

НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ
ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю. М. Лопухина ФМБА РОССИИ

СБОРНИК ТЕЗИСОВ

30 мая 2023,

www.rcpm.org

Москва, Малая Пироговская, 1а

ЮНОСТЬ

Исследование фармакокинетики выведения штаммов лактобацилл и бифидобактерий из организма мышей

Зорук П. Ю., Болдырева Д. И., Олехнович Е. И., Климина К. М.

*Лаборатория геномных исследований и вычислительной биологии
ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России*

Иммунологические подходы продемонстрировали высокую эффективность в борьбе с различными типами злокачественных опухолей. Однако у части пациентов не формируется ожидаемый положительный ответ на иммунотерапию. На основе проанализированных данных были выделены таксономические группы бактерий, связанные с положительным ответом на иммунотерапию рака, в частности бактерии рода *Bifidobacterium adolescentis*. В пилотном эксперименте на лабораторных мышах (самки, C57Bl/6) нами было проведено исследование фармакокинетики выведения штаммов лактобацилл и бифидобактерий из организма мышей.

Для проведения исследования были приготовлены лиофилизированные культуры штаммов *Lactobacillus rhamnosus K32* и *Bifidobacterium adolescent 150*. Были сформированы 3 группы по 12 мышей (контрольная группа; группа мышей, которые получали лактобациллы; группа мышей, которые получали бифидобактерии). Каждой мыши в экспериментальной группе ежедневно вводили при помощи стерильного одноразового желудочного зонда по 0,3 мл лиофилизированной культуры разведенной в фосфатно-солевом буфере (PBS), тогда как контрольная группа получала только PBS. Фекалии собирали до ввода бактериальной суспензии и на 5, 8, 12, 15, 19, 21, 25, 28 день эксперимента. Из фекалий выделяли ДНК и проводили секвенирование полной последовательности гена 16S рРНК с использованием технологии Oxford Nanopore. Для определения полного разнообразия секвенирование проводилось с 5-ю комбинациями различных праймеров. По результатам секвенирования и анализа данных обнаружено, что введение лактобацилл и бифидобактерий мышам изменяло бактериальный состав микробиоты мышей по сравнению с контролем. При этом комбинация различных праймеров на ген 16S рРНК существенно не влияла на бактериальное разнообразие внутри групп. Стоит отметить, что одна из комбинаций праймеров (8F-1492R) лучше всего определяла интересующий нас таксон *Bacteroides*. Также в образцах определяли наличие лактобацилл и бифидобактерий методом ПЦР. Показано, что лактобациллы сохраняются в организме в течение 2-х недель после их приема, а бифидобактерии выводятся на 4-ый день после их приема. Полученные результаты будут использованы для дальнейшего эксперимента по исследованию влияния анти-PD-1 и бактерий на меланому B16-F1 у мышей линии C57Bl/6.

**Протеомный анализ экссудатов операционных ран пациентов и их влияние
на пролиферативную активность дермальных фибробластов**

Арзумян Л. К., Арапиди Г. П., Шнайдер П. В., Колышев И. Ю.,

Говорун В. М., Шендер В. О.

*Лаборатория молекулярной онкологии
ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России*

Заживление ран представляет собой многоступенчатый сложный процесс, который затрагивает как иммунную систему организма, так и локальные ресурсы клетки. Большой вклад в процесс заживления раны вносят экссудаты, которые образуются в результате пропотевания плазмы через эндотелий сосудов окружающих тканей. Экссудаты содержат компоненты, которые у одних пациентов запускают сигнальные каскады, заживляющие раны, а у других, напротив, действуют на них деструктивно. Понимание того, почему некоторые раны неэффективно заживают, важно для улучшения восстановления пациентов после операций и разработки более эффективных методов лечения. В связи с этим, целью данного исследования являлось определить компоненты, которые связаны с заживлением ран пациентов. У 9 пациентов после масштабных полостных операций отбирали плазму и экссудаты в первые 3 дня после вмешательства. Активность экссудатов проверяли на первичной культуре дермальных фибробластов с помощью платформы Xcelligence. Все исследуемые экссудаты оказывали пролиферативную активность по сравнению с плазмой крови от этих же пациентов. Чтобы определить, какая фракция экссудатов обладает наибольшим эффектом, мы провели фракционирование экссудатов с использованием картриджей с отсечением по молекулярной массе 30 и 300 кДа. Эффектом обладала фракция экссудата больше 300 кДа, что указывает на то, что основной вклад в пролиферативный эффект вносят крупные белки и внеклеточные везикулы. Нагревание экссудата перед инкубацией приводит к исчезновению пролиферативной активности, что подтверждает гипотезу о том, что ключевую роль в процессе затягивания ран играют белки. Наш протеомный анализ показал, что в экссудатах по сравнению с плазмой крови преобладают белки, участвующие в сигнальных путях Wnt, Rho ГТФаз, а также регуляции сплайсинга. Данная работа позволила нам расширить знания о белковом составе экссудатов, что, в дальнейшем, может послужить источником прогностических маркеров ранозаживления или разработкой новых стратегий лечения.

Нетканые матрицы для локальной доставки ферментов и противоопухолевых препаратов

Бойченко О. П.^{1,2}, Якимова Т. М.², Москалец А. П.¹, Клячко Н. Л.², Клинов Д. В.¹

¹Лаборатория медицинских нанотехнологий
ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России,

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Ранее в нашей лаборатории методом электроформования были получены матрицы с протеолитическим ферментом лизоцимом, изучена кинетика его высвобождения из нановолокон и при этом показано сохранение его функциональной активности [1]. В данной работе нами изучена возможность внедрения в матрицы более сложных функциональных добавок: коллагеназы и комплекса меди с производными имидазолана. Первая может использоваться как в медицине (например, при лечении контрактуры Дюпюитрена или болезни Пейрони), так и в косметологии (для уменьшения видимости рубцовой ткани или восстановления кожи после процедуры лазерного пилинга). Вторая добавка – комплекс меди с 2-алкилтиоимидазолоном (Cu2Im) – является перспективной для лечения злокачественных опухолей [2]. Поэтому изучение возможности пролонгированной локальной доставки указанных функциональных добавок с помощью наноструктурированных матриц является актуальной научной задачей.

Матрицы с коллагеназой готовили методом электроспиннинга из общего раствора с полилактидом (PLA) в гексафторизопропанол (HFIP). Кинетику высвобождения определяли спектрофотометрически с помощью хромогенного субстрата N-Succ-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA. Константа Михаэлиса (KM) для фермента, высвободившегося из матрикса, оказалась близка к KM нативной коллагеназы. Однако наблюдалось снижение каталитической активности приблизительно на порядок, что может быть связано с денатурирующим действием HFIP.

Матрицы с комплексом Cu2Im (33 масс. %) были получены также методом электроформования из общего раствора полимера (PLA и PCL) в смеси HFIP с хлороформом. Высвобождение ионов меди определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии. Для PCL наблюдается практически 100% высвобождение в течение 24 ч., в то время как для PLA за указанное время выделяется всего 20% ионов меди. Показана высокая токсичность полученных матриц на культуре клеток меланомы B16.

[1] Павлова Е.Р. Изучение матриц из полиэфира и белка, полученных методом электроспиннинга. Дисс. ... канд. физ.-мат. наук. Москва, 2021 г. 124с.

[2] Krasnovskaya O.O. et al. Novel Copper-Containing Cytotoxic Agents Based on 2-Thioxoimidazolones // J. Med. Chem. 2020. Vol. 63, № 21. P. 13031–13063.

Конструирование scFv-антител, специфичных к RBD-домену Spike-белка вируса SARS-CoV2

Бровина К. А., Манувера В. А., Графская Е. Н.

*Лаборатория генной инженерии
ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России*

Моноклональные антитела 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 получить двуцепочечные минимоноклональные антитела без линкера и одноцепочечные минимоноклональные антитела со Strep-tag последовательностью в качестве линкера для исследования их свойств на примере антител, специфичных к RBD-домену Spike-белка вируса SARS-Cov2.

В ходе работы получены генетические конструкции, кодирующие одноцепочечные минимоноклональные антитела на основе описанных в литературе полноразмерных антител REGN10987 и SARS2-38, оценен уровень накопления рекомбинантных белков в *E.coli* и в клеточной линии HEK293, отработана методика выделения минимоноклональных антител из бактериальной культуры. Для получения scFv-антител без линкера два фрагмента ДНК, кодирующие переменные домены легкой и тяжелой цепи антитела, были объединены в бицистронный оперон в составе вектора на основе плазмиды серии pET. Аналогичным вектор использовался и для получения конструкции, кодирующей минимоноклональные антитела с последовательностью Strep-tag-(G3S)3-Strep-tag в качестве линкера. 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 путем диализа. Кроме того, были собраны две генетические конструкции на основе вектора pcDNA для получения scFv с последовательностью Strep-tag-(G3S)3-Strep-tag в качестве линкера в клетках человека. Оценка их функциональности будет проверена с использованием иммуноферментного анализа (ИФА); для минимоноклональных антител, линкер которых содержит StrepTag, будет проведена дополнительная оценка с применением белка стрептавидина.

Внутриклеточная стабильность рН-сенсоров на основе i-мотивов ДНК

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

*Лаборатория структуры и функций биополимеров
ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России*

Ранее в нашей лаборатории были разработаны сенсоры для внутриклеточного рН-имиджинга на основе меченных остатками флуорофоров i-мотивов ДНК. Их эффективность была показана на двух клеточных линиях – А549 и НЕК-293. **Целью данной работы** являлось исследование устойчивости рН-сенсоров к действию нуклеаз. В работе были решены следующие задачи: 1) охарактеризована динамика распределения сенсоров в клетке; 2) оценен вклад отдельных структурных элементов в устойчивость сенсоров к ферментативному гидролизу, определяющему их внутриклеточное перераспределение.

Сенсоры способны диффузно распределяться в ядре и накапливаться во внутриядерных и внеядерных гранулах. Ранее мы установили методом иммуоцитохимии, что внутриядерные гранулы представляют собой обогащенные факторами сплайсинга спеклы. Применение сенсоров для исследования механизмов патогенеза, ассоциированных с рН-зависимым нарушением сплайсинга вследствие изменения морфологии спеклов, потребовало предварительной оценки их устойчивости и учета возможного изменения локализации. Анализ данных флуоресцентной микроскопии показал, что распределение сенсоров не меняется в течение 12-24 часов после трансфекции, а на второй и третий день наблюдается увеличение количества визуализируемых внеядерных гранул, которые, предположительно, являются лизосомами с продуктами деградации сенсора.

Для установления ключевых структурных элементов, определяющих стабильность сенсоров в ядрах клеток, были синтезированы контрольные последовательности. Они представляют собой аналоги/фрагменты сенсоров и были получены одним из следующих путей: а) удалением одной концевой метки; б) заменой i-мотив-формирующего остова на олиготимидиновую последовательность. Было показано, данные контрольные последовательности не наблюдаются в ядре и ядерных спеклах через 12 часов после трансфекции, что указывает на их быстрое расщепление нуклеазами. Для проверки этого тезиса анализировали электрофоретическим методом скорость гидролиза сенсоров и контрольных последовательностей эндо- и экзонуклеазами в бесклеточной системе.

Результаты подтвердили, что остов i-мотива защищает сенсор от деградации эндонуклеазами, а концевые метки – от действия экзонуклеаз. В совокупности эти эффекты обеспечивают достаточную внутриклеточную стабильность сенсора в течение суток после трансфекции.

Разработка протокола исследования клонотипов репертуара Т-клеточных рецепторов у пациентов с болезнью Крона

Сикамов К. В.^{1,2}, Горбачев А. Ю.¹

¹*Лаборатория протеомного анализа
ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России*

²*Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)*

ВВЕДЕНИЕ. Болезнь Крона (БК) – это рецидивирующее хроническое идиопатическое заболевание, которое обуславливается воспалительными процессами слизистой оболочки кишечника. Было показано, что среди всех вариантов Т-клеток у пациентов с болезнью Крона, можно выделить особую группу клонотипов, то есть Т-клеток – обладающих специфической последовательностью нуклеотидов в генах Т-клеточных рецепторов (TCR), а именно CDR3 региона последовательности мРНК, – ответственных за аутоиммунную составляющую болезни Крона.

ВЫБОРКА ПАЦИЕНТОВ. Основные критерии включения пациентов в исследование – это диагностированная БК в стадии первичного или рецидивирующего обострения. Диагноз БК устанавливается по данным дифференциальной эндоскопической, клинической и гистологической диагностик. Пол, возраст, раса, терапевтические условия и сопутствующие заболевания не учитываются в качестве критериев исключения. Здоровые пациенты и пациенты с неспецифическим язвенным колитом (НЯК) исследуются в рамках контрольной группы. Образцы крови собираются с периодичностью раз в 3-4 недели с момента обращения в острой фазе.

TCR СЕКВЕНИРОВАНИЕ. Для исследования клонотипов Т-клеток в образцах периферической крови пациентов с БК была разработана панель для целевого обогащения кДНК последовательностями генов Т-клеточных рецепторов для технологии секвенирования MGISEQ. Процесс приготовления кДНК библиотеки начинается с разделением центрифугированием в градиенте плотности (Фиколл, “ПанЭко”) мононуклеарных клеток (включающих лимфоциты), из которых выделяется РНК при помощи тризольного метода (ExtractRNA, “Евроген”). Далее, подготовленные образцы РНК, используются в качестве матрицы для синтеза кДНК во время обратной транскрипции. Затем, используется Template Switch Oligos (TSO) – последовательность олигонуклеотидов, которая гибридизуются с дезоксинуклеотидами, добавленными вне матрицы РНК в силу особенности Mint-ревертазы (“Евроген”), а именно ее способности после завершения синтеза молекулы кДНК, нематрично присоединять к ее 3'-концу от 3 до 5 цитозинов. На завершительных стадиях вводятся технические последовательности

олигонуклеотидов – адаптеры, для секвенирования образцов на платформе MGISEQ-2000 – при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР), осуществляемой Tersus ДНК-полимеразой (“Евроген”), с *in silico* подобранными олигонуклеотидами на основе известных последовательностей не варьибельных доменов TCR генов. Итоговые библиотеки секвенируются на платформе MGISEQ-2000 с использованием PE-150 химических реагентов.

БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДАННЫХ. Полученные данные секвенирования изначально подвергаются препроцессингу Trimmomatic с контролем качества FastQC. После чего, для выравнивания и сборки последовательностей TCR, используется программа MiXCR (“MiLaboratories”). На финальных стадиях собранные транскрипты анализируются статистическими методами и визуализируются при помощи языка программирования R и встроенных в него пакетов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Таким образом, данный протокол позволяет получать и анализировать данные секвенирования репертуаров T-клеточных рецепторов, с целью поиска изменяющихся во времени (предположительно превалирующих в стадии обострения) последовательностей CDR3 региона, ассоциированных с БК для последующего поиска персонализированной терапевтической мишени.

Поиск новых проникающих пептидов методами машинного обучения

Серебренникова М. Ю., Графская Е. Н., Лацис И. А., Лазарев В. Н.

*Лаборатория генной инженерии
ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России*

С развитием медицины и фармакологии все более актуальной задачей становится разработка систем внутриклеточной доставки низкомолекулярных лекарственных веществ и биологически активных молекул, используемых в терапии различных заболеваний, включая лечение рака. Универсальность и эффективность проникающих пептидов (ПП) делает их перспективными агентами для создания новых терапевтических подходов для транспортировки средств широкого спектра.

К сожалению, на настоящий момент не существует глобального способа поиска новых последовательностей ПП, не требующего чрезмерных денежных или временных затрат. Поэтому наибольший интерес представляют работы, сфокусированные на использовании *in silico* методов. В настоящем исследовании с помощью разработанного на основе методов машинного обучения прогностического алгоритма идентифицирована новая последовательность ПП.

В рамках разработки алгоритма собрана выборка из 2536 молекул известных на данный момент ПП и не-ПП, не содержащих неприродных аминокислотных остатков и синтетических модификаций, длиной от 5 до 61 аа. Далее для каждого из этих пептидов определены молекулярные дескрипторы, и с помощью методов уменьшения размерности отобраны 20 численных параметров, наиболее полно характеризующих различия между классами ПП и не-ПП. На следующем этапе с помощью кросс-валидации найдены оптимальные значения входящих гиперпараметров для пяти выбранных моделей. По результатам оценки качества итоговый прогностический алгоритм представлен тремя лучшими моделями: на основе *k*-ближайших соседей, градиентного бустинга и случайного леса.

С помощью алгоритма осуществлен поиск новых ПП на независимом тестовом наборе данных и сформирован перечень из семи кандидатных пептидов. Последующая оценка структурно-функциональных свойств синтезированных пептидов продемонстрировала, что ни один из них не проявляет цитотоксической активности, а предпочтительной формой является образование α -спиралей или нерегулярных вторичных структур. В заключение, с использованием конфокальной микроскопии было показано, что один из меченых отобранных пептидов способен транслоцироваться в клетки мышечных фибробластов.

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 23-15-00084).

Молекулярно-генетическая характеристика индуцированных опухолей толстой кишки как модели колоректального рака у мышей линии BALB/CJ.

Латыпова Д. К.¹, Каныгина А. В.¹, Шарова Е. И.¹, Петрова Т. В.¹, Лазарев В. Н.².

¹*Лаборатория молекулярной генетики человека,*

²*Лаборатория генной инженерии ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России*

Химически индуцированная AOM/DSS животная модель колоректального рака часто используется для изучения данного заболевания. Молекулярно-генетическая характеристика данной модели необходима для понимания ее схожести с канцерогенезом человека и применимости в том числе в изучении эффективности некоторых иммунотерапевтических агентов.

Нами были секвенированы библиотеки тотальной РНК 7 образцов опухолей, 3 образцов смежной ткани кишечника без опухолевых изменений и 3 образцов ткани кишечника мышей линии BALB/CJ контрольной группы. Идентификация соматических мутаций производилась утилитой Mutect2, анализ экспрессии генов проводили пакетом edgeR.

Суммарно во всех опухолевых образцах в 972 генах идентифицировано 1848 соматических мутаций, затрагивающих аминокислотную последовательность белка, большую часть которых (90 %) составляли однонуклеотидные замены. Также были проанализированы мутации в драйверных генах, наиболее часто мутированным (как и в трех внешних сетях) оказался ген *Cttnb1*.

Анализ экспрессионного профиля выявил 700 генов, экспрессия которых значимо изменилась между контрольной группой и опухолевыми образцами (FDR=0,05, logFC=2). Изучение обогащения метаболических путей показало значимые изменения прежде всего в сигнальном Wnt пути. Из 10 групп внеклеточных лигандов, регулирующих путь, 4 группы (*Wif-1*, *Dkk*, *Notum*, *Wnt*) имеют повышенный уровень экспрессии. Из 7 групп рецепторов для внеклеточных лигандов 6 имеют повышенную экспрессию. Учитывая, что *Cttnb1* был мутирован во всех опухолевых образцах, можно предположить, что данный ген отвечает за начальный этап развития опухоли. Схожее поведение Wnt/ β -катенинового пути наблюдалось при анализе внешнего датасета Guo et. al 2018, полученного от аналогичной модели на другой линии мышей (C57BL/6).

Анализ экспрессии генов контрольных точек иммунного ответа показал, что представленная модель может использоваться для проверки ингибиторов белков *Vtn1*, *Nectin4*, *Lif*, так как только их экспрессия дифференциально отличалась и в группе опухоль/контроль, и в группе опухоль\прилегающая ткань кишки. Также нами показано, что данная модель не применима для ингибиторов PD-L1, PD1, CTLA-4.

**Разработка метода машинного обучения для анализа структурных и
однонуклеотидных вариантов генома на основе технологии полногеномного
секвенирования с низким покрытием.**

Бабанина М. В., Кулемин Н. А., Горбачев А. Ю.

Лаборатория протеомного анализа ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

Методы диагностики посредством анализа циркулирующей свободной ДНК стремительно набирают популярность из-за своей малой инвазивности и небольшого периода полураспада молекул, что позволяет получать клиническую картину в реальном времени.

Целью данной работы стала разработка метода машинного обучения, позволяющего на основе анализа данных полногеномного секвенирования плазмы крови с низким покрытием диагностировать рак груди на ранних стадиях.

На данный момент был разработан дизайн исследования, включающий определение критериев отбора испытуемых и минимального размера выборки. На основе анализа литературы был выбран перспективный для данной задачи метод машинного обучения (Random Forest). Выбранный метод был отработан на открытых данных, были получены результаты, сходные с результатами, опубликованными в литературе. В ближайшем будущем планируется произвести отработку методики выделения внеклеточной ДНК из плазмы крови и получения геномных библиотек из свободно циркулирующей ДНК без изменения представленности фрагментов на данных «ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России», произвести секвенирование и первичную обработку данных. Ожидается, что разработанная модель хорошо покажет себя как инструмент для диагностики рака груди на ранних стадиях.

Определение вариантов генов цитохромов P450 для анализа метаболизма препаратов, применяемых в психиатрии

Эсибов А. А., Кулемин Н. А., Горбачев А. Ю.

Лаборатория протеомного анализа ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

Фармакогенетические различия между индивидами могут существенно влиять на эффективность и безопасность лекарственных средств. Проявления этих различий включают изменения в скорости метаболизма, чувствительности к препаратам и вариабельности ответа на терапию. Около 50% пациентов нуждаются в коррекции дозировки, основанной на фенотипе активности цитохромов. Следовательно, при назначении лекарственных препаратов врачи должны учитывать фармакогенетические характеристики каждого пациента для достижения оптимального результата лечения и минимизации рисков побочных эффектов.

Основными ферментами, участвующими в метаболизме лекарственных средств, являются цитохромы семейства P450. В данном исследовании было проанализировано 9 ключевых цитохромов, которые участвуют в инактивации более 90% всех известных препаратов, на основе образцов из базы данных IKGР и собственной базы данных с использованием различных программ для генотипирования. Были исследованы данные полногеномного и полноэкзомного секвенирования, а также предложен алгоритм анализа смешанных данных, содержащих экзоны и полногеномные сиквенсы с низким покрытием, а также только данные полноэкзомного секвенирования.

Целью данного доклада является освещение фармакогенетических особенностей активности системы цитохромов P450, а также алгоритм определения вариантов генов цитохромов на данных секвенирования следующего поколения. Выводы о результативности предложенного алгоритма анализа смешанных данных и данных полноэкзомного секвенирования были сделаны на основе использования различных наборов для подготовки библиотек.

Разработка микросубстратов, состоящих из нановолокон, для эффективного культивирования клеток

Кулиева М.А., Богданова А.С., Бойченко О.П., Москалец А.П., Клинов Д.В.

*Лаборатория медицинских нанотехнологий
ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России,
Лаборатория функциональных биоматериалов МФТИ Физтех*

За последние несколько лет достигнут значительный прогресс в разработке методов клеточной терапии, а также улучшенных подходов к регенерации поврежденных тканей. В этих областях существует необходимость эффективной генерации большого количества клеток в ограниченном пространстве и при ограниченных ресурсах [1]. Основная проблема в количественном увеличении выращенной культуры связана с адгезивными клетками, которым необходимо прикрепляться к поверхности, чтобы оставаться жизнеспособными и размножаться [2].

В данной работе были разработаны микросубстраты из нановолокон для последующего культивирования на них клеточной культуры. Преимуществом таких микросубстратов является увеличение доступной для прикрепления клеток площади поверхности за счет использования 3D-микросубстратов из нановолокон. При этом для культивирования клеток требуется меньшее количество питательной среды. Также этот метод предоставляет возможность доставки клеточной культуры в прикрепленном виде к поврежденным участкам для применения в клеточной терапии.

В результате проведенной работы методом электроспиннинга были получены нановолоконные матриксы из раствора смеси полилактида (ПЛА) (REC, Россия) и желатина (Sigma-Aldrich, США) в гексафторизопропанол (HFIP) (P&M Invest, Россия) (ПЛА: желатин = 7:3, 100 мг/мл). Морфология полученных матриксов была исследована с помощью микроскопа Zeiss Merlin, оснащенного электронной оптикой Gemini II (Zeiss, Germany). Волокна имеют цилиндрическую структуру, гладкую поверхность и средний диаметр: $d=(0,34\pm 0,07)$ мкм. Микросубстраты квадратной формы и размером 300×300 мкм были изготовлены из ранее полученного матрикса с помощью лазерной гравировальной машины LaserPro Spirit GLS (GSS, Тайвань), оснащенной инфракрасным CO₂ лазером мощностью 100 Вт. Был произведен подбор оптимальных параметров лазерной резки для устранения эффекта плавления матрикса на границах микросубстратов. Морфология микросубстратов также была исследована с помощью СЭМ.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (госзадание) № 075-03-2023-106, номер проекта FSMG-2023-0015.

Литература

1. Bellani C.F. et al. Scale-Up Technologies for the Manufacture of Adherent Cells // *Frontiers in Nutrition*. Frontiers Media S.A., 2020. Vol. 7. 2. Derakhti S. et al. Attachment and detachment strategies in microcarrier-based cell culture technology: A comprehensive review // *Materials Science and Engineering C*. Elsevier Ltd, 2019. Vol. 103.

Отработка метода приготовления библиотек для РНК-секвенирования

Ли А.В., Горбачев А.Ю.

Лаборатория протеомного анализа
ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

РНК-секвенирование – это широко используемый подход к профилированию транскриптома, в котором используются технологии глубокого секвенирования. Как правило, популяция РНК преобразуется в библиотеку фрагментов кДНК с адаптерами, лигированными к одному или обоим концам. Фрагменты затем секвенируют, либо с одного конца, либо с обоих концов, в результате чего генерируются короткие прочтения, меченые с обоих концов. Поскольку простое секвенирование тотальной РНК неэффективно, ввиду того, что большинство прочтений будет отображать рРНК или тРНК, также необходимо проводить нормализацию кДНК, то есть повышать обнаружение более редких транскриптов мРНК.

Для получения достоверных результатов секвенирования необходимо использовать РНК высокого качества, поэтому в первую очередь важно подобрать метод выделения нуклеиновых кислот. Классические методы выделения нуклеиновых кислот включают в себя лизис биологического материала специальными реагентами или механическим путем. Широко используемым реагентом для выделения РНК является TRIzol™. Однако он работает для *E. coli* только при нагревании суспензии клеток и TRIzol™. Имеющиеся коммерческие наборы для выделения РНК требуют предварительной гомогенизации, что увеличивает вероятность деградации нуклеиновых кислот, к тому же при выделении на колонках происходит потеря части образца. Существуют и другие методы выделения РНК. Так, нами был выбран протокол для выделения РНК из клеток *E. coli* путем нагревания клеток в смеси 98% формамида и 10 мМ ЭДТА. Аналогичное использование формамида было описано ранее в методе выделения РНК для дрожжей [1].

Поскольку существуют различные методы лигирования адаптеров к фрагментам кДНК, дальнейшая задача заключается в подборе оптимальной методики с учетом преимуществ и недостатков. На данный момент нами были проверены несколько методов лигирования адаптеров, среди них одностадийный способ, при котором адаптеры одновременно присоединяются к двум концам кДНК. Другой способ заключается в пошаговом лигировании каждого из адаптеров к фрагментам кДНК. В каждом из методов используется доступная T4 ДНК лигаза, однако первый способ имеет преимущество в длительности протокола.

Таким образом, каждый этап в приготовлении библиотек фрагментов кДНК для дальнейшего РНК-секвенирования является важным и требует тщательной проработки и оптимизации.

Литература: Shedlovskiy D, Shcherbik N, Pestov DG. One-step hot formamide extraction of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. RNA Biol. 2017 Dec 2;14(12):1722-1726. doi: 10.1080/15476286.2017.1345417.

Поиск универсальных метагеномных маркеров микробиоты кишечника ассоциированных с ответом на иммунотерапию различных видов рака

Канаева В. А., Олехнович Е.И.

*Лаборатория геномных исследований и вычислительной биологии
ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России*

Известно, что микробиота желудочно-кишечного тракта влияет на развитие и функцию врожденного и адаптивного иммунитета. Было показано, что состав микробиоты пациентов также связан с противоопухолевым иммунитетом и эффективностью иммунотерапии. Целью нашей работы является проверка гипотезы о универсальности механизма влияния микробиоты кишечника на исход иммунотерапии независимо от типа рака. Для исследования из базы NCBI было загружено 130 образцов кишечной микробиоты больных раком: гепатоцеллюлярной карциномой, раком различных частей ЖКТ (толстой и прямой кишки, поджелудочной железы), раком легких, предстательной железы и яичников. Для всех образцов был проведен контроль и фильтрация человеческой ДНК. После проведения процедуры таксономической аннотации и статистической обработки было выявлено 18 бактерий, различающие экспериментальные группы пациентов с разным исходом иммунотерапии независимо от типа рака более чем в двух наборах данных. Воспроизводимыми биомаркерами, связанными с отсутствием ответа на иммунотерапию, в большинстве наборов данных были *E. coli* и *Bacteroides plebeius*, тогда как *Akkermansia muciniphila* была биомаркером позитивного исхода лечения. Таким образом, полученные данные могут свидетельствовать о существовании универсального механизма вовлеченности микробиоты кишечника в ответ на иммунотерапию различных видов рака.

Комбинированное воздействие бактериофага vB_SauM-515A1 и антибиотиков на клинические изоляты *Staphylococcus aureus*

Абдраймова Н. К., Корниенко М. А., Беспярых Д. А., Городничев Р. Б., Шитиков Е. А.

*Лаборатория молекулярной генетики микроорганизмов
ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России*

Распространение антибиотикоустойчивости среди штаммов *Staphylococcus aureus* является глобальной проблемой современного здравоохранения. Для ее решения рассматривается альтернатива классической терапии – комбинированное использование литических бактериофагов и антибиотиков.

Цель данной работы заключалась в оценке эффекта комбинированного воздействия литического бактериофага семейства *Herelleviridae* и антибиотиков различных классов на клинические изоляты *S. aureus* с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ).

В ходе исследования были использованы клинические изоляты *S. aureus* (n=16), литический бактериофаг vB_SauM-515A1 и антибиотики различных классов (оксациллин, ванкомицин, гентамицин, тетрациклин, левофлоксацин, линезолид). Штаммы были охарактеризованы по сиквенс-типам, профилю лекарственной устойчивости и чувствительности к бактериофагу. Определение оптимальных значений множественности инфекции (МОИ) проводили на основании кривых роста бактериальных клеток, инфицированных бактериофагом. Оценку совместного применения фага и субингибирующих концентраций антибиотика осуществляли в ходе анализа кривых роста штаммов. Для наиболее эффективных комбинаций были проведены эксперименты по изучению кривых единичного цикла роста фага.

Большинство штаммов (62,5%) характеризовалось МЛУ и относилось к клинически значимым сиквенс-типам. Бактериофаг vB_SauM-515A1 эффективно лизировал 81,25% штаммов коллекции. Четыре штамма с МЛУ были выбраны для изучения комбинированного воздействия двух агентов. Совместное использование фага в оптимальных значениях МОИ с субингибирующими концентрациями тетрациклина и линезолида приводило к повышению антибактериальной активности против двух штаммов. Снижения эффективности действия комбинаций фага и антибиотиков во всех исследуемых случаях не наблюдалось. Линезолид оказывал небольшое ингибирующее влияние на кривую единичного цикла роста бактериофага.

Таким образом, бактериофаг vB_SauM-515A1 является перспективным добавочным терапевтическим агентом против штаммов золотистого стафилококка с МЛУ.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-00443, <https://rscf.ru/project/22-15-00443/>.

Получение и анализ биосовместимости

гибридных микросфер ватерита с полисахаридами

Мальцева Л. Н.^{1,2}, Балабушевич Н. Г.^{1,2}, Михальчик Е. В.¹

¹Лаборатория физико-химических методов исследования и анализа
ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический
факультет, Москва, Россия

Ватерит – одна из биосовместимых и биоразлагаемых кристаллических полиморфных модификаций карбоната кальция со сферической поверхностью и развитой внутренней структурой, перспективная для направленной доставки биологически активных веществ. Термодинамическую нестабильность ватерита можно компенсировать соосаждением биополимеров с получением гибридных микросфер (ГМС) с новыми свойствами. Важным этапом при разработке средств доставки на основе ГМС является исследование взаимодействия частиц с белками и живыми клетками. Цель работы – исследование ГМС ватерита с природными полисахаридами и их биосовместимости в моделях *in vitro*. Контрольные микросферы ватерита (СС) и ГМС с соосажденными декстрансульфатом (ССДС), хондроитинсульфатом А (ССХС), гепарином (ССГ), фукоиданом (ССФ) и пектином (ССП) получали методом спонтанной кристаллизации. Частицы анализировали с помощью динамического лазерного светорассеяния, методом низкотемпературной адсорбции-десорбции азота, СЭМ и рентгенофазового анализа. Оценивали сорбцию на ГМС альбумина, муцина и каталазы. Для сорбированной каталазы измеряли кинетические параметры по разложению H₂O₂. По сравнению с контрольными СС, ГМС имели отрицательный поверхностный заряд и большую площадь поверхности (кроме ССДС), а также меньший размер пор (кроме ССХС). Наибольшую сорбцию альбумина и муцина показали СС и ССХС. Для сорбированной каталазы кинетические параметры были меньше, чем у нативного фермента. Максимальный гемолиз вызывали ССХС, наибольшую активацию нейтрофилов – ССФ, выраженное повреждение мембран клеток аденокарциномы (НТ-29) – ССДС (по данным теста на ЛДГ и по оценке АТФ во внеклеточной среде). Результаты работы свидетельствуют о перспективности применения полисахаридов для получения средств доставки на основе гибридных микросфер ватерита с заданными свойствами, включая их биологическую активность.

Работа поддержана РФФ, грант 23-45-10026.

Сравнение методов анализа данных секвенирования РНК

одинокных клеток в клеточных линиях

Казакова А. Н., Ануфриева К. С., Арапиди Г. П.

Лаборатория системной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА

Для исследования различий в экспрессии генов между клеточными популяциями или тканями используется метод секвенирования РНК. Классический подход - секвенирование РНК всей клеточной массы (bulk RNA-seq), который подразумевает анализ средней экспрессии генов в каждой популяции клеток. С развитием технологий секвенирования появился совершенно новый метод анализа клеток (single-cell RNA-seq), который позволяет изучать экспрессию генов в каждой отдельной клетке образца ткани. Основной проблемой single-cell RNA-seq является низкое количество транскриптов в каждой отдельной клетке, что ограничивает применение стандартных статистических методов, используемых в bulk RNA-seq. В настоящее время появляется все больше специализированных статистических методов, направленных на решение этой проблемы. Однако все еще не существует единого мнения относительно того, какие методы позволяют достичь наиболее точных биологических результатов при идентификации дифференциально экспрессируемых генов. В отличие от bulk RNA-seq, результаты single-cell RNA-seq не демонстрируют такую же высокую степень воспроизводимости от эксперимента к эксперименту и не всегда подтверждаются ПЦР.

Сравнение различных подходов нормализации и анализа дифференциальной экспрессии генов по данным single-cell RNA-seq является сложной задачей из-за неопределенности относительно точного количества различного типа клеток в исследуемых тканях. Мы предположили, что надежное сравнение производительности различных методов можно получить при анализе гомогенной популяции клеток в двух состояниях. Мы собрали 3 набора данных, каждый из которых включает образцы single-cell RNA-seq клеточной линии без воздействия химического вещества и после воздействия. В рамках исследования мы сравнили 9 методов нормализации и 8 методов анализа дифференциальной экспрессии генов между двумя популяциями клеток для каждого набора данных. Результаты показали, что методы Scran, LogNormalize и SCTransform демонстрируют наилучшие результаты для разделения клеток в соответствии с воздействием химического вещества. Неожиданно, но применение регрессии данных, основанной на уровне экспрессии митохондриальных генов и генов, связанных с клеточным циклом, которое широко используется во многих исследованиях, привело к существенному ухудшению качества кластеризации.

Чтобы оценить, насколько точно различные методы сравнения экспрессии генов в двух группах клеток на основе данных single-cell RNA-seq отражают биологические различия, мы использовали данные bulk RNA-seq для тех же клеток в качестве золотого стандарта. Использование метода pseudobulk, основанного на суммировании всех прочтений клеток одного типа, показало наиболее сопоставимые результаты с анализом данных bulk RNA-seq. Однако даже использование этого метода выявило большое количество ложных дифференциально экспрессируемых генов. Мы показали, что для single-cell RNA-seq данных наиболее достоверные результаты при сравнении экспрессии генов в двух группах клеток наблюдаются для генов, которые выражены по-разному в двух популяциях на уровне процента клеток с ненулевой экспрессией этих генов.

Работа поддержана грантом РФФ 22-75-00103.

Оценка профиля летучих соединений в модели DSS индуцированного колита в фазах острого воспаления и ремиссии

Шагалеева О. Ю.¹, Кардонский Д. А.¹, Иванов В. А.², Данилова Е. Ю.³, Конанов Д. Н.⁴,
Свиридова Д. А.¹, Силантьев А. С.¹, Филатова Ю. В.¹, Зоркина Я. А.⁵, Абрамова О. В.⁵,
Зубков Е. А.⁵, Морозова А. Ю.⁵, Захаржевская Н. Б.¹

¹Лаборатория молекулярной патофизиологии,

²Центр молекулярной медицины и диагностики

ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

³Кафедра аналитической химии, химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

⁴Лаборатория математической биологии и биоинформатики

НИИ СБМ Роспотребнадзора

⁵Лаборатория экспериментальной нейробиологии ФГБУ НМИЦ ПН им.В.П. Сербского

Введение: DSS (Dextran sulfate sodium) модель индуцированного колита относительно проста и воспроизводима. Известно, что DSS снижает уровень муцина и увеличивает проницаемость толстой кишки, одновременно изменяет резидентную микробиоту, следовательно меняя метаболитный профиль летучих органических соединений (ЛОС). В данном исследовании была реализована DSS модель на крысах с последующей оценкой развития воспаления и процессов естественного восстановления с помощью гистологических и молекулярных методов.

Материалы и методы: Исследование проводилось на самках крыс линии Wistar, возрастом 7-8 недель, разделенные на три группы: DSS7 (n=5), DSS14 (n=5), К (n=10). Группа К получала только питьевую воду. Группы DSS7 и DSS14 получали 4,5% водный раствор DSS (Dextran sulfate sodium salt, Mr ~40,000, Alfa Aesar) 7 дней. На 7-ой день крыс из группы DSS7 выводили из эксперимента. Группа DSS14 с 8 по 14 дни получала питьевую воду. На 14 день крыс группы К и DSS14 выводили из эксперимента. Образцы кала брали через каждые 3-4 дня для детекции ЛОС с помощью ГХ-МС с парофазным способом экстракции. Статистическую обработку данных производили в MetaboAnalyst 5.0. Для гистологической оценки образцы толстой кишки окрашивали гематоксилином и эозином.

Результаты: На 5-7 сутки в группах DSS7 и DSS14 наблюдались диарея и диарея с примесью крови, снижение массы и двигательной активности. На 12-14 сутки в группе DSS14 животные восстановились, стул был оформленным. При гистологическом анализе в группе DSS7 выявлены участки изъязвления с выраженной клеточной инфильтрацией. В группе DSS14 зоны изъязвления были менее выраженными. Согласно метаболомным данным, соотношение ЛОС отличалось во всех группах. Однако в группе DSS14 изменения в метаболомном профиле ЛОС прогрессировали и после прекращения введения DSS.

Выводы: DSS модель индуцированного колита показала изменения как на тканевом уровне, так и на уровне метаболитов, в момент обострения и ремиссии воспалительных процессов.

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

Конструирование штамма *Escherichia coli* с пониженным содержанием эндотоксинов при помощи геномного редактирования

Кириллин С. А., Бобровский П. А., Харламбиева Д. Д., Манувера В. А.

Лаборатория генной инженерии ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

Липополисахариды (ЛПС) являются основным компонентом внешней мембраны грамотрицательных бактерий. Наличие ЛПС в препаратах медицинского значения не допускается. Существующие на данный момент методы очистки растворов от ЛПС представляют определённые трудности и поиск альтернативного метода избавления от ЛПС является актуальной задачей.

Цель данной работы — создание генно-модифицированного штамма *E. coli* Rosetta 2(DE3) с нокаутом нескольких генов, ответственных за начальный этап биосинтеза ЛПС.

Задачи. 1) Определить гены-мишени для редактирования в выбранном штамме *E. coli*. 2) Последовательно провести нокауты выбранных генов-мишеней с помощью системы редактирования генома CRISPR-Cas9. 3) Оценить количество эндотоксинов в препаратах модельного рекомбинантного белка, полученного с использованием промежуточных и конечного мутантных штаммов.

Были сконструированы векторы с донорной ДНК, гомологичной целевым локусам генома. Успешность редактирования целевых локусов подтверждалась секвенированием по Сэнгеру. В мутантном и исходном штаммах был наработан рекомбинантный GFP (по три биологических повторности) и далее очищен при помощи металл-хелатной хроматографии. Содержание эндотоксинов в образцах очищенного GFP и лизатов клеток оценивалось качественным методом гель-тромб теста (разновидность ЛАЛ-теста). При этом анализировались серии двукратных разведений белка/лизатов клеток.

Выводы. 1) Собраны плазмидные векторы серии pTarget, предназначенные для CRISPR-Cas9-опосредованного геномного редактирования генов *kdsD*, *gutQ*, *lpxL*, *lpxM*, *lpxP*, *pagP*, *eptA*. 2) На основе *E. coli* Rosetta 2(DE3) получены промежуточные и конечный нокаутные по генам-мишеням штаммы. 3) По результатам гель-тромб теста содержание эндотоксинов снижено в четыре раза в препаратах рекомбинантного GFP и в восемь раз в лизатах клеток мутантного штамма относительно исходного.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00080, <https://rscf.ru/project/23-24-00080/>.

**Сравнительная характеристика трёхмерных моделей хрящевой ткани
на основе первичных культур хондроцитов человека
или дифференцированных хондрогенных производных из ИПСК**

Пикина А. С., Ручко Е. С., Еремеев А. В.

Лаборатория клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

Восстановление структуры гиалинового хряща является сложной задачей в связи со слабым регенеративным потенциалом хрящевой ткани. Одним из возможных путей решения этой проблемы может быть использование человеческих индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), обладающих неограниченным пролиферативным потенциалом и способностью к дифференцировке во всех типы клеток. Однако современные протоколы дифференцировки ИПСК в клетки, подобные хондроцитам, являются несовершенными, что ведет к необходимости их оптимизации, оценке эффективности и возможности к масштабированию.

В данной работе с помощью разработанного ранее метода получения органоидов мозга с помощью микролуночных планшетов AggreWellTM и минибиореакторов собственного изготовления были получены тканеинженерные 3D-модели на основе культур хондроцитоподобных производных из ИПСК и первичных культур хондроцитов. Для дифференцировки ИПСК использовали 4 протокола: «короткий» протокол, основанный на применении малых молекул вместо рекомбинантных факторов дифференцировки (Kawata et al., 2019); «длинный» протокол, включающий промежуточный этап дифференцировки в МСК-подобные клетки (Yamashita et al., 2015); «комбинированный» вариант двух вышеприведенных протоколов и протокол с применением среды, кондиционированной зрелыми хондроцитами человека.

Проведенная оценка полученных культур путем анализа экспрессии хондрогенных маркеров (агрекан, коллаген I и II типов, SOX9) методами RT-qPCR и ИЦХ, показала сходство по уровню экспрессии хондроцитоподобных производных ИПСК с культурой, полученной из донорской хрящевой ткани. Также показана возможность получения 3D структур – сфероидов с более высоким уровнем экспрессии хондрогенных маркеров, что позволяет использовать данный подход для разработки биомедицинских клеточных продуктов. Методические наработки данной работы используются в настоящее время в доклинических испытаниях на мышах линии мыши линии Nude/Balb/c, в ходе которых будет оценена приживаемость и интеграция 3D-имплантов, а также биораспределение, онкогенность и туморогенность.

МОЛОДОСТЬ

**Распознавание одиночных макромолекул и молекулярных машин с помощью
мягких эластичных нанопор**

Иванова К.А., Башкиров П.В.

Лаборатория электрофизиологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

Распознавание макромолекул с помощью нанопор становится одним из главных инструментов протеомных исследований. Однако данный подход ограничен водорастворимыми молекулами и их комплексами, зачастую изолированными от их естественной среды. В этой работе мы демонстрируем, что биомиметичные мембранные нанотрубки, приготовленные из синтетических липидов [1] и химически разработанных фолдамерных болаамфифилов (ФМБА), могут функционировать как нанопоры с мягкими эластичными стенками (НПЭС) с регулируемым диаметром просвета. Жидкокристаллическое состояние мембранной стенки обеспечивает контролируемый перенос ФМБА и белков, размещенных на мембране, через НПЭС, при этом ФМБА одновременно могут связываться с белками, расположенными снаружи, во внешнем объеме относительно НПЭС. Нами показано, что НПЭС надежно распознает как одиночные белковые эктодомены в просвете, так и динамические деформации эластичной стенки нанопоры под действием одиночных молекул и молекулярных машин, связывающимися с НПЭС снаружи и при этом остающимися в контакте со своими физиологическими партнерами (липидный бислой, нуклеозидтрифосфаты, вспомогательные белки). Используя структурное моделирование и методы одномолекулярной флуоресцентной микроскопии, мы подтвердили, что НПЭС различает размер и состояние олигомеризации белковых молекул, а также разрешает ГТФазный цикл одиночной белковой машины, формируемой динамином 1 человека. Таким образом, различные режимы распознавания, предлагаемые НПЭС, позволяют проводить комплексный мониторинг мембранных процессов, расширяя технологию нанопор до совершенно нового класса белков и интерактомоов.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-15-00265.

Литература

1. Bashkirov P.V., Kuzmin P.I., Chekashkina K. Reconstitution and real-time quantification of membrane remodeling by single proteins and protein complexes // Nature Protocols 2020. V. 15. P. 2443-2469.

Создание линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток с нокаутом и с избыточной экспрессией гена *UBE2A* при помощи технологии геномного редактирования CRISPR/Cas9.

Хомякова Е. А., Федоренко А. В., Сурдина А. В., Воловиков Е. А., Секретова Е. К.,
Шувалова Л. Д., Богомазова А. Н и Лагарькова М. А.

Лаборатория клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

Синдром Насименто, или синдром X-сцепленной умственной отсталости по типу Насименто, был впервые описан в 2006 году [1]. Он характеризуется задержкой умственного развития, аномалиями развития головы и лица и судорогами. Данный синдром вызван дисфункциональностью гена *UBE2A*, кодирующего фермент E2 убиквитин протеасомной системы. Роль *UBE2A* в нормальном развитии мозга и молекулярные механизмы, лежащие в основе синдрома Насименто, до сих пор остаются мало изученными.

Для исследования роли гена *UBE2A* в развитии синдрома Насименто было принято решение создать *in vitro* изогенную клеточную модель на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). ИПСК обладают уникальной способностью к самоподдержанию и дифференцировке в различные типы клеток, включая нейрональные клетки. Кроме того, они предоставляют возможность формирования трехмерных (3D) клеточных структур, таких как органоиды, которые специфичны для определенных органов, включая мозг. Таким образом, использование ИПСК позволяет изучать процессы нейрального развития.

Мы получили клеточные линии ИПСК нокаутные по *UBE2A* (*UBE2A-KO*) из здоровых ИПСК с использованием геномного редактирования CRISPR/Cas9. ИПСК были дифференцированы в фибробластоподобные клетки (CD105+, CD73+, CD90+), глиальные клетки (S100β+) и нейрональные предшественники (SOX1+, SOX2+, PAX6+). В анализе морфологии ядра *UBE2A-KO* ИПСК и нормальных ИПСК мы обнаружили значительное увеличение размера ядра *UBE2A-KO* по сравнению с нормальными ИПСК. Аналогично в анализе размера ядра нейральных производных мы наблюдали уменьшение размера ядра производных *UBE2A-KO*. В отличие от этого, в глиальных клетках ядра *UBE2A-KO* были большего размера, чем ядра глиальных клеток дикого типа. В литературе есть данные, свидетельствующие о том, что распределение ламинов в ядре меняется при переходе клеток в более дифференцированное состояние. Дальнейшие эксперименты по содержанию белков ламинов в производных ИПСК показал, что в глиальных *UBE2A*-дефицитных клетках существенно больше LaminB1, чем в глиальных клетках дикого типа. Ламины участвует в формировании ядерной мембраны и могут влиять на экспрессию генов, а нарушенное распределение ламинов может играть роль в заболеваниях развития нервной системы. С целью изучения феномена изменения размеров клеточного ядра в связи с разным состоянием гена *UBE2A* будут проведены дальнейшие исследования.

1 - Nascimento R. M. P. et al. *UBE2A*, which encodes a ubiquitin-conjugating enzyme, is mutated in a novel X-linked mental retardation syndrome //The American Journal of Human Genetics. – 2006. – Т. 79. – №. 3. – С. 549-555.

**Детекция связывания мелиттина с внешней поверхностью бактериальных клеток
E. coli с помощью биосенсора на поверхностных волнах
в одномерном фотонном кристалле**

Митько Т. В., Графская Е. Н., Басманов Д. В., Лазарев В. Н., Клинов Д. В.

*Лаборатория медицинских нанотехнологий
ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России*

Исследование бактерий играет важную роль в различных сферах нашей жизни, начиная от поиска новых методов лечения бактериальных инфекций, в том числе преодоления их устойчивости к антибиотикам, до использования культур бактерий в биотехнологии для получения биологически активных соединений. Детекция взаимодействия бактериальных клеток и биомолекул как правило осуществляется с использованием различных химически присоединённых меток и красителей, которые могут приводить к изменению конформации исследуемого соединения, и как следствие менять его активность, кинетику и механизм взаимодействия [1]. Использование безмаркерных методов позволяет решить эту проблему. Одним из подобных методов является использование оптических биосенсоров. Их главным преимуществом, помимо безмаркерности, является возможность исследования кинетики межмолекулярного взаимодействия в реальном времени [2].

В данном исследовании была продемонстрирована принципиальная возможность детекции взаимодействия «внешней» поверхности бактерий с низкомолекулярными биомолекулами, на примере мелиттина и *Escherichia coli*.

Были получены кривые сорбции мелиттина на поверхность *Escherichia coli*. По полученным данным были рассчитаны константы диссоциации реакции связывания мелиттина с внешней поверхностью бактериальных клеток, которая составила $(1,67 \pm 0,02) \times 10^{-6}$ М.

Также была показана принципиальная возможность детекции низкомолекулярных соединений на примере пропидия йодида с помощью биосенсора на поверхностных волнах в одномерном фотонном кристалле.

Литература:

1. Sun, Y. S.; Landry, J. P.; Fei, Y. Y.; Zhu, X. D.; Luo, J. T.; Wang, X. B.; Lam, K. S. Effect of Fluorescently Labeling Protein Probes on Kinetics of Protein–Ligand Reactions. *Langmuir* 2008, 24 (23), 13399-13405. DOI: 10.1021/la802097z
2. Konopsky, V.N.; Karakouz, T.; Alieva, E.V.; Vicario, C.; Sekatskii, S.K.; Dietler, G. Photonic Crystal Biosensor Based on Optical Surface Waves. *Sensors* 2013, 13, 2566-2578. DOI: 10.3390/s130202566