**Оптимизация системы для траспозонного мутагенеза *Mycoplasma* *gallisepticum* и изучение свойств полученных мутантов**

Арзамасов А.А., Фисунов Г.Ю, Евсютина Д.В, Капицкая К.Ю., Побегуц О.В., Говорун В.М.

Лаборатория протеомного анализа ФБГУН НИИ ФХМ ФМБА России

*Mycoplasma* *gallisepticum* относится к классу *Mollicutes* – бактерий с сильно редуцированным геномом (около одного миллиона пар оснований), для которых также характерно отсутствие клеточной стенки и сильная редукция метаболических путей. Тем не менее, несмотря на кажущуюся простоту устройства, многие регуляторные механизмы данной бактерии остаются неизученными. В связи с этим представляется необходимым создание надежной системы для манипуляции с генетическим материалом *M*. *gallisepticum*, в первую очередь для выключения (нокаута) определенных генов. Одним из классических инструментов для решения подобной задачи является транспозонный мутагенез.

В нашей работе был сконструирован вектор, оптимизированный для использования в бактерии *M*. *gallisepticum*, содержащий транспозазу и ген устойчивости к тетрациклину из транспозона Tn4001. Кодирующие участки были сконструированы *de novo*, промоторная и 5′-нетранслируемая (включая сайт связывания рибосомы) области были с небольшими изменениями взяты из соответствующих последовательностей, кодирующих белок rpsP *M.* *gallisepticum*. В качестве 3′-нетранслируемой области (включая терминатор) использован соответствующий участок из предшественника рРНК и белка dps *M*. *gallisepticum*. Для предотвращения повторного встраивания, ген транспозазы был вынесен за пределы участка транспозиции. Полученная система позволила использовать 1 нг плазмиды для получения 10-20 клонов-мутантов с 1 мл культуры.

В результате трансформации мы получили библиотеку из 50 мутантов, содержащих единичную вставку. При картировании места встраивания транспозона с помощью метода "прогулки по хромосоме" установлено, что более двух третей мутантов потенциально являются нокаутными. Для наиболее интересных из них были построены кривые роста, а также проведено сравнение белкового профиля с помощью двумерного дифференциального гель-электрофореза. Полученные результаты указывают на заметное изменение белкового состава у ряда мутантов *M*. *gallisepticum* и являются отправной точкой для исследований более мощными методами протеомики.

**Анализ генетических и эпигенетических изменений, вызванных пролонгированным радиационным воздействием.**

Бабикова Е.А., Наумов В.А., Захаржевская Н.Б., Генерозов Э.В.

Лаборатория молекулярной генетики человека ФБГУН НИИ ФХМ ФМБА России

Ионизирующее излучение индуцирует возникновение свободных радикалов, которые, будучи активными частицами, взаимодействуют с биологическими молекулами, что приводит к множественным повреждениям. Воздействие происходит на всех уровнях и, главным образом, на молекулярном, характеризующемся мутациями в ДНК, а также эпигенетическими изменениями. Наиболее изучены последствия облучения высокими дозами, однако малые дозы, хотя и не вызывают немедленного соматического эффекта, приводят к отдаленным стохастическим последствиям, выражающимся такими феноменами, как генетическая нестабильность, накопление и трансгенерационная передача генетических мутаций.

Для исследования были сформированы 2 группы, включающие сотрудников Российского федерального ядерного центра, подвергшихся различному типу пролонгированного радиационного воздействия (гамма или бета), и группа контроля. Оценка поврежденности ДНК, выделенной из лейкоцитарной фракции крови, была проведена с помощью метода ДНК-комет. Анализ эпигенетических изменений (метилирование ДНК) был выполнен с использованием ДНК- чипа Human Methylation450K (Illumina, США).

В ходе работы произведена оценка метилирования 485512 CpG сайтов во всех группах образцов. Для групп с обоими типами излучений были выявлены достоверные различия в степени метилирования генов DHFR, MIR1977 и RPTOR (P<1.5\* 10-6). Дополнительно, в группе сотрудников с преимущественным воздействием γ-излучения выявлены изменения в генах SVOPL, MTERFD3 и RRAS2 (P<2.6\*10-5). Корреляционный анализ метилирования ДНК со степенью ее поврежденности по результатам метода ДНК-комет показал достоверную зависимость для генов NME7, RAD50 и MIR1977. Гиперметилирование в гене DHFR, участвующем в метаболизме фолатов, может быть одной из возможных причин повышенной частоты возникновения генетических мутаций у облученных лиц. В свою очередь, гиперметилирование гена RAD50, входящего в состав репарационного комплекса MRN, может быть причиной нарушения механизма репарации ДНК при клеточном ответе на радиационный стресс. Нехватка нуклеотидфосфатов, ведущая к нарушениям репарации, так же может быть обусловлена гиперметилированием в гене нуклеозид дифосфат киназы 7 (NME7).

**Атомно-силовая микроскопия неканонических структур фибриногена.**

Баринов Н.А., Протопопова А.Д., Прохоров В.В., Клинов Д.В.

Лаборатория медицинских нанотехнологий ФГБУН НИИ ФХМ ФМБА

Фибриноген – один из ключевых белков крови. Его каноническая структура представляет собой три пары полипептидных цепей, формирующих три узла, соединённых альфа-спиральными нитями.

В данной работе с помощью атомно-силовой микроскопии фибриногена обнаружено, что наряду с нативными молекулами общепринятой структуры присутствуют в небольшом количестве и неканонические его структуры – в основном фибриллы в виде тонких нитей различной длины. Для их исследования проведены эксперименты по структурной перестройке фибриногена при различных температурах и временах взаимодействия с поверхностью подложки. Полученные структуры отличаются от тех, которые содержаться среди канонических молекул при физиологичных условиях.

Также исследовалось методом АСМ взаимодействие фибриногена с молекулами ДНК. Обнаружено что фибриноген не теряет своей структуры так выраженно, как в предыдущем случае.

Интерпретация АСМ изображений неканонических структур на данный момент проблематична и не может быть однозначной. Фибриллы имеют высоту 0.4 нм, меньшую чем высота coiled-coil участков 0.9 нм в нативных молекулах.

Вероятнее всего эти цепи являются следствием разрушения соединяющих сульфидных мостиков, и последующей реорганизации до уровня наблюдающихся фибрилл, соответствующих единичным альфа-бета-гамма цепям и/или их линейным агрегатам, так как гистограмма распределения длин фибрилл содержит ряд пиков в широкой области от 40 до примерно 250 нм..

**Регистрация транспорта макромолекул в канале липидных нанотрубок.**

Башкиров П.В., Чекашкина К.В, Кузьмин П.И. , Протопопова А.Д. , Ушаков А.М., ПозмоговаГ.Е.1, Клинов Д.В.

Лаборатория медицинских нанотехнологий ФБГУН НИИ ФХМ ФМБА России

Нанофлюидика — явление переноса вещества в наноканалах/нанопорах — представляет большой интерес для прикладных направлений медицины, биологии и техники с целью разработки биосенсеров одиночных молекул. Нами впервые предложен новый метод регистрирования нахождения заряженных макромолекул внутри наноканала в условиях малой ионной силы. В качестве наноканала мы используем липидную нанотрубку (НТ), чей радиус люмена составлят 5-10 нм. Стенка НТ представляет собой липидный бислой — двумерная жидкость, в которой также могут возникать явления переноса. Липидные НТ формируются из электронейтральных липидов в условиях малой ионной силы (10 мМ КС1). Радиус люмена НТ может принимать значения от 4 до 10 нм в зависимости от липидного состава. Регистрируемой величиной является ионный ток, текущий через канал НТ при возникновении разности потенциалов на ее концах. В качесте заряженной макромолекулы мы используем короткие одноцепочечные молекулы ДНК, имеющие высокую плотность заряда, который в растворе электролита экранируется ионной шубой. Когда концентрация ионов внутри «шубы» значительно превосходит их объемную концентрацию, появление молекул ДНК внутри канала НТ приводит к уменьшению его удельного электрического сопротивления, что наблюдается по росту ионного тока. Направление электрического поля внутри канала НТ напрямую влияет на транспорт ДНК. Изменение полярности электрического напряжения на концах НТ полностью блокирует транспорт ДНК. Таким образом мы демонстрируем, что существует возможность регистрации прохождения макромолекул через канал, чей радиус значительно превосходит поперечный размер молекулы.

**Конструирование плазмидных векторов для генетической трансформации *Helicobacter* *pylori*.**

Белова А.М.

Лаборатория генной инженерии ФБГУН НИИ ФХМ ФМБА России

*Helicobacter* *pylori* – спиралевидная, грамотрицательная, микроаэрофильная бактерия, которая инфицирует различные области желудка и двенадцатиперстной кишки. Показано, что бактерия ассоциирована с гастритом, а также язвой и раком желудка. Целью работы было создание оптимальных репортерных векторных систем на основе бактерии *H. pylori*.

Для осуществления поставленной задачи были использованы различные генно-инженерные подходы. В частности, были получены рекомбинантные векторы, в составе которых под контролем промоторных областей различных генов *H. pylori* находился ген, кодирующий зеленый флуоресцентный белок (GFP), флуоресценция которого может быть зарегистрирована в отдельных клетках и количественно оценена. Помимо этого использовался метод целевого разрушения генов (нокаут) в хромосоме *H. pylori*. Также были получены векторные конструкции, содержащие слитые последовательности различных генов H.pylori и гена, кодирующего GFP.

Изучение полученных штаммов *H. pylori*, трансформированных вышеуказанными конструкциями, проводилось различными экспериментальными методами. В частности, с помощью ПЦР в реальном времени был проведен анализ уровней экспрессии гена *gfp*, в случае действия на трансформанты различных индукторов транскрипции целевого гена. Помимо этого было проведено измерение флуоресценции GFP в клетках трансформированных штаммов. Также, для исследования изменения флуоресценции GFP в единичных клетках маркерных штаммов *H. pylori*, бактерии были иммобилизованы в каналах микрофлюидного чипа. Оценка проводилась с помощью флуоресцентного микроскопа после изменения pH или температуры среды для культивирования в каналах чипа.

 Таким образом, с помощью различных генно-инженерных подходов были получены векторные конструкции, успешно экспреccирующие GFP в клетках *H. pylori* и имеющие высокий потенциал в качестве репортерных систем для данной бактерии.

**Особенности протеома микобактерий кластера Beijing B0 в условиях *in vitro* культивирования.**

Ю.А. Беспятых, Е.А. Шитиков, И.А. Алтухов, И.О. Бутенко, Д.Г. Алексеев, Е.Н. Ильина

Лаборатория молекулярной генетики микроорганизмов ФБГУН НИИ ФХМ ФМБА России

На сегодняшний день актуальным является функциональный анализ информации, реализуемой геномом *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ), что возможно с привлечение методов протеомного тестирования, в том числе количественной протеомики. Целью настоящего исследования было описать особенности протеома штаммов *M. tuberculosis* кластера Beijing B0 в сравнении с лабораторным штаммом H37Rv условиях *in vitro* культивирования.

В исследование включены 7 штаммов МБТ кластера Beijing B0 и 1 референтный штамм H37Rv. Экстракцию белка из клеток микобактерий проводили согласно разработанной в лаборатории методике. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда (Bradford, 1976). Разделение белков осуществляли методом одномерного гель-электрофореза с окрашиванием Кумаси (Holbrook, 1976). Трипсинолиз проводили в геле согласно описанной ранее методике (Zhiguo, 2010). Безметочное протеомное профилирование белковых экстрактов осуществляли с использованием квадруполь-времяпролетных масс-спектрометров ABSciex TripleTOF 5600 в режиме IDA. Идентификацию пептидов проводили программными пакетами AB SCIEX ProteinPilot v 4.5 и Mascot v 2.2.07. Дальнейшую квантификацию осуществляли с помощью программного обеспечения Progenesis v 4.1.

В общей сложности достоверно идентифицировано 1868 белков для МБТ кластера Beijing B0 и 1560 для штамма H37Rv. Сравнительный количественный анализ штаммов кластера Beijing В0 и H37Rv показал статистически значимые отличия (больше чем в два раза) в степени представленности 118 белков (p<0.05). При этом в штаммах кластера Beijing B0 20 белков имели повышенный уровень экспрессии и 98 сниженный по сравнению с H37Rv. По данным COG-анализа обнаруженные изменения затронули преимущественно белки категорий Q, R и I. Функциональный анализ показал, что мы наблюдаем различия в представленности белков, относящихся к липидному метаболизму и участвующих в ответе на гипоксию. Зафиксированные изменения позволяют сделать предположение о лучшей адаптации штаммов кластера Beijing B0 к выживанию внутри макрофагов.

**Антихламидийная активность рекомбинантных пептидогликан-распознающих белков человека.**
Бобровский П. А.

Лаборатория генной инженерии ФБГУН НИИ ФХМ ФМБА России

Пептидогликан-распознающие белки человека (PGRPs) являются частью врожденного иммунитета, активирующими, по литературным данным, двухкомпонентные системы бактерий, что вызывает их гибель. В данной работе впервые было исследовано действие рекомбинантных PGRPs на внутриклеточную патогенную бактерию *Chlamydia trachomatis*.

Были получены стабильные линии HeLa и транзиентно трансфицированные клетки Expi293, синтезирующие рекомбинантные PGRP1, PGRP2, PGRP3 и PGRP4 в культуральную жидкость. Чтобы оценить влияние PGRP на эффективность заражения клеток, элементарные тельца C.trachomatis инкубировали в культуральной жидкости, содержащей PGRPs, в течение трех часов, и заражали клетки HeLa. Через 48 часов клетки фиксировали, окрашивали хламидийными антителами с флуоресцентной меткой и подсчитывали количество включений *C. trachomatis*. Активацию транскрипции генов двухкомпонентной системы ответа на стресс хламидий (ctcB-ctcC) изучали с помощью ПЦР в режиме реального времени.

В ходе работы было показано, что после инкубации элементарных телец хламидий с культуральной жидкостью, содержащей PGRPs, количество хламидийных включений в клетках HeLa через 48 часов после заражения уменьшается на 66-86% по сравнению с контролем. Также, продемонстрировано снижение инфекционной способности дочерних элементарных телец после контакта с PGRPs. В работе исследовали активацию транскрипции генов ctcB-ctcC двухкомпонентной системы хламидий после взаимодействия элементарных телец с PGRP. Показано увеличение транскрипционной активности генов ctcB-ctcC в 10-15 раз после взаимодействия элементарных телец с PGRP, при этом максимум продукции мРНК наблюдается через два часа после контакта элементарных телец с пептидогликан-распознающими белками человека.

Таким образом, мы впервые показали, что рекомбинантные пептидогликан-распознающие белки ингибируют развитие инфекции *C. trachomatis*.

**Роль генов репарации и рекомбинации в формировании устойчивости *E. coli* к антибиотикам класса хинолонов.**

Бодоев И.Н., Смирнов Г.Б., Ильина Е.Н.

Лаборатория молекулярной генетики микроорганизмов ФБГУН НИИ ФХМ ФМБА России

Механизмы устойчивости бактерий к хинолонам, типичным представителем которых является налидиксовая кислота (NAL), изучены достаточно детально. Согласно опубликованным данным NAL необратимо связывается ДНК-гиразой и блокирует её способность вносить в ДНК отрицательные сверхвитки (и релаксировать ДНК, т.е. вносить надрезы, ликвидирующие положительные сверхвитки). Известно, что формирование устойчивость к хинолонам связано в основном с модификациями мишени действия, обусловленными мутациями в гиразных и топоизомеразных генах. В первую очередь у E. coli возникает мутация в гене gyrA, которая приводит к аминокислотной замене Ser-83-Leu и МПК > 4 мг/л. Затем возможно появление мутаций в генах parC (Ser-80-Arg и Glu-84-Val) и gyrB (Asp-426-Asn и Lys-447-Glu), а также дополнительная мутация в gyrA (Asp-87-Asn).

Однако абсолютно неизученным остается роль генов системы репарации и рекомбинации (а также наличие в этих «существенных» генах мутаций) в формировании фенотипически-устойчивых штаммов. Следовательно, целью нашей работы является анализ влияния мутаций в генах репарации и рекомбинации на частоту (возможность) возникновения устойчивости к хинолонам у штаммов *E. coli*.

Первичные эксперименты проделаны на известных штаммах E. coli, несущих мутации в генах recA - AB2463, JC5088, lexA - JC169, PAM5717 и uvrD - KS106. Для контроля использовался штамм AB1157 с «диким» генотипом по этим генам.

Мутантные штаммы AB2463, JC169 и PAM5717 оказались более чувствительны к NAL по сравнению с контролем и обладали более низкой частотой возникновения NAL-R мутантов. Нам удалось получить высоко-устойчивые к NAL производные штаммов JC5088, KS106, AB1157, но не AB2463. Отобранные высоко-устойчивые клоны несли одинаковые Ser-83-Leu в GyrA и Gly-163-Val в GyrB мутации. В опытах с новобиоцином из AB2463 были выделены два морфотипа устойчивых колоний, отличающихся по своей UV чувствительности. Мутации в генах гиразы нами обнаружены не были, однако UV чувствительные колонии имели последовательность RecA белка идентичную родительскому штамму, тогда как UV резистентные несли мутацию Gly-299-Val. Полученные данные противоречивы и не позволяют сделать однозначные выводы о роли системы репарации, репликации и рекомбинации в формировании резистентности *E. coli*.

**Структура микробного сообщества стратифицированных озер.**

Болдырева Д. И., Бабенко В. В.

Лаборатория постгеномных исследований в биологии ФБГУН НИИ ФХМ ФМБА России

Стратифицированные водоемы, в том числе меромиктические, представляют собой водные экосистемы, характеризующиеся четким разделением слоев по содержанию солей, что определяет специфический состав микроорганизмов для каждого слоя. Стратифицированные водоемы играют важную роль накопительных систем, участвуют в круговороте биологически значимых элементов серы, углерода, водорода, азота. Микробные сообщества меромиктических озер и функциональные возможности данных сообществ пока мало изучены.

В настоящей работе выполнена количественная и качественная оценка бактериального разнообразия трёх стратифицированных озер бассейна Белого моря.

Для определения таксономического состава микробных сообществ, населяющих данные озера, были получены пробы воды с различных участков, отличающихся по глубине. Для каждой пробы проведено секвенирование вариабельных участков V3 – V4 и V5 – V6 гена 16S рРНК с использованием прибора Illumina MiSeq. По результатам секвенирования показано, что во всех пробах преобладают представители филума *Chlorobia*, *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, при этом их относительная представленность колеблется в зависимости от глубины забора исследуемого образца.

Для более точной таксономической классификации и определения функциональных возможностей метагеномного образца одного из озёр было выполнено shotgun секвенирование и дополнительное секвенирование вариабельных участков V2-V4-V8 и V3-V6,V7-V9 гена 16S рРНК, проведенные на приборе IonTorrent PGM. Риды, соответствующие последовательностям гена 16S, были собраны и проанализированы при помощи сборщика IDBA\_UD и баз данных RDP и SILVA. В результате анализа shotgun секвенирования было показано, что бактериальное сообщество исследуемых озёр характеризуется доминированием бактерий, принадлежащих к родам *Chlorobium* и *Thiomicrospira*. Менее представлены бактерии рода *Arcobacter*, *Methylocaldum*, *Desulfobacteraceae*, *Desulforhopalus*.

**Оптимизация методов метагеномного профилирования, основанных на анализе вариабельности гена 16S рРНК.**

Вахитова М.Т, Бабенко В.В
Лаборатория постгеномных исследований в биологии ФБГУН НИИ ФХМ ФМБА России

Наиболее распространенным методом для проведения таксономической классификации бактериальных сообществ в настоящее время является секвенирование вариабельных участков гена 16S рРНК. На данный момент имеется широкий выбор программного обеспечения для анализа полученных данных, а также разрабатываются новые более быстрые и эффективные алгоритмы.

В данном исследовании было выполнено сравнение работы двух наиболее популярных классификаторов: RDP (по базе RDP) и LCAClassifier (по базе SILVA). Для проведения анализа использовались данные, полученные в результате секвенирования смеси, состоящей из 25 образцов геномной ДНК бактерий, относящихся к 21 роду. Ранее каждый из образцов был охарактеризован с точностью до вида в результате проведения сиквенса гена 16S рРНК по Сенгеру. Библиотеки были приготовлены с использованием Ion 16STM Metagenomics Kit, содержащим два сета праймеров, первый из которых позволяет получать ампликоны V2, V4, V8 вариабельных фрагментов, а второй - V3, V6-V7, V9. Сиквенс был проведен на приборе Ion Torrent PGM. На первом этапе исследований использовались необработанные риды. При проведении таксономической классификации на уровне рода LCAClassifier идентифицировал 19 присутствующих в образце бактерий по первому сету праймеров и 18 по второму. Также в списке идентифицированных бактерий имелись ложноположительные результаты, число которых составляло 1 по первому сету праймеров и 4 по второму. При проведении таксономической классификации на уровне рода RDP classifier идентифицировал 20 присутствующих в образце бактерий по первому сету праймеров и 19 по второму. Число ложноположительных результатов составляло 6 по первому сету праймеров и 12 по второму. На втором этапе исследования была проведена сборка в IDBA и дальнейшая классификация на основе контигов. LCAClassifier идентифицировал 14 бактерий и получил 1 ложноположительный результат. RDP classifier обнаружил 18 бактерий и получил 3 ложноположительных результата. Т.о. можно сделать вывод о том, что для проведения классификации на основе необработанных ридов предпочтительно использование LCAClassifier, а после предварительной сборки – RDP classifier. Аналогичный эксперимент был проведен на образцах метагенома кишечника здоровых людей, который подтвердил сделанные ранее выводы.

**Изучение механизмов синхронизации процессов передачи информации у  *Mycoplasma gallisepticum* при адаптации к тепловому воздействию**

Евсютина Д. В., Фисунов Г.Ю., Мазин П.В., Говорун В.М.

Лаборатория протеомного анализа ФБГУН НИИ ФХМ ФМБА России

Общепринятое положение, обосновавшееся ещё со времен формулировки центральной догмы молекулярной биологии, что количество белка в клетке определяется представленностью мРНК, в настоящее время может быть оспорено. При изучении механизмов адаптации паразитической бактерии класса *Mollicutes* - *Mycoplasma gallisepticum* - была отмечена слабая корреляция между уровнем мРНК и белка при тепловом воздействии на бактерию. Под действием стресса наблюдается значительное изменение уровня мРНК. Экспрессия около 25% генов увеличивается, примерно такое же количество проявляет спад транскрипционной активности, и около 50% - не претерпевает изменений. Однако, на белковом уровне, картина абсолютно иная. Меняется представленность только порядка десяти белков, но даже такое состояние позволяет клетке жить и делиться.

Одной из возможных причин такой десинхронизации в передаче генетической информации может являться то, что не все получаемые транскрипты затем транслируются рибосомами. Для проверки этого предположения необходимо было сравнить представленность мРНК в рибосомально-связанной фракции с представленностью тех же транскриптов в суммарной цитоплазматической фракции в нормальном состоянии и при стрессовом воздействии на клетку.

Анализ полученных транскриптомных данных выявил некую избирательность рибосомы по отношению к мРНК. Разбив все транскрипты на группы, было обнаружено, что при тепловом воздействии, вектора изменения половины (53% от всех статистически значимых измерений) мРНК в обеих фракциях сонаправлены, а 5% направлены в противоположные стороны. Ответ клетки на стрессовое воздействие проявился в падении экспрессии мРНК, кодирующих белки трансляционного аппарата, а также участвующих в поддержании структуры ДНК (например, HU). Увеличенная экспрессия показана для мРНК, чьи продукты являются факторами вирулентности микоплазмы, участниками клеточного деления. Однако функции большинства сверхпредставленных мРНК неясны. В качестве правила отбора, которым «руководствуется» рибосома при выборе мРНК рассмотрено влияние образования вторичных структур в некодирующих областях.

**Поиск предикторов ишемии миокарда после раннего прекращения фондапаринукса при ОКС без подъемов ST с низким риском неблагоприятного течения заболевания**

А.С. Князев, И.С. Явелов.

Лаборатория клинической кардиологии ФБГУН НИИ ФХМ ФМБА России

Цель. В исследовании возможности раннего прекращения введения фондапаринукса при остром коронарном синдроме без подъемов ST (ОКСбпST) низкого риска, охарактеризовать особенности больных у которых впоследствии зарегистрирована стенокардия. Материал и методы. В проспективное несравнительное исследование включено 53 больных, госпитализированных с диагнозом ОКСбпST ≤48 час (медиана 2,3 час) после ангинозного приступа. Во всех случаях риск по шкале GRACE не превышал 108 баллов, не был повышен уровень тропонина Т, на ЭКГ не было депрессий сегмента ST ≥0,1 мВ. После однократного подкожного введения фондапаринукса антикоагулянты не применялись; аспирин и β-адреноблокаторы получали все больные, клопидогрел – 35 человек (66%). Через 12-24 час после инъекции фондапаринукса начинали Холтеровское мониторирование ЭКГ в 12 отведениях продолжительностью ≥36 час. Перед выпиской проводили нагрузочную пробу на тредмиле. Больные наблюдались в течение 6 мес. Результаты. Тредмил-тест проводился у 48 больных, в 12 случаях (25,0%) был положительным. Положительные результаты нагрузочного теста в 2 раза чаще выявлялись только у больных с утяжелением стенокардии напряжения как причины госпитализации (30,6 против 66,7%; р=0,041); достоверных различий по другим характеристикам (включая индекс GRACE) не было. Стенокардия в ближайшие 6 мес отмечена в 16 (30,2%) случаях, чаще выявлялась у больных с на хронической сердечной недостаточностью в анамнезе, при догоспитальном введении наркотических анальгетиков (в обоих случаях 2,8 против 25,0%; р=0,03) и реже, если причиной госпитализации был затяжной ангинозный приступ (91,7 против 50,0%; р=0,002). Выводы. При быстром прекращении фондапаринукса у больных, экстренно госпитализированных с ОКСбпST и имевших низкий риск неблагоприятного течения заболевания, возможности выявления лиц с положительным результатом нагрузочной пробы перед выпиской и наличием стенокардии ближайшие 6 мес ограничены. Индекс GRACE согласно критериям отбора был низким, и его значения у этого контингента больных не были сопряжены с последующим выявлением клинически выраженной ишемии миокарда.

**Цитокины Тh1-иммунного ответа при миалгическом энцефаломиелите/синдроме хронической усталости, ассоциированном с репликацией вируса Эпштейна-Барр**

Крынский С. А., Огурцов Д.П., Малашенкова И.К., Гурская О.Г., Компанеец И.А., Дидковский Н.А.

Лаборатория клинической иммунологии ФБГУН НИИ ФХМ ФМБА России

Миалгический энцефаломиелит/синдром хронической усталости (МЭ/СХУ) – хроническое неврологическое заболевание с иммунными расстройствами (G93.3 по классификации МКБ-10). Предмет наших исследований – МЭ/СХУ, ассоцированный с герпесвирусной инфекцией (ГВИ). По нашим данным и сообщениям других авторов, при МЭ/СХУ нередко выявляют признаки недостаточности Тh1-ответа. Однако до настоящего времени не изучена связь иммунных нарушений у этих больных с уровнем вирусной нагрузки. Обследовали 62 больных МЭ/СХУ (34 муж., 28 жен., средний возраст 34±5 лет). Контролем служили 32 условно здоровых добровольца. Проводили количественное определение вируса Эпштейна-Барр, герпесвирусов человека 6 и 7 типов (EBV, HHV-6, HHV-7) в слюне и в крови, изучали показатели гуморального и клеточного иммунитета, содержание Тх1-цитокинов (IFNγ, IL-2, IL-15) в крови. Критерием высокой степени вирусной нагрузки EBV в слюне было число копий ДНК вируса более 104/мл. Различия считали достоверными при p<0.05.

Частота обнаружения EBV в слюне при МЭ/СХУ была 62.3%, HHV-6 – 53.2%, HHV-7 – 97.2%. При этом высокую вирусную нагрузку EBV имели 41.5% больных МЭ/СХУ. Микст-инфекция EBV/HHV-6 была обнаружена у 77.2% больных с высокой репликацией EBV и у 54.5% больных с низкой его репликацией. Исследование Тх1-цитокинов показало, что у больных МЭ/СХУ уровень IFNγ и IL-2 был достоверно ниже при высокой вирусной нагрузке EBV, чем при низкой (p=0.006 и p=0.03). Кроме того, у больных была отрицательная корреляция между уровнем Тх1-цитокинов и числом копий EBV в слюне: между IFNγ и уровнем EBV (r= -0.35), между IL-2 и уровнем EBV (r= -0.44), между IL-15 и уровнем EBV (r= -0.59). Число NK-клеток (CD16+) при высоком уровне вирусной нагрузки EBV было меньше, чем при низкой, а число Т-клеток (CD3+) больше (р=0.008). Полученные данные показывают, что при МЭ/СХУ имеет место EBV-ассоциированная иммунная недостаточность: повышение числа копий EBV сопровождается уменьшением числа NK-клеток и уровня Tх1-цитокинов в крови. При подавлении репликации EBV у половины больных увеличивается число NK-клеток, а также содержание IFNγ и IL-2. Сделано предположение, что при высокой вирусной нагрузке EBV могут оказывать большее иммуносупрессивное влияние, которое, наряду с другими факторами, поддерживает хроническую вирусную инфекцию у больных МЭ/СХУ.

**Ноотропный и стресспротекторный эффект иммунотропного препарата из кожи**

Крючкова А.В., Иноземцев А.Н., Белова О.В., Луканидина Т.А., Москвина С.Н., Зимина И.В., Шмелева Е.В.

Лаборатория молекулярной иммунологии и биохимии ФГБУН НИИ ФХМ ФМБА России, Москва

К-активин – иммунотропный препарат, получаемый из кожи свиньи. В данной работе изучалось влияние К-активина на выработку условной реакции активного избегания (УРАИ) у крыс, что позволяет оценить ноотропные свойства препарата, а также влияние К-активина на функциональные нарушения УРАИ (сбой и пространственную переделку реакции избегания), что позволяет оценить стресспротекторные свойства последнего.

Работа проводилась на крысах-самцах линии Wistar (n = 19) массой 150-200 г на начало эксперимента. Животным ежедневно в течение 5 суток внутрибрюшинно вводили
К-активин в дозе 0,5 мг/кг веса крысы; контрольной группе вводился физиологический раствор. Далее у крыс вырабатывали УРАИ в челночной камере в течение 5 сессий, по 20 предъявлений в сессию. Условным сигналом служил звук зуммера, безусловным – удар электрическим током. У обучившихся животных (критерий обученности – 80 % реакций избегания) проводили сбой УРАИ, при котором верная реакция животного не приводила к выключению тока, и животные получали 5 ударов электротоком. Затем в 20-и предъявлениях тестировали уровень избегания в прежних условиях. После сбоя животным восстанавливали УРАИ и осуществляли пространственную переделку с помощью смены местоположения отверстия между отсеками, и в течение 20 предъявлений тестировали воспроизведение реакции в новых условиях.

Было установлено, что у животных, получавших К-активин, условная реакция вырабатывалась быстрее, чем у контрольной группы, со второго дня опыта. Полученные данные позволяют предположить наличие ноотропных свойств у К-активина. При этом к пятому дню опыта группы уравнивались в степени обучения УРАИ. У крыс, получавших К-активин, выработанный навык в условиях сбоя не нарушался, в отличие от контрольной группы. При проведении пространственной переделки реакции избегания у группы, получавшей К-активин, навык выполнения УРАИ восстановился быстрее, чем у контрольной. Полученные данные позволяют предположить наличие стресспротекторных свойств у К-активина.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 14-04-32087 мол\_а

**Алгоритм расчета индивидуального генетического риска развития возрастной макулодистрофии на основании геномных данных.**

Кулемин Н.А., Генерозов Э.В.

Лаборатория Молекулярной Генетики Человека ФБГУН НИИ ФХМ ФМБА России.

Возрастная макулодистрофия (ВМД) является широко распространенным заболеванием, развитие которого значительно детерминировано генетическими факторами. Наиболее значимые из них локализованы в 5 генах: С3, HTRA1, CFH, CFB и VEGF. В дополнение к ним ассоциация с заболеванием показана еще для множества нуклеотидных полиморфизмов других генов. В последнее время, в связи с внедрением в медицинскую практику методов полногеномного исследования стал актуальным вопрос о разработке алгоритмов оценки индивидуальных генетических рисков, основанных на анализе множества генетических вариантов. В рамках настоящего исследования был разработан алгоритм оценки индивидуального риска ВМД, основанный на анализе произвольной комбинации нуклеотидных полиморфизмов, ассоциированных с ВМД по результатам опубликованных ассоциативных исследований. Максимальное число полиморфизмов в тестовой панели достигало 75. Было использовано два метода вычисления суммарного риска: метод логистической регрессии и метод взвешенных рисков. Вычисления проводили на выборке пациентов с подтвержденным статусом заболевания и известным статусом генотипов по основным 5 генам (n=110), генотипированной на высокоплотных ДНК-чипах контрольной группе (n=1240) и искусственно созданной выборки геномов 10000 больных пациентов на основании опубликованных статистических данных по распространенности выбранных полиморфизмов среди пациентов - жителей центральной и восточной Европы.

Специфичность анализа на группе реальных пациентов, генотипированных только по 5 основным генам была достаточно высокой (площадь под ROC – кривой (AUC= 0,70). В свою очередь, анализ выборки виртуальных пациентов показал высокую специфичность теста на панели из всех возможных полиморфизмов (AUC=0,74)). В целом, полученные результаты подтверждают применимость разработанного подхода для определения генетических рисков заболеваний, детерминированных множеством генетических вариантов.

**Фибринолитическая и изопептидазная активности рекомбинантной дестабилазы медицинской пиявки *Hirudo medicinalis.***

Курдюмов А.С.

Лаборатория генной инженерии ФБГУН НИИ ФХМ ФМБА России

Дестабилаза – полифункциональный лизоцим секрета слюнных желёз медицинской пиявки, обладающий фибринолитической активностью, которая выражается в расщеплении изопептидных ε-(γ-Glu)-Lys связей в стабилизированном фибрине. Стабилизированный фибрин образуется на последней стадии процесса свёртывания крови, благодаря действию специфичной транспептидазы (фактор XIIIa). Действие дестабилазы направлено на превращение стабилизированного фибринового сгустка в нестабилизированный, что приводит к медленному разрушению тромба. Такой механизм действия фермента препятствует ретромбозам и другим осложнениям, которые возникают при использовании срочных тромболитических агентов. Поэтому изучение дестабилазы открывает широкие возможности для использования данного фермента в качестве тромболитического препарата нового поколения.

Целью данной работы являлось изучение фибринолитической и изопептидазной активности рекомбинантной дестабилазы медицинской пиявки. Мы сравнивали между собой четыре рекомбинантных дестабилазы, полученных в различных системах экспрессии: в бактериях *Escherichia coli*, дрожжах *Pichia pastoris* и культуре клеток человека Expi293. В случае *E. coli* мы получили нерастворимую дестабилазу в тельцах включения, которую после выделения ренатурировали и растворимую дестабилазу в виде слитого белка с шапероном SlyD. Шаперон отщепляли специфичной TEV-протеиназой. В культурах P.pastoris и клеток человека дестабилаза накапливалась в растворимом виде в культуральной жидкости. Специфичную изопептидазную активность исследовали двумя методами: на хромогенном субстрате L-γ-Glu-pNA и на диизопептиде γ-Glu-ε-Lys. Общую фибринолитическую активность проверяли методом просветления фибриновых пластин.

В ходе работы мы показали, что все исходно растворимые дестабилазы обладают сходными изопептидазной и фибринолитической активностями. Активность ренатурированного фермента существенно ниже (до пяти раз), что возможно говорит о некорректном фолдинге данной дестабилазы. Оказалось, что ни один из исследуемых рекомбинантных белков не расщепляет диизопептид.

Таким образом, мы получили рекомбинантную дестабилазу-2 в различных системах экспрессии и показали фибринолитическую и изопептидазую активность данного фермента.

**Aнализ изображений. Определение объектов(клеток) на микроскопических снимках. Измерение интесивности флюоресценции.**

Маттис П.А., Алексеев Д.Г.

Лаборатория биоинформатики, ФГБУН НИИ ФХМ ФМБА России

В области флюоресцентной микроскопии ученым часто приходится сталкиваться с большими объемами данных в виде фотографических снимков.

Основная цель работы заключалась в автоматизации анализа интенсивности флюоресценции клеток на микроскопических снимках.

В ходе работы была разработана консольная программа на языке программирования python, позволяющая обрабатывать группы изображений.

Программа обрабатывает снимки группами и сохраняет все данные об интенсивностях и площадях объектов, определенных на каждом отдельном снимке, в csv файл.

Для каждого обрабатываемого снимка сохраняется картинка с обведением и нумерацией определенных на нем объектов.

Программа поддерживает задание границ размеров объектов.

В фотографии часто приходится сталкиваться с цифровой засветкой:

Каждый пиксель 8 битного изображения может иметь $2^{8}$ возможных значений по интенсивности (0-255). Поэтому возникают случаи, когда этого набора значений недостаточно для записи интенсивности реального физического объекта. Программа позволяет указать процент пикселей максимального значения интенсивности 255 в объекте, превыщение которого исключает этот объект из обработки.

Пользуясь такой программой, можно автоматически определять флюоресцирующие клетки на микроскопических снимках, подсчитывать интенсивность флюоресценции каждого объекта.

На данный момент программа находится на тестировании

**Взаимодействие бактерии *M*. *gallisepticum* с клеткой-хозяина**

Матюшкина Д.С., Побегуц О.В., Бутенко Д.И., Говорун В.М.

Лаборатория протеомного анализа ФБГУН НИИ ФХМ ФМБА России

Род *Mycoplasma* относится к Грам-положительным бактериям без клеточной стенки, способным вызывать хронические заболевания у человека и животных. Характерной особенностью данных бактерий является их способность длительное время персистировать внутри организма, не оказывая на него сильного патогенного воздействия.

Объектом нашего исследования служила *Mycoplasma* *gallisepticum*, которая паразитирует в домашней птице. Несмотря на то, что по большинству литературных данных *M*. *gallisepticum* является пристеночным паразитом, в ряде работ была показана способность *M*. *gallisepticum* проникать внутрь эукариотических клеток (HeLa-229 и CEF). Для нас представляет большой интерес, какие изменения может претерпевать бактерия *M*. *gallisepticum*, находясь длительное время внутри клетки-хозяина.

Были проведены эксперименты по совместной культивации культур клеток HeLa, mES, HD3 с бактерией *M*. *gallisepticum*. Для получения внутриклеточной микоплазмы зараженные клеточные культуры обрабатывались гентамицином в конечной концентрации 600мкг/мл в течении 3 часов с последующим высеванием клеток на полужидкую среду для *M*. *gallisepticum*. Выросшие колонии свидетельствовали о заражении клеточных культур. В дальнейшем колонии пересевались в жидкую среду и культивировались до логарифмической фазы роста.

При сравнении *M*. *gallisepticum*, выделенной из зараженных культур, с лабораторным штаммом методом двумерного дифференциального электрофореза обнаружены изменения в белковом профиле. Наибольший интерес представляет наблюдение смены антигенного репертуара (поверхностных белков VLH) при внутриклеточном персистировании микоплазмы. Данное явление может является объяснением длительной локализации бактерии внутри клетки, незамеченной иммунной системой. Помимо поверхностных антигенов, происходят изменения в представленности белков гликолиза (фруктозо-1,6-дифосфатальдолаза; пируваткиназа; глицероальдегид-3-фосфат дегидрогеназа), что может свидетельствовать о большой затрате АТФ, необходимого для заражения и выживания бактерии внутри клетки-хозяина.

**Исследование адсорбции двухцепочечной ДНК на поверхности модифицированного графита**

Протопопова А.Д., Газизова Ю.С., Подгорский В.В., Баринов.Н.А., Прохоров В.В., Клинов Д.В.

Лаборатория Медицинских Нанотехнологий ФБГУН НИИ ФХМ ФМБА России

Жесткость ДНК хорошо изучена различными экспериментальными и теоретическими методами. Гибкость ДНК обусловлена малыми изменениями углов между соседними парами оснований, возникающими из-за тепловых флуктуаций, она хорошо описывается моделью червеобразной цепи (WLC). Изгибная жесткость ДНК зависит от температуры и ионной силы раствора и в рамках WLC модели обычно характеризуется персистентной длиной. Персистентную длину в растворе измеряют различными оптическими и механическими методами. Очень привлекательна идея ее измерения с помощью электронной или атомно-силовой микроскопии (АСМ), однако она неизбежно наталкивается на необходимость изучения взаимодействия ДНК с подложкой.

Методом АСМ нами была исследована адсорбция ДНК из растворов с низкой ионной силой (0,03 - 40 мМ) на поверхность графита, покрытого амфифильным модификатором GM. Разработан алгоритм оцифровки формы, которую молекула ДНК принимает на поверхности подложки, вычисления персистентной длины и других изгибных параметров ДНК. Показано, что при адсорбции на модифицированный графит ДНК принимает конформацию близкую к проекции 3D клубка на 2D поверхность. Обнаружен эффект “гофрировки” – мелкой извитости ДНК на поверхности GM-графита, интенсивность этого эффекта возрастает с уменьшением ионной силы раствора. Предложена модель, согласно которой, эффект “гофрировки” возникает из-за несимметричной компенсации зарядов ДНК при взаимодействии с GM-графитом.

**Разработка метода бимолекулярного FRET-анализа динамики вторичных структур ДНК**

Секридова А. В., Варижук А. М., Карпов В. А., Позмогова Г. Е.

Лаборатория искусственного антителогенеза ФБГУН НИИ ФХМ ФМБА России

Неканонические структуры ДНК (ncDNA) сегодня рассматриваются как перспективные мишени для создания лекарственных препаратов и новые генно-регуляторные элементы. Активно разрабатываются G-квадруплекс (GQ) направленные агенты для лечения онкологических и нейродегенеративных заболеваний [Mathad et al., 2011; Wu et al., 2010]. В этой связи актуально изучение динамики конформационных превращений полинуклеотидов. Известные методы основанны на мономолекулярных FRET-системах и не способны учесть влияние естественного дуплексного окружения сайтов ncDNA, что существенно ограничивает область их применения.

Цель настоящей работы состоит в создании нового бимолекулярного FRET-метода для выявления структурных перестроек фрагментов ДНК, несущих последовательности GQ/IM (I-мотив), и дальнейшего использования в скрининге экзогенных и эндогенных конформационных ДНК модуляторов. В отличие от мономолекулярной системы в нашем случае метка и гаситель расположены в разных молекулах комплекса. Это позволяет избежать частичного гашения флуоресценции в денатурированном состоянии и таким образом улучшить соотношение сигнал/шум. Выявление nc-структур основано на сравнительном анализе кривых флуоресцентного плавления контрольных образцов с известной вторичной структурой и исследуемых комплексов. Изменения флуоресценции регистрировали с помощью стандартного ДНК-амплификатора в режиме реального времени.

Нами был разработан дизайн и синтезированы комплексы олигомеров, имеющих различную структуру (дуплексов, фланкированных дуплексами GQ-IM, GQ-петля, IM–петля и ряд других, всего 8 моделей), исследованы их свойства, оптимизированы условия измерений, регистрации и обработки данных. Адекватность нового метода подтверждена экспериментами, демонстрирующими известные зависимости формирования nc-структур от концентрации ионов K+ и Li+. Применение бимолекулярного FRET-метода в формате планшетного амплификатора позволяет надеяться на создание эффективного инструмента для первичного скрининга природных и синтетических агентов, влияющих на конформацию ДНК и являющихся потенциальными лекарствами.

**Белковый профиль *Melioribacter roseus* в аэробных и анаэробных условиях**

Смоляков А.В., Алтухов И.А., Побегуц О.В., Бутенко И.О., Алексеев Д.Г.

ФГБУН НИИ ФХМ ФМБА России, Москва

МФТИ (ГУ), Долгопрудный

*Melioribacter* *resous*, новый анаэроб, являющийся одним из двух типичных представителей типа *Ignavibacteriae*. Метаболически универсальная бактерия, способная расти за счет питания сахарами или пептидами, за счет аэробного дыхания или за счет диссимилятивной утилизации арсената (соль мышьяковой кислоты), нитратов или Fe(III). Недавний анализ генома выделил ключевые элементы цепи переноса электронов, позволяющий понять способность бактерии адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды, за счет комбинации окисления различных доноров электронов при аэробном дыхании или сокращения акцепторов электронов.

В данной работы мы провели количественного и качественного протеомного анализ на основе масс-спектрометрических экспериментов для белковых клеточных лизатов для Melioribacter rosues P3M-2, полученных с прибора AB SCIEX TripleTOF 5600 в лаборатории протеомного анализа НИИ ФХМ. Идентификация происходила при помощи программ Mascot (версия 2.2.07) и MaxQuant (версия 1.5.2.8). Количественный анализ проводился с помощью программных решений OpenMS, MaxQuant (алгоритм LFQ и iBAQ) и Progenesis LC-MS и алгоритма emPAI.

В ходе анализа было идентифицировано 599 белков, достоверно отличающихся (p-value < 0.05 и изменения больше чем в 2 раза) между состояниями. Для 39 белков выше описанные критерии были подтверждены всеми 5 методами. На основе полученных результатов был проведен функциональный анализ.

**Сравнение пациентов с фибрилляцией предсердий, принимающих и не принимающих пероральные антикоагулянты.**

Ткаченко К.Г., Эрлих А.Д.

Лаборатория клинической кардиологии ФБГУН НИИ ФХМ ФМБА России

Предпосылки. Согласно действующим рекомендациям пероральные антикоагулянты (ПА) являются обязательным компонентом лечения пациентов с фибрилляцией предсердий (ФП) с умеренным и высоким риском тромбоэмболических осложнений. Однако частота использования ПА в реальной клинической практике в России не высока. Но не использование ПА пациентами с ФП отчасти может быть обусловлено медицинскими факторами (противопоказания, сопутствующие заболевания и т.д.).

ЦЕЛЬ настоящего анализа состояла в сравнении пациентов с ФП, которые принимали и не принимали ПА, для выявления медицинских факторов, связанных с не использованием ПА. Материал. В исследование включены 232 пациента с пароксизмами ФП, последовательно госпитализированные в ГКБ № 29. У 181 пациента, пароксизм ФП не был первым, и риск тромбоэмболий по шкале CHADS2VASC был 1 балл и выше (наличие в качестве фактора риска только женского пола приравнивалось к 0 баллам). Данные этих 181 пациентов использованы в настоящем анализе. Результаты. Доля пациентов, регулярно догоспитально принимавших ПА, оказалась низкой (62 из 181 или 34%). Из них 25 человек (40,3%) принимали варфарин, 18 (29,0%) – дабигатран, 17 (27,5%) – ривароксабан, 2 (3,2%) – апиксабан. Группы пациентов, принимавших и не принимавших ПА, значимо не различались по доле пожилых людей (как старше 65 лет, так и старше 75 лет), по доле женщин, пациентов со стенокардией, гипертонией, хронической сердечной недостаточностью, кровотечениями, злоупотреблением алкоголем в анамнезе, а также по среднему значению систолического артериального давления, частоте сердечных сокращений, по медиане значения шкалы CHADS2VASC, уровня гемоглобина, гематокрита, креатинина. Среди пациентов, не принимавших ПА, была обнаружена тенденция к большей частоте инфаркта миокарда (24% против 15%; р=0,3) и диабета (22% против 11%; р=0,1) в анамнезе, и тенденция к меньшей частоте перенесенного ранее инсульта (11% против 22%; р=0,3). Заключение. Не выявлено значимых различий между пациентами с ФП, принимавшими и не принимавшими ПА по основным анамнестическим и лабораторным показателям. Не использование пациентами ПА может быть обусловлено другими факторами, в частности социальными. Для изучения их роли необходимо существенное увеличение объёма регистрируемой информации.

**Влияние УФ-излучения на дисульфидные связи в кератинах волоса.**

Федоркова М.В.

Лаборатория биофизических методов диагностики ФБГУН НИИ ФХМ ФМБА России

Кератин входит в промежуточные филаменты клеток эпителиальной ткани эктодермального происхождения – кератиноциты.

Больше всего кератинов содержится в стержне волоса, около 80%, поэтому волос является удобной моделью изучения механизмов изменения кератинов под действием внешних факторов, в первую очередь, ультрафиолетового излучения.

Материалы и методы. Для исследования было взято шесть седых волос здорового добровольца. Обработку волос УФ светом проводили, используя бактерицидную лампу BLM-12, Medicor, в течение 6 часов. Отрезки обработанных УФ-светом и исходных образцов волос фиксировали на стеклянной подложке для последующего анализа с помощью конфокальной микроскопии (микроскоп  Thermo Scientific Raman DXR, лаборатория сверхбыстрых процессов в биологии МГУ). На каждом срезе измерения проводились в двух точках в центре и в двух на периферии. Часть образцов подвергали обработке карбонатным буфером для экстракции слабосвязанных кератинов.

Результаты. В контрольных образцах сигнал S-S связей на периферии был выше, чем в центре среза, а сигнал SH-групп не различался. В обработанных УФ-светом в образцах зарегистрировали одновременное снижение сигнала S-S cвязей и рост сигнала S-H связей как в центре, так и на периферии волоса, при этом степень выраженности эффекта снижалась от периферии к центру. После обработки волос карбонатным буфером сохранялись различия по содержанию S-S и S-H связей между облученными и необлученными образцами. Спектрофотометрический анализ (реакция Эллмана) подтвердил рост содержания SH во фракциях растворимых (слабосвязанных) и нерастворимых кератинов в волосах после УФ-обработки.

Заключение. УФ-излучение вызывает снижение содержания S-S и увеличение содержания S-H связей в кератинах волоса. УФ излучение затрагивает не только внешний слой, но и весь кортекс волоса, при этом эффекты сильнее выражены на периферии. Под действием УФ-излучения возрастает содержание S-H связей как в растворимых, так и в нерастворимых кератинах волоса.

**Разработка подходов к идентификации генов бактериального происхождения в геномных сборках эукариотических организмов.**

Шичкова П.А., Артамонова И.И., Алексеев Д.Г.

Лаборатория биоинформатики ФБГУН НИИ ФХМ ФМБА России

Большая часть биологических данных недостаточно тщательно обрабатывается и анализируется, например, в геномных сборках эукариотических организмов в публичных базах данных иногда обнаруживаются гены бактериального происхождения. Цель данной работы - разработка метода поиска и анализа генов потенциально бактериального происхождения в геномных сборках эукариот. Задачи работы – найти в геномной сборке комара-звонца *Polypedilum vanderplanki* гены бактериального происхождения и определить, каким бактериям они принадлежат, являются ли они генами эндосимбионта, микробиоты личинки комара или лабораторного загрязнения, охарактеризовать такие гены, если они найдутся. В ходе работы был проведен анализ последовательностей генов из генома *P. vanderplanki* по результатам работы алгоритма BLAST на базу Non Redundant Sequences, числу интронов в генах, GC составу, таксономический и филогенетический анализ, функциональная аннотация, проверка потенциально бактериальных генов на принадлежность к генам митохондрий; было изучено распределение потенциально бактериальных генов по скаффолдам комара, частоты использования кодонов, межгенные расстояния, величины покрытия генов прочтениями, наличие повторов. С помощью перечисленных методов были выявлены кандидаты в гены бактериального происхождения в геномной сборке комара *P. vanderplanki*. Мы выделили 51 потенциально бактериальный скаффолд из 894 скаффолдов по результатам анализа частот вхождения генов, кодирующих белки потенциально бактериального происхождения. Из 17824 генов *P. vanderplanki* 629 штук были идентифицированы как потенциально бактериальные. Из них 562 гена принадлежат организмам типа *Bacteroidetes*. Из их числа, 241 принадлежат организмам семейства *Cytophagaceae*. Полученные результаты хорошо согласуются с результатами исследования метагенома данного комара, где бактерии данных таксонов составляют значительную долю от общей бактериальной представленности.

Литература

1. Genome sequence analysis indicates that the model eukaryote Nematostella vectensis harbors bacterial consorts. Artamonova I.I., Mushegian A.R. Applied and environmental microbiology, 2013, 79(22): 6868-73, doi: 10.1128/AEM.01635-13