



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ им. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН



**Сборник материалов конференции
«Геномный анализ и
генетическая модификация клеток»**

Москва, 10-11 октября 2023

Проведение конференции поддержано
Министерством науки и высшего образования РФ,
соглашение № 075-15-2021-1075 от 28.09.2021

Оглавление

ДОЛГОВРЕМЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТРАНСКРИПТОМА И ГИПЕРПОЛИПЛОИДИЯ КАРДИОМИОЦИТОВ ПОСЛЕ НЕПЕРЕНОСИМОСТИ ЛАКТОЗЫ У НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС	4
МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК И РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К МЕТОТРЕКСАТУ ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ.....	5
НИТРОЕРГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА МОЗГА У ЖИВОТНЫХ С ГЕНЕТИЧЕСКИ ОБУСЛОВЛЕННОЙ АУДИОГЕННОЙ ЭПИЛЕПСИЕЙ	6
ПОИСК ОПТИМАЛЬНОГО БИОИНФОРМАТИЧЕСКОГО ИНСТРУМЕНТА ДЛЯ УДАЛЕНИЯ АДАПТЕРОВ И ОБРЕЗКИ ЧТЕНИЙ ПРИ ОБРАБОТКЕ ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ	7
АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА RS1800497 ГЕНА DRD2/ANKK1 С ПЕРВЫМ ПСИХОТИЧЕСКИМ ЭПИЗОДОМ ШИЗОФРЕНИИ	8
ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ 3D-РАССТОЯНИЙ МЕЖДУ ГЕНОМНЫМИ ЛОКУСАМИ В РАЙОНАХ ТАД И А/В КОМПАРТМЕНТОВ В ЭРИТРОБЛАСТАХ И ЗРЕЛЫХ ЭРИТРОЦИТАХ КУРИЦЫ	9
СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОПИСАНИЕ ПЕРВИЧНЫХ ПЛЕВРАЛЬНЫХ МЕЗОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК IN VITRO.....	10
<i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ТРАНСКРИПТОМНОГО ОТВЕТА ОРГАНИЗМА НА ВЫСОКИЕ ДОЗЫ ВИТАМИНА К И ВАРФАРИН, ИНГИБИТОР ЦИКЛА ВИТАМИНА К	11
ПОЛУЧЕНИЕ КУЛЬТУРЫ ВОЛОСОВИДНЫХ КОРНЕЙ У ДИКИХ ВИДОВ РОДА <i>FAGOPYRUM</i> MILL.	12
СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЦИС-РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ГЕНА <i>POU5F1</i>	13
ВИДОВОЕ РАЗГРАНИЧЕНИЕ ЭНДЕМИЧНЫХ ВИДОВ БАЙКАЛЬСКОЙ ГУБКИ <i>LUBOMIRSKIIDAE</i> НА ОСНОВЕ ОБЪЕДИНЕНИЯ ГЕНОМНЫХ И МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ДАННЫХ.	14
ПРИМЕНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ-КОДИРУЕМОГО БИОСЕНСОРА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЛИЯНИЯ МУТАЦИИ С.6055G>A В ГЕНЕ <i>LRRK2</i> НА ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ГЛУТАТИОНА	15
ЭФФЕКТ DD ГЕНОТИПА I/D ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ACE НА ЗАБОЛЕВАНИЯ, ПОВЫШАЮЩИХ РИСК РАЗВИТИЯ ПРЕЭКЛАМПСИИ.....	16
ДИЗАЙН И ПОЛУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ РЕПОРТЕРНОЙ ЛИНИИ ЭСК МЫШИ LMP7-TAGRFP С ПОМОЩЬЮ CRISPR/CAS9.	17
ИЗУЧЕНИЕ ДИСПЕРСНЫХ ПОВТОРОВ В БАКТЕРИАЛЬНЫХ ГЕНОМАХ	18
ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ Р1RNK-ПУТИ В ГОНАДАХ ГИБРИДОВ <i>D. MELANOGASTER/D. SIMULANS</i>	19
FLIMBOW: НОВЫЙ ПОДХОД К ИДЕНТИФИКАЦИИ КЛОНОВ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВРЕМЕНИ ЖИЗНИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ	20
ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ МЫШИ С НОКАУТОМ ГЕНА <i>PSMB8</i> КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РОЛИ СУБЪЕДИНИЦЫ ИММУНОПРОТЕАСОМЫ <i>B51/LMP7</i> В ИНДУКЦИИ КЛЕТОЧНОЙ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ.....	21
МОДЕЛИРОВАНИЕ МИКРОВЯЗКОСТИ МЕМБРАНЫ В ОКРУЖЕНИИ ЗОНДА АКТИВИРОВАННОЙ КУМАРИНАМИ C525 , C334 ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ПОД	

ДЕЙСТВИЕМ ПРИРОДНОГО АПОПТОГЕНА <i>CytC – CL</i> , КАК ГЕТЕРОГЕННОГО КАТАЛИЗАТОРА.....	22
ПЕПТИД EDG РЕГУЛИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ И СИНТЕЗ БЕЛКОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В ОБРАЗОВАНИЕ ЯЗВЫ ЖЕЛУДКА	23
KAISO — НОВЫЙ РЕГУЛЯТОР СЛУЧАЙНОЙ МОНОАЛЛЕЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ	24
ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ PRR1 НА РАЗВИТИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В СРЕДИННЫХ ШИПИКОВЫХ НЕЙРОНАХ	25
АНАЛИЗ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ <i>RETE TESTIS</i> И КЛЕТКАХ СЕРТОЛИ СЕМЕННИКА МЫШИ	26
ЛИПИДНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ КАК УНИВЕРСАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ	27
ГЕНЕТИЧЕСКИ-МОДИФИЦИРОВАННЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ МОДЕЛИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ РОЛИ НЕКОНСТИТУТИВНЫХ ПРОТЕАСОМ В РАЗВИТИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ.....	28
ПОЛНОГЕНОМНЫЙ И ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КЛЕТОК CHO 4BGD, СОДЕРЖАЩИХ НОКАУТЫ ГЕНОВ <i>BAK1</i> , <i>BAX</i> , <i>DHFR</i> , <i>GLUL</i> И ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ КОПИИ ГЕНОВ <i>BCL2</i> , <i>BECN1</i>	29
РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К ХИМИОТЕРАПИИ ТАКСАНАМИ ПРИ РАКЕ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ МИШЕНЕЙ НА ОСНОВЕ МИКРОРНК ПРОФИЛИРОВАНИЯ	30
ВЛИЯНИЕ ДЛИННОЙ НЕКОДИРУЮЩЕЙ РНК NEAT1_1 НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ НЕЙРОНАЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ПРИ СТРЕССЕ.....	31
ИССЛЕДОВАНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ И СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ TSPYL5 И TRIM27 КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ МИШЕНЕЙ ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ АЛТ-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ.....	32
ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ РЕПОРТЕР ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЖИВОЙ КЛЕТКЕ НА ПРИМЕРЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ИПСК В НЕЙРОНАЛЬНОМ НАПРАВЛЕНИИ.	33
ДЕТЕКЦИЯ ИЗОФОРМ МИКРОРНК, ОБРАЗУЮЩИХСЯ ПРИ SHRNA-ОПОСРЕДОВАННОЙ СВЕРХЭКСПРЕССИИ	34
СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА С МУТАЦИЕЙ В ГЕНЕ <i>GVA1</i> С ПОМОЩЬЮ ГЕНЕТИЧЕСКИ-КОДИРУЕМЫХ БИОСЕНСОРОВ.....	35
ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ, РАСПОЛОЖЕННЫХ В РЕГУЛЯТОРНЫХ ОБЛАСТЯХ ГЕНОВ <i>CD55</i> , <i>LGALS1</i> , <i>IFNAR2</i> И АССОЦИИРОВАННЫХ С ТЯЖЕЛЫМ ТЕЧЕНИЕМ ВИРУСНЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ.....	36
БИОСОВМЕСТИМЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИЛАКТИД-КО-ГЛИКОЛИДА КАК СРЕДСТВА ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ: ВСЕСТОРОННЕЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ КОМПОНЕНТОВ СИНТЕЗА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ НАНОАГЕНТОВ	37
РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ МЕТАЛЛООРГАНИЧЕСКИХ КАРКАСОВ	38
РОЛЬ РЕЦЕПТОРОВ NOTCH3 И NOTCH4 В ПРОЦЕССЕ ПРОФИБРОТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ФИБРОБЛАСТОВ ЛЕГКИХ ЧЕЛОВЕКА.....	39
РАЗРАБОТКА КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЕЙ, ДЕМОНИСТРИРУЮЩИХ МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ФЕНОТИП БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА, ВЫЗВАННОЙ МУТАЦИЯМИ В ГЕНЕ <i>GVA1</i> ...	40

ДОЛГОВРЕМЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТРАНСКРИПТОМА И ГИПЕРПОЛИПЛОИДИЯ КАРДИОМИОЦИТОВ ПОСЛЕ НЕПЕРЕНОСИМОСТИ ЛАКТОЗЫ У НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС

Анацкая ОВ¹, Рунов АЛ², Пономарцев СВ¹, Вонский МС², Елмуратов АУ³, Виноградов АЕ¹.

¹Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург

²Всероссийский научно-исследовательский институт метрологии им. Д.И.Менделеева, Санкт-Петербург.

³Медицинский Генетический Центр Генотек, Москва

Многие сердечно-сосудистые заболевания возникают в результате задержки роста, воспалений и недостаточного питания на ранних этапах постнатального развития. Природа этого явления до конца не ясна. Здесь мы стремились проверить гипотезу о том, что системное воспаление, вызванное неонатальной непереносимостью лактозы (ННЛ), может оказывать долгосрочное патологическое воздействие на программы развития сердца и регуляцию транскриптома кардиомиоцитов. Используя крысиную модель ННЛ, вызванную перегрузкой фермента лактазы, а также методы цитофотометрии, анализа изображений и мРНК-секвенирования, мы оценили ploидность кардиомиоцитов, признаки повреждения ДНК и связанные с ННЛ долговременные транскриптомные изменения. Особенное внимание было уделено генам, экспрессия которых качественно отличалась между контролем и опытом (т.е. тем генам, которые были «включены» или «выключены»). Наши данные показали, что ННЛ вызывает долговременную задержку роста животных, гиперполиплоидию кардиомиоцитов и обширные транскриптомные перестройки. Многие из этих перестроек известны как проявления патологий сердца, включая пути ответа на повреждение ДНК и поддержание теломер, а также воспаление, фиброз и реактивацию программ развития и стволовости. Биоинформатический анализ также выявил возможные причины этих патологических особенностей, включая нарушение передачи сигналов через гормоны щитовидной железы, кальция и глутатиона. Мы также обнаружили транскриптомные проявления повышенной полиплоидии кардиомиоцитов, такие как индукция генных модулей, связанных с открытым хроматином, например, «негативная регуляция организации хромосом», «транскрипция» и «биогенез рибосом». Эти данные свидетельствуют о том, что эпигенетические изменения, связанные с ploидностью, приобретенные в неонатальном периоде, необратимо перестраивают генные регуляторные сети, меняя транскриптом кардиомиоцитов. Здесь мы представили первые доказательства того, что ННЛ может быть важным триггером программирования развития сердечно-сосудистых заболеваний у взрослых. Полученные результаты могут помочь в разработке превентивных стратегий снижения неблагоприятного воздействия ННЛ-ассоциированного воспаления на развивающуюся сердечно-сосудистую систему.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1075 от 28 сентября 2021 г.).

МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК И РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К МЕТОТРЕКСАТУ ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Балан О.В.¹, Малышева И.Е.¹, Марусенко И.М.², Барышева О.Ю.²

¹Институт Биологии Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук», ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Россия, 185910

²Петрозаводский государственный университет, пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Россия, 185910

Ревматоидный артрит (РА) - хроническое аутоиммунное воспалительное заболевание соединительной ткани, характеризующееся преимущественным поражением периферических суставов, а также развитием внесуставных изменений. Несмотря на активное внедрение генно-инженерных биологических препаратов, метотрексат (MTX) продолжает оставаться «золотым стандартом» лечения РА. Применение данного препарата, с одной стороны, обусловлено его мощной противовоспалительной активностью. С другой стороны, MTX, ингибируя метионин-S-аденозилтрансферазу, может приводить к уменьшению уровня S-аденозилметионина (SAM) – донора метильных групп и, как следствие, к изменению статуса метилирования. Исследование профиля метилирования ДНК у больных РА выявило 22% дифференциально метилированных областей и дифференциально экспрессируемых генов, часть из которых связана с генетическими вариантами риска РА. Среди аннотированных последовательностей обнаружены гены, кодирующие мембранные транспортеры сем SLC и ABC.

Цель данного исследования – анализ уровня метилирования ДНК промоторных регионов генов *ABCB1* и *GGH* у больных РА чувствительных и резистентных к терапии MTX. Материалом для исследования служили образцы ДНК, выделенные из лейкоцитов периферической крови больных РА. Диагноз устанавливался по критериям ACR/EULAR 2010 г. Эффективность терапии оценивали на основании клинико-лабораторных показателей. Информационное согласие получено от всех пациентов. Работа утверждена Этическим комитетом ГБУЗ «Республиканская больница им. В.А. Баранова». В работе использованы: наборы реактивов «EZ DNA Methylation-Gold Kit» (Zymo Research, США), «High Resolution Melting Master» (Roche, Швейцария), «Human Methylated and Non-methylated DNA Set» (Zymo Research, США). Дизайн праймеров к конвертированной ДНК осуществлялся в программе MethPrimer 2.0. Исследования выполнены на научном оборудовании ЦКП КарНЦ РАН.

В группе пациентов с диагнозом РА положительно отвечающих на терапию MTX уровень метилирования ДНК исследуемых генов был значительно выше по сравнению с группой больных резистентных к данному препарату. Показано, что снижение уровня метилирования ДНК в промоторной области гена *GGH* и, как следствие, повышение уровня экспрессии самого гена, наблюдаемое в группе пациентов резистентных к терапии MTX, может быть обусловлено наличием С аллели в их генотипе (полиморфный маркер -649 С/Т, rs3758147). Дисперсионный многофакторный анализ выявил влияние двух исследуемых показателей ($F=124.81$, $p=0.0001$; $F=73.67$, $p=0.001$) как по отдельности, так и в сочетании ($F=48.28$, $p=0.0001$) на количество транскриптов гена *GGH*. На транскрипционную активность гена *ABCB1* оказывают влияние как однонуклеотидная замена -113 Т/С rs1280997502 ($F=38.81$, $p=0.0001$), так и уровень метилирования промотора гена *ABCB1* ($F=45.01$, $p=0.001$) Однако уровень метилирования ДНК не зависит от генотипа по полиморфному маркеру -113 Т/С.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение ГЗ, тема № 0218-2019-0077.

НИТРОЭРГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА МОЗГА У ЖИВОТНЫХ С ГЕНЕТИЧЕСКИ ОБУСЛОВЛЕННОЙ АУДИОГЕННОЙ ЭПИЛЕПСИЕЙ

Башкатова В.Г., Ванин А.Ф.*

ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина», Москва,

ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва

** Email: vbashkatova@inbox.ru*

Судорожные припадки, вызываемые звуковой стимуляцией у животных с генетически детерминированной аудиогенной эпилепсией принято рассматривать как одну из наиболее адекватных экспериментальных моделей, отражающих определенные эпилептиформные синдромы у человека. Установлено, что реакция животных этих линий на звук отличается высокой стабильностью и воспроизводимостью. Вместе с тем, нейрохимические характеристики мозга животных с генетически обусловленной аудиогенной эпилепсией как вне, так и во время судорожного припадка остаются во многом неизученными. Ранее было показано, в том числе и в наших работах, что судороги различной природы сопровождаются выраженным усилением генерации оксида азота (NO). Целью работы явилось изучение участия нитроэргической системы мозга животных с генетически обусловленной эпилепсией в механизмах судорог, вызванных звуковой стимуляцией. Эксперименты были выполнены на крысах-самцах линий Genetically Epilepsy Prone (GEP) и Вистар. Все эксперименты были проведены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» ФГБНУ НИИНФ им. П.К. Анохина и требованиями Европейской конвенции по защите экспериментальных животных. Для определения NO использовали прямой количественный метод электронного парамагнитного резонанса. Обнаружено, что в ответ на звуковой сигнал у 75-80% крыс GEP развивались типичные клонико-тонические судороги. В этих же условиях ни у одного животного Вистар судорожных проявлений не наблюдалось. Показано, что исходные концентрации NO в структурах головного мозга крыс Вистар и GEP не различались. На высоте аудиогенного судорожного припадка отмечалось двукратное увеличение генерации NO в структурах мозга крыс GEP по сравнению с таковым у крыс данной линии, не подвергнутых звуковому воздействию. Подобные результаты были получены и при изучении влияния звукового воздействия на интенсивность судорог и содержание NO у мышей линии DBA/2. При изучении эффектов модуляторов нитроэргической системы установлено, что прекурсор биосинтеза NO L-аргинин не влиял ни на интенсивность аудиогенного судорожного припадка, ни на повышенный под влиянием звуковой стимуляции уровень NO в мозге крыс. В то же время донор NO нитропруссид натрия оказывал выраженный проконвульсивный эффект. Ингибиторы NO-синтазы практически полностью предотвращали увеличение продукции NO и существенно подавляли судорожные проявления, обусловленные звуковой стимуляцией. Таким образом, результаты свидетельствуют о несомненном участии NO в патофизиологических механизмах развития судорог линий животных с генетически обусловленной аудиогенной эпилепсией.

ПОИСК ОПТИМАЛЬНОГО БИОИНФОРМАТИЧЕСКОГО ИНСТРУМЕНТА ДЛЯ УДАЛЕНИЯ АДАПТЕРОВ И ОБРЕЗКИ ЧТЕНИЙ ПРИ ОБРАБОТКЕ ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

Бобрик П.Ю., Жилинский В.Э.

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минский р-н, д. Боровляны, Беларусь

Актуальность исследования. В наше время применение методов секвенирования нового поколения (NGS) в клинической диагностике позволяет выявлять различные виды мутаций. Обработка данных NGS включает в себя несколько этапов, одним из которых является тримминг прочтений и удаление адаптеров. Необработанные данные могут привести к ложным результатам исследования, поэтому поиск оптимального программного решения для обрезки чтений является актуальной задачей.

Цель работы. Цель работы – провести анализ имеющихся в свободном доступе программных решений для удаления адаптерных последовательностей и тримминга прочтений.

Материалы и методы. Для тестирования были выбраны следующие программы: AlienTrimmer (v0.4.0), BBDuk (v39.01), Cutadapt (v4.4), fastp (v0.23.4), Trimmomatic (v0.39). Набор используемых данных состоял из 30 библиотек секвенирования. Автоматизация процесса тестирования осуществлялась с помощью пользовательского скрипта Python. Качество обработанных данных оценивалось с помощью FastQC.

Результаты. Триммер последовательностей Trimmomatic справлялся с поставленной задачей (удаление адаптерных последовательностей и глобальная обрезка чтений) в среднем за 40,66 секунд. fastp обрабатывал данные в среднем за 21,5 секунду. Инструмент способен выполнять не только обрезку чтений и удаление адаптеров, но и давать качественную оценку данным секвенирования. Кроме того, fastp может самостоятельно определять и удалять адаптеры. Как и Trimmomatic, fastp способен работать со сжатыми файлами, а также поддерживает многопоточность. Программа BBDuk производила тримминг и удаление адаптерных последовательностей в среднем за 22,25 секунды, имеет широкий спектр настроек. Программе AlienTrimmer для работы потребовалось максимальное количество времени среди всех тестируемых программ – 264,10 секунды. Кроме того, AlienTrimmer не поддерживает функцию глобальной обрезки и обработку сжатых файлов. Однако стоит заметить, что для работы AlienTrimmer потребовался очень малый объём вычислительных ресурсов. Cutadapt выполнял тримминг и удаление адаптерных последовательностей в среднем за 34,75 секунды. Инструмент поддерживает многопоточность, а также имеет максимально разнообразный функционал по удалению адаптерных последовательностей.

Заключение. Можно заключить, что на данный момент существует достаточное количество программных решений, выполняющих удаление адаптеров и тримминг сырых прочтений. Среди рассмотренных программных решений выделяется fastp, так как кроме максимальной скорости работы, возможности автоопределения адаптеров и поддержки многопоточности, программа способна генерировать отчёт о качестве чтений, что делает fastp оптимальным вариантом для обработки данных NGS.

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА RS1800497 ГЕНА DRD2/ANKK1 С ПЕРВЫМ ПСИХОТИЧЕСКИМ ЭПИЗОДОМ ШИЗОФРЕНИИ

Буртовская М.И.^{1*}, Карпова Н.С.², Нурбеков М.К.² Архипов А.Ю.³

¹Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова, г. Ярославль, Россия;

²Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, г. Москва, Россия;

³Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, г. Москва, Россия.

*e-mail: m.burtovskaya@gmail.com

Шизофрения – психическое расстройство, характеризующееся сочетанием позитивной и негативной симптоматикой, поведенческих, когнитивных нарушений и, приводящее к неблагоприятным социальным и экономическим последствиям. Поскольку у части людей с шизофренией после приема антипсихотических препаратов, направленных на блокаду дофаминовых рецепторов 2 (D2), снижались положительные симптомы, предполагается, что развитие заболевания связано с дисфункцией дофаминергической системы в головном мозге. Было показано, что у пациентов с шизофренией была повышена плотность D2-рецепторов и экспрессия гена DRD2.

Согласно GWAS catalog 21 полиморфизм гена DRD2 ассоциирован с шизофренией. Полиморфизм rs1800497 находится на расстоянии 9,5 кб от DRD2, располагаясь в области 8 экзона гена ANKK1. Предполагают, что замена аминокислоты (Glu713Lys) в С-концевом повторяющемся домене ANKK1, может изменять активность и экспрессию рецептора D2, также обнаружено, что доступность DRD2 в полосатом теле была на 12% ниже, чем у индивидуумов с мажорным аллелем.

Также сообщалось, что rs1800497 связан со сниженной функциональной активностью дофамина и связыванием D2 рецепторами в среднем хвостатом и вентральном полосатом теле. Таким образом, полиморфизм rs1800497 может выступать в качестве маркера шизофрении. Однако мета-анализ не выявил существенной взаимосвязи с шизофренией. В связи с этим, целью нашего исследования было проверить наличие ассоциации полиморфизма с первым психотическим эпизодом шизофрении.

Было проведено исследование с использованием образцов ДНК 35 пациентов с первым психотическим эпизодом шизофрении и 37 здоровых лиц без психических отклонений, а также онкологических и аутоиммунных заболеваний любой локализации. Выделение ДНК проводилось методом фенол-хлороформной экстракции. Генотипирование полиморфизма rs1800497 выполнялось с помощью TaqMan зондов в ходе Полимеразной Цепной Реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Анализ ассоциации проводили с использованием пакета "SNPassoc" в программе R (Версия 4.2.3).

В результате мы выявили ассоциацию между генотипами СТ и ТТ rs1800497 в доминантной (ОШ=2,92; 95%ДИ=1,03-8,27; p-value=0,0398) и кодоминантной (ОШ=3,54; 95%ДИ=1,09-11,54; p-value=0,0289) моделях наследования.

Таким образом, носители генотипов СТ и ТТ rs1800497 имеют повышенный риск развития первого психотического эпизода шизофрении. Однако ограничением исследования является небольшой размер выборки и требуются дальнейшие исследования rs1800497 в контексте шизофрении.

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ 3D-РАССТОЯНИЙ МЕЖДУ ГЕНОМНЫМИ ЛОКУСАМИ В РАЙОНАХ ТАД И А/В КОМПАРТМЕНТОВ В ЭРИТРОБЛАСТАХ И ЗРЕЛЫХ ЭРИТРОЦИТАХ КУРИЦЫ

*Валевская Д.Л., Плотников В.А., Маслова А.В., Красикова А.В.**

Лаборатория структуры и динамики клеточного ядра, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

**alla.krasikova@gmail.com*

В ходе эритроидной дифференцировки клетки претерпевают существенные изменения, такие как уменьшение размеров, потеря митохондрий и большей части рибосом. Одним из ключевых моментов эритропоэза является постепенная компактизация ядра, при которой происходит конденсация хроматина и снижается транскрипционная активность клетки. Эти процессы сопровождаются значительными изменениями трехмерной архитектуры генома в эритроцитах и, как показывают исследования, характерны для всех хордовых.

Наиболее широко используемым методом, который применяется в исследованиях трехмерной организации генома в настоящее время, является метод полногеномного захвата конформации хромосом (Hi-C), основанный на детекции контактирующих между собой участков ДНК. При анализе Hi-C карт выявляются области с высокой частотой контактов, которые соответствуют топологически-ассоциированным доменам (ТАД), а также А и В компартменты - районы активного и неактивного хроматина соответственно.

Не менее значимую роль в исследованиях архитектуры генома играют методы флуоресцентной визуализации районов генома и, в частности, FISH. При помощи FISH возможно визуализировать расположение районов интереса в ядре отдельной клетки и измерить 3D расстояния между ними, что является важным преимуществом этого метода перед Hi-C, который учитывает только частоты контактов участков генома. Расстояние между локусами, детектируемое при помощи FISH, и данные Hi-C о частоте контактов между этими же локусами коррелируют между собой. С другой стороны показано, что 3D расстояния между локусами в пределах одного ТАДа отличаются высокой вариабельностью. Ранее полученные для зрелых эритроцитов курицы Hi-C карты, свидетельствуют об исчезновении ТАДов, в то время как компартментализация хроматина сохраняется. В связи с этим для оценки особенностей организации генома в конкретном типе клеток представляется целесообразным привлекать оба метода.

В настоящем исследовании для визуализации структуры ТАД в ядрах эритробластов линии HD3 и зрелых эритроцитах курицы мы использовали 3D-FISH с зондами на основе ВАС-клонов к восьми районам на макрохромосомах 1, 2, 4 и микрохромосоме 14. В шести районах четыре линейно равноудаленных зонда выбраны таким образом, что один из них отделен от двух остальных границей ТАД. В двух других районах каждый зонд попадает в отдельный ТАД. Трехцветная FISH позволила измерить 3D расстояния между сигналами, процент их колокализации и, таким образом, верифицировать ТАДы. В эритроблестах для четырех из шести районов мы подтвердили, что 3D расстояния между FISH-сигналами, находящимися внутри районов ТАД значимо меньше, а процент колокализации больше, чем между сигналами из разных ТАД. Для большинства из этих районов в зрелых эритроцитах мы либо не наблюдали статистически значимых различий между 3D расстояниями, либо 3D расстояния между сигналами внутри района ТАД были больше, чем между соседними ТАД. Интересно, что в большинстве из проанализированных районов в эритроцитах 3D расстояния внутри и между ТАДами в среднем больше, чем соответствующие расстояния в клетках линии HD3, несмотря на значительно меньшие размеры ядра и более высокую компактизацию хроматина. В целом, наши данные по визуализации ТАД и районов А/В компартментов в клетках эритроидного ряда курицы подтверждают реорганизацию нанодоменов в ядрах зрелых эритроцитов курицы.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ № 19-74-20075 и с использованием оборудования ресурсного центра "Развитие молекулярных и клеточных технологий" Научного парка СПбГУ.

СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОПИСАНИЕ ПЕРВИЧНЫХ ПЛЕВРАЛЬНЫХ МЕЗОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК IN VITRO

Гайфулина Л.М.^{1*}, Бакаленко Н.И.¹, Смирнова Д.В.¹, Ян Д.Е.¹, Атюков М.А.², Малашичева А.Б.¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064

²Городская многопрофильная больница №2

*lianagaifullina.ya@yandex.ru

Спонтанный пневмоторакс (СП) является потенциально смертельным заболеванием в торакальной хирургии и характеризуется высоким риском рецидива. Известно, что частота рецидивированного СП без специального лечения составляет около 30–35%, с наибольшим риском в первый год. Более того, вероятность возвращения СП достигает 62% после второго и 83% после третьего эпизода заболевания. Для предотвращения рецидивов СП используют химический и механический способы индукции плевродеза. Химический - выполняется путем введения в плевральную полость склеротирующих агентов, что приводит к образованию спаек. Этот процесс состоит из 3-х этапов: воспаления; коагуляции с образованием фибриновых мостиков; фиброгенеза с замещением фибриновых мостиков коллагеновыми спайками. Ключевую роль в этом механизме играют мезотелиальные клетки (МК), способствуя образованию спаек. Таким образом, исследование особенностей МК висцеральной плевры и их роли в спаечном процессе является актуальной задачей в поиске молекулярных механизмов возникновения СП, в частности его рецидивов.

Цель данного исследования – практическая апробация метода выделения и культивирования МК висцеральной плевры донора с СП и его рецидива с последующим моделированием химического плевродеза для изучения регенеративных свойств МК у пациентов с СП.

В данной работе модифицировали описанный в литературе метод получения МК. Полученный в результате лёгочной резекции материал ткани измельчали, фильтровали и получали суспензию, которую высаживали в отдельные культуральные фласки на питательную среду RPMI с добавлением 20% фетальной бычьей сыворотки и 3-кратного антибиотика. Характеристику клеток мезотелия проводили методами ИЦХ и ПЦР.

В рамках исследования была получена культура МК из висцеральной плевры пациентов с СП, а также выполнена их характеристика методами иммуноцитохимического окрашивания и количественной ПЦР. Было показано, что плевральные МК активно экспрессируют мембранный интегральный белок (PDPN), известный как маркер эпителиальных клеток. В меньшей степени - E-кадгерин (E-Cad), отвечающий за клеточную адгезию и мезотелиально-мезенхимальный переход, и транскрипционный фактор Sox9, маркер легочного эпителия. Слабее экспрессируются белок клеточной адгезии эндотелия VE-кадгерин (VE-Cad).

DROSOPHILA MELANOGASTER КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ТРАНСКРИПТОМНОГО ОТВЕТА ОРГАНИЗМА НА ВЫСОКИЕ ДОЗЫ ВИТАМИНА К И ВАРФАРИН, ИНГИБИТОР ЦИКЛА ВИТАМИНА К

Дьяченко А.И., Кукушкина И.В., Клычников О.И., Нефедова Л.Н.

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Россия, Москва

Витамины группы К – это жирорастворимые витамины, которые синтезируются бактериями (витамин К₂) и растениями (витамин К₁). Также существуют и синтетические витамины К (К₃-К₇). У бактерий и растений витамин К является переносчиком электронов. Витамин К у млекопитающих участвует в карбоксилировании белковых факторов свертывания крови и некоторых белков костной ткани, выступая кофактором фермента гамма-глутамилкарбоксилазы (ГГК). В процессе реакции карбоксилирования, витамин К окисляется до эпоксида и восстанавливается эпоксиредуктазой витамина К (ВКОР). Эти последовательные процессы окисления и восстановления называются циклом витамина К. Варфарин – вещество, которое связывается с ВКОР и ингибирует процесс восстановления эпоксида витамина К, таким образом препятствуя его дальнейшему участию в реакции карбоксилирования. Исследование цикла витамина К и механизмов его регуляции в организме – одна из важных задач фармакологии и медицины, поскольку сейчас уже доказано положительное действие витамина К при ряде нейродегенеративных заболеваний, таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона. Это дает возможность использовать витамин К в будущем для терапии этих заболеваний. *Drosophila melanogaster* является хорошим модельным объектом для изучения метаболизма витамина К, так как у нее обнаружены гены ГГК и ВКОР, а варфарин не вызывает негативных физиологических эффектов. Целью нашей работы было определить генную сеть, задействованную в ответе на воздействие витамина К₃ (менадиона) и ингибитора цикла витамина К (варфарина) у имаго *D.melanogaster*.

Мы определили концентрацию менадиона (3,5мМ), которая приводила к гибели половины личинок. Также мы подобрали концентрацию варфарина (1мМ), которая нивелировала отрицательные эффекты менадиона. Было проведено секвенирование транскриптома мух, выращенных на полуплетальной (3,5мМ) концентрациях менадиона, варфарине (1мМ) и смеси менадиона и варфарина, и определен круг генов, дифференциально экспрессирующихся в ответ на воздействие этих веществ. Показано, что варфарин стимулирует экспрессию генов иммунного ответа. Также варфарин снижает уровень экспрессии АТФ-связывающих белков, в частности, киназ и хеликаз, а менадион – мембран-ассоциированных, в частности, белков-транспортеров. При совместном применении этих веществ, эффекты суммируются, что говорит о независимом влиянии менадиона и варфарина на экспрессию генов.

ПОЛУЧЕНИЕ КУЛЬТУРЫ ВОЛОСОВИДНЫХ КОРНЕЙ У ДИКИХ ВИДОВ РОДА *FAGOPYRUM* MILL.

Еилджи М.^{1,2}, Бабынин Э.В.¹, Румянцева Н.И.^{1,2}

¹ Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Казань, Россия,

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

*E-mail: mmlg985@gmail.com

Род *Fagopyrum* Mill. (гречиха) объединяет как однолетние (*F. esculentum* Moench, *F. tataricum* Gaertn., *F. giganteum* Krotov), так и многолетние (*F. cymosum* Meissn.) виды. Дикие виды гречихи являются источниками важных вторичных метаболитов, в первую очередь, флавоноидов. Содержание рутина в органах гречихи татарской (*F. tataricum*) значительно выше, чем в гречихе посевной (*F. esculentum*). Многолетняя гречиха (*F. cymosum*) является одним из основных охраняемых дикорастущих растений в Китае, а ее корневище является традиционным лекарственным средством, включенным в Китайскую фармакопею. Гречиха гигантская (*F. giganteum* Krotov) является амфидиплоидом, гибридом многолетней и татарской гречихи. Целью наших исследований является разработка эффективных способов трансформации диких видов гречихи с помощью диких штаммов *Agrobacterium rhizogenes* для последующего изучения вторичного метаболизма в культуре волосовидных корней и получения физиологически активных соединений.

Для трансформации мы использовали три вида гречихи (плоды получены из коллекции ВИР): *Fagopyrum tataricum* (К-17), *F. cymosum* (К-423I) и *F. giganteum* (К-109) и три диких штамма *Agrobacterium rhizogenes* (ATCC R1000, ATCC A4, ATCC 15834), полученных из группы специализированного метаболизма корней ИФР РАН.

Для генетической трансформации использовали следующие способы: совместное культивирование эксплантов гипокотилей и семядолей асептически выращенных проростков с бактериальной суспензией, а также инъектирование бактериальной суспензии шприцом в гипокотиль проростков или в стебель микроклонально размножаемых растений. Для ко-культивирования экспланты проростков выдерживали в среде с ночной суспензией бактерий в течение 20 мин, затем подсушивали на фильтровальной бумаге, помещали на среду МС без гормонов и инкубировали 2 сут в темноте. Затем экспланты переносили на среду МС с добавлением антибиотика цефатаксима (500 мг/л) и ещё через 2 сут - на среду МС без гормонов. Для последующего культивирования отбирали быстрорастущие корни и корни, имеющие необычную морфологию, и выращивали их в жидкой среде МС без гормонов.

После инъектирования бактериальной суспензии корни появлялись выше места инъектирования через 4 -5 сут, их вырезали и культивировали 2 сут в жидкой среде МС с добавлением цефатаксима, а затем переносили на жидкую среду МС без гормонов.

Преимущество способа трансформации через инъектирование заключалось в том, что образование корней наблюдали только после инъектирования бактериальной суспензии, но не в контроле. Тогда как при трансформации через ко-культивирование корни образовывались как после ко-культивирования эксплантов с бактериями, так и в контроле. Причём, в контроле частота корнеобразования для татарской гречихи составила 94.1%, а в опыте - 34.14% и 36.61% для штаммов R1000 и A4, соответственно.

При трансформации через инъектирование у *F. tataricum* частота корнеобразования составила 14.2% (штамм 15834), *F. cymosum* - 55.5% (штамм R1000) и 37.5% (штамм 15834), *F. giganteum* - 42.8% (штамм R1000).

Проведение ПЦР анализа на гены *rolA*, *rolB*, *rolC*, *rolD* и *virC* позволило к настоящему времени идентифицировать трансформированные корневые культуры *F. tataricum*, полученные как через ко-культивирование, так и через инъектирование, а также трансформанты *F. giganteum*, полученные путём инъектирования агробактериальной суспензии.

СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЦИС-РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ГЕНА *POU5F1*

Ермакова В.В.¹, Александрова Е.В.², Кузьмин А.А.¹, Томилин А.Н.¹

¹Институт цитологии РАН

²ФГБОУ ВПО Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики

v.ermakova@incras.ru

Ген *Pou5f1* играет одну из центральных ролей в регуляции плюрипотентного состояния клеток во время эмбриогенеза. Выживание и нормальное развитие плюрипотентных клеток критически зависят от уровня экспрессии его белкового продукта – транскрипционного фактора Oct4. Как его снижение, так и повышение приводит к дифференцировке эмбриональных стволовых клеток (ЭСК). Считается, что Oct4 в дифференцированных клетках не несет функциональной нагрузки, так как экспрессия белка в них не была идентифицирована. Однако в нескольких недавних работах с нокаутом гена *Pou5f1* в дифференцированных клетках было продемонстрировано изменение их фенотипа.

Вероятно, данный эффект может быть следствием нарушения регуляторных взаимосвязей, в формировании которых участвуют регуляторные элементы гена *Pou5f1*.

Целью данного исследования стало создание клеточной модели, позволяющей изучить роль гена *Pou5f1* в формировании регуляторной сети на разных стадиях плюрипотентности: от наивной к праймированной, а затем и в дифференцированных клетках.

В работе с помощью системы CRISPR/Cas9, на основе ЭСК мыши была получена клеточная модель, где ген *Pou5f1* с минимальным набором регуляторных элементов (конститутивный промотор, дистальный и проксимальный энхансеры) был помещён в новое генетическое окружение. Одновременно в эндогенной последовательности гена в обоих аллелях была удалена область промотора-первого экзона. Таким образом ген *Pou5f1* оказывается изолирован от привычных регуляторных взаимосвязей, и становится возможным оценить последствия их отсутствия.

При помещении клеток в условия культивирования в наивном состоянии, в ЭСК возрастал уровень Oct4. Также у полученных ЭСК был нарушен переход в праймированное состояние плюрипотентности.

Choi W. et al. было показано, что переход ПСК из наивного состояния в праймированное обусловлен прежде всего переключением активности проксимального и дистального энхансеров, которые в нашей модели не были изолированы от гена. Однако их присутствия оказалось недостаточно для адекватной регуляции гена *Pou5f1* при переходе на разные стадии плюрипотентности.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1075 от 28.09.2021).

ВИДОВОЕ РАЗГРАНИЧЕНИЕ ЭНДЕМИЧНЫХ ВИДОВ БАЙКАЛЬСКОЙ ГУБКИ LUBOMIRSKIIDAE НА ОСНОВЕ ОБЪЕДИНЕНИЯ ГЕНОМНЫХ И МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ДАННЫХ.

Ицкович В.Б.¹, Букишук Н.А.¹, Соколова А.М.², Глызина О. Ю.¹, Табоада С.^{3,4,5}, Риесго А.^{3,6}, Митци К.⁶, Диез-Вивез К.^{6,7}

¹Лимнологический институт Сибирского отделения РАН, Россия, 664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3

²Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334, Россия

³Отдел наук о жизни, Музей естественной истории, Лондон, Великобритания.

⁴Кафедра биоразнообразия, экологии и эволюции, Мадридский университет Комплутенсе, Мадрид, Испания.

⁵Кафедра естественных наук, Университет Алькала де Энарес, Мадрид, Испания.

⁶Отдел биоразнообразия и эволюционной биологии, Национальный музей естественных наук, Мадрид, Испания

⁷Отдел системной биологии, Национальный центр биотехнологии (CSIC), Мадрид, Испания

Байкальские эндемичные губки Lubomirskiidae (Porifera, Spongillida) представлены 13 видами и двумя подвидами. Разграничение видов внутри видового комплекса Lubomirskiidae весьма затруднено из-за наличия промежуточных морфологических форм. Использование геномных методов для букета близкородственных видов Lubomirskiidae необходимо для понимания процессов симпатрического видообразования. Чтобы изучить этот комплекс видов, мы получили данные высокопроизводительного секвенирования с помощью ddRAD seq, используя 21 особь из 7 предполагаемых видов и получив 5532 SNP, общих для 80% особей. Наш последующий анализ с использованием ADEGENET выявил 2 разных генетических кластера: один включает *Lubomirskia baikalensis* + *Lubomirskia fusifera* + *Lubomirskia abietina*, а другой включает *Baikalospongia bacillifera* + *Baikalospongia intermedia* + *Baikalospongia recta* + *Baikalospongia fungiformis*, при этом *Swartschewska raryucea* немного отличается от остальных. Аналогичные результаты были получены после запуска STRUCTURE, в ходе которого были восстановлены 3 кластера, включающие виды трех разных родов. Отдельный иерархический анализ видов *Lubomirskia* и *Baikalospongia* сгруппировал разные виды вместе, что указывает на то, что геномные различия между родственными видами невелики. Анализ fineRADstructure с использованием 40,989 SNP также показал результаты, аналогичные тем, о которых сообщалось выше, за исключением того, что *S. raryucea* оказалась ближе к *L. baikalensis* + *L. abietina*. Таким образом, молекулярный анализ позволил выделить три кластера, соответствующие родам байкальских губок *Lubomirskia*, *Baikalospongia* и *Swartschewska*, что подтверждается морфологическими особенностями, связанными со строением скелета. Сходные генетические профили и высокий уровень интрогрессии указывают на то, что родственные виды родов *Lubomirskia* и *Baikalospongia* фактически могут рассматриваться как один и тот же вид. Впервые филогенетические взаимоотношения семи видов Lubomirskiidae были реконструированы с использованием полногеномных SNP, полученных с помощью секвенирования ddRAD, и морфологических данных. Поскольку в Байкале в настоящее время наблюдается массовое заболевание и гибель губок, информация о количестве существующих видов необходима для мониторинга и защиты биоразнообразия.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-01037, <https://rscf.ru/project/22-24-01037>.

ПРИМЕНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ-КОДИРУЕМОГО БИОСЕНСОРА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЛИЯНИЯ МУТАЦИИ С.6055G>А В ГЕНЕ *LRRK2* НА ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ГЛУТАТИОНА

Капитошина Е.В.^{1,2}, Медведев С.П.¹, Закиян С.М.¹, Малахова А.А.¹

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» 630090, Новосибирск, Россия

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» 630090, Новосибирск, Россия

*e-mail: kapitoshina@list.ru

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, болезнь Паркинсона, генетически кодируемые биосенсоры

Патогенный генетический вариант с.6055G>А в гене *LRRK2* является одной из распространённых причин позднего начала болезни Паркинсона, вызывая доминантно наследуемую форму заболевания. *LRRK2* кодирует белок дардарин, который обладает ГТФазной и киназной активностями и вовлечён во многие клеточные процессы. Белок *LRRK2* в основном локализуется в цитоплазме и наружной мембране митохондрий, а также связан с микротрубочками и аппаратом Гольджи. Предполагается, что патогенные мутации *LRRK2*, нарушающие нормальную функцию лизосом, могут быть причиной митохондриальной дисфункции и повышения уровня активных форм кислорода, которые часто наблюдаются при нейродегенерации. Для визуализации цитологических процессов, в частности окислительного стресса, используются генетически-кодируемые биосенсоры, имеющие в своём составе редокс-чувствительный флуоресцентный белок roGFP2. roGFP2 способен менять свои спектральные характеристики в зависимости от окисленного/восстановленного состояния, возбуждаясь в окисленном состоянии при длине волны 400 нм, а в восстановленном – при 490 нм. Экспрессия биосенсора окислительно-восстановительного потенциала глутатиона GRX1-roGFP2 в культуре дофаминергических нейронов, поможет изучить специфические пути и причины возникновения болезни Паркинсона.

Цель исследования – создание клеточной модели болезни Паркинсона, несущей трансген биосенсора окислительно-восстановительного потенциала глутатиона GRX1-roGFP2.

Линия индуцированных плюрипотентных стволовых клеток - LR-21 с мутацией с.6055G>А в гене *LRRK2*, получена от пациента с болезнью Паркинсона. В локус *AAVS1* данной линии встроили последовательности биосенсоров с цитоплазматической (Cyto-GRX1-roGFP2) и митохондриальной (Mito-GRX1-roGFP2) локализацией. Для трансфекции использовали плазмиды, несущие конструкции биосенсора и тетрациклинового трансаktиватора, совместно с плазмидой, кодирующей компоненты системы CRISPR/Cas9. После селекции на антибиотиках (пурамицин и неомицин) и механического отбора устойчивых колоний, проверяли наличие нецелевых встроек трансгена и локуса *AAVS1* дикого типа (без встройки) методом ПЦР. По 3 клонa с каждой встройкой биосенсора были охарактеризованы для подтверждения статуса плюрипотентности. Активность встроеного генетически-кодируемого биосенсора была проанализирована добавлением диамида и диттиотреитола (ДТТ) в культуральную среду, что позволило достичь максимально окисленного и восстановленного состояния биосенсора, соответственно. По соотношению сигналов окисленной и восстановленной формы roGFP2 оценили окислительно-восстановительный потенциал глутатиона в клетке и доказали корректную работу биосенсора. Далее по 3 линии со встройками биосенсора запущены в нейрональную дифференцировку для получения дофаминергических нейронов. С помощью созданной клеточной модели можно изучать влияние мутации *LRRK2* (с.6055G>А) на окислительно-восстановительный потенциал глутатиона в дофаминергических нейронах.

Работа поддержана грантом РФФ № 23-15-00224.

ЭФФЕКТ DD ГЕНОТИПА I/D ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ACE НА ЗАБОЛЕВАНИЯ, ПОВЫШАЮЩИХ РИСК РАЗВИТИЯ ПРЕЭКЛАМПСИИ

Карпова Н.С., Дмитренко О.П., Нурбеков М.К.*

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» ФГБНУ «НИИОПП» 125315, Москва, ул. Балтийская, дом 8

**e-mail: nataliakarpova.sp@gmail.com*

К наиболее частым осложнениям беременности относятся гестационный сахарный диабет (ГСД) и преэклампсия (ПЭ). Частота преэклампсии при гестационном сахарном диабете (7,3%) выше, чем в популяции (4,5%). Предполагается, что при этих осложнениях беременности основным патофизиологическим фактором является дисфункция эндотелия сосудов.

Основным регулятором сосудистого тонуса является ренин-ангиотензин-альдостероновая система (РААС). Активация РААС приводит к повышению артериального давления за счет увеличения объема циркулирующей крови и усиления активности других сосудосуживающих факторов. Ключевая роль в функционировании РААС принадлежит ангиотензинпревращающему ферменту (АПФ), который оказывает значительное влияние на выработку ангиотензина II не только в циркулирующей крови, но и на синтез и взаимодействие компонентов тканевой РААС, в том числе в бета-клетках островков Лангерганса и плаценте.

Синтез компонентов РААС находится под генным контролем. Полиморфизм вставки/делеции (I/D) в 16-м интроне гена ACE, характеризуется наличием (I) или отсутствием (D) Alu-повторов длиной 264 п.н. с поли-A-хвостом длиной 15 п.н. Уровень АПФ в сыворотке крови в 2 раза выше у носителей генотипа DD по сравнению с носителями генотипа II.

В предыдущем исследовании мы выявили ассоциацию I/D полиморфизма гена ACE с риском развития преэклампсии у беременных женщин с ГСД. Значимыми факторами риска преэклампсии являются гипертоническая болезнь и анемия. По данным многочисленных исследований D аллель I/D полиморфизма связана с развитием артериальной гипертензии.

В рамках исследования, проведенного на образцах ДНК 155 беременных женщин с ГСД, выявлена статистически значимая взаимосвязь между DD генотипом I/D полиморфизма гена ACE с гипертонической болезнью в рецессивной (ОШ=3,39; 95% ДИ=1,32-8,72; p-value=0,01330), кодоминантной (ОШ=4,29; 95% ДИ=1,37-13,40; p-value=0,03490) и лог-аддитивной (ОШ=2,07; 95% ДИ=1,15-3,75; p-value=0,01382) моделях наследования. Также обнаружена ассоциация между I/D полиморфизмом гена ACE и развитием анемии во время беременности в лог-аддитивной модели наследования (ОШ=1,75; 95% ДИ=1,06-2,91; p-value=0,02638).

Таким образом, генотип DD I/D полиморфизма гена ACE является фактором риска развития гипертонической болезни, анемии и преэклампсии.

ДИЗАЙН И ПОЛУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ РЕПОРТЕРНОЙ ЛИНИИ ЭСК МЫШИ LMP7-TAGRFP С ПОМОЩЬЮ CRISPR/CAS9

Колтунова Л. А.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербургский государственный университет, Биологический факультет

Осуществляя регулируемый протеолиз большинства белков, убиквитин-протеасомная система является ключевым игроком в поддержании клеточного протеостаза. В условиях изменения окружающей среды или внутренних перестроек в клетке убиквитин-протеасомная система также демонстрирует некоторые перестройки в протеасомных комплексах. Так, например, в ответ на воздействие провоспалительных медиаторов или при окислительном стрессе каталитические субъединицы протеасомы могут замещаться индуцибельными каталитическими субъединицами LMP2, MECL-1 и LMP7, и такой комплекс носит название иммунопротеасома. Несмотря на то, что иммунопротеасома впервые была описана как компонент иммунной системы, известно, что экспрессия генов иммунопротеасом наблюдается в эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) человека. При этом в ЭСК человека синтез иммуносубъединиц снижается во время дифференцировки, в то время как в ЭСК мыши экспрессия иммунопротеасом наблюдается лишь в ранней дифференцировке. Для того, чтобы объяснить наблюдаемые различия в экспрессии иммунопротеасомных генов в клетках ЭСК человека и мыши мы планируем создать репортерную линию ЭСК мыши LMP7-TagRFP с помощью CRISPR/Cas9. LMP7 – субъединица иммунопротеасомы, кодируемая геном *PSMB8*. Мечение белка LMP7 флуоресцентным белком позволит прижизненно наблюдать экспрессию гена в процессе дифференцировки ЭСК, а также локализацию иммунопротеасом, что откроет новые возможности для изучения роли иммунопротеасом в этом процессе.

Для получения репортерной линии ЭСК мыши, экспрессирующей LMP7-TagRFP, с помощью CRISPR/Cas9 были получены три плазмиды. Для первых двух были сконструированы две направляющие РНК (gRNA) для гена *PSMB8*, вносящие разрывы в последнем экзоне на расстоянии 41 и 53 нуклеотидов от стоп-кодона, соответственно. Каждая из gRNA была клонирована в вектор lentiCRISPRv2, содержащий ген Cas9, а также гены устойчивости к ампицилину и пурамицину. Наличие вставки gRNA в полученных плаزمиде проверялось секвенированием.

Для получения третьей, донорной, плазмиды в линейаризованный вектор были последовательно клонированы три последовательности: левое и правые плечи гомологии и флуоресцентный белок. Левое и правое плечи гомологии были получены с помощью ПЦР с геномной ДНК, выделенной из ЭСК мыши, с использованием специфичных праймеров, содержащих уникальные сайты рестрикции. Клонирование последовательности флуоресцентного белка TagRFP осуществлялось с помощью специфических праймеров к TagRFP, один из которых включал в себя последовательность, кодирующую серин-глициновый линкер, и оба праймера также содержали уникальные рестрикционные сайты. В качестве матрицы для ПЦР использовалась плазида, содержащая кодирующую TagRFP последовательность. Полученные ПЦР-фрагменты рестрицировались по уникальным сайтам для образования липких концов. После каждого этапа клонирования промежуточные генетические конструкции проверялись с помощью секвенирования.

Таким образом, были получены генетические конструкции, необходимые для создания репортерной линии ЭСК мыши, экспрессирующей LMP7-TagRFP, с помощью CRISPR/Cas9 геномного редактирования.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №22-14-00390.

ИЗУЧЕНИЕ ДИСПЕРСНЫХ ПОВТОРОВ В БАКТЕРИАЛЬНЫХ ГЕНОМАХ

Коротков Е.В.

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»,

katrin2@biengi.ac.ru

Нами разработан *de novo* метод идентификации дисперсных повторов, основанный на использовании случайных позиционно-весовых матриц (ПВМ) и итерационной процедуры (ИП). Созданный алгоритм (метод ИП) позволяет выявлять дисперсные повторы, для которых среднее число замен между любыми двумя повторами на нуклеотид (x) меньше или равно 1,5. Мы применили этот метод для поиска дисперсных повторов в геноме *E.coli* и геномах девяти других видов бактерий. В геноме *E.coli* было найдено три семейства дисперсных повторов, которые содержат 2199, 1170 и 993 повтора соответственно. Члены этих семейств повторов имеют среднюю длину ~470, 550 и 560 оснований и суммарная длина повторов каждого семейства составляет $1,09 \times 10^6$, $0,64 \times 10^6$ и $0,58 \times 10^6$ оснований, соответственно. Всего три семейства дисперсных повторов занимают около 50% генома *E.coli*. Столь обширные семейства повторов не могли быть обнаружены в геноме *E. coli* с помощью программ RED, RECON или Repeat_masker, а только методом ИП. Это связано с тем, что ИП метод может находить *de novo* слабо подобные семейства повторов для которых $1.0 \leq x \leq 1,5$, тогда как все другие программы могли это сделать только для $x \leq 1,0$

Мы также нашли семейства дисперсных повторов не только в геноме *E. coli*, но и у девяти других эволюционно далеких видов бактерий. У них доля генома, занятая дисперсными повторами колеблется от 30 до 50% и число семейств колеблется от 1 до 3. Почти все найденные дисперсные повторы приходятся на кодирующие районы генов и они наложены на кодирующие участки в виде определенных мотивов. высока вероятность того, что дисперсных повторы могут существовать если не у всех, то у большинства видов бактерий. Мы предполагаем, что обнаруженные семейства повторов могут участвовать в создании жидкокристаллической структуры внутри бактериальной ДНК посредством взаимодействий между повторами внутри семейства. В этом случае взаимодействия между повторами внутри семейства может создавать такую жидкокристаллическую структуру. Обнаруженные семейства повторов могут участвовать в образовании нуклеоида.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ riPНК-ПУТИ В ГОНАДАХ ГИБРИДОВ *D. MELANOGASTER/D. SIMULANS*.

Котов А.А. *, Базылев С.С., Адашев В.Е., Оленина Л.В.

Курчатовский комплекс НБИКС-пт

*kotov_alexei@mail.ru

Малые некодирующие rиPНК являются ключевой системой защиты многоклеточных организмов от транспозонов. При этом rиPНК-путь быстро эволюционирует, что связано с быстрой адаптацией к внедрению новых мобильных элементов. Такие изменения могут приводить к появлению геномных различий и возникновению репродуктивных барьеров. Ранее с помощью трансгенных конструкторов было показано, что Rhino из вида *D. simulans* не формирует функциональный комплекс (RDC) с двумя другими партнерами Deadlock и Cutoff из генома *D. melanogaster*, что нарушает экспрессию предшественников и продукцию rиPНК. В рамках данной работы мы анализировали функциональные особенности rиPНК-пути в гонадах гибридов *D. melanogaster/D. simulans*. Все гибридные самцы в потомстве имели редуцированные гонады без герминальных клеток. Это может быть связано со значительными отличиями в структуре Y-хромосомы. В рамках проекта мы провели анализ локусов, ответственных за производство rиPНК с Y-хромосомы у *D. melanogaster*. Помимо *Su(Ste)* и *petrel* кластеров мы идентифицировали еще 13 участков Y-хромосомы. При этом мажорные кластеры являются видоспецифичными для *D. melanogaster*, следовательно, могут участвовать в формировании стерильности. Самки исследуемых гибридов обладали относительно нормально развитыми яичниками в 10-15% случаев. С помощью Вестерн-блот анализа, ОТ-ПЦР и анализа полнотранскриптомных библиотек мы выяснили, что аллели *rhino* и *cutoff* из генома *D. melanogaster* практически не экспрессируются в яичниках гибридов. Это указывает на функционирование только RDC-комплекса из генома *D. simulans*. При этом предшественники rиPНК в гибридных гонадах образуются из генома обоих видов. Мы предполагаем, что белки RDC-комплекса, кодируемые аллелями из генома *D. simulans*, могут функционально компенсировать отсутствие этих белков из *D. melanogaster* в яичниках гибридов. С другой стороны, отсутствие экспрессии аллелей из генома *D. melanogaster* может способствовать эффективному формированию функциональных комплексов и частично спасать функциональность rиPНК-пути. Не смотря на то, что уровень зрелых rиPНК был снижен по сравнению со средним уровнем у родительских видов, анализ дерепрессии транспозонов демонстрирует, что только 8 из 172 семейств транспозонов активируются. Это говорит о достаточном уровне rиPНК для подавления большей части семейств транспозонов, что противоречит ранее опубликованным данным о стерильности гибридов вследствие нарушения rиPНК-пути. Таким образом, нами была выявлена частичная функциональность rиPНК-пути в гибридах. При этом полученные сведения говорят о том, что rиPНК-путь может вносить вклад в гибридную стерильность, но не является ее причиной в случае гибридов *D. melanogaster/D. simulans*.

Работа выполнена при поддержке гранта МК-1205.2022.1.4 Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых - кандидатов наук

FLIMBOW: НОВЫЙ ПОДХОД К ИДЕНТИФИКАЦИИ КЛОНОВ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВРЕМЕНИ ЖИЗНИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Крамарев И.О.^{1*}, Полиновская В.С.¹, Горбачев Д.А.¹, Соловьев И.Д.², Савицкий А.П.², Лукьянов К.А.¹

¹Сколковский институт науки и технологий

²Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН

*E-mail: Igor.Kramarev@skoltech.ru

Brainbow и Lentiviral Gene Ontology (LeGO) представляют собой широко используемые методы для отслеживания клеточных линий. Они основываются на комбинаторной экспрессии набора из красного, зеленого и синего флуоресцентных белков в различном соотношении, что создает уникальные наследуемые цветовые маркеры. Однако число клонов, которые можно достоверно различить таким способом, не превышает нескольких десятков из-за ограниченного числа комбинаций. Бурное развитие технологий высокопроизводительной микроскопии и омиксных технологий создает потребность в идентификации огромного количества отдельных клеток или их клонов в крупных образцах тканей.

Для решения этой задачи, мы создали метод FLIMbow, сочетающий RGB мечение с флуоресцентной микроскопией времени жизни (FLIM), которая позволяет различать до трех флуоресцентных белков в одном цветовом канале. Мы создали библиотеку из восьми флуоресцентных белков, комбинации которых можно отличать по времени жизни флуоресценции в синем, зеленом и красном канале. Использование лентивирусов для доставки генетической конструкции флуоресцентных белков одновременно создает случайный набор уникальных меток и обеспечивает их наследуемость. Мы выяснили, что мечение клеток FLIMbow только в зеленом канале позволяет различать сопоставимое количество клонов по сравнению с мечением LeGO в трех каналах. Применение технологии FLIMbow в 2 или 3 каналах позволяет детектировать большее количество клонов, чем было возможно ранее. При этом разница в точности идентификации клонов тем выше, чем больше число одновременно анализируемых клонов.

Кроме того, использование FLIMbow в одном канале для отслеживания клонов *in vivo*, открывает возможность для одновременного наблюдения за иными маркерами, представляющими интерес, в других каналах. Так мы провели исследование клональной гетерогенности клеток HeLa в ответ на TrailDR-индуцированный апоптоз, где время апоптоза детектировалось с помощью FRET сенсора каспазы-3 в красном и инфракрасном каналах, а клоны были найдены с помощью FLIMbow в зеленом канале.

FLIMbow может использоваться для обнаружения сотен клонов среди многих тысяч клеток. Для упрощения обработки данным мы создали программу для автоматической детекции клеток, анализа FLIM данных и кластеризации клеток в клоны. Подводя итог, FLIMbow значительно увеличивает количество клонов, которые можно отследить, а также точность их идентификации. Мы надеемся, что наша технология найдет применение в эмбриологии, исследованиях клеточной гетерогенности и динамике развития опухолей.

ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ МЫШИ С НОКАУТОМ ГЕНА *PSMB8* КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РОЛИ СУБЪЕДИНИЦЫ ИММУНОПРОТЕАСОМЫ $\beta 5i/LMP7$ В ИНДУКЦИИ КЛЕТОЧНОЙ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ.

А.В. Кузнецов¹, А.Н.Томилин¹, А.С. Цимоха¹

¹Институт Цитологии РАН Санкт-Петербург, Россия, alsiberia13@gmail.com

Значительный интерес для регенеративной медицины и фундаментальных исследований в области биологии развития представляют индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) которые, как и эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) характеризуются способностью к неограниченному самовоспроизведению и дифференцировке во все типы клеток взрослого организма. Молекулярные механизмы индукции клеточной плюрипотентности в настоящее время остаются недостаточно изученными, и сам процесс репрограммирования носит стохастический характер и характеризуется низкой эффективностью и гетерогенностью получаемых иПСК. Известно, что в поддержании клеточной плюрипотентности и дифференцировке как иПСК, так и ЭСК участвует убиквитин-протеасомная система (УПС) - ключевой игрок поддержания белкового гомеостаза за счет селективной деградации внутриклеточных белков. Так, показано, что эффективность индукции иПСК из эмбриональных фибробластов мыши сильно снижается при ингибировании активности протеасомы. Кроме того, имеются данные, указывающие на участие иммунопротеасомы в процессе репрограммирования.

В качестве клеточной модели для изучения роли иммунопротеасомы в индукции клеточной плюрипотентности, мы получили линии ЭСК мыши с нокаутом гена *PSMB8*, который кодирует каталитическую субъединицу иммунопротеасомы $\beta 5i/LMP7$. Дифференцированные производные данных клеток можно использовать для получения иПСК и изучения эффектов, вызванных инактивацией гена *PSMB8* в процессе репрограммирования. Для осуществления нокаута мы трансфецировали ЭСК мыши плазмидой, кодирующей систему CRISPR/Cas9 с направляющей РНК к целевому гену и флуоресцентный маркер для селекции клеток, получивших плазмиду. Первичный анализ отобранных по флуоресцентному сигналу отдельных клонов ЭСК, проводили методом иммуно-блоттинга с антителами к продукту гена *PSMB8*. Поскольку в ЭСК мыши ген *PSMB8* не экспрессируется, мы подвергали отобранные клоны ЭСК дифференцировке *in vitro* и последующей активации синтеза иммунопротеасом воздействием $IFN\gamma$. Клоны ЭСК, не синтезирующие продукт гена *PSMB8*, были отобраны для верификации нокаута, которую осуществляли с помощью амплификации целевого участка геномной ДНК и его анализа с помощью секвенирования на содержание точечных мутаций, приводящих к сдвигу рамки считывания. Также с помощью секвенирования мы подтвердили целостность участков геномной ДНК, которые с наибольшей вероятностью могут выступать в качестве дополнительных мишеней для выбранных нами направляющих РНК (off-target сайты). Полученные нами линии ЭСК мыши с верифицированным нокаутом гена *PSMB8* и не содержащие мутаций в пяти наиболее вероятных off-target сайтах в дальнейшем будут использованы для установления роли иммунопротеасомы в процессе клеточного репрограммирования.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ (22-14-00390).

МОДЕЛИРОВАНИЕ МИКРОВЯЗКОСТИ МЕМБРАНЫ В ОКРУЖЕНИИ ЗОНДА АКТИВИРОВАННОЙ КУМАРИНАМИ C_{525} , C_{334} ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПРИРОДНОГО АПОПТОГЕНА $CytC - CL$, КАК ГЕТЕРОГЕННОГО КАТАЛИЗАТОРА.

Левченко И.Н.^{1,3}, Владимиров Г.К.², Володяев И.В.³

¹Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет им. Н.И. Пирогова, г. Москва

²Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Институт регенеративной медицины, г. Москва

³Московский Государственный Университет, г. Москва

Электронная почта: irnlevchenko@yandex.ru

Применение физических активаторов способствует усилению интенсивности свечения на 2–3 порядка не влияя на химические процессы проходящие в системе химических реакций. Физические активаторы природные красители кумарины C_{334} , C_{525} перехватывают возбуждение у триплетно-возбужденных кетонов, образующихся при рекомбинации перекисных радикалов по механизму Рассела и являются флуоресцентными зондами. При нахождении микровязкости мембраны в окружении зонда хемилюминесценция на 3–4 порядка выше, чем сами возбужденные кетоны.

Точность нашего исследования определяется наличием кардиолипина для стабилизации рН, гашение Fe^{2+} и присутствием природных красителей кумаринов C_{334} , C_{525} . Факторы которые искажают значение микровязкости мембраны в окружении зондов кумаринов C_{334} , C_{525} : не достаточное добавление пероксида водорода, избыточное количество азота (II), метанола, денатурация белка, изменение конформации $CytC$ в комплексе $CytC - CL$. Проанализированы системы липопероксидазной и квазилипоксигеназной реакций.

Природный инициатор апоптоза цитохром C с кардиолипином $CytC - CL$ отличается от нативного $CytC$ по следующим свойствами: Обладает флуоресценцией тирозиновых и триптофановых остатков. Теряет поглощение в полосе $Core(405 - 410 \text{ нм})$ в результате разрыва координационной связи железа гема с серой $Met80$ в $CytC$. Обладает ферментативной активностью. Катализирует образование липидных радикалов в мембране в окружении флуоресцентных зондов природных красителей кумаринов C_{334} , C_{525} . Ферментативная активность зависит не только от концентрации $CytC - CL$, но и от соотношения, определяющего процент абсолютного количества денатурированной формы. Микровязкость мембраны в окружении физических активаторов природных красителей кумаринов C_{525} , C_{334} обладает разным коэффициентом поляризации. Природный краситель кумарин C_{525} «классический» физический активатор хемилюминесценции окисляется природным апоптогеном $CytC - CL$, так же как природный краситель кумарин C_{334} , при этом скорость этого окисления ограничивается лишь концентрацией самого $CytC$, который тоже разрушается в составе $CytC - CL$ под действием пероксида водорода. В комплексе с анионными фосфолипидами у $CytC$ количество α -спиралей уменьшено: на 3,46% для окисленного $CytC$ и на 0,13% для восстановленного $CytC$. Количество β -структур увеличено на 6,35% для окисленного и на 0,92% для восстановленного $CytC$; 10). Полученные нами результаты могут стать основой для создания лекарственных препаратов нового образца, которые, являясь элементами клетки, соответственно, влияют на раковые клетки и нечувствительны к синтетическим препаратам.

ПЕПТИД EDG РЕГУЛИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ И СИНТЕЗ БЕЛКОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В ОБРАЗОВАНИЕ ЯЗВЫ ЖЕЛУДКА

Линькова Н.С.¹, Хавинсон В.Х.^{1,2}

¹АНО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», Санкт-Петербург, Россия

²ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН, Санкт-Петербург, Россия

Образование язвы желудка, вызванное *H. Pylori*, сопровождается нарушением концентрации ферментов антиоксидантной системы. Биологически активный пептид EDG (Glu-Asp-Gly), нормализующий функцию антиоксидантной системы и обладающий гастропротекторным действием, может быть эффективным в профилактике и комплексной терапии этого заболевания.

Пептид EDG предотвращает апоптоз эпителиоцитов желудка человека, индуцированный *H. Pylori*. Апоптоз в культуре клеток желудка человека оценивали с применением флуоресцентной микроскопии митохондрий. В контроле митохондрии в эпителиальных клетках желудка имели нормальную округлую или овальную форму с отчетливой флуоресценцией крист и матрикса. Это сопровождалось зеленой флуоресценцией митохондриального белка GFP. Микроб *H. Pylori* вызывал деструкцию митохондрий. Интенсивность флуоресценции митохондриального белка GFP снижалась в 6,5 раза. Добавление пептида EDG предотвращало разрушение митохондрий, а экспрессия митохондриального белка GFP сохранялась на уровне контроля. Таким образом, пептид EDG препятствовал повреждению митохондрий, вызванному *H. Pylori*, и развитию апоптоза эпителиоцитов желудка.

Введение пептида EDG животным способствовало заживлению язву желудка. Крысы были разделены на группы: 1 – интактные, 2 – моделирование язвы желудка и введение физиологического раствора, 3 – моделирование язвы желудка и введение пептида EDG ежедневно в течение 5 сут с момента возникновения язвы. Язву моделировали путем введения в желудок крысы цистамина-HCl. Одновременно с первым введением цистамина-HCl в желудок крысы вводили *H. Pylori*. Под действием пептида EDG на 21 сут наблюдалось полное заживление язвы. В контроле заживление язвы наблюдалось на 30 сут. При образовании язвы желудка в эпителиоцитах в 3-6 раз возрастал синтез молекул cNOS, iNOS, HSP70, NFkB –p65. cNOS и iNOS – конститутивная и индуцибельная формы NO-синтазы. HSP70 – стресспротекторный белок теплового шока. NFkB –p65 это фактор транскрипции, активирующий воспалительную реакцию. Пептид EDG нормализует синтез этих молекул в эпителии желудка. При образовании язвы в эпителиоцитах желудка повышается экспрессия мРНК генов провоспалительного цитокина TNF α и ферментов антиоксидантной системы SOD, Cox-2 соответственно в 3,7; 5 и 2 раза. Пептид EDG снижает экспрессию мРНК этих генов до нормы.

Таким образом, пептид EDG нормализует экспрессию генов цитокинов и ферментов антиоксидантной системы в эпителиоцитах желудка. Этот эффект лежит в основе его гастропротекторного действия.

KAISO – НОВЫЙ РЕГУЛЯТОР СЛУЧАЙНОЙ МОНОАЛЛЕЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ

Лобанова Я.В.^{1*}, Мазур А.М.¹, Абрамов П.М.¹, Прохорчук Е.Б.¹, Женило С.В.¹

¹ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биоинженерии им. К.Г. Скрыбина, Москва, Россия

*yaraloban@yandex.ru

В отличие от импринтированных локусов работа случайно моноаллельно экспрессирующихся генов не зависит от родительского происхождения аллеля, а механизм регуляции моноаллельной транскрипции на данный момент не установлен. Среди случайно моноаллельно экспрессируемых генов был найден ген *trim25*. Функционально TRIM25 является E3 убиквитин-лигазой, транскрипционным фактором и онкогеном. Метил-ДНК связывающий белок Kaiso участвует в регуляции транскрипции *trim25*. Причем Kaiso не только выступает в качестве транскрипционного регулятора, но и фактора, влияющего на метилирование промотора *trim25*. Так, экспрессия десумоилированной формы белка Kaiso приводит к появлению большего количества метилированных аллелей промотора *trim25* в клетках светлоклеточного рака человека Sak1, на которых также появляется H3K9me3 модификация гистонов. Удаление Kaiso приводит к снижению количества метилированных аллелей. На основании вышеописанных данных можно предположить, что Kaiso может выступать в роли регулятора случайной моноаллельной экспрессии гена *trim25*. Ключевым фактором моноаллельной экспрессии в случае импринтинга является транскрипционный корепрессор KAP1, который участвует в поддержании импринтированного аллеля в метилированном состоянии и установлении модификации H3K9me3. Поэтому в данной работе мы решили исследовать и охарактеризовать взаимодействие Kaiso с KAP1 и попытаться ответить на вопрос, могут ли они совместно регулировать экспрессию генов.

При удалении Kaiso в клетках Sak1 методом CRISPR/CAS9 геномного редактирования количество KAP1, связанного с хроматином, снижалось по сравнению с клетками дикого типа. Далее было продемонстрировано, что KAP1 напрямую взаимодействует с Kaiso. Также было показано, что сумоилирование KAP1 в свою очередь существенно усиливается в присутствии Kaiso, чего нельзя было сказать о влиянии на модификацию KAP1 ближайшего гомолога Kaiso ZBTB4. К тому же нами были определены домены Kaiso и KAP1, участвующие в их взаимодействии. Анализ транскриптома в линиях клеток Sak1 с нокаутом Kaiso или KAP1 показал наличие пула генов, изменяющих экспрессию в обеих нокаутных линиях, что указывает на возможное наличие генов-мишеней для их совместного регулирования.

Таким образом, мы показали, что Kaiso взаимодействует с KAP1, ключевым регулятором геномного импринтинга, причем Kaiso оказывает влияние на посттрансляционную модификацию KAP1 - его сумоилирование. Также были найдены гены, экспрессия которых зависит от обоих факторов. Это позволяет рассматривать Kaiso в дальнейшем как новый фактор, вовлеченный в регуляцию моноаллельной экспрессии.

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ PARP1 НА РАЗВИТИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В СРЕДИННЫХ ШИПИКОВЫХ НЕЙРОНАХ

Макеева В.С., Малахова А.А., Медведев С.П., Закиян С.М.

ФИЦ ИЦиГ СО РАН, 630090, Новосибирск, Россия

Болезнь Хантингтона – аутосомно-доминантное нейродегенеративное заболевание, вызванное экспансией CAG повторов в первом экзоне гена HTT. Удлинение полиглутаминового тракта белка приводит к аберрантным взаимодействиям мутантного хантингтина, образованию токсичных для клетки агрегатов и N-концевых фрагментов белка. Несмотря на накопленные за годы изучения механизмов болезни данные – о взаимодействиях мутантной формы хантингтина, молекулярных путях патогенеза и отражение их на функционировании нейронов и других клеток нервной системы – до сих пор нет эффективного средства терапии.

Одним из подходов к разработке лекарственного препарата является репозиционирование, то есть использование уже разработанных и проверенных препаратов в рамках исследуемого процесса или заболевания. Длительное повреждение ДНК в ходе окислительного стресса приводит к смерти нейронов, известной как партанатоз, ферментом репарации PARP1. Этот фермент в норме синтезирует сигнальные метки в виде поли-АДФ-рибозу из NAD⁺ для привлечения и активации машины репарации. При гиперактивации фермент в ходе хронического повреждения ДНК свободными формами кислорода появляются свободные молекулы PAR, индуцирующие активацию и транслокацию в ядро фактора AIF, что вместе с потребляемыми в процессе синтеза PAR АТФ и НАД⁺ приводит к гибели нейронов. Ингибирование PARP1 изначально разрабатывались для терапии онкологических заболеваний, связанных с мутацией в гене BRCA: инактивация PARP1 приводит к смерти активно делящихся раковых клеток. Однако тестирование ингибиторов на мышинной модели болезни Хантингтона демонстрирует снижение темпов гибели нейронов и проявление симптомов болезни.

Однако тестирование препаратов на животных моделях не воспроизводит особенности реакции человеческого организма. Поэтому для получения достоверного эффекта действия ингибиторов мы создали модель на основе ИПСК пациента с болезнью Хантингтона.

Чтобы детектировать эффект действия ингибиторов на патогенез, из полученных клонов ИПСК мы получили две линии с тетрациклин-активируемой экспрессией сенсоров XBP1, эмиссией в красном спектре сигнализирующим о стрессе ЭПР, и Mitotimer, локализующимся в митохондриях и меняющим флуоресценцию с зеленого на красный при их дегенерации. Клоны со встроенными конструкциями мы дифференцируем в срединные шипиковые нейроны и анализируем эффект действия ингибиторов.

Кроме того, мы нашли помимо PARP-ингибиторов другие разработанные препараты для подавления развития болезни Хантингтона. Мишени для лекарственных средств мы икали среди молекулярных путей мутантной формы белка хантингтина.

Работа поддержана грантом РФФ № 23-15-00224.

АНАЛИЗ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ *RETE TESTIS* И КЛЕТКАХ СЕРТОЛИ СЕМЕННИКА МЫШИ

Малолина Е.А.¹, Галиагберова А.А.², Мун В.В.¹, Сабиров М.С.¹, Дашинимаев Э.Б.², Кулибин А.Ю.¹

¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

²Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, 117997 Россия

Семенник млекопитающих состоит из извитых семенных канальцев, где клетки Сертоли (КС) поддерживают развитие недифференцированных половых клеток до сперматозоидов, интерстициальной ткани с тестостерон-продуцирующими клетками Лейдига и сети семенника (*rete testis*). Последняя представляет собой группу связанных друг с другом полостей и каналов, выстланных однослойным эпителием, по которым сперматозоиды переносятся из гонады в придаток семенника – эпидидимис.

Согласно последним данным, *rete testis* играет важную роль в физиологии семенника, а ее эпителий состоит из клеток, экспрессирующих важные маркеры КС. Тем не менее мало что известно о дифференциальной экспрессии генов между популяциями клеток сети семенника (КСС) и КС. В этом исследовании, используя флуоресценция-активированный клеточный сортинг, мы получили чистые культуры неонатальных КСС и КС шестисуточных мышат и идентифицировали дифференциально экспрессирующиеся гены между двумя этими популяциями клеток с помощью секвенирования РНК. Gene ontology analysis показал, что в КС экспрессируются гены, связанные с плотными контактами, липидным и глутатионным метаболизмом и митохондриями, что согласуется с их функциональной активностью в семеннике. Среди генов, дифференциально экспрессирующихся в КСС, были гены, связанные с клеточной пролиферацией, полярностью и актиновым цитоскелетом, что характеризует их как высоко пролиферирующие эпителиальные клетки.

Затем мы сравнили наши данные с данными секвенирования РНК других исследований, проведенных на эмбриональных и ювенильных клетках, и получили список генов, перманентно дифференциально экспрессирующихся в КСС (86 генов) и КС (79 генов). Среди генов, перманентно экспрессирующихся в КСС, было много транскрипционных факторов, которые могут участвовать в спецификации этих клеток. В КС таких генов было только два, один из которых, *Dmrt1*, является ключевым маркером КС и играет важную роль в их дифференцировке в постнатальном развитии. В КСС *Dmrt1* тоже экспрессируется, но на более низком уровне. Согласно данным литературы, экспрессия почти половины генов из списков перманентно дифференциально экспрессирующихся генов в КСС и КС может регулироваться этим фактором. Таким образом, разницу в экспрессии между этими двумя популяциями клеток во многом может определять различный уровень экспрессии *Dmrt1*.

Полученные данные о дифференциальной экспрессии генов позволили идентифицировать новые маркеры КСС и КС, а также гены принимающие участие в их спецификации.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00228, <https://rscf.ru/project/23-24-00228/>.

ЛИПИДНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ КАК УНИВЕРСАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Р.О. Меликов¹, О.В. Дорожж¹, Е.С. Коренков¹, В.А. Буртелов¹, М.П. Никитин^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Научно-технологический университет «Сириус»

Генная терапия является перспективным подходом к лечению ряда социально значимых заболеваний. Несмотря на стремительный прогресс в разработке новых терапевтических молекул и инструментов редактирования генома, эффективная и безопасная доставка этих генетических конструкций в клетки и ткани остается серьезной проблемой. Липидные наночастицы (ЛНЧ) являются одними из наиболее многообещающих систем доставки нуклеиновых кислот (НК). Связываясь с НК, липиды формируют стабильные наночастицы, которые с высокой эффективностью способны преодолевать клеточную мембрану и осуществлять эндосомальный выход, доставляя терапевтические агенты в цитоплазму. При этом благодаря биосовместимому составу ЛНЧ обладают низкой токсичностью, что делает их подходящими агентами для генной терапии.

Большинство методов, применяемых для синтеза ЛНЧ, обладают общими недостатками – высокой полидисперсностью и большими размерами образуемых частиц, а также низким процентом инкапсуляции НК, что существенно ограничивает их практическое применение. Для генерации ЛНЧ в данной работе использовался проточный метод с применением системы микродозирования производства фирмы «Abisense» и микрофлюидного чипа с Y-образным каналом. Поступая по двум разным каналам, органическая фаза (липиды в этаноле) и водная (НК в цитратном буфере) далее смешивались в турбулентном потоке. Контролируемое смешение липидов и НК в потоке способствовало формированию монодисперсных наночастиц.

С помощью предложенного метода были получены частицы, способные с высокой эффективностью инкапсулировать различные типы НК. В ходе работы были оптимизированы условия синтеза, а также подобраны оптимальные липидные составы для получения наночастиц. ЛНЧ продемонстрировали высокую эффективность трансфекции на клеточных линиях *in vitro*. Гидродинамические размеры частиц составили не более 80 нм. Небольшие размеры и высокая эффективность трансфекции делает полученные частицы перспективными кандидатами для доставки генов *in vivo*.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования, соглашения 075-03-2023-106, проект FSMG-2022-0016 (синтез наночастиц и их характеристика) и 075-03-2023-106, проект 0714-2020-0004 (изучение эффективности трансфекции *in vitro*).*

ГЕНЕТИЧЕСКИ-МОДИФИЦИРОВАННЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ МОДЕЛИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ РОЛИ НЕКОНСТИТУТИВНЫХ ПРОТЕАСОМ В РАЗВИТИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ.

Морозов А.В.

Институт молекулярной Биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Деградация большинства внутриклеточных белков представляет собой динамический и строго регулируемый процесс, осуществляемый протеасомами. Известны различные формы протеасом. Среди них особое внимание привлекает роль неконститутивных протеасом (иммунопротеасом (иП) и промежуточных протеасом (пП)).

В данной работе с использованием технологии редактирования генома CRISPR-Cas9 были получены четыре опухолевые клеточные линии различной природы, синтезирующие протеасомы, содержащие меченную флуоресцентным белком mCherry субъединицу иП и пП - $\beta 5i$. Важно отметить, что экспрессия химерного гена в модифицированных клетках находится под контролем эндогенных регуляторных механизмов и увеличивается после стимуляции клеток ИФН- γ и/или ФНО- α . Установлено, что флуоресцентные протеасомы сохраняют каталитическую активность и распределяются внутри ядра и цитоплазмы клеток. С помощью RNAseq были выявлены незначительные различия в профилях экспрессии генов между модифицированными клеточными линиями и линиями дикого типа. Используя полученные клеточные линии, было показано, что противоопухолевые препараты руксолитиниб, винкристин и гефитиниб стимулируют экспрессию $\beta 5i$ -содержащих протеасом, что может влиять на развитие заболевания.

В совокупности, полученные клеточные линии могут быть использованы в качестве платформы для исследований экспрессии генов иммунопротеасом, локализации иП и пП, взаимодействия неконститутивных протеасом с другими белками, транспорта протеасом и многих других аспектов биологии протеасом в опухолевых клетках. Более того, созданная платформа может быть особенно полезна для быстрых и крупномасштабных экспериментов, направленных на оценку влияния различных условий, включая действие лекарственных препаратов на пул протеасом.

ПОЛНОГЕНОМНЫЙ И ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КЛЕТОК СНО 4BGD, СОДЕРЖАЩИХ НОКАУТЫ ГЕНОВ *BAK1*, *BAX*, *DHFR*, *GLUL* И ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ КОПИИ ГЕНОВ *BCL2*, *BECN1*

Н.А. Орлова^{1,*}, М.В. Синегубова¹, Д.Э. Колесов¹, Л.К. Даянова¹, Ю.А. Ходак¹, И.И. Воробьев¹

Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина ФИЦ Биотехнологии РАН, 119071, Москва, проспект 60-летия Октября д.7 корп.1

*e-mail: nobiol@gmail.com

Линия клеток яичника китайского хомячка СНО К1 и ее сублинии используются для производства большинства терапевтических белков. Направленное редактирование генома клеток СНО позволяет получить новые сублинии с улучшенным метаболизмом, способные дольше расти в плотной культуре, а также секретировать больше целевого белка.

При помощи системы редактирования генома CRISPR/Cas9 нами была получена клональная линия клеток СНО 4BGD с гомозиготными нокаутами двух генов проапоптотических факторов – *BAK1* и *BAX*, и двух генов потенциальных селекционных маркеров – глутаминсинтазы (*GLUL*) и дигидрофолатредуктазы (*DHFR*). Также в клетки СНО 4BGD были введены дополнительные копии генов антиапоптотического фактора Bcl-2 и индуктора макроаутофагии Beclin-1 под контролем аутологичного конститутивного промотора гена фактора элонгации трансляции 1a (*EEF1A1*) китайского хомячка.

По данным полногеномного секвенирования полученной клеточной линии, все восемь целевых аллелей были успешно разрушены в ходе двух последовательных раундов редактирования-клонирования клеток. Два отредактированных геномных локуса содержали не точечные инсерции/делеции, а протяженные вставки нерелевантной ДНК, происходящей из другой хромосомы СНО, из плазмиды, кодирующей нуклеазу Cas9, а также из генома *E.coli*. В геноме отредактированных клеток не обнаружены события нецелевого редактирования известных генов СНО для всех использованных гидовых РНК.

Клетки 4BGD обладают ожидаемым фенотипом – полной устойчивостью к индукции внутреннего пути апоптоза, отсутствием ферментативной активности глутаминсинтазы и дигидрофолатредуктазы, способностью поддерживать амплификацию трансгенов с селективным маркером *DHFR*. Линия клеток СНО 4BGD и полученный на ее основе клональный продуцент антитела живут в культуре на 6-8 дней дольше, чем родительские клетки и контрольный клональный продуцент на их основе.

Клетки 4BGD в экспоненциальной фазе роста не демонстрировали сильного увеличения уровней экспрессии белков Bcl-2 и Beclin-1, однако при их продолжительном культивировании наблюдалось многократное повышение уровня экспрессии Bcl-2 и сохранение постоянного уровня экспрессии Beclin-1. Уровни транскрипции генов, связанных с индукцией аутофагии и внутреннего пути апоптоза при старении культуры клеток 4BGD также значительно отличались от родительских клеток.

Метод, включающий мультиплексное редактирование системой CRISPR/Cas9 и одновременную стабильную трансфекцию плазмидами, кодирующих гены для оверэкспрессии, позволяет относительно быстро получать клетки требуемого фенотипа для биофармацевтических приложений.

РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К ХИМИОТЕРАПИИ ТАКСАНАМИ ПРИ РАКЕ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ МИШЕНЕЙ НА ОСНОВЕ МИКРОРНК ПРОФИЛИРОВАНИЯ

Пудова Е.А.

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

Рак предстательной железы (РПЖ) является одним из наиболее распространенных и социально-значимых онкологических заболеваний у мужчин во всем мире. Стандартным методом лечения пациентов прогрессивных стадий РПЖ является химиотерапия с применением цитотоксических препаратов из класса таксанов, однако у большинства пациентов со временем происходит неизбежное развитие резистентности, что представляет собой серьезную проблему в области онкоурологии.

Настоящее исследование посвящено идентификация транскриптомных изменений на уровне экспрессии микроРНК, ассоциированных с развитием резистентности опухолевых клеток к таксану доцетакселу.

В качестве экспериментальной модели была использована клеточная линия РПЖ - РС3, на основе которой было проведено получение условно резистентных к доцетакселу клеток путем непрерывного культивирования со ступенчатым повышением концентрации таксана в среде (4 нМ, 8 нМ и 10 нМ). Условно-резистентными считали клетки, выжившие после культивирования при концентрации доцетаксела 10 нМ. Тотальная РНК из образцов была получена с помощью набора RNeasy Micro Kit (Qiagen).

Также в исследование были включены образцы плазмы крови 11 российских пациентов с РПЖ на фоне терапии доцетакселом, периодов ответа на терапию и условной прогрессии. Тотальная РНК из образцов плазмы крови была получена с помощью набора exoRNeasy Serum-Plasma Midi Kit (Qiagen).

Подготовка микроРНК библиотек была проведена с помощью набора NEBNext® Small RNA Library Prep Set for Illumina. Секвенирование библиотек было выполнено на приборе NextSeq 2000 с использованием набора NextSeq 2000 P2 Reagent kit. Биоинформатический анализ данных был выполнен с использованием инструмента miRge 3.0. Статистический анализ был проведен с помощью R с использованием пакетов WGCNA, а также edgeR для анализ дифференциальной экспрессии.

Нами был идентифицирован модуль, статистически значимо ассоциированный с условно резистентными к доцетакселу РС3 клетками ($r_s = 0,8$; $p = 0,001$). Оценка дифференциальной экспрессии участников модуля между условно резистентными к доцетакселу клетками с контролем, а также с клетками предыдущих этапов обработки доцетакселом (4нМ и 8нМ, соответственно) показала, что экспрессия 4 микроРНК (miR-22-3p, miR-222-5p, miR-222-3p и miR-504-5p) является статистически значимой во всех рассматриваемых сравнениях между экспериментальными клетками. Все микроРНК, за исключением miR-222-5p, демонстрируют повышение экспрессии в группе условно резистентных клеток, причем наиболее высокое значение наблюдается для miR-222-3p (до 2,65 раз при сравнении с группой 4нМ). При сопоставлении результатов дифференциальной экспрессии между данными профилирования образцов экзосом плазмы крови пациентов и экспериментальных РС3 клеток, было обнаружено статистически значимое повышение экспрессии miR-22-3p и miR-222-5p при резистентности/прогрессии заболевания.

Таким образом, полученные нами результаты подчеркивают важность дальнейших исследований идентифицированных микроРНК, которые могут быть рассмотрены в качестве перспективных терапевтических мишеней, а также предиктивных маркеров развития резистентности к доцетакселу при РПЖ.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22–24–01093).

ВЛИЯНИЕ ДЛИННОЙ НЕКОДИРУЮЩЕЙ РНК NEAT1_1 НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ НЕЙРОНАЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ПРИ СТРЕССЕ

Пукаева Н.Е.^{1,2}, Лыткина О.А.¹, Овчинников Р.К.^{1,2}, Кухарский М.С.^{1,2}

¹Институт физиологически активных веществ ФГБУН ФИЦ проблем химической физики и медицинской химии РАН, Черноголовка

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва

Длинные некодирующие РНК (днРНК) играют роль тонких регуляторов работы белок-кодирующих генов и ассоциированы с целым рядом заболеваний нервной системы. Изменение уровня днРНК NEAT1 (Nuclear Enriched Abundant Transcript 1) в мозге наблюдается при ряде нейродегенеративных заболеваний и психических расстройств. NEAT1 участвует в регуляции множества нейроспецифических процессов, включая нейронную пластичность, синаптическую передачу, нейрогенез, что в свою очередь важно для механизмов адаптации к стрессу. Непосредственная роль, которую NEAT1 играет в нормальной физиологии мозга, как и механизмы участия NEAT1 в развитии патологических процессов, остаются недостаточно изученными. Формируется новая научная концепция, согласно которой NEAT1 является стресс-зависимым транскриптом, оказывающим регуляторное действие в специфических условиях, на клеточном уровне. Целью данного исследования было охарактеризовать влияние повышенного уровня NEAT1_1 на выживаемость нейрональных культур в условиях клеточного стресса. Для этого использовались первичные гиппокампальные культуры, полученные от трансгенных мышей NEAT1_1Tg, экспрессирующих в нервной системе короткую изоформу NEAT1_1 человека. Культуры подвергались действию факторов, вызывающих разные типы клеточного стресса: для индукции стресса эндоплазматического ретикулума (ЭПР) использовался ингибитор протеасом MG132, репликативного стресса – камптотетин, температурного шока – нагрев до 44° С. Для всех экспериментальных условий была проведена оценка влияния экспрессии NEAT1_1 на апоптотическую гибель клеток методом иммуноцитохимического окрашивания антителами к активированной форме каспазы 3 (CC3). В результате было показано, что при обработке клеточных культур камптотетинном, количество CC3-позитивных клеток было значимо ниже в трансгенных культурах в сравнении с контрольными. В то же время, при ЭПР-стрессе и в условиях температурного шока, наоборот, наблюдалось увеличение числа апоптотических клеток в культурах экспрессирующих NEAT1_1. Для определения возможного механизма повышенной гибели клеток и в частности нейронов в культурах, был проведен анализ экспрессии генов, участников сигнальных путей реализации клеточного ответа на ЭПР-стресс, а также генов апоптоза. Различий в экспрессии генов, ключевых участников сигнальных путей ответа на ЭПР-стресс: транскрипционного фактора Atf4, проапоптотического гена Chop, шаперона Hspa5 (Grp78), несплайсированной формы мРНК Xbp1 (usXbp1), после обработки MG132, не наблюдалось. В NEAT1_1Tg культурах в отличие от WT не выявлялся рост экспрессии ряда генов ингибиторов апоптоза Bcl2l1, Bcl2l2, Aven, т.е. не происходило индукции этих защитных генов. Таким образом эктопическая экспрессия NEAT1_1 по-разному влияет на выживаемость клеток при стрессе в зависимости от типа стрессового воздействия.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ № 22-25-00645.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ И СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ TSPYL5 И TRIM27 КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ МИШЕНЕЙ ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ ALT-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ.

Силонов С.А.^{1,2*}, Смирнов Е.Ю.¹, Шмидт. Е.А.¹, Фонин А.В.¹, Кузнецова И.М.¹, Туроверов К.К.^{1,3}

¹Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

³Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

*silonovsa25@yandex.ru

Известно, что у раковых клеток нарушен процесс нормального клеточного деления и это приводит к их неограниченному росту. Одним из путей, по которому раковые клетки поддерживают неограниченный рост, является процесс альтернативного удлинения теломер (ALT), который составляет примерно 15% среди всех раковых заболеваний. При этом ALT-положительные клетки плохо поддаются химиотерапии по сравнению с другими опухолевыми клетками. Характерной особенностью ALT является формирование PML-телец (PML-NB) ассоциированных с процессом альтернативного удлинения теломер (ALT-ассоциированными PML-NB, APB). Процессы, происходящие в APB остаются слабоизученными и ведётся активный поиск потенциальных таргетных мишеней. Известно, что в состав PML-телец входит ряд белков PML (TRIM19), TRIM27, TSPYL5 и USP7, которые являются на сегодняшний день наиболее интересными кандидатами на роль таких мишеней.

Белок TSPYL5 принадлежит к семейству семенников-специфичных Y-кодируемых белков (TSPYL), по-разному экспрессируется в различных тканях и играет роль маркера супрессора клеточного роста. Ген, кодирующий белок TSPYL5, остается гиперметилованным практически во всех первичных глиомах и меланоме, а его повышенное метилирование коррелирует с прогрессированием заболеваний, таких как рак желудка и гепатоцеллюлярная карцинома. Кроме того, известно, что TSPYL5 модулирует рост аденокарциномы путем регуляции клеточного уровня p21, а через сигнальный путь PTEN/AKT помогает повысить устойчивость злокачественных клеток к цитотоксическим агентам и γ -излучению.

В данном исследовании показано, что белок TSPYL5 может быть локализован как в цитоплазме, так и в ядрышке клеток. С помощью системы анализа клеточного цикла (аналог Fucci) подтверждено, что такая локализация белка TSPYL5 не зависит от клеточного цикла. Обнаружено, что первые 50 аминокислот белка TSPYL5 отвечают за его локализацию в ядрышке. Установлена одинаковая высокая динамическая способность к восстановлению после фотообесцвечивания (FRAP) как полноразмерного TSPYL5, так и его фрагмента (первые 50 амк). Показана специфичная колокализация TSPYL5 в PML-тельцах с TRIM27 и USP7 в ALT-положительных клеточных линиях (U2OS, A549). Полученные данные позволяют рассматривать сеть взаимодействий TSPYL5 и TRIM27 как потенциальные мишени для последующей разработки таргетной терапии ALT-положительных онкологических заболеваний.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного фонда (грант РФФ № 22-25-00813) и стипендии президента РФ № СП-5364.2022.4.

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ РЕПОРТЕР ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЖИВОЙ КЛЕТКЕ НА ПРИМЕРЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ИПСК В НЕЙРОНАЛЬНОМ НАПРАВЛЕНИИ.

Степанов А.И.^{1,2}, Шуваева А.А.^{1,2}, Терских А.В.³, Лукьянов К.А.², Гурская Н.Г.^{1,2,4}

¹Сколковский институт науки и технологии, Центр молекулярной и клеточной биологии, Москва, Россия

²Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва, Россия

³Sanford-Burnham-Prebys Medical Discovery Institute, La Jolla, CA 92037, USA

⁴Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Эпигенетические модификации (метилование, ацетилирование и т.д.) гистонов ядра играют ключевую роль в регуляции экспрессии генов. Эпигеном клетки (совокупность эпигенетических модификаций) сильно изменяется в ходе таких процессов, как дифференцировка и дедифференцировка клеток. Классические методы анализа эпигенетических модификаций, такие как масс-спектрометрия и иммунопреципитация хроматина, работают только с фиксированными клетками. Мы разработали генетически кодируемый флуоресцентный репортер MPP8-Green для выявления классической модификации гистонов, связанной с неактивным состоянием генов - H3K9me3. Этот репортер, основанный на хромодомене MPP8, позволяет визуализировать эпигенетические ландшафты H3K9me3 в одиночных живых клетках. Мы использовали данный флуоресцентный репортер для отслеживания изменений ландшафтов H3K9me3 в процессе дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) в нейрональном направлении. Оригинальный метод оценки изменений ландшафтов (MIEL) в совокупности с методами статистической обработки позволил выявить два периода глобальной реорганизации H3K9me3 в ходе этого процесса. Сочетание живой визуализации эпигенетических ландшафтов и подходов машинного обучения позволяет получить ценные сведения о динамике эпигенетических изменений в процессе клеточной дифференцировки.

Работа поддержана грантом РФФ № 22-14-00141.

ДЕТЕКЦИЯ ИЗОФОРМ МИКРОРНК, ОБРАЗУЮЩИХСЯ ПРИ shRNA-ОПОСРЕДОВАННОЙ СВЕРХЭКСПРЕССИИ

Суворов Р., Губани Д., Райгородская М., Мальцева Д.

Факультет биологии и биотехнологии, НИУ ВШЭ

Сверхэкспрессия молекул микроРНК с помощью трансдукции лентивирусными частицами, кодирующими shRNA, широко применяется для исследования функций микроРНК. В частности, данный способ является практически единственной возможностью для стабильной сверхэкспрессии микроРНК, закодированных в геноме в составе кластера, например, микроРНК-93-5p из кластера микроРНК-106b-25. В рамках такого подхода целевая микроРНК кодируется в 3p-плече shRNA, поэтому вариации процессинга shRNA РНКазой Dicer в клетке могут приводить к образованию микроРНК с измененным 5'-концом (5'-изоформам микроРНК, 5'-изомикроРНК), а значит с измененным seed-регионом. Важно отметить, что изменение seed-региона микроРНК приводит к изменению набора ее мРНК-мишеней.

Одной из особенностей shRNA-опосредованной сверхэкспрессии является добавление РНК-полимеразой III (Pol III) нескольких урацилов на 3'-конец shRNA-транскрипта в процессе распознавания сигнала терминации (мотива из пяти Т-нуклеотидов). Наличие двух выступающих нуклеотидов на 3'-конце shRNA необходимо для ее распознавания и последующего процессинга Dicer. Однако shRNA, содержащие три и более выступающих нуклеотидов на 3'-конце, по-видимому, являются не оптимальными субстратами для Dicer и могут подвергаться альтернативному процессингу.

В настоящей работе клетки линии рака простаты DU145 были трансдуцированы лентивирусными частицами, кодирующими одну из трех shRNA для сверхэкспрессии микроРНК-93-5p. Используемые конструкции shRNA отличаются последовательностью петли, что, как ожидалось, способно влиять на эффективность процессинга shRNA. Выбранные последовательности петель или были взяты из литературы как показавшие свою эффективность, или ранее использовались нами в других экспериментах.

Проведенное секвенирование микроРНК показало значительную сверхэкспрессию изоформ микроРНК-93-5p в трансдуцированных линиях. Однако среди сверхэкспрессированных были преимущественно изоформы, которые имеют измененный 5'-конец, а также содержат дополнительные два-четыре урацила на 3'-конце микроРНК.

В то же время, ПЦР-РВ оказалось нечувствительной к образованию 5'-изомиРНК. Однако наличие дополнительных урацилов на 3'-конце изомиРНК приводило к значительному снижению эффективности ПЦР.

Таким образом, наличие трех и более урацилов на 3'-конце shRNA, по-видимому, действительно приводит к смещению положения разрезания shRNA ферментом Dicer. Подтверждение сверхэкспрессии микроРНК необходимо проводить с помощью микроРНК секвенирования, ПЦР-РВ не позволяет обнаружить образование 5'-изомиРНК.

СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА С МУТАЦИЕЙ В ГЕНЕ GBA1 С ПОМОЩЬЮ ГЕНЕТИЧЕСКИ-КОДИРУЕМЫХ БИОСЕНСОРОВ

Тарасевич Д.А.^{1,2}, Яркова Л.С.^{1,2}, Медведев С.П.²*

¹Новосибирский государственный университет 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 1

²ИЦиГ СО РАН 630090, Новосибирск, Россия, пр.ак.Лаврентьева,10

**e-mail: d.tarasevich1@gsnu.ru*

Ключевые слова: Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), редактирование генов и геномов, CRISPR/CAS9, модельные объекты, болезнь Паркинсона.

Болезнь Паркинсона (БП) представляет собой одно из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний, характеризующееся гибелью дофаминергических нейронов в черной субстанции головного мозга, что приводит к снижению уровня дофамина и развитию характерных симптомов, таких как брадикинезия, ригидность мышц и тремор.

Болезнь Паркинсона обладает разнообразными клиническими проявлениями. Разделяют идиопатическую форму заболевания, проявляющуюся у лиц пожилого возраста, и наследственную форму, которая может проявляться и в более раннем возрасте. Наследственная форма является полигенным заболеванием, то есть её вызывает множество генов и их генетических вариантов. Одним из таких генов, является ген GBA1, мутацию в котором имеют примерно от 1,8% до 47% пациентов с болезнью Паркинсона, в зависимости от этнической принадлежности.

Генетическая и клиническая гетерогенность БП представляют серьезные препятствия для разработки эффективных лекарственных препаратов. Для обеспечения устойчивого развития технологий поиска лекарственных средств необходимо создавать модельные системы, учитывающие индивидуальные особенности геномов пациентов и позволяющие исследовать дофаминергические нейроны.

Методология исследования: создание пациент-специфичных клеточных моделей на базе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) от пациентов с мутацией в гене GBA1 N370S, с использованием системы CRISPR/Cas9, для добавления генетически кодируемых биосенсоров, с последующим анализом полученных клонов (ПЦР, спонтанная дифференцировка, анализ кариотипа, выявление маркеров плюрипотентности иммунофлуоресцентным окрашиванием и методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией, выявление активности щелочной фосфатазы.) и их дифференцировкой в дофаминергические нейроны.

В центре нашей работы стоит изучение стресса ЭПР, который возникает в результате накопления несвернутых белков, что вызывает активацию системы Unfolded Protein Response (UPR). UPR включает мембранные белки ЭПР: PERK, IRE1 и ATF6. Мы планируем создать тестовую модель, позволяющую детектировать активацию UPR по двум его путям: IRE1 и ATF6. Для этой цели мы встраиваем конструкции, кодирующие биосенсоры XBP1-TagRFP и EGFP-ATF6, в клетки. XBP1-TagRFP связан с активацией белка IRE1, а EGFP-ATF6 позволяет визуализировать активацию транскрипционного фактора ATF6.

На данный момент мы создали и охарактеризовали 3 клон ИПСК с биосенсором XBP1-TagRFP, что позволяет визуализировать путь активации UPR через XBP1 для изучения стресса ЭПР и патологических процессов в дофаминергических нейронах с миссенс-мутацией в гене GBA1 N370S. Это может способствовать разработке новых подходов к терапии болезни Паркинсона.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ, РАСПОЛОЖЕННЫХ В РЕГУЛЯТОРНЫХ ОБЛАСТЯХ ГЕНОВ *CD55*, *LGALS1*, *IFNAR2* И АССОЦИИРОВАННЫХ С ТЯЖЕЛЫМ ТЕЧЕНИЕМ ВИРУСНЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Уварова А.Н.¹, Ткаченко Е.А.^{1,2}, Купраш Д.В. ^{1,2}

¹Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

²Биологический факультет, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

E-mail: uvarowww@gmail.com

На данный момент известен ряд однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), ассоциированных с тяжестью течения вирусных респираторных заболеваний (в том числе таких как грипп группы А, COVID-19), однако не во всех случаях известны молекулярные механизмы, ответственные за эту ассоциацию. Для SNP некодирующих областей генома известно, что их функциональная роль часто обуславливается аллель-специфическим изменением силы связывания с полиморфным участком определенных транскрипционных факторов. Мы изучили регуляторные области генов *CD55*, *LGALS1* и *IFNAR2* в клеточных моделях макрофагов и В-лимфоцитов человека, а также проанализировали ряд полиморфизмов (rs2564978, rs4820294 и rs12482193), располагающихся в регуляторных областях выбранных генов и ассоциированных с тяжелым течением COVID-19 или гриппа. Продукты данных генов – ингибитор системы комплемента CD55, белок межклеточного взаимодействия галектин-1 и интерфероновый рецептор - играют важную роль в врожденном противовирусном ответе. Мы клонировали регуляторные элементы этих генов с разными вариантами выбранных SNP в вектор с репортерным геном. Согласно данным люциферазных тестов, область потенциального энхансера в первом интроне гена *IFNAR2* на порядок увеличивала активность промотора гена в активированных клетках линии Reh (В-лимфоциты). Также, риск-аллели полиморфизмов rs2564978 и rs4820294, располагающихся в промоторах генов *CD55* и *LGALS1* соответственно, снижали активность соответствующих промоторов в активированных клетках линии U937 (модель макрофагов). С использованием биоинформатических ресурсов мы определили транскрипционные факторы SPI1 и ELF1, вероятно аллель-специфически связывающиеся с исследуемыми регуляторными областями. Затем, с помощью подавления экспрессии выбранных транскрипционных факторов с помощью малых интерферирующих РНК и использованием специфической активации, мы показали роль этих транскрипционных факторов в активности изучаемых регуляторных элементов. Таким образом, мы охарактеризовали энхансер гена *IFNAR2* и выполнили функциональную аннотацию нескольких SNP в промоторах генов *CD55* и *LGALS1*.

БИОСОВМЕСТИМЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИЛАКТИД-КО-ГЛИКОЛИДА КАК СРЕДСТВА ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ: ВСЕСТОРОННЕЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ КОМПОНЕНТОВ СИНТЕЗА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ НАНОАГЕНТОВ

Юрьева А.М.¹, Зверева С.Д.¹, Колесникова О.А.¹, Комедчикова Е.Н.¹, Шипунова В.О.^{1,2}, Никитин М.П.^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), 141701, г. Долгопрудный, Институтский переулок, д.9

²Научно-технологический университет «Сириус», направление «Нанобиомедицина», 354340, Краснодарский край, пгт. Сириус, Олимпийский пр., д. 1

E-mail: iureva.am@phystech.edu

Наночастицы на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA) являются перспективными агентами для доставки различных препаратов к клеткам опухоли. Данные наноструктуры являются полностью биосовместимыми и биodeградируемыми, а также могут быть использованы для медленного контролируемого высвобождения низкомолекулярных соединений и других наночастиц с требуемой кинетикой данного процесса. В частности, возможно использование наночастиц и микрочастиц из PLGA в качестве агентов доставки химиотерапевтических соединений, фотосенсибилизаторов и нуклеиновых кислот как агентов для генной терапии.

Несмотря на всестороннее использование данных наноструктур для различных биомедицинских применений и даже на тот факт, что ряд PLGA частиц уже присутствует в клинической практике, существует значительный пробел в понимании механизмов доставки данных наноструктур в области солидных опухолей и возможных факторов, которые позволят усилить эффективность данного проникновения.

В ходе выполнения данного исследования был синтезирован и всесторонне исследован различными физико-химическими методами спектр наноагентов на основе PLGA как диагностических и терапевтических агентов. Было исследовано влияние различных компонентов синтеза данных структур на их физико-химические и биологические свойства.

В частности, было исследовано как именно свойства матрицы, поверхности и внутренних компонентов влияют как на физико-химические характеристики структур, так и на их способность взаимодействовать с живыми системами, а именно, связываться с раковыми клетками *in vitro* и *in vivo*, а также селективно уничтожать данные клетки.

Установлено, что свойства поверхности оказывают значительное влияние на цитотоксичность структур с постоянной внутренней структурой, а также показано, что свойства поверхности могут значительно усиливать эффективность прижизненного биоимиджинга без воздействия на функционально активные компоненты наноагента.

Данное исследование направлено на выявление механизмов действия наночастиц в живых организмах и открывает перспективы для введения наночастиц в клиническую практику в качестве агентов доставки препаратов для генной и химиотерапии.

Исследование поддержано Министерством науки и высшего образования, соглашения 075-01593-23-04, проект 720000F.99.1.B385AV67000 (синтез наноагентов) и 075-03-2023-106, проект 0714-2020-0004 (исследование свойств наноагентов *in vitro* и *in vivo*).

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ МЕТАЛЛООРГАНИЧЕСКИХ КАРКАСОВ

М.Н. Яковцева¹, А.А. Котов¹, К.Г. Евченко¹, А.В. Максимов¹, М.П. Никитин^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Московская область, Россия

²Научно-Технический Университет «Сириус», Сочи, Россия

Терапия, основанная на использовании нуклеиновых кислот для воздействия на заболевания на фундаментальном уровне транскрипции и трансляции, обладает большим потенциалом для оптимизации методов лечения социально значимых заболеваний. В частности, использование антисмысловых олигонуклеотидов позволяет регулировать молекулярные процессы экспрессии генов путем связывания с целевой мРНК и ее последующей деградацией, таким образом препятствуя синтезу нежелательного белка. Наночастицы на основе наноразмерных металлоорганических каркасов (пMOF) являются одними из наиболее перспективных систем доставки, поскольку они способны одновременно транспортировать различные вещества, обладающие полезными свойствами, обеспечивая синергетический эффект. В этой работе мы демонстрируем возможность применения наночастиц на основе металлоорганических каркасов для регуляции синтеза белка посредством доставки антисмысловых олигонуклеотидов в бесклеточной системе синтеза.

Ключевые слова — наночастицы; металлоорганические каркасы; олигонуклеотиды; генная терапия; бесклеточная система

Последние достижения медицины позволяют воздействовать на заболевания на генетическом уровне, начиная от нокдауна гена и заканчивая экспрессией выбранного белка-мишени. Однако основным ограничивающим фактором остается проблема доставки нуклеиновых кислот в клетки и их ферментативная деградация. В последние годы были успешно протестированы наночастицы на основе железа для возможности доставки различных терапевтических средств, включая нуклеиновые кислоты. Среди них металлоорганические каркасы являются одной из наиболее перспективных платформ, так как обладают высокой несущей способностью, биосовместимостью и широкими возможностями химической модификации поверхности. В данной работе мы синтезировали наночастицы на основе металлоорганических каркасов и продемонстрировали их способность не только успешно регулировать синтез белка в бесклеточной системе синтеза, но и отсутствие токсических эффектов в сочетании с удобной оптической детекцией сигнала.

Наши результаты показывают, что наночастицы можно рассматривать как перспективные средства доставки нуклеиновых кислот. Дальнейший прогресс в этой области может стать важным шагом в разработке эффективных и безопасных наноагентов генной терапии, а также изучения тонких процессов клеточной регуляции, в том числе в оптогенетике.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования, соглашение 075-03-2023-106, проект 0714-2020-0004 (синтез, характеристика и исследование токсичности наночастиц) и соглашение 075-01593-23-04, проект 720000F.99.1.B 385AV67000 (оптической детекции сигнала от генетических конструкций).

РОЛЬ РЕЦЕПТОРОВ NOTCH3 И NOTCH4 В ПРОЦЕССЕ ПРОФИБРОТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ФИБРОБЛАСТОВ ЛЕГКИХ ЧЕЛОВЕКА

Д. Е. Ян^{1*}, Н.И. Бакаленко¹, Д. Смирнова¹, П. Д. Кучур¹, Л. М. Гайфулина¹, М.А. Атюков², А.Б. Малашичева¹

¹Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, 194064

²Городская многопрофильная больница №2

daniela.yan.2003@gmail.com

Данные последних десятилетий свидетельствуют о том, что NOTCH-сигналинг участвует в инициации профибротических процессов, поражающих различные ткани и органы (кожу, почки, легкие). На данный момент описано всего 4 рецептора NOTCH (NOTCH1-4), известных у млекопитающих, тем не менее, информации о специфичности вклада каждого из перечисленных рецепторов в процессы, связанные с NOTCH-сигналингом, крайне мало. Среди них меньше всего исследованы NOTCH3 и NOTCH4.

Цель исследования: оценить влияние изменений уровня экспрессии генов рецепторов NOTCH3 и NOTCH4 на профибротическую трансформацию легочных фибробластов.

В результате частичной резекции лёгкого нами был получен материал ткани, из которого в последующем получили культуру легочных фибробластов. Инициацию профибротической трансформации проводили при помощи фактора роста TGFβ1. Внутренний домен NOTCH рецепторов (N3ICD и N4ICD) помещали в лентивирусный вектор, который вводили клеткам для запуска NOTCH-зависимой активации. Ингибирование NOTCH-сигналинга проводили с помощью лентивирусных частиц, которые несли малые шпилечные РНК (shNOTCH3 и shNOTCH4). Также после заражения легочных фибробластов вирусными частицами с N3ICD и N4ICD были исследованы транскрипты клеточных образцов.

Таким образом мы установили, что при увеличении уровня экспрессии генов *NOTCH3* и *NOTCH4* происходит усиление экспрессии ключевых маркеров фиброза, таких как α-SMA, виментина и коллагенов. При этом для NOTCH3 наблюдается менее заметный эффект, по сравнению с NOTCH4. Экспрессия данных маркеров снижается при введении инактивирующих конструкций, которые частично нейтрализуют влияние TGFβ1. Добавление обоих рецепторов приводит к повышению экспрессии маркеров фиброза с разной интенсивностью, что подтверждается анализом транскриптомных данных. При этом добавление N4ICD повышает количество профибротических маркеров и увеличивает экспрессию, а N3ICD – наоборот. Помимо этого, в образцах с N3ICD было выявлено меньше дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ), в отличие от образцов с N4ICD, в которых также были обнаружены ДЭГ, участвующие в регуляции сигнальных путей WNT и TGFβ.

РАЗРАБОТКА КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЕЙ, ДЕМОНИСТРИРУЮЩИХ МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ФЕНОТИП БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА, ВЫЗВАННОЙ МУТАЦИЯМИ В ГЕНЕ *GBA1*

Е.С. Яркова^{1,2,*}, Е.В. Григорьева², С.В. Павлова², Д.А. Сорогина^{1,2}, А.Е. Копытова³, Г.В. Байдакова⁴, Е.Ю. Захарова⁴, С.Н. Пчелина³, С.М. Закиян²

¹Новосибирский государственный университет 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 1

²ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» 630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10

³ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики имени Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» 188300, г. Гатчина, Орлова роща, 1

⁴ФГБНУ Медико-генетический научный центр 115522, г. Москва, ул. Москворечье, 1

*e-mail: e.drozдова2@g.nsu.ru

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, болезнь Паркинсона, дофаминергические нейроны, глюкоцереброзидаза, мутация р.N370S, фармакологические шапероны

Клеточные модели на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) приобрели особую популярность при моделировании нейродегенеративных заболеваний человека, поскольку образцы мозга пациентов доступны только постмортально, а животные модели имеют ограничения из-за различий в метаболизме.

Вторым по распространению нейродегенеративным заболеванием является мультифакторная болезнь Паркинсона (БП), при которой гибнут дофаминергические (ДА) нейроны компактной части чёрной субстанции. До 15% всех случаев спорадической формы БП имеют мутации в гене *GBA*, который кодирует лизосомный фермент глюкоцереброзидазу (GCase). Мутации в гене *GBA* приводят к нарушению третичной структуры GCase, это вызывает лизосомную дисфункцию и способствует формированию нейротоксичных агрегатов – телец Леви.

В связи с вышесказанным, разработка модели БП и описание ограничений её использования, представляется крайне актуальной задачей.

Из мононуклеарной фракции периферической крови двух носителей замены р.N370S в гене *GBA* и двух условно-здоровых доноров путём репрограммирования нами были получены линии ИПСК и проведена их характеристика по всем стандартам. Далее проведена направленная дифференцировка полученных ИПСК в нейральные производные. Полученные клеточные культуры демонстрируют экспрессию маркёров, специфичных для зрелых ДА-нейронов или их предшественников (TH и LMX1A, соответственно). Также в культуре выявлена экспрессия маркёра глиальных клеток (S100b), которые необходимы для поддержания жизнедеятельности ДА-нейронов *in vivo*. Полученные культуры было решено протестировать на соответствие молекулярному фенотипу замены р.N370S: в культуре носителей наблюдается снижение активности фермента GCase относительно контроля. Таким образом, мы получили релевантную модель, отражающую необходимые характеристики *GBA*-ассоциированной БП.

На следующем этапе тестирования модели было решено проанализировать реакцию культуры на потенциальные лекарственные препараты. Для этой задачи был выбран амброксол – фармакологический шаперон GCase, который находится на стадии клинических испытаний. Мы показали, что амброксол достоверно повышает активность фермента GCase и не оказывает влияния на состав популяции клеточной культуры: экспрессия генов *GBA*, *TH* и *LMX1A* не изменилась после культивирования нейральных производных в присутствии амброксола.

Однако, в ходе работы мы выявили ограничения в использовании нашей модели. Обнаружилось, что, несмотря на одинаковые условия культивирования, клеточные культуры, полученные от разных пациентов, демонстрируют различия в скорости и эффективности дифференцировки. Это накладывает отпечаток на анализ тканеспецифичных характеристик.

Необходимо более детальное изучение причин возникновения данных ограничений и их влияния на интерпретацию результатов подобных исследований.