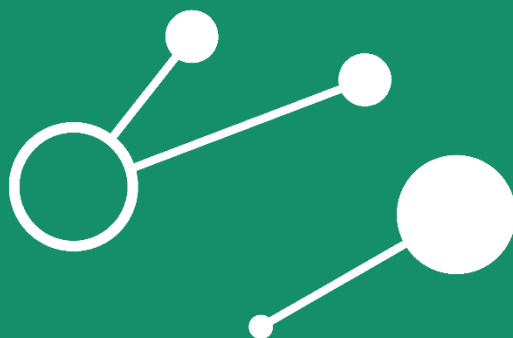
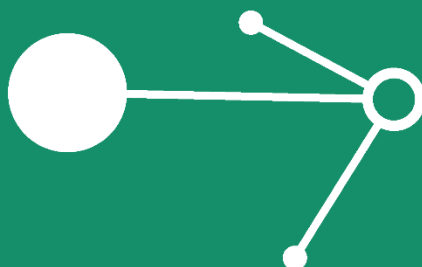
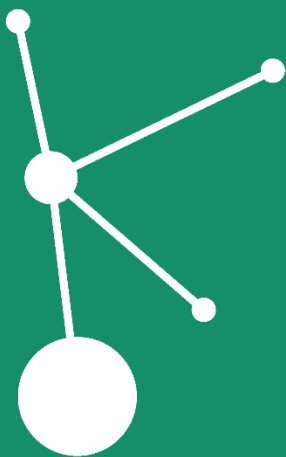




НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

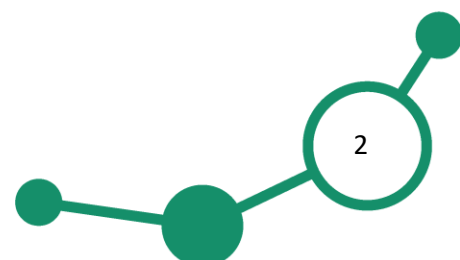
ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА РОССИИ
20-21 АПРЕЛЯ 2022 ГОДА





АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Ажикина Т.Л. _____	14	Иванова О.М. _____	6, 9
Алешикова О.И. _____	9	Казакова А.Н. _____	9
Ануфриева К.С. _____	6, 9	Климина К.М. _____	3
Аралов А.В. _____	14	Ключникова А.А. _____	5
Арапиди Г.П. _____	6, 9	Комарова А.В. _____	10
Ашрафян Л.А. _____	9	Конанов Д.Н. _____	17
Бабаева Н.А. _____	9	Копылова И.В. _____	11
Баранов К.К. _____	7	Котова Е.Н. _____	7
Башкиров П.В. _____	8	Лагарькова М.А. _____	9, 11, 13
Беспярых Д.А. _____	3	Лазарев В.Н. _____	16
Беспярых Ю.А. _____	7, 10, 20	Лебедева О.С. _____	11
Богомазова А. Н. _____	18	Лепехина Д.Ю. _____	12
Богомазова А.Н. _____	11, 21	Лукина М.М. _____	9, 21
Бодоев И.Н. _____	3	Майорова К.С. _____	11
Бойченко В.С. _____	9	Малахова М.В. _____	3
Бровина К.А. _____	4	Мальянц И.К. _____	9
Букато О.Н. _____	17	Манувера В.А. _____	4
Быченко О.С. _____	14	Мошковский С.А. _____	5
Варижук А.М. _____	3, 14, 21, 22	Ручко Е.С. _____	13
Ведехина Т.С. _____	3	Светлова Ю.И. _____	14
Веселовский В.А. _____	3	Свиридова Д.А. _____	15
Вигонт В.А. _____	11	Серебренникова М.Ю. _____	16
Владимирова Т.В. _____	13	Силантьев А.С. _____	17
Говорун В.М. _____	9	Слонов А.В. _____	9
Гончаров А.О. _____	5	Федоренко А. В. _____	18
Графская Е.Н. _____	16	Филатова Ю.В. _____	17
Грехнев Д.А. _____	11	Хомякова Е. А. _____	18
Другова С.В. _____	6	Хрулев А.А. _____	14
Еремеев А.В. _____	9, 13	Худжадзе Р.Т. _____	7
Жгун Е.С. _____	10	Шанский Я.Д. _____	7, 10
Зайчикова М.В. _____	3	Шендер В.О. _____	6, 9, 21
Захаржевская Н.Б. _____	15, 17	Широков Д.А. _____	12
Иванов В.А. _____	7	Шитиков Е.А. _____	3
Иванова К.А. _____	8	Шнайдер П.В. _____	6, 9





ТРАНСКРИПТОМНЫЙ ПРОФИЛЬ *Mycobacterium smegmatis* ПОД ДЕЙСТВИЕМ G4-СТАБИЛИЗИРУЮЩИХ СОЕДИНЕНИЙ

Бодоев И.Н., Малахова М.В., Беспятых Д.А., Зайчикова М.В., Ведехина Т.С., Веселовский В.А., Климина К.М., Варижук А.М., Шитиков Е.А.

Лаборатория молекулярной генетики микроорганизмов

В связи с широким распространением устойчивых форм туберкулеза актуальным является поиск новых лекарственных препаратов и мишеней для противотуберкулезной терапии. Одной из таких мишеней могут стать G-квадруплексы (G4) – неканонические вторичные структуры, формирующиеся в физиологических условиях гуанинсодержащими последовательностями ДНК и РНК. При этом G4-лиганды, способные стабилизировать G4, рассматриваются как возможные антибактериальные агенты. Цель представленного исследования заключалась в поиске связи между наличием потенциальных G4 в геноме модельного микроорганизма *M. smegmatis* mc2 155 и изменением транскриптомного профиля под действием G4-стабилизирующих лигандов.

Минимальную ингибирующую концентрацию лигандов BRACO-19 и TMPyP4 определяли методом серийных разведений. Транскриптомный анализ проводили на секвенаторе Illumina HiSeq 2500. Влияние лигандов на стабильность G4 определяли с помощью термической денатурации, контролируемой спектроскопией кругового дихроизма.

Инкубирование *M. smegmatis* с 1xМИК BRACO-19 (10мкМ) и TMPyP4 (4мкМ) в течение 4 часов привело к изменению экспрессии 822 (515↑; 307↓) и 680 (339↑; 341↓) генов соответственно. При этом статистический анализ не выявил связи между изменением уровня экспрессии генов под действием лигандов и наличием потенциальных квадруплекс-формирующих последовательностей, вне зависимости от локализации G4. В то же время при воздействии BRACO-19 были обнаружены существенные изменения в генах систем репликации и репарации, а также в генах метаболизма железа, что свидетельствует об индуцированном стрессе. Для TMPyP4 были обнаружены существенные изменения в факторах транскрипции и системе биосинтеза аргинина, что может свидетельствовать о множественности биологических мишеней для этого соединения.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 19-75-10109





КОНСТРУИРОВАНИЕ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫХ МИНИАНТИТЕЛ, СПЕЦИФИЧНЫХ К РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩЕМУ ДОМЕНУ SPIKE-БЕЛКА SARS-COV2

Бровина К.А., Манувера В.А.

Лаборатория генной инженерии

Основным поверхностным антигеном коронавируса SARS-CoV-2 – является Spike-белок. Моноклональные антитела, специфичные к рецептор-связывающему домену (RBD-домену) Spike-белка широко применяются для диагностики, вирусной нейтрализации при разработке передовых методов лечения, а также в исследовательских целях. Для связывания антигена достаточно использовать одноцепочечные минимоноклональные антитела (scFv-антитела), содержащие переменные фрагменты легкой и тяжелой цепи полноразмерного антитела. Целью данной работы является получение в клетках *E.coli* одноцепочечных минимоноклональных антител, специфичных к RBD-домену spike-белка SARS-CoV-2.

В ходе работы получены генетические конструкции, кодирующие одноцепочечные минимоноклональные антитела REGN10987 и SARS2-38, оценен уровень накопления рекомбинантных белков в *E.coli*, выделены белки из бактериальных клеток и проверена их функциональность с использованием иммуноферментного анализа (ИФА). Два фрагмента ДНК, кодирующие переменные фрагменты легкой и тяжелой цепи антитела, соединенные $(G_4S)_3$ линкером, были объединены в составе рекомбинантного гена, встроенного в вектор на основе плазмиды серии pET. Полученными плазмидами трансформировали штамм Rosetta2-DE3 *E.coli*. Далее были подобраны условия культивирования бактерий, обеспечивающие максимальную наработку рекомбинантных миниантител. Оба рекомбинантных белка обнаружены в нерастворимой фракции клеточной культуры *E.coli*. После выделения методом аффинной хроматографии scFv-антитела были переведены в растворимую фракцию. С помощью ИФА было показано связывание полученных антител с RBD-доменом.





РОЛЬ ФЕРМЕНТОВ ADAR ПРИ АКТИВАЦИИ ПРОТИВОВИРУСНОГО ИММУНИТЕТА, ВЫЗВАННОГО ИНГИБИТОРАМИ СПЛАЙСИНГА

Гончаров А.О., Ключникова А.А., Мошковский С.А.

Лаборатория протеогеномики ФНКЦ ФХМ

Одним из механизмов действия ингибиторов сплайсинга является активация врожденного противовирусного иммунитета на собственные двухцепочечные РНК (дцРНК). Редактирование РНК под действием аденозиндезаминаз ADAR выполняет в клетке множество функций, одна из которых – препятствие активации врожденного иммунитета на собственную двухцепочечную РНК, образующуюся из повторяющихся последовательностей генома. Мы предполагаем, что процессы сплайсинга и ADAR-опосредованного редактирования РНК могут взаимно воздействовать друг на друга в некоторых клеточных процессах.

Одна из метрик, которая используется для количественной оценки РНК-редактирования на уровне всего транскрипта, это *Alu-editing index* (AEI) – отношение числа замен аденозинов на инозин к общему числу аденозинов в *Alu*-повторах. Мы обнаружили, что уровень редактирования *Alu*-повторов в глиобластоме отрицательно коррелирует с экспрессией некоторых генов, вовлеченных в процессы сплайсинга. Из литературы известно, что дефицит ADAR нарушает нормальный процесс сплайсинга у мышей. Чтобы установить причинно-следственную связь, мы решили проверить, влияет ли грубое нарушение сплайсинга на ADAR-опосредованное редактирование РНК. Мы обнаружили, что в клетках линии HeLa, обработанных ингибитором сплайсосомы изогинкгетином в течение 6 часов, значительно снижен AEI. При этом, через 18 часов после воздействия препарата индекс возвращается к нормальным значениям. Предположительно, это может быть связано не с фактическим снижением активности ферментов ADAR, а с повышением количества *Alu*-повторов в мРНК из-за нарушения сплайсинга. При этом, происходит активация генов, ответственных за противовирусный ответ. Таким образом, клетке не хватает базальной активности аденозиндезаминаз для предотвращения активации врожденного противовирусного иммунитета.

Мы выдвигаем гипотезу, что при ингибировании активности ADAR можно повысить цитотоксический эффект ингибиторов сплайсинга за счет чрезмерной активации врожденного иммунитета.





ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОЙ РОЛИ СПЛАЙСОСОМНЫХ БЕЛКОВ В ФОРМИРОВАНИИ ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКА

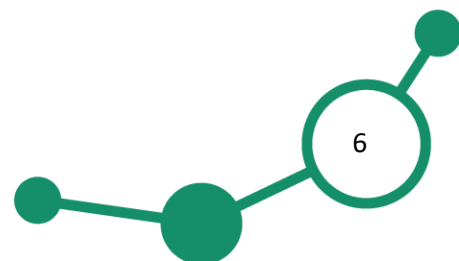
Другова С.В., Иванова О.М., Шнайдер П.В., Ануфриева К.С., Арапиди Г.П., Шендер В.О.

Лаборатория молекулярной онкологии

Ранее нами было показано, что в процессе химиотерапии опухолевые клетки способны секретировать во внеклеточное пространство различные компоненты сплайсосомы. При этом, такие секретомы повышают химиорезистентность реципиентных опухолевых клеток. Было продемонстрировано, что экзогенные сплайсосомные белки в составе внеклеточных везикул способны проникать в окружающие опухолевые клетки, однако последующий ход событий такого типа межклеточной коммуникации не понятен. Для исследования возможной роли сплайсосомных белков в формировании химиорезистентности, на основании биоинформатического анализа были выбраны белки SNU13 и SYNCRIP, которые были ассоциированы с плохим прогнозом для пациентов с аденокарциномой яичника. Прежде всего, мы показали, что индуцированные терапией секретомы действительно повышают представленность SNU13 и SYNCRIP в реципиентных опухолевых клетках. Чтобы исследовать может ли повышенная представленность этих сплайсосомных белков быть причиной приобретения опухолевыми клетками более агрессивного фенотипа, мы получили две клеточные линии со стабильной сверхэкспрессией последовательностей генов, кодирующих выбранные белки. С помощью количественной оценки уровней апоптоза и некроза клеток было показано, что сверхэкспрессия SNU13 и SYNCRIP приводит к формированию у опухолевых клеток резистентности к цисплатину. Кроме того, с использованием платформы xCelligence было продемонстрировано, что SYNCRIP значительно повышает скорость пролиферации опухолевых клеток.

Чтобы исследовать роль данных белков в возникновении химиорезистентности клеток аденокарциномы яичников, был проведен количественный протеомный анализ клеток с и без сверхэкспрессии SYNCRIP и SNU13 через 24 часа после обработки цисплатином. Во обеих линиях клеток со сверхэкспрессией относительно контрольных клеток в ответ на цисплатин повышалась представленность белков, участвующих в репарации ДНК, и понижалась активность путей, связанных с клеточным старением. Все полученные данные свидетельствуют о функциональной значимости SYNCRIP и SNU13 при ответе опухолевых клеток на химиотерапию.

Работа поддержана грантом РФФ № 19-75-10123.





РОЛЬ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА В РАЗВИТИИ ЛОР ПАТОЛОГИИ

Иванов В.А.¹, Котова Е.Н.², Худжадзе Р.Т.³, Шанский Я.Д.¹, Баранов К.К.², Беспярых Ю.А.¹

¹Лаборатория молекулярной медицины ЦММиД ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, ²Отделение оториноларингологии КБ 123 ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, ³Клинико-диагностическая лаборатория ЦММиД ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Поражение ротоглотки с развитием фаринготонзиллита (тонзиллита) является одной из часто встречающихся причин обращения к врачам-оториноларингологам. При этом, причины патологического процесса могут быть самыми разнообразными. Цель работы заключалась в установлении взаимосвязи между наличием инфекционного агента и гистологическими изменениями в тканях миндалин.

В исследование включено 43 пациента в возрасте от 2 до 15 лет, имевших показания к тонзилэктомии, не имеющих или после терапии (не менее месяца) инфекционных заболеваний. После хирургического вмешательства, часть удалённой ткани помещали в стерильный физиологический раствор. Далее образец делили на две части. Одна часть подвергалась фиксации в 10% забуференном формалине. Гистологическую проводку осуществляли на гистопротессоре Thermo Excelsior AS, заливку на станции Thermo HistoStar, затем готовили срезы толщиной 3 мкм на микротоме Thermo HM340E. Полученные образцы окрашивали гематоксилин-эозином по стандартному протоколу. Вторая часть использовалась для проведения ПЦР анализа на наличие бактериальных и вирусных агентов с использованием наборов фирмы Литех (Россия).

Согласно полученным данным в операционном материале 7 пациентов обнаружены вирусные агенты (*Cytomegalovirus* (CMV), *Human herpesvirus* (HHV) 4(EBV), HHV-6), 8 – бактериальные (*S. aureus*, *Str. pyogenes*) и одного - сочетание вирусной (EBV) и бактериальной инфекций. Установлена статистически достоверная зависимость между отитами и наличием бактериального возбудителя в лакунарном содержимом; наличием гигантских клеток в срезах и CMV. Показана возможная корреляция между количеством вторичных фолликулов и CMV; опустошением Т-зависимой зоны фолликулов и HHV-6.

Наличие инфекционных агентов в операционном материале при отрицательном предоперационном тестировании связано с внутриклеточным персистированием возбудителя и свидетельствует об ограниченности ПЦР исследования мазка из ротоглотки для выявления возбудителей хронического тонзиллита. Нёбные миндалины могут являться хроническим источником возбудителей инфекций, что подтверждается гистологической картиной.





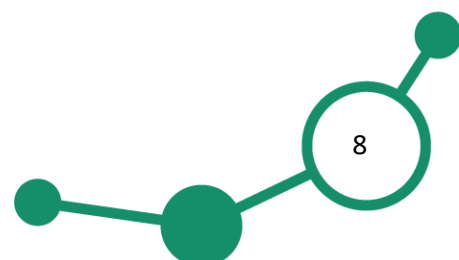
ЭЛАСТИЧНАЯ НАНОПОРА КАК СЕНСОР ОДИНОЧНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАКРОМОЛЕКУЛ И ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ

Иванова К.А., Башкиров П.В.

Лаборатория электрофизиологии

Создание сенсоров, способных детектировать не меченные (нативные) одиночные биологические макромолекулы или вирусные частицы имеет огромное практическое значение. Использование нанопор (нанометровых отверстий в тонких пленках), погруженных в раствор электролита, в качестве чувствительного элемента сенсора представляется наиболее перспективным. Регистрация объектов в нанопорах основана на измерении изменений ионного тока, текущего через нее.

В данной работе рассмотрены преимущества использования эластичных нанопор в качестве сенсора одиночных биологических макромолекул и вирусных частиц. Эластичная нанопора (просвет мембранной нанотрубки) представляет собой полый цилиндр, вытягиваемый из плоской бислоидной мембраны стеклянной микропипеткой. Стенки нанотрубки (НТ) являются липидным бислоем. Длину НТ можно изменять, меняя положение микропипетки. НТ остаются стабильным вплоть до 50 нм длины. Радиус НТ определяется соотношением модуля изгиба и латерального натяжения мембраны, и в зависимости от липидного состава может варьировать в диапазоне от 60 до 2 нм. Возможность подстраивать радиус НТ за счет липидного состава позволяет подобрать условия, когда поперечные размеры исследуемых объектов и просвета НТ совпадают. При этом чувствительность измерения отклоняется от линейного режима, и становится практически независимой от длины трубки. Кроме того, перенос объекта происходит под действием не электрофоретических, а пондеромоторных сил, что делает возможным транспортировку электронейтральных объектов и на 1-2 порядка увеличивает характерное время их нахождения внутри НТ. Нами продемонстрировано, что эластичные нанопоры на основе мембранных НТ могут быть успешно использованы как для детектирования небольших одиночных молекул, так и достаточно крупных мембранных везикул, в килгерцовом диапазоне частоты измерений с разрешающей способностью, превышающей твердотельные аналоги.





**ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ, СПЕЦИФИЧНЫХ ДЛЯ ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ,
НА ОСНОВАНИИ КОМПЛЕКСНОГО АНАЛИЗА ДАННЫХ РНК-СЕКВЕНИРОВАНИЯ В РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ
ОПУХОЛЕЙ**

Казакова А.Н., Ануфриева К.С., Иванова О.М., Шнайдер П.В., Мальянц И.К., Алешикова О.И.,
Слонов А.В., Ашрафян Л.А., Бабаева Н.А., Еремеев А.В., Бойченко В.С., Лукина М.М., Лагарькова М.А.,
Говорун В.М., Шендер В.О., Арапиди Г.П.

Лаборатория системной биологии

Опухоль-ассоциированные фибробласты (ОАФ) являются ключевыми компонентами стромального микроокружения опухолевых клеток и играют важную роль в стимуляции роста, инвазии и метастазировании опухоли. Однако в литературе до сих пор нет однозначного определения и точных характеристик ОАФ. Главным ограничивающим фактором изучения опухоль-ассоциированных фибробластов является отсутствие надежных белков для их выявления среди всех клеток опухоли. Существующие гены-маркеры, с помощью которых в различных исследованиях выявляют ОАФ, активно экспрессируются и другими мезенхимальными клетками микроокружения опухоли, в том числе нормальными активированными фибробластами прилегающей к опухоли соединительной ткани, а также опухолевыми клетками, претерпевающими эпителиально-мезенхимальный переход. Для всестороннего изучения особенностей транскриптома опухоль-ассоциированных фибробластов мы провели комплексный анализ большого массива данных различных технологий секвенирования (данные секвенирования мРНК, данные секвенирования РНК единичных клеток). По данным РНК-секвенирования одиночных клеток 10 различных типах опухолей и нормальных тканей был выявлен список генов, уровень экспрессии которых значительно выше в клетках фибробластов по сравнению с другими типами клеток. Затем мы изучили экспрессию выбранных генов в наборе данных секвенирования мРНК, соответствующих опухолевым линиям человека. Благодаря исследованию экспрессии предложенных маркеров по данным иммуногистохимического анализа и экспериментальной валидации полученных результатов мы выявили ОАФ-специфические белки, которые позволяют достоверно идентифицировать популяцию ОАФ в тканях опухоли.

Работа поддержана Грантом 075-15-2019-1669 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.





МОНИТОРИНГ СОДЕРЖАНИЯ ЖЕЛЧНЫХ КИСЛОТ И ИХ КОНЬЮГАТОВ В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В СОЧЕТАНИИ С ТАНДЕМНОЙ МАСС–СПЕКТРОМЕТРИЕЙ

Комарова А.В.^{1,2}, Шанский Я.Д.¹, Жгун Е.С.¹, Беспятовых Ю.А.^{1,2}

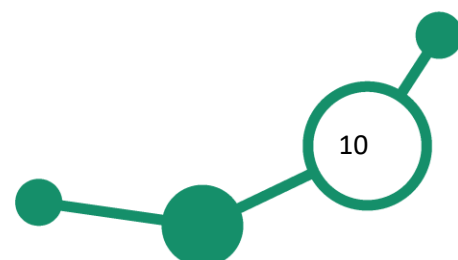
¹ *Лаборатория молекулярной медицины ЦММИД ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Москва, Россия;*

² *Факультет химико-фармацевтических технологий и биомедицинских препаратов, РХТУ им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия*

Желчные кислоты (ЖК) – органические вещества, являющиеся конечными продуктами обмена холестерина. Нарушение гомеостаза ЖК связано с рядом метаболических расстройств, что делает их возможными маркерами тяжести течения и исхода заболевания. Однако стандартизованные методы анализа ЖК отсутствуют. Целью работы являлась адаптация ВЭЖХ-МС/МС для определения ЖК и их конъюгатов в кале человека.

Исследование проведено на 17 образцах кала, полученных от 2 пациентов с ожирением II степени и различными типами сахарного диабета (СД), до, в ходе и после терапии методом трансплантации фекальной микробиоты (ТФМ). Выделение ЖК проводили методом сухого пятна после экстракции с помощью раствора натрия гидроксида (0.05 М). Разделение осуществляли с помощью хроматографа Accela на колонке Kromasil 5C18-100 (подвижная фаза – градиентная смесь раствора аммония ацетата, 10 mM, и ацетонитрила), детекцию – на приборе Thermofisher LXQ (Thermofisher Scientific, США). Количественный анализ проводили методом внутреннего стандарта.

В ходе работы подобраны оптимальные условия масс-спектрометрического анализа (ионизация электрораспылением, вольтаж иглы -4500 V, потенциал ионизации 25–30 V, температура 380°C, давление распыляющего газа 40 psi, время сканирования 50 мс). Суммарно было идентифицировано содержание 13 соединений. У пациентов отмечено снижение массы тела после ТФМ (динамика -4-5 кг за первый месяц наблюдения, далее -1-2 кг в месяц). Показано, что ТФМ терапия при СД I типа сопровождается повышением содержания ЖК и глициновых конъюгатов (за исключением урсодезоксихолевой кислоты) через 3 месяца с последующим снижением. При СД II типа ТФМ сопровождается через 2 недели повышением глициновых конъюгатов ЖК и литохолевой кислоты, а через 3 недели – повышением содержания свободных ЖК, с последующим их снижением до исходного уровня в течение 5 месяцев. Результаты могут свидетельствовать об изменении состава или активности кишечной микробиоты и улучшении функционирования пищеварительной системы в результате ТФМ.





ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ МУТАЦИИ G2019S В КИНАЗЕ LRRK2 НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МИТОХОНДРИЙ В ИЗОГЕННОЙ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Копылова И.В.¹, Майорова К.С.¹, Вигонт В.А.², Грехнев Д.А.², Богомазова А.Н.^{1,3},
Лебедева О.С.^{1,3}, Лагарькова М.А.^{1,3}

1 – Лаборатория клеточной биологии ФНКЦ ФХМ ФМБА; 2 – Институт цитологии РАН;

3 – Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины

В настоящее время для изучения патогенетических механизмов мутаций, ведущих к наследственным заболеваниям, всё чаще используют клеточные модели на основе изогенных линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). Линии ИПСК, входящие в состав таких моделей, отличаются лишь наличием патогенной мутации, что позволяет исключить влияние генетического фона. Кроме того, благодаря способности ИПСК к дифференцировке во все типы клеток, можно изучать мутации в клетках и тканях, где их эффект наиболее выражен. Ранее в нашей лаборатории с применением технологии редактирования CRISPR/Cas9 была получена клеточная модель на основе ИПСК больного наследственной формой болезни Паркинсона (БП). ИПСК данной клеточной модели отличаются по статусу мутации G2019S в гене *PARK8*, кодирующему киназу LRRK2. Мутация G2019S приводит к повышению киназной активности LRRK2 и в гетерозиготном состоянии является самой частой причиной развития наследственной и спорадической форм БП.

Поскольку в патогенезе БП значительную роль играет митохондриальный стресс и дегенерация дофаминэргических нейронов, в данной работе с помощью упомянутой выше изогенной клеточной модели мы изучали влияние мутации G2019S на митофагию и митохондриальный мембранный потенциал (ММП) именно в данном типе нейронов. Мы показали, что в нейронах, гетерозиготных по мутации G2019S, повышено количество митохондрий, что согласуется с данными литературы и подтверждает валидность модели. В пилотном эксперименте было показано, что дофаминэргические нейроны, гомозиготные по мутации G2019S, практически не отвечают повышением митофагии на митохондриальный стресс, вызванный добавлением разобщителя окислительного фосфорилирования, или на активацию индуктором аутофагии трегалозой. Также в нейронах, гомозиготных по мутации G2019S, не повышается ММП в ответ на обработку трегалозой. Полученные результаты можно объяснить тем, что повышенная киназная активность LRRK2 ослабляет митофагию.



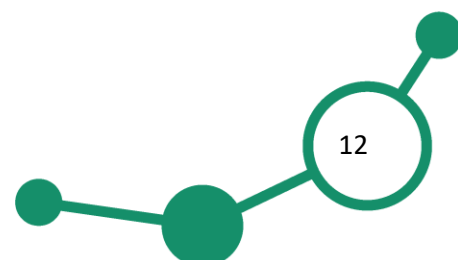
СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ХИМЕРНЫХ АПОПТИНОВ ДЛЯ УНИЧТОЖЕНИЯ КЛЕТОК ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ МЕЛАНОМЫ

Лепехина Д.Ю., Широков Д.А.

Лаборатория генной инженерии

Кафедра вирусологии и микробиологии МГАВМиБ им. К.И. Скрябина

Меланома это опухолевое заболевание кожных покровов человека, характеризующееся высокой вероятностью метастазирования и, соответственно, неблагоприятным прогнозом. В последние годы в развитых странах мира растёт как заболеваемость меланомой, так и количество смертельных случаев, обусловленных этой неоплазией. Поиск новых лекарств и терапевтических подходов к лечению данного заболевания представляется крайне актуальной задачей для современной медицины. Целью данной работы было создание рекомбинантных химерных белков на основе онколитического полипептида вирусной природы – апоптина – для уничтожения клеток злокачественной меланомы. Апоптин это небольшой пролин-богатый белок вируса инфекционной анемии цыплят, впервые подробно описанный в 90-х годах прошлого столетия. Было обнаружено, что его накопление в опухолевых клетках вызывает апоптоз, при этом на нормальные, нетрансформированные клетки апоптин токсического действия не оказывает. Для повышения избирательности по отношению к опухолевым клеткам мы решили создать химерные белки, в которых апоптин был бы соединён с меланома-специфичными пептидами, отобранными ранее методом фагового дисплея на клетках злокачественной меланомы. Эти пептиды содержат RGD-мотив (аргинин-глицин-аспарагиновая кислота), стабилизированный цистеинами, что обеспечивает высокую аффинность связывания с альфа5-бета3-интегринами – молекулами, опосредующими метастатический потенциал меланомных клеток, и в силу этого широко представленными на плазматической мембране клеток меланомы вертикального роста. Рекомбинантные гены были собраны с помощью ПЦР и клонированы в составе плазмид рЕТmin и рЕТ15mcs под контролем индуцибельного промотера T7. Данными плазмидами были трансформированы штаммы *E.coli BL21 (DE3) Gold* и *E.coli Rosetta2 (DE3)*, после чего подобраны условия экспрессии рекомбинантных генов. Химерные апоптины в наибольшем количестве накапливались в нерастворимой фракции бактериальных клеток. Целевые рекомбинантные белки были очищены с помощью металл-хелатной хроматографии на колонке с Ni-сефарозой в денатурирующих условиях.





СРАВНЕНИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ 2D И 3D КУЛЬТУР ХОНДРОЦИТОПОДОБНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ИПСК С ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРОЙ ХОНДРОЦИТОВ ИЗ ДОНОРСКОГО МАТЕРИАЛА

Ручко Е.С.¹, Владимирова Т.В.¹, Еремеев А.В.¹, Лагарькова М.А.^{1,2}

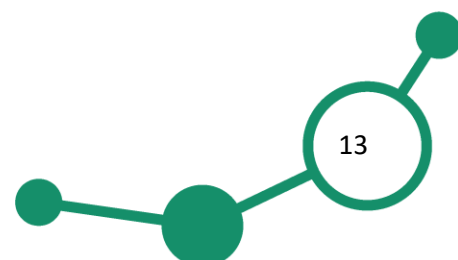
1 – Лаборатория клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА; 2 – Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины

Хронические заболевания суставов являются распространённой патологией, прогрессирование которой может приводить к нетрудоспособности пациентов. Медикаментозное лечение патологий хряща направлено на замедление процесса дегенерации хряща и не всегда способно обратить произошедшие патологические изменения вспять. Альтернативным терапевтическим подходом для этих заболеваний могут стать клеточные технологии и, в частности, заместительная терапия с использованием хондроцитов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК).

Целью настоящей работы был поиск наиболее эффективного протокола получения хондроцитов путём дифференцировки ИПСК *in vitro*. Так, мы получали 2D монослойные и 3D сфероидные культуры хондроцитоподобных производных ИПСК, используя три различных протокола дифференцировки ИПСК. Эти протоколы отличались по применению малых молекул (Chir 99021, ретиноевая кислота) и рекомбинантных факторов роста (TGF- β , BMP-2, β -FGF). Полученные культуры хондроцитоподобных производных сравнивали с культурами хондроцитов, полученных из донорской хрящевой ткани. Сравнение проводили по экспрессии хондрогенных маркеров (агрекан, коллаген 1 и 2 типа, SOX9), используя количественную ОТ-ПЦР и иммуноцитохимическое окрашивание.

В результате была показана способность полученных хондроцитоподобных производных ИПСК синтезировать вышеперечисленные хондрогенные маркеры, аналогично хондроцитам первичной культуры нативного хряща. Также нами было показано, что для 3D культур характерен более высокий уровень экспрессии хондрогенных маркеров по сравнению с аналогичными 2D культурами, что позволяет считать 3D подход приоритетным для разработки биомедицинских клеточных продуктов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант РФФИ 19-29-04113мк.



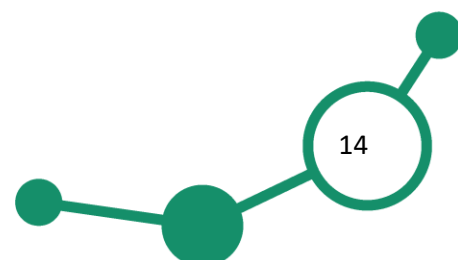


КОМПЛЕКСЫ ФЛУОРОГЕНОВ С АПТАМЕРАМИ MANGO ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ РНК В ЖИВЫХ КЛЕТКАХ

Хрулев А.А., Быченко О.С., Ажикина Т.Л., Аралов А.В., Варижук А.М., Светлова Ю.И.

Лаборатория искусственного антителогенеза

Для визуализации РНК в живых клетках широко применяется мечение исследуемой РНК последовательности аптамером Mango I, основным элементом которого является G-квадруплекс, с последующей обработкой клеток, экспрессирующих созданную конструкцию, флуорогеном TO1-biotin на основе тиазолового оранжевого (ТО). Данный краситель обладает низкой интенсивностью флуоресценции в свободном состоянии, которая значительно увеличивается при связывании флуорогена с аптамером. Пара TO1-biotin-Mango I не лишена недостатков, например, таких как ограничение визуализации в зеленом канале, малое значение Стоксова сдвига и сравнительно небольшой квантовый выход. Эти проблемы удалось частично решить с помощью селекции новых аптамеров Mango II, III и IV. Был разработан набор близких структурных аналогов TO1-biotin, для которых в данной работе предполагалось оценить их спектральные свойства при связывании с аптамерами Mango I, II, III, IV. В данной работе необходимо было решить следующие задачи: провести сравнительный анализ параметров флуоресценции серии аналогов TO1-biotin в комплексе с аптамерами, а также оценить специфичность и эффект «разгорания». Для оценки спектральных характеристик пары флуороген-аптамер измеряли параметры флуоресценции и абсорбции, для расчета их квантового выхода использовали стандарт родамин 6G. Константы связывания измеряли методом флуориметрии. Ряд флуорогенов показал значительное увеличение интенсивности флуоресценции в комплексе с аптамерами, в том числе большее, чем в комплексе с TO1-biotin, а также отмечалось увеличение Стоксова сдвига. Для лидерного аналога были измерены константы диссоциации с аптамерами. Далее, были оценены спектральные свойства лидерных флуорогенов в комплексе с двухмодульной РНК (MangoII аптамер и бактериальная малая РНК MTS1338 из *M.tuberculosis*), наработанной *in vitro*. Эффект «разгорания» подтвердился для гибридной, но не для контрольной РНК. На заключительном этапе гибридная РНК была визуализирована в макрофагах, зараженных *M.Smegmatis*, экспрессирующей нашу конструкцию. Таким образом, были получены новые перспективные молекулярные инструменты для отслеживания малых РНК в живых клетках.





СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЛЕТУЧИХ СОЕДИНЕНИЙ В СОСТАВЕ ВЕЗИКУЛ НАИБОЛЕЕ ПРЕДСТАВЛЕННЫХ ВИДОВ РОДА *BACTEROIDES*

Свиридова Д.А.¹, Кардонский Д.А.¹, Ефимов Б.А.^{1,2}, Багров Д.В.³, Захаржевская Н.Б.¹

¹ Лаборатория молекулярной патофизиологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

² Кафедра микробиологии РНИМУ им. Пирогова

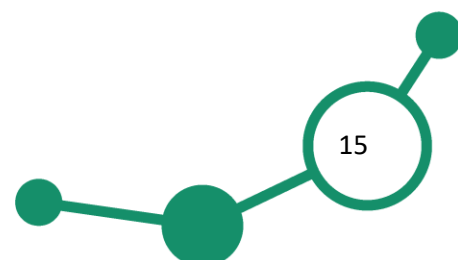
³ Лаборатория медицинских нанотехнологий ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Введение. Короткоцепочечные жирные кислоты (КЖК), продуцируемые многими видами бактерий, активно участвуют в регуляции метаболической активности и обладают иммуномодулирующими свойствами. Для рода *Bacteroides* показана роль везикул в аналогичных процессах, что позволяет предположить наличие в их составе в том числе и КЖК. В рамках данной работы впервые для бактериальных везикул была поставлена задача оценки спектра КЖК, содержащихся в везикулах наиболее распространенных в микрофлоре ЖКТ видов рода *Bacteroides*.

Материалы и методы. Для исследования везикул были взяты виды рода *Bacteroides*: *B.dorei*, *B.vulgatus*, *B.caccae*, *B.xylanisolvens*, *B.uniformis*, *B.thetaiotaomicron*, *B.cellulosalyticus*, *B.eggerthii*, *B.stercoris*, *B.intestinalis*, *B.clarus*, *B.coprocola*, *B.salyersiae*, *B.fragilis*, *B.finigoldia*. Для всех видов были подобраны условия культивации до достижения максимальной плотности для выделения везикул из культуральной среды. Везикулы были выделены методом последовательной фильтрации и центрифугирования. Финальные препараты были оценены методом ТЭМ. Препараты везикул анализировали посредством ГХ/МС Shimadzu QP2010 Ultra с парофазным экстрактором Shimadzu HS-20.

Результаты. Культуральные среды, а также состав газовой среды были подобраны с учетом скорости и интенсивности роста бактерий, в особенности для *B.intestinalis*. Полученные препараты везикул были оценены методом ТЭМ, при этом размеры везикул варьировали от 30 до 100 нм. Везикулы всех заявленных видов были исследованы методом ГХ-МС с парофазным способом экстракции, который был скорректирован с учетом исследуемого препарата. В ходе анализа КЖК были обнаружены в составе везикул большинства анализируемых видов *Bacteroides* в разных соотношениях, кроме *B.salyersiae* и *B.finigoldia*. При этом отмечалась явная тенденция наличия средне и длинноцепочечных жирных кислот у всех видов *Bacteroides*. В везикулах *Bacteroides fragilis* был выявлен бутират, известный своими иммуномодулирующими свойствами в отношении стволовых клеток кишечника.

Работа финансируется из средств гранта: РНФ 21-75-10172





АЛГОРИТМ ПОИСКА НОВЫХ ПРОНИКАЮЩИХ ПЕПТИДОВ НА ОСНОВЕ МЕТОДОВ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ

Серебренникова М.Ю., Графская Е.Н., Лазарев В.Н.

Лаборатория генной инженерии

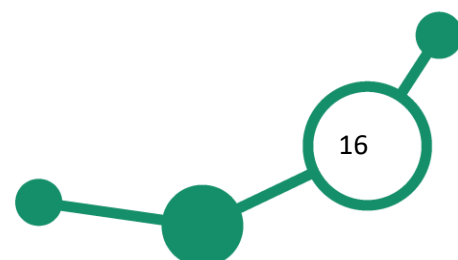
Все более актуальной задачей в современной медицине становится разработка систем внутриклеточной доставки биологически активных молекул для терапии широкого ряда болезней. Проникающие пептиды (ПП) являются перспективными агентами для создания новых терапевтических подходов в данной области.

Представленное исследование посвящено разработке предсказательного алгоритма проникающих пептидов с помощью методов машинного обучения. На первом этапе из открытых баз данных и сервисов (CPPsite 2.0, CellPPD, C2Pred, SkipCPP-Pred, MLCPP) была получена обучающая выборка, состоящая из 2536 молекул ПП и не-ПП длиной от 5 до 61 aa.

На следующем шаге для каждого пептида мы определили молекулярные дескрипторы, описывающие их уникальные свойства. С помощью методов уменьшения размерности выделили 20 параметров, наиболее полно характеризующих различия между классами ПП и не-ПП. Далее с помощью кросс-валидации нашли значения входящих гиперпараметров для каждого из следующих алгоритмов: k-ближайших соседей, логистической регрессии, градиентного бустинга, случайного леса и метода опорных векторов.

По результатам оценки качества полученных прогностических моделей ПП мы выбрали три лучших. С помощью отобранных алгоритмов мы осуществили поиск новых ПП на наборе данных, включающем пептидомы королевской кобры *Ophiophagus hannah*, красных муравьев *Manica rubida*, медоносных пчел *Apis mellifera* и медицинской пиявки *Hirudo medicinalis*, а также протеомы пауков-мегаломорфов *Hadronyche infensa* и медуз вида *Rhopilema esculentum* и *Sanderia malayensis*. В результате мы сформировали перечень кандидатных пептидов для дальнейшей оценки их структурно-функциональных свойств.

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 20–15–00270)





ЛИПИДОМИКА: МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И ИХ ИЗОМЕРОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ

Силантьев А.С.¹, Конанов Д.Н.³, Филатова Ю.В.¹, Букато О.Н.², Захаржевская Н.Б.¹

¹ Лаборатория молекулярной патофизиологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

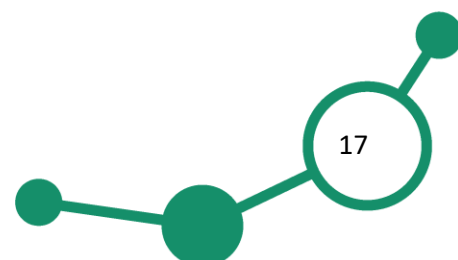
² Лаборатория протеомного анализа ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

³ Лаборатория математической биологии и биоинформатики НИИ системной биологии и
медицины Роспотребнадзора

Введение: Липидомика как одно из самых молодых направлений омиксных технологий позволяет дополнить картину биохимических процессов, происходящих в клетке. Учитывая значительное внутриклассовое разнообразие соединений липидной природы, включая наличие изомеров, методики для обзорного и таргетного анализа требуют разработки новых аналитических подходов актуальных научных и биомедицинских задач. В данном исследовании основной целью была разработка комбинированного панорамного анализа липидов и липидных изомеров в различных биологических объектах, а также оценка спектра липидных изменений в образцах сыворотки пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника.

Материалы и методы: на этапе разработки методик панорамного липидомного исследования были подготовлены протоколы пробоподготовки различных биологических образцов, в числе которых асцитическая жидкость и сыворотка крови. Анализ осуществлялся с использованием ультра высокоэффективной жидкостной хроматографии, совмещенной с масс-спектрометром SCIEX TripleTOF 6600. Разработанная методика панорамного липидомного исследования была использована для оценки липидных изменений в сыворотке крови пациентов с ВЗК (n=59) против группы здорового контроля (n=50).

Результаты: был разработан подход к анализу липидома, основанный на комбинации информационно-зависимого и информационно-независимого ВЭЖХ-МС анализа (IDA и SWATH). Комбинация этих методик позволила повысить количество идентификаций липидов при использовании стандартных методов пробоподготовки. Произведен экспериментальный анализ липидов в биологических образцах пациентов с ВЗК и группы контроля. Всего выявлено и идентифицировано 720 липидов, в том числе их региомеров.





СОЗДАНИЕ ИЗОГЕННОЙ КЛЕТочНОЙ МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФУНКЦИЙ ГЕНА *UBE2A* НА ОСНОВЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Федоренко А. В.¹, Хомякова Е. А.^{1,2}, Богомазова А. Н.^{1,2,3}

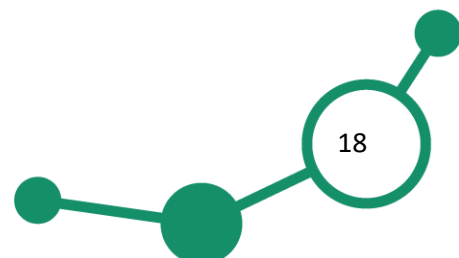
1 – Лаборатория клеточной биологии ФНКЦ ФХМ ФМБА; 2 – Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН; 3 – Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины

В 2006 году был описан синдром X-сцепленной умственной отсталости, связанный с наличием мутации в гене *UBE2A* и названный синдромом Насименто. Ген *UBE2A* кодирует убиквитин-связывающий белок E2, участвующий в модификации гистонов. К настоящему времени описан целый ряд мутаций в гене *UBE2A*, также ассоциированных с умственной отсталостью, однако патогенетический механизм, в котором отсутствие функционального продукта гена *UBE2A* нарушает умственное развитие, пока не известен. Целью данной работы было создание изогенной клеточной модели на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) для изучения функций гена *UBE2A*.

При помощи геномного редактирования CRISPR/Cas9 из ИПСК здоровых доноров были получены изогенные ИПСК с нокаутом гена *UBE2A*. Нами были отобраны 3 женских клона с гомозиготным нокаутом гена *UBE2A* и 2 мужских клона — с гемизиготным нокаутом. Генный нокаут был оценен функционально по экспрессии гена *UBE2A* при помощи количественной ОТ-ПЦР. Для отредактированных клонов ИПСК был подтвержден плюрипотентный их статус, и было подтверждено, что редактирование не вызвало аномалий кариотипа. Для изучения эффекта повышенной экспрессии гена *UBE2A* дополнительные копии этого гена были встроены в геном ИПСК при помощи лентивирусной трансфекции. Было отобрано 4 клона с индуцибельной гиперэкспрессией гена *UBE2A*, а также 4 контрольных клона, которые были трансфицированы вектором, не несущим функциональной копии гена *UBE2A*. Повышенная индуцибельная экспрессия гена *UBE2A* подтверждена при помощи количественной ОТ-ПЦР.

Полученная в данной работе коллекция линий ИПСК с различным статусом гена *UBE2A* будет использована для изучения роли этого гена в процессе нейронального развития, что возможно благодаря способности ИПСК к дифференцировке в нейральные клетки, а также способности ИПСК к самоорганизации в трехмерные клеточные структуры – мозговые органоиды, которые частично воспроизводят процессы раннего развития мозга *in vitro*.

Работа выполнена при поддержке РНФ, грант 21-65-00017.





АНАЛИЗ ВОЗМОЖНОЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ СВЯЗИ ГЕНОВ LOXHD1 И AGBL1 С ДИСТРОФИЕЙ ФУКСА

Цедилина Т.Р. , Скородумова Л.О., Антонова О.П., Малюгин Б.Э., Шарова Е.И.

Лаборатория молекулярной генетики человека

Дистрофия Фукса (FECF) - это наследственное заболевание глаз, характеризующееся потерей эндотелиальных клеток роговицы, ее последующим отеком и помутнением. Одним из наиболее специфических генетических маркеров FECF служит экспансия тринуклеотидного повтора в гене TCF4. Она обнаруживается у 50-65% пациентов. Причины патогенеза у пациентов без этой экспансии пытаются связывать в том числе с мутациями в генах LOXHD1 и AGBL1. Однако, их функциональная связь с FECF вызывает большие сомнения. Целью данной работы стал анализ возможного участия генов LOXHD1 и AGBL1 в развитии FECF. Задачами данной работы являются: анализ экспрессии LOXHD1 и AGBL1 в предшественниках эндотелия, самом эндотелии роговицы и тканях, где эти гены имеют доказанную функциональность; анализ несинонимичных вариантов в генах LOXHD1 и AGBL1 из литературных данных и последующий поиск носительства этих вариантов в доступных выборках с проверкой на наличие признаков FECF. Анализ экспрессии генов AGBL и LOXHD1 показал отсутствие их явной транскрипции в тканях эндотелия роговицы и в ее клетках-предшественниках. При этом экспрессия LOXHD1 в волосковых клетках улитки и экспрессия LOXHD1, AGBL1 в *Nucleus Accumbens* оказалась на среднем уровне. В результате анализа литературы было выявлено 30 вариантов, предположительно ассоциированных с FECF. Из них мы отобрали 7 редких вариантов, которые по частоте встречаемости потенциально могут быть ассоциированы с FECF и носители которых встречаются в генотипированных ранее локальных выборках. Нами было выявлено 2 носителя редких вариантов гена AGBL1 и 20 носителей редких вариантов гена LOXHD1. Из них у одной женщины подтвердилось наличие экспансии повторов в гене TCF4. Для остальных носителей и их родителей организуется офтальмологическая проверка симптомов FECF. На данный момент сделан вывод, что суммарная частота встречаемости редких вариантов в генах AGBL1 и LOXHD1 и отсутствие экспрессии в эндотелии роговицы и его предшественниках не подтверждают их возможную функциональную роль в развитии FECF. Прямая проверка наличия фенотипа у носителей в процессе завершения.



**РАЗРАБОТКА ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ЗОНДОВ И МОДИФИКАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ
МИКРОФЛЮИДНОГО ФОТОННО-КРИСТАЛЛИЧЕСКОГО БИОСЕНСОРА ДЛЯ ТИПИРОВАНИЯ
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

Ширшиков Ф.В.¹, Сизова С.В.², Шакуров Р.И.², Митько Т.В.³, Клинов Д.В.³, Басманов Д.В.²,
Беспярых Ю.А.¹

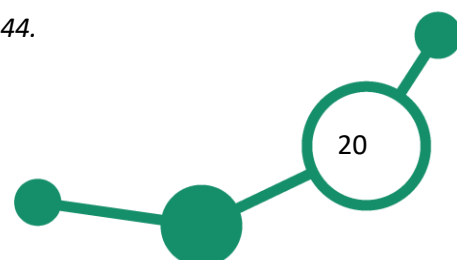
¹Лаборатория молекулярной медицины ЦММиД ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, ²Лаборатория
прикладных биомедицинских систем ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, ³Лаборатория медицинских
нанотехнологий ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Туберкулез представляет собой инфекционное заболевание человека, возбудителем которого являются бактерии нескольких вариантов вида *Mycobacterium tuberculosis* (МТБ). Актуальной задачей для мирового здравоохранения является быстрая диагностика МТБ, позволяющая не только идентифицировать возбудителя, но и определить потенциальный спектр его лекарственной устойчивости. Большие перспективы и возможности в этом направлении открывают оптические безмаркерные биосенсоры, обладающие высокой чувствительностью и широко применяемые для изучения кинетики связывания молекул-мишеней в реальном времени. Цель исследования заключалась в оптимизации структуры поверхности микрофлюидного безмаркерного биосенсора на поверхностных оптических волнах в одномерном фотонном кристалле (ОФК) и подборе зондов-мишеней для детекции МТБ.

Поверхность ОФК предварительно модифицировалась следующим образом: предварительная отмывка водой и этанолом, обработка низкотемпературной плазмой азота (Diener, Германия), функционализация раствором (3-аминопропил)триэтоксисилана и формирование покрытия из декстранов с различными молекулярными массами и функциональными группами. Сорбционная емкость модифицированной таким образом поверхности ОФК оценивалась по модельному белку — бычьему сывороточному альбумину (0.1 мг/мл), и олигонуклеотидам.

В ходе работы предложена оригинальная методика дизайна олигонуклеотидных зондов, показавшая свою применимость при детекции одноцепочечных ДНК-мишеней в водном растворе при комнатной температуре. Наиболее эффективным с точки зрения высокой сорбционной емкости и прироста сигнала связывания ДНК-мишеней оказалось покрытие фотонного кристалла слоем высокомолекулярного эпоксицированного декстрана молекулярной массой 500 кДа. Разработанная методика модификации поверхности перспективна для дальнейшего использования в диагностических тест-системах.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 20–75–10144.





СЕНСОРЫ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ pH В ЯДРЕ КЛЕТКИ НА ОСНОВЕ I-МОТИВОВ ДНК С АЛКИЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИЕЙ ОСТОВА

Шторк А.С., Петрунина Н.А., Лукина М.М., Ходорович Ю.М., Шендер В.О., Богомазова А.Н.,
Варижук А.М.

Лаборатория искусственного антителогенеза

Ранее в нашей лаборатории были разработаны и откалиброваны сенсоры, накапливающиеся в ядрах клеток и внутриклеточных биоконденсатах. С их помощью удалось детектировать нарушение гомеостаза pH в опухолевых клетках, но кинетические характеристики сенсоров и их рабочий диапазон не были оптимальны. Целью данной работы являлось получение химически модифицированных сенсоров с улучшенными характеристиками. В качестве модификации мы выбрали алкильный линкер в петлях i-мотива.

В работе были решены следующие задачи: 1) охарактеризованы кинетика и pH-зависимость модифицированных сенсоров при физиологических условиях и в условиях, имитирующих молекулярный краудинг; 2) установлено распределение сенсоров в клетках и выполнена их калибровка.

Анализ кинетики переходов показал увеличение скорости отклика сенсора после введения алкильной модификации, а также значительное замедление кинетики сенсоров в присутствии краудинг-агента. Рабочий диапазон сенсора был смещен относительно немодифицированного аналога и включал область значений pH 6.9 – 7.5. Присутствие краудинг-агента повышало pH перехода, что говорит о большей термодинамической стабильности i-мотивов в присутствии крупных ансамблей макромолекул, однако изменения носят незначительный характер. В клетках линий A549 и HEK293 сенсор концентрировался и распределялся в ядре с формированием фокусов, солокализованных с факторами сплайсинга. Калибровка на живых и фиксированных клетках после их инкубации с растворами заданного pH подтвердила функциональность модифицированного сенсора. Таким образом, на основе i-мотива с алкильной модификацией в петлях был получен сенсор с улучшенными характеристиками для определения pH в ядрах клеток.



ДЕТЕКЦИЯ КВАДРУПЛЕКСОВ (G4) В МОДЕЛИ НУКЛЕОСОМНОЙ ДНК

Юдин М.С., Павлова Ю.И., Новиков Р.А., Варижук А.М.

Лаборатория искусственного антителогенеза

Проблема связи между формированием квадруплексов (G4) и изменением структуры хроматина значима в рамках регуляции транскрипции. Для проверки снижения нуклеосомной плотности в G4-богатых фрагментах генома человека нами была получена *in vitro* модель нуклеосомы с G4-мотивом в линкерной ДНК. Было установлено, что на матрице с G4-мотивом доля нуклеосомы меньше. Качественными методами подтверждено наличие фолдированного квадруплекса в этом участке. Для точной интерпретации этих данных требовалась количественная оценка. Целью работы было определение доли сложенных G4 в модельных конструкциях методами спектроскопии кругового дихроизма (КД) и ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Было показано, что метод ^1H ЯМР-спектроскопии является оптимальным, поскольку позволяет надежно дискриминировать квадруплексные и дуплексные фрагменты по характерным сигналам иминовых протонов. Были получены спектры ДНК-конструкций с G4-мотивом, выполнена деконволюция этих спектров, т. е. их разложение на квадруплексную и дуплексную сигнатуры. Определено соотношение между интенсивностями дуплексных и квадруплексных сигналов. Доля фолдированных G4 в дуплексном окружении межнуклеосомной ДНК при физиологических условиях составляет порядка 20%. Данные ЯМР качественно подтверждаются результатами КД-спектроскопии. В дальнейшем планируется применять этот метод для количественной оценки стабилизирующей способности G4-лигандов – потенциальных терапевтических агентов.