.Р. 38, 56  
Покровский В.С. 44, 227  
Полесскова Е.В. 87, 140, 214  
Польшаков В.И. 236, 351  
Поляков И. 92  
Поляков И.В. 341  
Поляков Н.Б. 320  
Полякова А.С. 35, 36  
Полякова В.О. 373  
Полякова С.М. 111  
Пономарев А.С. 215  
Пономарева Н.И. 196  
Пономаренко Е.А. 71, 94, 100, 106, 149, 375  
Пономаренко Е.В. 93  
Пономарцев Н.В. 397  
Пономарцев С.В. 181  
Попкова Д.В. 248, 249  
Попкова Т.В. 228  
Попов А. 26  
Попов В.О. 347, 348  
Попов Д.В. 108, 109  
Попов Н.С. 210  
Попов С. 89  
Попова М.Р. 198  
Поройков В.В. 12, 195

- Потёмкина Е.А. 320  
Пржиялковская Е.Г. 187  
Приймак П.Г. 319  
Прокопьев Н.А. 130  
Пронин И.Н. 358  
Пронина Т.С. 261  
Прохорчук Е.Б. 10  
Птицин К.Г. 137  
Пугачев М.В. 45  
Пустошилов Д.В. 125, 128  
Путевич Е.Д. 62  
Пушин А.С. 31, 404  
Пчелина С.Н. 48, 153  
Пятницкий М.А. 100, 137, 147
- Радилов А.С. 54  
Радько С.П. 137, 149  
Разумова Е.А. 90, 377  
Райгородская М.П. 229, 230  
Райдару О.А. 191  
Райкина Е.В. 133, 134  
Рапопорт Е.М. 328  
Ратхор И. 350  
Ревельский А.И. 115  
Резванов П.М. 74  
Рейнберг М.В. 185  
Рекстина В.В. 393  
Ремеева А.А. 269, 323  
Репникова О.В. 373  
Рижиков Ю.Л. 58  
Ризванов А.А. 215, 239, 396  
Рихтер В.А. 367  
Рогаев Е. 123  
Роговская Н.Ю. 54  
Рогожин Е.А. 401  
Родин В. 92  
Родин С. 230  
Родина Е.В. 316  
Родина Ю.А. 134  
Рожмина Т. 399  
Романенко Г.А. 260  
Романова В.А. 156  
Романова Е.А. 264, 300  
Ромашин Д.Д. 100  
Ротанова Т.В. 350  
Рубцов П.В. 289, 290  
Рубцова М.П. 90  
Руденко А.Ю. 10, 236, 351  
Рудик А.В. 195  
Румянцева Н.П. 321  
Рыжкова О. 123  
Рябчевская Е.М. 371  
Рябченко А.С. 398
- Савватеева Е.Н. 110  
Савин Т.В. 129  
Савинков Р.С. 16  
Савинова Т.А. 191  
Савицкий А.П. 59, 306
- Савицкий М.В. 114  
Савченко Т.В. 400  
Сагитова В.Э. 214  
Салимова Т.Ю. 133  
Салина Е.Г. 157  
Саллум Г. 291  
Салюкова О. 123  
Самарина М. 404  
Самойлов А.Е. 197  
Самсонова М. 399  
Самцов М.П. 59  
Сапега Т.С. 25  
Сапожников С.В. 45  
Сапожникова К.А. 368, 370  
Саратов Г.А. 280  
Саркисян К.С. 30, 255  
Сарыгина Е.В. 71  
Сафронова В.Н. 252  
Сащенко Л.П. 264  
Сащенко Л.П. 300  
Сбарцалья В.А. 198  
Свердлов Е.Д. 39  
Светлова А.О. 294  
Светлова Ю. 289  
Свешникова А. 234, 235  
Свешникова А.Н. 82, 281  
Свирина Е.А. 56, 225, 238  
Северинов К.В. 125, 126, 128–130, 172  
Северов В.В. 296  
Северюхина М.С. 246  
Седлов И.А. 257  
Седов И.А. 287, 334  
Седых С.Е. 64  
Селезнева О. 148  
Селезов С.Ю. 78, 179  
Семашко Т.А. 29  
Семенов В.Э. 46  
Семенов О.Ю. 323  
Семёнов С.Д. 139  
Семенова М.А. 315  
Семисотнов Г.В. 312  
Семьянов А.В. 386  
Сергеев А. 92  
Сергеев А.В. 158  
Сергиев П.В. 10, 138, 214, 351  
Сергиенко О.В. 317  
Серегин А.А. 104  
Серегин Ю.А. 375  
Серегина Е. 268  
Середенин С.Б. 356  
Сивакова Т.В. 83  
Сидоренко С.В. 200  
Сидорова Е.Р. 334  
Сидорова М.В. 363  
Сидорова Т.Н. 31  
Сидорский Е.В. 272, 371  
Сизова С.В. 25  
Силантьев В.Е. 61  
Симанив Т.О. 222  
Синцова О.В. 248, 249
- Синьков В.В. 205  
Синягина Е.Г. 259  
Синягина М.Н. 146, 217  
Скарилкина К. 405  
Скворцов В.С. 331  
Скворцова Ю.В. 157  
Скоблов М.Ю. 122  
Скорнякова В.К. 153  
Скрябин Н.А. 159  
Скутьел М. 94  
Славохотова А.А. 204  
Слащук К.Ю. 185  
Слепов Ю.К. 178  
Сливка Е.В. 328  
Случанко Н.Н. 20, 254, 257  
Сметанин Р.В. 365  
Смирнов И.В. 350  
Смирнов И.П. 56, 109  
Смирнова К.В. 284  
Смирнова Л.П. 104, 284, 297  
Смирнова О.М. 315  
Смирновская М.С. 352  
Смолянова Н.А. 329  
Соболев Б.Н. 69, 195  
Соболев П.Д. 115  
Соколов О.Ю. 360  
Солдаткина О.И. 132  
Соловченко А.Е. 405  
Соловьёв А.И. 320  
Соловьева А.Ю. 348  
Соловьева В.В. 239  
Соловьева Е.Д. 354  
Соловьева Н.А. 18  
Сон Л.В. 250  
Сонец И.В. 75  
Сонец И.В. 75, 150  
Сорокина Е.А. 206  
Сорокина Е.Г. 357  
Сошникова Н. 8  
Сошникова Н.В. 304  
Сошнина В.А. 121  
Спарбер П.А. 122  
Сперанская А.С. 28, 75, 85, 150, 194, 208, 406  
Спицына А.С. 62  
Стародубцева Н.Л. 160  
Старостина Е.А. 221  
Стахеев А.А. 403  
Степанов А.В. 223  
Степанов В.А. 127  
Степанов Г.А. 64  
Степанова Е. 240  
Степанчук Я. 123  
Стеценко Д.А. 51  
Стеценко Д.А. 51, 213  
Сторожева Т.И. 338  
Стрельникова П. 169  
Стрельникова П.А. 102  
Строкач А.А. 148, 154  
Суворов Р. 170

- Суворова Ю. 126  
Суворова Ю.М. 129, 135  
Сударев В.В. 58  
Суздаленко А.С. 21  
Султанов Р.И. 21, 109  
Сумарокова М. 276  
Сумбатян Н.В. 56, 377  
Сунцова М. 123  
Сурдина А.В. 290  
Сурин А.К. 312  
Сурин А.М. 357  
Суханова Н. 123  
Сухарева М.С. 365  
Сухов Д.А. 260  
Сысоева А.А. 258
- Такташов Р.Р. 195  
Тальянский М.Э. 403  
Таранченко В.Ф. 161  
Тарасов Д.С. 59  
Тарасова И.А. 103, 142, 145, 151  
Тарасова О.А. 195  
Тарасова О.А. 69, 81  
Татаринев Д.А. 55  
Татарский Е.В. 122  
Творогова А.В. 369  
Тевяшова А.Н. 279  
Терехов С.С. 189, 222  
Терещенков А.Г. 56, 377  
Терещук В.Ю. 150  
Тесаков И.П. 281  
Тиванова Е.В. 199  
Тикуннова Н.В. 213  
Тилинова О.М. 58  
Тимербаев В.Р. 31, 404  
Тимофеева А.М. 64  
Титова А.А. 55  
Тихонова О.В. 18  
Тихонова Т.В. 348  
Тихонович Э.Л. 211  
Ткаченко М.Д. 90  
Тойшиманов М. 171  
Токмакова А.Д. 402  
Толичева О.А. 62, 214  
Толстыко Е.А. 87  
Тоневицкий А.Г. 170, 229, 230  
Торгунаков Н. 123  
Торопыгин И.Ю. 349  
Третьякова М.С. 159  
Трефилов В.С. 251  
Тризна Е.Ю. 190  
Трифонов О.П. 113, 117  
Трофимов В. 89  
Трошина Е.А. 174  
Трошина Е.А. 187, 221  
Трусова С.В. 408  
Трухин Ф.О. 61  
Тузилов А.Б. 328  
Туперцев Б.С. 53  
Тупикин А.Е. 144, 271
- Тутельян В.А. 93  
Тутыхина И.Л. 320  
Тышковский А.Э. 175  
Тюкина О.С. 319  
Тюрин А.П. 189  
Тяглик А.Б. 386
- Уварова В.И. 49  
Угрюмов М.В. 117, 261  
Украинцев А.А. 343  
Урбан А.С. 15  
Усакин Л.А. 186  
Усачев Д.Ю. 358  
Усачев К.С. 389  
Усачёв М.Н. 161  
Усенко Т.С. 48, 72  
Усольцева. Л.С. 187  
Устинов А.В. 368  
Уткин Ю.Н. 245, 246, 260, 262  
Уткина М. 89  
Уткина М.В. 187  
Уштанит А.И. 110
- Фарафонова Т.Е. 18  
Фафанова Е.М. 45  
Федакова Ю.В. 354  
Федин М.В. 392  
Федоров А.Н. 307, 312  
Федоров Д.Е. 177, 210, 75  
Федоров И.И. 165  
Федоров О.В. 22, 166  
Федорова Д.В. 281  
Федорова Л.С. 191  
Федорова М.С. 190, 216  
Федорова Я.Б. 102  
Федорос Е.И. 139  
Федосеева Е.Д. 110  
Федотова А.А. 386  
Феофанов А.В. 325  
Ферберг А.С. 214  
Фесенко И.А. 401  
Филатенкова Т.А. 365  
Филатова А.Ю. 122  
Филимонов В.В. 312  
Филимонов Д.А. 195  
Филимонов Д.А. 69  
Филин И.Ю. 239  
Филипенко М. 123  
Филиппов В.В. 108  
Филиппова М.А. 110  
Филькин С.Ю. 307  
Финкельштейн А.В. 77, 312, 322, 326  
Фирсов М.Л. 301  
Фисунов Г.Ю. 29, 303  
Фишман В. 26, 123, 124  
Фишман Н.Н. 292, 337  
Фокина А.А. 51, 213  
Фомина А.Д. 49  
Фофанов Г. 219
- Фрайтад В. 229  
Франкевич В.Е. 163  
Франкевич Н.А. 163  
Фролов Ф.А. 357  
Фролова А.А. 159
- Хабарова А. 123  
Хайбрахманова Д.Р. 334  
Хайдукова М.М. 365  
Хайретдинова А.Р. 313  
Хайрутдинов Б.И. 334  
Харлампиева Д.М. 401  
Харрасов Д.Р. 29  
Харченко М.В. 181  
Хасанов Т.А. 247  
Хасанов Ш.А. 28  
Хвостиков Т.С. 172  
Хилал Н.Р. 237  
Хозяинова А.А. 159  
Хомутов А.Р. 345  
Хорева А.Л. 134  
Хохлова М.А. 10  
Хохлова С.В. 231, 241  
Храмова Ю.В. 386  
Храпов Е. 123  
Хренова М.Г. 67, 341, 348  
Хусаинова Л.А. 215  
Хуснутдинова Д.Р. 217
- Цветков В.Б. 296  
Цедилина Т.Р. 130  
Цетлин В.И. 245, 246, 262  
Цой Е.А. 29, 303  
Цорин И.Б. 302  
Цыденнова И.А. 224
- Чаговец В.В. 163  
Чеканов Н.Н. 135  
Чеканов Н.Н. 125, 129, 133  
Червякова Я.В. 369  
Черемных А. 123  
Черкашин Е.А. 354  
Черкашина А.С. 321, 354  
Черневская Е.А. 206  
Черненькая Т.В. 209  
Чернов В.М. 216, 239  
Чернова О.А. 216  
Чернопятко А.С. 387  
Чернышкова О.В. 301  
Черткова Р.В. 315  
Четина Е.В. 228  
Чивкунова О.В. 405  
Чистяков Д.В. 266  
Чудаков Д.М. 237  
Чудинов А.В. 110  
Чудинов И.К. 85, 166, 197, 406  
Чуланов В.П. 196  
Чулин А.Н. 253

- Чулкова П.С. 200  
Чуров А.В. 285
- Шабалина А.В. 28  
Шабалкина А.В. 237  
Шабанова Е. 123  
Шайтан А.К. 327  
Шайхутдинова З.М. 55  
Шайхутдинова Э.Р. 246  
Шамова О.В. 365  
Шамонова М.А. 90  
Шапиро М. 394  
Шапкин А.В. 79  
Шаповалова В.В. 200  
Шарабанов А.В. 362  
Шарапова Е.Е. 35, 36  
Шарова А.А. 198  
Шаронов Г.В. 233, 237  
Шаскольский Б.Л. 110  
Шахова Е.С. 30  
Шварц Я.Ш. 205  
Шебардина Н.Г. 266  
Шевелева М.П. 22  
Шевцов М. 219  
Шевченко К.В. 361  
Шеленков А.А. 204  
Шелухина И.В. 245, 246  
Шендер В.О. 15, 19, 57, 164, 167, 225, 226, 232, 238, 242, 288, 299, 394  
Шенкарёв З.О. 249, 391  
Шепелев Н.М. 90  
Шеремет А.Б. 192  
Шерстюкова Д.В. 122  
Шестакова К.М. 74, 114  
Шестопалова М.С. 386  
Шике А. 229  
Шилова Н. 111, 123  
Шимановский Н.Л. 83  
Шипков Н.С. 348  
Шипунова В.О. 41  
Ширяев С.А. 177  
Ширяева А.А. 172  
Шитиков Е.А. 201  
Шишмаков М.А. 387  
Шишпарёнок А.Н. 318  
Шкиль Д.О. 50  
Шлеева М.О. 59
- Шлепова О.В. 308  
Шлихт А.Г. 80  
Шлыкова Д.С. 307  
Шмальгаузен Е.В. 305  
Шмелев А. 124  
Шмелёв М.Е. 61  
Шнайдер П.В. 19, 164, 225, 226, 232, 238, 242, 288, 299  
Шрам С.И. 302, 352, 360  
Шрёдер-Шварц Дж. 229  
Штам Т.А. 60, 62  
Шторк А.С. 289, 290  
Штуке Дж.Л. 229  
Штырлин Н.В. 45  
Штырлин Ю.Г. 45  
Шубина Е.Н. 360  
Шуленина О.В. 87  
Шулепко М.А. 308, 391  
Шульга О.А. 404  
Шумахер У. 229  
Шумов И.Д. 112  
Шунаев А.В. 179  
Шупик М.А. 241  
Шурганова Е.В. 233, 237  
Шутова А.С. 187
- Щекотихин А.Е. 279  
Щербакова А. 89  
Щербакова О.В. 27  
Щербакова Т.А. 352  
Щербина А.Ю. 134  
Цигал О.Е. 136
- Эверест-Дасс А. 229  
Эмануэль В.Л. 273  
Энгин Д.С. 101  
Энгин Д.С. 78, 179
- Юдин М.С. 296  
Юдинцева Н. 219  
Юкина М.Ю. 174  
Юркина Д.М. 264, 300  
Юркова М.С. 307, 310  
Юрковская А.В. 292, 337  
Юрова М.Н. 139  
Юсипов И.И. 180
- Юсупов М.М. 389
- Яголович А.В. 314  
Якубова Е.В. 43  
Ямпольский И.В. 9, 30, 255  
Ямскава В.П. 272, 371  
Ян А. 123  
Янова М. 240  
Ярема П. 94  
Ярных В.Л. 284  
Ярцев П.А. 209  
Яшин Д.В. 264, 300  
Яшин К.С. 308
- Antson A.A 254  
Bley V. 383  
Cai H. 383  
Cooley R.B. 254  
Cui J. 383  
Do F.T. 282  
Feng H. 383  
Franceschi C. 180  
Garcia-Perez E. 255  
He Jie 262  
He K. 383  
He Sh. 383  
Hong Senlian 218  
Jiang J. 383  
Li R. 383  
Lin C. 324  
Lin Ya. 383  
Luo An 262  
Luo Sulan 262  
Masson P. 55, 339  
Orzaez D. 255  
Qin Y. 383  
Rodriguez-Rodriguez M. 255  
Shaihutdinova Z. 339  
Vazquez-Vilar M. 255  
Wang Ch. 383  
Wang J. 383  
Wang X. 324  
Yang L. 383  
Zhang Yu. 383  
Zhao C. 383



**VI Международная конференция ПОСТГЕНОМ'2024  
XI Российский симпозиум БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ  
Российско-китайский конгресс в области наук о жизни  
(ПСБ «Патриот», 29 октября – 2 ноября 2024).  
Сборник тезисов докладов**

Издательство «Перо»  
109052, Москва, Нижегородская ул., д. 29-33, стр. 27, ком. 105  
Тел.: (495) 973-72-28, 665-34-36  
Подписано к использованию 27.11.2024.  
Объем 7,2 Мбайт. Электрон. текстовые данные. Заказ 1257.

VI INTERNATIONAL CONFERENCE  
**POSTGENOME'2024**

XI RUSSIAN SYMPOSIUM  
**PROTEINS AND PEPTIDES**

RUSSIAN-CHINESE CONGRESS  
**RUSSIAN-CHINESE  
LIFE SCIENCES CONGRESS**



**helicon**



OCTOBER 29 – NOVEMBER 2, 2024