ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ

ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-КЛИНИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА

НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ БИОЛОГИИ ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

НАУЧНЫЕ ТРУДЫ

МОСКВА

24–25 апреля 2018

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Аксельрод А.С. 14
Аниканов Н.А. 12
Антышева З.Г. 2
Ануфриева К.С. 3, 35
Арапиди Г.П. 3, 28, 32,
Ахметов И.И. 5
Бабенко В.В. 12
Багров Д.В. 23, 30
Басманов Д.В. 26
Башкиров П.В. 27, 34
Бобровский П.А. 4, 12, 36
Богомазова А. 32
Богомякова М.Е. 4
Борисов О.В 5
Бутенко И.О. 6, 35
Варижук А.М. 7, 9
Васильев А.О. 17
Вахитова М.Т. 7
Волков Т.А. 9
Воловиков Е.А. 4, 33
Гаранина И.А. 21
Генерозов Э.В. 5
Гладкова М.Г. 21
Говоров А.В. 17
Говорун В.М. 3, 6, 17, 35
Горобец Ю.М. 11
Графская Е.Н. 12
Гуляев А.С. 13
Долудин Ю.В. 17
Дубров В.Э. 37
Круглов Е.Е. 18
Евсютина Д. 20
Еникеев Д.В. 17
Желанкин А.В. 14
Жукова Ю. 32
Жукова Ю.Н. 4
Захаржевская Н.Б. 24
Ивлева Е.А. 15
Ильина Е.Н. 19
Кириллова Ю.Г. 9
Клинов Д.В. 11, 15, 23, 26, 30
Кобрицов Г.П. 37
Конанов Д.Н. 16
Корниенко М.А. 19
Костевич В.А. 29
Кострюкова Е.С. 17
Котова Е.С. 17
Кулемин Н.А. 5
Купцов Н.С. 19
Лавренова В.Н. 36
Лагарькова М.А. 3, 4, 11, 32, 33, 35
Лазарев В.Н. 4
Лебедева О.С. 4, 11, 28, 32, 33, 35
Левкина А. 20
Летаров А.В. 19
Летарова М.А. 19
Логиновский А.О. 21
Максютов Н.Ф. 21
Манолов А.И. 7, 16
Манувера В.А. 25
Матюшкина Д.С. 6, 24
Мирошина О.А. 22
Монахова К.З. 23
Морозов А.О. 17
Морозова О.В. 15
Образцова Е.А. 15
Орехов Д.И. 21
Осмоловский И.С. 16
Павлова Е.Р. 23, 30
Павлюков М.С. 3, 35
Петрова Д.А. 24
Петрухин И.Ю. 25
Побегуц О.В. 6, 24
Позмогова Г.Е. 7, 9
Полина Н.Ф. 12
Потолдыкова Н.В. 17
Прилепская Е.А. 17
Прусаков К.А. 26
Рагозин А.О. 37
Романов С.А. 26, 27
Савочкина Ю.А. 17
Северов В.В. 7
Сидоров В.С. 37
Силаков Н.М. 28
Соколов А.В. 29
Соколова А.И. 30
Соломатина Е.С. 28
Ставцев Д.С. 31
Султанов Р.И. 28, 32
Урум А.В. 33
Фарафонова Т.Е. 12
Федосеева А.И. 11
Фисунов Г.Ю. 20, 21, 24
Харитонов А.Е. 33
Харлампиева Д.Д. 12
Чекашкина К.В. 27, 34
Шарова Е.И. 2, 14, 17
Шендер В.О. 3, 35
Широков Д.А. 22
Шитиков Е.А. 19
Шнайдер П.В. 35
Штефан И.А. 36
Щербаков И.М. 37
Юдин А.В. 37

КАКИЕ ФАКТОРЫ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ДАННЫХ TCGA НЕОБХОДИМО УЧИТЫВАТЬ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

Антышева З.Г.[1], Шарова Е.И.[2]

[1]*Московский физико-технический институт (государственный университет);*
[2]*Лаборатория молекулярной генетики человека ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России*

Данные глобального ракового репозитория TCGA [1] гетерогенны не только в силу своего происхождения, но и в силу размеров выборок, и зачастую содержат образцы, биологически или технически не соответствующие критериям проекта. При этом в некоторых крупных проектах, анализирующих данные TCGA (firebrowse.org, proteinatlas.org), данные для анализа забираются целиком, без учета технических примечаний или наличия аномальных выбросов.

Для исследования влияния гетерогенности данных и необходимости учета некоторых факторов на результаты выявления кандидатных биомаркеров на основе данных TCGA, нами был взят рак простаты, как обладающий значительным количеством технических примечаний. Ранее Никитиной А. с соавт. [2] уже был отмечен факт подмеса чужеродной ткани в простатные образцы как в TCGA, так и на собственных данных.

Для проверки влияния тех или иных факторов на итоговые параметры дифференциальной экспрессии кандидатных раковых биомаркеров нами был выработан ступенчатый протокол анализа гетерогенности простатного транскриптомного сета данных TCGA. В результате применения протокола из 550 образцов (52 – нормальных, 498 – раковых) осталось 514 образцов (38 – нормальных, 476 – раковых). Анализ показал, что после очистки сета количество значимо дифференциально экспрессированных генов ($|\log_2 FC|>2$, p-value <0,001, RPKM>3) увеличилось в 1,4 раза со 140 до 197. 97 генов оказались общими для стартового и очищенного сета данных, в частности гены PCA3, ERG, PCAT14, AMACR и др. Анализ литературы также показал, что при максимально аккуратном анализе с учетом гетерогенности образцов более 20 генов, впоследствии подтвержденных как значимо изменяющих свою экспрессию в раке простаты, в том числе метастатическом, могут быть дополнительно обнаружены при потере всего 8 генов, если брать весь сет без учета гетерогенности.

Список литературы

1. Weinstein JN et al. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project //Nat Genet. 2013; 45: 1113–20.
2. Nikitina AS et al. Novel RNA biomarkers of prostate cancer revealed by RNA-seq analysis of formalin-fixed samples obtained from Russian patients // Oncotarget. 2017, May 16; 8(20): 32990–33001.

ВЛИЯНИЕ ДИСРЕГУЛЯЦИИ АЛЬТЕРНАТИВНОГО СПЛАЙСИНГА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ХИМИОТЕРАПИИ

Ануфриева К.С.[1,2,3], Шендер В.О.[1,2], Арапиди Г.П.[1,2,3], Павлюков М.С.[1], Лагарькова М.А.[2], Говорун В.М.[1,2,3]

[1]*ФГБУ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН*
[2]*ФГБУ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России*
[3]*Московский физико-технический институт (государственный университет*

Экспрессия абберантных форм транскриптов и возникновение мутаций в генах сплайсосомы являются факторами, способствующими развитию онкологических заболеваний. В последние годы появляются исследования, свидетельствующие о взаимосвязи между нарушениями регуляции альтернативного сплайсинга и устойчивостью раковых клеток к химиотерапии. Однако, в большинстве этих исследований основное внимание уделялось изменению соотношения представленности изоформ определенных генов, а не глобальным изменениям транскриптома. В представленной работе мы показали, что различные типы химиотерапевтических препаратов приводят к однотипным изменениям в альтернативном сплайсинге. Более того, удержание интрона оказалось наиболее частым событием альтернативного сплайсинга после воздействия различных типов химиотерапии. Чтобы выявить механизм, лежащий в основе этого эффекта, мы проанализировали изменения экспрессии генов, представленности белков, уровня фосфорилирования после воздействия облучения, гипоксии и 10 различных типов химиотерапевтических препаратов. Мы продемонстрировали, что после воздействия различных видов химиотерапии на раковые клетки происходит снижение представленности белков сплайсосомы. Механизмы, вовлеченные в этот процесс, достаточно разнообразны – это и удержание интрона, и снижение экспрессии генов, а также фосфорилирование и секреция во внеклеточное пространство белков сплайсосомы. Согласно результатам биоинформатического анализа и нашим собственным экспериментальным данным, снижение представленности сплайсосомных белков может способствовать выживанию раковых клеток после терапии. Снижение представленности сплайсосомных белков в клетке запускает арест клеточного цикла и сигнализирует клетке о необходимости репарации ДНК. Мы показали, что механизм формирования резистентности к химиотерапии может быть подавлен ингибиторами сплайсинга (Pladienolide B). Pladienolide B значительно повышал чувствительность раковых клеток к цисплатину. Мы предполагаем, что Pladienolide B может быть перспективным терапевтическим препаратом, повышающим эффективность химиотерапии.

Работа поддержана грантом РНФ 17-75-20205 (LC-MS/MS анализ), РФФИ 18-34-00622.

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИНИЙ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ КЛЕТОК С ИНАКТИВАЦИЕЙ ГЕНА БЕТА-2-МИКРОГЛОБУЛИНА МЕТОДОМ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ CRISP/CAS9

Богомякова М.Е., Бобровский П.А., Жукова Ю.Н., Лебедева О.С., Воловиков Е.А., Лазарев В.Н., Лагарькова М.А.

Лаборатория клеточной биологии, лаборатория генной инженерии
ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Основной причиной отторжения тканей при трансплантации является несовпадение гаплотипов HLA донора и реципиента. Открытие индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) открывает широкие перспективы для развития регенеративной медицины. Тем не менее, получение индивидуальных ИПСК нерентабельно из-за времени и средств, необходимых для контроля качества репрограмированных клеток. Возможным решением является создание охарактеризованных универсально совместимых линиий ИПСК, подходящих для трансплантации любому пациенту. Белки HLA I класса представляют собой гетеродимеры, состоящие из тяжелой α цепи и легкой цепи бета-2-микроглобулина (*b2m*). Инактивация *b2m* приводит к нарушениям формирования функционального комплекса HLA I, поэтому дифференцированные производные ИПСК без *b2m* должны обладать пониженной иммуногенностью по отношению к аллогенным $CD8^+$ Т клеткам реципиента. Следует отметить, что клетки, не несущие на поверхности молекулы HLA I класса, могут стать мишенями для NK клеток.

В ходе работы методом геномного редактирования CRISP/Cas9 были получены линии ИПСК с генетической инактивацией *b2m*. Редактирование обоих аллелей гена *b2m*, а также отсутствие «офф-таргет» эффектов в потенциальных локусах было подтверждено секвенированием. Методом проточной цитометрии было показано, что на поверхности всех выбранных для анализа клонов, а также их дифференцированных производных, отсутствует экспрессия молекул b2m и HLA-ABC. Генетические манипуляции и нарушение экспрессии HLA I класса не влияют на способность к самовоспроизведению, геномную стабильность и плюрипотентность полученных ИПСК: линии обладают нормальным кариотипом, экспрессируют основные маркеры плюрипотетных клеток Oct4, Sox2 и Nanog, а также способны к формированию эмбриоидных телец и к спонтанной дифференцировке в производные трех зародышевых листков. Иммуногенность нокаутных линий была проверена по стандартным иммунологическим протоколам, дифференцированные производные ИПСК демонстрируют повышенную резистентность к аллогенным $CD8^+$ Т лимфоцитам *in vitro*. Дальнейшие исследования предполагают анализ ответа NK клеток при ко-культивировании с полученными ИПСК, а также дальнейшее генетическое изменение линий ИПСК для получения линий, резистентных к натуральным киллерам.

ПОЛНОГЕНОМНОЕ АССОЦИАТИВНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА МЫШЕЧНЫХ ВОЛОКОН ВЫЯВИЛО 5 ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ВАРИАНТОВ, СВЯЗАННЫХ С ПРЕОБЛАДАНИЕМ ВОЛОКОН МЕДЛЕННОГО ТИПА

Борисов О.В, Кулемин Н.А., Ахметов И.И., Генерозов Э.В.

Лаборатория молекулярной генетики человека ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Введение. Биохимические свойства мышечной ткани определяются соотношением нескольких типов мышечных волокон. Преобладание медленных мышечных волокон ведет к повышению выносливости спортсмена, преобладание быстрых волокон является фактором успешности для спринтеров. Поскольку состав мышечных волокон определяется наследственными факторами до 45%, целью этого исследования было определение генетических маркеров, ассоциированных одновременно со структурой мышечных волокон и характеристиками спортивной успешности атлетов.

Материалы и методы. Были проанализированы профили высокоплотного генотипирования (HumanOmni1-Quad) российских спринтеров (n = 89) и стайеров (n = 103). Для независимой группы из 45 мужчин-спортсменов было также выполнено высокоплотное генотипирование (OmniExpressExome-8) и исследование состава мышечных волокон с помощью иммуногистохимического анализа. Для валидации результатов использовалась выборка из японских спортсменов (54 спринтера, 60 стайеров). Анализ, обработка и аннотирование данных выполнялись с использованием Plink, R и Ensembl VEP. Результаты: Российские спринтеры и стайеры сравнивались с помощью дизайна случай-контроль: все вместе и после исключения субэлитных спортсменов. При пересечении результатов этого этапа с исследованием аналогичного дизайна с японскими спортсменами мы установили 201 однонуклеотидный вариант (SNP) с уровнем значимости $p<0,05$. Далее, мы сравнили полученные результаты с данными регрессионного анализа по составу мышечных волокон (в процентах) и идентифицировали 5 SNP, ассоциированных одновременно с преобладанием медленных волокон у мужчин и со статусом спортивной успешности в видах физической активности на выносливость. Два SNP (rs4561252, rs7080650) относятся к суперсемейству фосфодиэстеразы и участвуют в регуляции сердечно-сосудистой функции, другие три варианта (rs6789275, rs7525663, rs9922975) являются межгенными и требуют дальнейшего функционального исследования. Ни один из 5 SNP не был описан ранее в каталоге NHGI-EBI GWAS.

Выводы. В этом исследовании было выявлено 5 SNP, которые ассоциированы одновременно с преобладанием медленных волокон и успешностью в видах спорта на выносливость.

Работа поддержана Российским научным фондом, грант № 17-15-01436.

ОЦЕНКА ПРОТЕОМНОЙ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII* ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ ТРАНСКРИПЦИИ

Бутенко И.О., Матюшкина Д.С., Побегуц О.В., Говорун В.М.

Лаборатория простых систем ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Одним из наиболее интересных и удобных модельных объектов для системных исследований являются бактерии класса молликут, состоящего из трех основных родов: *Mycoplasma*, *Spiroplasma* и *Acholeplasma*. Особенностью молликут является отсутствие клеточной стенки, редуцированный геном, изменение функции кодона UGA со стоп-кодона на кодирование триптофана. Вследствие паразитизма данных бактерий, у них редуцированы многие метаболические пути. В отличие от большинства представителей молликут, бактерии рода *Acholeplasma* относят в основном к сапрофитам и комменсалам. Данные микроорганизмы распространены повсеместно и их удавалось обнаружить в тканях растений, насекомых, млекопитающих, и даже сточных водах.

В данной работе, на модели *Acholeplasma laidlawii* был разработан метод протеомного профилирования отдельных колоний, с помощью которого был изучен ответ *A. laidlawii* на обработку ингибитором синтеза мРНК – рифампицином. С помощью метода мониторинга множественных реакций (MRM) были получены протеомные профили отдельных колоний *A. laidlawii* после обработки бактериальной культуры рифампицином. Была установлена степень вариабельности ключевых белков *A. laidlawii* в различных колониях, а также определена группа белков, чья представленность не менялась. Кроме того, для профилированных колоний была определена жизнеспособность клеток *A. laidlawii* при дальнейшей культивации в лабораторных условиях, и показана стабильность наблюдаемых протеомных изменений. На основе этих данных были обнаружены качественные и количественные параметры состава протеома, коррелирующие с выживаемостью отдельной бактериальной колонии при дальнейшей культивации, а также получена оценка пределов изменения состава протеома *A. laidlawii*, при которых клон сохраняет способность к пролиферации в лабораторных условиях.

ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ РОЛЬ G4 В ГЕНОМНЫХ ПЕРЕСТРОЙКАХ. ПОИСК ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ

Вахитова М.Т.[1], Северов В.В.[2], Варижук А.М.[2], Манолов А.И.[3], Позмогова Г.Е.[2]

[1]Лаборатория постгеномных исследований в биологии, [2]Лаборатория искусственного антителогенеза, [3]Лаборатория биоинформатики ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Сегодня показано участие G-квадруплексов ДНК (G4) в генной регуляции, транслокации и рекомбинации, а также в развитии антигенной изменчивости широкого круга патогенов [1], однако механизмы этих процессов остаются неясными. Ранее нами была сформулирована гипотеза о взаимодействии G-богатых фрагментов ДНК с образованием синаптического комплекса [2-3]. Формирование такого комплекса может приводить как к двунитевым разрывам, так и к обмену цепей. Межмолекулярный G4 в этом случае играет роль драйвера рекомбинации и должен оставаться консервативным в геномах.

Цель данной работы состоит в поиске биоинформатическими методами связи между потенциальными G4 сайтами (PQS) и процессами рекомбинации. Для проведения исследования были выбраны шесть различных геномов бактерии Streptococcus pyogenes, полностью собранных в разных лабораториях. При поиске PQS (ImGQfinder) для блоков G (длиной ≥3) допускалось присутствие одного мисматча [4]. Для определения рекомбинантных областей производилось множественное выравнивание геномов с использованием алгоритма Mauve [5], после чего определялась вероятность возникновения рекомбинации с помощью программы FastGear [6].

Анализ показал, что PQS – одни из самых консервативных сайтов. В каждом геноме было найдено от 34 до 44 сайтов PQS, из которых 17 присутствовали во всех геномах. Каждый штамм содержал от 2 до 5 уникальных сайтов PQS, однако около половины из них возникло в результате одной-двух мутаций в области G-трактов. Остальные PQS присутствовали в неизменном виде в нескольких геномах или могли содержать одну-две замены в области петель. Важно отметить, что промежутки длины 200 нуклеотидов в области PQS в большинстве случаев обладают высокой степенью сходства и не содержат крупных делеций. Полученные результаты аргументируют возможность *in vivo* реализации предложенного механизма G4-синапсиса и его участия в рекомбинационных процессах.

Список литературы

1. Harris L.M.Merrick C.J. // PLoS Pathog. 2015. Vol. 11, N 2. P. e1004562.
3. Varizhuk A.M., Sekridova A.V., Tankevich M.V., Podgorsky V.S., Smirnov I.P.Pozmogova G.E. // Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry. 2017. Vol. 11, N 2. P. 146-153.
4. Varizhuk A., Severov V.Pozmogova G. // Advanced Materials Letters. 2018. Vol. 9, N 2. P. 91-96.
5. Varizhuk A., Ischenko D., Tsvetkov V., Novikov R., Kulemin N., Kaluzhny D., Vlasenok M., Naumov V., Smirnov I.Pozmogova G. // Biochimie. 2017. Vol. 135, N P. 54-62.

6. Darling A.E., Mau B.Perna N.T. // PLoS ONE. 2010. Vol. 5, N 6. P. e11147.
7. Mostowy R., Croucher N.J., Andam C.P., Corander J., Hanage W.P.Marttinen P. // Molecular Biology and Evolution. 2017. Vol. 34, N 5. P. 1167-1182.

АНАЛИЗ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МОДЕЛЬНОЙ FRET СИСТЕМЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ИЗБИРАТЕЛЬНОСТИ И СТАБИЛИЗИРУЮЩЕГО ЭФФЕКТА G4-АДРЕСОВАННЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВ

Волков Т.А., Кириллова Ю.Г., Варижук А.М., Позмогова Г.Е.

Лаборатория искусственного антителогенеза ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Одно из современных направлений фармакологии связано с поиском лекарств, адресованных к новому типу мишеней – неканоническим структурам полинуклеотидов. Стабилизация G-квадруплексной (G4)-конформации в составе промоторов проонкогенов приводит к подавлению развития рака, показаны бактерицидные и противовирусные эффекты G4-лигандов [1-4]. Настоящая работа является частью проекта лаборатории по созданию экспресс скрининговой системы поиска G4-стабилизаторов среди природных и синтетических соединений – потенциальных селективных лекарств.

Цель исследования состояла в анализе использования модельной FRET-системы, включающей панель из шести G4-мишеней на примере случайной выборки антибиотиков, их новых синтетических аналогов и производных порфирина. Задачи работы состояли (1) в оптимизации метода в плашечном формате; и (2) его применении для характеристики стабилизирующих свойств и избирательности широкого ряда соединений.

Метод основан на сравнении FRET-эффекта при термической денатурации G4-олигомерных мишеней в присутствии и отсутствии лигандов. Его основное отличие от аналогичных подходов [4] состоит в наборе и структуре мишеней и высокой пропускной способности системы. В состав мишеней входят G4 промоторы генов *cMyc*, *cKit1* и G4 теломерный повтор; G4 промотора ВИЧ-1 (LTR II), что позволяет провести первичную оценку противовирусного и противоопухолевого потенциала лигандов, а шпилька и имперфектные квадруплексы – охарактеризовать их специфичность.

В ходе первичных экспериментов подобраны соотношения реагентов, состав буфера, режим плавления и др., исследовано более 60 соединений. Полученные результаты для известных веществ (берберин, микотоксины) коррелируют с литературными данными. Выявлена группа лидерных соединений, увеличивающих температуру плавления G4 более, чем на 20^{o}C, что сопоставимо с параметрами лучших известных лигандов (BRACO19, пиридостатин). Работа может дать перспективные прикладные результаты, а также быть полезной для структурно-функционального анализа – основы рационального дизайна G4-адресованных лекарств.

Список литературы

1. Artusi, S., Nadai, M., Perrone, R., Biasolo, M.A., Palu, G., Flamand, L., Calistri, A. and Richter, S.N. (2015) The Herpes Simplex Virus-1 genome contains multiple clusters of repeated G-quadruplex: Implications for the antiviral activity of a G-quadruplex ligand. Antiviral Res, 118, 123-131.

8. Perrone, R., Butovskaya, E., Daelemans, D., Palu, G., Pannecouque, C. and Richter, S.N. (2014) Anti-HIV-1 activity of the G-quadruplex ligand BRACO-19. J Antimicrob Chemother, 69, 3248-3258.
9. Porru, M., Zizza, P., Franceschin, M., Leonetti, C. and Biroccio, A. (2017) EMICORON: A multi-targeting G4 ligand with a promising preclinical profile. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1861, 1362-1370.
10. De Rache, A. and Mergny, J.-L. (2015) Assessment of selectivity of G-quadruplex ligands via an optimised FRET melting assay. Biochimie, 115, 194-202.

ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИЯ НЕЙРАЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ИПСК НА ПОДЛОЖКАХ ИЗ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК

Горобец Ю.М.*, Федосеева А.И*, Лебедева О.С., Лагарькова М.А, Клинов Д.В.

Лаборатория медицинских нанотехнологий, Лаборатория клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Известно, что электростимуляция может влиять на такие клеточные процессы, как пролиферация, дифференцировка, миграция и апоптоз, но при этом точные механизмы воздействия внешнего электрического поля ещё не до конца ясны. Для изучения электростимуляции, а также для дальнейшего применения в качестве нейрональных интерфейсов мы разработали подложки из углеродных нанотрубок (УНТ), преимущество которых заключается в высокой электрической проводимости, наноструктурированной морфологии, дешевизне и химической стабильности. При этом чистые УНТ обладают токсичностью для клеток, поэтому мы модифицировали УНТ белками. На таких подложках выращивались нейральные предшественники (NPC), дифференцированные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека. Клетки культивировали на поверхности модифицированных УНТ до 2 недель, после чего исследовали морфологию клеток с помощью оптической и электронной микроскопии и проводили иммуноцитохимический анализ. Было показано, что наилучшая адгезия проявляется у NPC к пленкам из УНТ, модифицированных желатином, и при этом последние не проявляют токсичных свойств. Для создания таких пленок на смесь желатина и УНТ воздействовали ультразвуком, полученную суспензию центрифугировали и пропускали супернатант через фильтр. Полученная на фильтре пленка из нанотрубок переносилась на модифицированное глутаральдегидом стекло, после чего к пленке подпылялись Au/Pd электроды. В дальнейшем планируется провести серию экспериментов для определения влияния электрических полей различных конфигураций на жизнедеятельность клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 17-75-30064).

**Эти авторы внесли равный вклад в работу.*

АЛГОРИТМ ПОИСКА ПРОНИКАЮЩИХ ПЕПТИДОВ, ОБЛАДАЮЩИХ АНТИМИКРОБНЫМИ СВОЙСТВАМИ

Графская Е.Н., Бабенко В. В., Полина Н. Ф., Харлампиева Д. Д., Бобровский П. А., Аниканов Н. А., Фарафонова Т. Е.

Лаборатория генной инженерии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Проникающие пептиды – короткие катионные молекулы, способные проникать внутрь плазматической мембраны без её повреждений. Такие пептиды могут использоваться для доставки физиологически активных компонентов внутрь клетки, а также служить антимикробными агентами. Нами был сконструирован алгоритм поиска проникающих пептидов, активных в отношении внутриклеточных бактерий, с использованием транскриптомных и протеомных данных. Алгоритм основан на отборе последовательностей, кодирующих активные молекулы с заданными свойствами среди токсин-подобных белков. Последовательности пептидов определялись как результат ограниченного протеолиза токсин-подобных белков по специфическим сайтам R(K)toR, EtoR или EafterR.[1,2] Отбор наиболее перспективных кандидатных последовательностей пептидов проводился согласно анализу их физико-химических свойств, антимикробного потенциала и проникающей способности. Для оценки различных параметров последовательностей использовались уже известные предсказывающие алгоритмы. Разработанный метод был применен для исследования данных транскриптомного профилирования ядовитых желез паука-птицееда *Poecilotheria fasciata*, а также транскриптомного профилирования щупалец и протеомного профилирования секрета морской анемоны *Cnidopus japonicus*. По результатам анализа данных 14 кандидатных пептидов были синтезированы твердофазным методом с использованием Fmoc-стратегии и их антимикробная активность была проверена в отношении прокариотических клеток *Bacillus subtilis* 168HT, *Escherichia coli* K12 subst. MG1655 и *Chlamydia trachomatis* D/UW-3/Cx согласно стандартным методикам. По результатам проверки активности среди кандидатных пептидов, один пептид был активен в отношении всех бактерий. Еще 7 пептидов проявили разную активность по отношению к грамположительной и грамотрицательным бактериям.

Список литературы

1. Kozlov, S. et al. A novel strategy for the identification of toxin-like structures in spider venom. *Proteins Struct. Funct. Genet*. 59, 131–140 (2005).
11. Kozlov, S. A. & Grishin, E. V. The universal algorithm of maturation for secretory and excretory protein precursors. *Toxicon* 49, 721–726 (2007).

РАЗНООБРАЗИЕ И ЭВОЛЮЦИОННАЯ ДИНАМИКА *PENELOPE* РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ У ПЛОСКИХ ЧЕРВЕЙ

Гуляев А.С.

Лаборатория организации генома ИБГ РАН
Лаборатория молекулярной генетики микроорганизмов ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

Ретротранспозоны – мобильные генетические элементы, использующие РНК-опосредованную мобилизацию через механизм «копирование – вставка». Они составляют значительную долю геномов эукариот и являются важнейшими участниками геномной эволюции. С появлением множества полногеномных данных появилась возможность проводить масштабные исследования как разнообразия, активности и эволюции самих мобильных элементов, так и их роли в эволюции геномов хозяев. Ретротранспозоны часто делят на четыре класса, или порядка: LTR, DIRS, LINE/SINE и PLE (*Penelope*-like elements) (1).

Цель этой работы состояла в том, чтобы изучить разнообразие и эволюционную динамику PLE-ретротранспозонов геномных сборках 32 видов плоских червей четырех классов: Trematoda (n=12), Cestoda (n=14), Monogenea (n=2) и Rhabditophora (n=4). Для получения последовательностей PLE использовали комбинацию биоинформатических подходов: *de novo* поиска и поиска по гомологии.

Доля PLE варьирует у плоских червей в широких пределах и коррелирует с размером генома. Так, у трематод доля PLE составляет от 3 до 15%; у цестод – от 0,02 до 10,32%; у моногеней – от 1 до 37,7%; у свободноживущих – от 0,58 до 3%. У всех цестод с размером генома около 100 Мб (сем. Taeniidae и Hymenolypididae) PLE полностью утеряны. Исключение составляют виды с геномами более 500 Мб – *D. latum*, *S. solidus*, *S. erinaceieuropaei* (доля PLE до 10%). По доле потенциально активных PLE выделяется *Schistosoma mansoni* (11%), что, скорее всего, отражает процессы адаптации паразита. Филогенетический анализ показал высокое, неизвестное ранее разнообразие PLE. Кроме того полученные данные заставляют предположить, что геномы плоских червей содержат одновременно несколько активных копий PLE, что не соответствует модели «мастер-копии».

Исследование выполнено за счет гранта РНФ (проект №17-74-10243).

Список литературы

1. Evgen'ev M. B. et al. *Penelope*, a new family of transposable elements and its possible role in hybrid dysgenesis in *Drosophila virilis* // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1997. – Т. 94. – №. 1. – С. 196-201.

ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ МИКРОРНК ПЛАЗМЫ КАК БИОМАРКЕРЫ ПАРОКСИЗМАЛЬНОЙ ФИБРИЛЛЯЦИИ ПРЕДСЕРДИЙ

Желанкин А.В., Шарова Е.И., Аксельрод А.С.

Лаборатория молекулярной генетики человека ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

Различными коллективами исследователей ранее было обнаружено, что профили циркулирующих внеклеточных микроРНК плазмы и сыворотки крови могут характеризовать ряд патологических состояний человека, в том числе и наличие фибрилляции предсердий (ФП). Объектом данного пилотного исследования являлись те микроРНК, для которых по совокупным литературным данным известна ассоциация с ФП, и мРНК-мишени которых соответствуют белкам, потенциально вовлеченным в патогенез ФП: hsa-miR-409-3p, hsa-miR-328-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-375. Анализ профилей микроРНК плазмы осуществлялся помощью количественной ПЦР по технологии TaqMan с использованием специфических зондов для детекции каждой отдельной мишени. Группа участников исследования включала условно здоровых лиц (27 чел., средний возраст 47,0 лет) и лиц с наличием пароксизмальной ФП, диагностированной врачами-кардиологами (12 чел., средний возраст 65,9 лет). Значения экспрессии микроРНК в плазме были нормированы на уровень потенциальной референсной микроРНК hsa-miR-16-5p. Степень гемолиза образцов плазмы оценивалась спектрофотометрически по разности величин пиков на длинах волны 414 и 385 нм (A414-385) по описанным ранее методикам. Для исследования были взяты только те образцы, значение A414-385 для которых не превышало 0,2 (отсутствие видимого гемолиза). Было обнаружено, что в группе с наличием пароксизмальной фибрилляции предсердий среднее значение нормированной экспрессии для hsa-miR-150-5p было выше (t-критерий Стьюдента, p=0,011), а для hsa-miR-409-3p – ниже (p=0,031) по сравнению с контрольной группой. Для остальных микроРНК не было обнаружено значимых различий между сравниваемыми группами.

СИНТЕЗ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ НАНОКЛАСТЕРОВ МЕТАЛЛОВ, СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ БЕЛКОМ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА

Ивлева Е.А., Клинов Д.В., Образцова Е.А., Морозова О.В.

Лаборатория медицинских нанотехнологий ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

Флуоресцентные металлические нанокластеры, состоящие от нескольких десятков до сотен атомов металлов, обладают уникальными электронными структурами и последующими из этого оптическими свойствами. Благодаря этим свойствам нанокластеры могут использоваться в качестве биосенсеров и биомаркеров и применяться для биовизуализации [1], [2].

В настоящей работе был оптимизирован протокол синтеза, а также были исследованы оптические свойства флуоресцентных нанокластеров золота и кадмия, стабилизированных белком бычьего сывороточного альбумина. Флуоресцирующие красным светом нанокластеры золота имеют три длины волны испускания – испускание на 345 нм соответствует флуоресценции аминокислоты триптофана, а испускание на 410 и 650 нм соответствуют двум различным по размеру кластеров золота, полученных в результате синтеза. Максимум интенсивности флуоресценции наблюдается при возбуждении на длине волны 325 нм. Для кадмиевых нанокластеров максимум поглощения приходится на 380 нм, а испускания на 500 нм. При возбуждении нанокластеров кадмия в диапазоне 270–290 нм наблюдается слабая флуоресценция аминокислоты триптофана, что может объясняться механизмом переноса энергии в системе кластер-белок. Для кадмиевых нанокластеров был посчитан квантовый выход, значение которого составило 5%. Методом сканирующей электронной микроскопии было показано, что размер кластеров золота не превышает 3 нм. Также было показано, что при трисинолизе и добавлении лаурилсульфат натрия флуоресценция раствора нанокластеров сохраняется, в то время как добавление бета-меркаптоэтанола полностью гасит флуоресценцию.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 17-75-30064).

Список литературы

1. G. Ou *et al.* “Fabrication and application of noble metal nanoclusters as optical sensors for toxic metal ions,” *Anal Bional Chem.* Apr; 410(10): 2485-2498, 2018.
12. L.Y. Chen, C.W. Wang, Z. Yuan, and H.T. Chang “Fluorescent gold nanoclusters: Recent advances in sensing and imaging,” *Anal. Chem.*, vol. 87, no. 1, pp. 216–229, 2015.

АЛГОРИТМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЗИЦИЙ ГЕНОМА ПРОКАРИОТ С ВЫСОКОЙ ЧАСТОТОЙ ГЕНОМНЫХ ПЕРЕСТРОЕК

Конанов Д.Н., Манолов А.И., Осмоловский И.С.

Лаборатория биоинформатики ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

Для анализа частоты геномных перестроек прокариот был разработан метод, в основе которого лежит представление всех вариантов чередования генов в виде ориентированного графа. Группы ортологии, рассчитанные для организмов из исследуемой выборки, определяются как узлы графа, а ребра проводятся между группами, расположенными последовательно в геноме хотя бы одного организма из выборки. Частота геномных перестроек (рекомбинации, делеции, дупликации и т.д.) в некоторой области генома может быть определена как количество различных путей в графе, начинающихся и заканчивающихся в данной области генома. Было предложено два варианта подсчета количества возможных путей: первая реализация использует вероятностный подход, ориентируясь исключительно на структуру графа, вторая последовательно ищет отличия между участками геномов у разных организмов, двигаясь по графу только по ним. Разработанный метод был использован для подсчета частоты геномных перестроек в следующих группах организмов: 327 генома *Escherichia coli*, 67 геномов бактерий рода *Salmonella*, 44 генома *Yersinia pestis,* 22 генома *Shigella flexneri,* 189 геномов *Klebsiella pneumonia.*

Рассчитанные значения были выровнены по рассчитанным точкам старта репликации, а также приведены к одинаковой форме GC-кривой. В результате была получена усредненная картина распределения частоты локальных изменений генома вдоль хромосомы для каждого из рассмотренных видов. Полученные распределения были сравнены друг с другом. Для поиска соответствия между разными усредненными распределениями использовался алгоритм динамической трансформации (Dynamic time warping). В результате сравнения было выявлено сходство расположения мест с наиболее высокой интенсивностью геномных перестроек у разных групп организмов.

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ДЕТЕКЦИЯ ТРАНСКРИПТОВ PCA3 И AMACR В МОЧЕ ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Котова Е.С., Савочкина Ю.А., Васильев А.О., Прилепская Е.А., Говоров А.В., Долудин Ю.В., Потолдыкова Н.В., Морозов А.О., Еникеев Д.В., Шарова Е.И., Кострюкова Е.С., Говорун В.М.

Лаборатория молекулярной генетики человека ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

Массовый ПСА-скрининг позволил значительно повысить долю пациентов, у которых рак предстательной железы (РПЖ) диагностируется на ранних стадиях. В данный момент актуальными являются разработка и апробация новых методик, которые позволили бы повысить специфичность ранней диагностики РПЖ. Перспективные результаты были получены при одновременном использовании нескольких биомаркеров (MiPS, Stockholm-3 и др.).

Таким образом, целью данной работы стала оценка диагностического потенциала одновременной количественной детекции в моче транскриптов генов PCA3 и AMACR, являющихся маркерами РПЖ. В рамках данного исследования были сформированы две выборки пациентов: 1) 69 человек, направленных на операцию по радикальной простатэктомии, трансуретральной резекции простаты и тотальной адэномэктомии, 2) 153 человека, направленных на диагностическую биопсию. Был проведен анализ содержания в мочевой РНК транскриптов генов PCA3, AMACR, PSA и GPI, для чего использовалась мультиплексная ОТ-ПЦР в реальном времени. Содержание транскриптов PCA3 и AMACR было нормировано на содержание транскрипта PSA. Также было рассчитано соотношение транскриптов GPI и PSA. Полученные результаты сравнивались с «золотым стандартом» – результатами патоморфологического исследования операционного и биопсийного материала. Было показано, что оба онкомаркера являются хорошими предикторами РПЖ. Также на предбиопсийной выборке было показано, что PCA3 позволяет выделить группу пациентов с агрессивными формами РПЖ, AUC 0,669 (95%CI 0,560-0,780). Однако, статистически значимо показать это на предоперационной выборке не удалось. Для обеих выборок было показано, что AMACR score является довольно хорошим предиктором наличия агрессивных форм РПЖ: в случае предоперационной выборки AUC 0,746 (95%CI 0,600-0,893), в случае предбиопсийной выборки AUC 0,708 (95%CI 0,617-0,799). Также была показана взаимосвязь между AMACR score и дополнительным параметром – отношением содержания транскрипта GPI к содержанию транскрипта PSA.

E. COLI КАК ПРЕДСТАВИТЕЛЬ ПРИСТЕНОЧНОЙ МИКРОФЛОРЫ ПАЦИЕНТОВ С ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ

Е.Е. Круглов

Кафедра медицинской биологии, генетики и экологии СамГМУ

В настоящее время язвенный колит рассматривается исследователями как полиэтиологичное заболевание, детально изучается каждый сегмент патогенеза. Возрастает научно-практический интерес к проведению микробиологических анализов биоптатов слизистой оболочки кишечника, определению исчерпывающего состава микробиома, подробной характеристике каждого представителя микробного сообщества, имеющего свою экологическую нишу в слизистой оболочке толстой кишки. [1,2] Исследованы биоптаты стенки толстого кишечника 26 пациентов с установленным диагнозом: «язвенный колит». Биоматериал получали при проведении стандартного эндоскопического обследования. Идентификацию осуществляли микробиологическим методом с использованием MALDI-ToF-масс-спектрометрии (Microflex LT, Bruker Daltoniks); антибиотикочувствительность определяли стандартным диско-диффузионным методом, в соответствии с требованиями нормативной документации. В результате исследования установлено, что у пациентов с выраженными морфологическими признаками язвенного колита чаще всего встречаются микст-ассоциации по 2-4 микроорганизма (23 микст-комплекса – 88,46%). У 23 пациентов (84,46%) встречался микроорганизм *E. coli.* Причем 20 штаммов в составе ассоциаций сочетание (86,95%), 3 (4,15%) представителя в одиночном виде. При оценке результатов теста на антибиотикочувствительность у *E. coli* структура резистентности (R) и чувствительности (S) к препаратам распределилась следующим образом. Цефтазидим (R= 34,78%), цефтриаксон (R= 34,78%), цефипим (R= 34,78%), амикацин, ципрофлоксацин, эритромицин, имипенем, меропенем (S=100%), гентамицин (R= 34,78%), ципрофлоксацин (R= 39,13%). Проведение микробиологического исследования биоптатов стенки кишечника у пациентов с выраженной степенью воспалительного процесса, позволит оптимизировать лечение выбором эффективных антибактериальных препаратов.

Список литературы

1. Ganganna K., Shetty P., Shroff S.E. Collagen in histologic stages of oral submucous fibrosis: A polarizing microscopic study // *J. Oral Maxillofac. Pathol.* – 2012. – Vol. 16, N 2. – P. 162-166.
2. Shevchenko O.V., Mudrak D.Y., Skleenova E.Y., Kozyreva V.K., Ilina E.N., Ikryannikova L.N., Alexandrova I.A., Sidorenko S.V., Edelstein M.V. First detection of VIM-4 metallo-β-lactamase-producing *Escherichia coli* in Russia // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2012. – Jul, 18(7). – P. 214- 217.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ВИРУЛЕНТНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ ПО ОТНОШЕНИЮ К КЛИНИЧЕСКИМ ИЗОЛЯТАМ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Купцов Н.С.[1], Корниенко М.А.[1], Летарова М.А.[2], Шитиков Е.А.[1], Летаров А.В.[2], Ильина Е.Н.[1]

[1]*ФГБУ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России*
[2]*ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт микробиологии им. Виноградского*

Антибактериальная химиотерапия испытывает серьезный кризис, вызванный распространением лекарственной устойчивости у возбудителей инфекций. В связи с этим становится актуальной разработка альтернативных подходов для преодоления этой проблемы. Одним из таких подходов является фаговая терапия. **Целью** исследования является биологическая характеристика индивидуальных вирулентных бактериофагов, входящих в состав коммерческих препаратов для фаговой терапии, и оценка их активности против клинических изолятов *Staphylococcus aureus*.

Материалы и методы. В работе использовали 20 клинических изолятов *S. aureus*. Для тестирования были выбраны препараты компании «Микроген»: Пиобактериофаг поливалентный очищенный и бактериофаг стафилококковый.

Результаты. Препараты были активны *in vitro* против всех 20 исследованных изолятов *S. aureus*, их титр составил 10^5-10^7 БОЕ/мл. Для дальнейшего изучения на трех различных штаммах были получены четыре индивидуальных изолятов бактериофагов, активных против *S. aureus*. Биологическое и генетическое типирование этих изолятов указывает на их идентичность. Частота резистентных к этому бактериофагу клонов была менее 10^{-8}, причем большинство клонов имели лишь частичную устойчивость. Для оценки эффективности подавления роста *S. aureus* данным бактериофагом *in vitro* к различным разведениям культуры стафилококка в лунках планшета добавляли 10^2 БОЕ фага. При концентрации клеток *S. aureus* менее 10^7 происходил лизис бактерий через 13–15 часов, однако при больших (>10^7) исходной концентрации клеток бактериофаги не вызывали значительного изменения оптической плотности по сравнению с контролем.

Выводы. Выделенный из коммерческих препаратов, бактериофаг обладает широким спектром литической активности и является кандидатом для разработки фаговых терапевтических препаратов нового поколения.

ОТРАБОТКА МЕТОДА MAGE ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА *MYCOPLASMA GELLISEPTICUM*

Левкина А., Евсютина Д., Фисунов Г.

Лаборатория протеомного анализа ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Создание живых систем с заданными функциями давно занимает умы ученых. Так, в 2016 году командой Крейга Вентера был получен штамм микоплазмы с синтетическим геномом размером 531 тыс. пар оснований и содержащий 473 гена. Из них функция 149 генов остается неизвестной [1]. Одним из способов выяснения функции гена является изменение его активности, с последующим отслеживанием ответа клетки. Для модуляции активности гена необходимо редактировать ген или его регуляторные области. В нашей работе мы применили метод MAGE [2] для внесения мутаций A1849->C, T1851->C в ген *rpoB* РНК-полимеразы, что ведет к аминокислотной замене N617->H. Такая мутация должна сделать микоплазму чувствительной к рифампицину. Показано, что введение обратной мутации (т.е H526-> N), делает *E. coli* резистентной к этому антибиотику [3]. MAGE основан на применении β белка фага лямбда. Этот белок связывается с олигонуклеотидом и способствует его отжигу на комплементарную цепь ДНК. Мы клонировали оптимизированный для *Mycoplasma gallisepticum* ген β белка фага лямбда. Полученный штамм *M. gallisepticum* использовали для электропорации клеток олигонуклеотидом, комплементарным участку отстающей цепи при репликации гена *rpoB,* но содержащим желаемые мутации. В результате было получено 45 отдельных колоний, и проведен скрининг двумя способами. Первый способ – высевание клонов *M. gallisepticum* на среду, содержащую рифампицин. Второй способ – использование ПЦР, где 3'-конец одного праймера был комплементарен мутантному варианту гена *rpoB.* Амплификация с гДНК, содержащей ген *rpoB* дикого типа должна идти не эффективно. Результаты обоих скринингов были положительны только для двух клонов – B5 и B8, указывая на мутацию в гене *rpoB*. Для подтверждения наличия мутации, ампликоны гена *rpoB* будут отсеквенированы по методу Сэнгера. Таким образом, были получены косвенные доказательства успешного применения метода MAGE для редактирования генома *M. gellisepticum*.

Список литературы

1. Hutchison C. et al. Design and synthesis of a minimal bacterial genome, *Science* (2016)
2. Wang H. et al. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution, *Nature* (2009)
3. Gaurivaud P. et al. Insusceptibility of Members of the Class Mollicutes to Rifampin: Studies of the Spiroplasma citri RNA Polymerase b-Subunit Gene, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (1996)

СРАВНИТЕЛЬНО-ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ КОММЕНСАЛЬНЫХ И ПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ

Гаранина И.А., Максютов Н.Ф., Гладкова М.Г., Орехов Д.И., Логиновский А.О., Фисунов Г.Ю.

Лаборатория протеомного анализа ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Энтеробактерии, в частности *Escherichia coli,* являются частью нормальной кишечной микрофлоры человека и других млекопитающих. Некоторые штаммы в определенных условиях могут проявлять патогенные свойства. Большинство работ по сравнительно-геномному анализу *E. coli* сравнивали патогенные штаммы либо с лабораторными, либо с ограниченным количеством комменсальных штаммов. Поэтому несмотря на огромное количество данных по *E. coli*, невозможно глобально оценить вклад отдельных генов в патогенность и предсказать ее. Целью работы было провести широкомасштабный анализ всех доступных геномов *E. coli* и близкородственных энтеробактерий (около 10 тыс. штаммов) и построить математическую модель, предсказывающую патогенные свойства штамма по геному.

Проведена полуавтоматическая аннотация более чем 5000 штаммов *E. coli* и получены следующие характеристики штаммов: тип – патогенный, комменсальный, лабораторный; патотип; вид организма хозяина; вызываемая болезнь. Скачены геномы порядка 7 тыс. штаммов *E. coli*, для которых были посчитаны ортологичные ряды. Разработана математическая модель, предсказывающая патогенность и патотип штамма по генному составу. Показатели AUC для построенных моделей, классифицирующих штаммы на комменсальные и патогенные, составили около 0,91–0,93; для моделей, отличающих уропатогенные штаммы от энтеровирулентных штаммов – 0,93–0,95. Новым методом, учитывающим взаимовлияние генов, были получены списки факторов патогенности. Большинство из них совпадает с известными факторами патогенности. Среди генов, отличающих уропатогенные штаммы от энтеровирулентных, большую часть составляют гены, дающие метаболическое преимущество при росте в определенной среде. Обнаружены новые факторы патогенности, не для всех из них известна функция кодируемого белка и его роль в патогенезе.

Таким образом, анализ около половины исследуемых штаммов показал высокий потенциал нашей модели для задачи предсказания патогенности штаммов. Полученные данные согласуются с другими исследованиями; удалось обнаружить новые факторы патогенности с неизвестными функциями.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА VP2 ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОЙ АНЕМИИ ЦЫПЛЯТ

Мирошина О.А., Широков Д.А.

Лаборатория генной инженерии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Вирус инфекционной анемии цыплят – это небольшой икосаэдрический вирус с кольцевым одноцепочечным ДНК-геномом. При инфекции данным вирусом происходит снижение уровня Т-клеток и гемоцитобластов у цыплят, что ведёт к анемии и иммуносупрессии. Вследствие этого цыплята становятся восприимчивы к вторичным инфекциям, что является серьёзной проблемой для промышленного птицеводства. Геном вируса инфекционной анемии цыплят, длина которого 2300 нуклеотидов, кодирует всего 3 белка. Один из них – фосфотаза VP2 – является каркасным белком при сборке вирусного капсида. Нами был получен рекомбинантный VP2 в клетках *Escherichia coli с целью использования его в качестве антигена в* диагностических тест-наборах и проверки его потенциала в качестве компонента протективных вакцин. Для этого с помощью ПЦР был амплифицирован участок ДНК, соответствующий открытой рамке считывания гена VP2 в геноме вируса. Этот фрагмент был клонирован в составе экспрессионных плазмид pETmin и pET15mcs, в которых контроль гетерологичной экспрессии рекомбинантных генов осуществляется промотором бактериофага T7. Были получены две конструкции: pCAV-VP2-H6 (на основе pETmin) и pH6-CAV-VP2 (на основе pET15mcs), кодирующие целевой белок с 6-гистидиновой меткой на С- и на N-концевой части полипептида соответственно. Данными плазмидами трансформировали штамм *Escherichia coli* Rosetta2(DE3), экспрессию генов индуцировали с помощью добавления IPTG до конечной концентрации 1 mM. Рекомбинантный белок VP2 с N-концевыми гистидинами накапливался в цитоплазматической фракции в растворимом виде, а белок VP2 с С-концевыми гистидинами обнаруживался только в тельцах включения. Выход белка составил в обоих случаях около 30 мг/л бактериальной культуры. Белок VP2 с N-концевыми гистидинами был выделен и очищен с помощью металл-хелатной хроматографии. В настоящее время проводится исследование возможности его использования в качестве компонента протективных вакцин.

ЭФФЕКТ УСАДКИ МАТРИКСА ИЗ ПОЛИЛАКТИДА, ПОЛУЧЕННОГО МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОСПИННИНГА, В ЭТАНОЛЕ

Павлова Е.Р., Багров Д.В., Монахова К.З., Клинов Д.В.

Лаборатория медицинских нанотехнологий ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Электроспиннинг – это метод электростатического формирования тонких волокон с диаметром от нескольких нанометров до микрон из раствора (или расплава) полимера. Матриксы, полученные методом электроспиннинга, состоят из волокон и могут использоваться в качестве фильтров, раневых и ожоговых покрытий, основы для тканеинженерных конструкций, субстратов для культивирования клеток и в других приложениях [1], [2]. В данной работе мы исследовали явление усадки (уменьшения размеров) матриксов из полилактида (ПЛА) после стерилизации этиловым спиртом. При погружении в этанол матриксы, сформированные методом электроспиннинга, уменьшаются в размерах на 30-55% по площади и сворачиваются (переходят в 3D), причем этот процесс занимает не более 100 секунд. На микромасштабе волокна ПЛА приобретают волнистую форму, которая может быть использована для улучшения цитосовместимости пленок [3]. Кроме того, спирт действует на матрикс, как пластификатор. Относительное удлинение матрикса при разрыве в спирте достигает 250%, в то время как на воздухе оно не превышает 10%. Мы предполагаем, что эффект усадки происходит из-за увеличения подвижности полимерных цепей в волокнах при добавлении спирта, которые в процессе электроспиннинга ориентировались и перешли в неравновесное состояние. Эффект усадки проявляется также при погружении матрикса в бутанол, но происходит медленнее (в течении 50 минут), что объяснятся большим коэффициентом диффузии бутанола в полилактиде.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 17-75-30064).

Список литературы

1. R. Gopal, S. Kaur, Z. Ma, C. Chan, S. Ramakrishna, and T. Matsuura, “Electrospun nanofibrous filtration membrane,” *J. Memb. Sci.*, vol. 281, no. 1–2, pp. 581–586, 2006.
2. A.G. Kanani and S.H. Bahrami, “Review on Electrospun Nanofibres Scaffold and Biomedical Applications,” *Trends Biomater. Artif. Organs*, no. November 2010, pp. 93–115, 2010.
3. W. Liu *et al.*, “Generation of electrospun nanofibers with controllable degrees of crimping through a simple, plasticizer-based treatment,” *Adv. Mater.*, vol. 27, no. 16, pp. 2583–2588, 2015.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЙ ВЕЗИКУЛ ПАТОГЕННОГО И НЕПАТОГЕННОГО ШТАММОВ *BACTEROIDES FRAGILIS* НА КУЛЬТУРУ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ ПРЯМОЙ КИШКИ ЛИНИИ SW837

Петрова Д.А., Захаржевская Н.Б., Побегуц О.В., Матюшкина Д.С., Фисунов Г.Ю.

Лаборатория протеомного анализа ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Согласно ряду исследований, отдельные компоненты внешнемембранных везикул *Bacteroides fragilis* оказывают влияние на структурные белки эпителиальных клеток [1,2]. Однако комплексного ответа в ходе воздействия везикул на эпителиальную культуру показано не было. В связи с этим целью работы был сравнительный протеомный анализ культуры клеток аденокарциномы прямой кишки SW837 под воздействием везикул патогенного и непатогенного штаммов *Bacteroides fragilis*.

Для оценки воздействия препарата везикул токсигенного (OMV+) и нетоксигенного штаммов (OMV-) *Bacteroides fragilis* использовали культуру клеток аденокарциномы прямой кишки SW837. Результаты оценивали в ходе 3-х часовой инкубации, с последующим двумерным электрофорезом и дальнейшей масс-спектрометрической идентификацией белков.

В ходе анализа протеомных данных были отмечены различия в обоих типах экспериментов по отношению к контролю в следующих группах белков: белки цитоскелета (для OMV+: K1C9, TPM3; для OMV-: ACTG); клеточной адгезии (для OMV+: HV208, B-cell receptor; для OMV-: EMIL2); белки, проявляющие убиквитин-лигазную активность (для OMV+: PSA1, FBX2, PLAP; для OMV-: DTX4); белки, проявляющие активность в отношении ДНК (для OMV+: BRD7, PKH4B, PHB; для OMV-: MTPN, NR4A, SSX3, EF1D, NPM, HNRPC, ZN706). Общими для обоих типов воздействий оказались белки: HS74L, HSP74, FBLI1, ECHD3, K2C8. Важно отметить, что увеличение количества белка FBLI1 было показано в обоих типах экспериментов. Согласно литературным данным изменение количества белка FBLI1 способствует эпителиально-мезенхимальному переходу и клеточной адгезии, а его ингибирование увеличивает миграцию клеток аденокарциномы толстой кишки HT29 [3].

Список литературы

1. Zakharzhevskaya N.B… et al. Interaction of *Bacteroides fragilis* toxin with outer membrane vesicles reveals new mechanism of its secretion and delivery // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2017. - № 2. doi: 10.3389/fcimb.2017.00002.
2. Zakharzhevskaya N.B., et al. Outer membrane vesicles secreted by pathogenic and nonpathogenic *Bacteroides fragilis* represent different metabolic activities // *Sci Rep*. – 2017. – № 1. doi: 10.1038/s41598-017-05264-6.
3. Wieczorek K. et al. Filamin A upregulation correlates with Snail-induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) and cell adhesion but its inhibition increases the migration of colon adenocarcinoma HT29 cells. // *J Exp Cell Res.* 2017 Oct 1;359(1):163-170. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.07.035. Epub 2017 Aug 1.

ПОЛУЧЕНИЕ НОВЫХ АНТИКОАГУЛЯЦИОННЫХ ПЕПТИДОВ МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ

Петрухин И.Ю., Манувера В.А.

Лаборатория генной инженерии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Тромбозы артерий и вен являются ведущей причиной смертности и инвалидизации населения всего мира. Ежегодно один из 250 человек, живущих на земле, погибает от тромбозов. Большие показатели смертности существуют, несмотря на многообразие лекарственных препаратов, созданных для борьбы с таким заболеванием. В связи с этим существует большая актуальность поиска новых тромболитических препаратов. Гирудины и бделлины – это пептиды секрета слюнных желез медицинских пиявок (*Hirudo medicinalis, H.verbana и H.orientalis*), которые обладают высокой антикоагуляционной активностью. Бделлины и гирудины являются пептидными ингибиторами сериновых протеиназ, участвующих в каскаде тромбообразования. Ранее в нашем научно-исследовательском центре в лабораториях постгеномных исследований в биологии и генной инженерии были расшифрованы последовательности генома медицинской пиявки и транскриптома её клеток слюнных желёз. При анализе полученной информации было обнаружено большое количество новых изоформ белков и пептидов, предположительно влияющих на гемостаз. Для исследования новых форм пептидов необходимо отработать способ получения крупных тромболитических пептидов и белков медицинской пиявки. Наиболее подходящим в данном случае представляется использование методов генной инженерии и технологии рекомбинантных белков. На первом этапе были отобраны несколько кандидатов, наиболее гомологичных уже известным пептидам, и на их основе производится отработка метода получения пиявочных антикоагулянтов в гетерологичной системе экспрессии бактерий *E.coli*. Были сконструированы три плазмиды, несущие ген-вставки, кодирующие бделлин и две изоформы гирудина, близкие, но не идентичные уже известным. Векторы, содержащие участки ДНК, кодирующие целевые пептиды, были собраны на основе плазмид pET15 и pETmin. Структура рекомбинантных плазмид была подтверждена путем секвенирования, далее ими были трансформированы клетки штаммов *E. coli* BL21 (DE3) gold, *E. coli* B834 (DE3) и *E. coli* Rosetta (DE3). В настоящее время производится подбор условий культивирования бактерий, при которых происходит наилучшее накопление рекомбинантных белков. В ближайшее время так же планируется получение антикоагуляционных пептидов в виде слитых белков с белками носителями – стрептавидином, шапероном SlyD и тиоредоксином, что может способствовать увеличению уровню их накопления в клетках *E. coli* при гетерологичной экспрессии.

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ ТОНКОГО СЛОЯ НА ОДНОМЕРНОМ ФОТОННОМ КРИСТАЛЛЕ

Прусаков К.А., Басманов Д.В., Романов С.А., Клинов Д.В.

Лаборатория медицинских нанотехнологий ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Работа посвящена новому методу засветки образцов в широкопольном флуоресцентном микроскопе. Этот метод позволяет возбуждать флуоресценцию только в тонком приповерхностном слое исследуемого объекта. Такая локализация инициирующего излучения уменьшает паразитный фоновый сигнал флуоресценции из объема образца. В результате, получаемые изображения обладают бóльшим контрастом и детализацией, по сравнению с изображениями, наблюдаемыми при объемной засветке.

Разработанный метод основан на ключевой новаторской идее [1], заключающейся в использовании для возбуждения флуоресценции длиннопробежных поверхностных электромагнитных волн оптического диапазона на одномерном фотонном кристалле [2]. Для исследования возможностей предложенного метода была построена экспериментальная установка, позволяющая возбуждать такие волны на одномерном фотонного кристалле и получать изображение его поверхности.

Для иллюстрации возможностей разрабатываемого метода были проведены эксперименты с образцами, типичными для флуоресцентной микроскопии. В качестве таких образцов были выбраны бактериальные и эукариотические клетки, содержащие различные флуоресцентные красители. Клетки фиксировали на поверхности фотонного кристалла с дисперсионной характеристикой, подходящей для накачки того или иного флуорофора. С помощью экспериментальной установки на поверхности фотонного кристалла возбуждались поверхностные длиннопробежные волны, которые, в свою очередь, возбуждали флуоресценцию красителей в клетках. Изображение поверхности фотонного кристалла с клетками детектировали с помощью широкопольного флуоресцентного микроскопа. Сравнение получаемых таким способом изображений, с изображениями, наблюдаемыми при объемной засветке подтвердило работоспособность и преимущества предложенного метода.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 17-75-30064).

Список литературы

1. Патент RU 2626269 Клинов Д.В., Прусаков К.А., Басманов Д.В. «Способ и устройство для возбуждения флуоресценции при помощи длиннопробежных поверхностных волн на одномерном фотонном кристалле», 2017.
2. Konopsky V.N., Alieva E. V. Long-Range Propagation of Plasmon Polaritons in a Thin Metal Film on a One-Dimensional Photonic Crystal Surface // *Phys. Rev. Lett. American Physical Society*, 2006. Vol. 97, № 25. P. 253904.

ОБРАТНЫЙ ПЬЕЗОЭЛЕКТРИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ В СИЛЬНО ИЗОГНУТОМ ЛИПИДНОМ БИСЛОЕ

Романов С.А., Чекашкина К.В., Башкиров П.В.

Лаборатория электрофизиологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Последние достижения нанотехнологий и молекулярной инженерии сделали возможным создание наноматериалов и систем, имитирующих процессы, происходящие в живой клетке. Разработка нанофлюидных биосенсоров, работающих по сходным с клеточными механизмам, чувствительных к воздействию одиночных молекул необходима для развития методов диагностики и секвенирования нового поколения [1]. Принцип работы таких сенсоров заключается в регистрации импульсов уменьшения ионного тока, текущего через наноканал, в ответ на частичное и кратковременное перекрытие просвета исследуемой молекулой [2]. Синтетические нанопоры уже используются для исследования отдельных макромолекул, но несмотря на высокую пропускную способность, их эффективность уступает биологическим каналам.

В работе на примере мембранной нанотрубки (НТ), вытянутой из плоской бислойной липидной мембраны [3], экспериментально показано, что свойство двумерной текучести липидного бислоя позволяет контролировать плотность поверхностного заряда на внутренней стенке НТ. Варьируя состав липидного бислоя, и включая в него помимо заряженных конические липиды, появляется возможность контролировать кривизну внутренней поверхности НТ, посредством изменения полярности прикладываемого сильного электрического поля. Таким образом продемонстрировано контролируемое изменение диаметра поры под действием электрического поля. Пьезоэлектрический эффект улучшает динамическую функциональность подобных наноструктур и позволяет выдвинуть предположение о перспективности использования липидного бислоя как биосовместимого модификатора поверхности синтетических сенсоров.

Список литературы

1. Wanunu M. 2012. Nanopores: A journey towards DNA sequencing. *Physics Life Rev*. 9 (2), 125–158.
2. Branton D., Deamer D.W., Marziali A., Bayley H., Benner S.A., Butler T., Jovanovich S.B. 2008. The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nat. Biotechnol*. 26 (10), 1146—1153.
3. Frolov V.A., Lizunov V.A., Dunina-Barkovskaya A.Y., Samsonov A.V., Zimmerberg J. 2003. Shape bistability of a membrane neck: a toggle switch to control vesicle content release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (15), 8698–8703.

СОЗДАНИЕ И ВАЛИДАЦИЯ ГЕННОИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ С ГИПЕРЭКСПРЕССИЕЙ И ИНАКТИВАЦИЕЙ TRIM29 И TP63

Силаков Н.М., Лебедева О.С., Арапиди Г.П., Соломатина Е.С., Султанов Р.И.

Лаборатория клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Рак предстательной железы (РПЖ) занимает третье место по смертности от онкологических заболеваний среди мужчин. Известно, что РПЖ развивается в результате опухолевой трансформации эпителия, сопряженной с генетическими и эпигенетическими мутациями. Переход к агрессивным формам рака часто сопряжен с протекающим в злокачественных клетках эпителиально-мезенхимальным переходом (ЭМП) - процессом, в ходе которого раковая клетка повышает свою способность к инвазии и метастазированию.

В предыдущей работе нашей группой было предсказано, что существует кластер ко-экспрессирующихся генов, ассоциированный с ЭМП. Этот кластер регулируется генами TP63 и TRIM29, играющими важную роль в развития эпителия. Также была предложена модель регуляции ЭМП и уровня метилирования энхансеров, ассоциированных с генами кластера, комплексом TP63-TRIM29 с MED12 - белком медиаторного комплекса. В нормальных клетках базального эпителия предстательной железы экспрессируются и TRIM29, и TP63, однако при развитии рака экспрессия теряется.

В качестве модели РПЖ была использована опухолевая линия LNCaP, а в качестве модели нормального эпителия – HaCaT - иммортализованные кератиноциты кожи. Для изучения индукции ЭМП линия HaCaT была заражена лентивирусными частицами, содержащими shРНК, комплементарную РНК TRIM29 и TP63, а линия LNCaP – лентивирусами, несущими гены TRIM29 и TP63. Вестерн-блот анализ подтвердил подавление синтеза белка при применении лентивирусов, несущих shРНК, и появление белковых продуктов TRIM29 и TP63 при заражении соответствующими лентивирусами. Таким образом, создана клеточная модельная система для изучения роли TP63 и TRIM29 в индукции ЭМП и формировании геномной нестабильности в линии раковых клеток LNCaP с восстановленной экспрессией TRIM29 и TP63. Планируется расширить панель трансгенных раковых и нормальных эпителиальных линий клеток. В уже полученных линиях анализируются изменения эпителиально-мезенхимального перехода (экспрессия генов и белков ЭМП, изменение адгезионных и миграционных свойств клеток и пр.)

ОКИСЛЕНИЕ ЦИСТЕИНА ЦЕРУЛОПЛАЗМИНОМ ОБЕСПЕЧИВАЕТ ГАЛОГЕНИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ В НЕЙТРАЛЬНОЙ СРЕДЕ

Костевич В.А., Соколов А.В.

Лаборатория физико-химических методов исследования и анализа
ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Миелопероксидаза (МПО) – гем-содержащий фермент лейкоцитов, обнаруживаемый также в плазме крови, обладающий пероксидазной и галогенирующей активностью, что обеспечивает антимикробную защиту, однако может приводить к развитию галогенирующего стресса. Двухэлектронный перенос на галогенид-ионы с образованием активных форм галогенов затруднен в нейтральной среде, однако возможен в присутствии тирозина. Ранее мы показали, что церулоплазмин (ЦП), ферроксидаза сыворотки крови, является физиологическим ингибитором МПО, образуя с ней специфический комплекс. Однако обнаружение модифицированных активными формами галогенов белков и липидов, в том числе в стенках сосудов, позволяет предположить, что галогенирующая функция МПО может быть реализована несмотря на присутствие ЦП в плазме крови. Известно, что ЦП окисляет цистеин посредством одноэлектронного переноса на кислород с образованием супероксид-аниона с последующей дисмутацией до H_2O_2. Цистеин не является пероксидазным субстратом МПО. Целью данного исследования было изучить возможность утилизации миелопероксидазой H_2O_2, образующегося при окислении цистеина ЦП.

Методы исследования. Препараты ЦП и МПО получали хроматографически из плазмы крови и экстракта нейтрофилов, соответственно. Кинетику окисления SH-групп цистеина оценивали по реакции с реактивом Эллмана. Реакционная смесь содержала: 0,5 мкМ ЦП, 5 нМ МПО, 200 мкМ цистеина, 100 мкМ тирозина, PBS. В отдельных опытах добавляли 200 мкМ NaBr или NaSCN, 20 мкМ H_2O_2.

Результаты. Показано, что ЦП окисляет цистеин при указанных условиях со скоростью около 0,4 сек$^{-1}$. Добавление МПО повышало скорость реакции до 0,6 сек$^{-1}$. Такая же скорость реакции достигалась при добавлении к МПО 20 мкМ H_2O_2 без ЦП. МПО в отсутствие H_2O_2 практически не окисляла цистеин, а добавление H_2O_2 к ЦП и к системе ЦП+МПО не влияло на скорость реакции. При использовании в качестве субстратов МПО бромид- и тиоцианат-ионов наряду с хлорид-ионами наблюдали те же соотношения скоростей реакции. Способность ЦП окислять цистеин отсутствовала после удаления ионов меди из лабильных сайтов белка фильтрацией через смолу Chelex-100 (Bio-Rad).

Заключение. ЦП, окисляя цистеин при участии ионов меди в лабильных сайтах связывания, усиливает галогенирующую активность МПО при pH=7,4.

Исследование поддержано грантами РФФИ № 17-04-00530 и Президента РФ МД-5133.2018.4.

МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕРЕНИЯ КОНСТАНТЫ АДСОРБЦИИ КРАСИТЕЛЕЙ НА ТВЕРДЫЕ СОРБЕНТЫ

Соколова А.И., Павлова Е.Р., Багров Д.В., Клинов Д.В.

Лаборатория медицинских нанотехнологий ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Задача измерения адсорбции возникает во многих прикладных разделах науки, например, очистке воды и воздуха, разработке аналитических приборов и лекарственных препаратов. Одним из методов получения пористых адсорбентов является электроспиннинг. Ранее нами было показано, что волокнистые пленки из смеси полилактида с желатином сорбируют красители лучше, чем аналогичные пленки из полилактида, что связано с наличием функциональных групп в составе желатина. Обнаруженная закономерность была верна для флуоресцентного красителя акридинового оранжевого, но для вещества со сходной химической формулой – пиронина У – наблюдалась обратная зависимость. Объяснить эти различия помогают термодинамические характеристики – изменение энергии Гиббса, энтальпии и энтропии. Несмотря на то, что процедуры их измерения давно описаны, существует множество неоднозначностей как в проведении измерений, так и в их интерпретации (Liu 2009; Salvestrini et al. 2014; Tran et al. 2017). В данной работе была сделана попытка измерить термодинамические характеристики адсорбции этих красителей на полимерные пленки.

Были получены изотермы адсорбции каждого из двух красителей на пленки двух типов (из чистого полилактида и из полилактида с желатином 80:20) при двух температурах – 290 К и 310 К. Оказалось, что лишь немногие из полученных изотерм описываются моделью Ленгмюра и допускают вычисление термодинамических характеристик.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 17-75-30064).

Список литературы

1. Liu, Y., 2009. Is the free energy change of adsorption correctly calculated? *Journal of Chemical and Engineering Data*, 54(7), pp.1981–1985.
2. Salvestrini, S. et al., 2014. Considerations about the correct evaluation of sorption thermodynamic parameters from equilibrium isotherms. *Journal of Chemical Thermodynamics,* 68, pp.310–316. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.jct.2013.09.013.
3. Tran, H.N. et al., 2017. Mistakes and inconsistencies regarding adsorption of contaminants from aqueous solutions: A critical review. *Water Research,* 120(April 2018), pp.88–116. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2017.04.014.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ХРОНИЧЕСКИХ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КИШЕЧНИКА В HLA-СИСТЕМЕ ЧЕЛОВЕКА

Ставцев Д.С.

Хирургическое отделение КБ № 123 ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Язвенный колит (ЯК) относится к хроническим воспалительным заболеваниям кишечника (ВЗК) с генетической предрасположенностью и неизвестной этиологией, и характеризуются иммунным воспалением слизистой оболочки толстой кишки [1, 3].

Известно, что важная роль в иммунном ответе в целом, и в возникновении ЯК в частности, принадлежит главному комплексу гистосовместимости (MHC), причем развитие заболевания носит мультифакториальный характер [2, 4, 5]. К настоящему времени проведено значительное количество исследований, связывающих ЯК с определенными генами HLA-системы [1, 3].

В исследовании представлены результаты изучения полиморфизма генов HLA (MHC, главного комплекса гистосовместимости) I и II классов у взрослых пациентов с язвенным колитом (ЯК) славян, проживающих в Московском регионе. Исследовано распределение генов HLA I и II классов в группах пациентов с ЯК в зависимости от клинической формы, ответа на гормональную терапию, возраста и пола больных. Выявлены HLA-маркеры предрасположенности и протекции к развитию заболевания, а также к возникновению различных форм течения ЯК. Определены маркеры чувствительности и устойчивости к терапии, позволяющие прогнозировать течение заболеваний.

Список литературы

1. Адлер Г. Болезнь Крона и язвенный колит. // Г. Адлер. - М.: ГЕОТАР-МЕД, 2001. – 500 с.
2. Болдырева, М.Н. HLA (класс II) и естественный отбор. «Функциональный» генотип, гипотеза преимущества «функциональной» гетерозиготности: автореферат дис. ... доктора медицинских наук: 14.00.36 // Болдырева М. Н. - Москва, 2007. - 47 с.
3. Воробьев, Г.И. Неспецифические воспалительные заболевания кишечника // Г.И. Воробьев, И.Л. Халиф. – М.: Миклош, 2008. – 400с.
4. Галактионов, В.Г. Иммунология / В.Г. Галактионов. – М.: Изд-во МГУ, 1998. – 480 с.
5. Конович, Е.А. Иммунопатогенез воспалительных заболеваний кишечника // Е.А. Конович, И.Л. Халиф, М.В. Шапина // *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* – 2013. 2013. - № 23 (4). – С. 69-78.

РАЗЛИЧИЯ В МЕТИЛИРОВАНИИ IPSC, ПОЛУЧЕННЫЕ ИНТЕГРАЦИОННЫМ И БЕЗИНТЕГРАЦИОННЫМ МЕТОДАМИ, ОБУСЛОВЛЕНЫ ТОЛЬКО МЕТИЛИРОВАНИЕМ ТРАНСГЕНОВ

Султанов Р., Богомазова А., Жукова Ю., Лебедева О., Арапиди Г., Лагарькова М.

Лаборатория клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) можно получить доставкой в соматическую клетку генов плюрипотентности. Различают интеграционные (ретро-/лентивирусы) и не интеграционные (плазмиды, вирус Сендай, белки и т.д.) методы доставки. При любом методе репрограммирования абсолютно необходимым условием полного репрограммирования является замолкание экспрессии внесенных извне факторов репрограммирования и индукция эндогенной экспрессии этих факторов. До настоящего времени остается неясным, как влияют различные методы получения на эпигеном клетки и равнозначны ли получаемые таким образом клеточные модели.

В этой работе мы провели анализ профилей метилирования линий ИПСК, полученных из фибробластов факторами Яманака (c-MYC, KLF4, SOX2, и OCT4) при помощи интеграционных (ретро- и лентивирусами) и не интеграционных методов (вирусом Сендай). Мы обнаружили, что существует только 9 CpG-сайтов, которые разделяют ИПСК по методу получения и воспроизводятся на изогенных линиях, репрограммированных разными методами. Эти 9 CpG-сайтов находятся в экзонах генов c-MYC, KLF4, SOX2, и OCT4, причем сайты гиперметилированы в линиях, полученных интеграционными методами. Нами была выдвинута гипотеза, что гиперметилирование 9 CpG-сайтов в ИПСК, полученных интеграционными методами, происходит за счет замолкания экзогенных вирусных конструкций. Для подтверждения этого предположения, мы провели бисульфитное секвенирования экзогенных и эндогенных генов c-MYC и KLF4. Мы показали, что в совершенных ИПСК ретровирусные вставки с этими генами полностью метилированы, в то время как в несовершенных, не полностью репрограммированных клонах ИПСК, в которых продолжают экспрессироваться вирусные KLF и c-MYC, они не метилированы. Таким образом, качество клонов ИПСК можно определить по уровню метилирования всего лишь нескольких CpG-сайтов. Несущественные различия в глобальном уровне метилирования ИПСК, полученных разными методами, позволяют использовать любой метод репрограммирования для исследования метилома этих клеточных линий.

МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ СЕТЧАТКИ, ПОЛУЧЕННОГО ИЗ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Харитонов А.Е., Воловиков Е.А., Урум А.В. Лебедева О.С., Лагарькова М.А.

Лаборатория клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Возрастная макулодистрофия и другие заболевания, связанные с дегенерацией пигментного эпителия сетчатки (ПЭС) глаза, значительно снижают качество жизни людей. Перспективным направлением клеточной терапии представляется трансплантация пациентам клеток ПЭС, полученных из плюрипотентных клеток человека (ПСК) (эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК)). Целью настоящей работы были получение и характеристика клеток ПЭС с использованием различных протоколов дифференцировки, сравнение морфологических и физиологических характеристик получаемых клеточных линий, а также подбор подложки, имитирующей мембрану Бруха, для дальнейшей отработки методов трансплантации ПЭС на животных моделях.

Индукция дифференцировки ПСК в клетки ПЭС была произведена путём культивирования в суспензионной культуре с формированием глазных органоидов и дальнейшим выделением пигментированных областей, а также в виде адгезивной культуры. Экспрессия специфических маркеров ПЭС была подтверждена с использованием методов ПЦР и иммуноцитохимии, а для нескольких линий секвенированием РНК. Изучение физиологических характеристик проводилось путём измерения трансэпителиального сопротивления, секреции VEGF и фагоцитоза. Полученные клеточные линии экспрессировали специфические маркеры, характерные для ПЭС: плотных контактов (ZO-1), зрительного цикла (RPE65, RLBP1 (CRALBP)), интегрального мембранного белка (BEST1), реорганизации актинового цитоскелета. Обнаружена экспрессия генов *TYR*, *RPE65*, *OTX2*, *CRALBP*, *MITF*, *PEDF*. Трансэпителиальное сопротивление возрастало с 33,6 Ω х см^2 через 5 дней после посева на 6,5 мм трансвеллы, покрытые матригелем, до 563,81 Ω х см^2 через 16 недель. Сравнение способности к росту, накоплению пигмента и способности образовывать поляризованный монослой на различных, приготовленных электроспиннингом мембранах показало, что полиуретан-желатиновые матрицы способны поддерживать созревание клеток ПЭС.

Полученные клеточные линии используются для трансплантации животным с целью изучения интеграции в нативную сетчатку, как в виде суспензии, так и на искусственных мембранах.

ВЛИЯНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА НА ИЗГИБНУЮ УПРУГОСТЬ НЕНАСЫЩЕННЫХ ЛИПИДНЫХ БИСЛОЕВ

Чекашкина К.В., Башкиров П.В.

Лаборатория электрофизиологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Холестерин является жизненно необходимым компонентом мембран клеток млекопитающих, составляя в некоторых клеточных мембранах до 50 моль% от общей массы липидов. Он является одним из основных факторов, определяющих структуру и функцию клеточных мембран. Холестерин оказывает существенное влияние на многие физико-химические свойства липидного бислоя – вязкость, температуру фазового перехода гель-жидкий кристалл, проницаемость, а также увеличивает изгибную жесткость мембраны. Однако, в настоящее время представления о воздействии холестерина на механические свойства липидного бислоя претерпевают изменения. Согласно последним исследованиям эффект, оказываемый холестерином на изгибную жесткость мембраны, может объясняется различной ориентацией молекул холестерина в гидрофобной области бислоя среди насыщенных и ненасыщенных липидных «хвостов».

В данной работе мы показываем, что холестерин может эффективно взаимодействовать с ненасыщенными “хвостами” липидов и таким образом регулировать изгибную жесткость липидных бислоев, составленных из ненасыщенных липидов различной молекулярной геометрии (лизолипидов). Используя липидные нанотрубки, как инструмент для измерения модуля изгиба мембраны, мы установили, что холестерин приводит к 5-кратному увеличению жесткости мембраны, содержащей лизолипиды. Интересно, что при этом холестерин ингибирует способность лизолипидов перераспределяться в градиенте кривизны мембраны. Мы предполагаем, что в результате взаимодействия холестерина с лизолипидом за счет образования водородной связи формируется гетеродимер – новый тип молекулы холестерин/лизолипид. Данное предположение подтверждается тем фактом, что добавление хаотропных агентов, разрушающих водородную связь, резко уменьшает влияние холестерина на изгибгую жесткость мембраны и более того, “освобождает” лизолипиды, позволяя им перераспределяться в градиенте кривизны мембраны согласно их молекулярной форме.

ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА РАСТВОРИМЫХ КОМПОНЕНТОВ АСЦИТОВ ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКА И ИХ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

Шнайдер П.В.[1,2], Шендер В.О.[1,2], Ануфриева К.С.[1,2], Арапиди Г.П. [1,2,3], Павлюков М.С.[1], Лебедева О.С[2]., Лагарькова М.А.[2], Бутенко И.О.[2], Говорун В.М. [1,2,3]

[1] *ФГБУ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РА*
[2]*Лаборатория клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России*
[3]*Московский физико-технический институт (государственный университет)*

Характерными особенностями рака яичников являются бессимптомное протекание первых стадий заболевания и большая вероятность образования асцита, что приводит к неблагоприятному прогнозу. Асцит - это избыточная жидкость в брюшной полости, которая содержит нормальные и опухолевые клетки, а также растворимые биологически активные компоненты. Таким образом, асцит представляет собой насыщенную микросреду, которая способствует росту опухолевых клеток и, возможно, приводит к возникновению устойчивости к химиотерапии (ХТ). Целью нашего исследования являлось определение главных функциональных компонентов асцита. На первом этапе работы для оценки влияния опухолевых асцитов на свойства раковых клеток первичные культуры опухолевых клеток были инкубированы с асцитическими жидкостями, полученными до и после ХТ. Было показано, что в асцитических жидкостях после лечения содержатся компоненты, которые усиливают устойчивость раковых клеток к действию химиопрепарата, повышают клеточную подвижность и приводят к повышенной экспрессии маркера агрессивного мезенхимального фенотипа (N-cadherin), понижая при этом экспрессию маркера эпителиального фенотипа (E-cadherin). Чтобы выяснить, как изменяется состав асцитов в ответ на ХТ, нами был проведен LC-MS/MS анализ. Всего было идентифицировано 1775 белков. Биоинформатический анализ данных секретома показал, что среди белков, содержание которых повышается в асцитических жидкостях после ХТ, наиболее значимо выделялись кластеры белков сплайсосомы, протеасомы, а также белков, отвечающих за внеклеточный транспорт. Таким образом, изучение секретомов раковых клеток *in vivo* до и после ХТ позволило выявить белки, потенциально ответственные за приобретение химиорезистентности опухолевыми клетками.

Работа поддержана грантом РНФ 17-75-20205.

НОКАУТ ГЕНА БЕТА-МИКРОГЛОБУЛИНА В КЛЕТКАХ ЛИНИИ C2C12

Штефан И.А., Лавренова В.Н., Бобровский П.А.

Лаборатория генной инженерии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Молекулы главного комплекса гистосовместимости I класса (MHC I) донора являются основными мишенями иммунного ответа хозяина при аллотрансплантации органов. Чтобы избежать ответа цитотоксических лимфоцитов на клетки донора необходимо использовать индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), что позволит получить ткань-донор, обладающую молекулами MHC I, идентичными молекулам реципиента, однако, несмотря преимущества этот подход дорог и сложен, что не всегда допустимо для современной медицины. Второй подход – применять универсальные клетки, не экспонирующие молекулы MHC I на своей поверхности. Этот подход более выгоден экономической точки зрения, так и по времени, затрачиваемому от поступления пациента до начала терапии. Белок β-микроглобулин (*b2m*) – консервативная субъединица, являющаяся общей для всех молекул MHC I класса. Вероятно, что его инактивация приведёт к невозможности сборки всего комплекса, и экспонированию на поверхности клетки. Целью работы являлся нокаут гена β2-микроглобулина (*b2m*) в клетках линии C2C12 с использованием системы CRISPR-Cas9. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи: с помощью биоинформатических сервисов найти в гене *b2m* целевые сайты для внесения специфических двухцепочечных разрывов; сконструировать плазмиды, кодирующие gRNA и белок Cas9, а также GFP для оценки эффективности трансфекции; трансфицировать клетки линии C2C12 полученными конструкциями и провести анализ эффективности редактирования генома. На первом этапе работы были подобраны шесть сайтов-мишеней для внесения двухцепочечных разрывов в гене *b2m* с минимальным количеством возможных неспецифических двухцепочечных разрывов в нецелевых участках генома. Последовательности, соответствующие сайтам-мишеням были использованы для конструирования плазмид, кодирующих элементы нуклеазного комплеса и репортерного белка GFP. Плазмидами трансфицировали клетки линии C2C12 с помощью трансфицирующего реагента Lipofectamine 3000. Через 24 часа после трансфекции клетки были лизированы, была выделена геномная ДНК и проанализирована эффективность редактирования гена *b2m* с помощью нуклеазы Surveyor. На этом основании были отобраны два сайта-мишени для нокаута гена *b2m* в клетках мышиных миобластов C2C12. При использовании этих gRNA наблюдается наибольшая эффективность редактирования геномной ДНК.

ПРИМЕНЕНИЕ VAC-ТЕРАПИИ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ОТКРЫТЫХ ПЕРЕЛОМОВ ЛОДЫЖЕК

Дубров В.Э., Рагозин А.О., Кобрицов Г.П., Сидоров В.С., Щербаков И.М., Юдин А.В.

Травматологическое отделение стационара КБ № 123 ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

В травматологическом отделении стационара ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России за период с 2007 по 2017 год было проведено лечение 31 пациента с открытыми переломами лодыжек. В соответствии с классификацией Gustilo/Anderson пациенты были подразделены на группу II типа повреждения - 14 наблюдений (45,2%), группу IIIA – 17 наблюдений (54,8%). Протокол этапного лечения включал в себя выполнение радикальной ПХО раны, открытую репозицию и накостный остеосинтез наружной лодыжки, наложение стержневого мост-аппарата внешней фиксации стопа-голень. В завершении операции рану по наружной поверхности голеностопного сустава, через которую проводили остеосинтез латеральной лодыжки, ушивали наглухо с оставлением дренажа для активной аспирации, а на рану по медиальной поверхности швы не накладывали, укрывая раневую поверхность при помощи VAC-системы с постоянным отрицательным давлением 125 мм рт.ст. Смену VAC-повязок выполняли каждые 72 часа с выполнением повторной хирургической обработки. После купирования явлений отека при отсутствии признаков воспаления выполняли второй этап оперативного лечения – демонтаж стержневого АНФ, остеосинтез внутренней лодыжки с пластикой раневого дефекта по медиальной поверхности голеностопного сустава местными тканями. Для оценки результатов лечения определяли частоту развития инфекционных осложнений (поверхностное и глубокое нагноение), некроза мягких тканей, консолидацию перелома (замедленное сращение или несращение), частоту развития остеомиелита и ампутаций конечности, а также степень восстановления функции голеностопного сустава (шкала AOFAS). Средний срок перехода ко второму этапу оперативного лечения составил 7,2 дня (от 6 до 17 дней), что позволило начать раннюю реабилитацию. Средний показатель по шкале AOFAS составил 81,2 балла, при этом результаты лечения были ранжированы по группам: от 90 до 100 баллов (отлично) – 13 пациентов (41,9%), от 75 до 89 баллов (хорошо) – 11 (35,5%), от 50 до 74 баллов (удовлетворительно) – 6 (19,4%), менее 50 баллов (неудовлетворительно) – 1 (3,2%). Неудовлетворительный результат был связан с развитием тяжелого посттравматического артроза, потребовавшего впоследствии выполнения артродеза голеностопного сустава. Этапный метод лечения открытых переломов лодыжек с использованием VAC-терапии позволяет выполнить окончательный остеосинтез в среднем через 7,2 дня с момента травмы, уменьшает частоту развития инфекционных осложнений, а также обеспечивает удовлетворительные результаты восстановления функции голеностопного сустава через год после травмы у 96,8% пациентов.

ПРИМЕНЕНИЕ VAC-ТЕРАПИИ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ОТКРЫТЫХ ПЕРЕЛОМОВ ЛОДЫЖЕК

Дубров В.Э., Рагозин А.О., Кобрицов Г.П., Сидоров В.С., Щербаков И.М., Юдин А.В.

Травматологическое отделение стационара КБ № 123 ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

В травматологическом отделении стационара ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России за период с 2007 по 2017 год было проведено лечение 31 пациента с открытыми переломами лодыжек. В соответствии с классификацией Gustilo/Anderson пациенты были подразделены на группу II типа повреждения - 14 наблюдений (45,2%), группу IIIA – 17 наблюдений (54,8%). Протокол этапного лечения включал в себя выполнение радикальной ПХО раны, открытую репозицию и накостный остеосинтез наружной лодыжки, наложение стержневого мост-аппарата внешней фиксации стопа-голень. В завершении операции рану по наружной поверхности голеностопного сустава, через которую проводили остеосинтез латеральной лодыжки, ушивали наглухо с оставлением дренажа для активной аспирации, а на рану по медиальной поверхности швы не накладывали, укрывая раневую поверхность при помощи VAC-системы с постоянным отрицательным давлением 125 мм рт.ст. Смену VAC-повязок выполняли каждые 72 часа с выполнением повторной хирургической обработки. После купирования явлений отека при отсутствии признаков воспаления выполняли второй этап оперативного лечения – демонтаж стержневого АНФ, остеосинтез внутренней лодыжки с пластикой раневого дефекта по медиальной поверхности голеностопного сустава местными тканями. Для оценки результатов лечения определяли частоту развития инфекционных осложнений (поверхностное и глубокое нагноение), некроза мягких тканей, консолидацию перелома (замедленное сращение или несращение), частоту развития остеомиелита и ампутаций конечности, а также степень восстановления функции голеностопного сустава (шкала AOFAS). Средний срок перехода ко второму этапу оперативного лечения составил 7,2 дня (от 6 до 17 дней), что позволило начать раннюю реабилитацию. Средний показатель по шкале AOFAS составил 81,2 балла, при этом результаты лечения были ранжированы по группам: от 90 до 100 баллов (отлично) – 13 пациентов (41,9%), от 75 до 89 баллов (хорошо) – 11 (35,5%), от 50 до 74 баллов (удовлетворительно) – 6 (19,4%), менее 50 баллов (неудовлетворительно) – 1 (3,2%). Неудовлетворительный результат был связан с развитием тяжелого посттравматического артроза, потребовавшего впоследствии выполнения артродеза голеностопного сустава. Этапный метод лечения открытых переломов лодыжек с использованием VAC-терапии позволяет выполнить окончательный остеосинтез в среднем через 7,2 дня с момента травмы, уменьшает частоту развития инфекционных осложнений, а также обеспечивает удовлетворительные результаты восстановления функции голеностопного сустава через год после травмы у 96,8% пациентов.