



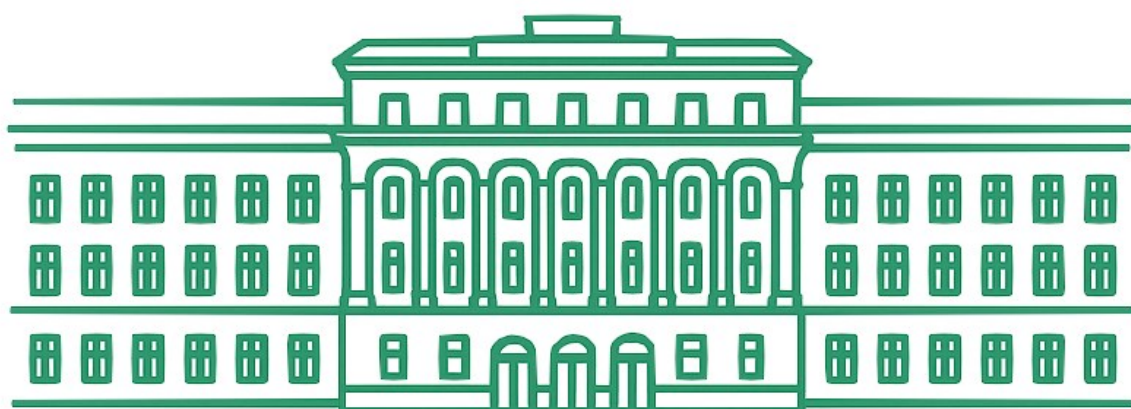
НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

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

25 апреля 2025 года



СБОРНИК ТЕЗИСОВ





АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

А

Авшалумов А.С., 2
Алдаров К.Г., 9
Ануфриева К.С., 4, 26
Арапиди Г.П., 4, 15,
18, 26, 35

Б

Бажутов М.Н., 9
Баклаушев В.П., 36
Барина А.А., 5
Барисёнок А.В., 3
Басманов Д.В., 9, 36,
40
Бекбаева И.В., 4
Беликова Л.Д., 9
Беспярых Ю.А., 31
Бобровский П.А., 30
Богомазова А.Н., 5,
11, 17, 22, 25, 37,
41
Богомоллова А.Ю., 5
Богомякова М.Е., 41
Борзенко Н.И., 6
Бровина К.А., 7, 33

В

Вайнер Ю.Г., 31
Варижук А.М., 16, 29
Веселовский В.А., 18,
28
Воробьева Е.А., 13

Г

Галямина М.А., 6, 37
Говорун В.М., 35
Гончаров А.О., 35
Гончаров Е.А., 8
Горбачев А.Ю., 2, 3, 6,
10, 23, 32, 38
Горланкин Е.А., 9

Д

Давиденко А.В., 11

Е

Емец Е.В., 22, 41
Еремеев А.В., 9, 25
Ефимов Б.А., 13

Ж

Жмурина В.Е., 10
Жукова А.Д., 11
Жукова О.А., 36

З

Загайнова Е.В., 5
Зайчикова М.В., 19
Захаржевская Н.Б., 13
Зуев С.Н., 12

И

Иванов В.А., 31
Иванова О.М., 4, 29

К

Кардонский Д.А., 13
Кашатникова Д.А., 13
Киселев С.И., 14
Киселёва Я.С., 15
Климина К.М., 18, 28
Клинов Д.В., 39
Книжник Е.К., 16
Кондакова Е.В., 22
Копылова И.В., 9, 17
Косс В.А., 18
Крашенинников В.Н.,
31
Кузнецова С.М., 19
Кулемин Н.А., 12, 21
Кустова А.О., 22

Л

Лагарькова М.А., 17,
22, 35, 41
Лазарев В.Н., 7, 33
Лашкин А.И., 4
Лебедева О.С., 9, 17,
24, 34
Лепехина Д.Ю., 20
Лузанова В.Д., 13
Лукина М.М., 26, 35

М

Малахова М.В., 19
Малышева Е.А., 21
Манувера В.А., 7, 20
Миронов Р.В., 22
Михайлычева М.В., 6,
23
Морозов М.Д., 18
Москалец А.П., 39
Мухина А.А., 24, 34

О

Олехнович Е.И., 18

П

Павлова Ю.И., 29
Пикина А.С., 25
Побегуц О.В., 2, 6, 37
Подлесный П.Р., 26
Подопригора И.В., 13
Попик Е.А., 24, 34
Протасов М.А., 27
Прусаков К.А., 9, 36

Р

Романов М.В., 28
Рубцов П.В., 29
Русавский Н.Р., 30

С

Сапожникова В.А., 16
Сариева Д.О., 31
Свирина Е.А., 26, 35
Семенов А.А., 32
Серебренникова М.Ю.,
33
Сизова С.В., 40
Силантьев А.С., 13
Смирнов И.П., 35
Спасельникова А.В.,
24, 34
Стекольников П.А.,
35
Столяров В.Ю., 36
Султанов Р.И., 15
Сурдина А.В., 29

Т

Тарабыкин В.С., 22
Трусов Н.В., 38

У

Ульянов А.Д., 22, 37
Уразаева Д.Р., 38

Ч

Чаплин А.В., 13
Чинарев А.А., 40

Ш

Шагалеева О.Ю., 13
Шарова Е.И., 8, 27
Шаталов Д.Д., 39
Шафоростов А.И., 40
Шендер В.О., 4, 26, 35
Шерман Д.К., 41
Широков Д.А., 16, 20
Шитиков Е.А., 14, 19
Шнайдер П.В., 4
Шторк А.С., 29



Применение случайного транспозонного мутагенеза для изучения феномена фенотипического переключения у адгезивно-инвазивной *E. coli*

Авшалумов А.С.^{1,2}, Побегуц О.В.¹, Горбачев А.Ю.¹

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

²Московский физико-технический институт

Escherichia coli с адгезивно-инвазивным фенотипом (AIEC) часто связывают с воспалительными заболеваниями кишечника, включая болезнь Крона. Было показано, что клинический изолят *E. coli*, выделенный от пациента с болезнью Крона, приобретает адгезивно-инвазивные свойства при продолжительном культивировании на пропионате, но теряет вирулентность при переводе на питательную среду с глюкозой [1]. В рамках изучения этого феномена используется метод случайного нокаута генов при помощи транспозонного мутагенеза. Транспозон вносится в клетки *E. coli* и осуществляется случайная интеграция транспозона в геном, что приводит к нокауту того гена, в который произошла вставка [2]. Далее, транспозонные мутанты культивируются в различных условиях. Определяя места вставок, т.е. «выключенные» гены, при помощи метода Tn-seq [3] можно установить, какие гены являются ключевыми для выживания в этих условиях. Поскольку пангеном *E. coli* является открытым, насчитывает более 20 тыс. генов, а два случайно выбранных изолята могут отличаться на несколько тысяч генов, применение данной методики является актуальной задачей и не может быть решена на основе опубликованных исследований для других штаммов.

Целью работы является адаптация методики секвенирования транспозон-геномных соединений (Tn-seq) под платформу MGISEQ и определение ключевых генов клинического изолята *E. coli*, необходимых для выживания на среде с добавлением пропионата натрия.

Для внесения случайных транспозонных мутаций были использованы плазмидные векторы, содержащие в себе мини-транспозоны, а также ДНК-белковый комплекс, состоящий из транспозона и фермента транспозазы. Выполнено сравнение методов трансформации, оценены значения эффективности, выбран оптимальный вариант и использован для получения мутантов. На основе имеющихся литературных данных [3] были разработаны олигонуклеотидные праймеры для сборки ДНК-библиотек со специфическим обогащением транспозон-геномных соединений. Проведена проверка их работоспособности. Были получены транспозонные мутанты, определено наличие случайных вставок, что делает возможным использование данного подхода для определения ключевых генов изолята AIEC, необходимых для формирования вирулентного фенотипа.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 25-24-00126.

Литература:

- [1] Pobeguts O. V. [et al.]. Propionate Induces Virulent Properties of Crohn's Disease-Associated *Escherichia coli* // *Frontiers in Microbiology*. 2020. [11]. p. 1460.
- [2] Cain A. K. [et al.]. A decade of advances in transposon-insertion sequencing // *Nature Reviews. Genetics*. 2020. 9 [21]. С. 526–540.
- [3] Palani N. Transposon insertion sequencing (Tn-seq) library preparation protocol - includes UMI for PCR duplicate removal 2019.



Мультиомный анализ молекулярных изменений при тройном негативном раке молочной железы

Барисёнок А.В., Горбачев А.Ю.

Лаборатория протеомного анализа

Тройной негативный рак молочной железы (ТНРМЖ) – агрессивная форма опухоли, характеризующаяся отсутствием экспрессии рецепторов эстрогена, прогестерона и HER2. Изучение молекулярных изменений с применением мультиомных подходов позволяет понять механизмы развития опухоли и выявить биомаркеры.

В исследовании использовались данные образцов пациентов с ТНРМЖ. В качестве нормальных образцов взята прилегающая к опухоли здоровая ткань. Гены, белки и пути ограничены в adjusted p-value < 0.05 и $|\log_2FC| > 1$.

Протеомные данные включали 30 опухолевых и 5 нормальных образцов, обработанных nf-core/quantms [1]. Идентифицировано 6524 белка. Для 5 пар «опухоль-норма» проведён анализ в MSstats [5], в результате выявлено 16 белков. Анализ с использованием enrichR выявил 154 пути. Попарный анализ для 5 пар образцов с помощью limma-voom выявил 2573 белка и 5280 пути.

Транскриптомные данные из 25 опухолевых образцов обработаны через nf-core/rnaseq [2]. Для сравнения взяты 89 нормальных образцов из базы по ТНРМЖ [7]. С помощью DESeq2 [6] выявлено около 14 тыс. генов. Сравнение каждого опухолевого образца с контрольной группой при помощи limma-voom выявило 1644 пути.

Анализ мутаций выполнен для 23 парных образцов через nf-core/sarek [3] и аннотирован через pcgr [4]. Найдено около 158 тыс. соматических мутаций в 15 тыс. генах. Для этих генов определены более 5 тыс. путей.

Интеграция путей по данным транскриптомики, протеомики и мутационного анализа выявила 65 путей, активных на всех уровнях. Пути участвуют в процессах клеточной пролиферации, миграции, апоптозе и межклеточном взаимодействии.

Мультиомный подход показал высокую эффективность в изучении ТНРМЖ. Интеграция транскриптомных, протеомных и экзомных данных позволила выявить ключевые молекулярные мишени.

Литература:

- [1] Dai C. [et al.]. quantms: a cloud-based pipeline for quantitative proteomics enables the reanalysis of public proteomics data // Nat. Methods. 2024. V. 21. P. 1603–1607.
- [2] Patel H. [et al.]. nf-core/rnaseq v3.18.0 – URL: <https://nf-co.re/rnaseq>.
- [3] Garcia M. [et al.]. Sarek: A portable workflow for whole-genome sequencing analysis of germline and somatic variants // F1000Research. 2020. V. 9. P. 63.
- [4] Nakken S. [et al.]. Personal Cancer Genome Reporter: variant interpretation report for precision oncology // Bioinformatics. 2017. V. 34(10). P. 1778–1780.
- [5] Kohler D. [et al.]. MSstats version 4.0: statistical analyses of quantitative mass spectrometry-based proteomic experiments with chromatography-based quantification at scale // J. Proteome Res. 2023. V. 22. P. 1466.
- [6] Love M. I. [et al.]. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 // Genome Biol. 2014. V. 15. P. 550.
- [7] Chen A. [et al.]. A comprehensive genomic and transcriptomic dataset of triple-negative breast cancers // Scientific Data. 2022. T. 9. № 572.



Биоинформатический анализ механизмов приобретения резистентности к цисплатину опухолевыми клетками под влиянием секрета от погибающих клеток

Бекбаева И.В., Шнайдер П.В., Иванова О.М., Лашкин А.И., Шендер В.О., Ануфриева К.С., Арапиди Г.П.
Лаборатория системной биологии

Цисплатин широко применяется как химиотерапевтический агент при терапии аденокарциномы яичника в связи с его способностью повреждать ДНК опухолевых клеток, вызывая апоптоз. Приобретаемая резистентность к цисплатину, в основном, объясняется активацией процессов репарации ДНК и изменениями регуляции клеточного цикла в опухолевых клетках. Ранее нами было показано, что везикулярная фракция секрета от погибающих под действием цисплатина опухолевых клеток усиливают химиорезистентность реципиентных опухолевых клеток [1].

В данной работе нами исследовались изменения транскриптома реципиентных клеток после трехдневной инкубации с секретами от погибающих клеток с целью определить механизмы, которые могут объяснять приобретение реципиентными клетками резистентности к цисплатину. Согласно результатам теста на выживаемость, обработка собственными секретами способствует приобретению резистентности у опухолевых клеточных линий рака яичника SKOV3 и A2780, и не оказывает влияния на химиорезистентность у неопухолевых клеточных линий фибробластов, кератиноцитов HaCaT и клеток нормального эпителия фаллопиевых труб hTERT FT282. Для данных клеточных линий был проведен транскриптомный анализ, по результатам которого было установлено, что при обработке реципиентных клеток секретами в опухолевых клеточных линиях активируются процессы репарации ДНК, регуляции клеточного цикла и сплайсинга РНК, тогда как для неопухолевых клеточных линий подобные изменения отсутствуют.

Для детального анализа процессов, запускающихся в клетках под действием цисплатина, был произведен анализ транскриптомных данных одиночных клеток для клеточной линии SKOV3 при обработке цисплатином. При помощи метода построения псевдовременной траектории (pseudotime analysis) было показано, что при обработке цисплатином в клетке понижается экспрессия генов, участвующих в процессах репарации ДНК, тогда как гены, вовлеченные в ответ на окислительный стресс, напротив, повышают свою представленность.

Для поиска внутриклеточных сигнальных путей, отвечающих за приобретение клетками резистентности к цисплатину, на основании данных о белок-белковых взаимодействиях был построен граф молекулярных каскадов. Для каждой клеточной линии был произведен поиск наикратчайших путей, начинающихся с (I) лиганда, обнаруженного в наших протеомных данных секретомов, (II) рецептора и белков-посредников, экспрессирующихся в клетках, и заканчивающийся (III) транскрипционным фактором, значимо регулирующим изменения транскриптома в клетках. По результатам анализа среди путей, характерных только для опухолевых клеток SKOV3, были выбраны транскрипционные факторы FOXM1, MYBL2 и STAT3, а также фактор роста FGF2, который может их активировать. В дальнейшем планируется исследование вклада этих генов в развитие химиорезистентности, опосредованной межклеточной коммуникацией, с использованием моделей опухолевых клеток с нокаутами.

Литература:

1. Shender, V.O., Anufrieva, K.S., Shnaider, P.V. et al. Therapy-induced secretion of spliceosomal components mediates pro-survival crosstalk between ovarian cancer cells. Nat Commun 15, 5237 [2024]. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-49512-6>



Сравнение особенностей дифференцировки различных линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в предшественники β -клеток поджелудочной железы

Богомолова А.Ю., Баринова А.А., Богомазова А.Н., Загайнова Е.В.

Лаборатория клеточной биологии

Сахарный диабет 1 типа (СД1) – аутоиммунное заболевание, характеризующееся разрушением β -клеток и развитием абсолютной инсулиновой недостаточности. Хотя трансплантация островков Лангерганса поджелудочной железы успешно применяется для лечения инсулин-дефицитных состояний, включая СД1, этот метод имеет существенные ограничения, такие как дефицит донорских органов надлежащего качества и риск иммунного отторжения трансплантата. В поисках решения этой проблемы активно разрабатываются новые подходы, основанные на использовании дифференцированных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). Однако до сих пор не удалось создать эффективный протокол дифференцировки ИПСК в функциональные β -клетки, обеспечить их достаточное количество и добиться стабильной долгосрочной активности.

Целью данного исследования была отработка протокола дифференцировки ИПСК в эндодермальном направлении и в клетки-предшественники β -клеток на линиях PBM022 E5, FF1S и изогенной гипоиммуногенной линии FF1SdB2M.

Результаты проточной цитометрии показали, что наиболее успешная дифференцировка в эндодермальном направлении наблюдалась у линий FF1S и FF1SdB2M, где доля эндодермальных клеток составила 92% и 73% соответственно. При дальнейшей дифференцировке в направлении клеток-предшественников поджелудочной железы иммуноцитохимический анализ выявил повышенную экспрессию маркеров PDX1 и NKX6.1 в клетках линии FF1S, что свидетельствует об их более высокой способности к созреванию в функциональные β -клетки.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 24-65-00044).



Исследование структуры липополисахаридов при формировании вирулентного фенотипа кишечной палочки

Борзенко Н.И., Побегуц О.В., Галямина М.А., Михайлычева М.В., Горбачев А.Ю.
Лаборатория протеомного анализа ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

AIEC – адгезивно-инвазивная форма *E.coli*, преобладающая в микробиоме кишечника в период активного воспаления. От пациента с болезнью Крона получен изолят *E.coli* ZvL2, обладающий адгезивно-инвазивным фенотипом. Длительный рост AIEC ZvL2 на среде, содержащей пропионат, способствует увеличению вирулентных свойств, а на среде, содержащей глюкозу, наоборот – их снижению. Сравнительный анализ геномов вирулентной и невирулентной формы не выявил значимых изменений, что предполагает эпигенетическую природу их регуляции.

E.coli вирулентного и невирулентного фенотипа могут иметь отличия в строении внешней мембраны. Липополисахариды (ЛПС) – основной компонент внешней мембраны, обеспечивающий ее структурную и функциональную целостность. ЛПС состоят из липида А, центрального олигосахарида и высоковариабельного О-антигена. О-антиген – важнейший фактор вирулентности бактерий, изменения в его структуре и в структуре ЛПС могут привести к потере вирулентности. Сравнительный количественный протеомный анализ методом ВЭЖХ-МС изолированных мембранных фракций вирулентного и невирулентного фенотипа AIEC ZvL2 показал, что пропионат вызывает значительные изменения в представленности белков, связанных с транспортом и модификацией ЛПС, а также с биосинтезом липида А и центрального олигосахарида.

Целью работы является проведение сравнительного анализа структуры липополисахаридов AIEC ZvL2, культивируемого на средах с добавлением глюкозы и пропионата методами MALDI-TOF масс-спектрометрии, спектроскопии ЯМР и электрофореза в ПААГ.

Результаты. Оптимизирован протокол оценки структуры липополисахаридов методом разделения в полиакриламидном геле. Электрофореграммы ЛПС AIEC ZvL2, культивируемого на средах с глюкозой и пропионатом, показывают различия в распределении фракций ЛПС. Обнаружены различия в жирнокислотном составе липида А для вирулентной и невирулентной формы изолята ZvL2. Установленные различия в структуре ЛПС для вирулентного и невирулентного фенотипа изолята ZvL2 свидетельствуют о том, что адгезивно-инвазивные свойства ZvL2 связаны с перестройкой липополисахаридов и липида А в их составе.



Исследование роли С-концевого мотива цистеин-богатого белка-антикоагулянта (CRA) медицинской пиявки

Бровина К.А.^{1,2}, Лазарев В.Н.^{1,2}, Манувера В.А.^{1,2}

¹ Лаборатория генной инженерии ФНКЦ ФХМ им. Ю. М. Лопухина ФМБА России,

² Московский физико-технический институт (НИУ)

В слюне медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* присутствуют различные антикоагулянты, включая те, что еще не были охарактеризованы [1]. Недавно мы обнаружили и описали один из них – цистеин-богатый белок-антикоагулянт (CRA, cysteine-rich anticoagulant) [2].

CRA показал высокую антикоагулянтную активность в клинических тестах на коагуляцию. Антикоагулянтную активность CRA оценивали по результатам стандартных клинических тестов на свертываемость крови: определение активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), тромбинового времени (ТВ) и протромбинового времени (ПВ). Ближайшим из описанных гомологов CRA является антистазин (ATS) мексиканской пиявки (*Haementeria officinalis*). CRA и ATS имеют характерную картину распределения остатков цистеина, что может указывать на схожую пространственную структуру. Остальные аминокислотные остатки у этих двух белков не демонстрируют значимой гомологии.

В отличие от антистазина, CRA содержит дополнительный С-концевой участок (28 а.о.) с гидрофобными остатками и 10 лизинами. Мы предположили, этот мотив позволяет CRA связываться с липидами клеточных мембран. Для проверки этой гипотезы была получена усеченная форма (CRA-cut) без С-концевого мотива, после чего исследовано связывание с липидными везикулами белков CRA и CRA-cut, в качестве контрольного образца был выбран BSA. В результате установлено, что CRA эффективно связывается с везикулами и осаждается вместе с ними при центрифугировании. В то же время CRA-cut в осадке с везикулами не обнаруживается и полностью остается в растворе. Неожиданные результаты проявились при тестировании способности CRA и CRA-cut подавлять коагуляцию. В тестах АЧТВ и ПВ коагуляционная активность CRA-cut оказалась ниже по сравнению с CRA. Однако, в тесте ТВ укороченный вариант белка значительно превзошел полноразмерную форму. Мы предполагаем, что такой эффект может быть связан с тем, что С-концевой мотив является модификатором специфичности связывания CRA с ингибируемыми протеиназами каскада свертывания крови, подобно тому, как стафилокиназа меняет субстратную специфичность тромбина.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда [23-25-00006].

Список литературы:

1. Babenko VV. BMC Genomics. 2020, doi: 10.1186/s12864-020-6748-0.
2. Manuvera VA. Biochem Biophys Res Commun. 2024, doi: 10.1016/j.bbrc.2024.149473.



Разработка инструмента для анализа дифференциальной экспрессии аллелей ГКГС

Гончаров Е.А., Шарова Е.И.

Лаборатория медицинской геномики

Исследование экспрессии аллелей ГКГС приобретает особую значимость в контексте онкологических и аутоиммунных заболеваний, поскольку помогает раскрыть важные механизмы иммунного ответа и патогенеза.

В настоящее время известно, что гены ГКГС характеризуются различной степенью экспрессии, однако универсального метода для корректного сравнения уровня экспрессии аллелей внутри одного гена и между разными образцами пока не разработано.

Для решения этой задачи был создан подход, который сначала идентифицирует аллели каждого гена ГКГС в исследуемом образце, а затем вычисляет их уровень экспрессии. В основе метода лежит последовательное использование проверенных инструментов анализа данных секвенирования: HLA-HD [1] и Salmon [3]. При расчёте экспрессии используется специально подготовленная база транскриптов без аллелей ГКГС с добавлением транскриптов аллелей, выявленных HLA-HD в конкретном образце.

Эффективность данного подхода была подтверждена на данных РНК-секвенирования клеток лимфобластоидной линии из проекта 1000 Genomes (набор Geuvadis) [4] и сравнением с подобным инструментом arcashLA [2].

Литература:

1. Kawaguchi S. [и др.]. HLA-HD: An accurate HLA typing algorithm for next-generation sequencing data // Human Mutation. 2017. № 7 (38). С. 788–797.
2. Orenbuch R. [и др.]. arcashLA: high-resolution HLA typing from RNAseq // Bioinformatics. 2020. № 1 (36). С. 33–40.
3. Patro R. [и др.]. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression // Nature Methods. 2017. № 4 (14). С. 417–419.
4. The Geuvadis Consortium [и др.]. Transcriptome and genome sequencing uncovers functional variation in humans // Nature. 2013. № 7468 (501). С. 506–511.



Подход к разработке “кишечника-на-чипе” с гидрогелевым матриксом

Горланкин Е.А.¹, Копылова И.В.², Прусаков К.А.¹, Беликова Л.Д.², Еремеев А.В.³, Лебедева О.С.²,
Алдаров К.Г.¹, Бажутов М.Н.¹, Басманов Д.В.¹

¹Лаборатория прикладных биомедицинских микросистем ФНКЦ ФХМ им. Лопухина ФМБА России

²Лаборатория клеточной биологии ФНКЦ ФХМ им. Лопухина ФМБА России

³Лаборатория трансляционной биомедицины ФНКЦ ФХМ им. Лопухина ФМБА России

В настоящее время основными моделями для исследования протекания заболеваний и тестирования лекарственных препаратов являются животные модели и 2D-модели *in vitro*. Основной проблемой таких моделей является низкая репрезентативность получаемых результатов [1], а также сложность работы с ними. Этим объясняется интерес к разработке 3D-моделей [2], в частности “органов-на-чипе”. Такие устройства повторяют физические, биохимические, а иногда и клеточные, геометрические особенности моделируемого органа.

Цель данной работы – создание микрофлюидного устройства “кишечник-на-чипе”, воссоздающего крипты и ворсинки кишечника. Моделировать ткани кишечника предполагается с использованием *in vitro* дифференцированных производных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Эпителиальные органоиды, полученные из стволовых клеток, обладают высоким потенциалом моделирования тканей [3], для этих целей и планируется использовать разрабатываемое устройство.

На первом этапе создали микроструктуру из фотополимера. На втором – негатив микроструктуры из коллагенового гидрогеля. Далее предстоит подращивание стволовых клеток на поверхности гидрогеля. Структура из фотополимера получена методом оптической полимеризации. Далее планируется получение структур с меньшим рельефом с использованием технологии двухфотонной фотополимеризации. Проведены эксперименты по иммобилизации клеток линии WiDR в структуре. Окрашивание F-актина фаллоидином показало заполнение крипт клетками. По результатам проделанной работы можно сделать вывод, что выбранная модель подложки подходит для работы с культурами клеток, но предстоит разработать микрофлюидную систему.

Литература

1. Verhulsel M. et al. Developing an advanced gut on chip model enabling the study of epithelial cell/fibroblast interactions // Lab Chip. 2021. Vol. 21, № 2. P. 365–377.
2. Eremeev A.V. et al. Cerebral Organoids—Challenges to Establish a Brain Prototype // Cells. 2021. Vol. 10, № 7. P. 1790.
3. Nikolaev M. et al. Homeostatic mini-intestines through scaffold-guided organoid morphogenesis // Nature. 2020. Vol. 585, № 7826. P. 574–578.



Сравнительный анализ патогенных геномных вариантов у здоровых и больных пациентов на основе полноэкзомного секвенирования

Жмурина В.Е., Горбачев А.Ю.

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

Современные технологии высокопроизводительного секвенирования открыли новые возможности для изучения генетической архитектуры сложных заболеваний. Полноэкзомное секвенирование (whole-exome sequencing, WES) стало важным инструментом в медицинской генетике, позволяя выявлять патогенные варианты, ассоциированные с различными патологическими состояниями. Однако интерпретация выявляемых генетических вариантов остается сложной задачей, требующей комплексного подхода к оценке их клинической значимости.

В данном исследовании было проведено полноэкзомное секвенирование 100 образцов ДНК с последующим биоинформатическим анализом для выявления и классификации генетических вариантов. Все обнаруженные варианты были аннотированы и оценены в соответствии с международными рекомендациями ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics), включая расчет вероятности их патогенности. Для дальнейшего анализа были отобраны варианты с высокой степенью достоверности (вероятность патогенности ≥ 0.8).

Особенностью данного исследования является сравнительный анализ двух тщательно подобранных когорт: 50 условно здоровых индивидов и 50 условно больных. Такой дизайн позволяет не только выявить потенциально патогенные генетические варианты, но и оценить их специфичность и частоту встречаемости в исследуемой популяции.

Проведенный анализ направлен на решение нескольких важных задач:

1. идентификацию потенциальных генетических маркеров, ассоциированных с изучаемым патологическим состоянием;
2. сравнение генетического ландшафта между группами здоровых и больных индивидов.

Результаты данного исследования имеют важное значение для развития персонализированной медицины, улучшения диагностики и понимания молекулярных механизмов развития заболевания. Полученные данные могут быть использованы для разработки новых подходов к генетическому скринингу и стратификации пациентов.



Сравнение экспрессии провоспалительного цитокина TNF в астроцитах, полученных из ИПСК пациентов с полиглутаминовыми нейродегенеративными заболеваниями: спиноцереbellарной атаксией 17 типа, 1 типа и болезнью Гентингтона

Жукова А.Д., Давиденко А.В., Богомазова А.Н.
Лаборатория клеточной биологии

Полиглутаминовые заболевания – это группа нейродегенеративных патологий, вызываемых экспансией CAG-повторов в кодирующей части различных генов, в результате в клетках синтезируются белки с удлинёнными полиглутаминовыми трактами. Примерами таких заболеваний являются спиноцереbellарные атаксии (SCA) 1 и 17 типов и болезнь Гентингтона (HD). SCA17 развивается в результате мутации в гене *TBP*, кодирующем транскрипционный фактор TBP. В случае SCA1 мутация происходит в гене *ATXN1*, кодирующем белок атаксин-1. В свою очередь, HD возникает в результате мутации в гене *HTT*, кодирующем белок гентингтин. Одним из факторов, предположительно обуславливающих развитие данных заболеваний, является нейровоспаление. Для этого процесса характерно появление реактивных астроцитов в головном мозге, которые отличаются повышенной продукцией провоспалительных цитокинов. Ранее нами было показано наличие провоспалительного фенотипа у астроцитов, полученных из ИПСК пациентов, больных SCA17.

Целью данной работы было исследование методом количественной ОТ-ПЦР экспрессии гена *TNF* в астроцитах, полученных от доноров со SCA17, SCA1 и HD, в интактном состоянии и после стимуляции TNF.

В интактных астроцитах пациентов со всеми тремя заболеваниями мы не обнаружили значимых отличий в уровне экспрессии *TNF* от клеток здоровых доноров. На стимуляцию экзогенным TNF все исследованные линии ответили повышением экспрессии гена *TNF*. В линиях SCA17 и HD повышение экспрессии TNF было менее выражено, чем в здоровом контроле, но в линии SCA1, наоборот, оно оказалось выражено сильнее.

Таким образом, было показано, что астроглиальные клетки SCA17 и HD обладают сниженной способностью к иммунной активации, что может свидетельствовать о выработке ими толерантности к воздействию экзогенных провоспалительных факторов. Однако для клеток SCA1 такого эффекта не наблюдалось, что говорит о том, что данный фенотип не является общим для всех полиглутаминовых заболеваний.



Разработка биоинформатических алгоритмов и инструментов для деперсонализированного хранения, консолидации, аннотации метаданными результатов генетических исследований, полученных в различных организациях

Зуев С.Н., Кулемин Н.А.

Лаборатория молекулярной генетики человека, ФГБУ ФНКЦ ФХМ им.Ю.М.Лопухина ФМБА России

Рост объемов генетических данных открывает новые исследовательские возможности, но ставит острые проблемы конфиденциальности с одной и возможности исключения аппаратных ошибок, с другой стороны. Риски реидентификации [1] и требования законодательства (напр., GDPR, №152 ФЗ) [2] требуют новых подходов. В России отсутствует единая инфраструктура, эффективно решающая дилемму баланса между надежной защитой персональных данных и удобным, стандартизированным доступом исследователей к генетическим ресурсам для совместной работы по принципам FAIR [3].

Цель работы – создание и описание архитектуры платформы, балансирующей безопасность и доступность, а также позволяющей исследователям самостоятельно выбирать тип и технологию используемых данных. Безопасность основана на деперсонализации: система оперирует агрегированными данными (напр., аллельными частотами), минимизируя риски идентификации. Доступность и ценность данных обеспечивает унифицированный конвейер обработки VCF-файлов, интегрирующий 18 стандартизированных метаданных (происхождение образца, технология, QC-метрики). Эти метаданные критичны для корректной интерпретации и фильтрации артефактов, повышая надежность данных.

Доступ к консолидированным данным и метаданным реализуется через простой веб-интерфейс с инструментами поиска, фильтрации и визуализации. Важный элемент коллаборации – функционал для обмена контактами между организациями (с их согласия), облегчающий установление научных связей.

Предлагаемая платформа закладывает основу для первого в РФ централизованного, безопасного и удобного ресурса деперсонализированных генетических данных. Решая проблему баланса защиты и обмена, она призвана преодолеть фрагментацию данных, стимулировать исследования и развитие персонализированной медицины.

Литература:

- [1] Erlich Y. et al. Science. 2018;362(6415):690-4. doi: 10.1126/science.aau4832
- [2] Shabani M., Marelli L. J Med Ethics. 2019;45(7):423-4. doi: 10.1136/medethics-2018-105215
- [3] Dorst M. et al. Front Cell Infect Microbiol. 2024;14:1384809. doi:10.3389/fcimb.2024.1384809



Влияние представителей родов *Bacteroides* и *Phocaeicola* на регуляцию провоспалительных и противовоспалительных сигнальных путей в условиях *in vitro*

Кашатникова Д.А.¹, Чаплин А.В.¹, Шагалеева О.Ю.¹, Захаржевская Н.Б.¹, Кардонский Д.А.¹, Воробьева Е.А.¹, Силантьев А.С.¹, Лузанова В.Д.¹, Ефимов Б.А.¹, Подопригора И.В.²

¹ Лаборатория молекулярной патофизиологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

² Лаборатория бактериологии, Научно-исследовательский институт молекулярной и клеточной медицины медицинского института РУДН

Введение: Рода *Bacteroides* и *Phocaeicola*, широко представлены в составе кишечной микробиоты человека и играют важную роль в поддержании гомеостаза и регуляции иммунного ответа хозяина. Настоящее исследование посвящено изучению вариантов иммунного уклонения и модуляции воспалительных процессов, реализуемых бактериями родов *Bacteroides* и *Phocaeicola*.

Материалы и методы: В работе было исследовано 18 штаммов из семейства *Bacteroidaceae* и 4 штамма *Phocaeicola* полученные из стула здоровых добровольцев. Культивация была проведена в анаэробных условиях при 37°C в течение 48 ч. Для приготовления кондиционированных сред (КС) все тестируемые штаммы *Bacteroides* и *Phocaeicola* выращивали в стандартных условиях в течение 24 ч. Затем жидкие культуры всех штаммов центрифугировали (40 мин, 3500g) и ресуспендировали в исходном объеме среды DMEM. После повторного центрифугирования в тех же условиях и удаления надосадочной жидкости готовили бактериальную суспензию, разбавляя ее до концентрации примерно $3,0 \times 10^8$ КОЕ/мл. Культуры инкубировали в течение 20 ч при 37°C в анаэробных условиях. После инкубации путем центрифугирования из полученных кондиционированных сред удаляли бактериальные клетки, а надосадочную жидкость стерилизовали на фильтре 0,22 мкм (Merck Millipore, Германия). Клетки HT-29 инкубировали с 450 мкл/лунку кондиционированной среды или среды отрицательного контроля в течение 30 мин, добавляли раствор ЛПС (LPS *Escherichia coli* O55:B5, Sigma) в количестве 10 мкл до конечной концентрации 100 нг/мл с последующей инкубацией в течение 4 ч. Экспрессию провоспалительного цитокинов *IL-8* и генов рецепторов *TLR-4* и *TLR-2* определяли методом RT-qPCR, используя ген *GAPDH* в качестве эталона.

Результаты: согласно полученным данным, кондиционированные среды (КС) штаммов *Bacteroides* и *Phocaeicola* демонстрируют видо- и штаммоспецифическое воздействие на экспрессию генов *TLR-2* и *TLR-4*. В частности, КС двух штаммов (*Bste_5888* и *Pcop_6_21*) достоверно снижают уровень экспрессии гена *TLR-4*, как в базальных условиях, так и при индукции липополисахаридом *E. coli* O55:B5. При этом КС штаммов *Bfra_Bob25* и *Bthe_6-237* повышают экспрессию гена *TLR-4*. Модуляция продукции и секреции *IL-8* также выявляет значительные различия между штаммами. Для штамма *Bint_181* установлено достоверное снижение экспрессии и секреции *IL-8*, как в базальных условиях, так и при воздействии ЛПС, что свидетельствует о его противовоспалительном потенциале. В то же время штаммы *Bthe_6-237* и *Pcop_6-21* демонстрировали потенцирование провоспалительного действия ЛПС. Эти результаты подтверждают многоуровневую стратегию иммунного уклонения у представителей родов *Bacteroides* и *Phocaeicola*, которая может включать модификацию структуры ЛПС, секрецию экзополисахаридов, эпигенетическую регуляцию генов *TLR* и ингибирование продукции *IL-8*.

Поддержано грантом РФФ №24-75-10100



Разработка пайплайна для масштабного анализа данных полногеномного секвенирования микобактерий туберкулезного комплекса

Киселев С.И., Шитиков Е.А.

Лаборатория молекулярной генетики микроорганизмов

Микобактериальные инфекции, включая туберкулёз, остаются одной из ведущих причин глобальной заболеваемости и смертности. Широкое применение полногеномного секвенирования микобактерий туберкулезного комплекса (МТВС) привело к накоплению большого объёма данных о мутациях, лекарственной устойчивости, внутривидовом разнообразии и путях передачи. Для эффективного использования этих данных необходимы специализированные инструменты анализа и визуализации. Целью данной работы стала разработка модульного пайплайна для автоматизированной обработки полногеномных данных МТВС и формирования стандартизированных отчётов.

Для разработки пайплайна MTBPipe были интегрированы биоинформатические инструменты с открытым исходным кодом. Картирование ридов выполняется с помощью BWA-MEM2, обработка выравниваний – через SAMtools, а анализ покрытия – с использованием mosdepth. Вариантный анализ (SNP и др.) реализован в BCFtools с фильтрацией, адаптированной под геномы микобактерий. Типирование регионов различий (RD) основано на анализе покрытия с помощью mosdepth и bedtools, результаты визуализируются с использованием R-пакетов. Сполиготипирование выполняется модифицированной версией SpoTyping-v2.0, поддерживающей как риды, так и BAM-файлы. Для анализа инсерционных элементов IS6110 применяется IS_mapper. Определение линий МТВС реализовано с использованием Python-скриптов на базе pandas и numpy. Весь процесс автоматизирован в Snakemake-пайплайне с изолированными conda-окружениями. Результаты (VCF, SNP-таблицы, RD-профили, сполиготипы, IS6110-карты, филогенетическая линия) интегрируются в PDF-отчёты с использованием matplotlib и PdfPages. Разработанный пайплайн был апробирован на ранее описанных выборках и успешно реализован при анализе более 70 000 геномов микобактерий, представленных в базе NCBI данными полногеномного секвенирования. Последнее позволило выработать критерии отбора и загрузки образцов, подтвердить стабильность работы системы и заложить основу для последующей обработки оставшихся геномов. В перспективе планируется создание веб-платформы для клиницистов и исследователей, обеспечивающей автоматизированный анализ и интерпретацию геномных данных.



Поиск соматических мутаций, приводящих к появлению энхансеров, в клеточной линии K562

Киселёва Я.С., Султанов Р.И., Арапиди Г.П.

Лаборатория системной биологии

Энхансеры, одни из ключевых регуляторов экспрессии генов, представляют собой небольшие некодирующие последовательности ДНК и контролируют транскрипцию с промотора гена или группы генов. Транскрипционные факторы (ТФ) связываются с энхансерами через специфические последовательности ДНК, обладающие высокой аффинностью к ТФ [1]. Различные заболевания оказываются связанными с нарушением функции энхансеров из-за хромосомных перестроек, генетических вариаций внутри энхансеров или эпигенетических модификаций [2]. Целью данной работы стал поиск однонуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphism, SNP) клеточной линии K562, приводящих к появлению *de novo* сайтов связывания транскрипционных факторов (ССТФ) и *de novo* энхансеров.

В данных полногеномного секвенирования (WGS) клеточной линии K562 (миелогенная лейкоemia человека, ENCODE Project) с помощью программы GATK HaplotypeCaller было найдено 3451952 SNP. С использованием базы данных HOCOMOCHO, содержащей мотивы связывания ТФ с ДНК, были определены мутации, которые потенциально могут приводить к появлению ССТФ. С помощью модели негативного биномиального распределения мы определили 1154 SNP (суммарно для всех 59 проанализированных ТФ), обладающих значимым аллельным дисбалансом по данным ChIP-Seq на соответствующий ТФ (AI-SNP). Также были проанализированы данные DNase-Seq, ChIP-Seq на гистоновые модификации H3K27ac/H3K4me1, характерные для активных энхансеров, а также данные Fiber-Seq для изучения влияния AI-SNP на эпигенетический ландшафт линии K562. Для поиска целевых генов предполагаемых *de novo* энхансеров был проведен анализ пространственной структуры хроматина (Hi-C) а также использовались данные известных ассоциаций между SNP и экспрессией генов проекта GTEx (Genotype-Tissue Expression project). Таким образом, мы определили AI-SNP (rs12623363), который приводит к возникновению ССТФ GATA2 и потенциально может влиять на экспрессию белок-кодирующего гена *SERTAD2*, который является прото-онкогеном, и AI-SNP (rs3748136), связанный с повышением экспрессии длинной некодирующей РНК RP11-10A14.5, для которой показано участие в регуляции метастазирования опухоли [3, 4].

Литература

1. F. Spitz, E. Furlong. Nature Reviews Genetics 2012, doi: 10.1038/nrg3207
2. A. Claringbould, JB. Zaugg. Trends in molecular medicine 2021, doi: 10.1016/j.molmed.2021.07.012
3. Y. Chen, X. Jie, B. Xing et al. Cell Death & Disease 2022, doi: 10.1038/s41419-022-04567-5
4. Z. Lin, F. Feng, J. Liang et al. Discover Oncology 2022, doi: 10.1007/s12672-022-00493-2



ИНТЕРКАЛИРОВАННЫЕ МОТИВЫ В ПРОМОТОРАХ/UTR КАК pH-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ

Книжник Е.К., Сапожникова В.А., Широков Д.А., Варижук А.М.

Лаборатория структуры и функций биополимеров

Интеркалированные мотивы (iM) – элементы вторичной структуры цитозин-богатых фрагментов ДНК. Синтетические iM могут играть роль pH-сенсоров *in vitro*. Мы предположили, что в клетке геномные iM выполняют сходную функцию, регулируя транскрипцию при изменении уровня кислотности среды. Примером подобных изменений, достигающих до ядра клетки, является ацидоз в очагах воспаления, а частым следствием – активация протоонкогенов. Другим примером служит накопительный эффект от скачков pH при многократном возбуждении нейронов; он может являться стартовой точкой активации генов синаптогенеза и нейропластичности, но механизмы этих процессов изучены слабо. Цель данной работы было прояснение роли iM в pH-зависимой регуляции транскрипции протоонкогенов и генов нейропластичности.

Отбор iM проводился на основании картирования их в геноме человека методом Cut&Tag, а также вероятности iM-фолдинга, предсказанной программами анализа последовательностей. Потенциально значимые iM были отобраны промоторов/UTR протоонкогенов и генов, ассоциированных с синаптопластичностью. На первом этапе были подробно рассмотрены iM промоторов и UTR гена *EGR1*, кодирующего рецептор эпидермального фактора роста (регулятор апоптоза), и *RHEB1*, кодирующего ГТФ-связывающий белок, обогащенный в мозге гомолог *Ras*. Отобранные iM были синтезированы в виде коротких олигонуклеотидов (ОДН) и встроены в плазмиду с репортерным геном, кодирующим люциферазу *Firefly* (FLuc) в области промотора/UTR. Проверка iM-фолдинга *in tube* проводилось методом спектроскопии кругового дихроизма (КД) с ранжированием pH или с добавлением дестабилизатора iM – нафталендиимидного производного SOP1812, которое проходит клинические испытания в качестве противоопухолевого агента. КД-спектроскопия подтвердила стабильность iM в слабокислой среде и дестабилизацию в присутствии SOP1812.

Для оценки влияния iM на транскрипцию клетки HEK293 были трансфицированы референсной плазмидой, кодирующей люциферазу *Renilla* (Rluc), и целевой плазмидой FLuc с/без iM или с мутантным iM. Соотношение Fluc:Rluc оценивалось с помощью двойного люциферазного теста. Тест показал, что наличие iM-вставки в промоторах и UTR приводит к незначительному снижению экспрессии репортерного гена. В модели острого ацидоза эффект проявлялся более отчетливо – предположительно, за счет стабилизации iM, тогда как мутации iM или обработка клеток SOP1812 ослабляли или нивелировали эффект. Результаты подтверждают участие iM в регуляции транскрипции при ацидозе, а также их чувствительностью к известному противоопухолевому агенту.



Влияние мутации G2019S в киназе LRRK2 на ответ дофаминергических нейронов при иммунной стимуляции

Копылова И.В., Богомазова А.Н., Лагарькова М.А., Лебедева О.С.

Лаборатория клеточной биологии

Болезнь Паркинсона (БП) – широко распространённое прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, вызванное гибелью дофаминергических нейронов (ДАН) чёрной субстанции. Нейровоспалительные процессы рассматриваются в качестве одной из его патогенетических компонент. Наиболее распространённой мутацией, ассоциированной с БП, является аминокислотная замена Gly2019Ser (G2019S) в киназе LRRK2 (с.6055G>A). Известно, что мутация G2019S приводит к усилению киназной активности LRRK2. Данный белок в больших количествах присутствует в миелоидных клетках и участвует в регуляции врождённого иммунного ответа. В то же время участие патогенной LRRK2-G2019S в развитии нейровоспаления при БП остается мало изученным. В нашей работе мы использовали ранее полученные изогенные линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) с различными комбинациями аллелей *LRRK2*, представляющими спектр киназной активности LRRK2 от её максимума (G2019S/G2019S) до полного отсутствия (KO/KO). ИПСК дифференцировали в ДАН, и на данной модели оценили эффект мутации G2019S на ответ нейронов при иммунной стимуляции.

В ходе работы были подобраны оптимальные условия иммунной стимуляции ДАН: при инкубации клеток с интерфероном гамма или интерфероном бета мы наблюдали многократное повышение экспрессии интерферон-стимулируемых генов. Однако в ДАН паттерн экспрессии не коррелировал с киназной активностью LRRK2, что косвенно указывает на роль других типов клеток в генерации и поддержании нейровоспаления при LRRK2-ассоциированной БП. Таким образом, для дальнейших исследований данных процессов требуется разработать и использовать комплексные клеточные модели БП, содержащие клетки трёх типов – ДАН, астроциты и микроглию.



Пептиды микробиты в кровотоке человека и метагеном кишечника: связь с заболеваниями желудочно-кишечного тракта

Косс В.А., Веселовский В.А., Олехнович Е.И., Морозов М.Д., Климина К.М., Арапиди Г.П.

Лаборатория системной биологии

В научной литературе описано множество связей между составом микробиоты и состоянием здоровья человека. Тем не менее до сих пор нет понимания молекулярных механизмов взаимодействия бактерий с организмом хозяина. Такие малые молекулы, как пептидные фрагменты бактериальных белков, способны попадать в кровоток человека из кишечника и распространяться по тканям и органам, играя ключевую роль во взаимодействии между микробиотой и человеком. Интерес представляет изучение пептидов микробиоты, циркулирующих в кровотоке, как потенциально биоактивных молекул, а также как возможных индикаторов или прогностических маркеров течения заболеваний.

В нашей работе мы исследовали пептиды бактериального происхождения в плазме крови 48 доноров, включая здоровых людей и пациентов с язвенным колитом, болезнью Крона, синдромом раздраженного кишечника и колоректальным раком. Применение метода LC-MS/MS (Q Exactive HF-X Hybrid Quadrupole-Orbitrap) позволило идентифицировать пептидные фрагменты, которые затем были сопоставлены с базой данных аннотированных белков микробиоты человека по версии Human Microbiome Project. Анализ выявил бактериальные пептиды, уникальные для пациентов с определенным заболеванием, а также пептиды, специфичные для нескольких патологий, но отсутствующие у здоровых доноров. Например, у пациентов с колоректальным раком были обнаружены фрагменты белков бактерии *Holdemanella biformis*, которая, как было показано ранее, может контролировать противоопухолевый ответ.

Также был проведен анализ метагенома кишечника тех же пациентов для оценки разнообразия бактериальных сообществ. При сравнении бактерий-продуцентов пептидов, идентифицированных в кровотоке, и результатов метагеномного анализа были выявлены совпадения между бактериями, ассоциированными с патологиями желудочно-кишечного тракта.



Характеристика микобактериофага YasnayaPolyana субкластера K4: биологические свойства и терапевтический потенциал

Кузнецова С.М., Зайчикова М.В., Малахова М.В., Шитиков Е.А.

Лаборатория молекулярной генетики микроорганизмов

Бактериофаги рассматриваются как перспективная альтернатива антибиотикам в условиях растущей устойчивости к противомикробным препаратам. Особый интерес вызывают микобактериофаги – фаги, специфичные к микобактериям, включая *M. tuberculosis* и нетуберкулёзные виды, устойчивые к большинству антибиотиков. При этом наибольший терапевтический потенциал демонстрируют фаги кластеров А и К. Целью данной работы явилась характеристика ранее выделенного бактериофага YasnayaPolyana, относящегося к субкластеру K4.

Микобактериофаг YasnayaPolyana был выделен с использованием метода накопительных культур на *Mycobacterium smegmatis* mc2 155. Спектр хозяев и титр фага были установлены методом спот-тестирования с модификациями. Полногеномное секвенирование проводилось на платформе Illumina. Кривые адсорбции и единичного цикла роста получены на *M. smegmatis* mc2 155. Температурная стабильность фага была протестирована в диапазоне от -20°C до 55°C. Влияние различных значений pH (2, 4, 6, 8, 9, 10, 12) изучали при температуре 20°C в течение 24 часов.

Фаг относился к субкластеру K4 умеренных фагов и демонстрировал высокий уровень гомологии с другими представителями субкластера. Анализ скорости адсорбции показал, что фаг YasnayaPolyana адсорбируется на клетках *M. smegmatis* mc2 155 в течение 40 мин. Латентный период для фага составил 60 мин, период роста – 180 мин. Температура -20°C вызывала незначительное снижение титра. При 55°C наблюдалось снижение титра на 1,5-2 порядка. Фаг сохранял жизнеспособность в диапазоне pH 6–12, однако при значениях pH ниже 6 наблюдалась полная утрата активности. Фаг YasnayaPolyana проявлял активность в отношении *M. Tuberculosis* и *M. abscessus*.

Микобактериофаг YasnayaPolyana обладает активностью в отношении *M. tuberculosis* и *M. abscessus*, стабильностью при различных температурах и значениях pH, а также устойчивыми параметрами репродуктивного цикла. Однако фаг относится к умеренным, что ограничивает его прямое терапевтическое применение. Тем не менее, с учётом его свойств, он может рассматриваться как перспективная основа для создания терапевтического агента на базе генно-модифицированного фага.

Исследование выполнено за счет средств гранта РФФИ № 24-15-00514.



Рекомбинантные апоптены снижают выживаемость клеток меланомы человека

Лепехина Д.Ю., Манувера В.А., Широков Д.А.
Лаборатория генной инженерии

Меланома – агрессивное опухолевое заболевание кожных покровов человека с высокой склонностью к метастазированию. Рост заболеваемости и смертности от меланомы в развитых странах делает поиск новых терапевтических стратегий актуальной задачей современной медицины. Ранее нами были получены шесть рекомбинантных химерных апоптеинов – небольших пролин-богатых белков, потенциально способных вызывать апоптоз в опухолевых клетках. Четыре из них содержали пептиды с RGD-мотивом (аргинин-глицин-аспарагиновая кислота) для селективного связывания с $\alpha V\beta 3$ -интегринами на поверхности меланомных клеток. В дизайне рекомбинантных апоптеинов использовались два варианта пептидов (RGD13 или RGD15 [1]), расположенных либо с N-, либо с C-конца химерного белка. Ещё два апоптеина не содержали RGD-пептидов и использовались в качестве контроля. Все рекомбинантные белки содержали гексагистидиновый тэг. Учитывая вероятность стерических препятствий при связывании RGD-пептида с интегрином, нами дополнительно были получены ещё четыре рекомбинантных белка, в которых узнающий рецептор пептид был отделён от апоптеина глицин-сериновым линкером. Плазмиды, кодирующие такие белки, были сконструированы с помощью метода PIPE, позволяющего осуществить «бесшрамовую» вставку нуклеотидных последовательностей в ген [2].

Для всех десяти рекомбинантных белков была оптимизирована схема получения. Она включала экспрессию рекомбинантных генов в составе плазмид в штамме *E.coli Rosetta2(DE3)* с индукцией ИПТГ, выделение фракции телец включения, очистку рекомбинантных белков металл-хелатной аффинной хроматографией на колонке с Ni-сефарозой в денатурирующих условиях и двухступенчатый диализ из элюиционного буфера в 0,2 М L-Arg-HCl, 50 mM Tris, pH 8,0. В качестве модельной системы для испытания полученных рекомбинантных белков использовали культуру клеток меланомы человека MeWo. Оценка жизнеспособности клеток проводилась через сутки после добавления рекомбинантных белков с помощью резазуринового теста (реагент PrestoBlue). Ряд апоптеинов с RGD-пептидами показал сильный цитотоксический эффект в микромолярном диапазоне концентраций.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 24-25-00344.

Литература:

1. Hölig, P. et al. Novel RGD lipopeptides for the targeting of liposomes to integrin-expressing endothelial and melanoma cells. *Protein Eng Des Sel.*, 2004, 17(5), 433–441. doi: 10.1093/protein/gzh055
2. Klock H.E. and Lesley S.A. The polymerase incomplete primer extension (PIPE) method applied to high-throughput cloning and site-directed mutagenesis. Chapter 6 from book "Methods in Molecular Biology: High Throughput Protein Expression and Purification", Sharon A. Doyle (ed.), 2009, vol. 498, p.91-103.



Применение фармакогенетического тестирования на примере атипичного нейролептика клозапина в лечении психических расстройств

Малышева Е.А., Кулемин Н.А.

Лаборатория молекулярной генетики человека, ФГБУ ФНКЦ ФХМ им.Ю.М.Лопухина ФМБА России

Взаимодействие фармакологических препаратов и биохимических факторов является одним из основополагающих принципов персонализированной медицины. Фармакогенетика изучает влияние индивидуальных генетических особенностей на эффективность и безопасность лекарственных средств. Одним из ключевых направлений является анализ метаболизма препаратов с учётом генетической вариабельности, что позволяет предсказывать ответ пациента на терапию и минимизировать побочные эффекты.

Несмотря на успехи в понимании биохимических и молекулярных механизмов действия антипсихотиков, на сегодняшний день не существует универсальных клинических протоколов, основанных исключительно на биохимических или генетических показателях. Атипичные антипсихотики, в частности клозапин, представляют собой группу препаратов, для которых особенно актуален индивидуализированный подход к выбору и дозировке.

Одним из ключевых элементов фармакогенетического тестирования является анализ структуры генов цитохромов P450. Наличие данных полного генома пациента позволяет выявлять индивидуальные особенности метаболизма, судить об активности ферментов, предполагать индивидуальную предпочтительность применения конкретного антипсихотика.

Сложность интерпретации фармакогенетических данных, отсутствие унифицированных рекомендаций и ограниченная доступность генетических тестов являются основными барьерами на пути персонализированной терапии, однако стоимость полногеномного секвенирования снижается и имеются основания предполагать, что через несколько лет такого типа тесты станут массовыми.

В ходе настоящей работы проведён литературный анализ публикаций, посвящённых фармакогенетике атипичных антипсихотиков на примере клозапина. На основе полученных результатов предложена обобщённая модель интерпретации результатов генетического тестирования, направленная на разработку персонализированных терапевтических рекомендаций при назначении клозапина.



Влияние дисфункции гена *UBE2A*, связанной с X-сцепленной умственной отсталостью по типу Насименто, на клеточную подвижность и экспрессию генов в процессе нейрогенеза

Миронов Р.В.¹, Емец Е.В.¹, Кустова А.О.², Ульянов А.Д.¹, Кондакова Е.В.², Тарабыкин В.С.², Богомазова А.Н.¹, Лагарькова М.А.¹

¹Лаборатория клеточной биологии ФНКЦ ФХМ им. Академика Ю. М. Лопухина ФМБА России,
Москва, Россия

²Лаборатория генетики развития мозга НИИ «Нейронаук» ННГУ им. Н. И. Лобачевского

Дисфункция гена *UBE2A*, который кодирует одноимённый E2 убиквитин-конъюгирующий фермент, вызывает X-сцепленный синдром умственной отсталости по типу Насименто. К числу известных функций *UBE2A* относится участие в регуляции транскрипции, митоза, репарации ДНК, в то время как его роль в нейрогенезе остается неизвестной. Предыдущими исследованиями нашей лаборатории показано снижение экспрессии генов Rho-ROCK сигнального пути, регулирующего динамику цитоскелета. Целью нашего исследования явилась функциональная валидация этих данных путем изучения влияния нокаута гена *Ube2a* на подвижность и морфологию нейронов в процессе эмбрионального кортикогенеза мыши, для чего мы использовали электропорацию эмбрионального мозга мыши для внесения генетических конструкций для CRISPR-Cas9 опосредованного нокаута гена *Ube2a*.

Нами были получены плазмиды pX330(GFP-), pX458(GFP+) со вставкой последовательностей для синтеза гидовой РНК, комплиментарной 3-му экзону гена *Ube2A* мыши. Оценку эффективности каждой гидовой РНК проводили после электропорации мышинных фибробластов линии 3T3. В результате охарактеризованы две гидовых РНК для редактирования гена *Ube2A* мыши, выбрана гидовая РНК с максимальной эффективностью редактирования, наблюдаемой при редактировании клеток 3T3 мыши, культивируемых *in vitro*, и равной 94%. Осуществлен дизайн ПЦР с праймерами к генам *Sry* и *Sox2* для генотипирования тканевого материала мыши по полу, ПЦР оптимизирована и валидирована на тканях взрослых самцов и самок мышей. Таким образом, создана платформа для изучения влияния нокаута гена *Ube2a* на подвижность и морфологию нейронов в процессе эмбрионального кортикогенеза мыши

Результаты морфометрического анализа мигрирующих нейронов в кортексе эмбрионов самцов мыши после CRISPR-Cas9 опосредованного нокаута гена *Ube2A* будут представлены на конференции.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 21-65-00017



Разработка программного пакета для аннотации бактериальных геномов и его применение для протеогеномного профилирования клинических изолятов кишечной палочки

Михайлычева М.В., Горбачев А.Ю.

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

На данный момент существует большое количество программного обеспечения для структурной и функциональной аннотации, с различными реализациями и объектами применения. В частности, для прокариотических геномов активно используются инструменты Prokka, Bakta, PGAP и другие. Однако при аннотации когорты родственных образцов для всех инструментов в той или иной степени возникает проблема консистентности результатов – одним и тем же генам могут быть присвоены как совершенно разные идентификаторы, так и разные синонимы одного и того же идентификатора. Это влияет на последующий сравнительный анализ и повышает количество генов, которые по ошибке будут считаться уникальными для конкретного образца.

Целью данного исследования была разработка инструмента, который бы производил аннотацию набора бактериальных геномов одного вида с максимально возможной степенью полноты и точности классификации геномных элементов.

Материалы и методы. Для описания используемых в программе инструментов следует пройти по основным этапам: вначале происходит подготовка базы данных белковых последовательностей для исследуемого организма, – в данном случае тестирование производилось на данных нескольких штаммов бактерии *Escherichia coli*, – для чего использовался ресурс UniProt и пакет для проведения кластеризации белков MMseqs2; далее поиск открытых рамок считывания и функциональная аннотация производятся с помощью инструмента Bakta; после этого присвоенная кодирующим последовательностям информация перепроверяется инструментом UPIMAP, в результате чего либо присваивается идентификатор репрезентативного члена кластера, в который попадает искомый элемент, либо производится новый поиск уже по всей базе UniProtKB для предварительно кластеризованных между образцами неизвестных белковых последовательностей; конвертация из формата .gff в формат .gtf производится инструментом AGAT. Сам инструмент, вспомогательные функции, расчет статистики, составление матрицы представленности генов, конвертация форматов написаны на языке программирования Python. Для валидации результатов использовались данные полногеномного секвенирования, транскриптомов и протеомов изолятов *E.coli*, полученных у пациентов с болезнью Крона, и лабораторного штамма *E.coli* MG1655, а также набор полных сборок *E.coli*, представленных в базе данных NCBI.

Результаты. Для оценки эффективности разработанного инструмента было проведено сравнение с другими аннотаторами – Prokka, Bakta (без модификаций), DFAST, PGAP – по количеству идентифицированных кодирующих последовательностей, размеру пан- и кор- геномов. Также была произведена проверка корректности присвоения идентификаторов путем выравнивания последовательности из исследуемого генома с соответствующей последовательностью базы данных.



Экспрессия компонентов внеклеточного матрикса и белков десмосомы в зрелых дофаминергических нейронах, дифференцированных из изогенных линий ИПСК с различными аллельными состояниями гена *LRRK2*

Мухина А.А., Попик Е.А., Спасельникова А.В., Лебедева О.С.
Лаборатория клеточной биологии

Болезнь Паркинсона (БП) – второе по распространенности нейродегенеративное заболевание, вызываемое гибелью дофаминергических нейронов в компактной части черной субстанции. Частой причиной наследственной формы БП является замена G2019S в киназе LRRK2, приводящая к повышению киназной активности. Долгое время исследования БП были сосредоточены на нарушениях в функционировании дофаминергических нейронов, в то время как роль их окружения оставалась неизвестной. Однако последние данные показывают, что внеклеточный матрикс (ВКМ) играет существенную роль в развитии нервной ткани и синаптической пластичности, а изменения в его составе вносят вклад в развитие БП. Предварительно проведенный транскриптомный анализ нейронов, дифференцированных из ИПСК, показал, что гены, кодирующие белки ВКМ (*LUM*, *EFEMP1*, *COL23A1*, *COL1A1*) и десмосомы (*DSC3*, *DSP*), повышено экспрессируются в клетках пациентов с БП. В то же время гены, кодирующие белки *COL3A1* и *COL1A2*, выше экспрессируются у здоровых доноров.

Для верификации данных транскриптомного анализа мы использовали зрелые дофаминергические нейроны, дифференцированные из изогенных ИПСК с различными аллельными состояниями гена *LRRK2*.

В зрелых нейронах экспрессия *COL3A1* оказалась повышена у линии с делецией мутантного аллеля (*wt/del*), а экспрессия *DSP*, *COL23A1*, *COL2A1* и *COL1A2* – у линий с нокаутом гена *LRRK2* (*del/del*). Экспрессия *DSC3*, *LUM*, *COL23A1* и *COL1A2* показала тенденцию к повышенному уровню у линий с крайними значениями киназной активности LRRK2 (*del/del* и *mut/mut*). Для белков *COL3A1* и *DSC3* была проведена полуколичественная оценка методом Вестерн-блоттинга. Однако значимых отличий в уровне представленности белков *DSC3* и *COL3A1* в зависимости от киназной активности LRRK2 выявлено не было. Также было проведено иммуноцитохимическое окрашивание, которое не продемонстрировало значимых отличий в локализации белков интереса в разных клеточных линиях. Таким образом, проведенные эксперименты не позволили подтвердить данные транскриптомного анализа.



Функциональное исследование *RBM18* в нейрогенезе: CRISPR-Cas9-индуцированный нокаут гена в культуре клеток человека

Пикина А.С., Еремеев А.В., Богомазова А.Н.
Лаборатория трансляционной биомедицины

Нарушения развития нервной системы остаются одной из ключевых проблем медицины, и поиск генетических факторов, влияющих на этот процесс, является важным направлением исследований. Ген *RBM18* был идентифицирован как кандидат, ассоциированный с такими нарушениями, в ходе крупномасштабного экзомного анализа семейных случаев, проведенного Лондонским институтом нейробиологии на Квин-Сквер [1]. Несмотря на то, что роль *RBM18* в нейрогенезе до сих пор неизвестна, его принадлежность к семейству РНК-связывающих белков, для некоторых из которых функция в клеточных и молекулярных механизмах развития нервной системы была установлена [2, 3], указывает на потенциальную значимость этого гена в данном процессе.

Целью нашей работы стала разработка CRISPR-Cas9 системы для нокаута *RBM18* в культурах клеток человека, чтобы создать инструмент для изучения его функции. Для этого мы выбрали три варианта 20-нуклеотидных направляющих РНК (sgRNA), нацеленных на экзон гена *RBM18*. Последовательности были клонированы в плазмидный вектор pX458 с использованием *E. coli*, а корректность клонирования подтверждена секвенированием. Полученные конструкции были использованы для трансфекции клеток HEK293 с применением полиэтиленимина (PEI). Анализ результатов редактирования, проведенный с помощью секвенирования по Сэнгеру и количественной оценки инделов, показал, что все три sgRNA индуцируют нарушения в целевом локусе *RBM18*. При этом одна из направляющих РНК, которая продемонстрировала более высокую эффективность редактирования (40%), была выбрана для дальнейших экспериментов. На следующих этапах мы планируем разработать изогенную систему с нокаутом *RBM18* в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (ИПСК), что может стать полезным материалом для моделирования нейрогенеза в условиях нарушения функции данного гена.

Литература:

- [1] Wilson, K., Newbury, D. F., & Kini, U. (2023). Analysis of exome data in a UK cohort of 603 patients with syndromic orofacial clefting identifies causal molecular pathways. *Human molecular genetics*, 32(11), 1932–1942.
- [2] Hayakawa-Yano, Y., & Yano, M. (2019). An RNA Switch of a Large Exon of Ninein Is Regulated by the Neural Stem Cell Specific-RNA Binding Protein, Qki5. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), 1010.
- [3] Ding, Y., Lin, M., Wang, J., & Shang, X. (2024). RBM3 enhances the stability of MEF2C mRNA and modulates blood-brain barrier permeability in AD microenvironment. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 1871(5), 119738. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2024.119738>



Исследование механизма специфичности цитотоксического действия ингибитора сплайсинга пладиенолид Б на опухолевые клетки по сравнению с нормальными

Подлесный П.Р., Лукина М.М., Ануфриева К.С., Свирина Е.А., Шендер В.О., Арапиди Г.П.

Лаборатория системной биологии

Многие типы злокачественных опухолей характеризуются изменениями в сплайсинге РНК, поэтому терапевтические стратегии, направленные на компоненты сплайсосомы, активно исследуются. Многообещающим подходом является применение малых молекул, модуляторов сплайсинга, таких как пладиенолиды, так как эти соединения характеризуются высокой противоопухолевой цитотоксичностью, а также демонстрируют синергетический эффект при комбинированном применении с другими противоопухолевыми препаратами. Таким образом, изучение процессов, вызываемых в клетках модуляторами сплайсинга, значимо для разработки эффективной противоопухолевой терапии.

В ходе исследования мы проанализировали профили транскрипции клеток аденокарциномы яичника линии SKOV3 через 24 и 48 часов после обработки их ингибитором сплайсинга пладиенолидом Б (pl-B) в дозе 1,56 нМ. Также мы изучили профили транскрипции опухолей и нормальных тканей кишечника мышей, полученных через 18 и 24 часа после внутривентрикулярной инъекции pl-B (1 мг/кг).

Биоинформатический анализ выявил, что под воздействием pl-B в клетках SKOV3 происходит снижение экспрессии генов, участвующих в репарации ДНК, а также возникает множество событий альтернативного сплайсинга типа «пропуск экзона» и «удержание интрона». Функциональный анализ показал, что гены с такими изменениями в сплайсинге участвуют в репарации ДНК, пути нонсенс-опосредованного распада (NMD) и сплайсинге пре-мРНК. Похожие результаты были получены и на мышинной модели: pl-B привел к значительным изменениям в экспрессии генов и схожему паттерну альтернативного сплайсинга во всех экспериментальных группах, за исключением нормальной ткани кишечника мышей через 24 часа после инъекции pl-B, где эффект практически отсутствовал. Стоит отметить, что пониженная экспрессия генов, связанных с NMD, а также нарушения в сплайсинге генов репарации ДНК были характерны только для опухолевой ткани. Мы предполагаем, что изменения в этих процессах могут обуславливать специфичность действия pl-B в отношении опухолевых клеток. Данные *ex vivo* также продемонстрировали, что эффект от pl-B длится непродолжительное время, при этом клетки нормальных тканей восстанавливаются быстрее опухолевых тканей.



Подход к определению ткане-специфичности генов для целей медицинской генетики

Протасов М.А., Шарова Е.И.
Лаборатория медицинской геномики

Генетические варианты в различных генах являются основной причиной многих наследственных заболеваний [1]. Однако, не любое изменение в гене будет влиять на фенотип, в том числе вызывая заболевание. Такие ограничения делают привязку фенотипов к вариантам неизвестной значимости или, с другой стороны, привязку известных генов к определенным фенотипам открытой проблемой. Это делает определение подходов лечения или предотвращение наследования генетических заболеваний задачей, гораздо более сложной, чем она могла бы быть.

В нашей работе реализована часть решения этой задачи, а именно метод автоматической привязки генов к тканям, ошибки в функционале которых с наибольшей вероятностью приведут к повреждению или изменению функционирования ткани, как для отдельных людей, так и для групп людей в предположении, что их патологии вызваны повреждениями в одной и той же ткани. Для этого был использован поиск генов-соседей в кластерах WGCNA [2] для вычисления ранжированных метрик привязки к тканям на основе данных данных GTEx[3] и HPA[4].

Эффективность метода базовой связи была продемонстрирована на ряде генов, включая гены пути синтеза меланина и гены. Для трех основных генов пути синтеза меланина (TYR, DCT, TYRP1) максимальные метрики (0.23, 0.19, 0.17) были присвоены группе пигментных клеток из одноклеточного набора и коже из набора образцов с экспрессией отдельных тканей. Интересно отметить, что большинство генов, ассоциированных с болезнями экспансий демонстрируют максимальные метрики привязки к мозжечку и периферическим нервам, что соответствует особенностям клинической картины большинства болезней экспансий.

Литература

1. Hamosh A, Scott AF, Amberger JS, Bocchini CA, McKusick VA. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders // Nucleic Acids Res. 2005 Jan 1;33(Database issue):D514-7.
2. Langfelder P, Horvath S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis // BMC Bioinformatics. 2008 Dec 29;9:559.
3. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) Portal
4. Max Karlsson et al. A single-cell type transcriptomics map of human tissues. // Sci. Adv. 7, eabh2169 (2021).



Сравнительный анализ платформ для секвенирования Pacific Biosciences, Oxford Nanopore Technologies и Illumina при профилировании почвенных микробиомов на основе 16S рРНК

Романов М.В., Веселовский В.А., Климина К.М.

Лаборатория геномных исследований и вычислительной биологии.

Профилирование микробиомов необходимо для понимания сложной живой структуры в почве, которая играет важную роль в сельскохозяйственных системах. Оно предоставляет чрезвычайно важную информацию об экологии почвы и помогает идентифицировать микробные сообщества, указывающие на плодородие почвы и урожайность, что имеет решающее значение для развития устойчивого сельского хозяйства. Несмотря на важность профилирования почвенного микробиома, традиционные методы, такие как культивирование и ПЦР-методы, сталкиваются со значительными ограничениями. Одной из основных проблем является высокое разнообразие в почвенных микробных сообществах, что затрудняет идентификацию и мониторинг реакции микроорганизмов на различные методы воздействия. Последние достижения в области технологий высокопроизводительного секвенирования, особенно Pacific Biosciences (PacBio) и Oxford Nanopore Technologies (ONT), предлагают секвенирование с длинными прочтениями, что улучшает анализ микробных сообществ. Однако их относительная эффективность и пригодность для изучения почвенного микробиома остаются малоизученными.

В данной работе мы сравнили три основные платформы секвенирования - PacBio, ONT и Illumina - для анализа бактериального разнообразия в образцах из трех разных типов почв, ДНК которых было получено в результате одного выделения, путем секвенирования гена 16S рРНК. Используя глубину 10, 20, 25 и 35 тысяч прочтений на образец, мы отметили, что PacBio продемонстрировала большую чувствительность в обнаружении видов бактерий, особенно в группах с низкой численностью (<1% от общего количества чтений), по сравнению с ONT. Значения альфа-разнообразия для PacBio и ONT статистически значимо не различались и выходили на плато при достижении 35000 прочтений. Анализ бета-разнообразия выявил согласованность платформ в кластеризации почвенных групп, за исключением региона V4 гена 16S рРНК на Illumina, где различия между группами были статистически незначимы ($P = 0,79$). Эти результаты позволяют говорить о том, что выбор платформы может влиять на получаемые данные о микробных сообществах, однако все они пригодны для выявления групп среди образцов.



SRSF-ЗАВИСИМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СПЛАЙСИНГА ПРИ АЦИДОЗЕ

Рубцов П.В., Шторк А.С., Иванова О.М., Павлова Ю.И., Сурдина А.В., Варижук А.М.

Лаборатория структуры и функций биополимеров

Ядерные спеклы представляют собой немембранные органеллы, наблюдаемые в интерфазе и включающие SR-богатые факторы сплайсинга (SRSF) в качестве основных компонентов. Они формируются по механизму разделения фаз “жидкость-жидкость” (англ. LLPS) за счет локальной аккумуляции SRSF, а также малых ядерных рибонуклеопротеинов, обеспечивая контроль их доступности/активности и в итоге – контроль альтернативного сплайсинга. В норме спеклы являются рыхлыми образованиями, что соответствует низкой эффективности LLPS и возможности высвобождения SRSF. Изменения морфологии ожидаются при опухолю-ассоциированном ацидозе, хотя прямые доказательства pH-чувствительности спеклов ранее получены не были. Прояснение этого вопроса важно для понимания вторичных патологических процессов в раковых клетках.

Цель работы заключалась в изучении pH-зависимости спеклов и выяснении механизма нарушений альтернативного сплайсинга при ацидозе. В модели ацидоза на клеточных линиях, зафиксированных в G2-фазе с помощью ингибитора CDK1 RO-3306, исследовали изменения морфологии спеклов. Используя нуклеотропный оптический pH-сенсор, подтвердили закисление нуклеоплазмы после обработки клеток буфером с pH 6 и ионофорами. Морфологию оценивали методом флуоресцентной микроскопии. Обнаружили, что слабокислая среда вызывает уплотнение спеклов, аналогичное уплотнению при дефосфорилированию SRSF. Было подтверждено, что причиной уплотнения спеклов при pH 6 является снижение растворимости SRSF из-за протонирования остатков фосфосерина. Следующим шагом стала проверка нарушений сплайсинга при удержании SRSF в уплотненных спеклах.

Предварительную выборочную проверку нарушений сплайсинга проводили на примере транскриптов генов *MTMR14*, *MYO1B* и *PKM*. Первый кодирует фосфатидилинозитол-3-фосфатазу, дисбаланс изоформ которой ассоциирован с нарушением динамики мембран, внутриклеточного транспорта и сигналинга. Второй кодирует моторный белок миозин, соотношение изоформ которого определяет межклеточные контакты и контакты мембраны с цитоскелетом. Третий кодирует пируваткиназы PKM1 и PKM2, дисбаланс которых ассоциирован с нарушениями энергетического обмена клетки. Выбор транскриптов обусловлен литературными данными по SRSF-зависимости сплайсинга и роли мис-сплайсинга в онкогенезе. Соотношение транскриптов в клетках модельной линии HEK-293 в норме и в условиях мягкого ацидоза анализировали методом ОТ-ПЦР. Одновременно отслеживали уровень контрольных транскриптов – регуляторов сплайсинга, экспрессия которых по литературе не зависит от pH. Наблюдали значимые изменения соотношения целевых транскриптов – в особенности кодирующих изоформы миозина, но не контролей. Таким образом, предварительные данные подтверждают SRSF-зависимые изменения сплайсинга при ацидозе. Для интегральной характеристики изменений проводится полный транскриптомный анализ.



Создание генетических конструкций с повышенным уровнем репрессии для тестирования токсичных рекомбинантных генов в *Escherichia coli*.

Русавский Н.Р., Бобровский П.А.

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

Экспрессия токсичных пептидов в бактериях связана с серьезными трудностями, сопряжёнными как с гибелью клеток после индукции экспрессии, так и с тем, что репрессия транскрипции в бактериальной клетке никогда не является полной даже при использовании специализировано сконструированных для этого промоторно-регуляторных областей [1].

Нами был разработан новый подход для подавления базальной экспрессии рекомбинантных генов, основанный на технологии CRISPR/Cas9. Он заключается в модификации плазмиды, кодирующей токсический продукт, прямо в процессе культивирования бактерий *Escherichia coli*. Плазмиды, сконструированные нами на основе плазмид серии pET, несут дополнительный участок ДНК между промотором и кодирующей частью гена, содержащий терминатор транскрипции. В результате, в процессе транскрипции происходит abortивный синтез мРНК и продукт экспрессии гена оказывается не функциональным [2]. При активации системы CRISPR/Cas9 терминаторный участок ДНК выщепляется из плазмиды, таким образом, восстанавливается структура гена, кодирующего целевой белок.

Чтобы реализовать подобную систему, использовали две плазмиды: модифицированную плазмиду pET-22b, несущую токсичный ген и вспомогательную плазмиду pEcCas-N20, несущую гены системы CRISPR/Cas9. В качестве модельного токсичного гена был использован ген левансуказы – *SacB*, продукт которого вызывает гибель бактериальных клеток при культивировании в среде, содержащей сахарозу. Нами были протестированы терминаторные последовательности *tt2*, *rrnB*, *h1*, взятые из литературных источников, а также гибридный терминатор *rh1*, состоящий из *rrnB* и *h1*. В ходе эксперимента, клетки *E. coli* BL21(DE3)gold/pECCasN20 трансформировали сконструированными плазмидами серии pET. Далее клетки высевали на агаризованную среду с добавлением 3% сахарозы как в присутствии, так и в отсутствии индуктора IPTG. Клетки инкубировали при 30°C 48 ч. с последующим подсчетом КОЕ.

В результате, работоспособной оказалась конструкция с терминатором *rh1*. На среде, содержащей сахарозу, выросло 143 ± 9 КОЕ, на среде, содержащей сахарозу и IPTG 11 ± 1 КОЕ, что составляет 23% и 2% от контроля соответственно. При использовании остальных конструкций роста бактерий не наблюдалось, вне зависимости от наличия индуктора, что говорит об их неработоспособности в данных условиях.

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

Литература:

- [1] Sørensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*. 2005;115(2):113-128.
- [2] Saïda F. Overview on the expression of toxic gene products in *Escherichia coli*. *Curr Protoc Protein Sci*. 2007;Chapter 5.



УФ микроскоп для исследования биотканей в области 210-500 нм

Сариева Д.О.^{1,3}, Крашенинников В.Н.², Иванов В.А.⁴, Беспятых Ю.А.⁴, Вайнер Ю.Г.²

¹Лаборатория прикладных биомедицинских микросистем ФНКЦ ФХМ им. Лопухина ФМБА России

²Лаборатория электронных спектров молекул Института спектроскопии РАН

³Лаборатория спектроскопии перспективных материалов Института спектроскопии РАН

⁴Лаборатория молекулярной медицины ФНКЦ ФХМ им. Лопухина ФМБА России

Возможности оптической микроскопии биологических тканей в нативных условиях сильно ограничиваются высокой прозрачностью большинства биологических объектов в ближней УФ, видимой и ближней ИК областях спектра и близостью значений коэффициента преломления воды и большинства фрагментов биологических тканей в этих областях. Для преодоления указанной трудности применяют окраску тканей, в частности, фрагментов клеток, специальными красителями, что приводит к изменению свойств и функционирования изучаемых объектов. Другим выходом может служить переход в дальнюю УФ область спектра, однако интенсивность обычно используемых источников излучения на основе ксеноновых и водородных ламп резко падает при переходе в область 250-200 нм [1]. В последнее время для УФ микроскопии стали использовать УФ светодиоды, однако они излучают в узких участках спектра и не позволяют проводить измерения в области короче 250 нм [2].

В докладе сообщается о создании УФ микроскопа на основе нового источника света высокой яркости, излучающего в широкой области спектра от ближнего ИК диапазона до вакуумного УФ. Рассматривается принцип действия и устройство указанного источника света, сообщается о результатах исследования его энергетических и спектральных параметров. Рассматривается оптическая схема и конструкция созданного микроскопа. Приводятся результаты применения микроскопа для различных целей биомедицины: получения контрастных микрофотограмм растительной клетки, срезов тканей кишечника человека, пораженного вирусом Эпштейна-Барр, цитомегаловирусом, токсигенным штаммом *C. Difficile*, эритроцитов и лейкоцитов в мазке крови без применения красителей; изучения распределения веществ внутри клетки и получения спектров поглощения отдельных ее компонентов; визуализации процесса гемолиза эритроцитов в реальном времени. Обсуждаются перспективы применения созданного УФ микроскопа для исследования биологических тканей и диагностики заболеваний.

[1] J. Hatfield et al. Exp Cell Res 1970, doi: 10.1016/0014-4827(70)90659-2

[2] V. Gorti et al. Biomedical Optics Express 2023, doi: 10.1364/BOE.482294



Разработка протокола и дизайн белков для энзиматического синтеза олигонуклеотидов

Семенов А.А., Горбачев А.Ю.

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

Синтезированные *de novo* олигонуклеотиды являются неотъемлемым компонентом для ряда медицинских и исследовательских задач - ПЦР-диагностики заболеваний, геномного редактирования, сборки искусственных генов. Однако, используемый на текущий момент времени фосфорамидитный метод химического синтеза олигонуклеотидов имеет ряд ограничений, наиболее важными из которых являются точность и предельная длина синтезируемого фрагмента. В связи с этим существует необходимость разработки и оптимизации протоколов энзиматического синтеза, потенциально устраняющих данные ограничения и открывающие новые возможности - хранение информации в виде ДНК, *de novo* сборки не только отдельных генов, но и геномов.

Целью данного исследования являлась разработка лабораторного протокола энзиматического синтеза коротких олигонуклеотидов.

Материалы и методы исследования. После сбора информации из открытых источников [2] и патентов коммерческих компаний были выявлены основные методики энзиматического синтеза - метод полимеразно-нуклеотидных конъюгатов, метод динамической гибридизации, циклическое обратимое терминирование с помощью 3'-блокированных нуклеотидов. На основании ряда критериев и ограничений последний был выбран в качестве основного метода при разработке лабораторного протокола.

В качестве основного фермента для тестирования лабораторного протокола была выбрана терминальная трансфераза *Zonotrichia albicollis* (ZaTdT) обладающая, по литературным данным [1], каталитической активностью относительно 3'-ONH₂-блокированных dNTP в три порядка превосходящей широко используемой терминальной трансферазы *Mus musculus* (MmTdT). Для повышения скорости реакции синтеза и стабильности фермента при помощи Fireprot 2.0, RFdiffusion и RoseTTAFold были смоделированы термостабильные варианты белков ZaTdT и MmTdT. Последовательность гена ZaTdT-R335L-K337G была синтезирована *de novo*, последовательность гена MmTdT получена из тканей тимуса мыши линии C57Black/6, после чего обе последовательности в составе плазмиды pET28a(+) были заклонированы в экспрессионный штамм *E.coli* BL21(gold) методом химической трансформации. Методика оценки качества синтеза и активности терминальной трансферазы проводилась при использовании коммерческой версии TdT и включала в себя метод синтеза на основе биотинилированных олигонуклеотидов с вариативной концевой последовательностью, метод полиакриламидного гелевого электрофореза высокого разрешения (HR-PAGE) и метод капиллярного электрофореза с флуоресцентным детектированием.

Результаты. Был составлен тестовый протокол энзиматического синтеза, смоделированы термостабильные и dNTP-O(NH₂)-специфичные варианты ZaTdT, отработана методология оценки качества синтеза и активности терминальной трансферазы.

Литература:

[1] Xiaoyun Lu et al. ACS Catal. 2022.

[2] Hoose A. et al. Nat. Rev. Chem. 2023.



Идентификация и функциональная характеристика новых антимикробных пептидов медицинской пиявки с помощью экспрессии кодирующих их генов в *Escherichia coli*.

Серебренникова М.Ю., Бровина К.А., Лазарев В.Н.

Лаборатория генной инженерии

В условиях глобального распространения инфекционных заболеваний, разработка инновационных терапевтических средств с уникальными механизмами действия становится приоритетной задачей современной науки. Особое внимание привлекают антимикробные пептиды (АМП) – ключевые компоненты врожденного иммунитета, демонстрирующие широкий спектр активности против разнообразных инфекций [1]. Настоящее исследование посвящено поиску и функциональному анализу новых АМП медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis*). Сложная система защиты пиявки от потенциальных патогенов подчеркивает ее ценность как источника новых антимикробных средств с уникальными механизмами действия.

Мы представляем результат тестирования антимикробной активности новых потенциальных антимикробных пептидов медицинских пиявок, обнаруженных с помощью BLAST-анализа всех белок-кодирующих участков генома *Hirudo medicinalis*. Из большого числа выявленных кандидатов для дальнейшей проверки были отобраны 10 новых последовательностей, предположительно кодирующих АМП. Среди них пять последовательностей, демонстрирующих гомологию с люмбрицинами, четыре – с нейромацинами и одна – с теромацином. Обнаруженные возможные АМП имели длину от 54 до 83 а.о., что затрудняет их получение путем химического синтеза. Поэтому для эффективного анализа их антимикробной активности мы использовали разработанную нами систему первичного скрининга, основанную на экспрессии рекомбинантных генов АМП в *Escherichia coli* [2].

Полученные результаты показали заметные различия в активности исследуемых соединений. На основании степени подавления роста бактерий все протестированные пептиды были разделены на три группы. LBr, относящийся к семейству люмбрицинов, и Nrl1, относящийся к нейромацинам, продемонстрировали самую высокую антимикробную активность, сравнимую с активностью широко известного АМП – мелиттина. Остальные пептиды из семейства мацинов продемонстрировали умеренные антимикробные свойства, в то время как другие гомологи люмбрицина, включая PP14, идентичный последовательности LBr-HM, ранее описанной для люмбрицина из медицинской пиявки, не проявили антимикробной активности в исследуемых условиях.

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

Литература:

[1] A. Moretta et al. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2021, doi: 10.3389/fcimb.2021.668632

[2] E.N. Grafksaia et al. *Applied Biochemistry and Microbiology* 2025, doi: 10.1134/S0003683824606292



Влияние замены Gly2019Ser в киназе LRRK2 на состав внеклеточного матрикса на разных этапах нейрональной дифференцировки

Спасельникова А.В., Попик Е.А., Мухина А.А., Лебедева О.С.

Лаборатория клеточной биологии

Болезнь Паркинсона (БП) – второе по распространенности нейродегенеративное заболевание, поражающее 1-2% людей старше 65 лет и 4% старше 85 лет и характеризующееся гибелью дофаминергических нейронов (ДАН) черной субстанции среднего мозга, образованием телец Леви, содержащих патологический альфа-синуклеин, а также симптомами: брадикинезией, тремором, ригидностью мышц, постуральной неустойчивостью, депрессией и деменцией. Мутация в гене *LRRK2* – наиболее частая причина наследственной БП, встречающаяся и в спорадических случаях. Большинство мутаций повышают активность киназы LRRK2. Наиболее изученная мутация 6055G>A приводит к замене Gly2019Ser и связана с аутосомно-доминантной формой БП.

Клеточные модели на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) пациентов позволяют изучать ранние этапы дифференцировки ДАН, механизмы нейродегенерации и тестировать потенциальные терапевтические подходы. Особый интерес представляет исследование роли внеклеточного матрикса (ВКМ), который регулирует нейрогенез, синаптическую пластичность и гомеостаз мозга. Изменения в составе ВКМ могут ускорять нейродегенерацию, однако его вклад в патогенез БП изучен недостаточно.

Цель нашей работы – анализ экспрессии белков ВКМ в культурах нейроэпителлия, нейрональных предшественников и зрелых ДАН, полученных из изогенных линий ИПСК с мутацией 6055G>A в гене *LRRK2*. Уровень мРНК оценивали методом количественной ОТ-ПЦР, а экспрессию белков – Вестерн блоттингом и иммуоцитохимическим окрашиванием.

Мы выявили различия в экспрессии белков ВКМ между клетками здоровых доноров и клетками с мутацией 6055G>A уже на стадии ИПСК. Также выявлены изменения экспрессии генов в процессе дифференцировки, что указывает на ремоделирование ВКМ при развитии дофаминергических нейронов. Эти данные подчеркивают важность изучения патологических изменений при наследственных формах БП на этапе эмбриогенеза.

Исследование выполнено при поддержке гранта 075-15-2019-1669 Министерства науки и высшего образования.



ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ФОРМИРОВАНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ИНГИБИТОРУ СПЛАЙСИНГА пре-мРНК ПЛАДИЕНОЛИДУ Б У КЛЕТОК РАКА ЯИЧНИКА

Стекольников П.А.¹, Свирина Е.А.¹, Лукина М.М.¹, Гончаров А.О.¹, Смирнов И.П.¹, Лагарькова М.А.¹,
Говорун В.М.³, Арапиди Г.П.^{1,2}, Шендер В.О.^{1,2}

лаборатория молекулярной онкологии

¹ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю. М. Лопухина ФМБА России, Москва, Россия

*²Институт биоорганической химии им. Шенякина-Овчинникова Российской академии наук,
Москва, Россия*

³Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины, Москва, Россия

Рак яичников – заболевание, которое демонстрирует один из самых высоких уровней смертности в гинекологии, проявляя при этом особую агрессивность. Традиционно, при лечении данного типа рака используются препараты платиновой группы, механизм действия которых заключается в повреждении ДНК. Однако в популяции клеток аденокарциномы яичников быстро появляются нечувствительные к данной терапии клетки. В связи с этим актуальной задачей является поиск новых подходов по терапии данного заболевания.

Ранее нашей группой было показано, что прединкубация клеток с ингибитором сплайсинга пре-мРНК пладиенолидом Б повышает чувствительность клеток аденокарциномы яичников к последующему повреждению ДНК. Однако механизм данного синергетического эффекта остается не до конца изученным. С целью выяснения подробностей цитотоксического действия пладиенолида Б через устанавливающиеся в резистентных клетках компенсаторные реакции, нами была создана клеточная линия SKOV3, устойчивая к ингибитору сплайсинга. Данная линия выводилась в течение 4 месяцев. Клетки инкубировали в присутствии пладиенолида Б, начиная с концентрации IC10=0,5 nM и постепенно увеличивая дозу до IC50=12 nM. В результате у резистентных клеток было установлено возрастание значения IC50 до 119,9 nM.

Для выявления особенностей резистентных опухолевых клеток был проведен протеомный анализ чувствительных и резистентных к пладиенолиду Б клеток SKOV3. Было установлено, что по сравнению с чувствительными клетками в резистентных клетках значительную часть дифференциально представленных белков занимают участники метаболических путей. Наряду со снижением представленности ферментов катаболизма глюкозы было показано увеличение представленности ферментов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), задействованных в обрабатывающих ЦТК реакциях. В условиях угнетения катаболизма глюкозы данный компенсаторный механизм может обеспечивать восполнение интермедиатов ЦТК через аминокислоты, поддерживая энергетический баланс через синтез жирных кислот.

С помощью флуоресцентного окрашивания митохондрий были показаны изменения в их расположении и морфологии, что свидетельствует о функциональных преобразованиях, которые могут быть связаны с установленным по данным протеомного анализа изменением протекающих в митохондриях метаболических реакций.

Полученная резистентная клеточная линия SKOV3 будет использоваться в ходе дальнейшего исследования с целью уточнения механизма цитотоксического эффекта пладиенолида Б.



Разработка прототипа микрофлюидной системы "лёгкое-на-чипе" для моделирования гематоальвеолярного барьера.

Столяров В.Ю.¹, Прусаков К.А.¹, Жукова О.А.², Баклаушев В.П.², Басманов Д.В.¹

¹Лаборатория прикладных биомедицинских микросистем ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

²"Научно-исследовательский институт пульмонологии" ФМБА России

"Органы-на-чипе" – микрофлюидные устройства, имитирующие физиологические, механические и клеточные свойства органов. Они используются для исследования различных патофизиологий и тестирования лекарственных препаратов.

В данной работе рассматривается один из подклассов этих устройств, "лёгкое-на-чипе" (ЛНЧ), имитирующее гематоальвеолярный барьер (газожидкостный интерфейс) лёгочной альвеолы человека [1, 2]. Чаще всего ЛНЧ представляет собой две проточные камеры, разделенные пористой мембраной с нанесенными на неё клетками.

Цель работы – изготовление ЛНЧ. Оно должно быть разборным, биосовместимым, стерильным, как можно более тонким для возможности наблюдения в конфокальный и флуоресцентный микроскопы, и иметь систему доставки клеток внутрь чипа на мембрану, наподобие катетеров. Также, необходимо изготовить мембрану из полидиметилсилоксана (ПДМС) толщиной <10 мкм и диаметрами отверстий <10 мкм, которая и будет использоваться для изучения различных аспектов физиологии гематоальвеолярного барьера.

Разработан чип, удовлетворяющий значительной части указанных требований. Основная часть его корпуса напечатана на фотополимерном LCD 3D-принтере. Также изготовлен прототип ПДМС-мембраны. Перфорация на ней сделана методом абляции с помощью фемтосекундного лазерного источника.

Предполагается, что устройство станет востребованным для исследований гематоальвеолярного барьера, скрининга лекарственных препаратов и изучения последствий баротравмы для нужд водолазной и арктической медицины.

Литература:

[1] Huh D et al. Science 2010, doi: 10.1126/science.1188302

[2] Жукова О.А. et al. Клиническая практика 2024, doi: 10.17816/clinpract637140



Разработка LAMP-теста для скрининга культур эукариотических клеток, культивируемых *in vitro*, на микоплазменную контаминацию

Ульянов А.Д.¹, Галямина М.А.², Побегуц О.В.², Богомазова А.Н.¹

¹Лаборатория клеточной биологии

²Лаборатория протеомного анализа

Культивирование эукариотических клеток *in vitro* сопряжено с риском их контаминации микоплазмами нескольких видов *Mycoplasma arginini*, *M. fermentans*, *M. hominis*, *M. hyorhina*, *M. orale* и *Acholeplasma laidlawii*. Микоплазменная контаминация приводит к искажению результатов экспериментов, снижению воспроизводимости и, нередко, к значительным финансовым потерям. В связи с этим клеточные культуры регулярно проходят проверку на наличие микоплазм. Наиболее популярный метод скрининга микоплазменной контаминации основан на выявлении ДНК микоплазм с помощью ПЦР, также используют микроскопическое выявление микоплазмы. Технология LAMP (англ., Loop-mediated Isothermal Amplification) представляет собой перспективную альтернативу для скрининга, т. к. она позволяет амплифицировать ДНК значительно быстрее и при постоянной температуре, что исключает необходимость использования дорогостоящего оборудования, такого как термоциклеры. Целью настоящего исследования было изучить видовую представленность микоплазм в клеточных культурах, разработать тест на основе LAMP для скрининга микоплазменной контаминации и оценить его чувствительность при различных способах выделения ДНК в сравнении с классической ПЦР и микроскопией при искусственном заражении микоплазмой *M. hominis* клеток аденокарциномы простаты LnCap, культивируемых *in vitro*.

В рамках исследования мы выделили тридцать один образец микоплазмы из клеточных культур, культивировавшихся в четырех лабораториях трех московских институтов. Для видовой идентификации использовали секвенирование по Сэнгеру участка гена 16S рПНК. Это позволило нам определить, что во всех проанализированных образцах содержится *M. hyorhina*. Мы подобрали праймеры для LAMP к консервативному участку гена 23S рПНК, которые позволяют выявлять ДНК микоплазм *M. hyorhina*, а также *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. hominis*, *M. orale*. Мы показали, что микроскопический метод детекции является наименее чувствительным. Также мы показали, что разработанный LAMP-тест с выделением ДНК экспресс-методом из культуральной среды является быстрой и чувствительной альтернативой классическому ПЦР с выделением геномной ДНК сорбционным методом.



Оптимизация и применение протокола подготовки кДНК библиотек для секвенирования на платформе MGISEQ последовательностей Т-клеточных рецепторов

Уразаева Д.Р.^{1,2}, Трусов Н.В.^{1,3}, Горбачев А.Ю.¹

¹Лаборатория протеомного анализа ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва

²Московский физико-технический институт (НИУ), Москва

³ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», Москва

В адаптивном иммунном ответе организма важную роль играет разнообразие Т-клеток, способных за счет своих высоковариабельных аминокислотных последовательностей рецепторов (TCR) узнавать широкий класс антигенов. Исследование репертуаров TCR методами высокопроизводительного секвенирования позволяет изучать иммунологическую норму и патологию для многих заболеваний.

В процессе приготовления кДНК-библиотек для TCR-секвенирования от эффективности реакции переключения матрицы в процессе синтеза кДНК зависит число детектируемых уникальных CDR3 клонотипов, поэтому целью данной работы стала оптимизация условий реакции обратной транскрипции с переключением матрицы.

Для получения кДНК библиотек из образцов РНК клеток крови здоровых доноров была применена методика 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends), основанная на панели Mamedov et al. [1], адаптированная нами для технологии секвенирования MGISEQ.

Для оптимизации протокола были протестированы следующие параметры синтеза кДНК: использование разных по последовательности цепь-инвертирующих олигонуклеотидов, варьирование соотношений дезоксирибонуклеотидтрифосфатов по методике [2], увеличение длительности инкубации и тестирование разных crowding-агентов для повышения локальной концентрации компонентов в смеси.

В результате данной работы удалось повысить эффективность реакции переключения матрицы при синтезе кДНК в протоколе подготовки библиотек для TCR-секвенирования и увеличить на два порядка число детектируемых уникальных клонотипов, что сопоставимо с лучшими опубликованными методиками TCR-секвенирования на других платформах [3].

Для функционального анализа применимости оптимизированной методики по результатам TCR-секвенирования было проведено профилирование репертуара Т-клеточных рецепторов мышей C57BL/6 из эксперимента по моделированию индуцированного воспаления кишечника. Изменение репертуара TCR мышей показало наличие иммунного ответа на воспаление тканей кишечника, подтверждаемое другими методами. Полученные с применением данной методики результаты показывают ее применимость для профилирования Т-клеточного репертуара не только образцов человека, но и образцов мышей.

Литература:

- [1] Mamedov I. Z. et al. (2013) Preparing unbiased T-cell receptor and antibody cDNA libraries for the deep next generation sequencing profiling, Front Immunol, 4: 456.
- [2] Lin W. (2019) Template-Switching Enhances Primer Extension Analysis of Transcription Start Sites, UC San Diego.
- [3] Barennes P. et al. (2021) Benchmarking of T cell receptor repertoire profiling methods reveals large systematic biases, Nat Biotechnol, 39: 236-245.



Полилактидные скаффолды, полученные методом термически индуцированного фазового расслоения

Шаталов Д.Д., Москалец А.П., Клинов Д.В.
Лаборатория медицинских нанотехнологий

Полимерные скаффолды (3D-матрицы) - это трёхмерные пористые твёрдые биоматериалы, которые используются в тканевой инженерии для восстановления и замены тканей, благодаря тому, что могут имитировать внеклеточный матрикс. В качестве биосовместимых полимеров для их изготовления часто используются полилактид, полигликолид, поликапролактон и др.

Известно несколько способов получения данных структур, среди которых отметим электроспиннинг, термически индуцированное фазовое расслоение (TIPS), метод высаживания осадителем (NIPS), вспенивание газом.

В данной работе рассматривается метод TIPS для получения скаффолдов, поскольку он обладает определенными преимуществами перед другими методами при изготовлении объемных пористых структур, а именно: формирование непрерывно связанной пористой сети, простота, контролируемость и масштабируемость процесса [1]. Согласно литературным данным для TIPS применяются такие растворители как диметилсульфоксид, 1,4-диоксан и тетрагидрофуран. Ацетон, как было нами обнаружено, обладает определенными особенностями фазового разделения: изменяя состав раствора, можно добиваться получения структур различной морфологии, что может быть полезно при подборе оптимальных условий для адгезии разных типов клеточных культур.

В настоящей работе с целью получения биосовместимых и биоразлагаемых 3D - матриц изучена термодинамическая система "полилактид - ацетон", построена фазовая диаграмма в зависимости от концентрации полимера, методом СЭМ охарактеризована морфология получаемых в результате скаффолдов, их пористость и характерный размер частиц. Данные результаты могут использоваться при создании биоматериалов в регенеративной медицине и тканевой инженерии.

Литература:

[1] Martinez-Perez CA, Olivas-Armendariz I, Castro-Carmona JS, Garcia-Casillas PE. Scaffolds for tissue engineering via thermally induced phase separation. doi: 10.5772/ 25476.



Разработка функциональных покрытий на основе полностью активированной N-гидроксисукцинимидом акриловой кислоты для микрофлюидного оптического биосенсора

Шафоростов А.И.¹, Чинарев А.А.², Сизова С.В.^{1,2} и Басманов Д.В.¹

¹Лаборатория прикладных биомедицинских микросистем ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России; ²ГНЦ ИБХ им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН

Надёжная модификация чувствительной поверхности биосенсора – ключевой этап при создании платформ для высокочувствительной детекции биомолекул и биомолекулярного взаимодействия. В данной работе для модификации чувствительной поверхности микрофлюидного оптического безмаркерного биосенсора на поверхностных волнах в одномерном фотонном кристалле (ПВФК) предложены полимеры на основе акриловой кислоты, полностью активированной N-гидроксисукцинимидом (pNAS).

Были исследованы различные схемы модификации поверхности фотонного кристалла (ФК): активация в плазме воздуха с последующей модификацией 3-аминопропилтриэтоксисилоном (АПТЭС) и затем ковалентное связывание pNAS с аминогруппами АПТЭС; активация в плазме воздуха и модификация pNAS без предварительного формирования поверхностных аминогрупп [1]. Параметры нанесения pNAS (время инкубации и температура) также варьировались.

Исследование сорбционной емкости разрабатываемых покрытий на основе pNAS проводили с помощью ПВФК-биосенсора EVA 3.0 (PCbiosensors, Россия). Высоту полимерного слоя и равномерность покрытий исследовали методом атомно-силовой микроскопии в жидкой фазе.

Сравнительный анализ различных подходов к подготовке поверхности ФК показал, что наиболее стабильные и воспроизводимые покрытия формируются при нанесении pNAS на активированную поверхность ФК без предварительной модификации АПТЭС при температуре 60°C в течение 40 мин.

Разработанные покрытия были апробированы для детекции иммуноглобулинов IgE к Gal d3 (белок куриного яйца с ММ 66-78 кДа) в сыворотке крови в низкодозовой модели аллергии на мышах, проведены сравнительные исследования сорбционной емкости с двумерным покрытием на основе АПТЭС. Разработанные покрытия рекомендованы для дальнейшей разработки мультиплексных диагностических платформ, которые являются экономичной и эффективной альтернативой традиционным ИФА-системам.

Литература:

[1] S.V. Sizova et al. Polymers 2022, doi: 10.3390/polym14010152



Роль активирующих рецепторов NK клеток в их ответе на аутологичные фибробластоподобные производные ИПСК

Шерман Д.К., Богомякова М.Е., Емец Е.В., Богомазова А.Н., Лагарькова М.А.
Лаборатория клеточной биологии

Персонализированные клеточные продукты, полученные из ИПСК пациента, теоретически должны быть иммунологически совместимы с реципиентом, однако наши предыдущие исследования показали, что фибробластоподобные производные ИПСК (iPS-fibro) остаются уязвимыми к атаке аутологичных NK-клеток. Это связано с дисбалансом поверхностных лигандов, а именно: мы наблюдали в iPS-fibro повышенную экспрессию активирующих молекул MICA, являющихся лигандом NK-клеточного рецептора NKG2D, PVR и NECTIN2 (лиганды DNAM-1).

В данной работе мы при помощи геномного редактирования CRISPR/Cas9 создали iPS-fibro с нокаутами генов активирующих лигандов *NECTIN2*, *PVR* и *MICA*, чтобы определить какой из них вносит наибольший вклад в NK-клеточный ответ. Иммунный ответ NK-клеток, выделенных из крови здоровых доноров, оценивали по уровню экспрессии маркера дегрануляции – CD107a (LAMP-1)

Наши исследования демонстрируют, что блокирование рецептора NKG2D антителами существенно подавляет иммунный ответ как аллогенных, так и аутологичных NK-клеток на iPS-fibro, подтверждая центральную роль этого рецепторного пути в активации цитотоксической реакции. Однако нокаут гена *MICA*, кодирующего основной лиганд NKG2D, не вызвала значимого снижения иммунного ответа, что свидетельствует о компенсаторных механизмах в этом сигнальном пути и недостаточности воздействия на единственную мишень. Несмотря на отсутствие эффекта от блокировки рецептора DNAM-1 антителами и нокаутов его лигандов (*NECTIN2* и *PVR*), мы наблюдали неожиданное усиление иммунного ответа при нокауте *NECTIN2*, что может указывать на его потенциальную ингибирующую функцию у фибробластов..

Полученные результаты свидетельствуют о сложной и нелинейной регуляции активации NK-клеток, где рецептор NKG2D играет ключевую роль в переключении NK-клеток с состояния анергии на активацию цитотоксической программы против iPS-fibro. В то же время, генный нокаут важнейшего лиганда этого рецептора не является достаточным для снижения иммунного ответа NK-клеток.

Работа поддержана грантом РФФИ № 24-65-00044.