

от подвижной личинки к прикрепленному фильтрату осуществляется за счет метаморфоза — процесса, сопровождаемого радикальным изменением плана строения организма. Преемственность между клетками личинки и тканями взрослого организма обсуждается до сих пор. Нашим объектом является губка *Halisarca dujardini* (класс Demospongiae). Ранее с целью прослеживания судьбы клеток личинки была изолирована электрофоретическая белковая фракция поверхностных жгутиковых клеток, содержащая мажорный белок; к данной фракции были получены поликлональные антитела, с помощью которых прослежена судьба жгутиковых клеток в метаморфозе. В настоящей работе нами с помощью центрифугирования в градиенте плотности, SDS-PAGE и тандемной масс-спектрометрии с использованием ранее секвенированного транскрипта была идентифицирована последовательность этого мажорного белка. Поиск в открытых базах данных показал, что он имеет множество ортологов у губок, стрекающих, гребневиков и иглокожих, однако все они ранее не описаны. Полипептид размером около 400 аминокислотных остатков имеет в составе два консервативных домена: TIM-barrel, обладающий ферментативной активностью в отношении макроэргических соединений, и канонический EF-hand, связывающий кальций. В геноме *H. Dujardini* имеется 4 близких паралога гена, кодирующего данный белок. мРНК гена экспрессируется в поверхностных клетках личинки. Мы предполагаем участие данного белка в кальций-опосредованной регуляции энергетического обмена, активация которого предвещает метаморфоз.

Работа выполнена в рамках проекта РФФ № 17-14-01089.

А.Н. Бызова^{1,2}, Ю.А. Нащекина¹

СКАФФОЛДЫ НА ОСНОВЕ ПРИРОДНЫХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРОВ, ПОЛУЧЕННЫЕ МЕТОДОМ ЛИОФИЛЬНОЙ СУШКИ

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

A.N. Byzova^{1,2}, Y.A. Nashchekina¹

NATURAL AND SYNTHETIC POLYMERS BASED SCAFFOLDS OBTAINED BY THE LYOPHIL DRYING METHOD

¹ Institute of Cytology Russian Academy of Science, Saint-Petersburg, Russia

² Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University, Saint-Petersburg, Russia

byzovaavozyb@gmail.com

Для изготовления скаффолдов используются такие методы, как электроформирование, фазоразделение, выщелачивание и т.д, но традиционным остается метод лиофилизации, основанный на сублимационном принципе: раствор полимера подвергается воздействию низких температур, после чего возгонкой в вакуумной камере удаляется растворитель. Такая сублимация кристаллов льда приводит к образованию системы взаимосвязанных пор в скаффолдах. Целью данного исследования является изготовление трехмерных пористых скаффолдов с разным размером пор и разной архитектурой при помощи метода лиофилизации.

Для изготовления скаффолдов на основе альгината готовили растворы альгината в воде с концентрациями 1–6%. Для скаффолдов на основе смеси коллагена и хитозана использовали 1%-ый раствор хитозана в 2%-ой уксусной кислоте, растворы коллагена в 0,1М уксусной кислоте с концентрациями 2 мг/мл и 4,9 мг/мл и 1% раствор глутарового альдегида. Также изготавливали двухкомпонентные хитозановые и коллагеновые скаффолды. В процессе эксперимента варьировали объемные соотношения компонентов, получили скаффолды, различные по своей структуре и свойствам.

Замороженные образцы помещали в лиофилизатор при температуре -50С и давлении 1 Торр для удаления растворителя. После высушивания скаффолды на основе смеси коллагена и хитозана обрабатывали 10% раствором NaOH (10 минут) и/или раствором PBS, после чего определяли степень деградации коллагена методом Лоури.

Размер и структуру пор альгинатных, коллагеновых и хитозановых скаффолдов анализировали с помощью метода световой микроскопии.

В результате исследования было показано, что при увеличении концентрации раствора альгината, толщина стенок пор полученных скаффолдов увеличивается с 8 до 15 мкм, а размер пор уменьшается с $23,5 \cdot 10^3$ мкм кв до $4 \cdot 10^3$ мкм кв. В скаффолдах на основе смеси хитозана, коллагена (в соотношении 1:1) и глутарового альдегида (4% от объема смеси) деградация коллагена на 90% меньше по сравнению с образцами без глутарового альдегида. При анализе коллагеновых скаффолдов с увлечением объемного содержания глутарового альдегида (2%, 4% и 10% от общего объема раствора коллагена с концентрацией 2 мг/мл) размер пор не изменяется и составляет $20 \cdot 10^3$ мкм кв, а толщина стенок увеличивается с 10 до 15 мкм.

Таким образом, в результате данной работы была получена серия образцов скаффолдов с разным размером пор. Было показано, что на размер пор и толщину стенок скаффолдов оказывает влияние концентрация раствора полимера. Также продемонстрировано, что обработка скаффолдов глутаровым альдегидом не только существенно снижает деградацию коллагена, но и увеличивает толщину стенок скаффолда.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект № 20-03-00400_a).

М.А. Васильченко-Базарова¹, А.А. Жарикова², А.А. Валяева², Д.М. Поташникова¹, М.А. Тихомирова⁴, Я.Р. Мусинова^{3,4}, Е.В. Шеваль^{1,3}

ВЛИЯНИЕ ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ И СТАБИЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ТАТ БЕЛКА ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА НА ЭКСПРЕССИЮ КЛЕТОЧНЫХ ГЕНОВ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ЛИМФОЦИТАХ RPMI 8866

¹ Кафедра клеточной биологии и гистологии, Биологический факультет МГУ

им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁴ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

M.A. Vasilchenko-Bazarova¹, A.A. Zharikova²,
A.A. Valyaeva², D.M. Potashnikova¹,
M.A. Tikhomirova⁴, Y.R. Musinova^{3,4}, E.V. Sheval^{1,3}

INFLUENCE OF INDUCIBLE AND STABLE HIV-1 TAT PROTEIN EXPRESSION ON EXPRESSION OF CELLULAR GENES IN CULTIVATED RPMI 8866 LYMPHOCYTES

¹ Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Department of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov State University, Moscow, Russia

⁴ Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

musinova.yana@gmail.com

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) вызывает развитие синдрома приобретённого иммунодефицита. Важную роль в развитии вируса играет белок Tat (трансактиватор транскрипции). Помимо активации транскрипции вирусных генов, этот белок способен покидать инфицированную клетку и проникать в другие близлежащие клетки. В настоящее время для терапии ВИЧ применяется комбинированная антиретровирусная терапия, однако при ее использовании увеличивается частота развитие онкологических заболеваний, например, некоторых В-клеточных лимфом. Предполагается, что, как минимум частично, именно Tat белок отвечает за развитие онкологических заболеваний у ВИЧ-инфицированных пациентов. При этом можно ожидать, что клетка частично компенсирует эффекты Tat белка. Для выяснения возможности компенсации лимфоцитами эффектов вирусного белка была изучена экспрессия генов (RNA-seq) в культивируемых В-лимфоцитах линии RPMI 8866, постоянно или индуцибельно экспрессирующих Tat белок [1]. В ходе анализа были выявлены дифференциально-экспрессируемые гены и построены предсказания ключевых метаболических путей, на которые повлияла экспрессия Tat белка. Некоторые сделанные предсказания были проверены экспериментально. Показано, что индуцибельная экспрессия Tat белка изменяет экспрессию существенно большего числа генов (5592 гена), по сравнению со стабильной экспрессией (1150 генов). При этом индуцибельная экспрессия затрагивает пути связанные с регуляцией пролиферации, репарации и сплайсинга. Эффекты стабильной экспрессии были менее выраженными. При стабильной экспрессии проявились категории, связанные с иммунными реакциями. Анализ клеток подтверждает, что индуцибельная, но не стабильная экспрессия Tat белка сильно влияет на пролиферацию клеток. Таким образом, клетка, действительно способна компенсировать эффекты Tat белка.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант № 17-75-20199).

Литература:

1. Горбачева М.А., Тихомирова М.А., Поташникова Д.М., Акбай Б., Шеваль Е.В., Мусинова Я.Р. Создание стабильных клеточных линий на основе культивируемых В-клеток RPMI 8866 с постоянной и индуцибельной экспрессией Tat белка вируса иммунодефицита человека. Онтогенез. 2019. 50(5):348–354.

Д.А. Горбенко^{1,2}, Д.Д. Недорезова¹,
М.Д. Рубель¹, Д.М. Колпащиков³

ВИЗУАЛЬНАЯ ДЕТЕКЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПАТОГЕНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЕРОКСИДАЗО-ПОДОБНЫХ ДЕЗОКСИРИБОЗИМОВ

¹ ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

² ФТИ им. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия

³ Университет Центральной Флориды, Орlando, США

D.A. Gorbenko^{1,2}, D.D. Nedorezova¹,
M.D. Rubel¹, D.M. Kolpashchikov³

VISUAL DETECTION OF PATHOGENIC BACTERIA WITH PEROXIDASE-LIKE

¹ ITMO University, Saint-Petersburg, Russia

² Ioffe Institute, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

³ University of Central Florida, Orlando, USA

daryarogova7@gmail.com

Молекулярная диагностика — это метод селективного анализа конкретных патогенных бактерий и вирусов. В данной работе рассматривается использование гибридных ДНК, имеющих в составе гуаниновые квадруплексы (Г-4). Одним из наиболее интересных свойств Г-4 является то, что он может связываться с геминном (железо (III) -протопорфирин IX) с образованием пероксидазы, имитирующей ДНКзимы и РНКзимы [1].

Были использованы два варианта технологии: бинарный Г-4, образующий комплекс дезоксирибозим-пероксидаза, а также дезоксирибозим-пероксидазный каскад. Бинарный дезоксирибозим состоит из двух цепей ДНК, которые образуют структуру Г-4 при гибридизации с диагностируемой бактериальной ДНК-или РНК-аналитом. Г-4 связывает гемин и катализирует пероксидазозависимое окисление бесцветного субстрата до окрашенного продукта, что можно обнаружить как визуально, так и спектрофотометрически [2]. В каскадном режиме РНК- или ДНК-аналиты распознаются с помощью РНК-расщепляющих дезоксирибозим-зондов с последующим расщеплением химерного субстрата ДНК или РНК, который высвобождает Г-4 в раствор.

Для идентификации бактериальных патогенов мы выбрали специфические гены, которые экспрессируются конститутивно. Была произведена проверка различных генов, относящихся к позднему литическому циклу. Данные гены в основном связаны с белками капсида и оболочки. Мы успешно осуществили каскадное обнаружение нескольких патогенов — *E. coli* и *S. pneumoniae*, а также вирусов дцДНК из группы Herpes, HSV1 и HSV2. Ампликоны РНК были получены в реакции NASBA, которая протекает при 41 °С и облегчается путем включения в последовательность сайта узнавания полимеразы T7.

В детекционной части работы РНК-расщепляющие дезоксирибозим-зонды смешивали с синтетическим аналитом или ампликонами РНК в реакционном буфере, инкубировали при 50 °С в течение 60 минут и после этого охлаждали до комнатной температуры. Затем к образцам добавляли гемин, 3,3'-диаминобензидин и перекись водорода для реализации реакции дезоксирибозим-пероксидазного каскада.

Литература:

1. W. Li et al., "Insight into G-quadruplex-hemin DNAzyme/RNAzyme: adjacent adenine as the intramolecular species for remarkable enhancement of enzymatic activity", *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, no. 15, pp. 7373–84, 2016.