

РОССИЙСКИЙ
ФОНД
ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ

ISSN 1605-8070

ВЕСТНИК РФФИ

4 (80) октябрь-декабрь 2013



ВЕСТНИК РФФИ

№ 4 (80) октябрь–декабрь 2013 года

Основан в 1994 году

Зарегистрирован Комитетом РФ по печати,
рег. № 012620 от 03.06.1994 г.

Учредитель

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Российский фонд фундаментальных исследований»

Главная редакция:

главный редактор В.Я. Панченко,
заместитель главного редактора В.В. Квардаков,
приглашенный редактор А.М. Егоров

Редакционная коллегия:

В.А. Геловани, Ю.Н. Кульчин, В.П. Матвеев, Е.И. Моисеев,
А.М. Музафаров, А.С. Сигов, Р.В. Петров, И.Б. Федоров, В.В. Ярмолук,
П.П. Пашинин, Е.Н. Черных, В.А. Шахнов

Редакция:

В.И. Елисеев, А.П. Локтев, А.О. Тимофеева

Адрес редакции:

119991, Москва, Ленинский проспект, 32а

Тел.: (495) 952 6053, факс: (495) 952 5541

e-mail: pressa@rfbr.ru



JOURNAL RFBR

Number 4 (80) October-December 2013

Founded in 1994

Registered by the Committee of the Russian Federation for Printed Media,
reg. Number 012620 of 03.06.1994

The Founder

**Federal State Institution
«Russian Foundation for Basic Research»**

Editor-in-Chief V. Panchenko,
Deputy chief editor V. Kvardakov,
Guest Editor A. Egorov

Editorial Board:

V. Gelovani, J. Kul'chin, V. Matveenko, E. Moiseev,
A. Muzafarov, A. Sigov, R. Petrov, I. Fedorov, V. Yarmolyuk,
P. Pashinin, E. Chernykh, V. Shakhnov

Editorial:

V. Eliseev, A. Loktev, A. Timofeeva

Editorial address:

119991, Moscow, Leninsky Prospect, 32a
Tel.: (495) 952 6053, fax: (495) 952 5541
e-mail: pressa@rfbr.ru

«Вестник РФФИ»

№4 (80) октябрь-декабрь 2013 г. (Приложение к «Информационному бюллетеню» № 21)

КОЛОНКА ПРИГЛАШЕННОГО РЕДАКТОРА

О редакторе тематического блока академике РАН А.М. Егорове.....	6
<i>Егоров А.М.</i>	
Аннотация к тематическому блоку.....	8
Приветственная речь генерального директора EMBL Яна Маттая	17
Европейская молекулярно-биологическая лаборатория (EMBL).....	21
РФФИ: биология и медицинские науки.....	23
Сотрудничество РФФИ и EMBL.....	24

ТЕМАТИЧЕСКИЙ БЛОК: СОВМЕСТНЫЕ ПРОЕКТЫ
МЕЖДУНАРОДНОГО СОТРУДНИЧЕСТВА РФФИ И EMBL

<i>Клёнов М.С., Лавров С.А., Пиллаи Р., Гвоздев В.А.</i>	
Короткие РНК и подавление транскрипции мобильных генетических элементов.....	25
<i>Золотарев Н.А., Максименко О.Г., Фурлонг А., Георгиев П.Г.</i>	
Новые транскрипционные факторы дрозифилы, которые взаимодействуют с инсуляторным белком CP190.....	29
<i>Зверева М.Э., Петрова О.А., Парфенова Ю.В., Смекалова Е.М., Малявко А.Н., Родина Е.В., Каллио И., Хакенберг К., Вигенс Т., Ламзин В.С., Донцова О.А.</i>	
На пути к атомной структуре компонентов теломеразного комплекса с целью создания регуляторов контроля развития раковых клеток.....	33
<i>Шайтан К.В., Кирпичников М.П., Ламзин В.С., Ильин В.А., Егоров А.М., Молодцов С.Л., Рычев М.В.</i>	
Рентгеновские лазеры и перспективы развития динамической структурной биологии.....	38
<i>Григоренко В.Г., Рубцова М.Ю., Егоров А.М., Каролан К., Ламзин В.С.</i>	
Рекомбинантные штаммы <i>E.coli</i> – продуценты бета-лактамаз. Поиск новых ингибиторов бета-лактамаз для преодоления бактериальной резистентности к антибиотикам.....	42
<i>Белоусов В.В., Билан Д.С., Матлашов М.Е., Шульц К.</i>	
Биосенсоры для детекции редокс-активных соединений.....	47
<i>Смирнов И.В., Белогуров А.А., Миткевич В.А., Федорова О.С., Фрибуле А., Ламзин В.С., Вильманс М., Габитов А.Г.</i>	
Структурные исследования биокатализаторов. Биокатализаторы-антидоты к фосфорорганическим отравляющим веществам	52

СМИ О СОТРУДНИЧЕСТВЕ РФФИ И EMBL И КОНГРЕССЕ FEBS 38

Российские и немецкие ученые совместно разрабатывают новые антибактериальные препараты (по материалам газеты «Поиск» № 26, 2013).....	58
Сотрудничество РФФИ и EMBL прорубает окно в Европу.....	62
FEBS 38 в Санкт-Петербурге (по материалам журнала Acta Naturae).....	65
<i>Арчаков А.И., Лисица А.В.</i>	
Проект «Протеом человека» представлен на конгрессе FEBS.....	74
Чтобы чаще встречаться. РФФИ и EMBL поддержат проведение научных мероприятий на территории России.....	76

"RFBR Journal"

No 4 (80), October–December 2013 (Supplement to RFBR "Information Bulletin" No 21)

GUEST EDITOR'S COLUMN

About the Editor of the Thematic Section Academician A. Egorov	6
<i>Egorov A.</i>	
Abstract of the Thematic Section.....	8
Greeting Speech of General Director EMBL Iain Mattaj	17
European Molecular Biology Laboratory (EMBL)	21
RFBR: Biological and Medical Sciences.....	23
Collaboration between RFBR and EMBL.....	24

THEMATIC SECTION.**INTERNATIONAL COLLABORATION BETWEEN RFBR AND EMBL**

<i>Klyonov M., Pillai R., Gvozdev V.</i>	
Short RNAs and Suppression of TE Transcription.....	25
<i>Zolotarev N., Maksimenko O., Furlong A., Georgiev P.</i>	
Novel Drosophila Transcription Factors Interacting with Insulator Protein CP190.....	29
<i>Zvereva M., Petrova O., Parfenova U., Smekalova E., Malyavko A., Rodina E., Kallio J., Hackenberg C., Wiegels T., Lamzin V., Dontsova O.</i>	
Towards Atomic Structure of Telomerase Complex Components in Order to Create Regulators to Control Growth of Cancer Cells.....	33
<i>Shaitan K., Kirpichnikov M., Lamzin V., Ilyin V., Egorov A., Molodtsov S., Rychev M.</i>	
X-Lasers and Prospects of Dynamic Structural Biology.....	38
<i>Grigorenko V., Rubtsova M., Egorov A., Carolan C., Lamzin V.</i>	
Creation of Recombinant Strains of <i>E. Coli</i> , Producing Beta-Lactamases. Study of Catalytic Properties and Search for New Beta-Lactamase Inhibitors fo Overcome Bacterial Resistance fo Antibiotics.....	42
<i>Belousov V., Bilan D., Matlashov M., Schultz C.</i>	
Redox Biosensors.....	47
<i>Smirnov I., Belogurov A., Friboulet A., Lamzin V., Mitkevich V., Fedorova O., Wilmanns V., Gabibov A.</i>	
Structural investigation of biocatalysts. Biocatalysts – antidotes towards organophosphorus compounds.....	52

MEDIA ABOUT COLLABORATION BETWEEN RFBR AND EMBL AND ABOUT THE CONGRESS FEBS 38

Russian and German Scientists Are Working Together to Develop New Antimicrobials. Interview with Academician A. Egorov (after Poisk Newspaper).....	58
Collaboration between RFBR and EMBL Opens a Window to Europe.....	62
FEBS 38 in Saint Petersburg (after Acta Naturae journal).....	65
<i>Archakov A., Lisitsa A.</i>	
The Project «Human Proteome» Presented at the FEBS Congress.....	74
In Order to Meet More Often. RFBR and EMBO Will Support Conducting Scientific Activities in Russia.....	76

О редакторе тематического блока академике РАН А.М. Егорове



Академик РАН.

*Доктор биологических наук,
профессор МГУ имени М.В. Ломоносова.*

*Заведующий лабораторией инженерной энзимологии
МГУ имени М.В. Ломоносова*

Создатель и руководитель научной школы по направлению «Аналитическая биотехнология».

Координатор программы сотрудничества РФФИ-EMBL

Автор более 335 научных работ.

ЕГОРОВ Алексей Михайлович

Егоров Алексей Михайлович родился в Москве в 1943 г. Закончил с отличием биолого-почвенный факультет МГУ имени М.В. Ломоносова в 1966 г. Свою трудовую деятельность начал в Межфакультетской лаборатории биоорганической химии, а с 1973 г. перешел на Химический факультет МГУ. А.М. Егоров является учеником профессора И.В. Березина – ведущего ученого в области проблем биокатализа. Принимал активное участие в организации кафедры химической энзимологии Химического факультета МГУ, на которой он и работает со дня ее организации, в настоящее время является главным научным сотрудником кафедры, возглавляет лабораторию инженерной энзимологии. В 1985 г. А.М. Егоров защитил докторскую диссертацию, с 1993 г. является профессором МГУ по специальности «биохимия». В 1995 г. А.М. Егоров был избран членом-корреспондентом РАМН по специальности биомедицинская технология, в 2000 г. – действительным членом РАМН (отделение медико-биологических наук).

Алексей Михайлович является одним из ведущих ученых в области физико-химической биологии и биотехнологии. Основные направления его научных исследований: исследование механизма действия и структуры NAD-зависимых ферментов, пероксидазы; разработка научных основ создания новых диагностических тест-систем на основе высокоспецифичных молекулярных взаимодействий белков, антител, гаптенов, ДНК с использованием в качестве метки ферментов и наночастиц металлов.

Большой вклад А.М. Егоров внес в создание новых методов генной инженерии для получения рекомбинантных белков, в разработку методов мутагенеза с целью направленного изменения свойств биомолекул, в создание химерных молекул белков. Он руководит исследованиями по созданию новых лекарственных препаратов пролонгированного действия на основе биодegradируемых полимеров и технологий суперкритических флюидов; созданию новых ингибиторов бактериальных ферментов бета-лактамаз для преодоления антибиотикорезистентности, получению рекомбинантных форм бета-лактамаз.

Научная деятельность А.М. Егорова направлена на изучение ферментов, использование принципов биокатализа для получения физиологически активных веществ и создание новых методов медицинской диагностики. Под его руководством получены важные теоретические результаты по изучению механизма взаимодействия антител с антигенами, позволяющие получать высокоспецифичные антитела для

анализа физиологически активных соединений. Работы А.М. Егорова внесли фундаментальный вклад в развитие теоретических основ ферментативных методов анализа. Разработаны методы иммунохимического анализа различных гормонов, белков, наркотиков, лекарственных соединений, антибиотиков, пестицидов, используемые в практическом здравоохранении в медицинских диагностических центрах, программах по экологии и охране окружающей среды. На основе установленных механизмов реакций био- и хемилюминесценции созданы ультрачувствительные методы анализа физиологически активных веществ. Разработаны научные основы создания новых диагностических тест-систем на основе высокоспецифичных молекулярных взаимодействий белков и ДНК с использованием ферментов и наночастиц металлов в качестве метки.

Научные разработки, выполненные под руководством А.М. Егорова совместно с научными коллективами кафедр Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова и институтов РАН и РАМН, послужили основой для широкого практического применения иммуноферментного анализа как в научных целях, так и в практическом здравоохранении. Приоритетные работы А.М. Егорова в области экспрессных методов иммуноферментного анализа получили признание в нашей стране и за рубежом.

А.М. Егоров является крупным организатором и координатором

научных исследований в нашей стране в области инженерной энзимологии. Он был заместителем Председателя ГКНТ по проблемам биотехнологии, директором государственного научного центра по антибиотикам. А.М. Егоров является создателем и руководителем научной школы по направлению «Аналитическая биотехнология». Под его руководством были выполнены научные проекты, финансировавшиеся РФФИ, Минобрнауки, Минпромторгом. А.М. Егоров принимает активное участие в работе научных советов РАН, РАМН, Минобрнауки и Минпромторга России, является членом редколлегий отечественных и зарубежных журналов по проблемам биотехнологии. Он также является президентом Ассоциации производителей средств лабораторной клинической диагностики.

Он является организатором и активным участником международных конференций по биотехнологии и аналитической химии, активно участвует в научном сотрудничестве с зарубежными фирмами и университетами США, Великобритании, Германии, Швеции и других стран.

А.М. Егоров активно участвует в подготовке научных кадров. Под его научным руководством подготовлены и защищены 30 кандидатских и 4 докторских диссертации. Алексей Михайлович вносит большой вклад в дело подготовки высококвалифицированных специалистов, обучение и воспитание студентов и аспирантов, совершенствование методов преподавания физико-химической биологии и биотехнологии.

А.М. Егоров является автором более 335 печатных статей, сборников и монографий, в том числе более 65 авторских свидетельств и патентов на изобретения в различных областях биотехнологии, химического анализа и медицинской науки.

А.М. Егоров принимал активное участие в работе конгресса FEBS 38, был председателем секции «Биохимия для медицины: создание лекарств и диагностика», участвовал в работе круглого стола РФФИ и EMBL и был председателем секции Минпромторга.

Аннотация к тематическому блоку

Общая задача совместного проекта РФФИ–EMBL (Европейская молекулярно-биологическая лаборатория) состоит в решении ряда актуальных проблем молекулярной биологии, генетики и структурной биологии с целью создания научных основ получения новых данных о регуляции генома, механизмах действия ферментов, получения новых лекарственных препаратов и методов диагностики. Использование большого опыта ведущих российских лабораторий РАН и МГУ имени М.В. Ломоносова, с одной стороны, а также научный опыт и высокотехнологичная исследовательская база EMBL позволили создать проект научных исследований, позволяющих найти новые подходы к изучению белков регуляции генома, выяснения их структуры и нахождению новых мишеней для создания *in silico* новых лекарственных соединений, используя опыт компьютерного анализа. Уже найдены новые молекулы – ингибиторы ферментов, разрушающих антибиотики, методы рентгеноструктурного анализа позволили перейти к кристаллизации различных белков: субъединиц фермента теломеразы, отвечающего за онкологию, синтетических антител, направленных на нейтрализацию различных токсинов, мутантов бета-лактамаз, отвечающих за устойчивость микроорганизмов к антибиотикам. Разработаны

библиотеки генов белков, отвечающих за регуляцию хроматина с использованием высокоэффективных ДНК секвенаторов. Эти работы открывают новые подходы к изучению эпигенетического контроля генома. Особый интерес представляют новые данные о роли перекиси водорода в клеточных процессах и создание совместно с EMBL новых систем высокочувствительного анализа, что в дальнейшем позволит изучать роль редокс-активных соединений кислорода в физиологических и патологических процессах. Таким образом, первые итоги совместных проектов РФФИ–EMBL показывают высокую эффективность взаимодействия научных групп и перспективу дальнейшего расширения сотрудничества.

В данном выпуске мы предлагаем обзоры поддержанных РФФИ проектов, выполняемых в рамках данного сотрудничества.

Abstract of the Thematic Section

The common target of the joint RFBR-EMBL (the European Molecular Biology Laboratory) project is to solve a number of current problems in molecular biology, genetics and structural biology in order to create scientific basis for obtaining new data on the genome regulation and the mechanism of enzyme action, for developing new drugs and diagnostic methods. The extensive experience of leading Russian RAS laboratories and Lomonosov Moscow State University coupled with EMBL scientific expertise and high tech research facilities made it possible to conduct research resulting in new approaches to the study of proteins of genome regulation and their structure as well as to finding new targets for creating drug compounds *in silico*, using computer analysis. New molecules have been found – inhibitors of enzymes destroying antibiotics. X-ray analysis methods made it possible to crystallize various proteins: subunits of telomerase responsible for cancer, synthetic antibodies for toxic neutralization, and mutants of beta-lactamases responsible for the resistance of microorganisms to antibiotics. The joint team of scientists has

developed libraries of genes responsible for chromatin regulation using highly efficient DNA sequencers. These research findings open new approaches to the study of the epigenetic control of genome. Especially interesting is the new data on the role of hydrogen peroxide in cell processes and creating jointly with EMBL, of new systems of high-sensitivity analysis, which will later enable the study of the role of redox-active oxygen compounds in physiological and pathological processes. To sum up, the first results of RFBR-EMBL joint projects demonstrate high effectiveness of the international scientific teamwork and open prospects for future expansion of the collaboration. In the present issue we publish overviews of projects conducted within this collaborative framework.

Возглавляемый Донцовой О.А. коллектив работает над совместным проектом Лаборатории Химии нуклеопротеидов Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова и Европейской лаборатории молекулярной биологии (EMBL, Hamburg) «На пути к атомной структуре компонентов теломеразного комплекса с целью создания регуляторов контроля развития раковых клеток». Этот проект посвящен структурным исследованиям теломеразного комплекса. Теломераза играет ключевую роль в поддержании длины теломер в эукариотических клетках. Активация теломеразы происходит в 85% типов опухолевых клеток и дает потенциал к неконтролируемому клеточному делению. На настоящий момент структурные данные для белков теломеразного комплекса ограничены. Наличие структуры высокого разрешения белков теломеразного комплекса позволит проводить докинг низкомолекулярных соединений для поиска новых ингибиторов этого фермента для создания целевой антираковой терапии. Структура ката-

литической субъединицы теломеразы, содержащей все домены, – это одна из наиболее желанных структур в мире. Оригинальность проекта состоит в выборе модельного организма; были выбраны термотолерантные дрожжи *H. polymorpha*. По аналогии с первым определением структуры рибосомы для термостабильного организма исследование теломеразного комплекса из термостабильного организма, возможно, позволит преодолеть такие сложности как нестабильность и плохую растворимость препаратов, помешавшие другим исследователям. Проводимое исследование относится к разряду междисциплинарных проектов и позволяет объединить успешные наработки как в создании функциональных тестов *in vitro* и систем выделения теломеразных белков из необычного по свойствам организма (русская сторона), так и многолетний опыт структурных исследований EMBL для определения структуры биологических объектов с использованием методов, основанных на макрмолекулярной дифракции рентгеновских лучей. Кроме того, последнее достижение в разработке методов определения структуры биообъектов в EMBL касается возможностей использования рентгеновского излучения лазера, позволяющего перейти к исследованию структур на уровне одной частицы или микрокристаллов. В результате совместной работы с лабораторией EMBL удалось получить первые кристаллы важного функционального домена каталитической субъединицы теломеразы и начать определение его структуры.

Team led by O. Dontsova working on a joint project between the Laboratory of Nucleoprotein Chemistry, Faculty of Chemistry, Moscow State University (MSU) and the European Laboratory Molecular Biology (EMBL, Hamburg). The project is devoted to structural studies of telomerase complex. Telomerase plays a key role in maintaining telomere length in eukaryotic cells. Telomerase activation occurs in 85% of tumor cell types and provides potential for uncontrolled cell division. At present, structural data for proteins of the telomerase complex are limited. The presence of high-resolution structure will allow docking low molecular weight compounds to search for new inhibitors of this enzyme. It is a way to create target anticancer therapy. The structure of the catalytic subunit of telomerase with all domains is one of the most desirable structure in the world. The originality of the project is in choosing a model organism; there were se-

lected thermo tolerant yeast *H. polymorpha* for telomerase study. By analogy with the first definition of the high-resolution structure of the ribosome from thermo stable organism the study of telomerase complex of such an organism may help overcome difficulties as instability and poor solubility that prevent to get high-resolution structure of full telomerase complex by other researchers. This research refers to the category of interdisciplinary projects and allows combining successful developments in the creation of functional tests *in vitro* and isolation telomerase proteins from unusual on the properties of the organism (Russian team) and long-term experience for structural studies in EMBL for determining the structure of biological objects using methods based on macromolecular X-ray diffraction.

Furthermore, recent achievement in the development of methods for determining the structure of biological objects in EMBL, concerns possibilities of using X-ray laser. It is way to get information on the level of a single particle or microcrystals. Telomerase is a multi-component complex consisting of RNA and multiple protein subunits. By working together, the team managed to get the first crystals of important functional domain of the catalytic subunit of telomerase and start to determine its structure.

Совместная работа групп Белоусова В.В. в Институте биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и А.Ю. Овчинникова РАН и Carsten Schultz в EMBL ведется с 2006 г. Российская группа специализируется на разработке генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров для детекции редокс-активных соединений, таких как пероксид водорода, NADH и др. Группа Carsten Schultz специализируется на липид-опосредованной передаче сигналов, органическом синтезе и создании синтетических красителей для детекции сигнальных процессов в живых системах. Сотрудничество с EMBL позволяет помещать редокс-сенсоры в структуру биологических моделей, а также быстро и эффективно тестировать их, используя возможности уникального центра световой микроскопии ALMF (Advanced Light Microscopy Facility) в EMBL Heidelberg.

Одним из наиболее интересных результатов сотрудничества явилось обнаружение «микродоменов» пероксида водорода в живых клетках, подвергнутых стимуляции ростовыми факторами. Сам факт

генерации H_2O_2 в клетках в ответ на ростовые факторы был известен уже более 10 лет. Нам удалось существенно детализировать картину распределения оксиданта в клетке. Было установлено, что H_2O_2 продуцируется на мембранах, функционально ассоциированных с ключевыми компонентами тирозинкиназных каскадов. Генерация H_2O_2 носит строго контролируемый характер, а сам оксидант не диффундирует в цитоплазме, а действует и распадается вблизи сайтов его продукции. Работа иллюстрирует способность клетки использовать потенциально токсичные молекулы в качестве мессенджеров.

В настоящее время сотрудничество продолжается благодаря совместному гранту EMBL-РФФИ. В рамках этого проекта разрабатываются новые сенсоры на пероксид водорода, обладающие повышенной яркостью, pH-стабильностью, флуоресцирующие в разных областях видимого спектра. Также ведется разработка системы энзиматической фотоактивируемой системы продукции H_2O_2 , основанной на оксидазе D-аминокислот, и изучается взаимосвязь липидной и редокс-опосредованной систем передачи сигналов в клетке.

Таким образом, в результате выполнения работ по проекту была создана методологическая платформа для детекции пероксида водорода в живых клетках, что в дальнейшем позволит изучать роль активных форм кислорода в физиологических и патологических процессах.

Collaboration between Belousov group in the Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry (IBCH) and Schultz group in the EMBL Heidelberg has been established in 2006. Russian group develops genetically encoded fluorescent biosensors for redox-active compounds, such as H_2O_2 , NADH, etc. Schultz group research area includes lipid signaling, organic synthesis and development of synthetic fluorescent indicators of dynamic processes in living cells. Collaboration with EMBL allows use of redox biosensors within biological models and to test them rapidly using unique equipment of the Advanced Light Microscopy Facility, ALMF.

One of the most important results is a discovery of H_2O_2 microdomains within living cells stimulated with growth factors. The

phenomenon of cellular H_2O_2 production has been known for more than last 10 years. IBCH and EMBL teams together made the map of intracellular H_2O_2 distribution much more detailed. It has been shown that H_2O_2 is produced on the membranes functionally associated with key components of tyrosine kinase cascades. H_2O_2 generation and diffusion are highly controlled. Being produced, the oxidant does not diffuse in the cytoplasm, but acts locally. This work illustrates how the cell is able to use potentially harmful substances as messenger molecules.

At the present time, collaboration between the groups is supported by the joint EMBL-RFBR grant. In frame of this project the team is aimed on development of novel H_2O_2 probes of different colors, high brightness and pH-stability; H_2O_2 generating system based on D-amino acid oxidase; probing the connection between lipid and redox signaling.

A variety of methodologies for H_2O_2 monitoring developed within this project will allow investigating roles of reactive oxygen species in physiological and pathological processes and developing new drugs aimed on H_2O_2 -producing systems.

Научный коллектив под руководством член-корреспондента РАН А.Г. Габимова провели структурные исследования роли константного домена легкой цепи на функциональную активность каталитического антитела А17. Совместно с коллегами из ЕМБЛ впервые были получены кристаллические структуры вариантов «реактибоди» А17, имеющих абсолютно идентичную аминокислотную последовательность антигенсвязывающего центра и отличающихся только константными доменами легкой цепи. Было проведено уникальное количество экспериментов по физико-химическому анализу вариантов антитела с различными изо-типами легкой цепи. Было установлено, что замена изо-

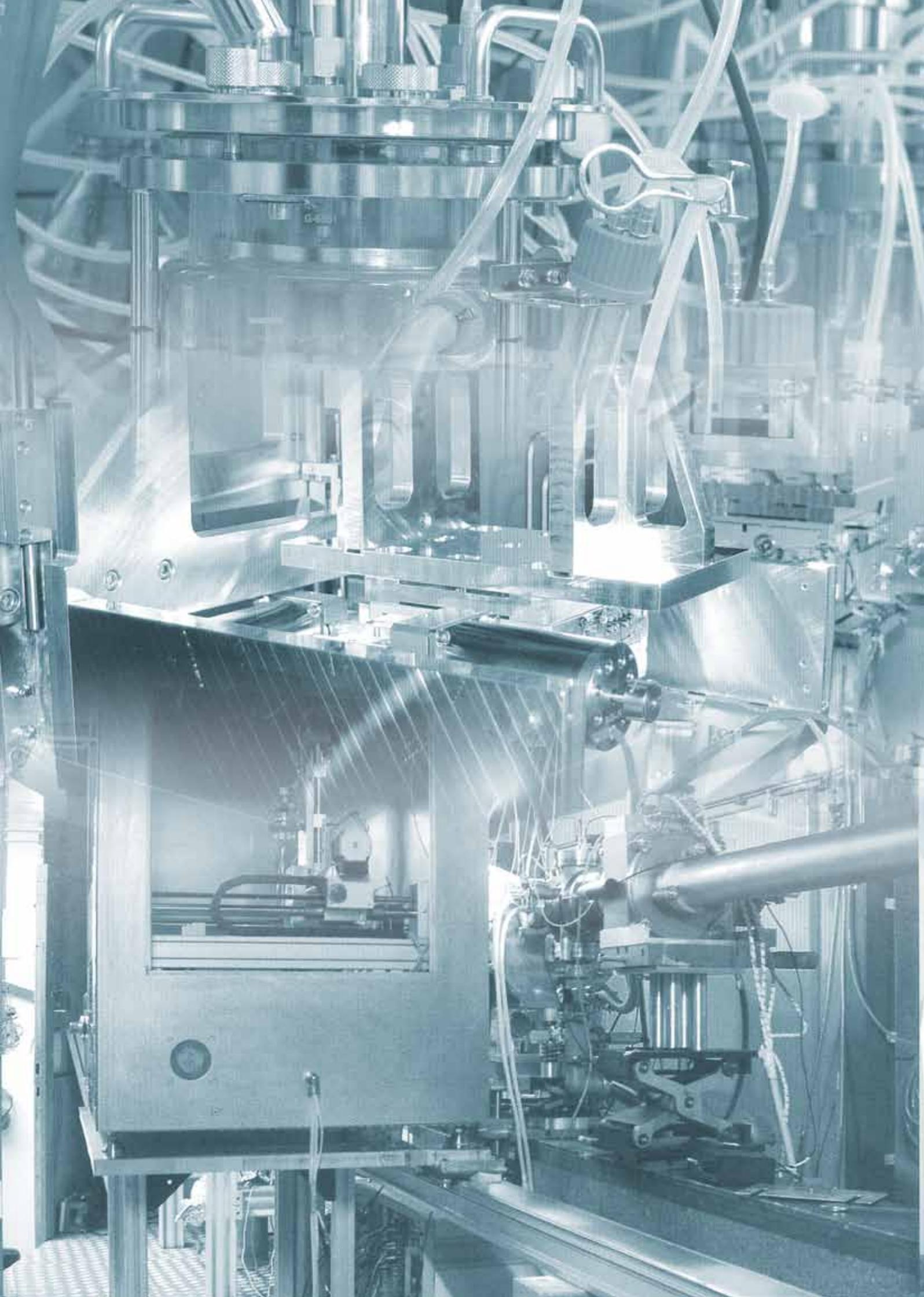
типа легкой цепи приводит к заметному изменению архитектуры активного центра антитела А17, но не влияет на функциональную активность абзима. Фармакокинетические исследования показали, что препарат антитела нейтрализующего фосфорорганические соединения имеет лишь незначительно меньший период полувыведения из кровотока, что делает его потенциальным препаратом для лечения интоксикации организма фосфорорганическими ядами.

*А.М. Егоров,
академик РАН, заведующий лабораторией инженерной энзимологии
химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова*

The group under supervision of member of Russian Academy of Science Prof. Alexander Gabibov made structural study of the role of isotype of constant light chain domain on А17 antibody functionality. Together with colleagues from EMBL were first obtained the crystal structures of А17 “reactibody” variants, having an amino acid sequence is identical to the antigen binding site, and differ only in the constant domains of the light chain. Were held a unique number of experiments on the physico-chemical analysis of antibody variants with different light chain isotypes.

It was shown that the kappa-lambda domain switch leads to structural change of the А17 active center, but not influence on its functionality. Pharmacokinetic studies have shown that neutralizing antibody preparation organophosphates has only slightly smaller half-life of blood flow, making it a potential treatment for intoxication by organophosphorus poisons.

*A. Egorov,
RAS Academician, Head of the Laboratory of Enzyme Engineering
at the Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University*



Штаб-квартира EMBL в Гейдельберге



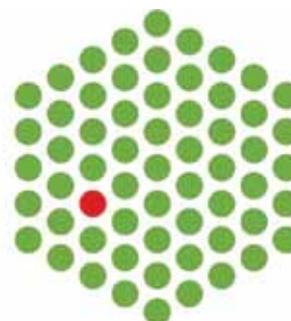
Приветственная речь генерального директора EMBL Яна Маттая

Совместные проекты EMBL и РФФИ по молекулярной биологии:
взаимобогащающее сотрудничество российских и европейских ученых

EMBL-RFBR Joint Projects in Molecular Biology: A Win-Win Cooperation for Russian and Embl Scientists



EMBL



Ян Маттай
генеральный директор EMBL

Iain W. Mattaj
FRS Director General

Дорогие читатели!

Европейская лаборатория молекулярной биологии (EMBL) – это ведущая межправительственная организация в области наук о жизни, штаб-квартира и основной исследовательский центр которой расположены в Гейдельберге (Германия) и которая имеет четыре филиала: в Хинкстоне, Гренобле, Гамбурге и Монтеротондо (Рим). EMBL финансируется за счет средств 20 стран – членов и одного неевропейского государ-

ства, имеющего ассоциированный статус. Лаборатория признается ведущим неамериканским центром и одним из пяти ведущих мировых организаций по качеству исследовательской работы.

Усилия EMBL сосредоточены на решении пяти ключевых задач.

- Во-первых, мы видим свою главную миссию в научных исследованиях на переднем крае наук о жизни и стремимся продвигать исследовательскую работу высочайшего уровня по всей Европе. В среднем EMBL поддерживает около 90 руководителей научных групп, которые являются главными поставщиками открытий в сфере биологии.

Dear readers,

European Molecular Biology Laboratory (EMBL) is Europe's flagship inter-governmental research organisation for the life sciences with its headquarters and main laboratory in Heidelberg, Germany and four outstations in Hinxton (EMBL-EBI), Grenoble, Hamburg and Monterotondo (Rome). EMBL is funded by public research money from 20 Member States

and one non-European Associate member. EMBL ranks as the top non-US institute and among the top 5 institutes worldwide in research performance.

EMBL focuses on five key missions:

- Firstly, we do forefront life science research as our overriding mission is the promotion of excellence in the life sciences throughout Europe. In average, EMBL employs around 90 outstanding group leaders, who are amongst key drivers of discoveries in life sciences in Europe.

- Во-вторых, мы предоставляем услуги государствам-членам. Основные среди них – поддержка ключевых биомолекулярных баз данных и биоинформационных инструментов, предоставляемых филиалом в Хинкстоне, которые ежедневно получают около 8 млн интернет-обращений, а также предоставляют доступ к синхротронным излучателям, технологиям с высокой производительностью, востребованным в структурной биологии, и другому оборудованию. В среднем доступ ежегодно получают около 3 000 пользователей.
- В-третьих, EMBL является одним из крупных европейских учебных центров, предоставляющим образование разных уровней в сфере наук о жизни. Страны-члены получают возможность направлять талантливых молодых ученых на обучение по международной докторской, а также по постдокторской и междисциплинарной постдокторской программам. Одновременно EMBL выступает организатором научных конференций и других мероприятий на высшем научном уровне, которые в 2013 г. посетили более 5000 человек.
- В-четвертых, EMBL прилагает усилия к обеспечению предельно быстрой передачи инновационных технологий, полученных в ходе фундаментальных исследований, в производство.

- И последнее – по порядку, но не по значению – это роль, которую EMBL играет в общеевропейской интеграции наук о жизни. В частности, сотрудничество с научными институтами в странах-членах способствует созданию сети исследователей-биологов высшего уровня.

Партнерские отношения с РФФИ развиваются с 2010 г., с момента подписания Меморандума о взаимопонимании, которым предусматривались совместные шаги, нацеленные на вступление России в EMBL. Основная часть совместной деятельности заключалась в осуществлении проектов на разных направлениях молекулярной биологии, предусматривавших участие как руководителей групп EMBL, так и ведущих российских ученых. EMBL и РФФИ одновременно объявили конкурсы, провели общую экспертизу и выбрали шесть совместных проектов, которые получили поддержку в 2012 г.:

- Secondly, we provide services to the Member States: The most important services run by EMBL are the core biomolecular databases and bioinformatics tools provided by the EMBL-EBI, which receive 8 million webhits every day, and the provision of beamlines, instrumentation and high-throughput technology for structural biology, which on average host 3000 users per year.
- Thirdly, EMBL is one of the major European training centres for life sciences at multiple levels. Benefits to the Member States include access of talented young researchers to the International PhD Programme, the Postdoctoral and Interdisciplinary Postdoctoral Programme. EMBL also organises top-class scientific conferences and events, which hosted over 5000 participants in 2013.
- Fourthly, EMBL actively seeks to facilitate and accelerate the transfer of innovative technology from basic research to industry.

- Last but not least, EMBL is taking a leading role in the integration of life science research in Europe. In particular, by developing partnerships with scientific institutions in our Member States we spread the network of excellence in life science research.

Collaboration with RFBR has been ongoing since 2010 when EMBL and RFBR signed a Memorandum of Understanding aiming to develop cooperation towards the membership of Russia in EMBL. The core of the cooperation has been focused on joint projects in different fields of molecular biology, which involve EMBL group leaders and Russian principal investigators. EMBL and RFBR launched simultaneous calls, performed joint evaluation and finally selected six joint projects in 2012:

- Молекулярные механизмы и ядерные процессы биогенеза piRNA (руководители Пиллаи Р., EMBL и Гвоздев В.А., Институт молекулярной генетики РАН).
- Структурные характеристики компонентов комплекса *polymorpha telomerase*: к пониманию атомных механизмов контроля над делением клеток (руководители Калио И., EMBL, Донцова О.А., МГУ имени М.В. Ломоносова).
- Идентификация новых регуляторов записи в раннем развитии эмбрионов (руководители Фурлонг А., EMBL, Георгиев П.Г., Институт молекулярной генетики РАН).
- Структурно-функциональные взаимодействия в искусственных ферментах (руководители Вильманс, EMBL, Габибов А.Г., Институт биоорганической химии имени академика М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН).
- Новые потенциальные ингибиторы бета-лактамаз для преодоления сопротивляемости бактерий к антибиотикам (руководители Ламзин В.С., EMBL, Григоренко В.Г., МГУ имени М.В. Ломоносова).
- Исследование связи сигналов редоксов и липидов (руководители Шульц К., EMBL, Белоусов В.В., Институт биоорганической химии имени академика М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН).

Несмотря на то, что заключительные отчеты по проектам ожидаются в начале 2014 г., уже очевидно, что руководители со стороны EMBL высоко оценивают результаты сотрудничества. За два года российские партнеры имели возможность провести часть своих экспериментов в лабораториях EMBL и овладеть новыми методиками. В свою очередь, европейские исследователи посетили РАН и МГУ имени М.В. Ломоносова. Очевидным свидетельством успеха является ряд публикаций в высокорейтинговых журналах, число которых, по всей видимости, возрастет, когда все участники окончательно оформят полученные результаты в виде статей. Также надо отметить, что проекты были представлены на двух международных конференциях в России: МОСБИО в Москве в марте и FEBS в Санкт-Петербурге в июле 2013 г.

- "Molecular mechanisms of piRNA biogenesis and its nuclear action": a collaboration between Pillai from EMBL and Gvozdev from RAS;
- "Structural characterisation of components of a *H. polymorpha telomerase* complex: towards an atomic understanding of cell division control": a collaboration between Kalio from EMBL and Dontsova from MSU;
- "Identification of new transcriptional regulators of early embryonic development": a collaboration between Furlong from EMBL and Georgijev from RAS;
- "Structure-functional interrelation in artificial enzymes": a collaboration between Wilmanns from EMBL and Gabibov from RAS;

- "Novel potential inhibitors of beta-lactamases for overcoming bacterial antibiotic resistance": a collaboration between Lamzin from EMBL and Grigorenko from MSU;
- "Probing the connection of redox and lipid signaling": a collaboration between Schultz from EMBL and Belousov from RAS.

While the final reports of joint projects are due to be submitted in early 2014, it is already clear that the EMBL group leaders have been very pleased with the collaborations. In the past two years Russian colleagues have travelled to the EMBL labs to carry out part of their experiments there and many learned new techniques. EMBL researchers have visited the labs of their partners at RAS and MSU. A clear indicator of success of these projects is the fact that several have already published in prominent journals, while others are finalising their research and are in the process of submitting their results. It is also important to emphasise that the projects were presented at two prominent international conferences in Russia – MOSBIO in Moscow in March and at the FEBS meeting in St. Petersburg in July 2013.

EMBL твердо намерена продолжать сотрудничество с РФФИ. В 2014 г. планируется подписание нового плана совместной деятельности, в соответствии с которым должно увеличиться число проектов, а также предполагается организовать в России научную конференцию при участии Европейской организации молекулярной биологии.

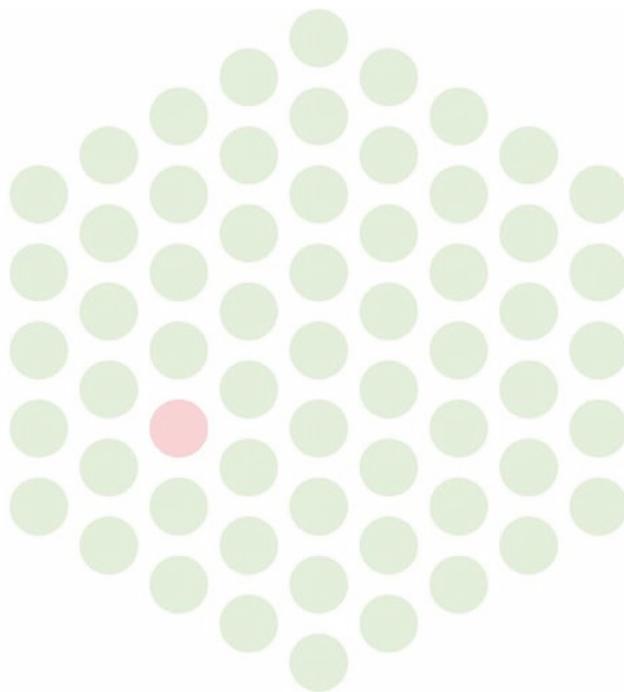
Партнерство EMBL и РФФИ исключительно важно, так как позволяет объединить усилия высококлассных европейских и российских ученых. В дальнейшем присоединение России к EMBL позволит расширить участие

российских ученых в образовательной и исследовательской деятельности лаборатории. Со своей стороны, мы будем рады приветствовать Россию в качестве члена EMBL и надеемся, что это событие не заставит себя долго ждать. На данный же момент мы уверены, что успешный опыт партнерских отношений с РФФИ имеет значение не только здесь и сейчас, но и сыграет важную роль в будущем.

EMBL is dedicated to continue this successful cooperation with RFBR. In 2014 EMBL and RFBR plan to sign a new plan for cooperation. This will enable to extend collaborations between EMBL and Russian scientists as well as to organise a prominent scientific event in Russia in collaboration with the European Molecular Biology Organisation (EMBO).

Collaboration with RFBR is of outstanding importance as it brings together top-class scientists from EMBL and Russia. More interactions and stronger involvement of

Russian researchers at EMBL, such as access to training, different services and labs will be enabled once Russia accedes to EMBL. At EMBL we would be delighted to welcome Russia amongst our Member States as soon as possible. In this respect we are certain that our strong collaboration with RFBR will play a key role not only in the current period, but also in the future.



Европейская молекулярно-биологическая лаборатория (EMBL)

Европейская молекулярно-биологическая лаборатория (EMBL) была организована в 1974 г. как международная научная организация для решения в пределах прежде всего европейского научного пространства таких задач, как проведение фундаментальных исследований в области молекулярной биологии, в т.ч. в качестве экспериментальной базы для занятых такими исследованиями ученых, не являющихся сотрудниками EMBL, для подготовки специалистов в области молекулярной биологии, разработки и передачи новых технологий по результатам проводимых в EMBL исследований, а также чтобы обеспечивать междисциплинарные исследования в области наук о жизни. К настоящему времени деятельность EMBL (в 2013 г. ее бюджет составил 209 млн евро) финансируется с участием 19 европейских стран, Израиля и Австралии, являющейся ее ассоциированным членом.

За прошедшие годы EMBL превратилась в крупную международную научную организацию мирового уровня, занимая (в 1999-2009 гг.) первое место в Европе и третье место в мире по количеству публикаций (1435), цитированию (94736) и цитированию на одну статью (60,02). Основной научный и учебный центр EMBL находится в г. Гейдельберге (Германия), имеются региональные центры в немецком Гамбурге (структурная биология), английском Хинстоне (Европейский институт биоинформатики), французском Гренобле (структурная биология) и итальянском Монтеротондо (виварий и медицинская биология). В 85 научных лабораториях EMBL комплексные исследования по различным направлениям генетики и молекулярной биологии ведут 1400 сотрудников этой организации, рекрутированных из 60 стран, представляющих специалистов различных дисциплин, включая биологию,

физику, химию и математику. Лаборатории EMBL ежегодно посещают для проведения исследований и экспериментов до 6000 ученых.

В России EMBL имеет около 30 совместных проектов с различными исследовательскими организациями, в том числе из МГУ им. М.В. Ломоносова, НИЦ «Курчатовский Институт», Института биохимии РАН, Института биоорганической химии РАН, ряда других. В 2010 г. было заключено соглашение между РФФИ и EMBL о проведении конкурса научных проектов по молекулярной биологии, совместно выполняемых исследователями из EMBL и России. В конкурсе приняли участие 11 проектов, из которых были отобраны 6. Краткое резюме их выполнения в 2012 г. прилагается, работы были продолжены в 2013 г. В ходе выполнения проектов между участниками проходит обмен информацией, материалами, а также живые контакты. В частности, проведены три совместных семинара, в 2013 г. состоялась встреча участников в рамках VII Московского Международного Конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития».

Основные направления исследований EMBL

Биология мыши

Человек и мышь – это генетически очень близкие организмы, что делает мышью идеальным модельным организмом для изучения человеческих заболеваний. Исследователи из EMBL изучают мышью с признаками, аналогичными депрессии, сердечной недостаточности, рассеянного склероза и хронических фобий, чтобы разобраться в болезнях человека. Используя генетические и поведенческие методы, они также исследуют важные аспекты психологии млекопитающих, включая регенерацию клеток мышечных и нервных тканей, дифференцировку клеток крови, эмбриональное развитие, а также комплексное поведение как обучение, запоминание и испуг.

Биология развития

В одной клетке содержится вся необходимая информация для развития многоклеточного организма. «Инструкцией для сборки» является ДНК, копии которой передаются во все клетки развивающегося тела. Что обуславливает различия между клеткой мозга, клеткой сердца и клеткой крови? Ученые EMBL при помощи микроскопа, вычислительной техники, микроматричного анализа и генетики изучают развитие многоклеточного живого существа из единственной клетки. Они используют различные



*Международный центр
повышения квалификации EMBL*

модельные организмы, чтобы выяснить, к чему приводят мутации отдельных генов.

Биология клетки и биофизика

Биология клетки охватывает все аспекты устройства и жизнедеятельности клетки, а также ее функциональности внутри многоклеточного организма. Исследователи EMBL при помощи компьютерного моделирования и передовых технологий визуализации ищут объяснение молекулярным механизмам и физическим принципам, которые определяют клеточную организацию.

Биоинформатика и вычислительная биология

Молекулярная биология требует сбора, организации и обработки огромного объема данных. Требуется создание больших баз данных для хранения информации о геноме, структурах ДНК, белковых секциях и молекулярных структурах. EMBL предоставляет сервис по поддержке, обновлению и бесплатному предоставлению online доступа к подобным базам данным. Кроме того, исследовательские группы в EMBL используют подходы вычислительной биологии для разработки программ и моделей, симулирующих динамические процессы, а также для выборки необходимой информации по результатам анализа данных из различных областей биомедицины.

Биология генома

Геном содержит информацию, определяющую клеточные процессы: от расшифровки РНК до организации белковых структур. Ученые лаборатории используют системный подход в биологии, чтобы рассмотреть эти комплексные процессы на всех уровнях исследования, объединяя глобальный подход на уровне исследования генома с детальным исследованием механизма на молекулярном уровне.

Структурная биология

Белки обладают уникальной трехмерной структурой, позволяющей им взаимодействовать и быть активным участником молекулярных механизмов, лежащих в основе всех процессов в клетке. Один неправильно сформированный белок может нарушить работу всей клетки. Для понимания белковых структур и их взаимодействия ученые EMBL применяют мощные рентгеновские установки и методы на основе магнитного резонанса.

РФФИ: биология и медицинские науки

Известно, что все основы современной генетики и молекулярной биологии были заложены при исследовании морщинистости плодов гороха Менделем или при изучении цвета глаз плодовой мушки-дрозофилы. Поэтому в РФФИ ждут от заявителей проекты, нацеленные в первую очередь на постижение и прояснение законов и форм существования природы.

Для решения подобных задач Фонд проводит конкурс исследовательских проектов, в рамках которого поддерживаются заявки на проведение исследований, поданные отдельными учеными или коллективами до 10 человек, вне зависимости от званий, степеней, возраста и т.д.

Направление «Биология и медицинские науки» является наиболее популярным среди всех областей знания конкурса исследовательских проектов. Так, в 2013 г. экспертным советом по биологии и медицинским наукам было рассмотрено 2 197 заявок на поддержку исследовательских проектов, что составляет 21% от общего количества заявок. Из них одобрено – 649. С учетом продолжающихся проектов в 2013 г. было профинансировано 1 807 коллективов ученых. Из них не менее половины проектов в части объектов исследования или возможности использования результатов на практике связаны с медицинской тематикой. К этому следует добавить поддержку 120 международных и 110 региональных проектов биологической и медицинской направленности. Более того, многие исследования, имею-

щие перспективой выход в практическую медицину, поддерживаются и экспертными советами РФФИ по химии, физике и инженерным наукам.

Важной инициативой Фонда стало проведение нового конкурса Комплексных Междисциплинарных Фундаментальных Исследований (КОМФИ). Конкурс нацелен на решение проблем одной из самых перспективных областей наук о жизни. В последние десятилетия наблюдается колоссальный прогресс в медицинской диагностике, фармакологии, сельскохозяйственных технологиях, промышленной биотехнологии. В основе всех этих инноваций лежат результаты фундаментальных молекулярно-биологических исследований.

Не менее значимые достижения ожидаются и в ближайшем будущем. Например, прогнозируются создание мишень-направленных лекарственных препаратов для неинвазивного лечения многих тяжелых заболеваний, разработка методов генетической терапии.

Ключевую роль в дальнейшем развитии исследований должны сыграть современные физико-химические методы, геномные, постгеномные и информационные технологии. Конкурс КОМФИ позволил объединить усилия профессионалов различной специализации.

На участие в конкурсе было подано 119 комплексных заявок, в состав которых входили 387 научных проектов. Конкурс был чрезвычайно жестким – заявки подавались, как правило, директорами и ведущими сотрудниками институтов, все проекты отличались очень высоким научным уровнем. По результатам экспертизы был поддержан 31 комплексный проект.

В биологии и медицине фундаментальность не имеет четкого определения и характеризует степень «важности», престижности проводимых исследований и всегда связывается с микроскопическими представлениями, подразумевая, что биохимические взаимодействия и только они могут быть ответственны за возникновение, существование, структуризацию и функционирование живого.

Сотрудничество РФФИ и EMBL

Совместное научное сотрудничество ученых России и EMBL дает большие преимущества нашей стране, поскольку прежде всего открывает доступ к уникальному научному оборудованию, методикам и материалам, которые трудно доступны в стране. Соискателями работ являются имеющие богатый научный опыт сотрудники. Высокие требования, предъявляемые к биологическим материалам и образцам, также влияют на уровень выполняемых в России работ. Совместное общение зарубежных и отечественных ученых проходит в духе доброжелательства и взаимного понимания. Этим во многом объясняется высокая актуальность и результативность исследуемых задач, а эффективность работ в несколько раз превышает традиционную аддитивность получаемых результатов. В частности, совместная работа ведущих ученых с сотрудниками EMBL открывает возможность публикации статей в высокорейтинговых зарубежных журналах, что является одним из главных современных требований. Дальнейшее развитие указанного сотрудничества позволит не только повысить уровень фундаментальных работ в области молекулярной биологии и генетики, но и использовать опыт EMBL в трансфере технологий и их коммерциализации как в нашей стране, так и за рубежом. Важной особенностью EMBL является высокоэффективная

подготовка научных кадров, что позволит решить проблему подготовки специалистов высокого уровня.

В то же время нужно отметить, что отечественные группы, участвующие в данном международном проекте, нуждаются в укреплении материально-технической базы, новых приборах, упрощении системы финансирования, обеспечения зарубежными расходными материалами высокого качества.

В настоящее время обсуждается проблема модернизации отечественной системы научных организаций. В этой связи нужно признать, что созданная в EMBL международная система научно-технического сотрудничества представляет собой еще один пример высокоэффективной организации науки, занимающей первое место в Европейском Союзе и третье в мире. Использование этого опыта может быть примером создания аналогичной системы, а включение России в EMBL было бы весьма полезным.



(Слева направо) Академик РАН А.М. Егоров, Ян Маттай (EMBL), А.Ю. Сумбатов (Министерство образования и науки РФ), Яна Павлич (EMBL), Герлинд Валлон (EMBO), Мария Лептин (EMBO), академик РАН В.Я. Панченко (РФФИ), академик РАН В.А. Черешнев (депутат Государственной Думы), академик РАН О.И. Киселев (директор НИИ гриппа РАМН)

Короткие РНК и подавление транскрипции мобильных генетических элементов*

Клёнов М.С., Лавров С.А., Пиллаи Р., Гвоздев В.А.

Представлены результаты исследования функций эволюционно консервативного белка Piwi в ткани зародышевого пути и механизмов функционирования коротких РНК. Белок Piwi дрозофилы, также как и его ортологи у млекопитающих, участвует в эпигенетической регуляции генома за счет взаимодействия с короткими некодирующими РНК особого типа (piРНК), которые осуществляют подавление транскрипции транспозонов (мобильных генетических элементов). При отсутствии Piwi и piРНК наблюдаются активные перемещения транспозонов, что приводит к мутациям и стерильности особей. Кроме того, показана роль белков Piwi в дифференцировке стволовых клеток и канцерогенезе. Для изучения механизма транскрипционной репрессии транспозонов белком Piwi и короткими piРНК была проведена иммунопреципитация хроматина яичников дрозофилы с последующим глубоким секвенированием (ChIP-seq). В качестве модельной системы была использована охарактеризованная нами мутация piwi^{Nt}, которая приводит к образованию белка Piwi, лишённого сигнала ядерной локализации, в результате чего полностью нарушается сайленсинг мобильных элементов, однако сохраняется близкая к норме морфология яичников. Анализ ChIP-seq показал, что отсутствие белка Piwi в клеточном ядре приводит к масштабной активации транскрипции транспозонов, что сопровождается модификациями гистонов в составе хроматина. Впервые обнаружено, что Piwi способен подавлять транскрипцию мобильных элементов с помощью механизма, не связанного с привлечением стандартных гетерохроматиновых маркеров (H3K9me3 и HP1).

Ключевые слова: Piwi, дрозофила, короткие РНК, piРНК, хроматин, транскрипция.

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 12-04-92421-EMBL-a).

В настоящее время бурно развиваются исследования роли особого класса коротких некодирующих РНК, характерной особенностью которых является их взаимодействие с белками подсемейства Piwi семейства Аргонавт (Piwi-interacting RNA (piРНК)). В основе процессов сайленсинга с помощью piРНК, также как и РНК-интерференции, лежит узнавание РНК-мишени с помощью комплементарной ей молекулы

короткой РНК. При этом piРНК преимущественно комплементарны транспозонам (мобильным генетическим элементам) и участвуют в подавлении их экспрессии в клетках гонад (яичниках и семенниках). При нарушении системы piРНК-зависимого сайленсинга наблюдается активная транскрипция и перемещения транспозонов, что приводит к мутациям, разрывам ДНК, общей дестабилизации генома герминальных клеток и, как следствие, к стерильности особей. Исследования piРНК на дрозофиле стимулировали работы на млекопитающих, показавшие эволюционный консерватизм процессов биогенеза и функционирования piРНК [1, 2]. Известно, что некоторые белки подсемейства Piwi, ассоциированные с короткими piРНК, действуют как нуклеазы, расщепляющие мишень – мРНК в цитоплазме. Один из белков подсемейства Piwi у дрозофилы, собственно Piwi, является ядерным и участвует в подавлении экспрессии транспозонов



КЛЁНОВ

Михаил Сергеевич

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник Института
молекулярной генетики РАН.



ЛАВРОВ

Сергей Александрович

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
Института молекулярной генетики РАН.



Рамеш ПИЛЛАИ

руководитель группы Европейской
молекулярной биологической
лаборатории во Франции.



ГВОЗДЕВ

Владимир Алексеевич

академик РАН, заведующий отделом
Института молекулярной
генетики РАН.

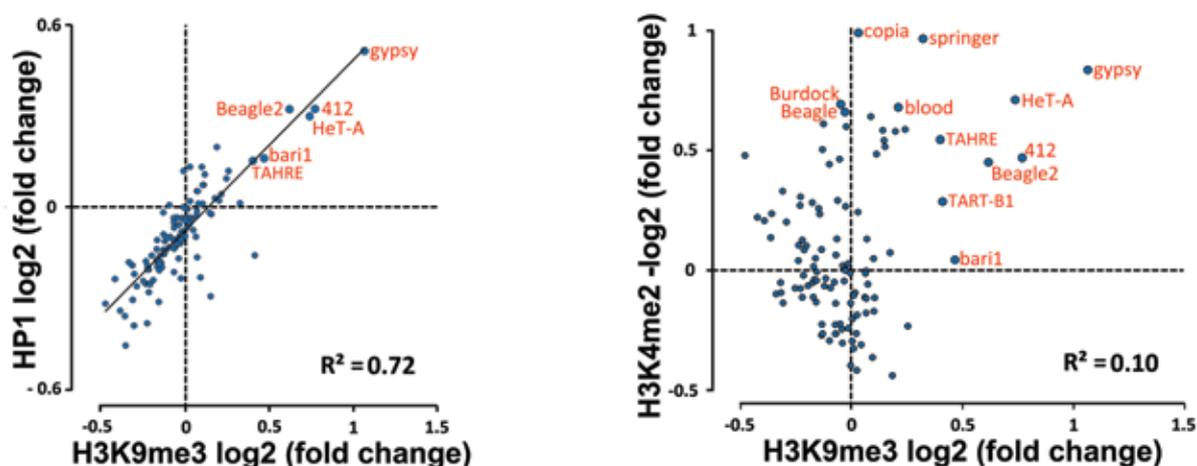


Рис. 1. Изменения количества гистоновых модификаций H3K4me2 (активная транскрипция) и H3K9me3/HP1 (неактивный хроматин, гетерохроматин) для различных транспозонов при мутации *riwiNt* по сравнению с диким типом

на уровне транскрипции. Белок Piwi дрозофилы является ортологом ядерного белка Miwi2 у млекопитающих.

В настоящей работе изучали механизм подавления транскрипции с помощью коротких РНК на примере белка Piwi дрозофилы. Для этого была проведена иммунопреципитация хроматина в яичниках дикого типа и охарактеризованных в нашей лаборатории мутантов гена *riwi* (*riwiNt*) с последующим полногеномным секвенированием (ChIP-seq). Описанная нами ранее мутация *riwiNt* приводит к образованию белка Piwi, лишённого сигнала ядерной локализации, в результате чего полностью нарушается сайленсинг мобильных элементов, однако сохраняется близкая к норме морфология яичников [3]. Этот результат позволил сделать два важных вывода: репрессия транспозонов с участием Piwi осуществляется в ядре на транскрипционном уровне; Piwi, лишённый способности транспортироваться в ядро, сохраняет способность поддерживать самообновление стволовых клеток зародышевого пути. В настоящем исследовании был проведен анализ хроматина транспозонов на фоне мутации *riwiNt* с целью выявления тех механизмов сайленсинга транспозонов, которые обеспечивают стабильность генома. Продолжение работы, касающейся роли Piwi в поддержании стволовых клеток, входит в наши дальнейшие планы. Это направление имеет фундаментальное значение и прикладной интерес, учитывая современные представления о роли стволовых раковых клеток в развитии опухолей.

Анализ полученных данных ChIP-seq показал, что отсутствие белка Piwi в клеточном ядре приводит к масштабной активации транскрипции транспозонов, сопровождающихся определенными модификациями

хроматина. Для 30 семейств транспозонов, относящихся к классу LTR-содержащих ретротранспозонов, и для 10 ретротранспозонов типа LINE при мутации *riwiNt* обнаружено увеличение количества диметилированного по лизину 4 гистона H3 (H3K4me2). Данная модификация характерна для активно транскрибируемого хроматина и ее распределение в геноме дрозофилы практически полностью совпадает с распределением РНК-полимеразы II [4]. Наиболее сильное возрастание уровня H3K4me2 наблюдалось в тех участках транспозонов, которые расположены сразу после промоторов. Для некоторых семейств транспозонов при мутации Piwi обнаружено уменьшение количества основных меток гетерохроматина (неактивного хроматина) – триметилированного по лизину 9 гистона H3 (H3K9me3) и белка HP1. Наиболее выраженное уменьшение уровня H3K9me3 (в среднем, в 2,5 раза) наблюдается для ретротранспозона *gypsy* (рис. 1). Выявляется четкая корреляция (рис. 1) между изменениями H3K9me3 и HP1 (коэф. Пирсона = 0,9), что является ожидаемым результатом, поскольку H3K9me3 рассматривается как гистоновая модификация, которая напрямую связывается с белком HP1. В то же время, суммарный статистический анализ всех семейств транс-

позонов показал отсутствие обратной корреляции между изменениями уровня транскрипции (H3K4me2) и H3K9me3/HP1 (рис. 1). Ряд ретро-транспозонов (*coria*, *mdg3*, *blood* и др.), для которых обнаруживалось значительное повышение уровня diMeK4 на фоне мутации *piwiNt*, не демонстрировали при этом какого-либо убывания уровней гетерохроматиновых маркеров (H3K9me3 и HP1) (рис. 1). Этот результат является неожиданным и позволяет предполагать, что комплекс Piwi способен подавлять транскрипцию некоторых мобильных элементов с помощью механизма, не связанного с метилированием K9 гистона H3. Таким образом, помимо описанной в литературе гетерохроматинизации ДНК-мишеней [2], существует и другой механизм эпигенетического подавления транскрипции с помощью коротких РНК и Piwi.

Нами также была обнаружена возможность влияния Piwi на структуру хроматина и уровень экспрессии уникальных белок-кодирующих генов. По данным ChIP-seq анализа, мутация Piwi вызывает изменения хроматинового ландшафта для небольшого числа (несколько десятков) белок-кодирующих генов. Вблизи некоторых из этих генов были обнаружены инсерции транс-

позонов. Однако с помощью метода micro-array мы обнаружили, что такие изменения хроматина не оказывают существенного влияния на уровень экспрессии мРНК соответствующих генов. Таким образом, белок Piwi в комплексе с piРНК репрессирует хроматин и транскрипцию транспозонов, но, как правило, не влияет на функционирование нормальных генов, даже если те соседствуют с местами встройки транспозонов.

В ряде работ показано, что белки Piwi активно экспрессируются в различных типах раковых клеток и уровень их экспрессии коррелирует со скоростью пролиферации опухолей, в том числе у человека [2, 5]. Белок Piwi участвует в эпигенетической регуляции генома у эукариот. В настоящее время нарушения в характере эпигеномной изменчивости рассматриваются как причины предрасположенности к раковому перерождению. Эти представления особенно активно обсуждаются в дискуссиях о раковых стволовых клетках, причины возникновения которых связывают с эпигеномной изменчивостью. Поэтому исследования молекулярных процессов, лежащих в основе механизма участия Piwi в клеточных делениях и в самообновлении стволовых клеток на примере модельного объекта – дрозофилы, допускающего изошранные методы генетического манипулирования с геномом, представляет большой фундаментальный и практический интерес. Мы обнаружили, что цитоплазматическая форма Piwi неспособна обеспечить нормальный уровень пролиферации стволовых герминальных клеток, что указывает на роль Piwi-зависимого ядерного сайленсинга транспозонов в обеспечении клеточных делений и позволяет предполагать подобный механизм участия белков Piwi в канцерогенезе.

Литература ●

1. *Siomi M., Sato K., Pezic D., Aravin A.A.* PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2011. – 12, 4. – PP. 246–258.
2. *Ishizu H., Siomi H., Siomi M.* Biology of PIWI-interacting RNAs: new insights into biogenesis and function inside and outside of germlines // *Genes Dev.* – 2012. – 26. – PP. 2361–2373.
3. *Klyonov M.S., Sokolova O.A., Yakushev E.Y., Stolyarenko A.D., Mikhaleva E.A., Lavrov S.A., Gvozdev V.A.* Separation of stem cell maintenance and transposon silencing functions of Piwi protein // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2011. – 108, 46. – PP. 18760–18765.
4. *Kharchenko A.A., Alekseyenko Y.B. et al.* Comprehensive analysis of the chromatin landscape in *Drosophila* // *Nature.* – 2011. – 471. – PP. 480–485.
5. *Suzuki R., Honda S., Kirino Y.* PIWI expression and function in cancer // *Front. – Genet.* – 2012. – 3, 204.

Новые транскрипционные факторы дрозофилы, которые взаимодействуют с инсуляторным белком CP190 *

Золотарев Н.А., Максименко О.Г., Фурлонг А., Георгиев П.Г.

В настоящее время стало очевидно, что пространственная организация генома играет важную роль в процессах клеточной дифференцировки и регуляции активности генов.

Энхансеры могут находиться на любом расстоянии (в некоторых случаях достигающем миллионов пар нуклеотидов) от активируемого ими гена. Возникает вопрос, каким образом обеспечивается специфичность взаимодействия между энхансерами и промоторами. Согласно современным данным, основную роль в поддержании архитектуры хромосом играют инсуляторные белки. Однако механизмы их действия остаются неисследованными. Плодовая мушка *Drosophila melanogaster* является идеальным объектом для исследования механизмов специфичных дистанционных взаимодействий у высших эукариот. У дрозофилы были найдены три основных инсуляторных ДНК-связывающих белков: Su(Hw), dCTCF (гомолог белка CTCF позвоночных) и Zw5. При этом активность белков Su(Hw) и dCTCF зависит от связывания с ними белка CP190, который, как предполагается, является ключевым в формировании инсуляторных комплексов и дистанционных взаимодействий. В настоящем исследовании был проведен поиск новых мишеней белка CP190. В результате были найдены два новых инсуляторных белка Pita и CG7928, для которых был проведен полногеномный анализ сайтов связывания в S2 клетках дрозофилы.

Ключевые слова: инсулятор, дистанционные взаимодействия, регуляция транскрипции, транскрипционный фактор.

*

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 12-04-92423 -EMBL-a).

Обычно в регуляторной области гена содержится от одного до нескольких десятков энхансеров, каждый из которых определяет тканевую или временную специфичность экспрессии гена или его экспрессию в небольшой группе клеток [1]. Энхансеры могут находиться на любом расстоянии (в некоторых случаях достигающем миллионов пар нуклеотидов) от активируемого ими гена [2]. Возникает вопрос, каким обра-

зом обеспечивается специфичность взаимодействия между энхансерами и промоторами. Этот вопрос является актуальным, так как нарушение правильной активации транскрипции многих генов приводит к тяжелым заболеваниям человека. В настоящее время, несмотря на многочисленные данные о дистанционных взаимодействиях, у человека найден только один белок, CTCF, который, как предполагается, может поддерживать дистанционные взаимодействия [3]. Известно, что мутации в гене, кодирующем CTCF, являются одной из причин возникновения некоторых видов рака [4]. Несмотря на многочисленные исследования, остается непонятным, каким образом CTCF поддерживает специфичность дистанционных взаимодействий, так как этот белок не имеет доменов, обеспечивающих эффективную гомодимеризацию. Согласно одной из моделей, CTCF помогает связываться другим транскрипционным факторам, которые, в свою очередь, непосредственно участвуют в обеспечении специфичных дистанционных взаимодействий [5].



ЗОЛОТАРЕВ

Николай Александрович
аспирант Института молекулярной генетики РАН.



МАКСИМЕНКО

Оксана Геннадьевна
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Института молекулярной генетики РАН.



Айлин ФУРЛОНГ

доктор философии, заведующая отделом EMBL в Гейдельберге, Германия.



ГЕОРГИЕВ

Павел Георгиевич
профессор, доктор биологических наук, заведующий отделом Института молекулярной генетики РАН.

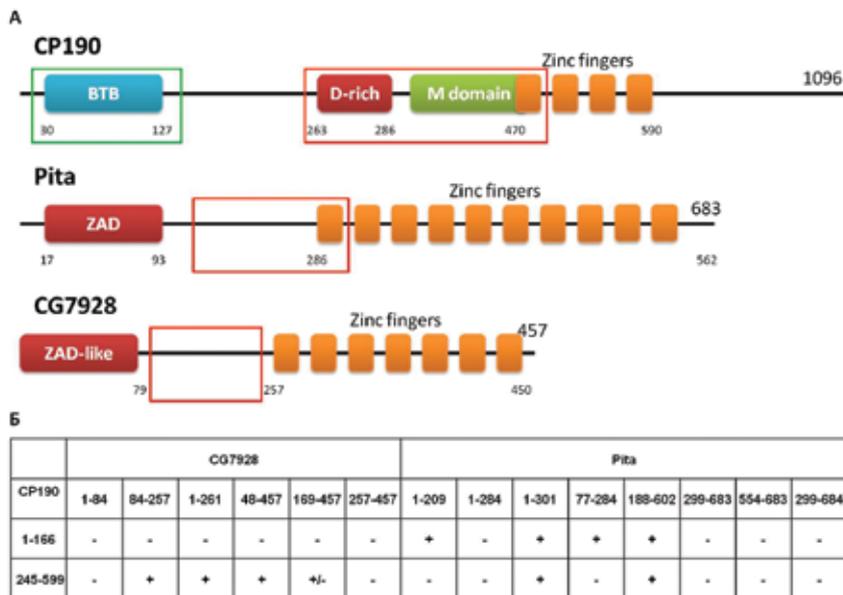


Рис. 1. Доменная структура белков CP190, Pita и CG7928. Рамками показаны участки белков, необходимые для взаимодействия. (Б) Результаты анализа взаимодействий участков белков в дрожжевой двугибридной системе. Цифры показывают номера аминокислотных остатков. «+» есть взаимодействие между участками, «-» нет взаимодействия

Плодовая мушка *Drosophila melanogaster* является удобным модельным объектом, который используется для выяснения механизмов многих биологических процессов, которые сходным образом регулируются у всех высших эукариот. У дрозофилы был найден гомолог белка CTCF (dCTCF), который был изучен в лаборатории профессора Ренкавица [6]. В результате был выявлен транскрипционный фактор CP190, который взаимодействует с dCTCF и нужен для его функциональной активности [7,8]. Также было показано, что CP190 является необходимым компонентом Su(Hw)-инсуляторного комплекса [9]. Полногеномный анализ показал, что только

часть сайтов связывания для CP190 совпадают с Su(Hw)- и dCTCF-зависимыми инсуляторами [10]. Целью настоящего проекта является идентификация новых транскрипционных факторов, взаимодействующих с CP190, и выяснение их роли в регуляции активности инсуляторов и промоторов. Предполагается, что эти транскрипционные факторы могут обеспечивать дистанционные взаимодействия.

Для идентификации новых транскрипционных факторов, которые взаимодействуют с CP190, был проведен скрининг дрожжевой двугибридной библиотеки ДНК-связывающих белков дрозофилы против белка CP190. В данной библиотеке было около 200 транскрипционных факторов, которые содержат домен, имеющий более трех цинковых пальцев C2H2-типа. В результате нами был идентифицирован набор белков, которые взаимодействуют с CP190 в дрожжевой двугибридной системе. Среди этих белков особое внимание было уделено двум: Pita и CG7928 (рис. 1А). Белок Pita имеет на N-конце слабо изученный домен ZAD, ответственный за гомодимеризацию, и на C-конце – 10 цинковых пальцев. Белок CG7928 имеет на N-конце домен, который по структуре напоминает ZAD-домен, и на C-конце – 7 цинковых пальцев. Взаимодействие белков Pita и CG7928 с CP190 было также подтверждено с помощью иммунопреципитации из ядерных лизатов эмбрионов *Drosophila* и S2-клеток.

Был проведен полногеномный анализ сайтов связывания для белков Pita и CG7928 в S2-клетках. Белки Pita и CG7928 преимущественно связываются с промоторными областями генов (более 50% сайтов связывания), что предполагает их роль в активности промоторов дрозофилы. Для обоих белков были найдены специфические последовательности сайтов связывания, которые были подтверждены с помощью экспериментов по изменению подвижности фрагментов ДНК в геле (EMSA) с бел-

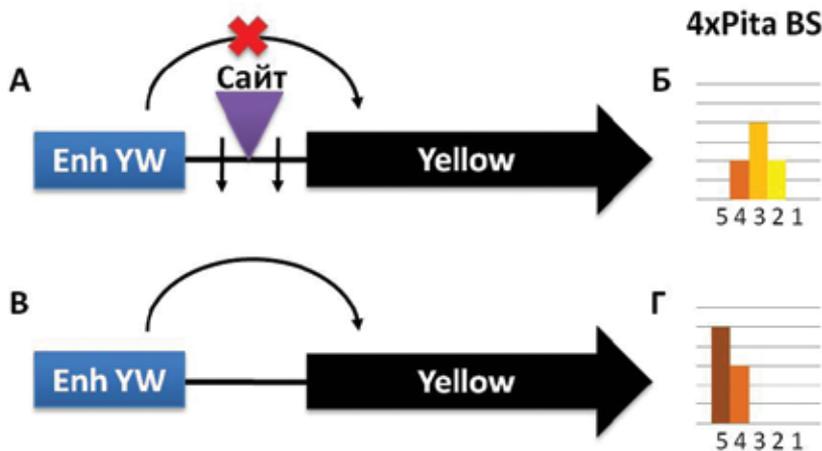


Рис. 2. Конструкции для анализа энхансер-блокирующей активности сайтов связывания белков. (А) Конструкция со встроенным сайтом связывания. (Б) Распределение количества мух с разной окраской тела показывает активность гена Yellow при встроенном сайте связывания белка Pita. (В) Конструкция с вырезанным сайтом связывания белка Pita. (Г) Распределение количества мух с разной окраской тела при вырезанном сайте. Enh YW – энхансер. 5 – максимальная окраска, 1 – минимальная

ками, наработанными *in vitro* в бактериях. В результате было доказано, что часть цинковых пальцев участвует в специфичном узнавании ДНК.

Анализ участков взаимодействия белка CP190 с белками Pita и CG7928 проводили с помощью дрожжевой двугибридной системы (рис. 1Б). Белок CP190 взаимодействует с белками Pita и CG7928 с помощью среднего участка, содержащего домен, богатый остатками аспарагиновой кислоты, М-домен и несколько доменов цинковых пальцев (245-599 аминокислоты, отмечены красным). Для взаимодействия с белком Pita также важен ВТВ-домен, расположенный на N-конце (1-166 аминокислоты, отмечен зеленым).

Белки Pita и CG7928 взаимодействуют с помощью своих средних участков. У белка Pita это участок 77-284 аминокислоты, отмечен красным рис. 1А. Для белка CG7928 это участок 84-257 аминокислотные остатки. Эти участки не имеют выраженной гомологии с другими белками и не имеют доменной организации. Возможно, эти участки в составе белков Pita и CG7928 служат площадкой для взаимодействия и с другими белками.

Для исследования инсуляторной активности белка Pita были получены фрагменты ДНК, содержащие четыре сайта связывания для Pita (рис. 2). Были созданы трансгенные линии дрозофилы, в которых тестируемые сайты связывания белка были встроены между энхансерами и промотором гена yellow, который отвечает за пигментацию тела, крыльев и щетинок мух (рис. 2А). Тестируемый элемент был встроен между сайтами связывания для F₁p-рекомбиназы (FRT). В каждой линии оценивали окраску тела мух по пятибалльной шкале. В результате было получено 6 трансгенных линий, которые содержат сайты связывания для Pita. Все трансгенные линии имели сниженную пигментацию тела и крыльев (рис. 2Б), которая значительно увеличивалась после удаления сайтов связывания для Pita (рис. 2В, Г). Таким образом, сайты связывания для белка Pita функционируют как инсулятор и частично блокируют активность энхансера гена yellow. Связывание белка Pita с тестируемыми сайтами в трансгенных линиях было подтверждено при помощи иммунопреципитации хроматина.

Таким образом, в настоящем исследовании охарактеризованы два новых белка дрозофилы, взаимодействующие с CP190, сайты связывания для которых преимущественно находятся в области промоторов генов. Белок CP190 связывается с белками с помощью ВТВ-домена, что значительно снижает вероятность использования этого домена для установления дистанционных взаимодействий, как предполагалось ранее [11]. Дальнейшее исследование свойств новых и ранее известных белков позволит выяснить механизмы дистанционных взаимодействий.

Литература ●

- Bulger M., Groudine M.** Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers. // *Cell*. 2011. – 144. – PP. 327–339.
- Herold M., Bartkuhn M., Renkawitz R.** CTCF: insights into insulator function during development. // *Development*. – 2012. – 139. – PP. 1045–1057.
- Ohlsson R., Bartkuhn M., Renkawitz R.** CTCF shapes chromatin by multiple mechanisms: the impact of 20 years of CTCF research on understanding the working of chromatin. // *Chromosoma*. – 2010. – 119. – PP. 351–360.
- Fiorentino F.P., Giordano A.** The tumor suppressor role of CTCF. // *J. Cell Physiol*. – 2012. – 227. – PP. 479–92.
- Ghirlando R., Giles K., Gowher H., Xiao T., Xu Z., Yao H., et al.** Chromatin domains, insulators, and the regulation of gene expression. // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2012. – 1819. – PP. 644–651.
- Holohan E.E., Kwong C., Adryan B., Bartkuhn M., Herold M., Renkawitz R., Russell S., White R.** CTCF genomic binding sites in *Drosophila* and the organization of the bithorax complex. // *PLoS Genetics*. – 2007. – 3. P. e112.
- Mohan M., Bartkuhn M., Herold M., Philippen A., Heintz N., Bardenhagen I., Leers J., White R.A., Renkawitz-Rohl R., Saumweber H., Renkawitz R.** The *Drosophila* insulator proteins CTCF and CP190 link enhancer blocking to body patterning. // *EMBO J*. – 2007. – 26. PP. 4203–4214.
- Bartkuhn M., Straub T., Herold M., Herrmann M., Rathke C., Saumweber H., Gilfillan G.D., Becker P.B., Renkawitz R.** Active promoters and insulators are marked by the centrosomal protein 190. // *EMBO J*. 2009. 28. PP. 877–888.
- Pai C.Y., Lei E.P., Ghosh D., Corces V. G.** The centrosomal protein CP190 is a component of the gypsy chromatin insulator. // *Mol. Cell*. 2004. 16. PP. 737–748.
- Nègre N., Brown C.D., Shah P.K., Kheradpour P., Morrison C.A., Henikoff J.G., Feng X., Ahmad K., Russell S., White R.A., Stein L., Henikoff S., Kellis M., White K.P.** A comprehensive map of insulator elements for the *Drosophila* genome. // *PLoS Genet*. 2010. 6. P. e1000814.
- Wood A.M., Van Bortle K., Ramos E., Takenaka N., Rohrbaugh M., Jones B.C., Jones K.C., Corces V.G.** Regulation of chromatin organization and inducible gene expression by a *Drosophila* insulator. // *Mol. Cell*. 2011. 44. PP. 29–38.

На пути к атомной структуре компонентов теломеразного комплекса с целью создания регуляторов контроля развития раковых клеток *

Зверева М.Э., Петрова О.А., Парфенова Ю.В., Смекалова Е.М., Малявко А.Н., Родина Е.В., Каллио И., Хакенберг К., Вигенс Т., Ламзин В.С., Донцова О.А.

Онкологические заболевания – это одно из угрожающих явлений XXI в. Один из путей разработки принципиально новых препаратов для их лечения – это фундаментальные исследования возможностей регулирования работы теломеразы. Теломераза – это сложный комплекс, основными компонентами которого являются теломеразная РНК и каталитическая белковая субъединица – теломеразная обратная транскриптаза. Этим двум компонентам достаточно для проявления активности теломеразы *in vitro*, в то время как в естественных условиях для ее функционирования необходимы дополнительные белки для привлечения теломеразы на теломеру и регуляции активности фермента. Функциональные исследования теломеразы затруднены из-за недостаточности данных о пространственной структуре теломеразного комплекса. Получение данных на атомном уровне о структуре теломеразных белков является абсолютно необходимым этапом для разработки низкомолекулярных соединений – ингибиторов теломеразной активности. Такие вещества являются потенциальными агентами, способными нормализовать механизмы клеточного деления в раковых клетках и привести их к апоптотической смерти. Ограниченные данные о структуре теломеразных компонентов связаны с их низкой стабильностью *in vitro*. Для определения пространственной структуры методом рентгеноструктурного анализа или методом нанокристаллографии с помощью рентгеновского лазера на свободных электронах необходимо получение монокристалла или большого количества нанокристаллов, для образования которых необходима стабильность *in vitro* компонентов теломеразы. Нами был выбран уникальный объект исследования – термотолерантные дрожжи *Hansenula polymorpha*. Определены основные и дополнительные компоненты теломеразного комплекса, созданы системы их суперэкспрессии и выделения и протестирована возможность структурного исследования.

Ключевые слова: теломераза, термотолерантные дрожжи, компоненты теломеразного комплекса, Est1, N-домен каталитической субъединицы теломеразы, кристаллизация.

*

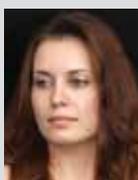
Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 12-04-92429-EMBL-a).



ЗВЕРЕВА

Мария Эмильевна

кандидат химических наук,
доцент химического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова.



ПЕТРОВА

Ольга Алексеевна

ведущий лаборант НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова.



ПАРФЕНОВА

Юлия Юрьевна

студент НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова.



СМЕКАЛОВА

Елена Михайловна

кандидат химических наук,
младший научный сотрудник
химического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова.



МАЛЯВКО

Александр Николаевич

аспирант химического
факультета МГУ имени
М.В. Ломоносова.



РОДИНА

Елена Валерьевна

кандидат химических наук,
доцент химического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова.



Йоханна КАЛЛИО

кандидат химических наук,
старший научный сотрудник
Европейской лаборатории по
молекулярной биологии. (EMBL)
Гамбург, Германия.



Клаудиа ХАКЕНБЕРГ

кандидат биологических наук,
научный сотрудник Европейской
лаборатории по молекулярной
биологии. (EMBL)
Гамбург, Германия.



Тим ВИГЕЛЬС

кандидат биохимических наук,
научный сотрудник Европейской
лаборатории по молекулярной
биологии. (EMBL)
Гамбург, Германия.



ЛАМЗИН

Виктор Станиславович

кандидат химических наук,
заместитель директора и заведующий
лабораторией отделения
ЕМБЛ в Гамбурге, Германия.



ДОНЦОВА

Ольга Анатольевна

доктор химических наук,
Заведующая лабораторией химии нуклеопротеидов,
заведующая кафедрой Химии природных соединений
химического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова.

дит к фенотипу укороченных теломер, а функция подтверждена биохимическими методами. Для *Tetrahymena thermophila* получены данные о структуре N-концевого домена теломеразной каталитической субъединицы [4] и о структуре РНК-связывающего домена [5]. Получение данных о структуре N-концевого домена каталитической субъединицы теломеразы для другого организма позволит проследить схожесть на уровне пространственной организации структуры, что особенно интересно в связи с низкой схожестью теломеразных белков на уровне первичной структуры.

Образование функционального теломеразного комплекса *in vivo* требует дополнительных белков. Например, в случае дрожжевой теломеразы *Sacharomyces cerevisiae* (для этого организма накоплено большое количество экспериментальных данных) такими белками являются: Est1, Est3, Cdc13. Для одного из этих белков – Est3 – функция до сих пор не известна. При определении структуры Est3 белка можно будет сделать выводы о том, какую именно функцию выполняет этот белок в теломеразном комплексе. На настоящий момент данных о структуре этого белка нет. Структуры других белков, ассоциированных с теломеразой, также плохо представлены.

Отсутствие достаточных данных о структуре каталитической субъединицы фермента и дополнительных компонентов, возможно, связано с их низкой растворимостью и низкой стабильностью в растворимой форме. Известно, что белки термофильных организмов обычно оказываются стабильнее своих аналогов из других организмов, поэтому работа с теломеразными белками из термотолерантных дрожжей *Hansenula polymorpha* может оказаться перспективной для дальнейшего определения их структуры.

В результате проведенного исследования мы определили ген каталитической субъединицы *H. polymorpha* и создали конструкции для экспрес-

сии данного белка и его N-концевого домена [6]. Для успешного получения кристаллов и решения структуры необходимо иметь белки в растворимом состоянии в достаточной концентрации. Настоящее исследование было направлено на оптимизацию условий выделения каталитической субъединицы *H. polymorpha* и ее N-концевого домена, подбор начальных условий кристаллизации для дальнейшего определения структуры. Были идентифицированы гены других теломеразных белков (Est1, Est3) для этого организма (статья про идентификацию Est1 принята в печать в 2013 г., журнал «Доклады академии наук») и протестирована возможность их структурных исследований. Рекомбинантный белок Est1 не стабилен и не пригоден для структурных исследований в отличие от белка Est3. Для каталитической субъединицы теломеразы были получены и охарактеризованы три варианта N-концевого домена: с N- или C-концевым аффинным тагом, а также нативный белок. Для кристаллизации использовали нативный вариант белка. Масс-спектрометрический анализ нативного белка подтвердил, что он соответствует последовательности 1-153 каталитической субъединицы, включая N-концевой остаток Met, с дополнительной вставкой из 6 остатков на C-конце, оставшейся после протеолитического удаления аффинного тэга.

На первом этапе был проведен скрининг условий кристаллизации N-концевого домена с использованием коммерческих наборов реактивов, в том числе на оборудовании для автоматической кристаллизации High Throughput Protein Crystallisation System, EMBL, Гамбург. Однако скрининг не показал ожидаемых результатов. Был проведен детальный анализ аминокислотной последовательности N-домена с использованием биоинформатических подходов. Были предсказаны вторичная структура белка, профиль гидрофильности, степень доступности боковых групп растворителю, определены возможные сайты белок-белкового взаимодействия, наиболее и наименее упорядоченные участки цепи. Анализ показал, что N- и C-концевые участки полипептидной цепи разупорядочены и не обладают выраженной вторичной структурой, что, по-видимому, негативно отражается на кристаллизации.

Для того, чтобы убрать разупорядоченные участки цепи, был опробован частичный протеолиз белка в мягких условиях непосредственно во время кристаллизации. Предполагалось, что в растворе высокой концентрации белка, используемом при кристаллизации, протеолизу подвергнутся только те участки, которые экспонированы или разупорядочены. С этой целью были опробованы несколько протеолитических ферментов, в том числе трипсин,

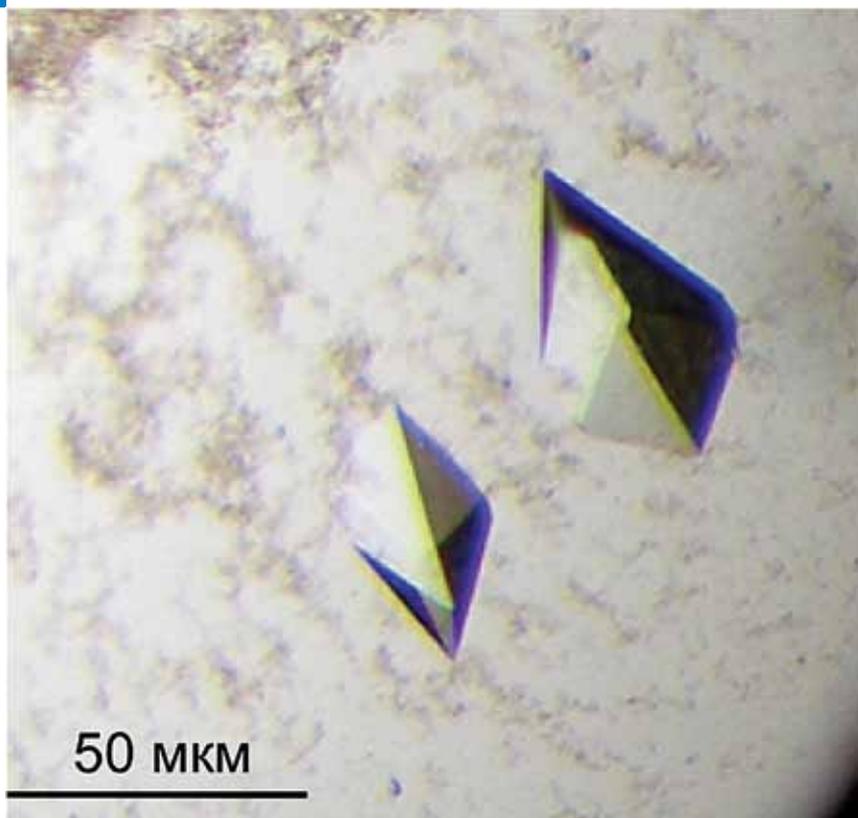


Рис. 1. Единичные кристаллы N-домена

субтилизин, папаин, глутамилэндопептидаза. Протеазы добавляли в раствор белка в массовом соотношении порядка 1:100, инкубировали при комнатной температуре и этот раствор использовали для кристаллизации. В случае трипсина при скрининге условий с использованием набора реактивов Wizard II (Emerald Biosystem, США) был получен положительный результат. Эти условия использовали для дальнейшей оптимизации. В результате были получены единичные кристаллы N-домена (рис. 1), которые были использованы для получения набора дифракционных данных с разрешением 2,4 Å.

Полученные кристаллы подходят для исследования методом РСА. Очень мелкие кристаллы можно исследовать методом нанокристаллографии, а именно с помощью рентгеновских лучей лазера на основе

свободных электронов (ЛСЭ). ЛСЭ обеспечивает интенсивное коротко-импульсное излучение (с длиной импульса от 100 до 10 фс или короче). Предварительное моделирование процесса взаимодействия такого импульса с биологическим материалом на одной молекуле лизоцима [7] позволило предположить, что в течение этого короткого периода времени радиационные повреждения не успеют существенно нарушать исходное положение атомов, при этом рентгеновское излучение, попадающее на образец со скоростью 300000 км/с, успеет пройти на несколько мм дальше. Все фотоны, рассеянные от образца с размером меньше этого расстояния, приведут к когерентному дифракционному рассеянию, которое можно измерить. Этот эффект известен как «дифракция до разрушения», поскольку радиационный распад молекулы, вызванный излучением, произойдет после прохождения излучения через образец. Недавние эксперименты подтвердили этот эффект и показали возможность использования ЛСЭ в нанокристаллографии [8] с образцами размером порядка 1 мкм. Эти эксперименты, как и классическое определение структуры методом РСА, в рамках сотрудничества по программе РФФИ-EMBL проводятся в лаборатории Ламзина в EMBL в Гамбурге. Мы надеемся в ближайшее время представить атомарную структуру компонентов теломеразного комплекса: N-концевого домена каталитической субъединицы и/или белка Est3.

Литература

1. Zvereva M.I., Shcherbakova D.M., Dontsova O.A. (2010) Telomerase: structure, functions, and activity regulation. *Biochemistry (Mosc)*, 75(13):1563–83.
2. Gillis A.J., Schuller A.P., Skordalakes E. (2008) Structure of the *Tribolium castaneum* telomerase catalytic subunit TERT. *Nature*, 455(7213):633–7.
3. Mitchell M., Gillis A., Futahashi M., Fujiwara H., Skordalakes E. (2010) Structural basis for telomerase catalytic subunit TERT binding to RNA template and telomeric DNA. *Nat Struct Mol Biol*, 17(4):513–8.
4. Jacobs S.A., Podell E.R., Cech T.R. (2006) Crystal structure of the essential N-terminal domain of telomerase reverse transcriptase. *Nat Struct Mol Biol*, 13(3):218–25.
5. Rouda S., Skordalakes E. (2007) Structure of the RNA-binding domain of telomerase: implications for RNA recognition and binding. *Structure*, 15(11):1403–12.
6. Смекалова Е.М., Петрова О.А., Зверева М.Э., Донцова О.А. (2012) Рекомбинантная форма TERT *Hansenula polymorpha* обладает ограниченной обратнотранскриптазной активностью. *Acta naturae*, 4 (1): 72–75.
7. Neutze R., Wouts R., van der Spoel D., Weckert E., Hajdu J. Potential for biomolecular imaging with femtosecond X-ray pulses. *Nature* 2000 406:752–757.
8. Chapman H.N. et al. Femtosecond X-ray protein nanocrystallography. *Nature* 2011 470:73–77.

Рентгеновские лазеры и перспективы развития динамической структурной биологии *

Шайтан К.В., Кирпичников М.П., Ламзин В.С., Ильин В.А., Егоров А.М, Молодцов С.Л., Рычев М.В.

Кратко обсуждаются возможности использования рентгеновского лазера XFEL для решения задач современной структурной биологии. Результаты подготовительных работ участников международного проекта ХВІ были представлены в рамках международного симпозиума и намечен план дальнейшего сотрудничества.

Ключевые слова: рентгеновские лазеры на свободных электронах, структурная динамика белков, мембранные белки, структура белковых комплексов.

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 12-04-92425-EMBL-a).

21 марта 2013 г. в рамках Международного симпозиума по научно-техническому сотрудничеству РФФИ-EMBL в области молекулярной биологии, проходившего под эгидой VII Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» состоялось заседание секции «Новые технологии в использовании лазеров для изучения биологических объектов (проект ХВІ)». На заседании выступили с докладами представители Европейской лаборатории молекулярной биологии (EMBL), Научно-исследовательского центра «Курчатовский институт» (НИЦ КИ), Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (МГУ), Института биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН) и Института химической физики имени Н.Н. Семенова (ИХФ РАН). Эти организации, совместно с рядом других европейских лабораторий, объединены в консорциум ХВІ по созданию лаборатории структурной биологии,

который поддержан по итогам конкурса, проводившемся в 2012 г. XFEL (Гамбург), где в настоящее время создается рентгеновский лазер на свободных электронах с уникальными параметрами пучка, позволяющими проводить структурными и динамические исследования бимакромолекул, их комплексов, клеточных и субклеточных структур.

Использование рентгеновских лазеров открывает новую эру в структурной биологии и очень гармонично вписывается в перспективное развитие постгеномных технологий.

Уровень развития современной биологии, биомедицины, фармакологии требует знаний о механизмах биологических процессов в норме и патологии с атомной точностью. В настоящее время в базах данных содержится информация только о порядке 90 тысяч из миллионов белковых структур. Эта информация в подавляющем большинстве случаев получена методами рентгено-



ШАЙТАН

Константин Вольдемарович

доктор физико-математических наук, профессор Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.



КИРПИЧНИКОВ

Михаил Петрович

академик РАН, декан биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова



ЛАМЗИН

Виктор Станиславович

кандидат химических наук, заместитель директора и заведующий лабораторией отделения EMBL в Гамбурге, Германия.



ИЛЬИН

Вячеслав Анатольевич

доктор физико-математических наук, начальник отделения НИЦ «Курчатовский институт».



ЕГОРОВ

Алексей Михайлович

академик РАН, заведующий лабораторией инженерной энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.



МОЛОДЦОВ

Сергей Львович

доктор физико-математических наук, научный директор Европейского рентгеновского лазера на свободных электронах (XFEL).



РЫЧЕВ

Михаил Викторович

кандидат физико-математических наук, заместитель директора НИЦ «Курчатовский институт».

структурного анализа и относится к кристаллическим структурам белков в некоторых локально равновесных конформациях. К сожалению, огромное число белковых структур, особенно сложных белковых комплексов, практически не поддаются кристаллизации или получаемые для них кристаллы имеют нанометровые размеры и сильные дефекты, что осложняет использование классического рентгено-структурного анализа (РСА). Кроме того, классический РСА практически неприменим для изучения структуры и динамики биомолекул в переходных, функционально активных состояниях.

Использование рентгеновских лазеров на свободных электронах (XFEL) дает принципиально новые возможности как для структурного анализа биологических объектов, так и изучения их функциональной структурной динамики. Сочетание огромной яркости вспышки свыше 10^{23} Вт/см² (сфокусированную на область 100 нм²) и короткой длительности порядка 10 фс приводит к совершенно уникальным принципиальным возможностям этого инструмента. С одной стороны, при такой мощности излучения возникающие напряженности электрического поля на молекуле таковы, что достаточно быстро приводят к ее глубокой ионизации и, в последующем, кулоновскому взрыву. Однако до этого момента успевает накопиться двумерная картина рассеяния рентгеновских квантов, которая дает представление о распределении электронной плотности в молекуле. По этой картине рассеяния возможно восстановление проекции атомной структуры.

То есть, синхронизируя вспышки рентгеновского лазера и вброс биомолекул или их комплексов в пучок с определенной задержкой после перевода макромолекул в функционально активное состояние имеется принципиальная возможность получить для функционального акта «молекулярное кино». В нас-

тоящее время такое молекулярное кино может быть предсказано только методами молекулярного моделирования с использованием суперкомпьютерных технологий. Однако и в этом случае требуется знание начальной пространственной структуры биомолекулярного комплекса и всех параметров межатомных силовых взаимодействий с высокой точностью. Хотя современными методами для целого ряда систем такие задачи решаются, но появление непосредственных и прямых экспериментальных результатов в этой области будет иметь последствия для биологии и биомедицины, которые трудно переоценить.

Вместе с тем, следует иметь в виду, что анализ картины рассеяния мощного лазерного рентгеновского излучения на единичных (некристаллических или сильно дефектных) образцах и решение для них обратной задачи рассеяния ставит ряд весьма нетривиальных физических, математических и вычислительных проблем. Эффект суммарного рассеяния квантов на всех атомах макромолекулы, ограниченность статистики по числу фотонов от рассеяния на единичном образце, проблемы с неопределенной ориентацией и конформацией частицы во время эксперимента, существенный вклад в картину рассеяния неупругих процессов делает решение обратной задачи рассеяния одной из самых трудных и амбициозных для современной структурной биологии. В качестве приза при решении этой задачи мы получим качественный скачок в наших знаниях о структуре и функциональной динамике биообъектов.

В последнее время в России и Европе интенсивно проводятся исследования и разработки в области математического и компьютерного обеспечения работ в этом направлении с ориентировкой на возможности рентгеновского лазера в Гамбурге, который вступит в строй по плану в 2017 г. Эти работы ведутся, в частности, в гамбургском отделении EMBL и в России (МГУ, НИЦ «Курчатовский институт», ИБХ РАН и ИХФ РАН). Сделанные на секции доклады по данной проблеме от всех вышеперечисленных участников разработки показали хорошую координацию и взаимную дополняемость проводимых исследований. Проведенные дискуссии и обсуждения докладов дают основания считать, что к настоящему моменту сформировалась работоспособная международная команда исследователей, активно работающих над основными аспектами проблемы обработки информации, получаемой при рассеянии излучения рентгеновского лазера биообъектами. Это в настоящее время является одним из важнейших этапов подготовки к планируемым экспериментам на рентгеновском лазере. Отметим также, что в НИЦ «Курчатовский институт» начаты работы по подготовке

вычислительной инфраструктуры для обработки и хранения данных экспериментов с XFEL на Курчатовском суперкомпьютере. Системы хранения и обработки после завершения проекта позволят аккумулировать все необходимые данные и результаты экспериментов, проводимых российской стороной.

Основные работы на данный момент сфокусированы на решении следующих проблем:

- Разработка методов быстрого детектирования и классификации изображений, содержащих дифракционную картину, получаемых при дифракции рентгеновского лазерного излучения на макромолекулах, создание средств компьютерного моделирования неупругих эффектов из первых принципов (НИЦ «Курчатовский институт»).
- Изучение и моделирование неупругих эффектов (включая нестационарные формфакторы) при рассеянии интенсивного рентгеновского излучения макромолекулами и влияние конформационных движений на дифракцию рентгеновского лазерного импульса на нанокристаллах (ИХФ РАН).
- Изучение роли мембранных компонент при дифракции на белок-мембранных комплексах (ИБХ РАН и Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова (СВФУ)).
- Разработка компьютерных методов восстановления пространственной структуры белков путем анализа карт электронной плотности низкого разрешения, получаемых при рассеянии рентгеновского лазерного излучения на единичных белковых структурах с использованием биоинформационных баз данных, методов молекулярного моделирования, анализа 3D изображений (МГУ, биологический факультет).
- Разработка новых подходов для восстановления изображений сложных объектов, включая клеточные структуры по дифракции рентгеновского лазерного излучения (EMBL).

Один из докладов, представленных совместно МГУ и ИХФ РАН, был также посвящен разработке пилотного проекта по демонстрации возможностей XFEL при изучении функциональной динамики белков. Удобной системой для этого являются первичные стадии фотоиндуцированных превращений в

зрительных белках. Реакция фотоизомеризации ретиналя в родопсине является одной из самых быстрых в природе. Элементарный химический акт фотоизомеризации протекает за время порядка 80 фс. Следует отметить, что скорость фотоизомеризации свободного ретиналя в растворе на два порядка медленнее. Выяснение молекулярного механизма протекания фотоиндуцированных структурных перестроек ретиналя в белковой матрице является актуальной задачей как с фундаментальной точки зрения, т.е. выяснения фундаментальных основ зрительного восприятия, так и в прикладном аспекте. Сегодня ретинальсодержащие белки – родопсин и бактериородопсин – рассматриваются в качестве прообразов фотоуправляемого сверхскоростного молекулярного переключателя.

Заглядывая несколько вперед, следует обратить внимание и на другие крайне интересные с точки зрения современной биомедицины объекты исследований. Речь идет прежде всего о достаточно широком спектре мембранных белков и рецепторов, играющих важнейшую роль в регуляции физиологических функций клетки. Это и ионные каналы, различные GPCR рецепторы и их комплексы с другими белками и лигандами. Все эти объекты весьма трудно кристаллизуются или, в большинстве случаев, вообще не кристаллизуются. Однако их структурные изменения при функционировании являются ключом к пониманию и управлению их функциями. Именно поэтому с применением рентгеновских лазеров на свободных электронах в структурной биологии можно ожидать качественно новых результатов.

Рекомбинантные штаммы *E.coli* – продуценты бета-лактамаз. Поиск новых ингибиторов бета-лактамаз для преодоления бактериальной резистентности к антибиотикам *

Григоренко В.Г., Рубцова М.Ю., Егоров А.М., Каролан К., Ламзин В.С.

Бета-лактамы антибиотики, к которым относятся пенициллины, цефалоспорины, монобактамы и карбапенемы, являются наиболее широко используемым классом антибактериальных средств для лечения инфекций. Основным фактором, ограничивающим клиническую эффективность бета-лактамовых антибиотиков, является способность микроорганизмов вырабатывать гидролитические ферменты бета-лактамазы, разрушающие структуру антибиотика. Ингибирование данных ферментов является в настоящее время наиболее перспективным способом преодоления резистентности бактерий к антибиотикам данного класса.

Целью настоящей работы является поиск новых эффективных ингибиторов бета-лактамаз на основе знания детальной структуры ферментов и их комплексов с потенциальными ингибиторами с целью повышения эффективности антибактериальной терапии инфекционных заболеваний. Создан биобанк рекомбинантных штаммов *E.coli* – продуцентов бета-лактамаз молекулярного класса А. Разработана эффективная система экспрессии рекомбинантной бета-лактамазы класса А TEM-1 и CTX-M-2 в клетках *E.coli* для изучения в условиях *in vitro/in vivo*. Разработан метод выделения и очистки активных гомогенных форм рекомбинантных ферментов и определены их каталитические параметры по субстрату CENTA. Впервые определены значения констант ингибирования гидролиза субстрата CENTA для рекомбинантной бета-лактамазы TEM-1 сульбактамом, тазобактамом и клавулановой кислотой, а также для новых синтетических ингибиторов, предсказанных *in silico* в группе Виктора Ламзина в ЕМБЛ в Гамбурге. В результате были выявлены соединения, обладающие наилучшими параметрами ингибирования. Показано, что рекомбинантные штаммы *E.coli* могут быть использованы для скрининга потенциальных антибиотиков и ингибиторов бета-лактамаз *in vivo*.

Ключевые слова: ингибиторы бета-лактамаз, рекомбинантные бета-лактамазы, антибиотикорезистентность.

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 12-04-92425-EMBL-a).

В настоящее время бета-лактамы антибиотики, особенно пенициллины и цефалоспорины I-IV поколения, широко используются для лечения тяжелых инфекционных заболеваний, вызываемых как грамотрицательными, так и грамположительными микроорганизмами, и составляют более 50% мирового рынка антибиотиков [1]. Однако эффективность их применения ограничена появлением и распространением устойчивых к действию антибиотиков штаммов

микроорганизмов [2-4]. Известно несколько механизмов резистентности микроорганизмов к бета-лактамам антибиотикам, однако основным из них у грамотрицательных микроорганизмов является продукция бактериальных ферментов – бета-лактамаз (Е.С.3.5.2.6). Бета-лактамазы представляют собой суперсемейство генетически и функционально различных ферментов, которых объединяет способность расщеплять бета-лактамно кольцо, в результате чего антибиотик теряет свою активность [5-8]. Мутантные формы бета-лактамаз обладают расширенной субстратной специфичностью и различными каталитически-



ГРИГОРЕНКО

Виталий Георгиевич
кандидат химических наук,
старший научный сотрудник
Московского государственного
университета имени
М.В. Ломоносова.



РУБЦОВА

Майя Юрьевна
кандидат химических наук,
ведущий научный
сотрудник Московского
государственного университета имени
М.В. Ломоносова.



ЕГОРОВ

Алексей Михайлович
академик РАН, заведующий
лабораторией инженерной энзимологии
химического факультета
Московского государственного университета
имени М.В. Ломоносова.



КАРОЛАН

Киран
кандидат химических наук,
Европейская молекулярно-биологическая
лаборатория (EMBL).



ЛАМЗИН

Виктор Станиславович
кандидат химических наук, заместитель
директора Европейской молекулярно-биологической
лаборатории (EMBL).

Таблица 1. Типы бета-лактамаз, составляющие созданный биобанк рекомбинантных плазмид и штаммов-продуцентов бета-лактамаз

Класс бета-лактамаз	Биобанк рекомбинантных плазмид	Биобанк рекомбинантных штаммов <i>E.coli</i> DH5 α , BL21(DE3) ρ LysS	Биобанк рекомбинантных препаратов ферментов
Класс А	TEM-1 TEM-29 TEM-30 TEM-31 TEM-79 TEM-143 CTX-M-2	TEM-1 TEM-29 TEM-30 TEM-31 TEM-79 TEM-143 CTX-M-2	TEM-1 CTX-M-2
Класс В	IMP-1 VIM-2 VIM-4	IMP-1 VIM-2 VIM-4	VIM-4
Класс D	OXA-40	OXA-40	

ми свойствами, что резко ограничивает эффективность действия новых бета-лактаменных антибиотиков.

Создание биобанка штаммов *E.coli* – продуцентов бета-лактамаз

Совместный проект «Поиск новых ингибиторов бета-лактамаз для преодоления бактериальной резистентности к антибиотикам» лаборатории инженерной энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова и Европейской лабораторией молекулярной биологии (EMBL, Hamburg) направлен на создание инновационных подходов для поиска новых ингибиторов бета-лактамаз для преодоления антибиотикорезистентности. С этой целью проводился поиск новых эффективных ингибиторов бета-лактамаз методом компьютерного моделирования и рентгеноструктурного анализа детальной структуры комплексов ферментов с ингибиторами.

Для скрининга ингибиторов в условиях *in vitro/in vivo* был создан биобанк штаммов *E.coli* и разработаны эффективные системы экспрессии генов рекомбинантных бета-лактамаз класса А, позволяющие получать рекомбинантные ферменты в растворимой функционально-активной форме в периплазме клеток *E.coli* (таблица 1). Методом рентгено-структурного анализа была

подтверждена структура рекомбинантной бета-лактамазы TEM-1. Индивидуальные формы рекомбинантных бета-лактамаз могут быть использованы для изучения новых синтетических ингибиторов, предсказанных *in silico*, а также проведения работ по рентгено-структурному анализу комплексов новых потенциальных ингибиторов с ферментом с целью установления их места локализации и механизма связывания с ферментом-мишенью.

В дальнейшем созданный биобанк рекомбинантных штаммов и рекомбинантных ферментов предполагается использовать как для изучения эффективности действия существующих бета-лактаменных антибиотиков, так и для создания новых антибиотиков и поиска новых ингибиторов бета-лактамаз как *in vitro*, так и *in vivo*, а также для получения контрольных (референсных) образцов генов бета-лактамаз для стандартизации диагностических тест-систем для идентификации генетических детерминант антибиотикорезистентности.

Поиск и тестирование новых потенциальных ингибиторов бета-лактамаз

Существующие в медицинской практике ингибиторы бета-лактамаз обладают узкой специфичностью, кроме того, большинство из них по структуре являются бета-лактамами, и их присутствие в биосфере на протяжении многих лет могло привести к появлению нечувствительных к ним штаммов. Учитывая высокую скорость мутирования генов бета-лактамаз, а также влияние некоторых мутаций на изменение и расширение профиля субстратной специфичности ферментов, появление новых нечувствительных штаммов представляет большую опасность в течении инфекционного заболевания.

кубации в течение ночи при 37°C анализировали рост колоний на чашках с ампициллином и без него. На *рис. 1* представлены фотографии чашек Петри, на которых видно, что при добавлении в среду с канамицином и ампициллином нового потенциального ингибитора сериновых бета-лактамаз Nr-6922126, рост колоний значительно снижался. Этот простой метод может быть использован в качестве биотеста для скрининга потенциальных лекарственных средств и ингибиторов бета-лактамаз.

Заключение

В результате выполнения совместного с лабораторией EMBL проекта «Поиск новых ингибиторов

бета-лактамаз для преодоления бактериальной резистентности к антибиотикам» были экспериментально установлены параметры ингибирования для новых синтетических ингибиторов, предсказанных *in silico*, а также начаты работы по рентгено-структурному анализу комплексов новых потенциальных ингибиторов с ферментом с целью установления мест локализации и механизма связывания с ферментом-мишенью.

Кроме того, эта работа позволит на основе экспериментальных биохимических данных оценить эффективность предложенных на основании *in silico* расчетов потенциальных ингибиторов бета-лактамаз; установить специфические взаимодействия, влияющие на параметры связывания ингибиторов с бета-лактамазами. Это, в свою очередь, станет основой для создания инновационных подходов для преодоления антибиотикорезистентности и поиск адекватных способов повышения эффективности лечения инфекционных заболеваний.

Литература

- Elander R.P.** Industrial production of beta-lactam antibiotics. // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2003. – Vol. 61, no. 5–6 – PP. 385–392.
- Poole K.** Resistance to beta-lactam antibiotics. // *Cell Mol Life Sci.* – 2004. – Vol. 61, no. 17. – PP. 2200–2223.
- Livermore D.M., Pearson A.** Antibiotic resistance: location, location, location. // *Clin Microbiol Infect.* – 2007. – Vol. 13. – PP. 7–16.
- Harada S., Ishii Y., Yamaguchi K.** Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical laboratory and therapy. // *Korean J Lab Med.* – 2008. – Vol. 28, no. 6. – PP. 401–412.
- Leinberger D., Grimm V., Rubtsova M.Y., Weile J., Schroepfel K, Wichelhaus T., Knabbe C., Schmid R., Bachmann T.** Integrated Detection of Extended-Spectrum-Beta-Lactam Resistance by DNA Microarray-Based Genotyping of TEM, SHV, and CTX-M Genes // *Journal of Clinical Microbiology.* – 2010. – Vol. 48, no. 2. – PP. 460–471.
- Rubtsova M.Y., Ulyashova M.M., Bachmann T.T., Schmid R.D., Egorov A.M.** Multiparametric determination of genes and their point mutations for identification of beta-lactamases. // *Biochemistry (Mosc).* – 2010. – Vol. 75, no. 13. – PP. 1628–1649.
- Rubtsova M.Y., Ulyashova M.M., Edelstein M.V., Egorov A.M.** Oligonucleotide microarrays with horseradish peroxidase-based detection for the identification of extended-spectrum beta-lactamases. // *Biosens Bioelectron.* – 2010. – Vol. 26, no. 4. – PP. 1252–1260.
- Иванов Д.В., Егоров А.М.** Распространение и механизмы резистентности микроорганизмов, продуцирующих бета-лактамазы. // *Биомедицинская химия.* – 2009. – Т. 55, № 1. – С. 50–59.
- Horn J.R., Shoichet B.K.** Allosteric Inhibition Through Core Disruption. // *J. Mol. Biol.* – 2004. – Vol. 336. – PP. 1283–1291.

Биосенсоры для детекции редокс-активных соединений*

Белоусов В.В., Билан Д.С., Матлашов М.Е., Шульц К.

Молекулярный кислород является центральной молекулой для аэробных форм жизни, являясь не только терминальным акцептором электронов в дыхательных цепях, но и глобальным регулятором многих физиологических и патологических процессов. Данная регуляция осуществляется активными формами кислорода (АФК), которые производятся в клетке строго контролируемым образом. Неконтролируемая продукция АФК ведет к неспецифичному повреждению белков, липидов и ДНК: состоянию, известному как «окислительный стресс».

В последние годы создание синтетических красителей и генетически кодируемых сенсоров сделало возможным наблюдение за динамикой H_2O_2 в живых организмах. Генетически кодируемые сенсоры обладают такими преимуществами, как высокая селективность, возможность направленной доставки сенсора в субклеточные компартменты, а также возможность создания трансгенных линий животных, экспрессирующих сенсор. Создание новых генетически кодируемых сенсоров АФК является целью совместного проекта EMBL-РФФИ «Изучение взаимосвязи между фосфолипид-опосредованной и окислительно-восстановительной передачей сигнала в клетке». Результатом двух лет выполнения проекта стало создание нескольких молекулярных инструментов, предназначенных для детекции АФК и других редокс-активных соединений.

Ключевые слова: активные формы кислорода, биосенсоры, НАДН, оксидаза D-аминокислот.

*

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 12-04-92427-EMBL-a).

Генерация пероксида водорода с одновременной детекцией

Дрожжевая оксидаза D-аминокислот (D-amino acid oxidase, DAO) может быть использована в роли генетически кодируемого генератора H_2O_2 в клетках при изучении окислительного стресса и редокс-сигналинга. Оксидаза окисляет D-аминокислоты с высвобождением H_2O_2 (1). При гетерологической экспрессии DAO в клетках животных, L-аминокислоты, используемые клетками для биосинтеза белка, не являются субстратами DAO, и пероксид водорода не производится. При добавлении субстрата, например D-аланина, в среду культивации, образуется пероксид водорода. Однако динамика продукции H_2O_2 в клетке и чувствительность этой продукции к концентрации добавленного D-Ala оставалась неисследованной. Мы разработали молеку-

лярный инструмент на основе DAO, позволяющий не только продуцировать H_2O_2 (2), но и визуализировать продукцию пероксида водорода. Для этого мы объединили в одну белковую молекулу DAO, ген которой был оптимизирован по кодонам для оптимальной экспрессии в клетках млекопитающих, и *HyPer* – генетически кодируемый индикатор H_2O_2 (рис. 1). При экспрессии в клетках млекопитающих химерный белок *HyPer*-DAO отвечал изменением флуоресценции на добавление D-Ala.

Мы продемонстрировали работоспособность системы на двух клеточных линиях, HeLa-Kyoto и NIH-3T3. На рис. 2 приведены результаты для линии NIH-3T3. Несмотря на миллимолярные концентрации добавленного D-Ala, концентрация H_2O_2 в цитоплазме не превышала 50-100 нМ. Это, по-видимому, связано с тем, что лимитирующим субстратом в данном случае является молекулярный кислород, концентрация которого не превышает 0,2 мМ для культур клеток и 0,02 мМ для тканей в организме. Более подробно о результатах исследования можно узнать из статьи в журнале *Antioxidants & Redox Signaling* (2).

RexYFP: генетически кодируемый сенсор для детекции соотношения НАД⁺/НАДН

Важнейшим клеточным параметром является соотношение НАД⁺ к НАДН. НАД⁺/НАДН индекс отражает окислительно-восстановительный и общий мета-



БЕЛОУСОВ

Всеволод Вадимович

доктор биологических наук, руководитель Группы биологии активных форм кислорода Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.



БИЛАН

Дмитрий Сергеевич

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



МАТЛАШОВ

Михаил Егорович

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



ШУЛЬЦ

Карстен

руководитель группы EMBL в Гейдельберге, Германия

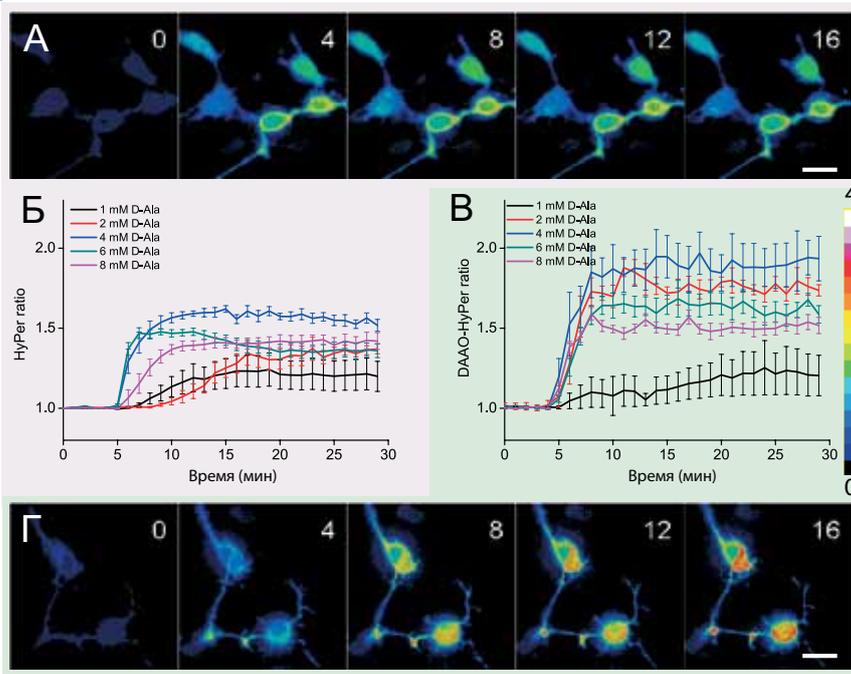


Рис. 1. Сравнение химерного белка HyPer-DAO с коэкспрессией HyPer и DAO в клетках NIH-3T3. А. Радиодетектируемые изображения клеток NIH-3T3, трансфицированных векторами, кодирующими HyPer и DAO. Числа отражают время в минутах. Б. Динамика изменений сигнала сенсора HyPer при коэкспрессии с DAO после добавления различных концентраций D-Ala. В. Динамика изменений сигнала сенсора HyPer в составе химерного белка с DAO после добавления различных концентраций D-Ala. Г. Радиодетектируемые изображения клеток NIH-3T3, трансфицированных вектором, кодирующим химерный белок HyPer-DAO. Числа отражают время в минутах. Цветовая шкала отражает сигнал HyPer или HyPer-DAO. Масштабная линейка 20 мкм

болический статус клетки (3). В цитоплазме значение этого параметра строго регулируется и может изменяться от 700 до 1 (4, 5), в то время как в митохондриях диапазон изменений составляет от 7-8 до 1 (4).

На сегодняшний день прямых методов регистрации изменений NAD^+/NADH соотношения в клетках в режиме реального времени не существует. Широко распространенные УФ- и двухфотонная микроскопия позволяют визуализировать лишь флуоресцирующий

НАДН, но не дают информации о динамике изменений NAD^+ , а, следовательно, и NAD^+/NADH соотношения (6-9). Вместе с НАДН детектируются и окисленные флавины, флуоресцирующие в той же области спектра. Мы разработали новый метод, позволяющий регистрировать динамику изменения соотношения NAD^+/NADH в клетках. На основе белка T-Rex (из *Thermus aquaticus*) (10), который является природным сенсором NAD^+/NADH , и желтого флуоресцентного белка cpYFP мы создали генетически кодируемый флуоресцентный сенсор RexYFP для детекции NAD^+/NADH . T-Rex пребывает в двух конформационных состояниях, зависящих от уровня НАДН в системе. Мы интегрировали cpYFP в последовательность T-Rex, предполагая, что конформационные изменения T-Rex вызовут изменения спектральных характеристик флуоресцентного белка в составе конструкции T-Rex-cpYFP, что позволит осуществлять мониторинг динамики NAD^+/NADH соотношения.

В опытах *in vitro* образование НАДН в пробе вызывало увеличение поглощения при 340 нм при одновременном уменьшении интенсивности возбуждения пика 490 нм в этой же пробе, в то время как интенсивность на 420 нм оставалась неизменной (означает рост F_{420}/F_{490}) (рис. 2). Мы установили, что RexYFP отвечает даже на небольшие количе-

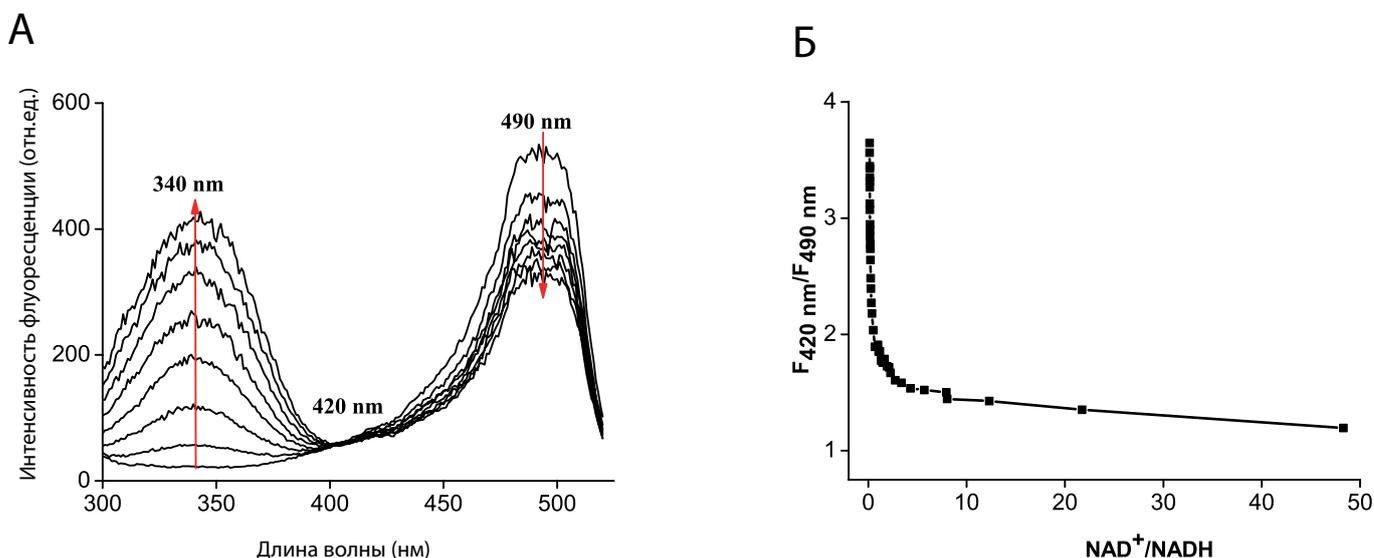


Рис. 2. Изменения спектра RexYFP при изменении соотношения NAD^+/NADH . А. Спектр возбуждения флуоресценции сопряженной ферментативной системы, содержащей НАДН и RexYFP. Б. Зависимость сигнала сенсора от соотношения NAD^+/NADH

ства НАДН, который появляется на начальных стадиях реакции. Таким образом, будучи в составе сенсора, домен T-Rex сохранил способность отвечать на небольшие изменения концентрации НАДН даже в присутствии избытка НАД⁺, АТФ и АДФ. Сигнал RexYFP не зависел от его концентрации в пробе. При экспрессии в клетках эукариот RexYFP позволил впервые детектировать динамику соотношения НАД⁺/НАДН в митохондриях и цитоплазме. Получить более полную информацию можно в статье в журнале *Biochim Biophys Acta* (11).

HyPer-3: быстрый сенсор пероксида водорода с высоким динамическим диапазоном

В результате замены Н34У в HyPer был получен биосенсор с высоким соотношением сигнала к шуму, названный HyPer-3 (рис. 3). Мы провели измерения полупериодов окисления и восстановления для HyPer, HyPer-2 и HyPer-3. Полупериод окисления HyPer-3 был в 1,4 раза быстрее, чем окисления HyPer-2. Полупериод восстановления HyPer-3 был наиболее коротким среди всех исследуемых образцов. Высокий динамический диапазон HyPer-3 существенно упрощает детекцию H₂O₂ в тканях *in vivo*. Мы также установили, что сенсоры на основе одного флуорофора способны менять время жизни флуоресценции при активации, что позволяет наблюдать за ними с помощью микроскопии с детекцией времени жизни флуоресценции (FLIM). Более подробно ознакомиться с результатами данной работы можно в статье в журнале *ACS Chemical Biology* (12).

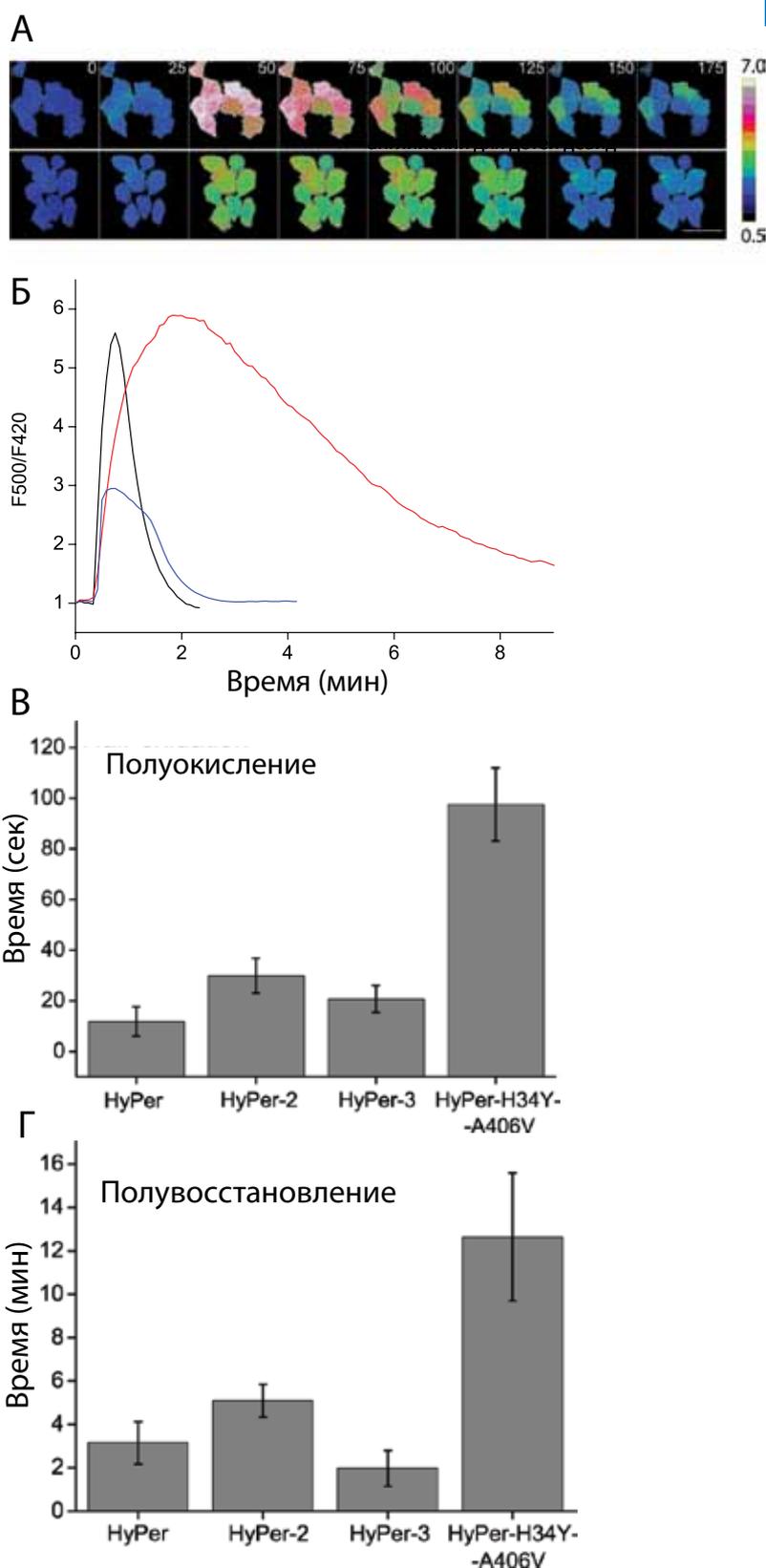


Рис. 3. Сравнение сенсора HyPer-3 с HyPer-2 и HyPer

А. Изменения соотношения F500/F420 в ответ на добавление 150 мкМ H₂O₂ к клеткам, экспрессирующим HyPer-3 (верхний ряд изображений) и HyPer (нижний ряд изображений). Числа отражают время в секундах для обоих рядов изображений. Шкала 40 мкМ

Б. Типичная динамика изменений соотношения F500/F420 в ответ на экзогенный H₂O₂ в клетках, экспрессирующих HyPer-3 (черная кривая), HyPer-2 (красная кривая) и HyPer (синяя кривая)

В. Времена полукисления HyPer, HyPer-2, HyPer-3, и HyPer-H34Y-A406V. Нулевой момент времени соответствует моменту добавления H₂O₂. Показаны средние значения и стандартное отклонение

Г. Времена полувосстановления HyPer, HyPer-2, HyPer-3, и HyPer-H34Y-A406V. Нулевой момент времени соответствует максимальному значению F500/F420. Показаны средние значения и стандартное отклонение. Данные панелей В и Г получены в результате обработки 7 экспериментов для HyPer, 10 для HyPer-2, 10 для HyPer-3, и 4 для HyPer-H34Y-A406V; >10 клеток в каждом эксперименте

Литература

1. *Pollegioni L., Diederichs K., Molla G., Umhau S., Welte W., Ghisla S., Pilone M.S.*
Yeast D-amino acid oxidase: structural basis of its catalytic properties. – *J Mol Biol*, 2002. – Vol. 324, – PP. 535–546.
2. *Matlashov M.E., Belousov V.V., Enikolopov G.*
How Much H₂O₂ Is Produced by Recombinant D-Amino Acid Oxidase in Mammalian Cells. – *Antioxid Redox Signal.* – 2013 in press.
3. *Xie W., Xu A., Yeung E.S.*
Determination of NAD(+) and NADH in a single cell under hydrogen peroxide stress by capillary electrophoresis. – *Anal Chem*, 2009. – Vol. 81. – PP. 1280–1284.
4. *Williamson D.H., Lund P., Krebs H.A.*
The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. – *Biochem J*, 1967. – Vol. 103. – PP. 514–527.
5. *Ying W.*
NAD⁺ and NADH in cellular functions and cell death. *Front Biosci*, 2006, Vol 11, pp 3129–3148.
6. *Liang B., Petty H.R.*
Imaging neutrophil activation: analysis of the translocation and utilization of NAD(P)H-associated autofluorescence during antibody-dependent target oxidation. – *J Cell Physiol*, 1992. – Vol. 152. – PP. 145–156.
7. *Pan L., Zhang X., Song K., Tang B., Cai W., Wu X., Rupp R.A., Xu J.*
Real-time imaging of autofluorescence NAD(P)H in single human neutrophils. – *Appl Opt* 2009. – Vol. 48. – PP. 1042–1046.
8. *Piston D.W., Masters B.R., Webb W.W.*
Three-dimensionally resolved NAD(P)H cellular metabolic redox imaging of the in situ cornea with two-photon excitation laser scanning microscopy. – *J Microsc*, 1995. – Vol. 178. – PP. 20–27.
9. *Rocheleau J.V., Head W.S., Piston D.W.*
Quantitative NAD(P)H/flavoprotein autofluorescence imaging reveals metabolic mechanisms of pancreatic islet pyruvate response. – *J Biol Chem*, 2004. – Vol. 279. – PP. 31780–31787.
10. *McLaughlin K.J., Strain-Damerell C.M., Xie K., Brekasis D., Soares A.S., Paget M.S., Kielkopf C.L.*
Structural basis for NADH/NAD⁺ redox sensing by a Rex family repressor. – *Mol Cell* 2010. – Vol. 38. – PP. 563–575.
11. *Bilan D.S., Matlashov M.E., Gorokhovatsky A.Y., Schultz C., Enikolopov G., Belousov V.V.*
Genetically encoded fluorescent indicator for imaging NAD/NADH ratio changes in different cellular compartments. *Biochim Biophys Acta*, 2013. – Vol. 1840. – PP. 951–957.
12. *Bilan D.S., Pase L., Joosen L., Gorokhovatsky A.Y., Ermakova Y.G., Gadella T.W., Grabher C., Schultz C., Lukyanov S., Belousov V.V.*
HyPer-3: A Genetically Encoded H₂O₂ Probe with Improved Performance for Ratiometric and Fluorescence Lifetime Imaging. – *ACS Chem Biol*. – Vol. 20138. – PP. 535–542.

English

Redox Biosensors^{*}

Vsevolod V. Belousov –

PD.sci, biological sciences, Lab head
Shemyakin-Ovchinnikov Institute
of Bioorganic Chemistry,
Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997, Russia
e-mail: vsevolod.belousov@gmail.com

Mikhail E. Matlashov –

PhD, student, Shemyakin-Ovchinnikov Institute
of Bioorganic Chemistry,
Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997, Russia
e-mail: matlashowww@mail.ru

Dmitry S. Bilan –

PhD, student, Shemyakin-Ovchinnikov Institute
of Bioorganic Chemistry,
Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997, Russia
e-mail: d.s.bilan@gmail.com

Carsten Schultz –

Group Leader EMBL Heidelberg
Meyerhofstraße 1, Heidelberg, 69117, Germany
e-mail: schultz@embl.de

Abstract

Oxygen is a central molecule in aerobic life being not only a terminal electron acceptor in respiratory chains, but also a global regulator of many physiological and pathological processes. This regulation acts via reactive oxygen species (ROS) produced in the cell in a highly controlled way. Overproduction of ROS causes damage of many biological molecules: a condition called "oxidative stress".

In the last years synthetic and genetically encoded redox probes appeared allowing H₂O₂ detection within the cells and tissues. Genetically encoded sensors are highly selective and sensitive, they can be targeted to various cellular compartments and particular cell types within transgenic animals. A joint EMBL-RFBR project "Probing the connection of redox and lipid signaling" is aimed at the development of molecular tools for detecting ROS and other redox-active substances.

Keywords: reactive oxygen species, biosensors, NADH, D-amino acid oxidase.

*

The work was financially supported by RFBR (project № 12-04-92427-EMBL-a).

References

1. **Pollegioni L., Diederichs K., Molla G., Umhau S., Welte W., Ghisla S., Pilone M.S.**
Yeast D-amino acid oxidase: structural basis of its catalytic properties. – *J Mol Biol*, 2002. – Vol. 324. – PP. 535–546.
2. **Matlashov M.E., Belousov V.V., Enikolopov G.**
How Much H₂O₂ Is Produced by Recombinant D-Amino Acid Oxidase in Mammalian Cells. – *Antioxid Redox Signal*. – 2013 in press.
3. **Xie W., Xu A., Yeung E.S.**
Determination of NAD(+) and NADH in a single cell under hydrogen peroxide stress by capillary electrophoresis. – *Anal Chem*, 2009. – Vol. 81. – PP. 1280–1284.
4. **Williamson D.H., Lund P., Krebs H.A.**
The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. – *Biochem J*, 1967. – Vol. 103. – PP. 514–527.
5. **Ying W.**
NAD+ and NADH in cellular functions and cell death. *Front Biosci*, 2006, Vol 11, pp 3129–3148.
6. **Liang B., Petty H.R.**
Imaging neutrophil activation: analysis of the translocation and utilization of NAD(P)H-associated autofluorescence during antibody-dependent target oxidation. – *J Cell Physiol*, 1992. – Vol. 152. – PP. 145–156.
7. **Pan L., Zhang X., Song K., Tang B., Cai W., Wu X., Rupp R.A., Xu J.**
Real-time imaging of autofluorescence NAD(P)H in single human neutrophils. – *Appl Opt* 2009. – Vol. 48. – PP. 1042–1046.
8. **Piston D.W., Masters B.R., Webb W.W.**
Three-dimensionally resolved NAD(P)H cellular metabolic redox imaging of the in situ cornea with two-photon excitation laser scanning microscopy. – *J Microsc*, 1995. – Vol. 178. – PP. 20–27.
9. **Rocheleau J.V., Head W.S., Piston D.W.**
Quantitative NAD(P)H/flavoprotein autofluorescence imaging reveals metabolic mechanisms of pancreatic islet pyruvate response. – *J Biol Chem*, 2004. – Vol. 279. – PP. 31780–31787.
10. **McLaughlin K.J., Strain-Damerell C.M., Xie K., Brekasis D., Soares A.S., Paget M.S., Kielkopf C.L.**
Structural basis for NADH/NAD+ redox sensing by a Rex family repressor. – *Mol Cell* 2010. – Vol. 38. – PP. 563–575.
11. **Bilan D.S., Matlashov M.E., Gorokhovatsky A.Y., Schultz C., Enikolopov G., Belousov V.V.**
Genetically encoded fluorescent indicator for imaging NAD/NADH ratio changes in different cellular compartments. *Biochim Biophys Acta*, 2013. – Vol. 1840. – PP. 951–957.
12. **Bilan D.S., Pase L., Joosen L., Gorokhovatsky A.Y., Ermakova Y.G., Gadella T.W., Grabher C., Schultz C., Lukyanov S., Belousov V.V.**
HyPer-3: A Genetically Encoded H₂O₂ Probe with Improved Performance for Ratiometric and Fluorescence Lifetime Imaging. – *ACS Chem Biol*. – Vol. 20138. – PP. 535–542.

Структурные исследования биокатализаторов. Биокатализаторы-антидоты к фосфорорганическим отравляющим веществам *

Смирнов И.В., Белогуров А.А., Миткевич В.А., Федорова О.С., Фрибуле А.,
Ламзин В.С., Вильманс М., Габиров А.Г.

Задачи биотехнологии и фундаментальные проблемы биокатализа делают актуальной проблему создания новых биокатализаторов. Изучение взаимосвязи структуры и функции ферментов перспективно как с точки зрения фундаментальной науки, так и практического применения. К настоящему моменту разработаны методы получения каталитических антител, основанные на отборе по реакционной способности, например, получение «реактибоди». Именно этим способом было получено антитело А17, которое с высокой эффективностью взаимодействовало с фосфорорганическими соединениями. Для определения роли константного домена легкой цепи на функциональную активность каталитического антитела А17 совместно с коллегами из ЕМБЛ нами впервые были получены кристаллические структуры вариантов «реактибоди» А17, имеющих абсолютно идентичную аминокислотную последовательность антигенсвязывающего центра и отличающихся только константными доменами легкой цепи. Было проведено уникальное количество экспериментов по физико-химическому анализу вариантов антитела с различными изотипами легкой цепи. Впервые было установлено влияние изотипа константного домена легкой цепи на каталитическую и антигенсвязывающую функцию антитела. Фармакокинетические исследования показали, что препарат антитела, нейтрализующего фосфорорганические соединения, имеет лишь незначительно меньший период полувыведения из кровотока, что делает его потенциальным препаратом для лечения интоксикации организма фосфорорганическими ядами. Подобное антитело-антидот получено впервые. Полученные нами результаты по изучению влияния замены константного домена легкой цепи антитела должны учитываться при работе с репертуарами иммуноглобулинов и могут быть использованы исследователями, работающими в области создания новых биокатализаторов и препаратов на основе антител.

Ключевые слова: каталитические антитела, фосфорорганические токсины, структура антител, изотипы антител.

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 12-04-92428-ЕМБЛ-а).

Биокатализ является одной из основополагающих функций белков. Все процессы жизнедеятельности организма связаны с биокаталитическими превращениями различных метаболитов. Нарушение в механизмах функционирования биокатализато-

ров неизбежно влечет за собой возникновение целого ряда патологий. Основные биокаталитические превращения в организме осуществляются эволюционно совершенными



СМИРНОВ

Иван Витальевич

кандидат химических наук, старший научный сотрудник Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН имени М.В. Ломоносова.



БЕЛОГУРОВ

Алексей Анатольевич

кандидат химических наук, старший научный сотрудник Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН имени М.В. Ломоносова.



МИТКЕВИЧ

Владимир Александрович

старший научный сотрудник Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.



ФЕДОРОВА

Ольга Семеновна

профессор, заведующий лабораторией Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН.



ФРИБУЛЕ

Алан

профессор, заведующий лабораторией Технологического Университета г. Компьень, Франция.



ЛАМЗИН

Виктор Станиславович

кандидат химических наук, заместитель директора и заведующий секцией лабораторией отделения EMBL в Гамбурге, Германия.



ВИЛЬМАНС

Маттиас

профессор, директор и заведующий секцией лабораторией отделения EMBL в Гамбурге, Германия.



ГАБИРОВ

Александр Габирович

член-корреспондент РАН, заместитель директора и заведующий лабораторией биокатализа Института биоорганической химии имени ак. М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

белковыми катализаторами – ферментами. Впоследствии стало очевидным, что спектр биокаталитических молекул существенно шире и в 1989 г. за открытие каталитических РНК Нобелевская премия была присуждена Сиднею Алтману и Томасу Чеху. В конце 80-х гг. прошлого столетия благодаря усилиям исследователей из США, Великобритании, Франции и России была доказана гипотеза Лайнуса Полинга о возможности осуществления биокаталитических превращений антителами (иммуноглобулинами) и были получены каталитические антитела – абзимы (abzyme – производное слова AntiBody – антитело и enzyme – фермент), способные катализировать десятки химических превращений. Молекулы антител обладают уникальным свойством – гиперизменчивостью структуры. Это факт, с точки зрения теории рекомбинации ДНК, был объяснен Лауреатом Нобелевской премии Сусумо Tonegawa. Именно свойство гиперизменчивости дает принципиальную возможность получать широкие репертуары биокатализаторов, используя антительные матрицы. Особый интерес с точки зрения биотехнологического применения представляли реакции, которые удавалось катализировать с помощью абзимов, но которые невозможно было «ускорять» с помощью существующих ферментов. Так в руки исследователей попал инструмент, позволивший создавать биокатализаторы de novo, используя молекулы иммуноглобулинов. В данном проекте РФФИ-EMBL была поставлена задача создания платформы на основе каталитических антител с целью получения потенциальных антидотов к фосфорорганическим отравляющим веществам, токсинам. Решение этого вопроса требовало как углубленных биохимических исследований, так и проведения исследований структуры создаваемых новых биокатализаторов.

Фосфорорганические токсины (ФОТ) занимают ведущее место по токсич-

ности для животных и человека среди всех известных на сегодняшний день. К ним относят ряд пестицидов, зарин, зоман, газ VX. В основе действия ФОТ лежит необратимое связывание токсина с ацетилхолинэстеразой высших организмов. Современные протекторы и терапевтические агенты, применяемые при отравлении ФОТ, не совершенны, низкомолекулярные антидоты на основе оксимов (диприроксим, обидоксим, пралидоксим) токсичны и взаимодействуют с ФОТ в значительных концентрациях до 50 мг/кг. Среди наиболее перспективных новых антидотов, способных нейтрализовать ФОТ, выделяется фермент – бутирилхолинэстераза. На сегодняшний день человеческую бутирилхолинэстеразу получают очисткой плазмы крови, что весьма дорого и налагает жесткие требования к тестированию исходного материала в связи с контаминациями донорской плазмы вирусами. Проект получения рекомбинантного фермента в достаточных количествах не был реализован ни в одной из ведущих лабораторий мира. Весьма привлекательной целью является создание антитела, способного нейтрализовать ФОТ. В настоящее время рекомбинантные и гуманизированные антитела находят широкое применение в качестве вакцин и терапевтических агентов. Молекулы иммуноглобулинов имеют ряд преимуществ перед ферментами в качестве лекарственных средств, поскольку имеют продолжительный период полужизни в кровотоке и для них известны эффективные механизмы выведения из организма в виде комплекса с антигеном. В данном проекте впервые в качестве антидота к ФОТ предложено использовать рекомбинантное антитело, селективное из полусинтетической библиотеки иммуноглобулинов человека и экспрессированное в эукариотической системе. Данные по специфическому связыванию аналогов ФОТ, полученные в настоящем исследовании, дают основания рассматривать рекомбинантные антитела в качестве эффективных потенциальных ФОТ – нейтрализующих агентов.

Проблема создания биологических антидотов к ФОТ стала в последнее время особенно актуальной из-за возрастающего числа техногенных катастроф, проблем возможной утечки в ходе уничтожения огромных запасов химического оружия, возросших вероятностей террористических атак и широким применением пестицидов, причем часто без особых мер предосторожности. Достаточно отметить, что в результате самоотравления пестицидами в сельских районах развивающихся стран ежегодно погибает более 200 тыс. человек.

Неоценимый вклад в исследование биокатализаторов внес рентгено-структурный анализ, позволивший с высокой точностью определить архитектуру актив-

ных центров большинства существующих катализаторов. С помощью рентгено-структурного анализа удалось идентифицировать аминокислотные остатки, ответственные за различные этапы каталитического акта, а замена последних позволила изменять условия протекания каталитического превращения. Рентгено-структурный анализ стал активно применяться и при исследовании абзимов и помог выяснить в целом ряде случаев особенности доменной структуры антител, обеспечивающие их каталитические функции. Наибольший интерес с точки зрения «мимикрирования» каталитической функции антителами безусловно вызвали превращения, при которых биокатализатор был способен непосредственно участвовать в химических превращениях и его активный центр участвовал в образовании и разрыве ковалентных связей.

Ковалентный катализ является одним из основополагающих механизмов, обеспечивающих уникальные свойства ферментов как наиболее эффективных биокатализаторов. Разработка путей создания искусственных ферментов, способных осуществлять ковалентный катализ, закладывает основу исследований эволюции биокаталитических функций и обеспечит практическое применение в фармацевтике и биотехнологии. В работе по совместному проекту РФФИ-EMBL для получения искусственных биокатализаторов, способных осуществлять ковалентный катализ, впервые была использована стратегия химической селекции полусинтетической библиотеки варьируемых фрагментов генов иммуноглобулинов человека. В результате было получено семейство искусственных ферментов, сформировавших активный центр, способный ковалентно взаимодействовать с необратимым ингибитором сериновых протеаз – арил фосфонатом. Наиболее активный клон A17 проявлял ферментативные свойства и катализировал гидролиз пептидной связи в низкомолекулярном субстрате Phe-MCA. Значительный успех на пути получения новых биокатализаторов был достигнут на пути механизм-зависимой селекции молекулярных библиотек генов иммуноглобулинов. В настоящей работе мы сочетали преимущества двух вышеназванных методов: 1) использование структур антител как белкового каркаса, способного нести каталитическую функцию и 2) применение стратегии реакционной селекции для создания биокатализаторов, участвующих в ковалентном катализе, *de novo*.

Реакционную селекцию можно сравнить с неким подобием «рыбалки», однако в данном случае используется весьма специфический «крючок», который позволяет «ловить» только молекулы, использующие определенный механизм для взаимодействия с «крючком».

Эффективным способом селекции сериновых гидролаз является механизм-зависимая реакция фосфорилирующих агентов с нуклеофильными остат-

ками активного центра ферментов. Известно, что высокореакционноспособные фтор фосфонаты являются эффективными ингибиторами сериновых протеаз и эстераз, однако малоустойчивы в водной среде. Использование менее реакционноспособных *p*-нитрофенольных производных фосфонатов позволяет обеспечить компромисс – сохранить повышенную реакционную способность и обеспечить адекватную стабильность для химической селекции.

По завершении селекции антитела были проэкспрессированы и использованы для реакции с фосфонатом. Полученные таким способом биокатализаторы были использованы для создания поетнциальных антидотов к фосфорорганическим токсинам. Поскольку эти ингибиторы сериновых гидролаз являются аналогами ФОТ по механизму действия, подобное ингибирование позволяет предполагать, что антитело A17 будет обладать способностью связывать и сами ФОТ. Нами была установлена гидролитическая активность A17 в отношении одного из самых распространенных фосфорорганических пестицидов – параоксону, что свидетельствует об использовании антитела-абзима в качестве антидота. Для выяснения механизма взаимодействия антитела с ФОТ и выяснения путей улучшения его каталитической функции нами в рамках проекта был проведен рент-

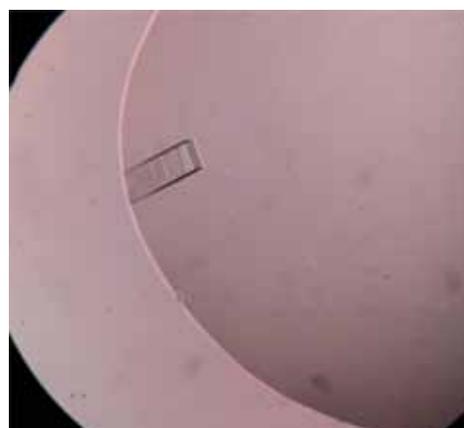


Рис. 1. Кристалл антитела FabA17-1 в маточном растворе. Условия кристаллизации: 0,1 М Tris-HCl pH 8,5; 0,1 М MgOAc; 12% PEG8000. Время роста кристалла – 23 дня при 18°C

гено-структурный анализ молекулы антитела и с применением методов генетической инженерии произведены изменения в доменной структуре полученного абзима. Были получены кристаллы антитела (см. рис. 1) и разрешены кристаллические структуры вариантов «анти-фосфорорганического» антитела А17 с каппа и лямбда изотипом с разрешением 1,8 и 1,95 ангстрем, соответственно.

Было установлено, что замена константного домена легкой цепи антитела с каппа на лямбда изотип не влияет на кинетические и термодинамические характеристики взаимодействия антитела А17 с фосфорорганическим токсином фосфонатом X, однако, приводит к структурным изменениям архитектуры активного центра. При этом основным участником этих изменений является Trp92 легкой цепи, который поворачивается и сдвигается на 4 ангстрема в сторону антиген-связывающего кармана, увеличивая гидрофобный карман и образуя подобие крышки у входа в активный центр (рис. 2).

Замена изотипа константного домена легкой цепи привела к улучшению термодинамической стабильности молекулы антитела для лямбда варианта. Методами кристаллографического анализа в совокупности с методами молекулярной динамики установлено, что каппа изотип антитела А17 имеет более жесткую и менее подвижную структуру активного центра (r.m.s.d. 1,2 и 1,3 ангстрем для тяжелой и легкой цепей, соответственно) по сравнению с лямбда вариантом (r.m.s.d. 2,2 и 2,7 ангстрем для тяжелой и легкой цепей, соответственно).

Методами предстационарной кинетики и масс-спектрометрии было установлено, что взаимодействие антитела с фосфорорганическими соединениями протекает по механизму индуцированного соответствия через стадию образования не ковалентного комплекса. Гидролиз фосфорорганических соединений проходит через стадию образования стабильного ковалентного интермедиата.

Важно отметить, что замена изотипа константного домена легкой цепи антитела не привело к изменению эффективности взаимодействия биокатализаторов с фосфонатом X, но существенно изменила индивидуальные константы скорости образования не ковалентного комплекса.

Были определены фармакокинетические параметры для препаратов бутирилхолинэстеразы человека и антитела А17. Показано, что время полувыведения антитела из кровотока мыши составляет 620 мин, для не модифицированного рекомбинантного фермента бутирилхолинэстеразы человека составляет 180 мин, в то время как для химически полисиалированной БуХЭ – более шестнадцати часов.

Полученные нами результаты по изучению влияния замены константного домена легкой цепи антитела должны учитываться при работе с репертуарами иммуноглобулинов и могут быть использованы исследователями, работающими в области создания новых биокатализаторов и препаратов на основе антител.

Результаты работы коллектива российских авторов, являющихся основными исполнителями проекта, и коллег из ЕМБЛ опубликованы в высокорейтинговом журнале Acta Crystallographica Section D (IF=14,1) в виде экспериментальной статьи под названием "Role of k-l light-chain constant-domain switch in the structure and functionality of A17 reactibody".

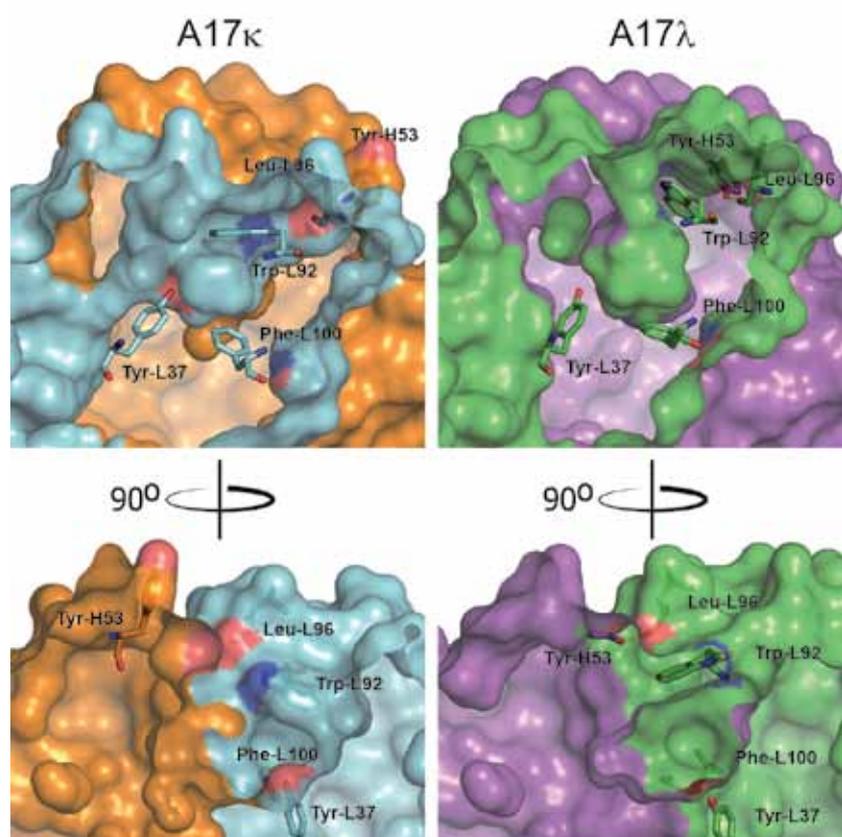


Рис. 2. Поворот и сдвиг Trp92 легкой цепи увеличивает гидрофобный карман и образует подобие крышки у входа в активный центр. Легкая цепь А17κ показана голубым, тяжелая цепь – коричневым; легкая цепь А17λ окрашена в зеленый, тяжелая цепь – в фиолетовый

Abstract

The development of new biocatalysts is one of the actual biotechnological and the fundamental task of modern enzymology. Study of relationship between structure and function of enzymes as promising from the point of view of fundamental science and practical applications. To date, there are developed methods for obtaining catalytic antibodies, based on the selection in terms of reactivity, such as getting "reactibody" approach. By such way antibody A17 was selected and used for further study. To determine the role of the constant domain of the light chain on the functional activity of the catalytic antibody A17, together with colleagues from EMBL we were first obtain the crystal structures of A17 "reactibody" variants, having an amino acid sequence is identical to the antigen binding site, and differ only in the constant domains of the light chain. We held a unique number of experiments on the physico-chemical analysis of antibody variants with different light chain isotypes. We showed the influence of the isotype of the constant domain of the light chain of the catalytic antibodies and antigen-binding function. Pharmacokinetic studies have shown that neutralizing antibody preparation organophosphates has only slightly smaller half-life of blood flow, making it a potential treatment for intoxication by organophosphorus poisons. Such antibody antidote is first obtained. Our results on the effect of replacing the constant domain of the antibody light chain should be taken into account when working with a repertoire of immunoglobulins and can be used by researchers working in the field of new biocatalysts and drugs based on antibodies.)

Keywords: catalytic antibodies, organophosphorus compounds, antibody structure, antibody isotypes.

References

1. Smirnov I., Carletti E., Kurkova I., Nachon F., Nicolet Y., Mitkevich V.A., Débat H., Avalle B., Belogurov A.A.Jr., Kuznetsov N., Reshetnyak A., Masson P., Tonevitsky A.G., Ponomarenko N., Markarov A.A., Friboulet A., Tramontano A., Gabibov A.G. Reactibodies generated by kinetic selection couple chemical reactivity with favorable protein dynamics. Proc Natl Acad Sci U S A, 11 Sep 20;108(38):15954-9.
2. Ilyushin D.G., Smirnov I.V., Belogurov A.A.Jr., Dyachenko I.A., Zharmukhamedova Tlu, Novozhilova T.I., Bychikhin E.A., Serebryakova M.V., Kharybin O.N., Murashev A.N., Anikienko K.A., Nikolaev E.N., Ponomarenko N.A., Genkin D.D., Blackburn G.M., Masson P., Gabibov A.G. Chemical polysialylation of human recombinant butyrylcholinesterase delivers a long-acting bioscavenger for nerve agents in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. – 2013 Jan 22;110(4):1243-8.
3. Belogurov A.Jr., Smirnov I., Ponomarenko N., Gabibov A.G. Antibody-antigen pair probed by combinatorial approach and rational design: bringing together structural insights, directed evolution, and novel functionality. FEBS Lett. 2012 Aug 31;586(18):2966-73.
4. Smirnov I, Belogurov A.Jr, Friboulet A., Masson P., Gabibov A.G., Renard P.Y. Strategies for the selection of catalytic antibodies against organophosphorus nerve agents. Chem Biol Interact. 2013 Mar 25;203(1):196-201.
5. Kurkova I.N., Reshetnyak A.V., Durova O.M., Knorre V.D., Tramontano A., Friboulet A., Ponomarenko N.A., Gabibov A.G., Smirnov I.V. Antibodies-antidotes against organophosphorus compounds. Dokl Biochem Biophys. 2009 Mar-Apr;425:94-7.
6. Ilyushin D.G., Haertley O.M., Bobik T.V., Shamborant O.G., Surina E.A., Knorre V.D., Masson P., Smirnov I.V., Gabibov A.G., Ponomarenko N.A. Recombinant human butyrylcholinesterase as a new-age bioscavenger drug: development of the expression system. Acta Naturae. 2013 Jan;5(1):73-84.
7. Kurkova I.N., Smirnov I.V., Belogurov A.A.Jr., Ponomarenko N.A., Gabibov A.G.. Creation of catalytic antibodies metabolizing organophosphate compounds. Biochemistry (Mosc). 2012 Oct;77(10):1139-46.
8. Smirnov I., Belogurov A., Gabibov A.G. Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. Editors Drauz K., Groeger H., May O. Chapter 14. Catalytic antibodies. Wiley-VCH, Weinheim, 2012 ISBN 978-3-527-32547-4

Российские и немецкие ученые совместно разрабатывают новые антибактериальные препараты

Россия и Германия совместно проводят исследования в области молекулярной биологии

По материалам газеты «Поиск» № 26, 2013

Открытие и создание первых антибиотиков произвели настоящую революцию в мире медицины. И сегодня практически невозможно представить нашу жизнь без этих лекарств. Однако многие не подозревают, что привычным «помощникам» нашего здоровья угрожает опасность.

О том, как и зачем создаются новые антибактериальные препараты и о совместном проекте лаборатории инженерной энзимологии Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова и Европейской лаборатории молекулярной биологии (EMBL, Hamburg) рассказывает заведующий лабораторией, академик РАН, доктор биологических наук, профессор Алексей ЕГОРОВ.

– Алексей Михайлович, Вы принимали активное участие в расширении международного сотрудничества РФФИ, в частности, с EMBL. Скажите, как удалось этого добиться и какие сложности стояли на пути подписания соглашения?

– Европейская молекулярно-биологическая лаборатория – это аналог нашей Дубны. В нее входит 20 европейских государств и страна-партнер – Австралия. По своему рейтингу в области молекулярной биологии с точки зрения количества научных публикаций и индекса цитирования она занимает четвертое место в мире и первое в Европе. Организация поддерживает почти 100 программ в разных направлениях молекулярной биологии.

В настоящее время Россия официально не входит в состав EMBL, что не мешает нам активно сотрудничать по целому ряду проектов на основе научных соглашений. Различные российские научные группы имеют порядка

30 видов контактов с EMBL, участвуют в проектах через ЕС и через другие организации в качестве партнеров.

Большим шагом на пути взаимодействия стало подписание в 2011 г. официального соглашения между РФФИ и EMBL. Переговоры о сотрудничестве велись больше года. РФФИ удалось заключить соглашение, при котором фонд не является формально членом EMBL, а участвует как ассоциированный член.

Европейская молекулярно-биологическая лаборатория – это очень уважаемая в научном мире организация, нам интересно вместе с ними работать, печататься в журналах, участвовать в европейских проектах. Как говорится: «Скажи мне, кто твой друг, и я скажу, кто ты». Мы выбрали серьезного партнера, и это открывает перед нами очень много возможностей. Вокруг нас была как будто «Берлинская стена»: языка не знаем, статьи наши не печатают, мы варили науку в собственном котле, она была изолированной. Такое соглашение, как данное сотрудничество, дают прорывы. Это очень важно для нас.

При EMBL, например, существует организация, которая называется Трансфер Текнолоджи (EMBL Enterprise Management Technology Transfer GmbH (EMBLEM)). Компания занимается очень широким кругом деятельности: это и патентование, и организация совместных компаний, и перенос технологий, и



Академик РАН А.М. Егоров

продажа лицензий, в общем, коммерциализация науки. Очень разумно все сделано.

Бытует мнение, что советские ученые никогда не думали об эффективности их исследований, об экономике... Глупости, всегда мы об этом думали! В СССР было такое слово – «внедрение», теперь это трансфер технологий, и компания Трансфер Текнолоджи готова помогать и делиться опытом с нами.

– Кто способствовал подписанию соглашения со стороны EMBL?

– В настоящее время одну из руководящих должностей в EMBL занимает Виктор Ламзин (заместитель руководителя отделения EMBL в Гамбурге), он отвечает за кристаллографию, изучение структуры белков. Во многом именно благодаря ему и было заключено соглашение о сотрудничестве, в рамках которого было проведено две конференции: в Германии и в России, третья состоялась в этом году.

В прошлом году прошел первый международный конкурс, и из 12 заявок было поддержано 6 работ.

– Расскажите подробнее про прошедший совместный конкурс. Почему на него поступило такое небольшое количество заявок?



Руководитель проекта В.Г. Григоренко

– Мы искали партнеров, которые уже знали, что такое EMBL. 12 организаций прислали свои предложения.

– То есть, сначала нашим исследователям нужно связаться с европейскими учеными?

– Да, ведь все работы совместные. Многие работали вместе и до конкурса. Практически все так или иначе были уже знакомы и принимали участие в совместных проектах.

– Какие новые возможности предоставляет ученым это сотрудничество?

– EMBL – это многофункциональная организация. У нее разные задачи, начиная от подготовки научных кадров, в том числе кадров самого высокого научного менеджмента.

Для России в рамках соглашения появилась возможность проведения совместных исследований, продвижения и обсуждения, постановки новых научных проблем. Это само по себе очень важно.

Наши сотрудники ездят за границу и работают на уникальном оборудовании, которого у нас практически нет. Например, на оборудовании для рентгеноструктурного анализа мы делали рентгеновскую кристаллографию фермента. Для России это как чудо, а там это получается значительно проще.

Также важен психологический фактор, сотрудничество накладывает жесткие обязательства, спустя рукава не поработаешь. Есть график, план, надо бегать, трудиться. Проходит много важных совместных мероприятий: симпозиумы, конференции, международный конгресс по биотехнологии. Проводим совместные сессии, рассказываем о проблемах, обмениваемся мнениями. В этом году было большое научное заседание, где каждый отчитывался по своему проекту. Раньше мы знали одну группу, теперь мы знаем 6 групп. Все познакомились, получается такой своеобразный научный клуб.

Этим летом с 6 по 11 июля состоится еще одно важное мероприятие – Конгресс Федерации европейских биохимических обществ – 2013 (FEBS). (К моменту выхода журнала мероприятие состоялось, читайте об этом в статье А.Г. Габибова. – ред.). Это уникальное событие для всей России, это как Олимпийские игры, только для биохимиков всего мира. В нашей стране он проходил лишь однажды – в 1984 г., теперь в 2013 г. Это очень важно для отечественной науки. Туда приедет все руководство EMBL и ЕМБО, будут проходить переговоры о дальнейшем расширении сотрудничества.

– Расскажите про проект, выполняемый в вашей лаборатории.

– В числе 6 совместных с EMBL работ, получивших поддержку РФФИ, был проект лаборатории инже-



нерной энзимологии Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова «Поиск новых ингибиторов бета-лактамаз для преодоления бактериальной резистентности к антибиотикам», направленный на создание инновационных подходов для преодоления антибиотикорезистентности (способности микроорганизмов-возбудителей инфекционных заболеваний вырабатывать устойчивость к действию антибиотиков). Российской группой ученых руководит старший научный сотрудник кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, кандидат химических наук Виталий Григоренко.

Если бы мы сами делали такую работу, без европейских партнеров, мы бы ее делали 20 лет. И неизвестно, сделали бы или нет. Я бы уже точно был на пенсии.

За один год мы сделали огромный рывок. Трансфер Текнолоджи уже показывает нашу работу на выставках, уже есть заинтересованные компании. Это фармацевтический бизнес, в нем интерес очень быстро растет, нужны все время новые и новые молекулы, постоянно увеличивается неустойчивость, резистентность и токсичность, поэтому нужно искать новые вещества.

– *Расскажите подробнее о самом проекте.*

– Работа большая, она разделена между двумя группами, в Германии профессионально делают то, что они умеют, а мы выполняем свой объем работ. Эффект аддитивности (*суммарное действие – ред.*) деятельности коллективов получается не равный сумме эффектов действия каждого в отдельности, а существенно больше. Получается синергия.

Бета-лактамы антибиотики составляют более 50% мирового рынка антибактериальных препаратов в лечении широкого круга тяжелых инфекционных заболеваний. В настоящее время их эффективность применения ограничена появлением и распростра-

нением устойчивых к ним штаммов вредоносных микроорганизмов.

У бактерии существует резистентность (*противодействие – ред.*) к антибиотикам. Одним из основных механизмов этой резистентности является продукция ферментов – бета-лактамаз, разрушающих бета-лактаманное кольцо антибиотика, в результате чего он теряет свою антимикробную активность.

Резистентность преодолевают, когда ингибируют (*снижают скорость химических реакций или подавляют их – ред.*) тот фермент, который разрушает антибиотики.

За последние 70 лет, пока существуют антибиотики, количество лактамаз увеличилось в разы, их стало уже 800 штук, потому что происходят постоянные мутации. Вследствие большого разнообразия бета-лактамаз и опасности их широкого распространения необходимо комплексное изучение их свойств и структуры, поиск эффективных ингибиторов и разработка методов диагностики.

Возникла идея, что нужно искать не только новые антибиотики, но и новые ингибиторы, с помощью которых можно убивать эти лактамазы, и тогда можно будет использовать старые антибиотики, стоит лишь немного их модифицировать.

Бета-лактамы антибиотики, такие как пенициллин, – это удивительный класс антибиотиков. В нашем организме нет собственных мишеней для них. Мишень – это фермент, который формирует стенку вредоносной бактерии, и он есть только в бактериях. Действие этого класса антибиотиков на организм человека – исключительно маленькое. Другие антибиотики бьют по нашим же с вами мишеням. А пенициллина можно давать миллион единиц, 10 млн единиц, если нужно – для организма это не так уж и страшно. Поэтому нужно искать ингибиторы для защиты антибиотиков.

– **Каким образом осуществляется этот поиск?**

– Наши партнеры из EMBL придумали способ, с помощью которого можно вести компьютерный поиск новых веществ. Они разработали компьютерную программу для анализа банка данных из 8 млн химических молекул. В этом банке данных и ищутся аналогичные, близкие молекулы, с помощью компьютера изучается, как они связываются с бета-лактамазой. В итоге им удалось отобрать 550 молекул.

Далее с помощью робота в чашечки заливают фермент-лактамазу, потом в каждую из чашечек добавляют одну из 550 молекул, и смотрят, какой из них влияет на лактамазу. В итоге отобрали лишь пять образцов. Представляете, какая статистика? Из 8 млн отобрали только пять!

Мы же в это время занимались тем, что делали банк генно-инженерных лактамаз. Чтобы фермент был в доступен в большом количестве. У наших коллег из EMBL в настоящее время нет технической возможности самим изготавливать лактамазу, а у нас есть оборудование для ее производства.

– **Эти пять отобранных веществ уже были активны?**

– Они уже связывались с лактамазой и при моделировании на компьютере ингибировали ее активность. Дальше нужно было это все проверять на практике.

Виталий Григоренко в нашей лаборатории выращивает лактамазу и смотрит, как эти ингибиторы на нее действуют. Из этих пяти веществ два оказались достаточно активными. И это только начало.

Чтобы создать новое лекарство, нужно 10 лет и миллиард долларов. В рамках проекта наши ученые совместно с немецкими за один год нашли уже две высокоактивные молекулы. С точки зрения токсичности они не опасны. Их можно дальше разрабатывать.

Сейчас в Германии уже получили кристаллы этих ферментов, идет рентгеноструктурный анализ. Мы продолжаем их снабжать ферментом, а они ищут разные условия кристаллизации, чтобы знать, в каком месте и как ингибитор связывается. Это очень «тонкая» работа. Можно думать уже о том, как дальше этот ингибитор модифицировать.

Лактамаза мутирует, но есть участки структуры, которые остаются постоянными. Мы ищем универсальный ингибитор, действующий как раз на эти постоянные участки. Природа очень хитра, есть вероятность, что и другие части начнут мутировать, но пока что этого не происходит.

– **Взаимодействие будет продолжаться?**

– Да. РФФИ дает средства на то, чтобы продолжать эту работу. В Германии очень довольны сотрудничеством и очень заинтересованы, ведь у нас есть результат.

– **Каковы перспективы сотрудничества с EMBL?**

– Сейчас при поддержке РФФИ выполняются 6 совместных проектов, они все очень интересные. Все ориентированы на молекулярную биологию с дальнейшим выходом на новые лекарства и новые лечения. Конечная цель – это фармацевтические препараты.

Такая работа, например, ведется на кафедре химии и природных соединений в МГУ имени М.В. Ломоносова. Они занимаются теломеразой. Это фермент, который отвечает за считывание, обработку и удлинение ДНК. Под руководством А. Габибова изучаются структуры новых молекул антител, имеющих терапевтическое значение. Другие работы направлены на изучение механизмов регуляции генома на модельных системах, которые очень важны для лечения рака.

* В этом году мы продолжили работу в рамках существующего проекта. На следующий год, возможно, будут объявлены конкурсы на более крупные работы. Если сотрудничество с EMBL получится, это потребует больших средств.

Самый сложный вопрос – как делать совместные патенты с зарубежными организациями. Этому все-таки нам еще нужно научиться. Сотрудничество с такого рода научными организациями, как EMBL, нам необходимо, оно позволяет повысить эффективность наших работ.

Екатерина Саруль,
Андрей Локтев,
РФФИ

Сотрудничество РФФИ и EMBL прорубает окно в Европу

Летом 2013 г. в Санкт-Петербурге в рамках 38-го Конгресса федерации европейских биохимических обществ (FEBS–2013) состоялось специальное заседание, посвященное перспективам сотрудничества российских ученых и Европейской лаборатории молекулярной биологии (EMBL).



Выступает глава EMBL Ян Маттай



В дискуссии, посвященной перспективам сотрудничества, участвуют (слева направо): Ян Маттай (EMBL), академик РАН В.Я. Панченко (РФФИ), академик РАН В.А. Черешнев, академик РАН А.М. Егоров, А.Ю. Сумбатян (Министерство образования и науки РФ)

Основной темой обсуждения стало расширение сотрудничества РФФИ и EMBL, взаимодействие с Европейской организацией молекулярной биологии (EMBO), а также перспективы вступления России в данные организации.

В заседании приняли участие председатель Совета РФФИ Владислав Панченко, глава EMBL Ян Маттай, глава EMBO Мария Лептин, председатель комитета Государственной Думы Федерального собрания РФ по науке и наукоемким технологиям академик Валерий Черешнев, академик РАН Алексей Егоров и заместитель Директора Департамента международного сотрудничества в образовании и науке Александр Сумбатян.

Все участники обсуждения пришли к единому мнению: активное взаимодействие с крупнейшими европейскими научными организациями даст российским ученым ряд серьезных преимуществ. Это и обмен накопленным опытом, и посещение научных центров по всей Европе, и работа на уникальном оборудовании, включая крупные международные научные установки, а также оформление совместных патентов. Роль данного взаимодействия отметил председатель Совета РФФИ Владислав Панченко, сообщив о результатах проектов РФФИ и EMBL, а также об участии России в создании установок класса mega science. В частности, глава Фонда отметил роль России в масштабном национальном исследовательском проекте – строительстве рентгеновского лазера на свободных электронах (XFEL).

По словам Владислава Панченко, необходимость расширения международного сотрудничества крайне важна, и РФФИ активно над этим рабо-

тает. В период с 2011 по 2013 гг. Фонд поддержал 27 российско-европейских исследований, в том числе с Объединением им. Гельмгольца в Германии, ЭраНЕТ, в рамках мультинациональных конкурсов с испанским национальным исследовательским институтом, национальным центром научных исследований Франции, с Лондонским королевским обществом.

Перспективы данного взаимодействия для России действительно сложно недооценить. В рамках сотрудничества РФФИ и EMBL в 2012 г. было поддержано 6 совместных проектов, о результатах которых рассказали их руководители в преддверии заседания. Все исследования направлены на создание инновационных лекарственных препаратов для лечения тяжелых заболеваний. Большой интерес у слушателей вызвал проект под руководством Маттиаса Вилманнса (Mattias Wilmans) (EMBL) и Александра Габитова (Россия), посвященный созданию новых каталитических антител, которые являются основой для большого количества лекарственных средств в современной медицине. Особое внимание было также уделено проекту под руководством Джоанны Каллио (EMBL) и Ольги Донцовой (Россия). Полученные в ходе исследования данные откроют принципиально новые возможности для разработки противоопухолевых препаратов.

Все 6 российско-европейских групп уже получили перспективные результаты, которые и положили начало диалогу о возможности вступления России в столь уважаемое в мировом научном сообществе организации.

В результате заседания стороны договорились о подготовке меморандума по расширению сотрудничества между российскими учеными, EMBL и EMBO, а также обсудили возможность создания координационного органа в России. Развитие отношений между РФФИ и EMBL является особенно актуальным в связи с тем, что 2014 год объявлен годом научного сотрудничества России и ЕС.



Яна Павлич (Jana Pavlic), Герлинд Валлон (Gerlind Wallon) и академик РАН Алексей Егоров



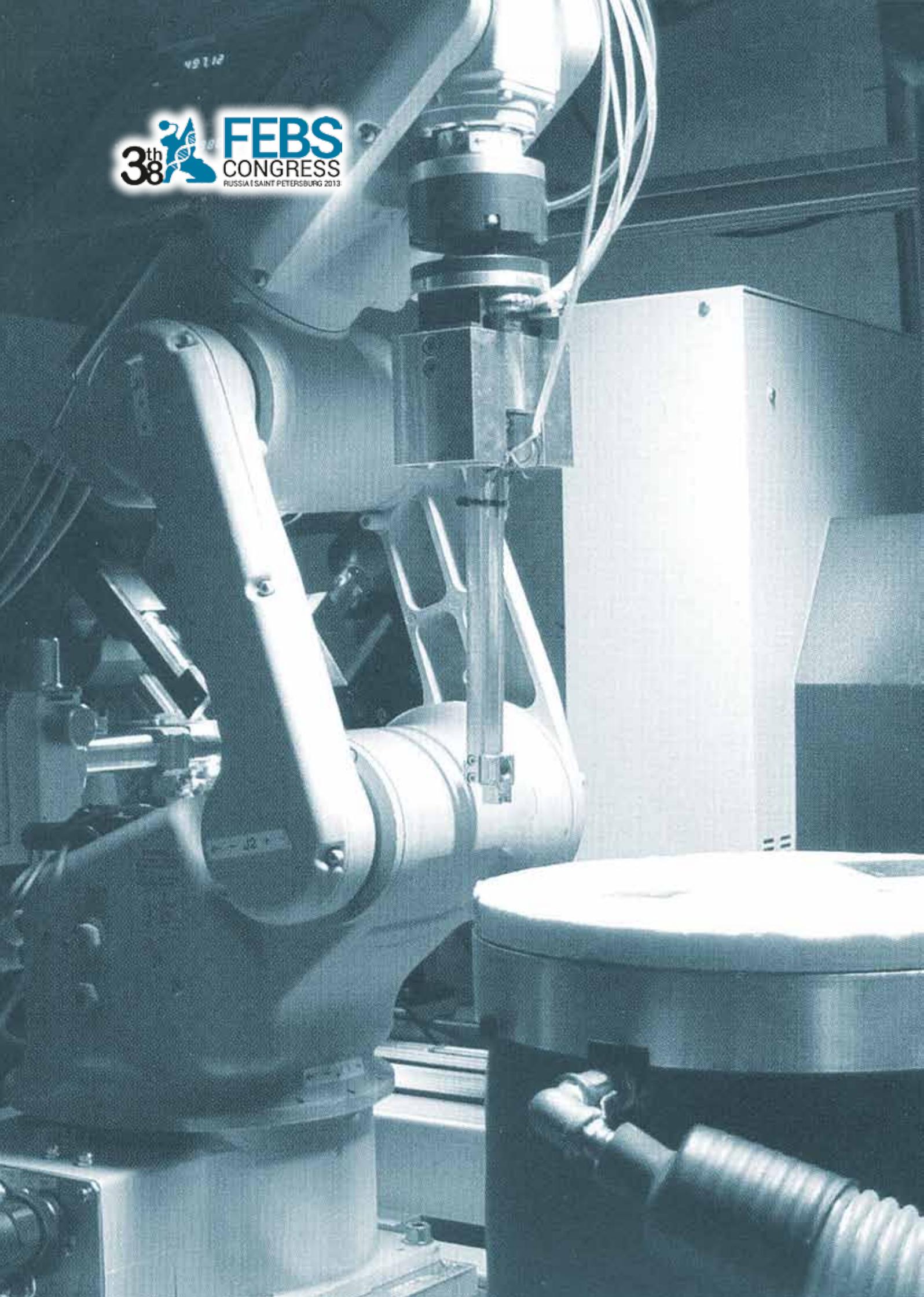
Академики РАН: Алексей Егоров и Валерий Черешнев



Обсуждение программы сотрудничества

49712

3th  **FEBS**
CONGRESS
RUSSIA | SAINT PETERSBURG 2013



Конгресс FEBS 38 в Санкт-Петербурге

По материалам журнала *Acta Naturae* 2013, том 5 No.4 (19)



Немного статистики и сравнение с «Западом»

Организация FEBS объединяет более 36 000 исследователей в 35 национальных биохимических обществах стран Европы. Ее деятельность распространяется далеко за пределы конгрессной платформы. В структуру FEBS входят комиссии по изданию журналов (FEBS Journal; FEBS Letters и др.) «Наука и общество», «Женщины в науке», секция образования, комитет по стипендиям и др. Организация FEBS очень демократична и предполагает регулярные перевыборы руководства и председателей комитетов. Конгрессы FEBS ежегодно проходят в европейских странах в течение уже около 40 лет и собирают научную европейскую общественность, работающую в области наук о жизни. Тематика конгрессов за последние годы значительно расширилась и в известном смысле

2013 год был ознаменован для российской научной общественности, работающей в области наук о жизни, крупнейшим событием – проведением в Санкт-Петербурге в июле 38-го Конгресса Федерации европейских биохимических обществ (ФЕБО – FEBS). Журнал *Acta Naturae* и люди, его делающие, принимали самое активное участие в организации и проведении этого форума, мы бы хотели поделиться своими впечатлениями «изнутри» и дать анализ произошедшего.

А.Г. Габиров,
член-корреспондент РАН, профессор,
главный редактор журнала *Acta Naturae*,
Председатель оргкомитета конгресса
FEBS 38

пересекается с тематикой конгрессов по биофизике, нейронаукам, иммунологии. Эта тенденция не случайна, так как стремление к глубокой специализации направлений исследований, характерное для конца XX в., имеет тенденцию быть замененным на «универсализацию» исследований и активное сочетание дисциплин и экспериментальных подходов. Внедрение «omics», глубокого секвенирования, применение платформ ЯМР, рентгеноструктурного анализа с использованием методов QM/MD действительно позволяет комплексно подойти к решению задач биологии и молекулярной медицины. Такое положение дел не могло не отразиться на программах больших международных форумов. Требования к их организации возросли многократно. Бренд FEBS, несмотря на экономические трудности в Европе, собирает большие аудитории: Прага, 2009 (1900 делегатов); Гетеборг, 2010 (1600 участников); Турин, 2011 (1850 человек); Севилья, 2012 (2000 человек). Мы просто не могли занижать планку. На Конгрессе в Санкт-Петербурге было более 2400 человек, что, как мы видим, является рекордом последних лет (таблица 1). Этот факт удивил руководство FEBS, которое изначально относилось к нам хотя и доброжелательно, но с определенным недоверием. Как удалось этого добиться-



Губернатор
г. Санкт-Петербурга
Георгий Полтавченко



Президент РАН,
академик Владимир
Фортов



Депутат Государственной
Думы, академик РАН
Валерий Черешнев



Генеральный секретарь
FEBS Израэль Пехт
(Israel Pecht)

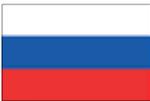


Академик РАН
Владислав Панченко.
Председатель РФФИ,
академик РАН



Лауреат Нобелевской
премии Арон Чехановер
(Aaron Chiechanover)

Таблица 1. Количество участников Конгресса по странам (представлены данные по первым 20 странам)

	Россия	864		Корея	53
	Турция	151		Украина	52
	Польша	115		Португалия	46
	Италия	112		Япония	31
	США	111		Израиль	29
	Германия	107		Греция	27
	Великобритания	95		Нидерланды	27
	Чехия	84		Румыния	26
	Франция	83		Хорватия	23
	Испания	73		Венгрия	23

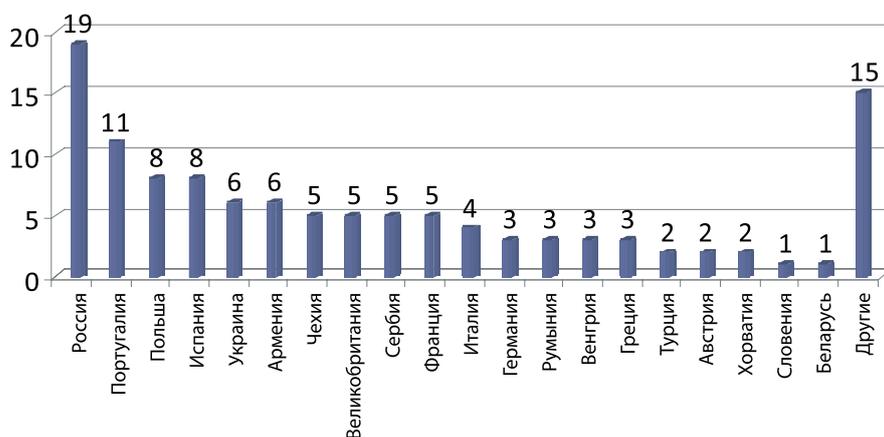
сы? Мы сумели собрать уникальную команду докладчиков. Одиннадцать лауреатов Нобелевской премии – живые легенды науки XX в. и начала XXI в. Интересен и факт научно-политического предвидения руководителя симпозиума «Мембранный транспорт и секреция: от нефронов к нейронам» профессора Александра Петренко, пригласившего в качестве ключевого лектора Джеймса Ротмана (James Rothman), ставшего Нобелевским лауреатом уже после Конгресса, осенью 2013 г. В программе Петербургского конгресса значилось 40 симпозиумов, собравших в общей сложности более 320 докладчиков. В этом был определенный финансовый и смысловой риск. Количество докладчиков примерно в два раза превышало среднестатистические значения конгрессов прошлых лет. По меткому выражению профессора Израиля Пехта (Israel Pecht), генерального

секретаря FEBS, «в Петербурге было собрано два конгресса FEBS». Пустых аудиторий не было. Научная ответственность в интенсивном ритме мигрировала между залами заседаний. Неудобство доставляло лишь отсутствие качественной шумоизоляции между аудиториями. Нам удалось обеспечить высокий уровень «интернационализма» докладчиков. Как видно из *таблицы 2*, число докладчиков из России было значительным, но не доминирующим, как, к сожалению, это случилось на некоторых других конгрессах FEBS. Этот факт никак не связан с уровнем отечественной науки. Мы

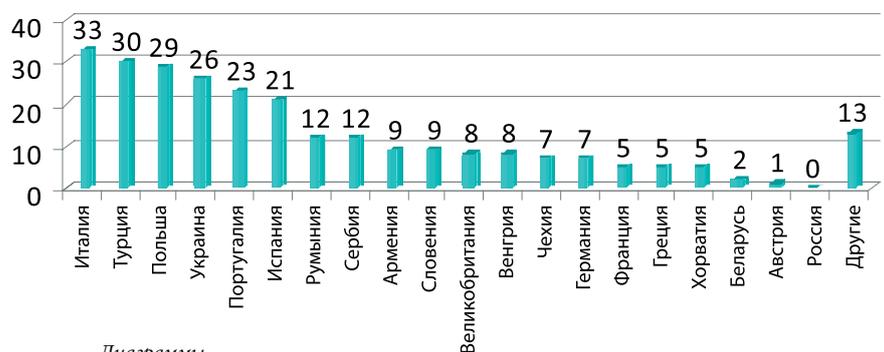
Представительство молодых ученых по странам (всего 1118 человек)



Молодежный форум FEBS - представительство по странам (всего 117 человек)



Стипендии ФЕБС - распределение победителей по странам (всего 252 человека)



Диаграммы

Овчинников провел знаковый XVI Конгресс FEBS с участием Лайнуса Полинга, Дороти Ходжкин и других величайших ученых того времени. 38-й Конгресс FEBS подтвердил, что значительная часть отечественных ученых соответствует мировому уровню, так как подавляющее большинство проведенных симпозиумов

(33 из 40) наряду с европейскими и американскими председателями возглавлялись российскими учеными, причем не уехавшими за рубеж нашими соотечественниками, а исследователями, имеющими лаборатории в России. Таким образом, представители отечественной науки известны за рубежом, причем они способны собрать воедино достойных иностранных коллег и квалифицированно организовать тематический форум. Этот вывод важен не только для нас. Иностранные коллеги убедились, что российская наука не погибла и российских ученых можно приглашать в качестве соисполнителей в крупные европейские и международные проекты. Многие иностранные делегаты делились своим положительным впечатлением, полученным от кратких докладов и постерных сообщений российских молодых ученых. На Конгрессе прекрасно работала секция, посвященная проблемам биохимического образования; руководители – профессоры Татьяна Овчинникова и Фердинанд Хухо (Ferdinand Huch). Форум показал, что у российской науки о жизни есть будущее и она интересна миру, но при этом необходимо грамотно распорядиться имеющимися и по ступающими человеческими ресурсами, приборной и реактивной базой. Статьи, бесосновательно критикующие отечественную научную школу, вредны и вызывают часто недоумение даже в среде иностранных коллег. Вместе с тем стагнация развития и недоучет необходимости участия «на уровне» в «международном разделении научного труда» недопустимы. Конгресс показал, что «точка невозврата» пройдена и у России есть будущее в области «бионауки».

FEBS 38 и власть

Традиционно конгрессы FEBS привлекают властные структуры стран-хозяев. На открытиях выступают мэры городов, министры, депутаты. Эта имиджевая часть всегда забо-

тит организаторов. 38-й Конгресс не стал исключением. Исторически необходимо отметить роль фонда «Сколково» в инициировании правительственных решений по Конгрессу. Виктор Вексельберг обратился от имени фонда «Сколково» в Правительство РФ с просьбой поддержать инициативу Национального комитета российских биохимиков провести конгресс в Санкт-Петербурге. Ассамблея FEBS на конкурсной основе со второго раза проголосовала за Санкт-Петербург как столицу Конгресса.

В 2013 г. Дмитрием Медведевым было подписано Распоряжение Правительства РФ с указанием министерствам и ведомствам секторов ответственности в подготовке Конгресса. Председателем оргкомитета Конгресса был назначен Дмитрий Ливанов. Наиболее болезненно решался вопрос с визами для иностранных делегатов. Мы понимали, что для большинства европейцев, особенно для молодежи, вопрос границ уже давно канул в Лету. Сейчас можно с уверенностью сказать, что благодаря прекрасной работе сотрудников МИД, за исключением единичных случаев, все, кто хотел приехать на Конгресс, смогли это сделать. Министерство образования и науки и его сотрудники сыграли важную роль на разных этапах подготовки Конгресса. Неоценимую помощь оказали тогдашний заместитель министра Игорь Федюкин и быстро включившийся в процесс подготовки заместитель министра Александр Повалко. Очень много для подготовки Конгресса сделали директор Департамента международных отношений Евгений Угринович и его заместитель Александр Сумбатян, сотрудники министерства Владимир Арбузов и Альберт Гармаш. Принципиальный вклад в решение критических проблем внес председатель Комитета Государственной думы РФ по науке и наукоемким технологиям академик Валерий Черешнев. Тогдашний заместитель председателя Комитета, а ныне заместитель министра Минобрнауки Люд-

мила Огородова также способствовала разрешению ряда сложнейших ситуаций, связанных с подготовкой Конгресса. Вся тяжесть ответственности за Конгресс со стороны Российской академии наук легла на плечи вице-президента РАН академика Анатолия Григорьева, подписавшего десятки писем в министерства и ведомства и решившего ряд принципиальных проблем Конгресса. Руководство Санкт-Петербургского научного центра РАН, Академического университета и лично академик Жорес Алфёров помогли успешно разрешить многочисленные организационные проблемы Конгресса. Без активного участия первого проректора по научной работе Академического университета члена-корреспондента РАН Михаила Дубины не состоялся бы Молодежный форум. Неоценимая помощь была оказана руководством СПбГПУ в лице ректора члена-корреспондента РАН Андрея Рудского, проректоров Дмитрия Райчука и Александра Речинского. Комфортное размещение участников Молодежного форума было обеспечено на территории студенческого городка СПбГПУ при самом активном содействии Виктора Игнатенко. На всех этапах подготовки большую роль сыграл руководитель Комитета по науке и высшей школе администрации Санкт-Петербурга Андрей Максимов и его заместитель Ирина Ганус. В подготовке и реализации программы Конгресса велика роль РФФИ и лично его председателя академика Владислава Панченко. Фонд смог оказать беспрецедентную финансовую поддержку Конгрессу, а Владислав Яковлевич принял участие в открытии и лично провел заседание сессии, посвященной сотрудничеству Европейской молекулярно-биологической лаборатории с фондом (EMBL–РФФИ). На начальных этапах неоценимую помощь в организации оказал член совета фонда «Сколково» Михаил Ковальчук. Конгресс был открыт вице-премьером Правительства РФ Аркадием Дворковичем, зачитавшим личное обращение к Конгрессу Председателя Правительства Российской Федерации Дмитрия Медведева. На открытии с приветственной речью к участникам и гостям Конгресса обратился губернатор Петербурга Георгий Полтавченко. Конгресс проходил в непростое для российской науки время. За несколько дней до его открытия был издан проект закона о реформе науки в России, и Конгресс сразу же превратился в площадку для бурных дискуссий. В приветственном слове вновь избранного президента РАН академика Владимира Фортова звучали слова примирения конфликтующих сторон.

FEBS 38, фундаментальная наука и биотехнология

Спор о соотношении «фундаментальной» и «прикладной» науки идет десятилетия. Разногласия эти

носили «международный» характер, однако с революционным развитием биотехнологии и биофармацевтики страсти улеглись (во всяком случае, за границей). С очевидностью стало понятно, что не существует науки «второй свежести», называемой биотехнологией. В настоящее время каждое значимое открытие в биомедицинской области призвано стать основой для «прикладной» разработки. Ситуацию во многом можно сравнить с физикой прошлых лет, да и с нынешней, когда многие крупные открытия стали основой для разработок новых видов вооружения. При этом крупнейшие физики сами непосредственно принимали участие в реализации этих «прикладных» разработок. На 38-м Конгрессе FEBS наряду с «академическими», фундаментальными симпозиумами достаточно много внимания было уделено биомедицине, проблеме рака, аутоиммунных заболеваний, биофармацевтике. Заседание секции «Наука и общество» – председатель Жак Вейль (Jacques-Henry Weil), было полностью посвящено проблемам онкологии. В рамках Конгресса состоялась сессия фонда «Сколково», организованная вице-президентом фонда Александром Черновым и заместителем руководителя биомедкластера «Сколково» Геленой Лифшиц. Университет «Сколтех» представлял профессор Константин Северинов. Министерство промышленности и торговли РФ выступило с инициативой провести специальную сессию по биофармацевтике. Организация заседания шла под эгидой тогдашнего директора Департамента химико-технологического комплекса и биоинженерных технологий Минпромторга России, а ныне заместителя министра Сергея Цыба, директора Департамента внешнеэкономических отношений Алексея Груздева. Удалось организовать очень интересную сессию. Председательствовали на ней с российской стороны академик РАМН Алексей Егоров, сопредседателем был директор департамента фармакологии Йельского университета, иностранный член РАН профессор Иосиф Шлессинджер (Joseph Schlessinger). В работе сессии приняли участие Нобелевские лауреаты Жан-Мари Лен (Jean Marie Lehn), Жюль Хоффман (Jules Hoffmann), Ада Йонат (Ada Yonath), с российской стороны выступал крупнейший специалист в области противоопухолевой терапии академик Михаил Личиницер. На заседании были рассмотрены вопросы создания новых ингибиторов протеинкиназ – потенциальных противораковых агентов.

Что нового узнали ученые в Петербурге на Конгрессе?

Безусловно, огромное удовольствие доставили пленарные лекции. Сусуму Тонегавы (Susumu Tonegawa),

получивший Нобелевскую премию за теорию перегруппировки генов иммуноглобулинов, рассказал о своих новых работах по «функциональному биоимиджингу» участков мозга. Его статья в Science вышла уже после Конгресса. Широкую палитру комбинаторной биологии нарисовал в своей пленарной лекции экс-президент Института Скриппса профессор Ричард Лернер (Richard Lerner). Подходы к созданию новых лекарственных препаратов антипролиферативного ряда изложил Иосиф Шлессинджер (Joseph Schlessinger). Новые подходы к эволюции и происхождению жизни представил Нобелевский лауреат Джек Шостак (Jack Szostak).

Без кого Конгресс не мог бы состояться?

Неоценимый вклад в подготовку программы внесли председатель и секретарь Международного консультативного совета Конгресса Нобелевский лауреат сэр Ричард Робертс (Richard Roberts) и профессор Майкл Блэкберн (Michael Blackburn). Велика роль в разработке программы Нобелевского лауреата Роджера Корнберга (Roger Kornberg). Президентом Конгресса был академик Владимир Скулачев. Работа над программой велась непосредственно председателем программного комитета Сергеем Кочетковым и секретарем программного комитета Мариной Третьяк, на плечи которой легла забота обо всем лекторском корпусе. Невозможно переоценить роль секретаря Конгресса Веры Кнорре. Работа по подготовке тезисов участников была прекрасно проделана координатором Конгресса Александрой Рогальской. Россия обречена жить в научном сообществе, и лишь активное участие российских ученых в международных знаковых форумах поможет нашей стране отстаивать свои позиции. Безусловно, некоторые знаковые научные мероприятия надо проводить и у себя дома.



Торжественное открытие 38-го Конгресса



Губернатор Санкт-Петербурга Георгий Полтавченко на торжественном открытии 38-го Конгресса FEBS



Выступает академик РАН Владислав Панченко, на сцене (слева направо): академик РАН Владимир Скулачев, нобелевский лауреат Арон Чехановер, академик РАН Валерий Черешнев



На сцене БКЗ «Октябрьский»: губернатор г. Санкт-Петербурга Георгий Полтавченко, президент РАН, академик Владимир Фортов и генеральный секретарь FEBS Израэль Пехт



Аркадий Дворкович, заместитель председателя Правительства РФ



Глава EMBL Ян Маттай (Iain Mattaj) с приветственной речью



Открытие 38-го Конгресса в БКЗ «Октябрьский» в Санкт-Петербурге 6-11 июля 2013 г.



Владислав Панченко с приветственной речью на открытии конгресса



Генеральный секретарь FEBS Израэль Пехт



Аркадий Дворкович и Александр Габиров



Г. Полтавченко, В. Фортов, И. Пехт, В. Панченко



Владислав Панченко и Мария Лептин (Maria Leptin)



Академики РАН: Валерий Черешнев и Анатолий Григорьев



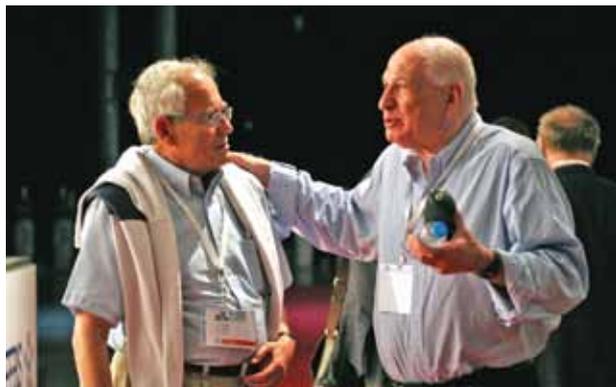
Зал заседаний EMBL



Майкл Села (Micael Sela) читает лекцию, председатели - С. Комиссаренко и В. Черешнев



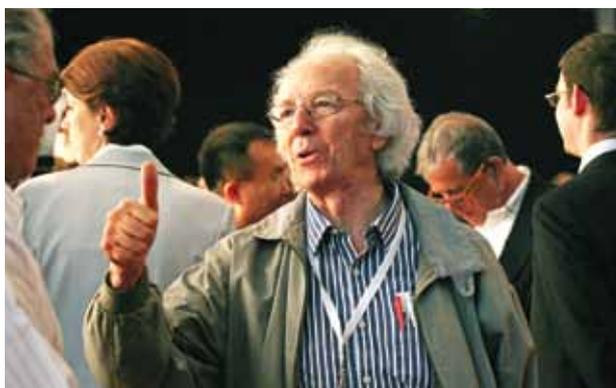
Зал заседаний



Израэль Пехт (Israel Pecht) и Джозеф Шлессингер (Joseph Schlessinger)



Джек Шостак (Jack Szostak)



Эрнесто Карафоли (Ernesto Carafoli)



Владислав Панченко, Александр Габитов и Майкл Села



Общее фото участников конгресса

Проект «Протеом человека» представлен на конгрессе FEBS

по материалам журнала *Proteomics*

Арчаков А.И., Лисица А.В.



Арчаков А.И., академик РАН, директор Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича РАН, член Международного совета основных исполнителей проекта «Протеом человека»



Лисица А.В., член-корреспондент РАН, заместитель директора Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича РАН

В рамках 38-го международного конгресса FEBS (Федерация Европейских биохимических сообществ) хромосомотцентричный проект «Протеом человека» (С-НРР) был впервые представлен широкому биохимическому сообществу. Целью проекта «Протеом человека» является создание каталога белков человека (по аналогии с проектом «Геном человека») и развитие знаний о причинах возникновения заболеваний, способах их предотвращения и лечения, увеличении продолжительности и качества жизни. Поскольку реализация проекта «Протеом человека» возможна только при условии консолидации усилий всех стран, в которых есть необходимые технологии и подготовленные для решения масштабных задач кадры, то организация научного совещания с участием представителей стран-участников проекта была крайне необходимой. Проведение научного совещания по хромосомотцентричному проекту «Протеом человека» в России было поддержано организационным комитетом Международной организации «Протеом человека».

В настоящее время в России сформирован конкурентоспособный задел в данном направлении, создана дорожная карта проекта, сосредоточенная на протеоме 18-й хромосомы, как одной из составляющих хромосомотцентричного проекта «Протеом человека» (см. публикацию PMID: 21563312). В совещании приняли участие известные отечествен-

ные и зарубежные ученые, высококвалифицированные специалисты, работающие в области протеомных исследований и постгеномных технологий – всего более 50 участников, в том числе около 30 участников из-за рубежа. В программе совещания было 29 устных и 5 стендовых докладов. Открыл совещание председатель профессор Gil Omenn (University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA), который осветил общую стратегию, организацию и прогресс развития проекта «Протеом человека». Профессор Ancha Baranova (George Mason University, USA) в своем выступлении описала имеющуюся брешь между так называемыми «-омиками» (геномика, протеомика, транскриптомика, интерактомика, метаболомика и др.) и классической биохимией. Эта тема обсуждалась и в докладах профессора Young-Ki Paik (Yonsei Proteome Research Center, Department of Integrated Omics for Biomedical Research, Korea), Alexey Nesvizhskiy (University of Michigan, Ann Arbor, USA), а также Виктора Згоды из ИБМХ РАН (Москва), который продемонстрировал результаты изучения транскриптопротеома хромосомы 18 за первые 3 года реализации проекта. Доктор Сергей Мошковский из ИБМХ РАН (Москва) в своей презентации представил результаты пилотного исследования возможности сочетания С-НРР и проекта по инвентаризации генома злокачественных опухолей на примере изучения колоректального рака. Петр Лохов из ИБМХ РАН продемонстрировал возможность клинического применения метаболомики для диагностики заболеваний, в частности, диагностики диабета. В докладе академика РАН

Александра Арчакова (ИБМХ РАМН, Москва), посвященном ширине и глубине протеома, была озвучена «прямоугольная» концепция размера протеома, а именно: его ширина (разнообразие видов белков) и его глубина (число копий определенного вида белка). Обсуждению вопроса ширины протеома был посвящен доклад профессора Amos Bairoch (Swiss Institute of Bioinformatics and University of Geneva; Switzerland), который представил описание базы знаний NeXtProt и отметил, что ширина протеома может быть определена только для индивидуального протеома, а не для общего протеома всей популяции человека. В продолжение этой темы Елена Пономаренко из ИБМХ РАМН (Москва) предложила использовать данные NeXtProt для определения числа видов белков в составе усредненного протеома, основываясь на расчетных значениях среднего количества модификаций (сплайс-вариантов, белков с одно-аминокислотными заменами и пост-трансляционными модификациями) на ген. Наличие адекватного биоинформационного подхода для подсчета количества видов белков необходимо для определения размеров протеома, кодируемого одной хромосомой или, например, семейством белков – т.е. в тех случаях, когда экспериментально

количество видов определить затруднительно. Результаты экспериментального подхода для оценки ширины протеома были представлены в докладе доктора С. Нарыжного (Petersburg Nuclear Physics Institute, Gatchina, Russia).

Ряд докладов был посвящен описанию протеомных методов. Так, Александр Макаров из компании Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany свой доклад посвятил использованию Orbitrap масс-спектрометрии в протеомике. Виктор Быков (NT-MDT companies group, Москва-Зеленоград) продемонстрировал биологическое и медицинское применение сканирующих микроскопов. В докладе профессора Сергея Усанова (Institute of Bioorganic Chemistry NASB, Minsk, Belarus), посвященном изучению семейства цитохромов P-450 протеомными методами, было отмечено, что системный подход в изучении семейства цитохромов P-450, включающий экспериментальную энзимологию, исследования *in silico*, анализ кристаллической структуры, протеомную и метаболомную технологии, позволяет объединить открытия и находки в протеомных исследованиях человека.

Следует отметить, что все доклады российских ученых, прозвучавшие на данном совещании, получили высокую оценку зарубежных коллег, что свидетельствует о соответствующем уровне исследований, проводимых в России в настоящее время.

Часть результатов, приведенных в сообщениях российских ученых, была получена в ходе реализации научных проектов, поддержанных РФФИ, в частности, № 12-04-33109, № 12-04-31570.

В заключение профессор Gil Omenn предложил подготовить аналитический обзор по итогам проведенного совещания по хромосомоцентричному проекту «Протеом человека» для публикации в международном журнале *Proteomics* (импакт-фактор 4,505).

Чтобы чаще встречаться

РФФИ и ЕМВО поддержат проведение научных мероприятий на территории России

По материалам газеты «Поиск»



Стороны подписывают соглашение о сотрудничестве (слева направо, первый ряд): Ян Маттай, глава EMBL, Мария Лептин, глава ЕМВО, Владимир Квардаков, заместитель Председателя РФФИ (второй ряд): Яна Павлич (EMBL), Силке Шумахер (ЕМВО), Герлинд Валлон (ЕМВО), Александр Шаров (РФФИ)

В 2011 г. РФФИ подписал соглашение с Европейской лабораторией по молекулярной биологии (EMBL), в рамках которого в 2012–2013 гг. шло финансирование шести совместных исследовательских проектов.

Основы будущего сотрудничества с ЕМВО были заложены летом прошлого года во время проведения в Санкт-Петербурге ежегодного Конгресса Федерации европейских биохимических обществ (ФЕБО) – крупнейшего международного форума лучших биохимиков планеты (мероприятие было поддержано РФФИ). Тогда же состоялось первое знакомство представителей российского фонда с главой ЕМВО Марией Лептин, в ходе которого подчеркивалось, что взаимодействие с этой организацией, обеспечивающей мобильность и научную специализацию по молекулярно-биологическим исследованиям в Европе, даст российским ученым ряд серьезных преимуществ.

Начатый в Санкт-Петербурге разговор недавно продолжился в Гейдельберге, который посетили представители РФФИ: член-корреспондент РАН, заместитель председателя Совета РФФИ Владимир Квардаков, начальник Управления международных связей РФФИ Александр Шаров и другие представители фонда.

В ходе переговоров с руководством ЕМВО (эта организация в свою очередь является подразделением крупной европейской ассоциации ЕМВС – Европейской конференции по молекулярной биологии, которая финансирует как исследовательскую деятельность лаборатории EMBL, так и научные мероприятия, проводимые ЕМВО) обсуждалась возможность повышения мобильности участников исследовательских проектов, осуществляемых при патронаже РФФИ и EMBL. Итогом обсуждений стало решение о проведении на конкурсной основе научных мероприятий в области молекулярно-биологических исследований на территории России. Речь идет о научных конференциях, семинарах, круглых столах, участвовать в которых смогут российские и европейские ученые.

Предполагается, что в 2014 г. в России будет проведено первое меро-

приятие такого профиля (для которого EMBL готов выделить 20 тыс. евро). В дальнейшем число встреч ученых на территории России, поддержанных двумя организациями, можно будет увеличить. В соответствии с принятым планом, уже в марте этого года будет подготовлено объявление о конкурсе, в апреле-мае пройдет конкурс, а первое пилотное мероприятие может состояться осенью этого года.

Продолжится в этом году сотрудничество РФФИ и с Европейской лабораторией по молекулярной биологии. Будет проведен новый конкурс проектов, финансирование которых начнется с 2015 г. Напомним: в рамках действующего соглашения РФФИ с EMBL осуществляется финансовая

поддержка проведения совместных российско-европейских фундаментальных научных исследований в области молекулярной биологии по следующим направлениям: структурная биология (Structural biology), геномика (Genomics), биомолекулярная химия (Biomolecular chemistry), клеточная биология (Cell biology/imaging), развитие технологии XFEL применительно к науке о жизни (XFEL technology development for life science application), высокопроизводительные вычисления (High performance computing). Участники совместных проектов получают сопоставимые гранты с обеих сторон. Европейская сторона по условиям соглашения предоставляет уникальное оборудование и всю исследовательскую инфраструктуру для выполнения работ в лабораториях EMBL, расположенных в Гамбурге, Гренобле, Гейдельберге и других крупных научных центрах молекулярно-биологического профиля.

Светлана Беляева

Фотографии, используемые в выпуске, предоставлены:
пресс-службой РФФИ, журналом «Acta Naturae»,
www.commonswikimedia.org, EMBL

Подписано в печать 16.12.2013. Формат 60 x 90 ¹/₈.
Печ. л. 10. Тираж 1100 экз.

Оригинал-макет ЗАО «ИТЦ МОЛНЕТ»
123104, г. Москва, Малый Палашевский пер., д. 6
Тел./факс: (495) 927 0198,
e-mail: info@molnet.ru
Печать ООО «ТрансАвтоматизация»
121433, г. Москва, ул. Б. Филевская, д. 41, кор.1

