

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства»

Итоговая научно-практическая конференция 2025

ТЕЗИСЫ ПОСТЕРНЫХ ДОКЛАДОВ

20-21 января 2026 года

МУЛЬТИОМНЫЙ АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ПРИ ТРОЙНОМ НЕГАТИВНОМ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Барисёнок А. В.^{1, 2}, Горбачёв А. Ю.²

¹Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет)

²Лаборатория протеомного анализа ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

Тройной негативный рак молочной железы (ТНРМЖ) характеризуется агрессивным клиническим течением, высокой пролиферативной активностью и выраженной молекулярной гетерогенностью. Целью данного исследования является мультиомный интегративный анализ ТНРМЖ.

В исследование включены 28 образцов ТНРМЖ и нормальные контрольные ткани. Использованы данные RNA-seq, протеомики и секвенирования всего экзома, а также транскриптомные данные TCGA-BRCA. Обработка RNA-seq и протеомных данных выполнена с применением пайплайнов nf-core. Дифференциальная экспрессия генов и белков оценивалась с помощью DESeq2 и MSstats. Соматические варианты выявлялись с помощью mutect2, оценка копийности — с использованием ASCAT. Аннотация соматических вариантов выполнялась с применением pcgr, герминальных — cpr. Иммунная инфильтрация оценивалась по данным RNA-seq методом CIBERSORTx.

Анализ клинических данных выявил значимые взаимосвязи между возрастом пациентов, пролиферативной активностью и иммунной инфильтрацией. У пациенток младше 50 лет наблюдался более высокий уровень Ki67, а у пациенток младше 60 лет — более высокий уровень TILs. Опухоли степени злокачественности G2 чаще соответствовали возрастной группе ≥ 50 лет. Анализ патогенных герминальных мутаций показал снижение их среднего числа у пациентов старше 65 лет.

Интеграция данных транскриптома, протеома, соматических мутаций и копийности генов позволила сформировать список генов с согласованными нарушениями на нескольких молекулярных уровнях. Отбор генов основывался на наличии изменений как минимум в двух типах данных с дополнительной фильтрацией по величине эффекта, принадлежности к пикам CNV и наличию повторяющихся мутаций. Для полученного набора генов был выполнен анализ функционального обогащения, что позволило идентифицировать ключевые сигнальные и биологические пути.

Интеграция различных разделений по типам и клинических данных выявила, что подтип LAR выделялся и характеризовался пониженным уровнем Ki67 и TILs и преобладанием степени злокачественности G2.

1. Ewels P. [et al.]. The nf-core framework for community-curated bioinformatics pipelines // Nat. Biotechnol. 2020. V. 38(3). P. 276–278.
2. 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.
3. 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.
4. Национальный институт рака. The Cancer Genome Atlas (TCGA) [Электронный ресурс]. — URL: <https://www.cancer.gov/tcga> (дата обращения: 03.03.2025).

ПОЛУЧЕНИЕ ПАНКРЕАТИЧЕСКИХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ИЗ ГИПОИММУНОГЕННЫХ ИПСК С НОКАУТОМ ГЕНА *B2M*

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

Лаборатория клеточной биологии

Согласно последним прогнозам, к 2030 году число пациентов с сахарным диабетом в мире может достичь 643 млн человек. В настоящее время для лечения инсулин-дефицитных состояний применяются несколько подходов: инсулиновтерапия, трансплантация цельной поджелудочной железы и клеточные технологии. При использовании первых двух методов существуют значительные ограничения, такие как невозможность поддержания стабильного физиологического уровня глюкозы в крови, дефицит донорских органов и риск иммунного отторжения транспланта. Для решения этих проблем разрабатываются новые методы лечения на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК).

Перспективным направлением является использование гипоиммуногенных ИПСК, в частности, линий с нокаутом гена *B2M*, что приводит к отсутствию экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости I класса на поверхности клеток. Создание эффективного протокола дифференцировки таких клеток в функциональные инсулин-продуцирующие β -клетки позволит получить неограниченный источник транспланационного материала и потенциально решить проблему его иммуногенности.

Целью данной работы было получение панкреатических предшественников β -клеток путем дифференцировки двух линий ИПСК: контрольной линии FF1S и изогенной гипоиммуногенной линии FF1SdB2M с нокаутом гена *B2M*.

На первом этапе дифференцировки была проведена оптимизация протокола. Увеличение длительности стадии дефинитивной энтодермы до 4 дней привело к повышению доли CXCR4-позитивных клеток (свыше 90%). На 16-й день дифференцировки были получены клеточные культуры, экспрессирующие ключевые маркеры созревания, пролиферации и функции β -клеток: доля PDX1 $^{+}$ клеток составила 5–8%, а доля NKX6.1 $^{+}$ клеток – 28–50%. Полученные данные подтверждают корректное направление дифференцировки по панкреатическому пути как для контрольных ИПСК, так и для ИПСК с нокаутом *B2M*. Таким образом, нами был успешно оптимизирован протокол панкреатической дифференцировки и получены клетки панкреатических предшественников, дифференцированные из гипоиммуногенных ИПСК.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, грант № 24–65-00044.

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ МЯГКОЙ КИСЛОТНОЙ ЭЛЮЦИИ И ИММУНОАФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ИММУНОПЕПТИДОМА МНС I

Борзенко Н.И., Побегуц О.В., Галямина М.А., Горбачев А.Ю.

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

Иммунопептидный подход позволяет идентифицировать пептидные эпитопы, презентируемые молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС класса I и II) на поверхности клеток. Молекулы МНС I и МНС II различаются по источнику представляемых антигенов: МНС II презентируют экзогенные антигены, а МНС I – эндогенные. Иммунопептидомика особенно эффективна для определения внутриклеточных бактериальных антигенов, представленных в комплексе с МНС I на поверхности инфицированных клеток.

Иммунопептиды могут быть выделены различными методами, среди которых классическим эталонным является иммунопреципитация (IP) со специфическими антителами, а альтернативным, более быстрым и доступным, но менее специфичным – мягкая кислотная элюция (MAE). Метод MAE основан на элюции МНС-ассоциированных пептидов непосредственно с поверхности интактных клеток без предварительного лизиса. К его преимуществам относятся отсутствие необходимости использования антител и возможность анализа посттрансляционных модификаций пептидов. Иммунопреципитация обеспечивает более высокую специфичность выделения комплексов МНС-пептид, однако требует использования моноклональных антител, а также характеризуется большей продолжительностью подготовки образцов. Методы MAE и IP выявляют как частично перекрывающиеся, так и различающиеся пептидные репертуары, что обосновывает целесообразность их комплексного применения.

Целью работы является сравнение иммунопептидных профилей клеточной линии кератиноцитов HaCaT, полученных с использованием метода иммунопреципитации с антителами W6/32 и метода мягкой кислотной элюции.

Материалы и методы. Иммунопептиды, презентируемые на поверхности клеток HaCaT, выделяли методами MAE и IP. Метод MAE основан на мягкой обработке интактных клеток слабокислым буфером в присутствии ингибиторов протеаз. Для проведения IP моноклональные антитела W6/32 (гибридома HB-95) предварительно выделяли из секретома гибридомных клеток с использованием колонки с сефарозой и протеином A, после чего иммуобилизовали на иммуноаффинных колонках с последующим ковалентным связыванием с протеином A. Полученные пептиды анализировали с использованием системы нано ВЭЖХ Ultimate 3000 RSLC, соединенной с масс-спектрометром Q Exactive HF Orbitrap (Thermo Fisher Scientific). Обработку масс-спектрометрических данных проводили с использованием инструмента quantms для сравнения числа и длины идентифицированных пептидов, а также оценки их сродства к молекулам МНС класса I с применением алгоритма netMHC.

Результаты. Методом IP было идентифицировано примерно в четыре раза больше целевых пептидов по сравнению с методом MAE. При этом для обоих подходов был получен характерный для МНС I диапазон длин пептидов (8-12 аминокислот). Доля перекрывающихся пептидов, идентифицированных методами IP и MAE, составила 14,5 %. Анализ сродства пептидов к молекулам МНС I показал значительно более высокие значения при применении иммунопреципитации по сравнению с MAE (67 % против 11 % соответственно), что отражает более высокую специфичность иммуноаффинного метода.

Выводы. Метод иммунопреципитации превосходит мягкую кислотную элюцию по числу идентифицированных пептидов и сродству к молекулам МНС I. Однако, применение обоих подходов приводит к выявлению значительного числа уникальных пептидов, что подчеркивает целесообразность использования метода MAE для более полного охвата иммунопептидного профиля.

АВТОМАТИЗАЦИЯ КЛИНИКО-ГЕНОМНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

В.Е. Жмурина, А.Ю. Горбачев

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

Введение. В современной медицинской и научной практике всё более широкое распространение получают методы молекулярно-генетического и клинико-геномного анализа, направленные на выявление геномных вариантов, экспрессионных профилей и молекулярных особенностей опухолей, определяющих чувствительность к противоопухолевой терапии. Для эффективной реализации персонализированного подхода в онкологии необходимо интегрированное исследование мульти-омиксных данных пациента с учётом клинических характеристик, включая возраст, пол, стадию заболевания и историю лечения. Однако существующие программные решения, как правило, ориентированы на анализ отдельных типов данных (WGS, WES, RNA-seq или протеомика) и не обеспечивают их совместной обработки. Это приводит к фрагментации анализа, увеличению трудозатрат и снижению воспроизводимости результатов.

Цель. Разработка автоматизированного программного подхода к клинико-геномному анализу, направленного на повышение эффективности подбора персонализированной терапии для пациентов с онкологическими заболеваниями.

Материалы и методы. В рамках исследования была разработана архитектура программного решения, предназначенного для автоматизации обработки, интеграции и интерпретации геномных данных пациента. Конвейер включает модули анализа герминальных и соматических вариантов, сопоставления результатов секвенирования с базами клинических рекомендаций и таргетных препаратов, а также интеграции данных экспрессии генов и протеомных профилей. Реализованы алгоритмы аннотации и приоритизации геномных вариантов с учётом их клинической значимости, уровня доказательности и потенциального влияния на лекарственный ответ. Тестирование и верификация разработанной системы проведены на собственных клинических данных и опубликованных референсных наборах.

Результаты. В ходе работы реализован автоматизированный клинико-геномный конвейер, обеспечивающий интеграцию мульти-омиксных данных пациента и их перевод в клинически интерпретируемый формат. Использование разработанного подхода позволило сократить время анализа и снизить долю ручных операций, а также повысить воспроизводимость и стандартизацию результатов.

Заключение. Разработанный программный подход представляет собой универсальный инструмент для автоматизации клинико-геномного анализа в онкологии и может быть использован в научных и клинических исследованиях, направленных на внедрение персонализированной терапии.

РАЗРАБОТКА КОНВЕЙЕРА АВТОМАТИЗИРОВАННОГО ПОДБОРА ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ДЛЯ НОКАУТА ГЕНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ CRISPR-CAS9

Зайцев И.Л.^{1,2}, Семенов А.А.^{1,3}, Горбачев А.Ю.¹

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

²ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ (Пироговский Университет)

³Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Несмотря на наличие отдельных инструментов для дизайна направляющих РНК и подбора праймеров, отсутствуют решения, обеспечивающие их интеграцию в единый автоматизированный конвейер. Это существенно усложняет подготовку серии экспериментов по нокауту генов методом CRISPR/Cas9 и обуславливает необходимость разработки специализированного инструмента автоматизированного подбора праймеров.

Целью работы является разработка конвейера автоматизированного подбора праймеров для экспериментов по нокауту генов с использованием системы CRISPR/Cas9.

Материалы и методы исследования. Для тестирования разработанного конвейера использовался аннотированный геном изолята E.Coli ZvL. Для подбора гидовых РНК и подбора праймеров использовались программы CHOPCHOP и PRIMER3 соответственно. Интеграция этапов и автоматизация вычислений осуществлялись с использованием набора скриптов, реализованных на языках программирования R и Bash. В качестве входных данных использовались файл генома и его аннотация в табличном формате с указанием целевого гена.

Результаты. Разработанный пайплайн позволяет получить набор олигонуклеотидных последовательностей, необходимых для постановки эксперимента по нокауту генов с использованием системы CRISPR/Cas9. В частности, конвейер автоматически генерирует последовательности направляющих РНК, праймеров для амплификации плеч гомологии, а также праймеров, используемых на этапе скрининга полученных клонов. Для проведения последующего скрининга также формируется сопроводительный отчёт, включающий данные о предполагаемом наличии или отсутствии сдвига рамки считываания, координатах вырезаемого фрагмента генома, а также ожидаемые длины ПЦР-продуктов, используемых для первичного скрининга модифицированных клонов. Разработанный конвейер позволяет существенно упростить этап подготовки экспериментов по нокауту генов с использованием системы CRISPR/Cas9 за счёт автоматизации подбора праймеров и сопутствующего анализа целевой области редактирования. Получаемые результаты требуют дальнейшей экспериментальной валидации.

Литература

1. Labun, Kornel, et al. "CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing." *Nucleic acids research* 47.W1 (2019): W171-W174.
2. Untergasser, Andreas, et al. "Primer3—new capabilities and interfaces." *Nucleic acids research* 40.15 (2012): e115-e115.
3. Shukal, Sudha, et al. "Metabolic engineering of Escherichia coli BL21 strain using simplified CRISPR-Cas9 and asymmetric homology arms recombineering." *Microbial Cell Factories* 21.1 (2022): 19.

НОВЫЙ АЛГОРИТМ ПРОФИЛАКТИКИ ВЕНОЗНЫХ ТРОМБОЭМБОЛИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ДИССЕМИНИРОВАННЫМИ СОЛИДНЫМИ ОПУХОЛЯМИ: ПЕРВЫЕ НАБЛЮДЕНИЯ

Иванова К.А., Мещеряков А.А.

Клиническая больница №123, онкологическое отделение

Актуальность: Венозные тромбоэмболические осложнения (ВТЭО) являются частой причиной ухудшения прогноза у онкологических пациентов и нередко приводят к прерыванию противоопухолевой терапии. В клинической практике для оценки риска ВТЭО преимущественно используется шкала Khorana, однако ее прогностическая ценность ограничена. Применение номограммы Vienna CATS позволяет расширить поиск пациентов групп риска. С другой стороны, оба подхода не отражают динамических изменений системы гемостаза. В связи с этим актуальным является внедрение как более точной исходной оценки риска, так и динамического мониторинга системы гемостаза.

Цель: Представить первые результаты применения нового алгоритма профилактики ВТЭО, включающего сочетанное использование двух шкал и индивидуальный подбор доз антикоагулянтов на фоне динамического мониторинга системы гемостаза.

Материалы и методы: Пациенты с метастатическими солидными опухолями, которым планируется проведение лекарственной противоопухолевой терапии. На этапе скрининга выполняются клинико-лабораторная оценка с обязательным определением уровней D-димера и C-реактивного белка, УЗИ вен нижних конечностей, расчет риска ВТЭО по шкале Khorana и номограмме Vienna CATS. Назначение и коррекция доз антикоагулянтов осуществляются в соответствии с протоколом исследования на основании динамики D-димера. На момент подготовки тезисов завершено 6-месячное наблюдение у двух пациентов.

Результаты: Наблюдение 1. Мужчина 50 лет с диссеминированным раком желудка. При оценке риска ВТЭО по шкале Khorana получено 3 балла (высокий риск), расчетный 6-месячный риск ВТЭО по номограмме Vienna CATS составил 10% (умеренный риск). Исходный уровень D-димера составил 1,26 нг/мл ($2,29 \times \text{ВГН}$). На фоне прямых оральных антикоагулянтов (ПОАК) отмечено устойчивое снижение D-димера: 1-я неделя — 1,02, 2-я — 0,86, 3-я — 0,70, 2-й месяц — 0,64, 3-й — 0,66, 4-й — 0,65, 5-й — 0,58, 6-й — 0,59 нг/мл. ВТЭО в течение 6 месяцев не зарегистрировано.

Наблюдение 2. Женщина 50 лет с диссеминированным раком прямой кишки. Риск ВТЭО по шкале Khorana оценен как низкий (0 баллов), при этом по номограмме Vienna CATS расчетный 6-месячный риск ВТЭО составил 6% (промежуточный риск), что служило основанием для включения пациентки в протокол исследования. Исходный уровень D-димера — 2,01 нг/мл ($4,02 \times \text{ВГН}$). На фоне ПОАК отмечено быстрое снижение D-димера в ранние сроки: 1-я неделя — 0,57, 2-я неделя — 0,41 нг/мл, далее с 3-й недели и до 6-го месяца фиксировались показатели ниже референсных значений. ВТЭО в течение 6 месяцев не зарегистрировано.

Выводы: Новый алгоритм профилактики ВТЭО позволяет персонализировать ведение пациентов с диссеминированными солидными опухолями. У двух первых пациентов, завершивших период наблюдения, зарегистрировано снижение D-димера (в одном случае более чем на 50% от исходного уровня, во втором — нормализация уровня) без развития ВТЭО в течение 6 месяцев проведения противоопухолевой лекарственной терапии.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОГО ВИДА *PARABACTEROIDES VESICULIFIACIENS* SP.

Кашатникова Д.А.¹, Чаплин А.В.^{1,2}, Подопригора И.В.³, Щербакова В.А.², Захаржевская Н.Б.¹, Кардонский Д.А.¹, Кошкин Ф.А.², Евсеев П.В.², Ефимов Б.А.^{1,2}

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

² Кафедра микробиологии и вирусологии, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Российская Федерация;

³Лаборатория бактериологии, Научно-исследовательский институт молекулярной и клеточной медицины медицинского института РУДН

daria_sv11@mail.ru 89162830623

Введение: Род *Parabacteroides* включает группу облигатно анаэробных, не образующих спор, грамотрицательных бактерий, относящихся к недавно выделенному семейству *Tannerellaceae* типа *Bacteroidota*. В данной работе мы предлагаем штамм ASD2025T в качестве типового штамма нового вида, *Parabacteroides vesiculifaciens* sp. nov., используя полифазный таксономический подход, сочетающий фенотипическую и филогенетическую характеристику, и описываем эффект кондиционированной среды на клетки колоректальной adenокарциномы HT29.

Материалы и методы: Штамм ASD2025T был выделен из фекалий 4-летнего здорового ребенка. Рост штамма обнаружен на анаэробном базальном агаре (Oxoid) с добавлением 5% (об/об) дефибринированной овечьей крови (Oxoid) в анаэробных условиях при 37 °C в течение 72 часов. Морфологию клеток оценивали посредством световой микроскопии (Axio Scope. A1; Zeiss) и сканирующей электронной микроскопии JSM-6380 (JEOL Ltd., Токио, Япония). Секвенирование гена 16S rPHK осуществлялось на платформе MinION™ Mk1B. Профили клеточных длинноцепочечных жирных кислот определяли в культурах с помощью газового хроматографа-масс-спектрометра Agilent 6850-5973 (Agilent Technologies, США). Продукты ферментации в среде PYG анализировались с помощью метода ВЭЖХ (Knauer, Германия). С помощью клеточной модели HT29 было исследовано модулирующее воздействие культуральной среды, полученной от штамма ASD2025T, на экспрессию гена IL-8.

Результаты: согласно данным микроскопии клетки представляли собой неподвижные полиморфные палочки, производящие внеклеточные везикулы. Филогенетический анализ поместил штамм ASD2025T в род *Parabacteroides* в комплекс видов, включающий *P. acidifaciens*, *P. hominis*, «*P. massiliensis*», *P. merdae* и *P. johnsonii*. Фенотипически штамм имел ограниченный ферментативный профиль по сравнению с родственными видами, был отрицательным по каталазе и гидролизу эскулина и производил сукцинат в качестве основного конечного продукта метаболизма. Его основными жирными кислотами были антеизо-C15:0, изо-C17:0 3-OH и C15:0. Кондиционированная среда штамма ASD2025T, как и среда *P. merdae* EBA4-19, значительно подавляла экспрессию гена IL-8 в клетках HT29 и противодействовала провоспалительному эффекту ЛПС *E. coli*.

Вывод: хотя ASD2025T был выделен из микробиоты человека, большинство родственных метагеномных геномов, происходят из микробиомов мышей. На основании отчетливых генотипических и фенотипических характеристик штамм ASD2025T представляет собой новый вид рода *Parabacteroides*, для которого предлагается название *Parabacteroides vesiculifaciens* sp. nov.

Работа поддержана грантом РНФ №24-75-10100

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ИНДУЦИРОВАННЫХ ТЕРАПИЕЙ СЕКРЕТОМОВ В УВЕЛИЧЕНИИ ВЫЖИВАЕМОСТИ КЛЕТОК РАКА ЯИЧНИКА

Лашкин А.И., Шнайдер П.В., Арапиди Г.П., Иванова О.М., Гончаров А.О., Лагарькова М.А., Говорун В.М., Шендер В.О.

Лаборатория Молекулярной онкологии

Несмотря на разнообразие терапевтических методик и химиопрепаратов, полное излечение от онкологических заболеваний не гарантируется из-за высокой пластичности опухолей, приводящей к химиорезистентности и рецидивам. Помимо известных механизмов формирования химиорезистентности, последние исследования показывают, что погибающие во время химиотерапии опухолевые клетки, становясь значительной частью микроокружения опухоли, могут стимулировать рост и выживание оставшихся опухолевых клеток, способствуя быстрому восстановлению новообразования [Shender et al., *Nat Comm* (2024)]. Однако точные механизмы данного явления пока изучены мало, а их блокирование могло бы улучшить существующие терапевтические подходы.

Прежде всего, мы исследовали эффективность секретомов от погибающих клеток и проанализировали, к каким типам химиотерапии они стимулируют развитие устойчивости у реципиентных опухолевых клеток. Оказалось, что инкубация хемонаивных опухолевых клеток с секретомами от погибающих опухолевых клеток повышает их устойчивость только к ДНК-повреждающим химиопрепаратам. Иммуноцитохимическое-исследование фокусов γH2AX, фосфорилированного RPA2 и платиновых сшивок в реципиентных клетках подтвердило, что после инкубации с секретомами такие клетки быстрее справляются с повреждениями ДНК. С помощью протеомного анализа и вестерн-блота секретомов от погибающих под действием цисплатина или контрольных необработанных опухолевых клеток было показано, что секретомы от погибающих клеток обогащены белками, участвующими в регуляции сплайсинга пре-мРНК. Мы предположили, что РНК-связывающие белки сплайсосомы, которые при нормальных условиях находятся преимущественно в ядре, могут оказываться во внеклеточном пространстве в результате образования стрессовых гранул в цитоплазме под действием стресса и далее секретироваться в составе внеклеточных везикул. Чтобы выяснить, отменяет ли блокирование сборки стрессовых гранул протективный эффект секретомов от погибающих опухолевых клеток, мы использовали малую молекулу эпигаллокатехин-3-галлат (EGCG), который, связываясь с белком G3BP1, нарушает сборку стрессовых гранул. Оказалось, что обработка донорных опухолевых клеток цисплатином одновременно с ингибитором сборки стрессовых гранул EGCG отменяет хемопротективный эффект секретомов от погибающих под действием терапии клеток. Полученные результаты в дальнейшем могут быть использованы для разработки и усовершенствования более эффективных схем комбинированной терапии для лечения рака яичника.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ №25-75-10152.

АПТАМЕРЫ К HNRNP A1 КАК ИНГИБИТОРЫ АМИЛОИДИЗАЦИИ

Малахова Е. И., Ведехина Т. С., Алиева С. Э., Баринов Н. А., Клинов Д. В., Варижук А. М.

Лаборатория структуры и функций биополимеров

Белки семейства гетерогенных ядерных рибонуклеопротеинов (hnRNP) в норме участвуют в регуляции сплайсинга и транскрипции. Эти функции обеспечиваются наличием сиквенс-специфичных мотивов связывания РНК (RRM), а также конформационно неупорядоченного фрагмента, который часто включает мотивы, обогащенные остатками аргинина и глицина (RGG) и полярных незаряженных аминокислот (прионоподобные мотивы, PLD). Классическим примером является рибонуклеопротеин hnRNP A1. Его доменную структуру представляют следующим образом: RRM1-RRM2-RGG-PLD. Тандемные RRM узнают инtronные регуляторные элементы в пре-мРНК перед сборкой сплайсосомы; RGG связывает G-квадруплексы (G4) в промоторной ДНК при инициации транскрипции, а PLD в норме обеспечивает ядерную локализацию hnRNP A1 и взаимодействие с белками-партнерами. В случае мутации в PLD hnRNP A1 переходит в нейротоксичные агрегаты – фибриллы амилоидного типа. С их накоплением связано развитие лобно-височной деменции и бокового амиотрофического склероза, что определяет актуальность разработки ингибиторов амилоидизации.

Данная работа была нацелена на получение аптамеров к hnRNP A1 на основе G4, фиксирующих конформацию RGG. Известно, что взаимодействия G4-RGG ограничивают конформационные перестройки RGG-PD и препятствуют образованию фибрилл. Однако, применение G4 в качестве ингибиторов амилоидизации ограничено их недостаточно высокими сродством и селективностью к hnRNP. Для решения этой проблемы мы применили следующий подход: к функциональному G4-модулю через дуплексный линкер присоединяли так называемый адресующий модуль – последовательность, узнаваемую RRM2. Последовательность линкера была взята из известного аптамера к иному RGG-содержащему белку. В качестве функционального и адресующего модулей изначально использовали природные фрагменты ДНК и РНК, контактирующие с hnRNP A1 на этапах транскрипции и сплайсинга: промоторный G4 и интронный цис-регуляторный элемент. В ходе оптимизации первый заменили на укороченный аналог, второй – на устойчивый к нуклеазам аналог с модифицированным сахарофосфатным оставом, фиксированным в характерной для РНК конформации. Для оценки сродства исходных и оптимизированных аптамеров к мишени применяли метод микромасштабного термофореза. Вторичную структуру аптамеров подтверждали методами спектроскопии кругового дихроизма и УФ-плавления. Оценка влияния на hnRNP A1 включала проверку формирования предшественников фибрилл (уплотненных биоконденсатов) меченым белком дикого типа в присутствии дополнительных белковых компонентов методом флуоресцентной микроскопии, а также проверку амилоидизации мутантного hnRNP A1 методами атомно-силовой микроскопии и флуориметрии в присутствии флуорогенного зонда на фибриллы.

Полученный аптамер-лидер с модификацией в адресующем модуле превосходил аналоги и прототип без адресующего модуля по аффинности к hnRNP A1. Он подавлял формирование предшественников фибрилл в образцах с белком дикого типа на $90 \pm 10\%$, а также на 70-90 % снижал амилоидизацию мутанта hnRNP A1. Результаты могут найти применение в разработке препаратов для терапии лобно-височной деменции и амиотрофического бокового склероза.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОФИЛЕЙ МЕТИЛИРОВАНИЯ ВИРУЛЕНТНОГО И НЕВИРУЛЕНТНОГО ФЕНОТИПА КЛИНИЧЕСКОГО ИЗОЛЯТА КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ

Михайлышева М. В., Семенов А. А., Борзенко Н. И., Галямина М. А., Побегущ О. В.,
Горбачев А. Ю.

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

Феномен переключения фенотипа при смене источника углерода в среде культивирования, наблюдаемый у адгезивно-инвазивных *E. coli* (AIEC – Adherent-Invasive *E. coli*), описан в литературе с 2020 года, однако пока не было предъявлено четкого молекулярного механизма и подтверждения генетической природы этого эффекта. В связи с этим работа посвящена исследованию эпигенетических изменений, потенциально влияющих на вирулентные свойства AIEC.

Для анализа метилирования были использованы данные секвенирования Oxford Nanopore генома клинического AIEC изолята ZVL, выращенного на среде M9 с добавлением пропионата (соответствует вирулентному фенотипу) или с добавлением глюкозы (соответствует невирulentному фенотипу), а также полученные ранее полные сборки генома, аннотации, транскриптомные и протеомные данные изолята ZVL.

Для поиска ферментов, отвечающих за метилирование в изоляте, белок-кодирующие последовательности генома в аминокислотном представлении были выровнены против REBASE Gold базы экспериментально проверенных метилтрансфераз, в результате чего было найдено восемь кандидатов. Три найденных DAM-метилтрансферазы были определены при аннотировании как орфанская ДНК-аденин-метилаза, Retron Ec67 ДНК-аденин-метилаза и фаговая N-6-аденин-метилтрансфераза. Все восемь потенциальных ферментов были обнаружены при анализе дифференциальной экспрессии в соответствующих транскриптомных данных изолята ZVL, и только три – в протеомных (hsdRM, dcm). На пропионате значимо уменьшалась представленность системы рестрикции-модификации I типа hsdRM, распознавающая уникальный непалиндромный мотив метилирования.

Всего было *de novo* определено пять мотивов метилирования, при этом они совпадали для обоих условий культивирования. Два являются стандартными для *E. coli* – ‘GATC’ DAM-метилтрансферазы (6mA модификация) и ‘CCWGG’ DCM-метилтрансферазы (5mC). Также был найден непалиндромный мотив ‘GGANNNNNRTAAAY’/‘RTTAYNNNNNTCC’ (6mA) и два мотива 4mC и 5mC – ‘GATCNTCR’ и ‘GATCTCT’.

Далее были получены расположения модификаций трех типов (6mA, 5mC, 4mC) в полном геноме изолята ZVL. Обнаружено 56 значимо различающихся позиций, из них 45 метилированы при культивировании на пропионате, 11 – на глюкозе. Некоторые из них согласуются с указанными выше последовательностями, однако большая часть не укладывается в найденные мотивы и соответствует 4mC модификации, наименее распространенной в случае бактерий и более характерной для эукариот. При росте на пропионате часть этих позиций метилирования расположена в промоторных областях генов, связанных с метаболизмом (*lpdA*, *rhaS*), адаптацией к стрессу (*pmrR*, *dnaT*, *entS*), на глюкозе – в промоторных областях генов транспорта пептидов (*dtpB*) и сборки ЛПС (*IptC*). Таким образом, переход на среду с источником углерода в виде пропионата потенциально может сопровождаться специфичным метилированием промоторов ключевых метаболических и стрессовых генов.

НОВЫЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МИШЕНИ LRRK2 – БЕЛКИ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИЕ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ

Попик Е. А., Спасельникова А. В., Копылова И. В., Казакова А. Н., Скородумова Л. О.,
Шендер В. О., Арапиди Г. П., Лагарькова М. А., Богомазова А. Н., Лебедева О. С.

Лаборатория клеточной биологии

Болезнь Паркинсона (БП) является вторым по распространенности нейродегенеративным заболеванием в мире. Наследственные формы составляют 10–15% случаев БП. Мутации в гене, кодирующем богатую лейциновыми повторами киназу 2 (LRRK2), являются наиболее распространенной причиной возникновения наследственных форм БП. При этом наиболее частой мутацией в LRRK2, ассоциированной с БП, является мутация G6055A, приводящая к аминокислотной замене G2019S и к увеличению киназной активности LRRK2 примерно в 1,4 раза. Считается, что LRRK2 может участвовать в процессах аутофагии, везикулярном транспорте, цилиогенезе и регуляции митофагии посредством фосфорилирования Rab белков – наиболее изученных *in vivo* субстратов фермента. Показано также, что LRRK2 может регулировать процессы трансляции за счет фосфорилирования 4E-БР (репрессора трансляции) и рибосомного белка s15. Однако поиск других субстратов LRRK2 и, как следствие, определение всех её функций в клетках остается актуальной научной задачей.

Ранее нами была создана изогенная система индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), моделирующая полный спектр функциональной активности киназы LRRK2. Система включает линии ИПСК с полным и гетерозиготным нокаутом LRRK2, с нормальным вариантом гена, а также с гетеро- и гомозиготной мутацией G6055A. Анализ протеома и транскриптома дофаминергических нейронов, дифференцированных из ИПСК изогенной системы, показал, что мутация G6055A связана с повышенной активностью процессов метаболизма нуклеиновых кислот. Фосфопротеомный анализ выявил несколько белков, фосфорилирование которых коррелирует с киназной активностью LRRK2. По результатам омиксных исследований и на основе литературных данных были выбраны пять белков-партнеров LRRK2 (LIG3, PRKDC, DDX46, DDX51, DHX29), связанных с метаболизмом нуклеиновых кислот, которые могут быть субстратами LRRK2.

Цель данной работы – выбрать наиболее перспективные белки-партнеры LRRK2 для дальнейшего определения фермент-субстратных взаимодействий киназы LRRK2.

В ходе работы мы провели дифференцировку ИПСК изогенной системы в дофаминергические нейроны. Экспрессию LIG3, PRKDC, DDX46, DDX51, DHX29 в процессе нейрональной дифференцировки оценивали методами ОТ-ПЦР и вестерн-блоттинга.

Мы выявили, что в процессе нейрональной дифференцировки наивысшего уровня экспрессии гены DDX46, DDX51, PRKDC, LIG3, DHX29 достигают на стадии зрелых нейронов. Наивысший уровень экспрессии из пяти проанализированных генов имеют гены DDX46, LIG3, PRKDC. Методом вестерн-блоттинга подтверждено, что гены DDX46, LIG3, PRKDC экспрессируются в зрелых нейронах на уровне белка. Таким образом, для дальнейших исследований фермент-субстратных взаимодействий киназы LRRK2 наибольший интерес представляют белки DDX46, LIG3 и PRKDC в связи с их более высокой экспрессией в зрелых дофаминергических нейронах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Федеральная научно-техническая программа развития генетических технологий на 2019-2030 годы, соглашение № 075-15-2025-518).

СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ НОКДАУНА *ADAR* И ИНГИБИТОРА СПЛАЙСИНГА СПОСОБСТВУЕТ ОБРАЗОВАНИЮ R-ПЕТЕЛЬ, ВЫЗЫВАЯ УСИЛЕНИЕ АПОПТОЗА В КЛЕТКАХ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКА

Проскуряков Т.А., Гончаров А.О., Кудрявский В.В., Иванова О.М., Лукина М.М.,
Бржозовский А.Г., Кононихин А.С., Николаев Е.Н., Шендер В.О.

Лаборатория молекулярной онкологии

Редактирование РНК является одним из механизмов адаптации опухолевых клеток, формирующих устойчивость к химио- и иммунотерапии. Помимо модулирующей роли в регуляции врожденного иммунитета, редактирование, опосредованное ADAR1, важно для разрешения аберрантных гибридных структур РНК:ДНК, таких как R-петли, количество которых увеличивается при нарушении сплайсинга пре-мРНК. Поскольку ингибирование сплайсинга рассматривается как перспективный противоопухолевый подход, мы предположили, что сочетанное нарушение сплайсинга пре-мРНК и редактирования РНК будут приводить к повышенной гибели опухолевых клеток. Данная работа посвящена проверке данной гипотезы и исследованию молекулярного механизма данного явления. На первом этапе, были исследованы уровни апоптоза в опухолевых клетках, индуцированного совместным действием ингибитора сплайсинга пладиенолида Б и нарушением редактирования пре-мРНК. Для этого, была создана линия клеток аденокарциномы яичника SKOV3 с устойчивым нокдауном гена *ADAR*. С помощью теста на уровень апоптоза было показано, что нокдаун *ADAR* не приводит к увеличению апоптоза, тогда как его сочетание с ингибированием сплайсинга вызывает выраженную индукцию апоптотической гибели клеток. Протеомный анализ выявил значительное повышение белков, ассоциированных с контрольной точкой сборки веретена деления в клетках с одновременным нокдауном и действием пладиенолида Б по сравнению с контрольными клеточными линиями, то есть комбинированное воздействие нокдауна и пладиенолида Б нарушает корректную сборку митотического веретена и сегрегацию хроматид, что приводит к нарушению митоза и активации апоптоза. Иммуноцитохимическое исследование показало, что в клетках с комбинацией нокдауна *ADAR* и обработки пладиенолидом Б количество R-петель значительно выше, чем в остальных группах, что свидетельствует о взаимосвязи процессов редактирования и сплайсинга пре-мРНК в условиях митотического стресса.

Таким образом, мы обнаружили, что совместное действие ингибитора сплайсинга пладиенолида Б и снижение представленности ADAR1 в клетках аденокарциномы яичника способствуют образованию R-петель и развитию репликативного стресса, а также повышению уровня белков, ассоциированных с контрольной точкой сборки веретена деления, что влечет усиление апоптоза. Полученные данные могут быть полезны в разработке комбинированных терапевтических стратегий, направленных на процессы редактирования и сплайсинга РНК, при лечении аденокарциномы яичников.

ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ ПО СОВЕРШЕНСТВОВАНИЮ АЛГОРИТМА ДИГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ЛАТЕНТНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ С МЕСТНО- РАСПРОСТРАНЕННЫМ И МЕТАСТАТИЧЕСКИМ РАКОМ ЛЕГКОГО

Санфиров С. И., Горяннова А.Ю., Мещеряков А. А.

Клиническая больница № 123, онкологическое отделение

Актуальность. Значительная часть больных раком легкого (60-70%) изначально диагностируется с местно-распространенными (III стадия) или метастатическими (IV стадия) формами заболевания. Одногодичная летальность у пациентов с впервые диагностированной IV стадией немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) достигает 50-70%, а при мелкоклеточном раке легкого — 80-90%, что может быть обусловлено не только прогрессированием самой опухоли, но и наличием инфекционных осложнений. При использовании химиотерапии (ХТ) для данной категории больных актуален риск развития тяжелого нежелательного явления – фебрильной нейтропении, приводящей к летальным исходам в 5-15% случаев. Совершенствование диагностики и лечения латентных инфекций будет способствовать улучшению как непосредственных, так и отдаленных результатов лечения больных раком легкого.

Цель: сформировать дизайн исследования для доказательства необходимости диагностики и лечения латентных инфекций у больных местно-распространенным и метастатическим НМРЛ.

Материалы и методы. В исследование будут включены больные местно-распространенным и диссеминированным НМРЛ, которым планируется проведение курсов химиотерапии ± иммунотерапии ± таргетной терапии, ранее не получавшие лечение, с подтвержденным гистологическим диагнозом, наличием диагностированной латентной инфекции, ECOG статус 0 – 2.

Результаты. Будет разработан дизайн проспективного однорукавного нерандомизированного исследования. Первая стратификация: диагностика латентной инфекции по лабораторным данным (наличие лейкоцитоза, соотношение нейтрофилов и тромбоцитов к лимфоцитам, а также уровня С-реактивного белка (СРБ) и альбумина). Вторая стратификация: оценка эффективности эмпирической антибиотикотерапии (АБТ) 1 линии в течение 48-72 часов, с последующим распределением пациентов на 2 рукава. При наличии динамики снижения уровня СРБ – инициация курса ХТ на фоне АБТ, которая будет продолжаться до 7-10 дней. В случае повышения СРБ запланирована смена АБТ 2 линии в соответствии с данными бактериологического исследования и чувствительности к антибиотикам в течение 48-72 часов. Третья стратификация: при снижении уровня СРБ – проведение курса ХТ на фоне АБТ 2 линии. При сохраняющемся или увеличивающемся уровне СРБ, при отсутствии клинической симптоматики инфекционного процесса – проведение курса ХТ в редуцированных дозах. Контроль наличия латентных инфекций будет проводиться перед каждым курсом химиотерапии. Сравнительный анализ будет выполнен с использованием исторической контрольной группы пациентов, получающих противоопухолевую терапию. Первичной конечной точкой будет являться уменьшение частоты инфекций на фоне проведения химиотерапии, вторичными конечными точками – выживаемость без прогрессирования (ВБП), частота объективного ответа (ЧОО), а также частота развития нежелательных явлений (НЯ). В исследование планируется включить 100 пациентов. Результаты ожидаются в первом квартале 2027 года.

СТАБИЛИЗАЦИЯ G-КВАДРУПЛЕКСОВ ПРОИЗВОДНЫМИ АНТРАХИНОНА, СЛИТЫМИ С ГЕТЕРОАРЕНАМИ

Сапожникова В. А., Ведехина Т. С., Варижук А. М., Тихомиров А. С.

Лаборатория структуры и функций биополимеров

G-квадруплексы представляют собой неканонические структуры ДНК/РНК, играющие ключевую роль в регуляции онкогенов и теломер, что делает их перспективными мишениями для противоопухолевой терапии. Перспективные лиганды к квадруплексам, проявляющие антироплиферативную активность, включают антрахиноновые производные с дополнительными гетероциклами. Они эффективно стабилизируют квадруплексы за счет π-π-стэкинговых взаимодействий расширенной ароматической системы с гуаниновой тетрадой. Ранее было показано, что на селективность лиганда к конкретным квадруплексным структурам влияют тип гетероатомов в расширенной ароматической системе и наличие заместителей с амино- или гуанидино-группами, которые, предположительно, контактируют с сахарофосфатным оставом ДНК [1].

Целью работы был сравнительный анализ действия антрахиноновых лигандов с различными дополнительными гетероциклами (фуран, пиррол, тиазол, пиридин или пиразин) и заместителями, полученных в ФГБНУ "Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе" РАН. Анализ включал скрининг лигандов против терапевтически значимых мишней и контрольных квадруплексов/дуплексов методом FRET-плавления для предварительной оценки стабилизирующего действия и селективности. По итогам FRET-плавления были отобраны лидеры. Их сродство к мишням оценивалось методом на основе флуориметрии, а селективность к квадруплексам теломер и промотора онкогена *Myc* дополнительно проверялась в присутствии избытка конкурента. Полученные результаты были сопоставлены с антироплиферативным действием лигандов на клетки линии острой миелоидной лейкемии (K562), карциномы толстой кишки (HCT116) и эмбриональных почек человека (HEK293).

В результате исследования было установлено, что в ряду тризамещенных антрахиноновых производных с гетероаренами выраженным стабилизирующим действием на онкопромоторные и теломерные квадруплексы обладают производные с тиазольным циклом. Они значимо превосходят известный прототип с фурановым циклом. Однако, индекс селективности (SI) квадруплекс/дуплекс, рассчитанный по соотношению констант связывания (около 13 и 4 для тиазолсодержащих производных с амино- и гуанидино-заместителями соответственно) указывает на необходимость дальнейшей оптимизации. Это согласуется с умеренной селективностью, выявленной на клеточных линиях (значения SI HEK293/HCT116 составили 4,6 и 2,3). Дальнейшая модификация лигандов для повышения селективности может включать оптимизацию заместителей.

Таким образом, подтверждена целесообразность использования антрахиноновых производных, слитых с гетероаренами, в качестве каркасов при дизайне квадруплексных лигандов. Выявлен наиболее перспективный тип каркасов (с тиазольным циклом) и намечены стратегии дальнейшей оптимизации.

[1] Thiadiazole-, selenadiazole-and triazole-fused anthraquinones as G-quadruplex targeting anticancer compounds. DV Andreeva, TS Vedekhina, AS Gostev, LG Dezhenkova, YL Volodina, AA Markova, MTuan Nguyen, OM Ivanova, VA Dolgusheva, AM Varizhuk, AS Tikhomirov, AE Shchekotikhin. European Journal of Medicinal Chemistry 2024, 268, 116222.

ХАРАКТЕРИСТИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КРЕСТООБРАЗНОЙ ДНК И НУКЛЕОИД-АССОЦИИРОВАННЫХ РНК С БЕЛКОМ НУ

Стрежнева А.Р.^{1,2}, Семёнов А.А.^{1,2} Горбачев А.Ю.¹

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

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Белок НУ – гистоноподобный белок, который может связываться с различными формами ДНК, РНК, а также играет роль шаперона во взаимодействии нуклеоид-ассоциированных РНК4 (наРНК4) и ДНК, влияя на конформацию нуклеоида. Субъединицы α и β белка НУ кодируются генами *hupA* и *hupB*, белок НУ может присутствовать в клетке в виде гетеро- или гомодимера.

В ходе экспериментов по транспозонному мутагенезу были идентифицированы наРНК4, которые предположительно связаны со сменой фенотипа *E. coli* в сторону АIEC. В связи с этим были выдвинута следующая гипотеза: взаимодействие наРНК4 и белка НУ играет роль в регуляции вирулентности АIEC.

Выяснение природы взаимодействия наРНК4 и НУ с ДНК может помочь в поиске мишней для лечения болезни Крона и определения механизма её возникновения.

Целью данного исследования было охарактеризовать взаимодействие крестообразной ДНК (крДНК) и наРНК с белком НУ.

Материалы и методы исследования. Для исследования были выбраны наРНК4-305, расположенная между генами *prpE* и *codB*, и наРНК4-330, расположенная между генами *prpB* и *prpC*.

Для отработки методики анализа изменения электрофоретической подвижности в геле был проведён эксперимент с НУ $\alpha\beta$ и крДНК с FAM-меткой. Предварительно была произведена оценка светимости FAM-метки для определения оптимального количества крДНК. Для анализа изменения электрофоретической подвижности в геле использовались разные концентрации НУ $\alpha\beta$ при неизменном значении концентрации крДНК с FAM-меткой.

Наработка ДНК-матрицы для дальнейшей транскрипции наРНК проводилась с помощью вложенной ПЦР. Транскрипция *in vitro* наРНК4-305 и наРНК4-330 была проведена при помощи Т7 РНК-полимеразы. Подтверждение факта синтеза короткой РНК проводилось при помощи обработки продуктов реакции транскрипции ДНКазой и РНКазой. Присоединение флуоресцентной метки к наРНК проводилось при помощи модифицированной лабораторной TdT. Для подтверждения взаимодействия НУ $\alpha\beta$ и наРНК4 был проведён анализ изменения электрофоретической подвижности в геле.

Получение конструктов на основе векторов pET28a(+) с вставками генов *hupA* и *hupB*, кодирующих субъединицы НУ α и НУ β , было проведено с помощью реакций рестрикции и лигирования.

Результаты. Была отработана методика по определению изменения электрофоретической подвижности в геле крДНК при специфичном связывании с гетеродимерами НУ $\alpha\beta$, а также проведены рассчёты константы связывания НУ $\alpha\beta$ и крДНК. Проведены реакции *in vitro* транскрипции наРНК4-305 и наРНК4-330, подтверждена возможность присоединения флуоресцентно меченого FAM-ddNTP к РНК при помощи TdT и показано образование комплексов при взаимодействии наРНК4 и НУ $\alpha\beta$. На основе векторов pET28a(+) были получены конструкты, содержащие вставки генов *hupA* и *hupB*, для наработки и выделения соответствующих белков.

Литература

1. Z. Qian, V.B. Zhurkin, & S. Adhya, DNA–RNA interactions are critical for chromosome condensation in *Escherichia coli*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 114 (46) 12225-12230 (2017).
2. Kamash D, Rouviere-Yaniv J. The histone-like protein HU binds specifically to DNA recombination and repair intermediates. EMBO J. 2000 Dec 1;19(23):6527-35.
3. Phan NQ, Uebano T, Shimohata T, Nakahashi M, Mawatari K, Takahashi A. 2015. DNA-Binding Protein HU Coordinates Pathogenicity in *Vibrio parahaemolyticus*. J Bacteriol 197.

АДГЕЗИВНО-ИНВАЗИВНЫЕ *ESCHERICHIA COLI* ОТ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ КРОНА СПОСОБНЫ КОЛОНИЗИРОВАТЬ КИШЕЧНИК МЫШЕЙ И ВЫЗЫВАТЬ ВОСПАЛЕНИЕ

Уразаева Д.Р.^{1,2}, Трусов Н.В.^{1,3}, Побегущ О.В.¹, Галямина М.А.¹, Смирнов И.П.¹, Михайлышева М.В.^{1,2}, Горбачев А.Ю.¹

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

²Московский физико-технический институт (НИУ), Москва

³ФГБУН “ФИЦ питания и биотехнологии”, Москва

Введение. В настоящее время активно изучается роль кишечной микробиоты в возникновении и поддержании воспаления кишечника при воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК), в частности у пациентов с болезнью Крона (БК). Обнаружено, что одной из особенностей у пациентов с БК является повышенное содержание адгезивно-инвазивных *Escherichia coli* (AIEC) от общего количества бактерий в слизистой оболочке кишечника. AIEC способны успешно проникать через муциновый слой, преодолевать эпителиальный барьер, выживать и размножаться внутри макрофагов, усугубляя воспалительный процесс. Также существует гипотеза об участии аутореактивных Т-клеток, активирующихся на антигены микробиоты и атакующих собственные клетки организма, в развитии заболевания. Ранее (M. Ormsby 2020 г.) для штамма AIEC *LF-82* была показана способность колонизировать кишечник мышей и вызывать хроническую инфекцию.

Цель. Изучение способности клинических изолятов адгезивно-инвазивных *Escherichia coli* от пациентов с болезнью Крона колонизировать кишечник мышей и вызывать воспаление.

Методы. Исследование проведено с использованием мышей-самцов C57Black/6, зараженных двумя изолятами AIEC *BL2K2* и *Zvl2* (БК-изоляты). Через 21, 28 и 35 суток после введения штаммов проведен сбор материала: кровь и 3 отдела кишечника (тонкая, слепая и толстая кишка). Из отделов кишечника были получены лизаты, часть из них была использована для посевов на селективную среду для получения отдельных колоний *E. coli* с их последующим полногеномным секвенированием для доказательства колонизации разных отделов кишечника. Другая часть использована для протеомного анализа методом ВЭЖХ-масс-спектрометрии и для определения содержания цитокинов методом иммуноферментного анализа. Из крови мышей, контрольной группы и зараженных изолятом *Zvl2*, была выделена РНК из мононуклеарных периферических клеток (РВМС). По методике 5'-RACE приготовлены кДНК библиотеки для секвенирования последовательностей Т-клеточных рецепторов (TCR) на платформе MGISEQ.

Результаты. Показано, что БК-изолят *E. coli BL2K2*, полученный от пациента с БК и обладающий адгезивно-инвазивным фенотипом, успешно колонизирует кишечник мышей и вызывает изменения в тканях толстой и слепой кишки, а также увеличение уровня цитокинов ФНО α и ИЛ-6. С помощью сравнительного протеомного анализа показано, что колонизация БК-изолятами вызывает в ткани толстой кишки активацию процессов, связанных с ответом на бактериальную инфекцию, а также с накоплением внеклеточного матрикса, приводящего к фиброзу, что является одним из признаков воспалительного процесса. При этом наибольшее количество дифференциально экспрессирующихся белков в протеоме толстой кишки наблюдалось через 28 суток инфекции. Среди них отмечается увеличение уровня просапозина Psap, предшественника подмножества липидсвязывающих белков-сапозинов, способных переносить гликолипиды на антигенпрезентирующие молекулы семейства CD1. По данным анализа данных секвенирования TCR показано увеличение доли отдельных iNKT-ассоциированных клонотипов после инфицирования изолятом *Zvl2*, что можно рассматривать как потенциальную иммунную реакцию на гликолипидные антигены введенных мышам *E.coli*. Также развитие воспаления проявляется в снижении α -разнообразия репертуаров Т-клеток в группе с БК-изолятом по сравнению с контролем, что свидетельствует о клonalной экспансии, появлением в этой группе клонотипов, ассоциированных с инфекционными, бактериальными и аутоиммунными заболеваниями.

Таким образом, на мышной модели была показана способность адгезивно-инвазивных *Escherichia coli* от пациентов с болезнью Крона колонизировать кишечник и вызывать воспаление, что позволит глубже изучить роль AIEC в этих процессах.

ГЕНОМНАЯ И ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТРЕХ ЛИТИЧЕСКИХ БАКТЕРИОФАГОВ, АКТИВНЫХ В ОТНОШЕНИИ АДГЕЗИВНО-ИНВАЗИВНЫХ *ESCHERICHIA COLI*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ КРОНА

Хохрякова А.А., Михайлычева М. В., Галямина М.А., Городничев Р.Б., Побегуц О. В.,
Горбачев А.Ю.

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

Введение.

Устойчивость бактериальных патогенов к антибиотикам побуждает исследователей искать новые средства борьбы с инфекциями. Одним из таких перспективных средств являются литические бактериофаги, которые обладают высокой специфичностью и могут использоваться не только для фаготерапии при воспалительных заболеваниях, но и для редактирования микробиоты кишечника и для изучения механизмов вирулентности бактерий. Адгезивно-инвазивные *E. coli* (AIEC) являются одной из причин поддержания хронических воспалительных заболеваний кишечника, в частности болезни Крона. Выделение и комплексное изучение новых фагов, активных в отношении AIEC, является важным этапом для создания основы персонализированной фаговой терапии этого заболевания.

Цель работы.

Получить полногеномные последовательности, провести аннотацию и филогенетический анализ геномов трех бактериофагов (vB_EcoA_PHZVL, vB_EcoS_PHRAI, vB_EcoA_PHPAV), активных в отношении AIEC. Определить круг хозяев, титры и морфологические характеристики бляшек. Установить взаимосвязь между морфологическими свойствами бляшек и структурой поверхностных полисахаридов бактерий-хозяев.

Результаты.

Бактериофаги vB_EcoA_PHZVL, vB_EcoS_PHRAI и vB_EcoA_PHPAV были выделены из образцов сточных вод с использованием клинических изолятов *E. coli* Р.Б. Городничевым в лаборатории генетики микроорганизмов. Их полногеномные последовательности были определены на платформе DNBSEQ-G400, после чего геномы были собраны и аннотированы. Филогенетический анализ позволил установить, что фаги vB_EcoA_PHZVL и vB_EcoA_PHPAV относятся к роду *Teseptimavirus*, формируют внутри него новый вид и являются представителями группы T7-подобных фагов. Фаг vB_EcoS_PHRAI был отнесен к роду *Tequattrovirus*, также образуя новый вид, и классифицирован как T4-подобный фаг. В результате аннотации удалось предсказать функции для приблизительно 55-65% кодируемых белков. Сравнение с базами данных факторов вирулентности (VFDB) и антибиотикорезистентности (CARD) подтвердило отсутствие в геномах генов токсинов, интеграз и детерминант устойчивости к антибиотикам, что указывает на их потенциальную безопасность для возможного терапевтического применения. На основе лабораторной коллекции, состоящей из 40 клинических изолятов *E. coli*, был определен спектр хозяев для этих трех фагов, а также исследованы их титры и морфология литических бляшек. Установлено, что данные фаги не проявляли литической активности в отношении лабораторного штамма K12 MG1655 и пробиотического штамма Nissle 1917. Наличие у бактериофага vB_EcoA_PHZVL бляшек с полупрозрачным ореолом, а также выявление в его геноме гена деполимеразы в ходе аннотации свидетельствует о том, что данный фаг обладает деполимеразной активностью. Кроме того, в ходе исследования была продемонстрирована корреляция между морфологическими особенностями формируемых бляшек и структурой поверхностных полисахаридов бактерии-хозяина.

ОПТИМИЗАЦИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДИКИ ТРАНСПОЗОН-ИНСЕРЦИОННОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ КАК ИНСТРУМЕНТА ИЗУЧЕНИЯ ОБРАТИМОГО ПЕРЕКЛЮЧЕНИЯ ФЕНОТИПА У АДГЕЗИВНО-ИНВАЗИВНОЙ *E. COLI*

А.С. Авшалумов^{1,2}, А.М. Шумрикова^{1,2}, О.В. Побегуц¹, А.Ю. Горбачев¹

¹Лаборатория протеомного анализа ФГБУ 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 культивирования на пропионате, но теряет вирулентность при переводе на питательную среду с глюкозой [1]. В рамках изучения этого феномена используется метод случайного транспозонного мутагенеза, сопряженного с секвенированием транспозон-геномных соединений, так называемый метод Tn-seq. 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 можно установить, какие гены необходимы для выживания в этих условиях [3]. 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 актуальным, т.к. задача не может быть решена на основе опубликованных исследований для других штаммов.

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

Ранее в работе была использована методика подготовки ДНК-библиотек, подразумевающая обогащение целевых фрагментов путем последовательной амплификации методом ПЦР с транспозон-специфическими праймерами. На основе имеющихся литературных данных были разработаны олигонуклеотидные праймеры для сборки ДНК-библиотек со специфическим обогащением транспозон-геномных соединений [3]. Проведена оптимизация полученной методики, в результате которой удалось увеличить долю целевых прочтений с 5% в первой версии методики до более чем 70% от общего числа прочтений. Ограничением используемого метода является наличие ложноположительных результатов, вызванных неспецифической амплификацией ввиду неспецифического отжига праймеров на случайные места генома, которая оценивается на уровне от двух до семи процентов. В связи с этим мы начали работу над альтернативным методом, подразумевающим обогащение целевых фрагментов путем гибридизации со специфическими биотинилизованными зондами с последующим захватом стрептавидином. Данная методика демонстрирует отсутствие ложноположительных идентификаций вставок и демонстрирует сходный порядок богатства полученной библиотеки в пересчете на один миллион прочтений в сравнении с амплификационным подходом.

Был проведён Tn-seq эксперимент в ряде модельных условий, включая рост на питательных средах с различными источниками углерода, а также модели адгезии и инвазии, взаимодействия с макрофагами и инфекции у мышей. В результате были выявлены кандидатные гены, потенциально связанные с выживанием на среде с пропионатом натрия и вирулентностью AIEC. Путем направленного нокаута получены мутанты *E. coli* ZvL2 с нокаутами некоторых из отобранных генов. Проанализированы гены, влияющие на формирование поверхностных структур, в том числе *wecBN*, *wecBH* и *fnlA* и ген клеточной регуляции *pdeB*. Показано влияние нокаутов на адгезивно-инвазивные свойства.

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). C. 526–540.

[3] Palani N. Transposon insertion sequencing (Tn-seq) library preparation protocol - includes UMI for PCR duplicate removal 2019.