

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
**ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-КЛИНИЧЕСКИЙ ЦЕНТР**  
**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ**  
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА



**НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ  
МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ  
ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ  
ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА**



**НАУЧНЫЕ ТРУДЫ**

**МОСКВА**  
**23-24 апреля 2019**



# НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ

ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России

23–24 апреля 2019

## АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Аксельрод А.С. 8  
Алексеев Д. 14  
Алехина О.М. 5  
Арапиди Г.П. 18, 30  
Артемьева М.М. 16  
Атауллаханов Ф.И. 24  
Бабаян К.С. 8  
Бабенко В.В. 2  
Багров Д.В. 3, 22, 27  
Баландина А.Н. 24  
Басманов Д.В. 17  
Башкиров П.В. 11  
Белова А.М. 17  
Бобровский П.А. 4  
Богданова А.С. 3  
Богомазова А.Н. 6  
Богомякова М.Е. 4  
Букато О.Н. 9  
Бутенко И.О. 5  
Варижук А.М. 11, 20, 23  
Васильев С.В. 8  
Вахитова М. 14  
Веселовский В.А. 21  
Вигонт В.А. 6  
Волков Т.А. 20  
Воловиков Е.А. 6  
Волок В. 14  
Генерозов Э.В. 12, 19  
Говорун В.М. 5  
Голощяпов О.В. 21  
Графская Е.Н. 7, 16  
Григорьева Т. 14  
Гуляев А.С. 15  
Демкин В.В. 28  
Долудин Ю.В. 12  
Евсютина Д.В. 9, 29  
Еремеев А.В. 4, 6, 31  
Желанкин А.В. 8  
Жукова Ю. 26  
Зиганшин Р.Х. 2  
Зубкова О.А. 18  
Зубов А.И. 9  
Иванов Д.Г. 10  
Ивлева Е.А. 10  
Ивченков Д.В. 11  
Ильина Е.Н. 21  
Исаакова Е.А. 23  
Казначеева Е.В. 6  
Каныгина А.В. 12  
Карганова Г. 14  
Киррилова Ю.Г. 20  
Климина К.М. 21  
Клинов Д.В. 3, 10, 17, 22, 27  
Колесникова О.А. 4  
Кононихин А.С. 10  
Корниенко М.А. 15  
Кострюкова Е.С. 12, 14  
Кошечкин С.И. 28  
Кузнецова В. 14  
Кузьмин П.И. 11  
Кулемин Н.А. 19  
Купцов Н.С. 15  
Лавренова В.Н. 16  
Лагарькова М.А. 4, 6, 18, 26, 31  
Ладыгина В.Г. 9  
Лазарев В.Н. 4, 7, 16  
Лацис И.А. 7  
Лебедева О.С. 6, 26  
Летаров А.В. 15  
Маланин С. 14  
Манолов А.И. 21  
Матюшкина Д.С. 5  
Митько Т.В. 17  
Морозова О.В. 10  
Муллюкина А.С. 18  
Надеждин К.Д. 7  
Недвиг Е.А. 19  
Николенко Т.А. 20  
Образцова Е.А. 3, 10  
Олехнович Е.И. 21  
Павленко А.В. 21  
Павлова Е.Р. 3, 7, 10, 22  
Павлова Ю.И. 23  
Панькова Н.В. 16  
Петрунина Н.А. 24  
Побегуц О.В. 9  
Подгорный О.В. 7  
Позмогова Г.Е. 20, 23  
Полина Н.Ф. 7  
Попов В.В. 27  
Прусаков К.А. 17  
Семашко Т.А. 9  
Семенов И.А. 26  
Соколова А.И. 22, 27  
Старикова Е.В. 28  
Стоногина Д.А. 8  
Султанов Р.И. 12, 18, 26, 30  
Тяхт А. 14  
Уткин Ю.Н. 2  
Фисунов Г.Ю. 9, 29  
Храмова Ю.В. 27  
Цой Е.А. 29  
Чепурных Ю.Ф. 26  
Чунослова А.А. 30  
Шарова Е.И. 8, 12  
Шельгин Ю.А. 12  
Шендер В.О. 18, 26  
Шитиков Е.А. 15  
Шнайдер П.В. 26  
Шувалова Л.Д. 31



# НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России

23–24 апреля 2019

## ТРАНСКРИПТОМНЫЙ И ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ ЯДОВИТЫХ ЖЕЛЁЗ ЗМЕИ *AZEMIOPS FEAE*

Бабенко В.В.<sup>1</sup>, Зиганшин Р.Х.<sup>2</sup>, Уткин Ю.Н.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Лаборатория постгеномных исследований в биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

<sup>2</sup>Лаборатория протеомики ИБХ РАН

<sup>3</sup>Лаборатория молекулярной токсикологии ИБХ РАН

Яды змей представляют собой сложные смеси различных биологически активных компонентов, и обладающих множеством функций, и свойств. Физиологические эффекты ядов так же очень разнообразны, они могут проявлять протеолитическую, антимикробную активность, а также нейротоксические, цитотоксические, гемостатические и гемолитические эффекты. Эти особенности делают змеиный яд незаменимым источником для поиска новых соединений с различными фармакологическими свойствами. Исследования в этой области полезны не только для создания эффективных противоядий и лекарственных средств, но и для разработки новых инструментов в молекулярной биологии.

В настоящее время наиболее опасными для человека и животных являются змеи семейств *Viperidae*, *Elapidae* и *Colubridae*, имеющие хорошо развитый аппарат для впрыскивания яда, включающий передние зубы. Из них наиболее распространены змеи семейства *Viperidae*, обитающие на территориях от полярного круга до экватора. К настоящему времени семейство *Viperidae* включает 36 родов и 260 видов. Яды наиболее опасных представителей этого семейства достаточно хорошо исследованы. Основной фармакологический эффект этих ядов — гемотоксический. Однако, по-прежнему относительно немного известно о действии минорных и прежде всего - пептидных компонентов яда змей. Приведенные данные свидетельствуют о том, что яды змей семейства *Viperidae* могут содержать нейроактивные соединения [1-3].

Объект исследования — нетипичная бирманская гадюка *Azemipos feae* - является уникальным источником новых пептидов с неисследованными свойствами. Некоторые из этих пептидов являются гомологами и аналогами регуляторных молекул организма млекопитающих. Изучение этих компонентов яда является важной задачей, для понимания значения и механизмов работы подобных факторов в организме человека. Новые знания в этой области могут стать теоретической базой для создания новых лекарственных препаратов.

### Список использованной литературы

1. Yamazaki Y., Morita T. Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. *Toxicon*. 2004. V. 44. P. 227231.
2. Schmidt J.J., Weinstein S.A., Smith L.A. Molecular properties and structure-function relationships of lethal peptides from venom of Wagler's pit viper, *Trimeresurus wagleri*. *Toxicon*. 1992. V. 30. P. 1027-1036.
3. McArdle J.J., Lentz T.L., Witzemann V., et al. Waglerin-1 selectively blocks the epsilon form of the muscle nicotinic acetylcholine receptor. *J. Pharmacol. and Exp. Ther.* 1999. V. 289. P. 543-550.



# НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ

## ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России

23–24 апреля 2019

### ЭЛЕКТРОСПИННИНГ ДВУХКОМПОНЕНТНЫХ СИСТЕМ НА ПРИМЕРЕ СИСТЕМЫ ПЛА-БСА

Богданова А.С., Павлова Е.Р., Образцова Е.А., Багров Д.В., Клинов Д.В.

*Лаборатория медицинских нанотехнологий ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России*

Электроспиннинг – широко распространенный метод изготовления полимерных нановолокон и волокнистых материалов с применением сильного электростатического поля напряжением порядка 10 кВ. Волокнистые материалы, полученные электроспиннингом, могут использоваться в качестве фильтров, сорбентов, материалов для тканевой инженерии и доставки лекарственных средств. В настоящее время активно исследуется электроспиннинг мультикомпонентных белково-полимерных систем. Добавление белковой компоненты может улучшить биосовместимость, гидрофильность и другие качества материалов. Мультикомпонентные волокна могут быть изготовлены путем электропиннинга из белково-полимерной смеси или с помощью коаксиального электроспиннинга, где растворы компонент подаются по-отдельности. В первом случае компоненты перемешиваются внутри волокна, во втором – формируется структура сердечник-оболочка.

В данной работе мы исследовали свойства волокнистых матриц из полилактида (ПЛА) и бычьего сывороточного альбумина (БСА), сформированных методами коаксиального электроспиннинга и электроспиннинга смеси. ПЛА и БСА были растворены в гексафторизопропанол (ГФИП). Трёхкомпонентная фазовая диаграмма ПЛА-БСА-ГФИП показала, что для данной системы фазовое разделение проявляется в широком диапазоне концентраций. Морфология коаксиальных волокон и волокон из смесей была исследована методом сканирующей электронной микроскопии. С помощью просвечивающей электронной микроскопии мы показали структуру коаксиальных волокон. Также мы изучили кинетику выхода БСА из обоих типов матриц в водный раствор. БСА в составе коаксиальных матриц растворялся быстрее, чем БСА из смесевых волокон, что можно объяснить образованием однокомпонентных волокон наряду с коаксиальными. Тем не менее для обоих типов матриц наблюдалось пролонгированное высвобождение белка: в период с 1 по 7 день процент вышедшего белка лежал в пределах 40-50%. Таким образом, мультикомпонентные матрицы, изготовленные методом электроспиннинга, могут быть использованы для пролонгированного высвобождения белковых лекарственных средств.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 17-75-30064).*



## НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России

23–24 апреля 2019

### ПОИСК ВОЗМОЖНЫХ ПУТЕЙ ИНГИБИРОВАНИЯ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НК КЛЕТОК ПРОТИВ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР, НЕ ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ HLA I КЛАССА

Богомякова М.Е., Колесникова О.А., Бобровский П.А., Лазарев В.Н., Лагарькова М.А.,  
Еремеев А.В.

*Лаборатория клеточной биологии и лаборатория генетической инженерии ФГБУ ФНКЦ  
ФХМ ФМБА России*

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) потенциально могут служить источником клеточного материала для направленной дифференцировки в необходимый тип клеток и последующей трансплантации. Тем не менее, получение пациент-специфических (аутологичных) ИПСК требует длительного времени и больших средств, а также контроля качества каждой линии репрограммированных клеток. Потенциальным решением проблемы гистосовместимости может стать создание «универсальных» линий ИПСК, производные которых подходили бы для трансплантации всем реципиентам. Один из возможных подходов - нокаут гена  $\beta$ -2-микроглобулина (*b2m*), который отвечает за формирование функциональной структуры HLA I класса. Клетки, не экспрессирующие молекулы HLA I класса, не должны распознаваться аллогенными CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами. В то же время отсутствие HLA-I должно делать производные ИПСК с инактивацией гена *b2m* чувствительными к НК клеточному лизису. Теоретически, активацию НК клеток можно снизить за счет гиперэкспрессии растворимой формы MICA, связывание которого с NKG2D рецептором будет способствовать снижению цитотоксичности НК клеток.

Ранее в нашей лаборатории были получены линии ИПСК с инактивацией гена *b2m*, из которых были дифференцированы фибробластоподобные производные (ФП). Методом проточной цитометрии было показано, что на поверхности ФП с нокаутом *b2m* отсутствует экспрессия молекул HLA-ABC и *b2m*, в отличие от изогенного контроля дикого типа. Иммуногенность ФП анализировали при сокультивировании с клетками-эффекторами (Т-лимфоциты и НК клетки) с помощью лактат-дегидрогеназного теста. Было показано, что ФП с нокаутом *b2m* обладают повышенной резистентностью к цитотоксическому действию CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов по сравнению с изогенным контролем дикого типа при различных соотношениях эффекторных и таргетных клеток. Тем не менее, нокаутные линии оказались чувствительными к НК клеточному лизису. Также были получены данные, свидетельствующие о снижении цитотоксичности НК клеток при повышенной экспрессии белка MICA без трансмембранного домена клетками-мишенями линии HEK293.

*Данная работа поддержана грантом РФФ №17-75-10206.*



# НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России

23–24 апреля 2019

## ГРАНИЦЫ ВАРИАбельНОСТИ ПРОТЕОМА *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII*

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

*Лаборатория простых систем ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России*

Одними из наиболее удобных модельных организмов для системных биологических исследований являются бактерии класса молликут. Их отличительными чертами являются отсутствие клеточной стенки, редуцированный геном, изменение функции кодона UGA со стоп-кодона на кодирование триптофана. Вследствие паразитизма данных бактерий, у них редуцированы многие метаболические пути. В отличие от большинства молликут, ведущих исключительно паразитический образ жизни, вид *Acholeplasma laidlawii*, также принадлежащий к классу молликут, относят в основном к сапрофитам и комменсалам, их удавалось обнаружить в тканях растений и сточных водах, что позволяет предположить у них сравнительно большие адаптивные способности.

В данной работе на модели *Acholeplasma laidlawii* был разработан метод протеомного профилирования отдельных колоний и моноклональных культур. С помощью данного подхода был изучен ответ *A. laidlawii* на обработку ингибитором матричного синтеза - рифампицина. С помощью метода мониторинга множественных реакций (MRM) были получены протеомные профили отдельных колоний и полученных из них моноклональных культур *A. laidlawii* после обработки бактериальной культуры рифампицином. Была установлена степень варибельности ключевых белков *A. laidlawii* между различными клонами, а также определена группа белков, чья представленность не варьировала. Таким образом были получены качественные и количественные характеристики протеома *A. laidlawii*, и получена оценка пределов варибельности состава протеома *A. laidlawii*.



# НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ

ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России

23–24 апреля 2019

## МОДЕЛЬ СПИНОЦЕРЕБЕЛЛЯРНОЙ АТАКСИИ I ТИПА НА ОСНОВЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Воловикова Е.А.<sup>1</sup>, Еремеев А.В.<sup>1</sup>, Вигонт В.А.<sup>2</sup>, Казначеева Е.В.<sup>2</sup>, Лебедева О.С.<sup>1</sup>, Богомазова А.Н.<sup>1</sup>, Лагарькова М.А.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Лаборатория клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

<sup>2</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Среди наследственных нейродегенеративных заболеваний человека можно выделить группу заболеваний, вызванных экспансией полиглутаминовых участков (pQ) в белках. К этому классу заболеваний относится спиноцеребеллярная атаксия первого типа (SCA-1) – аутосомно-доминантное нейродегенеративное заболевание, вызванное экспансией CAG повторов в гене *ATXN1*. Тяжесть заболевания зависит от длины непрерывного CAG участка гена *ATXN1*. При SCA-1 наблюдается гибель клеток Пуркинью мозжечка. Белок ATXN1 участвует в транспорте мРНК, транскрипционной регуляции генов, образует динамичные внутриядерные агрегаты. Для животных моделей известно несколько молекулярных путей, приводящих к развитию заболевания, такие как изменение эффективности комплекса-репрессора транскрипции ATXN1-CIC, нарушение репарационной активности клетки, вызванные интеграцией мутантного белка, повреждения ядерной мембраны и другие.

Ранее полученные в нашей лаборатории линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) с экспансией в гене *ATXN1* являются удобным инструментом для проверки существующих гипотез и дальнейшего изучения молекулярных путей развития SCA-1. Мы получили нейрональные и глиальные культуры, а также органоиды мозга из ИПСК с мутацией в гене *ATXN1*. С целью проверить гипотезу о нарушениях механизмов репарации при SCA-1 мы провели тесты репарационной активности нейронов и кожных фибробластов. По аналогии с данными для других нейродегенеративных заболеваний, мы провели RNA-FISH для анализа распределения CAG-содержащих мРНК в фибробластах, глиальных клетках и нейронах. Также на культурах нейронов мы показали повышенное количество изменений формы ядра в условиях, имитирующих старение клеток путем добавления протеасомного ингибитора MG132. Для различных клеточных культур мы провели экспрессионный анализ ключевых генов-участников развития SCA-1.

Полученная нами клеточная модель SCA-1 является перспективной для дальнейшего использования. В будущем мы планируем провести ряд масштабных экспериментов для изучения молекулярных механизмов развития полиглутаминовых заболеваний с использованием этой модели в сравнении с имеющимися у нас моделями других PolyQ-заболеваний – SCA-17 и хореи Гентингтона.



# НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ

ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России

23–24 апреля 2019

## АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ *HIRUDO MEDICINALIS*: ОТ ФУНКЦИЙ К ДЕЙСТВИЮ

Графская Е.Н., Надеждин К.Д., Подгорный О.В., Лацис И.А., Полина Н.Ф., Павлова Е.Р.,  
Лазарев В.Н.

Лаборатория генной инженерии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Рост антибиотикорезистентности побуждает к разработке альтернативных стратегий лечения инфекционных заболеваний. Антимикробные пептиды (АМП), компоненты врожденного иммунитета всех живых организмов, являются перспективными лекарственными средствами нового поколения для борьбы с бактериальными инфекциями. Мы применили разработанный вычислительный алгоритм для анализа сборки генома медицинской пиявки *Hirudo medicinalis*, с целью поиска потенциальных антимикробных пептидов. Полученные в ходе анализа пептиды были синтезированы, их антимикробная активность была протестирована в отношении трех видов бактерий (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* и *Chlamydia trachomatis*). Восемь из двенадцати пептидов обладали антимикробной активностью. Два из них, 3967 (FRIMRILRVLKL) и 536-1 (RWRLVCFLCRRKKV), демонстрировали подавление роста всех трех видов бактерий при минимальной ингибирующей концентрации 10 мкМ.

Мы проанализировали цитотоксическую и гемолитическую активность всех пептидов. Было показано, что пептиды не обладают цитотоксической активностью и проявляют низкую гемолитичность. Кроме того, был проведен анализ вторичной структуры пептидов с использованием ЯМР-спектроскопии, который подтвердил альфа-спиральную структуру для пептида 3967. Мы проанализировали изменение морфологии бактерий после инкубации с пептидами методом сканирующей электронной микроскопии. По результатам исследования, мы предполагаем различия в механизмах действия пептидов 3967 и 536\_1.

Наши экспериментальные данные подтверждают применимость разработанного вычислительного алгоритма для идентификации антимикробных пептидов с низкой токсической и гемолитической активностью. Использование разработанного алгоритма позволило обнаружить два антимикробных пептида *Hirudo medicinalis*, которые могут являться потенциальными кандидатами для терапии различных инфекционных заболеваний.



## НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России

23–24 апреля 2019

### **ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ микроРНК miR-146a-5p, miR-21-5p и miR-320a ХАРАКТЕРИЗУЮТСЯ ПОВЫШЕННЫМ УРОВНЕМ ЭКСПРЕССИИ В ПЛАЗМЕ ПРИ ПАРОКСИЗМАЛЬНОЙ ФИБРИЛЛЯЦИИ ПРЕДСЕРДИЙ**

Желанкин А.В., Васильев С.В., Стоногина Д.А., Бабалян К.С., Шарова Е.И., Аксельрод А.С.

*Лаборатория молекулярной генетики человека ФГЮБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России*

Профили циркулирующих внеклеточных микроРНК (ц-микроРНК) плазмы и сыворотки крови могут характеризовать ряд патологических состояний человека, в том числе и наличие фибрилляции предсердий (ФП). Однако, для ряда таких ц-микроРНК имеются противоречивые данные о направленности изменения экспрессии при ФП. В данном исследовании 8 ц-микроРНК плазмы, для которых были опубликованы данные об ассоциации с ФП, и потенциально вовлеченные в патогенез ФП (hsa-miR-409-3p, hsa-miR-328-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-375), были проанализированы на предмет изменения их уровней экспрессии с помощью количественной ПЦР по технологии TaqMan с использованием специфических зондов. В анализ также были включены также микроРНК для контроля гемолиза (miR-23a-3p, miR-451a) и одна референсная микроРНК (miR-16-5p), на которую производилась нормировка. Группа участников исследования включала условно здоровых лиц (30 чел., средний возраст 47,1 лет), участников с наличием гипертонической болезни 1-2 степени (30 чел., 57,6 лет), участников с наличием диагностированной врачами-кардиологами пароксизмальной или постоянной ФП на фоне ГБ (30 чел., 68,0 лет) и на фоне ИБС (20 чел., 71,4 лет), и лиц с наличием ИБС без ФП (20 чел., 70,6 лет). Степень гемолиза образцов плазмы оценивалась спектрофотометрически по разности величин пиков на длинах волны 414 и 385 нм (коэффициент гемолиза HS) по описанным ранее методикам. Для исследования были взяты только те образцы, значение HS для которых не превышало 0,25. Сравнение относительных уровней экспрессии ц-микроРНК производилось с использованием дисперсионного анализа с поправкой на множественное сравнение Бонферрони-Хольма, а также с учетом поправки на влияние параметров HS и соотношения miR-23a-3p и miR-451a, и наличия сахарного диабета 2 типа; различия считались значимыми, если коэффициент значимости  $p$  не превышал 0,1. Было обнаружено, что экспрессия микроРНК miR-146a-5p, miR-21-5p и miR-320a повышена во всех группах с наличием ФП и в группе с наличием ИБС по сравнению с условно здоровыми лицами ( $p < 0,05$ ). Экспрессия miR-320a была повышена во всех группах с наличием ФП по сравнению с группой с наличием ГБ без ФП ( $p < 0,05$ ). Группа с наличием ФП на фоне ИБС характеризовалась повышенной экспрессией miR-146a-5p, miR-150-5p, miR-21-5p, miR-320a и miR-451a по сравнению с условно здоровыми лицами и лицами с ГБ без ФП.



# НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ

## ФГБУ ФНЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России

23–24 апреля 2019

### ИДЕНТИФИКАЦИЯ НУКЛЕОИД-АССОЦИИРОВАННЫХ БЕЛКОВ *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM*

А.И. Зубов<sup>1</sup>, Д.В. Евсютина<sup>1</sup>, В.Г. Ладыгина<sup>1</sup>, О.Н. Букато<sup>1</sup>, Г.Ю. Фисунов<sup>1</sup>, Т.А. Семашко<sup>1</sup>,  
О.В. Побегуц<sup>1</sup>

Лаборатория протемного анализа, отдел молекулярной биологии и генетики ФГБУ ФНЦ  
ФХМ ФМБА России

Полученные на сегодняшний день данные о структуре бактериального нуклеоида дают полное основание считать, что нуклеоид – очень динамичная и пластичная структура, изменяющаяся во время клеточного цикла и быстро реагирующая на изменения окружающей среды. Одним из удобных объектов для исследования структуры бактериального нуклеоида являются микоплазмы, для которых характерны маленький размер генома и значительная редукция известных систем регуляции экспрессии генов из-за паразитического образа жизни. В нашей лаборатории на примере *Mycoplasma gallisepticum* было показано, что десятки оперонов, в том числе и принципиально важные для клетки гены, отвечающие за трансляцию и деление клетки, не могут транскрибироваться на наблюдаемом уровне только благодаря активности промотора. Их экспрессия поддерживается и координируется с помощью новых неизвестных механизмов. Мы предполагаем, что одним из таких механизмов может быть динамически меняющаяся структурная организация хроматина. Известно, что структуру хромосомы поддерживают нуклеоид-ассоциированные белки (НАБ). У *Mycoplasma gallisepticum* известно лишь три гистоноподобных белка и пока ничего неизвестно о представленности ДНК-связывающих белков. В настоящей работе методом мягкого лизиса клеток *Mycoplasma gallisepticum* и последующего фракционирования лизата с помощью центрифугирования в линейном градиенте сахарозы проведено выделение нативного нуклеоида в двух различных условиях, при которых наблюдается отсутствие варибельности структуры: в стационарной фазе роста клеточной культуры и в синхронизированной культуре в активной фазе роста. Методом дифференциального 2Д электрофореза и ВЭЖХ масс-спектрометрии проведено профилирование белков, входящих в состав нуклеоида для этих двух условий. Сравнительный МС-анализ позволил выявить ряд белков как общих для двух фаз роста, так и характерных для каждой из них. Кроме известных ДНК-связывающих белков удалось выявить ряд белков с неизвестной функцией, которые могут быть возможными кандидатами, принимающими участие в структурной организации хроматина.



# НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ

## ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России

23–24 апреля 2019

### ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ МЕТАЛЛИЧЕСКИЕ НАНОКЛАСТЕРЫ И НАНОЧАСТИЦЫ

Ивлева Е.А., Образцова Е.А., Павлова Е.Р., Морозова О.В., Кононихин А.С., Иванов Д.Г., Клинов Д.В.

*Лаборатория медицинских нанотехнологий ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России*

Металлические нанокластеры (НК), состоящие из нескольких десятков атомов, представляют собой новый класс флуоресцентных наноматериалов. Вследствие малого размера (<2 нм) непрерывная электронная плотность состояний распадается на дискретные уровни энергии и тем самым НК проявляет молекуло-подобные свойства<sup>1</sup>. Стабилизация НК с помощью органических лигандов обеспечивают хорошую стабильность, сильную флуоресценцию и биосовместимость. Такие свойства делают НК хорошим кандидатом для применения в биовизуализации<sup>2</sup>, маркировке клеток и биосенсировании<sup>3</sup>.

В данной работе были получены флуоресцентные НК золота и кадмия, а также их композитные НК с использованием бычьего сывороточного альбумина (БСА) в качестве восстановителя и стабилизатора. ПЭМ высокого разрешения показал, что размеры НК были менее 1,6 нм. По результатам масс спектрометрии и элементного анализа золотые и кадмиевые НК содержали ~ 15 атомов и ~ 35 атомов соответствующих металлов, в то время как композитные НК состояли из ~10 и ~30 атомов золота и кадмия. Флуоресценция всех типов НК возбуждалась в широком диапазоне с максимумом эмиссии при 650 нм (для золотых НК) и 500 нм (для кадмиевых НК). КД спектроскопия показала, что белковый компонент НК слегка денатурирует во время синтеза из-за щелочных условий (pH = 11) и сохраняет это состояние после образования НК. Методом нанопреципитации из НК были получены флуоресцентные наночастицы (НЧ) со средним размером около 100 нм. ПЭМ подтвердил, что металлические НК не агрегируют в металлических НЧ во время синтеза. Полученные НЧ обладали почти полностью теми же оптическими свойствами, что и исходные НК.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 17-75-30064).*

<sup>1</sup> Jie Zheng, Philip R. Nicovich, and Robert M. Dickson, 'Highly Fluorescent Noble-Metal Quantum Dots', *Annual Review of Physical Chemistry*, 58.1 (2006), 409–31 <<https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.58.032806.104546>>.

<sup>2</sup> Xu Wu and others, 'Ultrasmall Near-Infrared Gold Nanoclusters for Tumor Fluorescence Imaging in Vivo', *Nanoscale*, 2.10 (2010), 2244–49 <<https://doi.org/10.1039/c0nr00359j>>.

<sup>3</sup> Saravanan Govindaraju and others, 'Fluorescent Gold Nanoclusters for Selective Detection of Dopamine in Cerebrospinal Fluid', *Nature Publishing Group*, 2017, 1–12 <<https://doi.org/10.1038/srep40298>>.



# НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России

23–24 апреля 2019

## ПЕРЕХОД КЛУБОК-СПИРАЛЬ АМФИФИЛЬНОЙ НО СПИРАЛИ БЕЛКА ЭПСИНА НА ИСКРИВЛЕННОМ ЛИПИДНОМ БИСЛОЕ И ВЛИЯНИЕ ВСТРОЕННОЙ В БИСЛОЙ НО СПИРАЛИ НА МОРФОЛОГИЮ МЕМБРАН.

Ивченков Д. В., Кузьмин П. И., Варижук А. М., Башкиров П. В.

Лаборатория электрофизиологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Морфогенез мембран посредством периферийных белков актуальная тема современных исследований, требующая новых экспериментальных и теоретических подходов [1]. Клатрин опосредованный эндоцитоз – один из ярких примеров сложных процессов, изучающийся в рамках обозначенной области знаний. Один из его важных участников – эпсин, взаимодействует с мембраной посредством специального фрагмента – амфифильной НО спирали и индуцирует в ней положительную кривизну [2]. Роль НО спирали в этом процессе является сегодня предметом дискуссии [3] и требует экспериментальных проверок и количественных моделей. Так же амфифильные участки встречаются во многих других белках, например в ArfGAP1, который инициирующий разборку COP1 оболочки или в magainin 2, проявляющем антибактериальные свойства [4]. Поэтому изучение амфифильных пептидов поможет понять широкий круг биологических явлений.

В данной работе изучается взаимодействие НО пептида белка эпсина с липидным бислоем разного состава и разной кривизны. Были получены следующие экспериментальные результаты:

1. уменьшение радиуса липидной нанотрубки вследствие встраивания спиралей (с 18нм до 11нм при  $\sim 1$ мкмоль НО в растворе);
2. отсутствие тубуляции гигантских униламеллярных везикул (ГУВ) при концентрации  $> 3$ мкм НО пептида, несмотря на то, целый ENTH домен эпсина (который содержит НО) тубулирует ГУВы при тех же концентрациях;
3. методом кругового дихроизма показано увеличение вероятности перехода клубок-спираль при увеличении кривизны липидного бислоя.

### Список литературы

- [1] Bassereau, P., Jin, R., Baumgart, T., Deserno, M., Dimova, R., Frolov, V.A., Bashkirov, P.V., Grubmüller, H., Jahn, R., Risselada, H.J. and Johannes, L., 2018. The 2018 biomembrane curvature and remodeling roadmap. *Journal of physics D: Applied physics*, 51(34), p.343001.
- [2] Ford, M.G., Mills, I.G., Peter, B.J., Vallis, Y., Praefcke, G.J., Evans, P.R. and McMahon, H.T., 2002. Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature*, 419(6905), p.361.
- [3] Stachowiak, J.C., Schmid, E.M., Ryan, C.J., Ann, H.S., Sasaki, D.Y., Sherman, M.B., Geissler, P.L., Fletcher, D.A. and Hayden, C.C., 2012. Membrane bending by protein–protein crowding. *Nature cell biology*, 14(9), p.944.
- [4] Drin, G. and Antonny, B., 2010. Amphipathic helices and membrane curvature. *FEBS letters*, 584(9), pp.1840-1847.



# НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ

ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России

23–24 апреля 2019

## ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ТАРГЕТНЫХ ПАНЕЛЕЙ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕОАНТИГЕННОГО ПРОФИЛЯ ОБРАЗЦОВ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ТОЛСТОЙ И ПРЯМОЙ КИШКИ

Каныгина А.В., Шарова Е.И., Султанов Р.И., Шелыгин Ю.А., Долудин Ю.В.,  
Кострюкова Е.С., Генерозов Э.В.

*Лаборатория молекулярной генетики человека ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России*

В настоящее время активное развитие получают иммунотерапевтические подходы к лечению различных онкозаболеваний, в частности – метастатических раков различной локализации. Одним из методов персонализированной адъювантной иммунотерапии является стимулирование иммунного ответа на мутантные белки опухоли с помощью препаратов на основе неоантигенных пептидов, синтезируемых опухолевыми клетками в результате появления соматических мутаций. Широко применяемые в клинике методы детектирования некоторых частых соматических вариантов не позволяют получить неоантигенный профиль опухоли, достаточный для дизайна эффективного препарата в случае мало- и среднемутированных раков, в то время как идентификация соматических мутаций методами высокопроизводительного полноэкзомного и/или РНК-секвенирования является сложной и дорогостоящей процедурой, мало применимой в реальной клинической практике. Мы оценили возможность применения 11 коммерчески доступных таргетных панелей онкологической направленности производителей Roche, Agilent Technologies, Thermo Fisher и QIAGEN для детектирования потенциально иммуногенных соматических мутаций у пациентов с аденокарциномой толстой и прямой кишки. Анализ показал, что ни размер панели (число охватываемых генов), ни изначальная специализация панели под данное заболевание (колоректальный рак) не дает преимуществ при оценке индивидуального неоантигенного профиля. Оптимальным для данной задачи является использование онкопанелей общего профиля, содержащих среднее (2,300–11,200) количество ампликонов и/или охватывающие 150–600 генов. Такие панели позволяют детектировать достаточное количество иммуногенных эпитопов (>3), для доли пациентов, превышающей показатель в 30–50%.

### Список литературы

1. Cancer Genome Atlas Network et al. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer //Nature. – 2012. – Т. 487. – №. 7407. – С. 330.
2. Ott P. A. et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma //Nature. – 2017. – Т. 547. – №. 7662. – С. 217.
3. Frattini M. et al. Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis //Clinical Cancer Research. – 2004. – Т. 10. – №. 12. – С. 4015-4021.
4. <https://portal.gdc.cancer.gov/>
5. Charoentong P. et al. Pan-cancer immunogenomic analyses reveal genotype-immunophenotype relationships and predictors of response to checkpoint blockade //Cell reports. – 2017. – Т. 18. – №. 1. – С. 248-262.
6. Guinney J. et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer //Nature medicine. – 2015. – Т. 21. – №. 11. – С. 1350.



## НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ

ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России

*23–24 апреля 2019*

7. Drake C. G., Jaffee E., Pardoll D. M. Mechanisms of immune evasion by tumors  
//Advances in immunology. – 2006. – Т. 90. – С. 51-81.
8. Giannakis M. et al. RNF43 is frequently mutated in colorectal and endometrial cancers  
//Nature genetics. – 2014. – Т. 46. – №. 12. – С. 1264.



# НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ

ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России

23–24 апреля 2019

## МИКРОБИОМ ЯКУТОВ: ВИЛЮЙСКИЙ ЭНЦЕФАЛИТ И БАКТЕРИИ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С МЕТАБОЛИЗМОМ

Кузнецова В., Тяхт А., Кострюкова Е., Вахитова М., Григорьева Т., Маланин С., Волок В., Алексеев Д., Карганова Г.

*Институт биологии гена РАН, группа биоинформатики*

Каталогизация кишечного микробиома относительно изолированных популяций позволит прояснить влияние диеты и образа жизни на структуру кишечного сообщества и идентифицировать возможные риски, связанные с образом жизни таких групп, а также заболеваниями. Быт северных популяций, в том числе якутов, обусловлен суровыми климатическими и нередко социоэкономическими обстоятельствами. Помимо этого, существуют эндемические заболевания, среди которых вилюйский энцефалит (ВЭ) – заболевание ЦНС, этиология которого неясна. Изучение микробиоты у пациентов с ВЭ поможет пролить свет как на причину, так и на возможные прогностические маркеры заболеваний. Мы провели описательное исследование кишечного сообщества у населения Якутии (n=17), в том числе здоровых людей (n=11) и людей с ВЭ (n=6) с помощью секвенирования 16S рРНК по образцам кала. Анализ данных был проведен с помощью системы Кномикс-Биота. Были выявлены значимые изменения между составом микробиоты у якутов с ВЭ по сравнению со здоровыми якутами. У пациентов с ВЭ существенно выше относительный уровень бактерий из семейства *Christensenellaceae* и архей из *Methanobacteriaceae* - которые в ряде исследований связаны с индексом массы тела, метаболизмом и пищевым поведением. На уровне реконструкции метаболического потенциала у больных с ВЭ наблюдается пониженный уровень микробного синтеза ряда витаминов. Обнаруженные различия указывают на возможное проявление нарушения оси “кишечник-мозг” при ВЭ. Этнометагеномика - важный инструмент для сохранения микробного разнообразия человечества и выработки потенциальных микробиотных маркеров заболеваний.

### Список литературы

1. Efimova, D. et al. (2018). Knomics-Biota-a system for exploratory analysis of human gut microbiota data. *BioData mining*, 11(1), 25.
2. Klimenko, N. et al. (2018). Microbiome responses to an uncontrolled short-term diet intervention in the frame of the citizen science project. *Nutrients*, 10(5), 576.



# НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ

## ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России

23–24 апреля 2019

### СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ ВИРУЛЕНТНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ СТАФИЛОКОККОВ

Н.С. Купцов<sup>1</sup>, М.А. Корниенко<sup>1</sup>, А.С. Гуляев<sup>1</sup>, А.В. Летаров<sup>2</sup>, Е.А. Шитиков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Лаборатория молекулярной генетики микроорганизмов ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

<sup>2</sup>ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт микробиологии им. Виноградского, Москва

В связи с распространением устойчивых к антимикробным препаратам бактерий актуальны альтернативные подходы терапии инфекций, например, бактериофагами. Сегодня фаговые препараты – это набор плохо охарактеризованных вирулентных фагов «дикого» типа, обладающих широким спектром действия. Целью данной работы является описание вирулентных фагов стафилококков, используемых в качестве терапевтических агентов, а также оценка разнообразия их рецептор-связывающих белков.

Из терапевтического препарата компании «Микроген» («Бактериофаг стафилококковый» серия М/5439019) были выделены фаги phSa515A1 и phSa436. Спектр их хозяев определяли на коллекции из 49 штаммов *Staphylococcus aureus* (SA), 35 *Staphylococcus epidermidis* (SE) и 35 *Staphylococcus haemolyticus* (SH). Геномы phSa515A1 и phSa436 получены на платформе Illumina.

Чувствительными к phSa515A1 были 97% SA, 14% SE и 0% SH, тогда как phSa436 вызывал лизис 68% SA и не лизировал штаммы SE и SH. Размер генома phSa515A1 составил 140 т.п.о, а геном phSa436 – 18 т.п.о. Геномный анализ показал, что phSa515A1 и phSa436 относятся к семействам *Myoviridae* и *Podoviridae*, соответственно. Генов лизогении и факторов патогенности выявлено не было, что свидетельствует о возможности их применения в терапии. Ключевым моментом взаимодействия фаг – бактерия является распознавание рецептор-связывающими белками фага рецепторов бактерий. С помощью сравнительного анализа геномов исследуемых фагов и фагов из базы данных NCBI были выявлены открытые рамки считывания (ORF), ответственные за адсорбцию фагов (для *Myoviridae*: ORF 96, ORF 103, ORF105 референсного генома phiSA039; для *Podoviridae*: ORF14 и ORF15 референсного генома SCH1). Установлена вариабельность этих генов для каждого семейства фагов, показано их высокое разнообразие относительно остальных генов генома. Полученные результаты о разнообразии генов РСБ могут быть применены для создания фагов-платформ, безопасность и эффективность которых подтверждены, а широкий спектр активности обеспечивается с помощью генно-инженерных систем управления специфичностью спектра хозяев фагов.



# НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ

## ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России

23–24 апреля 2019

### АНТИГИПОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДОВ БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА 70

Лавренова В.Н.<sup>1</sup>, Графская Е.Н.<sup>1</sup>, Артемьева М.М.<sup>1,2</sup>, Панькова Н.В.<sup>1,2</sup>, Лазарев В.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Лаборатория генной инженерии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

<sup>2</sup>Кафедра физиологии человека и животных биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

Гипоксия – это патологическое состояние, возникающее в тканях и органах при недостатке кислорода. Ключевыми факторами в адаптации к гипоксии являются клеточные сенсоры содержания кислорода, например, транскрипционный фактор HIF1 $\alpha$ . При недостатке кислорода увеличение содержания данного белка в ядре ведёт к изменению экспрессии генов, необходимых клетке для адаптации, что позволяет считать HIF1 $\alpha$  маркёром активации антигипоксических клеточных ответов. Так как гипоксия является причиной многих распространённых заболеваний, в т.ч. инфаркта миокарда, современные подходы к терапии инфаркта направлены на поиски веществ, обладающих антигипоксической активностью. В нашей лаборатории ранее было показано антигипоксическое действие пептидов белка теплового шока 70.

Целью данной работы являлась дальнейшая проверка антигипоксического эффекта пептидов белка теплового шока 70. Для достижения цели были поставлены следующие задачи: создание и тестирование репортерных конструкций для оценки активности HIF1 $\alpha$  в культуре клеток; определение антигипоксического эффекта пептидов A4, B1 и панели укороченных пептидов, полученных из B1 на культуре клеток; определение антигипоксического и кардиопротекторного эффекта пептидов A4, B1 на животной модели.

Тестирование антигипоксического действия пептидов проводили на клеточной линии HeLa с использованием репортерной плазмиды, содержащей сайт связывания HIF1 $\alpha$ , минимальный аденовирусный промотор MLP и ген зелёного флуоресцентного белка GFP. Добавление в культуральную среду пептидов A4, B1 до концентрации 10 мкМ приводило к повышению активности HIF1 $\alpha$ . Тестирование панели укороченных пептидов (21 пептид), полученных из пептида B1, выявило 5 пептидов, приводящих к значительному увеличению активности HIF1 $\alpha$  в клетках. Пептиды A4 и B1 при однократном введении повышали выживаемость крыс в модели экспериментального инфаркта миокарда  $\approx$  на 25% по сравнению с контрольной группой крыс, которым вводили физ.раствор.

Таким образом, как на клеточной, так и на животной модели было показано антигипоксическое действие исследуемых пептидов, что делает потенциально возможным их дальнейшее применение в терапии инфаркта миокарда.



# НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ

## ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России

23–24 апреля 2019

### ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК С БЕЛКАМИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ С ПОМОЩЬЮ БИОСЕНСОРА НА ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОЛНАХ В ОДНОМЕРНОМ ФОТОННОМ КРИСТАЛЛЕ

Т.В. Митько, К.А. Прусаков, А.М. Белова, Д.В. Клинов, Д.В. Басманов

*Лаборатория медицинских нанотехнологий ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России*

Применение биосенсора на поверхностных волнах для прямого наблюдения кинетики связывания объектов с поверхностью бактериальных клеток имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционно используемыми микроскопическими методами, поскольку не требует введения метки или красителя для визуализации реакции, а измерения проводятся для большого количества клеток, что дает статистически достоверные результаты.

В данной работе исследовался процесс сорбции белков на поверхность бактериальных клеток, иммобилизованных на поверхности одномерного фотонного кристалла (ОФК), в реальном времени. В качестве модельного белка использовался конканавалин А, бактериальные клетки – *E. coli BL21DE3*. Были получены сорбционные кривые, решена задача о нахождении константы диссоциации комплекса конканавалина А и бактериальных клеток *E. coli* и показана жизнеспособность иммобилизованных клеток.

На предварительно модифицированную с помощью полиалиламина и глутарового альдегида [1,2] поверхность ОФК иммобилизовали конканавалин А, с которым связывались *E. coli*. Растворы, содержащие различные концентрации конканавалина, прокачивались над поверхностью ОФК и связывались с «внешней» поверхностью бактериальных клеток. Получены кривые сорбции для различных концентраций конканавалина.

*Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект №18-32-00797)ю*

#### Список литературы

1. Morozova O.V., Levchenko O.A., Cherpakova Z.A., Prokhorov V.V., Barinov N.A., Obratsova E.A., Belova A.M., Prusakov K.A., Aldarov K.G., Basmanov D.V., Lavrenova V.N., Pavlova E. R., Bagrov D.V., Lazarev, V.N., Klinov D.V., “Surface modification with polyallylamines for adhesion of biopolymers and cells”, International Journal of Adhesion and Adhesives, Apr. 2019,
2. Белова А.М., Басманов Д.В., Прусаков К.А., Лазарев В.Н., Клинов Д.В., “Микрофлюидная платформа для создания биосенсора на одиночных генетически модифицированных клетках *Helicobacter pylori*”, Биофизика, V. 63, I. 5, pp. 923-932, Jan. 2018



## НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России

23–24 апреля 2019

### ПОИСК БЕЛКОВЫХ ПАРТНЕРОВ TRIM29 В НОРМАЛЬНОМ БАЗАЛЬНОМ ЭПИТЕЛИИ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Мулюкина А.С., Султанов Р.И., Зубкова О.А., Шендер В.О., Арапиди Г.П., Лагарькова М.А.

*Лаборатория клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России*

Рак предстательной железы (РПЖ) является одним из самых распространенных онкологических заболеваний среди мужчин старше 50 лет. Большая часть опухолей предстательной железы развивается из базального эпителия и ассоциирована с изменением экспрессии белка TRIM29. Ранее нашей группой на основе данных биоинформатического анализа была предложена модель активации энхансеров кластера генов, ассоциированных с процессом малигнизации эпителия простаты при возникновении РПЖ, комплексом белков TP63-TRIM29-MED12. Согласно модели, TRIM29 связывается с TP63 и MED12 через V-box (VV) и Coiled-Coil (CC) домены, соответственно. Целью данной работы является изучение интерактома TRIM29 и его форм с делецией CC- и VV-доменов.

В ходе работы были получены генетические конструкции, содержащие полноразмерный ген TRIM29, слитый с пептидом FLAG, и ген TRIM29 с делециями участков, кодирующих VV- и CC-домены, соответственно. С использованием этих конструкций были получены культуры клеток HaCaT (иммortalизованные кератиноциты кожи) RWPE-1 (базальный эпителий предстательной железы) со сверхэкспрессией этих генов. Была произведена иммунопреципитация TRIM29 и мутантных форм из лизатов трансдуцированных клеточных линий HaCaT и RWPE-1, что подтверждено методом вестерн-блоттинга. Было обнаружено, что TRIM29 способен к образованию гомомерных структур за счет CC-домена в клеточных линиях HaCaT и RWPE-1.

Дальнейший анализ преципитатов методом масс-спектрометрии позволит ответить на вопрос о белках-партнерах TRIM29 и подтвердить или опровергнуть гипотезу о существовании комплекса TP63-TRIM29-MED12.



# НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ

ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России

23–24 апреля 2019

## ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА БИОИНФОРМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ДАННЫХ ИОННОГО ПОЛУПРОВОДНИКОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Е.А. Недвига, Н.А. Кулемин, Э.В. Генерозов

*Лаборатория молекулярной генетики человека ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России*

Использование технологии ионного полупроводникового секвенирования, реализованной на приборной базе секвенаторов Ion Proton (ThermoFisher Scientific) в комбинации с амплификационным способом подготовки библиотек AmpliSeq позволяет эффективно анализировать большой объем нуклеотидных последовательностей, вплоть до полного экзома человека. Критическим этапом биоинформатической обработки таких больших объемов данных является картирование полученных ридов на референсную последовательность. Опыт обработки полноэкзомных данных, полученных по технологии AmpliSeq и рекомендованный производителем, выявил достаточное большое количество ошибок интерпретации картирования. Подробный анализ ошибок показал, что по крайней мере части из них можно избежать, если использовать альтернативный подход, учитывающий особенности амплификации целевых регионов. Так, для достижения хорошей специфичности методом AmpliSeq, при полноэкзомном секвенировании мультипраймерная амплификация происходит в 12 независимых пулах праймеров. В ходе проведенной работы, был предложен новый биоинформатический подход, основанный на параллельном картировании ридов в каждом пуле независимо и не на весь референсный геном, а только на специфические регионы, представленные в конкретном амплификационном пуле. При этом выравнивание данных идет не целиком с Fastq файла, а с локальных Fastq файлов каждого пула, далее идет обработка данных, а затем объединение нескольких GVCF файлов одного образца в один общий. По сравнению с алгоритмом, предлагаемым производителем по умолчанию, когда идет выравнивание прочтений на всю референсную геномную последовательность это позволяет исключить вероятность ошибочного картирования этих ампликонов на неправильную референсную позицию, которая технически не может присутствовать в данном пуле. Кроме того, за счет параллельной обработки данных по разным пулам, разработанный нами подход позволяет и сократить общее время обработки данных.



## НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России

23–24 апреля 2019

### ИЗБИРАТЕЛЬНАЯ СТАБИЛИЗАЦИЯ НСНА ДНК ПРОИЗВОДНЫМИ АУРЕОЛОВОГО РЯДА

Николенко Т.А., Волков Т.А., Киррилова Ю.Г., Варижук А.М., Позмогова Г.Е.

Лаборатория искусственного антителогенеза ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Значительный интерес к производным ауреоловой кислоты связан в последние годы с исследованием их противоопухолевых свойств. Однако данные о механизмах комплексообразования и избирательности этих лигандов носят неоднозначный характер. Показано, что в присутствии  $Mg^{2+}$  они способны образовать аффинную к GC-мотивам ДНК димерную форму и влиять на конформацию олигомера  $(CCG)_4$  [Chen Y.-W. *Int. J. Molecular Sciences*. - 2018; 19:2796]. Мы предположили, что лиганды этого ряда могут проявлять селективность к non-B сайтам ДНК (G4/IM). Цель работы состояла в исследовании взаимодействия антибиотиков группы ауреоловой кислоты с различными конформационными структурами ДНК (G4, IM, шпильки). Для проведения анализа использовали разработанную в лаборатории скрининговую FRET систему. Панель мишеней была дополнена G4 и IM, характерными для промоторных областей генов (DNMT, EWS, SOX1, C-Myc), дифференциально транскрибирующихся в присутствии митрамицина и оливомицина [R. Lin. *Anti-Cancer Drugs*. 2007; 18:1157-1164, I. Cheglakov. *Dokl. Bioch. and Biophys.* 2010; 435:320–322.]. В качестве контролей использовались  $(\pm CG)$  ДНК-шпильки. Эксперименты проводились в присутствии и отсутствии  $Mg^{2+}$ . Были исследованы не только известные антибиотики (митрамицин, хромомоцин а3, оливомицин), но и ряд их новых синтетических аналогов, полученных в лаборатории Тевяшовой А.Н. в НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе.

В результате мы впервые продемонстрировали избирательное связывание митрамицина, оливомицина и его трех производных с G4-мишенями. Наиболее перспективное соединение в виде димера эффективно связывало все целевые IM, повышая их термостабильность (более чем на 20°C). Стабильность ДНК-комплексов коррелировала с антибактериальной активностью лигандов в отношении *Myc. smegmatis*, отличающейся G/C-богатым геномом (данные получены Малаховой М.). Анализ данных позволил выявить важные для драг-дизайна структурно-функциональные закономерности. В совокупности полученные результаты могут внести существенный вклад в понимание молекулярных механизмов противоопухолевых и антибактериальных эффектов антибиотиков ауреолового ряда. Разработанная панель мишеней позволяет использовать FRET-метод как эффективный исследовательский инструмент поиска и сравнения лигандов, адресованных неканоническим структурам полинуклеотидов – потенциальным лекарствам направленного действия.



# НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ

## ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России

23–24 апреля 2019

### **ИЗМЕНЕНИЕ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА ЗДОРОВЫХ ВОЛОНТЕРОВ ПОСЛЕ ФЕКАЛЬНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ**

Олехнович Е.И., Голощапов О.В., Манолов А.И., Павленко А.В., Веселовский В.А.,  
Климина К.М., Ильина Е.Н.

*Лаборатория биоинформатики ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России*

Фекальная трансплантация (или трансплантация фекальной микробиоты - ТФМ) в настоящее время одобрена для лечения рецидивирующего клостридиального колита. Однако, существует ряд исследований по применению данной процедуры в составе терапии других воспалительным заболеваниям кишечника, таких как Болезни Крона, неспецифического язвенного колита и др. В большинстве случаев эффекты ТФМ оценивались у пациентов с изначально измененной микробиотой. Целью настоящего исследования было оценить влияние процедуры на микробиоту кишечника здоровых добровольцев и отследить долгосрочные изменения.

Мы провели метагеномный анализ трех здоровых добровольцев до и после ТФМ, который осуществляли при помощи замороженных капсул. Образцы кишечной микробиоты оценивали, используя полногеномное метагеномное секвенирование. Анализ данных продемонстрировал глубокий сдвиг в сторону таксономического состава донорской микробиоты у всех добровольцев. После ТФМ у всех испытуемых наблюдали колонизацию кишечника донорскими бактериями. Данный эффект сохранялся в течение ~ 1 года наблюдения.

Таким образом, процедура ТФМ приводит к значительным долгосрочным направленным изменениям микробиоты кишечника у здоровых добровольцев в сторону донорской таксономической композиции.



## НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России

23–24 апреля 2019

### ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКООРИЕНТИРОВАННЫХ ВОЛОКНИСТЫХ МАТРИКСОВ ИЗ ПОЛИЛАКТИДА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ КОНТАКТНОГО ОРИЕНТИРОВАНИЯ КЕРАТИНОЦИТОВ

Павлова Е.Р., Багров Д.В., Соколова А.И., Клинов Д.В.

*Лаборатория медицинских нанотехнологий ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России*

Рельеф субстрата оказывает влияние на форму и адгезию клеток, а также на направление и скорость их миграции. Это явление называется контактным ориентированием. Одним из способов получения анизотропного субстрата является электроспиннинг – метод формирования полимерных нано- и микроволокон и волокнистых матриксов под действием электростатических сил. Матриксы с ориентированными волокнами пригодны для изучения контактного ориентирования. Обычно для их формирования используют специальные коллекторы – пару параллельных лезвий или вращающийся вал. Однако, степень ориентации волокон в таких случаях сильно падает с увеличением толщины матрикса. В данной работе мы использовали новый способ формирования матриксов с высокой степенью ориентации волокон. Матриксы из полилактида (PLA), полученные методом электроспиннинга, с хаотично расположенными волокнами растягивали в этаноле, который служил пластификатором. В результате волокна выстраивались вдоль направления вытяжки. Матриксы, растянутые в этаноле, с разными диаметрами волокон ( $1,8 \pm 0,8$  мкм и  $0,5 \pm 0,2$  мкм), мы использовали в качестве субстратов для культивирования человеческих кератиноцитов линии HaCaT. Отношение размеров клеток HaCaT вдоль и поперек волокон, выращенных на ориентированных матриксах, ( $3,3 \pm 1,7$  и  $3,0 \pm 1,5$ ) независимо от диаметра волокна превышало в два раза аналогичное значение для клеток, выращенных матриксах из случайно ориентированных волокон ( $1,5 \pm 0,6$ ).

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 17-75-30064).*



## НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России

23–24 апреля 2019

### АПТАМЕРЫ К ГИСТОНЫМ ШАПЕРОНАМ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ ЭЛОНГАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ В РАКОВЫХ КЛЕТКАХ

Ю.И. Павлова, Е.А. Исаакова, А.М. Варижук, Г.Е. Позмогова

*Лаборатория искусственного антителогенеза ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России*

Шапероны гистонов (ШГ) – белки, отвечающие за формирование нуклеосом, перенос и позиционирование гистонов. В контексте элонгации транскрипции ключевым ШГ является гетеродимерный комплекс FACT (FACilitates Chromatin Transcription). Он снижает нуклеосомный барьер для РНК-полимеразы за счет частичной сборки/разборки нуклеосомных частиц. Выполненный сотрудниками нашей лаборатории анализ интерактома ДНК-G-квадруплексов (G4) выявил FACT и его функциональный аналог BRD3 (способствует транскрипции гиперацетилированного хроматина) в числе наиболее аффинных к G4 белков человека. Ранее сродство к G4 отмечалось и для других структурных/функциональных аналогов FACT: нуклеолина (NCL, заменяет FACT при его недостатке) и ATRX (играет роль FACT при транскрипции теломер). Мы сделали следующий вывод: сродство к G4 – общее свойство ряда ШГ с FACT-подобной активностью (это проясняет регуляторную роль геномных G4 в элонгации транскрипции). Мы также предположили, что экзогенные G4 могут быть использованы в качестве ловушек на ШГ для системного подавления транскрипции. Высокоаффинные к ШГ экзогенные G4 мы далее называем аптамерами. Подавление транскрипции должно достигаться исключительно в опухолевых клетках. Мы рассчитываем добиться этого за счет NCL-связывающей способности G4-аптамеров и их NCL-опосредованного эндоцитоза. (В норме NCL локализован в ядре, а для раковых клеток характерно его экспонирование и на внешней поверхности). Используя методы микротермофоретического анализа, спектроскопии КД и др., мы проанализировали серию G4-олигонуклеотидов и комплексов с ШГ. Мы отобрали три лидерных аптамера с высоким сродством минимум к двум ШГ-мишеням (NCL и другой FACT-аналог). Лидерные аптамеры сохраняют G4-фолдинг во внеклеточной и внутриклеточной средах, т.е. способны узнавать и основную мишень в ядре (для подавления транскрипции), и мембраносвязанный NCL (для достижения онкоселективного эффекта). Это позволяет говорить о перспективах применения аптамеров в качестве противоопухолевых средств. Дальнейшие планы включают проверку цитотоксичности и непосредственную проверку ШГ-ингибирующей функции аптамеров *in vitro* на моонуклеосомной модели.



# НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ

ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России

23–24 апреля 2019

## ВЛИЯНИЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ АКТИВАЦИИ И ИНГИБИРОВАНИЯ АКТИВАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ НА ОБРАЗОВАНИЕ ТРОМБИНА В БОГАТОЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЕ ЧЕЛОВЕКА.

Петрунина Н.А., Баландина А.Н., Атауллаханов Ф.И.

*Лаборатория биофизики НМИЦ ДГОИ им. Д. Рогачева*

Свёртывание крови – это совокупность двух основных процессов: тромбоцитарного звена гемостаза и ферментативной каскадной реакции белков плазмы (факторов свёртывания), итогом которой является полимеризация фибрина. Переход фибриногена в фибрин регулируется вторым фактором свёртывания – тромбином, который оказывает влияние и на другие реакции каскада по петлям положительных и обратных связей. Он также является одним из основных активаторов тромбоцитов. В результате активации некоторые тромбоциты выставляют на своей поверхности фосфатидилсерин, необходимый для сборки комплексов белков свёртывания крови [1]. Однако, эффект добавления искусственных фосфолипидных микровезикул (ФМ) качественно не совпадает с эффектом тромбоцитов, оказываемым на генерацию тромбина. В нашей работе мы определяли, какой вклад вносит активация тромбоцитов в генерацию тромбина (ГТ) в богатой тромбоцитами плазме.

Мы изучали ГТ в плазме с ФМ (фосфатидилхолин : фосфатидилсерин = 4 : 1) на анализаторе Тромбодинамика-4D с применением флуорогенного субстрата к тромбину [2]. Использовалась кровь здоровых доноров, из которой осаждением всех клеток крови (за исключением тромбоцитов, если это было необходимо) готовили плазму путём центрифугирования. Активатором свёртывания служил тканевый фактор (5 пМ). При концентрации ФМ 4 мкМ в плазме без тромбоцитов ГТ имеет вид одиночного пика с амплитудой  $102 \pm 29$  нМ через  $8 \pm 2$  минуты от момента активации свёртывания. При уменьшении количества ФМ этот пик уменьшается, но не сдвигается по времени.

Если в плазме присутствуют тромбоциты, то на кривой ГТ можно наблюдать два пика. Их амплитуда снижается вместе с концентрацией тромбоцитов, максимум первого пика не смещается, а время достижения второго увеличивается. При высокой же концентрации тромбоцитов близкой к 200 тыс./мкл наблюдается только один объединённый пик через  $10 \pm 3$  минут после активации с амплитудой  $124 \pm 30$  нМ.

Ингибирование активации тромбоцитов простагландином E1 (100 мкМ) приводит к сокращению общего количества тромбина в эксперименте: площадь под кривой ГТ уменьшается в 1,5-2,5 раза за счёт исчезновения второго пика или уменьшения амплитуды единственного при высоких концентрациях тромбоцитов. С предварительной активацией тромбоцитов тромбиноподобными пептидами TRAP-1 (200 мкМ) и TRAP-4 (550 мкМ) второй пик тромбина отсутствует, а амплитуда первого пика увеличивается в 2 раза, за счёт чего общее количество тромбина такое же, как в контрольном эксперименте без дополнительной активации, но нарабатывается быстрее.

По результатам работы можно сделать вывод, что ГТ происходит в два этапа в плазме с тромбоцитами и второй этап связан с активацией тромбоцитов в процессе свёртывания.

### Список литературы

1. Пантелеев М.А. и др. Практическая коагулология. М., 2011. С. 192



**НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ  
ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ**  
**ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России**

*23–24 апреля 2019*

2. A.D. Kuprash, et al, "Sensitivity and Robustness of Spatially Dependent Thrombin Generation and Fibrin Clot Propagation" // *Biophys J.*, 2018, 115(12), 2461



# НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ

ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России

23–24 апреля 2019

## ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ФАКТОРОВ СПЛАЙСИНГА В ПРОГРЕССИИ И ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ РАКА НА ПРИМЕРЕ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКА

Семенов И.А., Шнайдер П.В., Жукова Ю., Султанов Р.И., Чепурных Ю.Ф., Лебедева О.С.,  
Лагарькова М.А., Шендер В.О.

Лаборатория клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Механизмы возникновения устойчивости раковых клеток изучаются довольно давно, однако до сих пор не найдено способа их преодолеть. Исследования последних лет показали, что один из механизмов формирования резистентности опухолей основан на сигналах, секретируемых погибающими опухолевыми клетками. Ранее нами было показано, что погибающие раковые клетки способны специфически секретировать белки сплайсосомы во внеклеточное пространство<sup>1</sup>. Такие секретомы, обогащенные компонентами сплайсосомы, многократно повышали устойчивость реципиентных опухолевых клеток к последующей химиотерапии (ХТ), стимулировали изменение сплайсинга и способствовали мезенхимальной трансформации соседних выживших клеток. Однако какую роль играют белки сплайсосомы в данном типе межклеточной коммуникации, неизвестно. Поэтому целью работы являлось исследование того, как могут повлиять на судьбу раковой клетки повышенные уровни представленности этих белков.

Для искусственного повышения представленности белков сплайсосомы нами были получены стабильные клеточные линии со сверхэкспрессией одного из трех сплайсинговых факторов: SF3B1, SRSF3 и U2AF1. Для этого нами были получены лентивирусные частицы, содержащие ген целевого белка, которыми затем инфицировали клетки аденокарциномы яичника SKOV3. Каждый ген, кодирующий целевой белок, был слит с последовательностью FLAG-эпитопа и флуоресцентного белка GFP, соединенных через последовательность IRES. Оказалось, что повышенные уровни представленности белков SF3B1 и U2AF1 значительно повышали резистентность клеток рака яичника SKOV3 в условиях *in vitro*, однако при этом практически не влияли на скорость их пролиферации. Таким образом, мы выяснили, что сверхэкспрессия U2AF1 и SF3B1 имеет схожий эффект воздействия на клетки, что и секретомы от погибающих клеток. Это подчеркивает важную роль белков сплайсосомы в формировании химиорезистентности. Чтобы получить подробное представление о белок-белковых взаимодействиях и функциях этих белков в клетке до и после воздействия цисплатина, на следующем этапе работы будет проведена иммунопреципитация с последующей масс-спектрометрией.

### Список литературы

1. Shender, V. O. et al. // *Mol. Cell. Proteomics* **34**, 119–135.e10 (2014).



# НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ

ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России

23–24 апреля 2019

## ВЛИЯНИЕ РЕЛЬЕФА ПОВЕРХНОСТИ НА ФОРМУ И ОРИЕНТАЦИЮ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ ПОЧКИ

Соколова А.И., Багров Д.В., Храмова Ю.В., Попов В.В., Клинов Д.В.

*Лаборатория медицинских нанотехнологий ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России*

В данной работе мы попытались выяснить, возможно ли изменение формы и ориентации клеток карциномы почки под действием только субстрата. Исследование проводилось на культуре клеток Саки-1, выращенных на ориентированных субстратах с периодом 1,7мкм и 10мкм, полученных методом литографии. Клетки культивировали в течение 20 часов, после чего окрашивали Hoechst33342 и исследовали методом флуоресцентной микроскопии. Затем по полученным снимкам с помощью программы ImageJ были рассчитаны соотношения соотношения длинных и коротких сторон клеток (Membrane aspect ratio – MAR) и ядер (Nuclear aspect ratio – NAR), а также отклонение клеток от направления рельефа. Статистическую обработку данных проводили в программах Statistica 6.0 и Oriana 4.0.

Результаты исследований показали, что клетки культуры Саки-1 ведут себя по-разному в зависимости от рельефа субстрата: значения MAR тем выше, чем сильнее выражен рельеф ( $1.4 \pm 0.4$ ,  $1.8 \pm 0.7$  и  $2 \pm 1$  для клеток, выращенных на стекле, подложках с периодом 1.7мкм и 10 мкм соответственно;  $p < 0,01$ ). По данным круговой статистики ядра клеток ориентируются по направлению рельефа ( $r=0.9$ ,  $k=5$  для субстрата с периодом 10мкм и  $r=0.8$ ,  $k=3$  для субстрата с периодом 1.7мкм), в то время как для ядер клеток, выращенных на стекле, данной закономерности показано не было ( $r=0.6$ ,  $k=1.5$ ). В то же время, установлена позитивная корреляция между MAR и NAR для всех субстратов ( $R=0,47$  для клеток, выращенных на стекле,  $R=0,39$  для клеток, выращенных на ориентированных субстратах;  $p < 0,01$ ).

Таким образом, было показано, что рельеф может определять форму клеток и их ориентацию в отсутствие дополнительных биохимических сигналов. Кроме того, изменения сказываются и на форме ядра и коррелируют с изменениями формы клетки.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 17-75-30064).*



# НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России

23–24 апреля 2019

## БИОРАЗНООБРАЗИЕ ФАГОВ ВАГИНАЛЬНЫХ ЛАКТОБАКТЕРИЙ

Старикова Е.В.<sup>1</sup>, Кошечкин С.И.<sup>2</sup>, Демкин В.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Лаборатория биоинформатики ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России; <sup>2</sup>Институт молекулярной генетики РАН

Основным компонентом здоровой микрофлоры влагалища являются лактобактерии. За счёт создаваемой ими кислой среды осуществляется защита организма хозяина от патогенных и условно-патогенных бактерий, а также микроскопических грибов. Отсутствием или низкой представленностью лактобактерий, а также колонизацией влагалища строгими анаэробами характеризуются такие гинекологические заболевания, как бактериальный вагиноз, этиология которого до сих пор остаётся неясной. Одной из возможных причин снижения численности лактобактерий, приводящей к бактериальному вагинозу, является активность бактериофагов. На данный момент известно лишь несколько бактериофагов основных видов вагинальных лактобацилл, таких как *Lactobacillus gasseri* и *Lactobacillus jensenii*, в то время как для *Lactobacillus iners* и *Lactobacillus crispatus* бактериофаги на данный момент не охарактеризованы. Целью нашей работы являлось выявление умеренных бактериофагов в геномах бактериальных видов лактобацилл и оценка их потенциальной активности с использованием метагеномных данных. Нами были идентифицированы 53 неизбыточных последовательностей профагов в 130 геномных сборках 4 видов вагинальных лактобацилл. 41 из 53 последовательностей профагов имели соответствия в спейсерах CRISPR-систем лактобактерий. Потенциальная активность предсказанных профагов оценивалась путём картирования WGS-метагеномов влагалища на сборки вагинальных видов лактобацилл и оценки покрытия профагов. В результате данной работы нами был выявлен ряд профагов *Lactobacillus crispatus*, предположительно способных к активной фаговой инфекции. Полученные данные могут быть использованы при дальнейшем исследовании этиологии бактериального вагиноза.

*Работа была выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 19-015-00385).*



## НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России

23–24 апреля 2019

### **ДНК-СВЯЗЫВАЮЩАЯ И АТФазная АКТИВНОСТЬ БЕЛКА WhiA *Mycoplasma gallisepticum*.**

Цой Е.А., Евсютина Д.В., Фисунов Г.Ю.

Лаборатория протеомного анализа ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Молликуты обладают рядом особенностей, отличающих их от большинства бактерий. Например, у них отсутствует клеточная стенка, а размер генома в среднем составляет от 0,5-1,5 млн. п.н. Белки семейства DUF199-WhiA – одни из немногих кандидатных регуляторов экспрессии генов у Молликут, обладающие почти универсальной консервативностью в этой филогенетической группе.

Кристаллическая структура WhiA из *Thermotoga maritima* была получена в 2009 году, она демонстрирует, что белок состоит из двух консервативных доменов, соединенных между собой небольшим линкером. При этом N-концевой участок гомологичен эндонуклеазам семейства LAGLIDADG, а С-концевой содержит НТН-домен, характерный для бактериальных транскрипционных факторов.

Белки семейства WhiA встречаются во многих группах бактерий, в том числе у Mollicutes, Firmicutes, Actinobacteria и Thermotogae, однако его функции в целом непонятны за исключением некоторых частных случаев. Например, было показано, что в *Streptomyces coelicolor* белок WhiA регулирует процесс образования спор в ответ на неблагоприятные условия, а для *Vacillus subtilis* было показано, что он участвует в поддержании структуры хромосомы. Функция данного белка у бактерий в целом, а также причины его сохранения в редуцированных геномах представителей класса Mollicutes остаются не ясными.

Целью работы было изучить функцию белка WhiA на модели бактерии *Mycoplasma gallisepticum* S6, относящейся к классу Mollicutes.

При помощи анализа электрофоретической подвижности ДНК-белковых комплексов была показана способность WhiA связывать мотив, состоящий из двух консервативных частей (GATACACCN<sub>7</sub>GTTGT), которые расположены в промоторной области оперона генов рибосомных белков. При этом каждый из ДНК-связывающих доменов WhiA узнаёт свою последовательность. Белок способен связывать эти последовательности если они разнесены на несколько сотен пар нуклеотидов и формировать хромосомные петли. В ходе исследования было показано, что белок, так же как и хоминг эндонуклеазы, обладает АТФазной активностью. За счёт гидролиза АТФ происходит диссоциация одного из ДНК-связывающих доменов от сайта связывания. Таким образом, активность WhiA как транскрипционного фактора и как белка хроматина регулируется с помощью концентрации АТФ в клетке.



# НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ

ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России

23–24 апреля 2019

## ПОИСК ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАЗВИТИЕМ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ПРИ ПОМОЩИ АНАЛИЗА ДАННЫХ DNase-seq

Чуносова А.А., Султанов Р.И., Арапиди Г.П.

*Лаборатория клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России*

Рак предстательной железы (РПЖ) - одно из самых распространенных онкологических заболеваний среди мужчин. Злокачественное перерождение базального эпителия предстательной железы сопровождается многочисленными эпигенетическими изменениями, в том числе сменой спектра открытых регионов хроматина. Потому характеристика регионов хроматина, которые изменили свое состояние при онкотрансформации, может помочь найти транскрипционные факторы, ассоциированные с развитием РПЖ.

Для поиска этих факторов были использованы данные полногеномного секвенирования регионов, чувствительных к ДНКазе-I (DNase-seq), и транскрипционного профилирования (RNA-seq) линий PrEC и LNCaP, представляющих собой модель нормального базального эпителия простаты и РПЖ соответственно. Регионы, дифференциально открытые (ДОР) между линиями по данным DNase-seq, лежат преимущественно в межгенных и интронных регионах (~70%). Были определены транскрипционные факторы, которые дифференциально экспрессируются между линиями PrEC и LNCaP, и мотивами связывания которых обогащены ДОРы. Функциональная аннотация генов, лежащих в окрестности +/- 500 кб от мотивов каждого ТФ, показала их значимую ассоциацию с клеточной адгезией (для PrEC) и активностью протеасомы (для LNCaP).

Таким образом, был получен список транскрипционных факторов, ассоциированных с развитием рака предстательной железы. Определено, что, в основном, факторами, представленными в нормальном базальном эпителии, регулируются гены, связанные с процессами клеточной адгезии.



## НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России

23–24 апреля 2019

### ПОИСК ОПТИМАЛЬНЫХ ПРОТОКОЛОВ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ПОСЛЕДУЮЩЕГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КИШЕЧНЫХ ОРГАНОИДОВ ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК (ИПСК)

Шувалова Л.Д., Еремеев А.В., Лагарькова М.А.

*Лаборатория клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России*

Поиск наиболее точных моделей живых систем всегда был и остается актуальной проблемой в клеточной биологии. В ходе ряда исследований трехмерные культуры (органойды), в том числе получаемые из плюрипотентных стволовых клеток, показали себя более совершенными модельными системами, чем привычные двумерные. В течение нескольких последних лет были разработаны методы получения многоклеточных органойдов мозга человека, толстой кишки, почки, сетчатки, печени.

В 2009 году Сато и соавторы (Sato et al., 2009) создали новый протокол для роста и размножения органойдов, использовав определенный набор нишевых факторов кишечных стволовых клеток (ISC) при культивировании. Эта работа упростила процесс выращивания и поддержания культур и расширила спектр потенциальных исходных материалов, в качестве которых могут выступать тканевые биопсии и ИПСК.

Ранее в нашей лаборатории был отработан протокол дифференцировки в гепатоциты через стадию дефинитивной эндодермы. Целью настоящего исследования стало получение кишечных органойдов из ИПСК также через стадию дефинитивной эндодермы. Задачами стали анализ описанных в литературе протоколов, их тестирование и оптимизация.

Помимо апробации протоколов, предложенных в литературе, мы протестировали коммерческие среды для получения органойдов. Как и для гепатоцитов, для формирования кишечных органойдов из ИПСК на первом этапе была получена и иммуноцитохимически проанализирована 2D культура дефинитивной эндодермы. После этого в процессе дальнейшего культивирования не произошло ожидаемой спонтанной кластеризации клеток и открепления их от культурального пластика. В связи с этим мы использовали иной метод получения 3D агрегатов, в частности использовали коммерческие планшеты AggreWell. Далее культивирование полученных первичных органойдов продолжили в трех различных условиях:

- в полужидкой среде, в каплях матригеля, прикрепленных к поверхности и погруженных в культуральную среду (как предлагалось в коммерческом наборе),
- в статической суспензионной культуре,
- при помощи оригинального метода, ранее предложенного и успешно протестированного в нашей лаборатории на мозговых органойдах - в минибиореакторе, в динамической суспензионной культуре.

Формирование кишечных крипт происходило при всех трех вариантах культивирования. Однако при культивировании органойдов в полужидкой среде была отмечена тенденция к оседанию органойдов на дно и распластыванию их по культуральному пластику. В случае статической суспензии отдельные органойды формировали большие конгломераты, чего не наблюдалось в минибиореакторе. Полученные органойды были охарактеризованы методом иммуноцитохимического окрашивания на маркеры кишечной эндодермы и более зрелых



## **НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ**

**ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России**

*23–24 апреля 2019*

клеток кишечника Sox17, FoxA2, CDX2, E-Cadherin, Vimentin, EpCAM, Mucin 2, Cytokeratin 20 (KRT20), Desmin, Human Villin. Отрабатываются протоколы экспансии и криоконсервации органоидов.

Результаты нашего исследования полезны для моделирования взаимодействий кишечника с микробиотой и для создания моделей заболеваний.