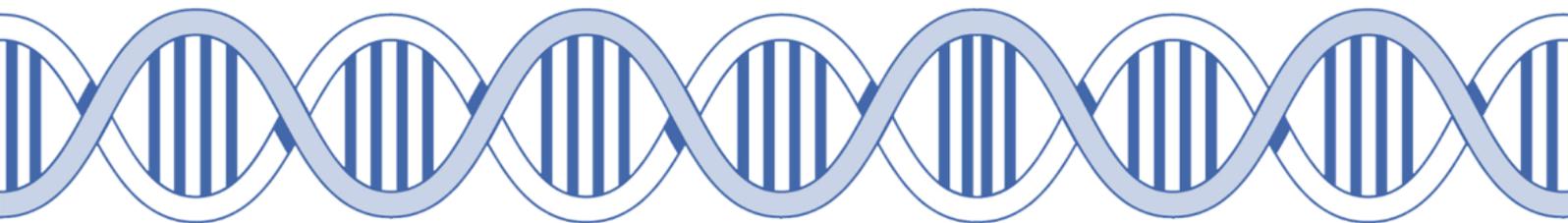


Научная конференция молодых ученых
ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России



СБОРНИК ТЕЗИСОВ



21-22 мая 2024



АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Авшалумов А.С. 31, 33, 34
Алдаров К.Г. 25
Алиева С.Э. 38
Антонов В.В. 50
Антонова О.П. 20
Ануфриева К.С. 15, 52, 40
Аралов А.В. 11
Арапиди Г.П. 12-19, 40, 41, 43
Арзуманян Л.К. 41
Бабанина М.В. 35
Бабенко В.В. 4, 28, 33
Бажутов М.Н. 25, 49
Балабушевич Н.Г. 8
Баринов Н.А. 47
Баринова А.А. 10
Басманов Д.В. 24, 25, 49
Бекбаева И.В. 16
Беликова Л.Д. 25
Беспярых Ю.А. 26, 27, 37, 49
Богомазова А.Н. 43, 44, 45
Богомякова М.Е. 13, 45
Бойченко О.П. 3
Бочаров Э.В. 21
Бровина К.А. 23
Варижук А.М. 11, 38, 46, 47
Васильчикова Е.А. 40
Веселовский В.А. 4, 6
Вигонт В.А. 43
Воробьева Е.А. 51, 52, 53
Воронина А.К. 13
Галямина М.А. 31, 33, 36
Говорун В.М. 40
Голубинская П.А. 9, 10
Гончаров А.О. 39
Горбачев А.Ю. 29-36
Горланкин Е.А. 25
Господарик А.В. 27
Графская Е.Н. 21, 22, 23
Грехнёв Д. А. 43
Деев Р.В. 40
Емец Е.В. 45
Еремеев А.В. 7, 9, 10, 25
Ефимов Б.А. 13, 51, 52
Захаревич Н.В. 4
Захаржевская Н.Б. 51, 52, 53
Зоркина Я.А. 53
Зорук П.Ю. 4, 6
Иванов В.А. 53
Иванова О.М. 13, 15, 16, 40, 41, 47
Казакова А.Н. 15
Казакова В.Д. 52
Калачнюк Т.Н. 27, 48
Камзеева П.Н. 11
Канаева В.А. 5
Каныгин А.П. 24
Кардонский Д.А. 51, 52, 53
Карпова Ю.С. 22
Кашатникова Д.А. 51, 52, 53
Кашина А.В. 40
Киселёва Я.С. 19
Климина К.М. 4, 5, 6, 44
Клинов Д.В. 3, 47
Клячко Н.Л. 3
Ковалева П.А. 20
Ковальчук С.И. 28
Козакова В.Д. 51, 53
Колдман В.А. 4, 6
Колдман С.Д. 4, 6
Колокольникова О.А. 32
Конанов Д.Н. 53
Копылова И.В. 43
Корниенко М.А. 37
Коршунова А.В. 48
Косс В.А. 17
Котова Е.С. 20
Кузнецов А.А. 14
Кузьменко Л.В. 26
Кулемин Н. А. 35
Куликова В.К. 27, 49
Лагарькова М.А. 13, 40, 43, 45
Лазарев В.Н. 21, 22, 38
Ларин А.К. 4
Лашкин А.И. 16
Лебедева О.С. 24, 25, 42, 43
Ли А.В. 30
Лопухов А.В. 3
Лукина М.М. 39
Малахова М.В. 13
Мальгин Б.Е. 20
Мальцев Д.И. 21
Манувера В.А. 21, 22
Матюшкина Д.С. 52
Медведев К.Е. 37
Михайлычева М.В. 31, 33
Михальчик Е.В. 8
Мороз Г.Д. 38
Морозов М.Д. 4, 6
Мосиевич Д.В. 8
Москалец А.П. 3
Мочалова Е.Н. 40
Наумов С.А. 24
Нестеров М.С. 51
Никитин М.П. 40
Олехнович Е.И. 4, 5, 6
Павлова Ю.И. 47
Панасенко О.М. 38
Пантелеев М.А. 38
Паршин В.Д. 50
Петрова А.В. 14
Пикина А.С. 7
Побегуц О.В. 33
Подлесный П.Р. 12
Подоплелова Н.А. 38
Попик Е.А. 42
Прохорова Н.Д. 27
Прусаков К.А. 24, 25, 49
Решетов И.В. 50
Рубцов П.В. 46
Рубцова М.П. 11
Ручко Е.С. 9
Свирина Е.А. 40
Северов В.В. 11
Секретова Е.К. 44
Селезнева О.В. 4
Семенов А.А. 31
Серебренникова М.Ю. 21
Сикамов К.В. 29, 32, 33
Силаков Н.М. 36
Силантьев А.С. 51, 52, 53
Сильвестрова А.А. 28
Скородумова Л.О. 20
Смирнов И.П. 33, 36, 39
Спасельникова А.В. 42
Столяров В.Ю. 24



Строкач А.А. 4, 6
Суздаденко А.С. 18
Султанов Р.И. 18
Сурдина А.В. 44, 46, 47
Ткаченко И.С. 20
Трусов Н.В. 29, 30
Уразаева Д.Р. 29, 31, 32, 33
Федоренко А.В. 44
Фирова Р.Х. 8
Хомякова Е. А. 44
Хромых Н.И. 26, 27
Шагалева О.Ю. 51, 52, 53
Шакуров Р.И. 24, 49
Шанский Я.Д. 26
Шарова Е.И. 20
Шендер В.О. 13-16, 39-41, 43
Шепелев Н.М. 11
Шерман Д.К. 45
Широков Д.А. 28
Шитиков Е.А. 37
Шнайдер П.В. 13-16, 40, 41
Шторк А.С. 46
Щербаков П.Л. 32
Юдин М.С. 38, 47

Нетканые материалы на основе полилактида с протеолитическим ферментом коллагеназой для медицинских и косметологических применений

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

¹ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, лаборатория медицинских нанотехнологий

²МГУ, химический факультет, Москва, Россия

Коллагеназа – это специфическая протеаза, синтезирующая и гидролизующая коллаген - основной компонент внеклеточного матрикса, ран, рубцов и фиброзной ткани. Имеющиеся к настоящему времени результаты доклинических и клинических исследований подтверждают способность коллагеназы ускорять процесс регенерации кожи [1]. Существующие средства на основе коллагеназы имеют ряд недостатков, основной из которых – это потеря ферментативной активности и, как следствие, неэффективное лечение. Поэтому целью нашей работы является получение и характеристика нетканого полилактидного материала с коллагеназой, который будет иметь свойства пролонгированного высвобождения и сохранения активности фермента.

В ходе работы методом электроформования было создано несколько матриксов (варьировали состав исходной смеси и условия формования). Была показана биосовместимость полученных матриксов на культуре клеток НЕК293, а также определены их механические свойства: прочность на разрыв и относительное удлинение до разрыва. Матриксы между собой сравнивались по скорости высвобождения коллагеназы в буферный раствор, а также по ее остаточной ферментативной активности. Активность определяли спектрофотометрически по методике [2]. Оказалось, что варьированием состава смеси можно изменять скорость высвобождения коллагеназы в довольно широких пределах (от 14% до 80% в сутки). Также было показано, что иммобилизованная коллагеназа после высвобождения из матрикса сохраняет часть своей ферментативной активности ($K_{m,эфф}$ практически не изменяется, в то время как $k_{2,эфф}$ уменьшается на 64%), что позволяет использовать данную технологию в медицинских и косметических целях. Также в материал был введен антибактериальный компонент феноксиэтанол, чтобы предотвратить бактериальное заражение при хранении.

Основным преимуществом данного материала перед существующими аналогами являются пролонгированное высвобождение фермента, сохранение его ферментативной активности при релизе в течение суток и при хранении материала в течение нескольких месяцев при комнатной температуре.

Литература:

[1] А.В. Майорова и др. Фармация и фармакология. 2019. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-5-260-270.

[2] Tsu C.A., Craik C.S. J. Biol. Chem. 1996. DOI: 10.1074/jbc.271.19.11563.

Сравнительный анализ платформ Illumina и Oxford Nanopore Technologies для секвенирования кишечной микробиоты мышей

П.Ю. Зорук, А.А. Строкач, Е.И.Олехнович, В.А. Веселовский, В.В. Бабенко, С.Д. Колдман, В.А. Колдман, О.В. Селезнева, Н.В. Захаревич, А.К. Ларин, М.Д. Морозов, К.М. Климина

Лаборатория геномных исследований и вычислительной биологии

Микробиом кишечника является одним из крупнейших бактериальных сообществ в человеческом организме и влияет как на поддержание здоровья, так и на развитие различных заболеваний [1]. Известно, что комменсальные бактерии, такие как бифидобактерии и лактобациллы, оказывают благотворное влияние на состояние организма хозяина, модулируя иммунные реакции, укрепляя кишечный барьер и подавляя рост патогенных микроорганизмов [2]. Таким образом, изучение микробиоты кишечника является важной и перспективной областью исследований.

В последние годы был достигнут большой прогресс в определении состава бактериальных сообществ кишечника благодаря развитию технологий секвенирования с использованием приборных комплексов различных типов. Illumina и Oxford Nanopore Technologies (ONT). Основными методами для идентификации микробных сообществ служат анализ последовательности гена 16S рРНК и полногеномное секвенирование (whole genome sequencing (WGS)). Целью нашего исследования было сравнение методов секвенирования на двух платформах, Illumina и Oxford Nanopore Technologies (ONT), для определения наиболее оптимального подхода для анализа состава микробиоты кишечника.

В ходе эксперимента было исследовано влияние двух комменсальных штаммов, *Lactocaseibacillus rhamnosus* K32 и *Bifidobacterium adolescentis* 150, на кишечную микробиоту мышей линии C57BL/6. Изменения бактериального состава оценивали путем секвенирования гена 16S рРНК и WGS на двух платформах – Illumina и ONT. Для секвенирования гена 16S рРНК на ONT использовали 5 известных комбинаций праймеров, и проводили сравнительный анализ эффективности определения бактериального разнообразия с помощью данных комбинаций. Все 5 исследуемых комбинаций праймеров на ген 16S рРНК позволили выявить сопоставимое альфа-разнообразие кишечной микробиоты мышей. Однако одна из комбинаций праймеров (bif27F - 1492R) являлась более специфичной при идентификации определенных видов, что привело к отличному профилю биоразнообразия. Платформы Illumina и ONT демонстрировали различия в профилях микробного разнообразия при секвенировании гена 16S рРНК. Помимо этого, было показано, что Illumina идентифицирует преимущественно *Bacteroidota*, в то время как ONT выявляет *Firmicutes* и *Actinobacteria*. Дополнительно, мы провели попарное сравнение данных, полученных с разных платформ для секвенирования и с разной исходной ДНК (обычная и высокомолекулярная). Результаты исследования демонстрируют высокую степень корреляции между данными, полученными с одной платформы и с разным типом исходной ДНК. Однако данные WGS, полученные с платформ Illumina и ONT, имеют высокий уровень сходства. В целом, использование комбинированных данных с двух платформ секвенирования позволяет более полно и точно оценивать бактериальное разнообразие в анализируемых образцах. Результаты секвенирования также показали, что введение мышам штаммов бифидобактерий и лактобацилл вызвало значительные изменения в составе их кишечной микрофлоры по сравнению с контрольной группой.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 23-75-10125.

Литература:

- [1] Blaut M., Clavel T. Metabolic Diversity of the Intestinal Microbiota: Implications for Health and Disease //The Journal of nutrition. – 2007. – Т. 137. – №. 3. – С. 751S-755S.
- [2] O'Toole P. W., Marchesi J. R., Hill C. Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics //Nature microbiology. – 2017. – Т. 2. – №. 5. – С. 1-6.

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

Канаева В.А., Климина К.М., Олехнович Е.И.

Лаборатория геномных исследований и вычислительной биологии

Известно, что структура и состав микробиоты кишечника (МК) человека влияют на состояние его иммунной системы [1], а кроме того и на эффективность иммунотерапии. Настоящее исследование направлено на определение универсальных метагеномных маркеров МК, коррелирующих с успешностью иммунотерапии при различных видах рака.

Для работы были загружены метагеномы из 11 независимых исследований из открытой базы данных NCBI. Всего было собрано 814 образцов МК пациентов страдающих различными онкологическими заболеваниями, включая меланому, рак толстой и прямой кишки, поджелудочной железы, рак легких, молочных желез и яичников. Из них 462 образца от пациентов, которые ответили на терапию и 352 от не ответивших. Для всех образцов проведен контроль качества прочтений и фильтрация человеческой ДНК.

На первом этапе создавался избыточный каталог геномов, собранных из метагеномов. Данный процесс включал сборку метагеномных контигов, биннинг, де-репликацию собранных бинов и их таксономическую аннотацию. В результате был создан каталог из 3855 операционных геномных единиц (ОГЕ). Далее, на основе анализа представленности ОГЕ в образцах и оценки их влияния на исход иммунотерапии, было выявлено 424 метагеномных маркера, из которых 166 связаны с ответом на иммунотерапию (R), а 258 - с отсутствием ответа (NR).

Среди маркеров, ассоциированных с NR были выявлены такие микроорганизмы как *Hungatella effluvii*, которая может вызывать инфекции и бактериемию у человека, *Raoultella ornithinolytica* – патогенный микроорганизм, вызывающий инфекции. Среди маркеров, ассоциированных с R, наиболее часто встречаются *Bifidobacterium adolescentis*, *Bacteroides uniformis*, *Alistipes putredinis*. Эти виды, оказывают положительное влияние на МК и облегчают течение различных заболеваний [2, 3, 4].

В результате анализа функциональных путей, было установлено, что для R по сравнению с NR, наблюдалось статистически значимое увеличение метаболизма крахмала и сахарозы. Эти вещества активно ферментируются *B. adolescentis*, который также участвует в ферментации других гликанов [2]. В тоже время, R связан с уменьшением активности пути образования биопленки *E. coli*, которая часто выступает в роли патогенного фактора.

Для построения предсказательной модели использовались значения логарифмических отношений относительных представленностей маркерных ОГЕ. Применение модели логистической регрессии позволило спрогнозировать ответ на иммунотерапию для различных видов рака. Данная модель оказалась значительно эффективнее принятых в научном сообществе по изучению МК методов.

Результаты данной работы создают основу для формирования гипотезы о влиянии микробиоты на эффективность иммунотерапии рака. Введение нового метода анализа метагеномных данных, обеспечивает более детальное описание состава кишечной микробиоты и повышает точность прогнозирования исходов лечения. Это исследование способствует переходу к персонализированной медицине и разработке методов предсказания реакции на иммунотерапию у пациентов с различными видами рака.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-75-10029.

Литература:

- [1] E.Z. Goma. Antonie van Leeuwenhoek 2020, doi: 10.1007/s10482-020-01474-7
- [2] T. Leser and A. Baker. Beneficial Microbes 2023, doi: 10.1163/18762891-20230030
- [3] Y. Yan, Y. Qu et al. Biofilms Microbiomes 2023, doi: 10.1038/s41522-023-00420-5
- [4] Y. Yang, X. Zheng et al. Front. Immunol. 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.836542

Идентификация бактерий, способствующих улучшению результатов иммунотерапии меланомы

Морозов М.Д., Строкач А.А., Зорук П.Ю., Веселовский В.А., Колдман В.А.,
Колдман С.Д., Олехнович Е.И., Климина К.М.

Лаборатория геномных исследований и вычислительной биологии

Микробиота кишечника человека выполняет множество функций важных для поддержания здоровья и регуляции иммунной системы. В научной литературе имеется связь между составом микробиоты кишечника и результатами иммунотерапии злокачественных опухолей [1]. Эта зависимость была подтверждена экспериментами по пересадке микробиоты от пациентов мышам, лишенным микробиоты, а также пациентам с негативными результатами лечения [2, 3], однако четкого понимания биологических механизмов все еще нет. Поэтому, целью данного исследования была систематизация метагеномных данных из открытых источников и валидирование полученных результатов с использованием экспериментальной модели меланомы.

С использованием модели смешанных эффектов (ZicoSeq) были проанализированы таксономические профили 680 кишечных метагеномов пациентов, проходивших иммунотерапию, из 7 ранее опубликованных исследований (базы данных NCBI-EBI). Для повышения достоверности результатов в анализе были использованы различные стратегии коррекции эффектов множественного тестирования гипотез. В частности, использовались поправки на множественное сравнение: FWER (family-wise error rate) - вероятность совершить хотя бы одну ошибку первого рода и FDR (false discovery rate) - для учета вероятности ошибки второго рода. В результате анализа, *Bifidobacterium adolescentis* была идентифицирована как единственный строгий биомаркер положительного исхода иммунотерапии, прошедший установленные пороги достоверности (FWER $p < 0.05$; FDR $p < 0.05$). Чтобы подтвердить потенциальное воздействие *B. adolescentis* на результаты иммунотерапии было проведено исследование влияния анти-PD-1 терапии в комбинации с бифидобактериями на лечение экспериментальной модели меланомы.

Для проведения исследования из коллекции микроорганизмов ИОГен РАН был предоставлен штамм *B. adolescentis* 150. Опыты на лабораторных животных проводились в виварии ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России. В исследованиях использовались самки мышей C57Bl/6 весом 17-20 граммов, приобретенные в питомнике «Филиал Столбовая ФГБУН НЦБМТ ФМБА России». Мышам была привита культура клеток меланомы B16/F1. Вводилась лиофильная культура бифидобактерий и раствор антитела PD-1 в соответствии с разработанным протоколом исследования. В дальнейшем проводился сбор мышинных фекалий для оценки бактериального разнообразия посредством секвенирование гена 16S рНК на Oxford Nanopore Technologies. Транскриптомное секвенирование тотальной РНК опухоли применялось для количественной оценки уровня экспрессии генов. Результаты показали, что введение штамма *B. adolescentis* 150 не только способствовало увеличению роста экспериментальной меланомы, но также приводил к повышению количества условно-патогенных бактерий в кишечнике. На основе анализа данных транскриптома, повышалась экспрессия опухолевых генов *Ero11*, *Mtss11*, *Atf3*, *Mitf*, *Mxi1*, *Vegfa*, *Slc2a1*, которые согласно литературным данным ассоциируются с метастазированием и прогрессированием опухоли [4-6].

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-75-10029.

Литература:

- [1] Lu, Y., Yuan, X., Wang, M., He, Z., Li, H., Wang, J., & Li, Q. Journal of hematology & oncology 2022, doi: 10.1186/s13045-022-01273-9
- [2] Routy, Bertrand et al. Science 2018, doi: 10.1126/science.aan3706
- [3] Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, Reuben A, Andrews MC, Karpinets TV, et al. Science 2018, doi: 10.1126/science.aan4236
- [4] Kajiwarra, Toshimitsu et al. European journal of immunology 2016, doi: 10.1002/eji.201646525
- [5] Muto, Satoshi et al. Biomedicines 2023, doi: 10.3390/biomedicines11010190
- [6] Rodolfo, Monica et al. Cancer letters 2004, doi: 10.1016/j.canlet.2004.06.049

Модельная система гематоэнцефалического барьера на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

А.С. Пикина, А.В. Еремеев

Лаборатория трансляционной биомедицины

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), играющий критическую роль в регуляции химического микроокружения мозга, представляет собой сложную систему, которая контролирует проникновение молекул из крови в мозговую ткань и наоборот. Изучение барьерной функции данной структуры для лучшего понимания механизмов селективного транспорта, а также прогнозирования эффективности потенциальных терапевтических агентов на данный момент осуществляется, в основном, с помощью перфузии сосудистой системы головного мозга лабораторных животных, однако этот подход неэффективен в ряде случаев, а также не отражает специфичность ГЭБ человека [1]. В связи с этим, разработка доступных биомиметических моделей ГЭБ человека *in vitro* достаточно актуальна.

В нашем исследовании мы предлагаем модель ГЭБ на основе дифференцированных производных индуцированных плюрипотентных клеток человека (ИПСК) в системе планшетов Transwell™. ИПСК представляют собой обширный ресурс для моделирования, а система Transwell™ предоставляет удобную и воспроизводимую платформу для воссоздания и дальнейшего тестирования барьерной функции. В работе мы использовали протоколы для дифференцировки ИПСК, базирующиеся на ключевых принципах барьерогенеза в центральной нервной системе *in vivo* [2,3]. Помимо этого, предлагаемая модель является контактной, т.е. нейральные предшественники и эндотелиальные клетки находятся в непосредственном контакте друг с другом, что лучше отражает физиологические условия.

В результате дифференцировки производные ИПСК демонстрировали экспрессию характерных маркерных белков: β 3-тубулин в нейральных производных, CD31, CD105 и ГЭБ-специфические транспортёры GLUT-1, LAT-1, и P-gp. Также проводили измерение трансэндотелиального сопротивления (TEER) – важнейшего показателя барьерной функции, и зафиксировали значения ~ 2000 Ом·см² в совместных культурах, что соответствует высоким показателям среди других результатов по литературе [4]. Совместные культуры демонстрировали низкую проницаемость для флуоресцентного декстрана (40 кДа) и митохондриального красителя (672 Да). Кроме того, мы предлагаем одно из применений данной системы *in vitro* – изучение функций ГЭБ в условиях индукции воспаления, путём внесения экзогенных цитокинов и последующего тестирования проницаемости для мононуклеаров крови (РВМС) и макрофагов, полученных из клеток линии ТНР-1.

Предложенный нами подход оптимизации может позволить масштабировать и стандартизировать получение модели ГЭБ человека, что в перспективе предоставит базу для различных исследований.

Литература:

- [1] S. Raut et al. In Vitro Models of the Blood–Brain Barrier. *Methods in Molecular Biology* 2022, doi: 10.1007/978-1-0716-2289-6_2
- [2] A. Eremeev et al. Brain Organoid Generation from Induced Pluripotent Stem Cells in Home-Made Mini Bioreactors. *Journal of Visualized Experiments* 2021, doi: 10.3791/62987
- [3] M.T. Pham et al. Generation of human vascularized brain organoids. *NeuroReport* 2018, doi: 10.1097/WNR.0000000000001014
- [4] A.B. Salmina et al. Blood–brain barrier and neurovascular unit in vitro models for studying mitochondria-driven molecular mechanisms of neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, doi: 10.3390/ijms2209466



**Биосовместимость гибридных микрочастиц
ватерита с пектином в модельных системах *in vitro***

Фирова Р.Х.^{1,2}, Мосиевич Д.В.^{1,3}, Балабушевич Н.Г.^{1,3}, Михальчик Е.В.¹

¹Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА,
Москва, Россия

²ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва,
Россия

³Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва,
Россия

Микро- и наночастицы – это перспективные средства доставки лекарственных препаратов белковой и небелковой природы при воспалительных заболеваниях кишечника. К достоинствам ватерита, являющегося полиморфом карбоната кальция, относят отсутствие токсичности, пористость и биосовместимость. Для увеличения стабильности ватерита получают его гибридные модификации с включением различных биополимеров, в том числе, пектина, обладающего важными свойствами.

Цель работы состояла в выявлении эффектов загруженного в ватерит пектина при оценке биосовместимости частиц. Микрочастицы ватерита (СС) получали соосаждением из растворов CaCl_2 и Na_2CO_3 , а микрочастицы ССП - в присутствии пектина. Наличие анионного пектина в ССП подтверждено термогравиметрическим анализом (7 %) и изменением поверхностного заряда частиц с 2 ± 1 до -12 ± 2 мВ. Включение пектина снижало лизис эритроцитов в модели гемолиза *in vitro* и их агрегацию. Активация дыхательного взрыва выделенных нейтрофилов крови человека под действием СС и ССП по данным хемилюминесцентного анализа (ХЛ) не различалась и не сопровождалась гибелью клеток, согласно результатам измерения активности внеклеточной лактатдегидрогеназы и способности нейтрофилов отвечать на последующую активацию фторбол-12-миристан-13-ацетатом или клетками *E. coli*. В присутствии 1% сыворотки или в результате предварительной опсонизации ССП активировали ХЛ нейтрофилов сильнее, чем СС. Предварительная инактивация сыворотки при 56°C отменяла эффекты опсонизации, что указывает на участие белков системы комплемента во взаимодействии с поверхностью ССП. Предобработка микрочастиц основным компонентом слизи кишечника муцином значительно усиливала ХЛ ответ нейтрофилов на СС, но не на ССП. В качестве перспективного для доставки белкового препарата исследовали рекомбинантный лактоферрин человека (ЛФ), который адсорбировали на СС и ССП. В предварительных экспериментах изучили комплексообразование пектина и ЛФ в растворе с помощью спектроскопии, ХЛ в реакции Фентона и при активации нейтрофилов в крови *ex vivo*. Используя последнюю систему, выявили, что адсорбция ЛФ на ССП в отличие от СС усиливает активацию нейтрофилов, что подтверждает сохранение его биологической активности в комплексе с пектином на поверхности частиц.

Полученные результаты позволяют рассматривать микрочастицы ССП как средство для мукозальной доставки с высокой биосовместимостью.

Работа проведена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 23-45-10026), а получение микрочастиц частично темой 121041500039-8 МГУ имени М.В. Ломоносова.



**Изучение онкогенности, туморогенности и биораспределения препарата
тканевой инженерии для лечения повреждений хрящевой ткани на мышцах
линии Balb/c Nude**

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

Лаборатория Трансляционной биомедицины ФНКЦ ФХМ им. академика Ю.М. Лопухина

В настоящее время клеточные технологии являются активно развивающимся направлением медицинской науки, применение которых направлено и на восстановление структуры хрящевой ткани [1]. Аутологичные культуры хондроцитов успешно применяются в лечении повреждений суставного хряща за рубежом [2], а в России подобные технологии успешно проходят клинические исследования. Получение 3D хрящеподобных конструкций представляет собой перспективное направление для коррекции объемных дефектов суставного хряща. Однако, перед применением подобных клеточных технологий в клинической практике, необходимо оценить соответствие полученного клеточного продукта требованиям безопасности, а именно провести анализ биораспределения, оценить потенциальные туморогенность и онкогенность, а также доказать эффективность и стабильность интеграции трансплантатов в окружающие ткани.

В представленной работе была изготовлена партия хрящевого имплантата "Хондросферы" на основе хондроцитов человека, полученных из биопсийного материала. Было показано, что полученные клеточные культуры обладают, аналогичным нативным хондроцитам, уровнем экспрессии основных хондроцитарных маркерных генов: агрекана, коллагена I и II типов и SOX9, при их анализе с помощью ИЦХ и количественной ПЦР. В дальнейшем были проведены эксперименты по трансплантации хрящевых имплантов мышцам линии Balb/c Nude, со следующим распределением животных по группам "Контроль-плацебо", n=24; "Хондросферы", n=24; "Клеточные линии МСК, MDA231", n=6. Было показано, что хондросферы не демонстрируют онкогенности и туморогенности, не гипертрофируются *in vivo*, а также не обладают потенциалом к миграции в отдаленные органы и ткани через 3 и 9 месяцев после введения, при их сравнении с МСК и MDA231. Также, на основании данных гистологического исследования с помощью окраски гематоксилином и эозином, альциановым синим, было показано формирование гетероптической хрящевой ткани в местах инокуляции хондросфер в опытных группах животных. Все эти результаты свидетельствуют в пользу безопасности и эффективности применения изучаемого клеточного продукта.

Литература:

[1] M. Makarczyk. Organogenesis 2023, doi: 10.1080/15476278.2023.2278235.

[2] T. Negoro et al. npj Regen Med 2018, doi: 10.1038/s41536-018-0055-2.

Оптимизация протокола медленной заморозки для нейрональных органоидов

А. А. Барина, П. А. Голубинская, А. С. Пикина, А. В. Еремеев

Лаборатория клеточной биологии, лаборатория трансляционной биомедицины

Органоиды представляют собой сложные трёхмерные многоклеточные структуры, являющиеся производными стволовых клеток или клеток-предшественников. Их строение и структура схожа с органами, что позволяет использовать органоиды для моделирования заболеваний, а также для регенеративной медицины и тестирования различных терапевтических средств. При масштабировании производства органоидов остро встает проблема их длительного хранения без значительной потери жизнеспособности. Криоконсервация является одним из наиболее приемлемых способов сохранения большого количества биоматериала длительное время, при сохранении структур и функций после разморозки. Такой подход достаточно беспрепятственно применяется для консервации простых структур и культур клеток, но для крупных объектов возникает ряд проблем, связанных неравномерной скоростью заморозки, повреждением внутренних структур кристаллами льда. В этой связи оптимизация условий криоконсервации органоидов позволит обеспечить длительное хранение органоидов и существенно упрощает их использование в исследовательских или клинических целях. Тем не менее, влияние криоконсервации на морфологию, функциональность и процесс дифференцировки органоидов остаётся не до конца изученным. Цель текущего исследования заключалась в сравнении и оптимизации известных протоколов криоконсервации для нейрональных органоидов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Была поставлена задача подобрать среду для криоконсервации с наименьшим влиянием на морфофункциональные характеристики органоидов, а также определить оптимальную для заморозки стадию дифференцировки нейрональных органоидов. Была проведена дифференцировка ИПСК в нейрональные производные в условиях 3D-культивирования в биореакторах. В процессе культивирования органоиды были заморожены методом медленной заморозки в различных криосредах (FBS+10%DMSO, FBS+8%DMSO, DMEM+10%FBS+8%DMSO) на пяти стадиях дифференцировки (дни 9, 16, 22, 29 и 43). После разморозки органоиды культивировались в течение двух недель. Затем оценивалась экспрессия нейрональных маркеров MAP2 и Nestin и сравнивалась с таковой у интактных органоидов. Также визуально оценивалась морфология и целостность органоидов в течение всего времени после разморозки. По результатам количественного ПЦР, окрашивания и оценки морфологии органоидов до и после заморозки, была выбрана лучшая среда, а также определена оптимальная стадия дифференцировки нейрональных органоидов для криоконсервации. В дальнейшем планируется провести аналогичные тесты с органоидами сердца, а также оптимизировать протокол витрификации для органоидов.



Регуляторные элементы в 5'-НТО мРНК гена *DDX23*

П.Н. Камзеева, Н.М. Шепелев, В.В. Северов, А.М. Варижук, М.П. Рубцова, А.В. Аралов.

Лаборатория структуры и функций биополимеров

Опубликованные ранее данные по рибосомному профайлингу свидетельствовали о формировании в 5'-НТО мРНК гена *DDX23* ингибирующих трансляцию элементов вторичной структуры, однако топология их не была определена [1]. С помощью предиктора G-квадруплексов (G4) в данной 5'-НТО нами были выделены три G-богатые последовательности, перекрывающиеся со старт-кодонами малой и основной открытых рамок считывания [2]. Были синтезированы соответствующие олигонуклеотиды и их мутированные последовательности, не образующие G4. Сравнение спектров кругового дихроизма олигонуклеотидов в присутствии стабилизирующих G4 ионов калия и дестабилизирующих ионов лития указало на вероятное образование G4 одной из последовательностей дикого типа. Для нее также было выявлено повышение температуры плавления в присутствии селективного G4-стабилизатора пиридостатина и увеличение интенсивности флуоресценции в тесте с использованием «разгорающегося» зонда тιοфлавина T.

Структуры последовательности дикого типа и ее мутантов были исследованы методом 1D ¹H ЯМР спектроскопии. Данные для дикого типа свидетельствовали о равновесии двух структур - G4 и шпильки. Внесение нуклеотидных замен в последовательность дикого типа позволило сместить равновесие в сторону одной из структур. Использование селективного G4-стабилизатора пиридостатина в двойном люциферазном тесте с плазмидой, транскрипт которой содержит 5'-НТО мРНК гена *DDX23*, не выявило какого-либо изменения в уровне экспрессии. Таким образом, исследуемая последовательность может формировать во внутриклеточной среде шпильку, и в дальнейшем мы планируем использовать модифицированные олигонуклеотиды для ее направленной стабилизации и дестабилизации.

Работа поддержана грантом РФФ № 24-15-00236.

Литература:

- [1] P. Murat, G. Marsico, B. Herdy, et al. *Genome Biol* 2018, doi: 10.1186/s13059-018-1602-2
- [2] O. Kikin, L. D'Antonio, P.S. Bagga, *Nucleic Acids Research* 2006, doi: 10.1093/nar/gkl253



Динамическая модель гликолиза бактериальной клетки

П.Р. Подлесный, Г.П. Арапиди

Лаборатория системной биологии

Математическое моделирование играет важную роль в исследованиях внутриклеточного метаболизма. Объединяя экспериментальные данные с теоретическими представлениями о метаболизме, вычислительная модель позволяет получить качественное и порой количественное представление о метаболических реакциях и механизмах их регуляции. В рамках данной работы нами была разработана математическая модель гликолиза бактерии на основе системы обыкновенных дифференциальных уравнений. Уравнения для скоростей ферментативных реакций были составлены с помощью подхода convenience kinetics [1]. Модель была реализована в виде программного пакета в среде MatLab (MathWorks).

Имея функционирующую модель, мы были заинтересованы в том, чтобы проверить ее способность симулировать различные режимы гликолиза. Получение осцилляций представляло особый интерес, поскольку гликолитические осцилляции наблюдались экспериментально как в эукариотических, так и прокариотических клетках [2, 3]. Поиск параметров модели (констант Михаэлиса и чисел оборота ферментов), обуславливающих возникновение колебаний, был выполнен с помощью стохастического алгоритма глобальной оптимизации, particle swarm optimization, реализованного в среде MatLab (MathWorks). Эффективность данного алгоритма применительно к задаче подбора параметров кинетической модели уже была продемонстрирована ранее [4]. На основе анализа энзимологической базы данных BRENDA [5] для каждого параметра модели был получен биологически реалистичный диапазон значений, внутри которого осуществлялся поиск. Константы равновесия для реакций были получены с помощью веб-инструмента eQuilibrator [6].

В результате нам удалось получить набор биологически правдоподобных параметров, при которых наблюдались устойчивые колебания, что демонстрирует способность нашей модели симулировать сложные метаболические процессы. Характеристики полученных колебаний (амплитуда и частота) по порядку величин согласуются с экспериментальными данными для дрожжевых клеток [7]. Оценка достоверности результатов моделирования применительно к бактериям требует экспериментальной проверки, которую мы планируем провести в дальнейшем, и тем самым изучить прогностический потенциал нашей модели.

Литература:

- [1] W. Liebermeister and E. Klipp. Theoretical Biology and Medical Modelling 2006, doi: 10.1186/1742-4682-3-41
- [2] B. Hess and A. Boiteux. Biological Chemistry 1968, doi: 10.1515/bchm2.1968.349.2.1567
- [3] U. Schaefer et al. Analytical biochemistry 1999, doi: 10.1006/abio.1999.4048
- [4] J. Levering et al. Biophysical chemistry 2013, doi: 10.1016/j.bpc.2012.11.002
- [5] A. Chang et al. Nucleic Acids Research 2021, doi: 10.1093/nar/gkaa1025
- [6] M. E. Beber et al. Nucleic Acids Research 2022, doi: 10.1093/nar/gkab1106
- [7] R. Peter. FEMS Microbiology Reviews 2003, doi: 10.1016/S0168-6445(03)00065-2

Анализ протеома бактерии *Helicobacter cinaedi* в культуральных условиях и после контакта с макрофагальными клетками

А.К. Воронина, Б.А. Ефимов, М.В. Малахова, М.Е. Богомякова, П.В. Шнайдер, О.М. Иванова, М.А. Лагарькова, В.О. Шендер, Г.П. Арапиди

Лаборатория системной биологии

По данным ВОЗ, сердечно-сосудистые заболевания являются лидирующей причиной смертности во всем мире, причем наибольший вклад в смертность вносит атеросклероз. Согласно липопротеидной теории патогенеза, атеросклероз может быть индуцирован нерегулируемым захватом модифицированных липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) и очень низкой плотности неповрежденным эндотелием стенки сосудов [1]. Опубликован ряд исследований, согласно которым нарушение метаболизма ЛПНП в макрофагах может быть вызвано внутриклеточным патогеном, микроорганизмом *Helicobacter cinaedi*, однако роль *H. cinaedi* в развитии патологии окончательно не доказана [2, 3]. *Helicobacter cinaedi* - спиралевидная грамтрицательная бактерия, энтерогепатический представитель рода *Helicobacter*. На сегодняшний день *H. cinaedi* является малоизученным организмом, однако в последние годы появляются сообщения о все более разнообразных патологиях, связанных с данной бактерией, и о ее распространении в различных регионах земного шара [4].

В литературе описано только три фактора вирулентности *H. cinaedi*: cytolethal distending toxin (Cdt) [5], alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) [6] и *Helicobacter cinaedi* autotransporter protein (HcaA) [7]. Поэтому целью нашего исследования является выявление белковых факторов, которые могут способствовать патогенезу данной бактерии. Поскольку на данный момент для *H. cinaedi* не опубликовано протеомных исследований, для достижения поставленной цели мы провели детальное изучение на масс-спектрометре Q Exactive HF-X Hybrid Quadrupole-Orbitrap протеома *H. cinaedi* штамма ВАА-847 до и после контакта с макрофагами типа М1. В результате анализа протеома бактерии мы обнаружили, что после контакта с макрофагальными клетками значительно увеличивается присутствие белка HcaA, фактора патогенности, отвечающего за адгезию и инвазию. Присутствие двух других известных факторов патогенности - Cdt и AhpC - после контакта с макрофагами наоборот снизилось. Кроме описанных в литературе факторов патогенности, был выявлен ряд белков, вовлеченных в механизмы адаптации к неблагоприятным условиям.

Литература:

- [1] J. Fan and T. Watanabe Pathol. Int., 2022, doi: 10.1111/pin.13202
- [2] S. Khan et al. Microbiol. Immunol., 2012, doi: 10.1111/j.1348-0421.2012.00421.x
- [3] S. Khan et al. Sci. Rep., 2014, doi: 10.1038/srep04680
- [4] A.K. Voronina and G.P. Arapidi Front. Microbiol., 2024, doi: 10.3389/fmicb.2024.1371717
- [5] N.S. Taylor et al. J. Infect. Dis., 2003, doi: 10.1086/379837
- [6] N. Charoenlap et al. Infect. Immun., 2012, doi: 10.1128/iai.05477-11
- [7] S. Aoki et al. mSphere, 2023, doi: 10.1128/msphere.00403-23

Влияние химиотерапии на пептидный паттерн лигандов главного комплекса гистосовместимости I класса злокачественных опухолей яичников

А.В. Петрова, А.А. Кузнецов, П.В. Шнайдер, В.О. Шендер, Г.П. Арапиди

Лаборатория системной биологии

Аденокарцинома яичника включает в себя гетерогенную группу злокачественных новообразований и входит в пятерку основных причин смертности среди онкологических заболеваний. Данное заболевание в 85% случаев диагностируется на поздних стадиях (III или IV) и прогрессирует с высокой скоростью: рецидив возникает уже через 6-12 месяцев после курса терапии, как правило, поражая и второй яичник с последующим возникновением резистентности. Поэтому поиск новых подходов к лечению аденокарциномы яичника остается актуальной задачей современной онкологии [1]. Иммуноterapia – одна из новейших и активно развивающихся направлений в онкотерапии, принцип которой заключается в стимуляции иммунной системы для борьбы с заболеванием, используя собственные ресурсы. Презентация антигена с участием белков главного комплекса гистосовместимости первого класса (Major histocompatibility complex I, MHC I) является одним из ключевых процессов функционирования иммунной системы человека. MHC I позволяет идентифицировать клетки, экспрессирующие мутантные белки. В нашей лаборатории была показана взаимосвязь изменения сплайсинга в опухолевых клетках в ответ на использование химиотерапевтических препаратов платины и таксанов. Причем различные препараты вызывали в общем достаточно схожие изменения сплайсинга [2,3]. У нас возникла гипотеза о том, что в результате изменения сплайсинга, вызванного применением терапевтических препаратов, через MHC I клетки могут начать презентировать новые антигены.

Целью настоящей работы являлся поиск потенциальных мишеней для иммунотерапии аденокарциномы яичника, появляющиеся после химиотерапии. Предварительно была разработана и улучшена методика выделения иммунопептидома из клеточного и опухолевого материала, которая позволила идентифицировать со 100 млн клеток примерно 1000 уникальных пептидных последовательностей лигандов MHC I, более 80% которых являются аффинным к характерным аллелям MHC I по данным биоинформатического анализа. Среди идентифицированных пептидов иммунопептидома аденокарциномы яичника обнаружено 70 пептидов-фрагментов опухолевых специфичных тестикулярных антигенов (Cancer/Testis Antigens, CTA) белков, которые являются потенциальными мишенями для иммунотерапии.

Литература:

1. Baldwin L.A. et al. Ten-Year Relative Survival for Epithelial Ovarian Cancer // *Obstetrics & Gynecology*. 2012. Vol. 120, № 3. P. 612–618.
2. Pavlyukov M.S. et al. Apoptotic Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Malignancy of Glioblastoma Via Intercellular Transfer of Splicing Factors // *Cancer Cell*. 2018. Vol. 34, № 1. P. 119-135.e10.
3. Anufrieva K.S. et al. Therapy-induced stress response is associated with downregulation of pre-mRNA splicing in cancer cells // *Genome Med*. 2018. Vol. 10, № 1. P. 49.

Изучение опухоль-супрессирующей популяции фибробластов и ее влияния на опухолевые клетки

А.Н. Казакова, К.С. Ануфриева, М.М. Лукина, О.М. Иванова, П.В. Шнайдер, В.О Шендер, Г.П. Арапиди

Лаборатория системной биологии

Самыми высоко представленными клетками опухолевого микроокружения являются опухоль-ассоциированные фибробласты (ОАФ) [1]. В последние два десятилетия появляется все больше доказательств того, что ОАФ обладают широким спектром онкогенных функций и вносят свой вклад на каждом этапе формирования опухоли, включая ее инициирование, прогрессию и метастазирование. Сложность в изучении ОАФ возникает из-за одновременного существования нескольких популяций ОАФ, характеризующихся разными профилями экспрессии генов, функциональными отличиями и пространственным разделением в микроокружении опухоли. Комплексное изучение каждой популяции, в том числе маркеров, механизмов активации и функциональных особенностей, может способствовать существенному прогрессу в методах, используемых для диагностики, лечения и мониторинга опухолей. Традиционно химиотерапевтические методы лечения разрабатываются для воздействия, в первую очередь, на опухолевые клетки, однако недавние исследования показали, что таргетная терапия на основе «анти-ОАФ» подхода также может быть эффективна для лечения онкологических заболеваний [2]. Однако, текущие стратегии терапии нацелены на истощения всех ОАФ, и не учитывают их гетерогенную природу. Отдельные популяции ОАФ могут проявлять как опухолестимулирующие, так и опухолесупрессивные свойства. Перепрограммирование фенотипа ОАФ к единой противоопухолевой популяции представляется более эффективной стратегией. Тем не менее, разработка таких терапевтических агентов требует четкого понимания того, какие популяции ОАФ в опухолях обладают исключительно опухолесупрессивными свойствами.

На основании всестороннего изучения особенностей транскриптома ОАФ была идентифицирована популяция, которая вызывает подавление роста опухоли. Анализ данных секвенирования одиночных клеток опухоли яичника выявил, что данная популяция связана с ответом на интерферон. Благодаря анализу данных “The cancer genome atlas” мы показали, что высокая представленность данной популяции в опухолевой ткани коррелирует с хорошим прогнозом пациентов. Также мы показали, что экспрессия гена *CCL11* характерна только для данной популяции фибробластов. Опухольсупрессирующая популяция была получена из первичной культуры дермальных фибробластов с помощью добавления IFN γ и сверхэкспрессии *CCL11*. Секвенирование матричной РНК подтвердило повышение экспрессии основных генов-маркеров популяции в созданной клеточной линии фибробластов. Было показано, что секретом полученных фибробластов способствует пониженной устойчивости опухолевых клеток яичника к цисплатину, а также пониженной скорости миграции.

Литература:

1. Ping Q, Yan R, Cheng X, Wang W, Zhong Y, Hou Z, et al. Cancer-associated fibroblasts: overview, progress, challenges, and directions. *Cancer Gene Ther.* 2021;28: 984–999.
2. Zhang C, Fei Y, Wang H, Hu S, Liu C, Hu R, et al. CAFs orchestrates tumor immune microenvironment-A new target in cancer therapy? *Front Pharmacol.* 2023;14: 1113378.

Биоинформатический поиск молекулярных механизмов приобретения резистентности опухолевых клеток к цисплатину в результате воздействия секретома, индуцированного терапией

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

Лаборатория системной биологии

Стандартом противоопухолевой химиотерапии при аденокарциноме яичника является использование цисплатина, который повреждает ДНК опухолевых клеток, приводя к их гибели. Однако часто вследствие активации процессов репарации и изменения регуляции клеточного цикла опухоль становится резистентной к препарату [1,2]. Ранее в ряде работ было показано, что апоптотические опухолевые клетки способны секретировать внеклеточные везикулы, которые при инкубации с соответствующими реципиентными клетками приводят к приобретению последними резистентности к химиотерапии [3–5].

В данной работе на модели аденокарциномы яичника мы исследовали изменения транскриптома и обуславливающие их механизмы в реципиентных клетках под воздействием везикул от донорных клеток, обработанных цисплатином. Было показано, что секретом, индуцируемый терапией (therapy-induced secretome, TIS), способствует приобретению резистентности у опухолевых клеток линий SKOV3 и A2780. Также в исследование были взяты клеточные линии hTERT FT282, HaCaT и фибробласты, TIS которых не стимулировал приобретение резистентности; эффект не наблюдался и при воздействии TIS от SKOV3 на hTERT FT282. Анализ данных транскриптомов клеточных линий, инкубированных с TIS или контрольными секретоматами, показал, что в клетках линий SKOV3 и A2780 активируются процессы сплайсинга РНК, регуляции клеточного цикла и репарации ДНК. В клетках линии hTERT FT282 обработка TIS приводит к активации провоспалительных путей, а для HaCaT и фибробластов клеточные процессы значимо не меняются.

Поиск молекулярных механизмов, запускаемых TIS, был выполнен при помощи определения наиболее коррелирующих по данным экспрессии транскрипционных факторов. Затем по данным белок-белковых взаимодействий, взятых из базы данных OncoboxPD, был построен граф сигнальных каскадов [6]. При помощи анализа протеомных данных были определены белки, которые присутствуют только в TIS и могут влиять на изменения транскриптома реципиентных клеток. По результатам биоинформатического анализа было показано, что транскрипционные факторы FOXM1, MYBL2 и STAT3 могут влиять на изменения транскриптома в SKOV3 после обработки TIS.

Литература:

- [1] G. Damia, M. Broggin. Cancers 2019, doi:10.3390/cancers11010119
- [2] L. Yang et al. Oncology Reports 2022, doi:10.3892/or.2022.8293
- [3] M.S. Pavlyukov et al. Cancer Cell 2018, doi:10.1016/j.ccell.2018.05.012
- [4] A.C. Obenauf et al. Nature 2015, doi:10.1038/nature14336
- [5] P. Samuel et al. Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B Biological sciences 2018, doi:10.1098/rstb.2017.0065
- [6] M.A. Zolotovskaia et al. Computational and Structural Biotechnology Journal 2022, doi:10.1016/j.csbj.2022.05.006

Пептидные фрагменты белков микробиоты в кровотоке пациентов с различными заболеваниями желудочно-кишечного тракта

В. А. Косс, Г. П. Арапиди

Лаборатория системной биологии

Взаимодействие человека с его микробиомом изучают на разных уровнях: от организменного до молекулярного. Последний все сильнее интересует исследователей, ведь он лежит в основе координации организма и симбионтов. Мы считаем, что в качестве главного звена во взаимосвязи бактерий и хозяина большой интерес представляют продукты деградации белков микробиоты – бактериальные пептиды – так как благодаря своим малым размерам они могут проникать сквозь стенку желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) в кровоток человека [1]. Далее, распространяясь по разным тканям и органам, пептиды могут влиять на физиологические функции организма [2]. Это позволяет нам рассматривать микробиомные пептиды как потенциальные биоактивные молекулы, а также индикаторы или прогностические маркеры течения заболеваний.

В рамках нашего исследования были проанализированы 123 образца плазмы от здоровых доноров, пациентов с язвенным колитом, болезнью Крона, синдромом раздраженного кишечника или колоректальным раком. Анализ пептидов, выделенных по ранее описанной методике, был проведен методом ВЭЖХ-МС/МС на масс-спектрометре Q Exactive HF-X Hybrid Quadrupole-Orbitrap и соотнесен с базой данных аннотированных белков микробиоты человека согласно Human Microbiome Project.

Были отмечены пептиды с наибольшей повторностью и суммарным количеством идентификаций по масс-спектрам для каждой из групп пациентов. Среди них выявлены как пептиды из консервативных белков-предшественников разных бактерий, так и более специфичные, относящиеся к конкретному таксономическому уровню. Например, на основании масс-спектров образцов пациентов с колоректальным раком были идентифицированы фрагменты FAD-зависимой оксидоредуктазы бактерии *Delftia acidovorans* — этот белок в литературе сейчас предлагается использовать как новый биомаркер для данной онкологии.

Другим подходом к анализу полученных данных масс-спектрометрии было рассмотрение таксономических уровней бактерий, чьи пептидные фрагменты белков были обнаружены в плазме крови пациентов. Так было показано, что более 200 разных таксонов микроорганизмов являются абсолютно уникальными для пациентов с патологиями ЖКТ, и 32 рода бактерий соответствуют более представленным родами у этих пациентов по сравнению со здоровыми донорами.

Анализ литературы показал, что большинство обнаруженных уникальных пептидов или бактерий не просто воспроизводимы в повторах среди пациентов с заболеваниями, но и действительно ассоциированы с механизмами патогенеза. Тем временем те идентифицированные пептиды и бактерии, для которых пока нет описанной связи с состояниями здоровья ЖКТ, могут стать темой для дальнейшего изучения с целью уточнения путей взаимодействия микробиоты и человека.

Литература:

[1] Georgij P. Arapidi et al. bioRxiv; doi.org/10.1101/2023.04.11.536435

[2] Fernández-Tomé et al. Nutrients 2019, 11(11), 2605; doi.org/10.3390/nu11112605

Создание модели для изучения связывания ДНК-связывающего домена TP63 с альтернативными сайтами связывания TP63

А. С. Суздаленко, Р. И. Султанов, Г.П. Арапиди

Лаборатория системной биологии

Транскрипционный фактор TP63 – белок семейства p53, играющий важную роль в развитии онкологических заболеваний. В работах других исследовательских групп было предсказано, что TP63 может связываться с семью ДНК-мотивами [2]. Однако функциональная роль такого широкого спектра мотивов остается неясной. Ранее нашей группой было показано на примере рака предстательной железы, что E3-убиквитин-лигаза TRIM29 влияет на активность TP63 как транскрипционного фактора [1]. Но молекулярные механизмы в основе этой регуляции остаются не до конца изученными. Нами было выдвинуто предположение, что TRIM29 может стабилизировать комплекс TP63 с минорными ДНК-мотивами связывания.

Для проверки нашей гипотезы необходимо проанализировать связывание TP63 с его основным и минорными ДНК-мотивами при различных условиях *in vitro*. Для этого была получена генноинженерная конструкция, кодирующая ДНК-связывающий домен TP63 (DNA-binding domain, DBD), находящийся в одной рамке считывания с пептидом 6His-tag. Проводилась индукция экспрессии гена, кодирующего рекомбинантный белок, в штамме *Escherichia Coli* BL21 с использованием изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ). Рекомбинантный белок DBD-TP63-6His очищали с использованием иммобилизованной металлоаффинной хроматографии. Был получен раствор рекомбинантного DBD-TP63-6His концентрации 4 мкг/мкл. Для проверки функциональности DBD-TP63-6xHis был проведен эксперимент по электрофоретической задержке в геле (Electrophoretic mobility shift assay, EMSA, основан на разной подвижности свободной и связанной с белком ДНК) с олигонуклеотидами, содержащими основной или минорный мотив связывания TP63. Выяснили, что DBD-TP63 связывается со своим основным ДНК-мотивом, но при таких же условиях не связывается с минорным мотивом.

Подводя итоги, в рамках данной работы была выделен и очищен белок DBD-TP63-6xHis. При помощи EMSA было показано, что ДНК-связывающий домен TP63 связывается со своим основным мотивом. В будущем мы планируем проверить связывание ДНК-связывающего домена TP63 с остальными предсказанными ДНК-мотивами. Полученные материалы позволят пролить свет на факторы, регулирующие ДНК-связывающую активность TP63, что в дальнейшем может быть полезно для разработки новых типов противоопухолевых терапий.

Литература:

[1] R. Sultanov. Epigenetics Chromatin 2024, doi: 10.1186/s13072-024-00529-7

[2] K. Riege. Elife 2020, doi: 10.7554/eLife.63266

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

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

Лаборатория системной биологии

Энхансеры представляют собой небольшие некодирующие последовательности ДНК, которые регулируют транскрипцию с промотора гена или группы генов. Транскрипционные факторы (ТФ) связываются с энхансерами через специфические последовательности ДНК (мотивы), обладающие высокой аффинностью к ТФ. Различные заболевания оказываются связанными с нарушением функции энхансеров из-за генетических вариаций внутри энхансеров или эпигенетических модификаций. Поэтому целью данной работы стал поиск однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), приводящих к появлению *de novo* сайтов связывания транскрипционных факторов (ССТФ) и *de novo* энхансеров и их целевых генов.

В ходе работы нам удалось найти мутации клеточной линии K562 (ENCODE Project), которые потенциально могут приводить к формированию мотивов связывания ТФ. В данных полногеномного секвенирования (WGS) клеточной линии K562 было найдено 3 451 952 SNP. С использованием базы данных HOCOMO, содержащей мотивы связывания ТФ с ДНК, были определены мутации, которые потенциально могут приводить к появлению ССТФ. С использованием негативного биномиального распределения мы определили 1154 SNP (суммарно для всех 59 проанализированных ТФ), обладающих значимым аллельным дисбалансом по данным ChIP-Seq на соответствующий ТФ (AI-SNP). Также были проанализированы данные DNase-Seq и ChIP-Seq на гистоновые модификации H3K27ac/H3K4me1, характерные для активных энхансеров, для изучения влияния AI-SNP на эпигенетический ландшафт K562. Оказалось, что в сайтах связывания пионерных ТФ (то есть ТФ, которые могут связываться со своими мотивами на закрытом хроматине) чаще встречаются SNP с аллельным дисбалансом в данных DNase-Seq. Для поиска целевых генов предполагаемых *de novo* энхансеров был проведен анализ пространственной структуры хроматина (Hi-C) а также использовались данные ассоциаций между SNP и экспрессией генов проекта GTEx. Таким образом, мы определили AI-SNP (rs12623363), который приводит к возникновению ССТФ GATA2 и потенциально может влиять на экспрессию прото-онкогена *SERTAD2*. Был определен AI-SNP (rs3748136), связанный с повышением экспрессии длинной некодирующей РНК RP11-10A14.5, для которой показано участие в регуляции метастазирования опухоли. При анализе данных каталога NHGRI-EBI GWAS были определены AI-SNP (rs10864368, rs2074441, rs10445034), приводящие к возникновению ССТФ GATA2, TFAP4, E2F1 и ассоциированные с числом лейкоцитов в крови.

Подводя итоги, в результате работы были найдены мутации, приводящие к появлению *de novo* ССТФ, проанализировано их влияние на эпигеном и пространственное взаимодействие с генами. Были определены наиболее перспективные для дальнейшего исследования SNP, потенциально обладающие функциональным эффектом.

Представленность альтернативных изоформ РНК гена SLC4A11 в эндотелии роговицы здоровых людей и пациентов с эндотелиальной дистрофией роговицы Фукса

Ц.А. Ковалева, Е.С. Котова, О.П. Антонова, Б.Е. Малыгин, И.С. Ткаченко, Е.И. Шарова, Л.О. Скородумова

Лаборатория молекулярной генетики человека

Первичная дистрофия эндотелия роговицы Фукса (ДФ) является наследственным заболеванием глаза, характеризующимся снижением числа клеток эндотелия роговицы, поддерживающих водный баланс стромы роговицы. Часть случаев ДФ связана с вариантами в гене белка SLC4A11, который является ионным транспортером и может вносить вклад в поддержание водного баланса стромы роговицы. Большое количество работ, посвященных роли белка SLC4A11 в патогенезе ДФ, было основано на предположении, что в эндотелии преимущественно образуется РНК изоформа 2, которая является одной из трех основных изоформ SLC4A11. В одной из последних работ было показано, что основной формой белка SLC4A11 в эндотелии роговицы является укороченный с N-конца полипептид (далее-v2short), образование которого, по-видимому, является результатом старта трансляции на РНК-изоформе 2 не с первого, а с третьего инициаторного-кодона, находящегося в той же рамке считывания, что и первый. Целью нашей работы стал анализ представленности альтернативных изоформ РНК гена SLC4A11 в эндотелии роговицы здоровых людей и пациентов с ДФ.

Для получения полного набора возможных транскриптов SLC4A11, мы объединили в файле с транскриптомной аннотацией (gtf-файл) изоформы РНК из проекта GENCODE и базы данных RefSeq. Полученный файл был дополнен изоформами, собранными de novo на основе транскриптомов эндотелия роговицы. Далее была проведена оценка представленности изоформ SLC4A11, в транскриптомах эндотелия роговиц здоровых доноров и больных ДФ, полученных в нашей лаборатории и опубликованных другими авторами. Наиболее представленной изоформой оказалась изоформа 3, второй по представленности – изоформа 6 (NM_001400277), которая не соответствовала ни одной из трех основных изоформ SLC4A11. Третьей по представленности оказалась некодирующая изоформа NR_174471. Высокая представленность изоформы 6 интересна тем, что она кодирует v2short, но при этом его старт трансляции является первым АТG-кодоном данной мРНК. Представленность изоформ 1 и 2 была оценена, как довольно низкая.

Также мы провели анализ 5'-концевых последовательностей транскриптов, образующихся в эндотелии роговицы 5 доноров и 5 пациентов с ДФ, методом 5'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends). Продукты 5'RACE были разделены электрофоретически. Для одного из образцов две наиболее яркие полосы были вырезаны из геля и ДНК из них секвенирована по Сэнгеру. Они соответствовали 5'-концевому участку изоформы 6 и некодирующей изоформы NR_174471. Изоформа 6 была наиболее представленной в большинстве образцов.

Таким образом, мы получили свидетельства преимущественной экспрессии 3 и 6 изоформ РНК SLC4A11 в эндотелии роговицы и довольно низкой представленности в нем изоформы 2.

In silico предсказание и анализ новых проникающих пептидов

М.Ю. Серебrenникова, Д.И. Мальцев, Э.В. Бочаров, Е.Н. Графская, В.Н. Лазарев

Лаборатория генной инженерии

Проникающие пептиды – это уникальные молекулы, способные автономно преодолевать различные биохимические барьеры, не нарушая их целостности [1]. Их потенциал в диагностике заболеваний и лечении разнообразных патологий определяет их как ключевой элемент современной биомедицины. Использование машинного обучения, благодаря способности быстро анализировать большие объемы данных и выявлять скрытые закономерности, создает новые перспективы для разработки ПП.

В рамках данного исследования был разработан прогностический алгоритм TripleEP-CPP (Triple Ensemble Prediction of Cell-Penetrating Peptides) на основе стэкинга моделей k-ближайших соседей, градиентного бустинга и случайного леса. Для процедуры обучения были подготовлены два независимых набора данных, включающие 1168 проникающих и 1212 непроникающих пептидных последовательностей, извлеченных из базы данных ПП CPPsite2.0 [2] и открытой базы данных Swiss-prot [3]. Для каждой из них были рассчитаны молекулярные дескрипторы, представление об относительной важности которых получено методом Лассо Тишибрани. Основываясь на результатах анализа, было установлено, что наибольшее влияние на определение различий между двумя классами оказывают 20 численных параметров. На следующем шаге с помощью десятикратной перекрестной проверки были протестированы наиболее значимые подмножества параметров выбранных классификаторов. В результате путем ансамблирования оптимизированных моделей был разработан прогностический алгоритм, успешно определяющий проникающие пептиды на валидационной выборке.

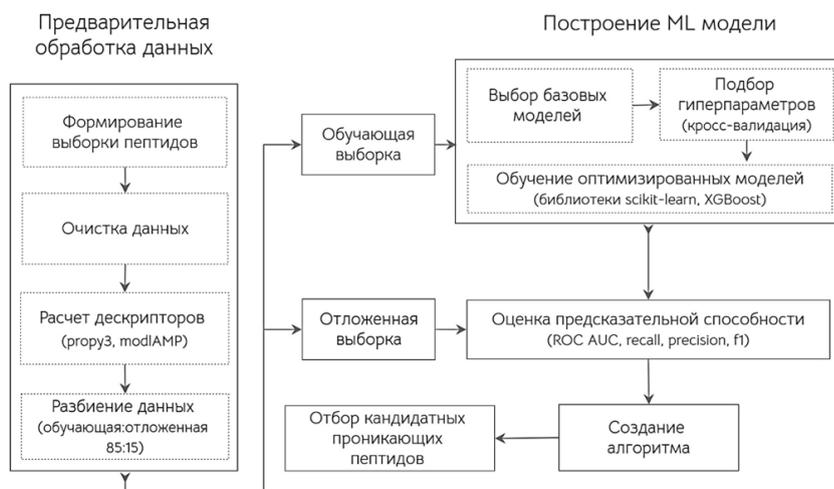


Рис. 1. Схема построения прогностического алгоритма, отражающая основные этапы отбора и предварительной обработки данных, выбора и обучения модели, а также оценки результатов.

С его помощью на независимом тестовом наборе данных, состоящем из некоторых доступных протеомов и пептидомов различных организмов, выявлены потенциальные проникающие пептиды, которые затем были химически синтезированы с применением твердофазного метода и подвергнуты оценке цитотоксичности и проникающей активности. В ходе исследования был обнаружен новый низкотоксичный проникающий в клетку пептид CpRE12 (SYQWQIFYRSLDGSGAKE) из протеома *Rhopilema esculentum*. Последующий ЯМР-анализ показал, что N-конец пептида формирует альфа-спираль (до двух витков), а C-конец не имеет упорядоченной структуры.

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

Литература:

- [1] G. Guidotti et al. Trends in Pharmacological Sciences 2017, doi:10.1016/j.tips.2017.01.003
- [2] K. Kardani and A. Bolhassani. Journal of Molecular Biology 2021, doi:10.1016/j.jmb.2020.11.002
- [3] A. Bairoch and B. Woeckmann. Nucleic Acids Research 1991, doi:10.1093/nar/19.suppl.2247

Разработка системы получения мутантных антимикробных пептидов

Ю.С. Карпова, Е.Н. Графская, В.А. Манувера, В.Н. Лазарев

Лаборатория генной инженерии

Антимикробные пептиды (АМП) - компоненты врожденного иммунитета многих организмов, обладают цитотоксической активностью в отношении широкого спектра микроорганизмов, а также участвуют в модуляции иммунного ответа. На сегодняшний день для множества описанных пептидов из природных источников показано потенциальное применение в медицине. Разработка синтетических АМП позволяет вносить модификации для повышения стабильности и снижения токсичности пептидов, создавая тем самым соединения с заданными свойствами, необходимыми для эффективной борьбы с конкретными патогенами.

В данном исследовании мы применили метод контролируемого мутагенеза с целью разработки новых антимикробных соединений-аналогов известных АМП. На этапе разработки системы отбора наиболее эффективных соединений была создана методика получения измененных антимикробных пептидов в гетерологичных системах экспрессии грам-положительных и грам-отрицательных бактерий (*B. subtilis* и *E. coli*). Для них сконструировали плазмидные вектора, экспрессирующие известные АМП (мелиттин, цекропин, апидаецин, Nm-AMP2 и Nm-AMP4 [1]) на основе челночного вектора рНТ43 и вектора рЕТ-min (экспрессионная плаزمида серии рЕТ). Изменения в кодирующие последовательности вносили с использованием dITP и 5-Br-dUTP, что позволило получить библиотеку векторов, экспрессирующих мутантные варианты выбранных антимикробных пептидов. В виду высокой токсичности полученных соединений по отношению к клеткам-продуцентам для отбора вариантов, экспрессирующих наиболее активные пептиды, нами была разработана методика негативной селекции. В результате были получены бактериальные штаммы-продуценты АМП, рост которых эффективно подавляется при индукции.

Кроме того, нами был предложен способ внесения изменений в структуру АМП с использованием различных белков, участвующих в посттрансляционных модификациях лантибиотиков. Лантибиотики – это антимикробные пептиды со структурными элементами, значительно повышающими их антимикробную активность и стабильность. Нами на основе интегративной плазмиды рMUTIN4 был получен вектор, содержащий гены селективной дегидратации nisB, циклазу nisC, липопротеин nisI и транспортер nisT. Рекомбинатную протеиназу nisP, ответственную за финальную стадию созревания лантибиотика, а именно отщепление сигнального пептида, получали отдельно в системе *E. coli*.

Литература:

[1] E.N. Grafskaja, et al. Materials & Design, 2022. doi: 10.1016/j.matdes.2022.111364.

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

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

Лаборатория генной инженерии

Моноклональные антитела широко применяются для диагностики, вирусной нейтрализации при разработке передовых методов лечения, а также в исследовательских целях. Для связывания антигена достаточно использовать одноцепочечные минимоноклональные антитела (scFv-антитела), содержащие переменные фрагменты легкой и тяжелой цепи полноразмерного антитела. Целью данной работы является получить двуцепочечные минимоноклональные антитела без линкера и одноцепочечные минимоноклональные антитела со Strep-tag последовательностью в качестве линкера для исследования их свойств на примере антител, специфичных к RBD-домену Spike-белка вируса SARS-CoV2.

В ходе работы получены генетические конструкции, кодирующие одноцепочечные минимоноклональные антитела на основе описанных в литературе полноразмерных антител REGN10987 и SARS2-38, оценен уровень накопления рекомбинантных белков в *E.coli* и в клеточной линии HEK293, отработана методика выделения минимоноклональных антител из бактериальной культуры. Для получения scFv-антител без линкера два фрагмента ДНК, кодирующие переменные домены легкой и тяжелой цепи антитела, были объединены в бицистронный оперон в составе вектора на основе плазмиды серии pET. Аналогичным вектор использовался и для получения конструкции, кодирующей минимоноклональные антитела с последовательностью Strep-tag-(G3S)3-Strep-tag в качестве линкера. Полученными плазмидами трансформировали штамм Rosetta2-DE3 *E.coli*. Далее были подобраны условия культивирования бактерий, обеспечивающие максимальную наработку рекомбинантных миниантител. Оба рекомбинантных белка обнаружены в нерастворимой фракции клеточной культуры *E.coli*. После выделения методом аффинной хроматографии scFv-антитела были переведены в растворимую фракцию путем диализа. Кроме того, были собраны две генетические конструкции на основе вектора pcDNA для получения scFv с последовательностью Strep-tag-(G3S)3-Strep-tag в качестве линкера в клетках человека, а также три генетические конструкции, кодирующие миниантитела с последовательностью Strep-tag-(G3S)3-Strep-tag, на основе последовательности REGN10987 и плазмидного вектора pET22b(+) с исходным сигнальным пептидом pelB и сигнальными пептидами OmpA и Pho. Оценка их функциональности была проведена с использованием иммуноферментного анализа (ИФА); для минимоноклональных антител, линкер которых содержит StrepTag, была проведена дополнительная оценка с применением конъюгата белка стрептавидина и пероксидазы хрена.

Устройство для выращивания сердечной ткани из прогениторных клеток

В. Ю. Столяров, К. А. Прусаков, О. С. Лебедева, С. А. Наумов, А. П. Каныгин, Р. И. Шакуров, Д. В. Басманов.

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

В последние 20 лет в биомедицине всё большую популярность получают так называемые системы “Органа-на-чипе” [1]. Они способны имитировать клеточные свойства органа во многих аспектах, в частности его межтканевые интерфейсы, а также механические и физиологические реакции. В данной работе рассматривается частный случай этих систем - “Сердце-на-чипе”, представляющее собой выращенную из прогениторных клеток сердечную ткань.

Руководствуясь наиболее актуальными результатами международных исследований [2, 3], были разработаны электроды, следующие принципу модульности, и подложки для выращивания кардиомиоцитов. Предполагается, что электроды и подложки в последующем станут основой устройства для выращивания сердечной ткани. Его планируется сделать биосовместимым, стерильным, с возможностью помещения в CO₂-инкубатор и визуального наблюдения за ростом клеток. Будет обеспечена возможность варьировать различные параметры культивирования клеток, в частности форму и материал электрода, форму, частоту и амплитуду подаваемого на клетки напряжения.

В будущем на полученном устройстве планируется вырастить сердечную ткань и изучить зависимости ее строения, состава и топологии от параметров культивирования.

Предполагается, что устройство станет востребованным для моделирования сердечных заболеваний, исследования влияния лекарственных средств, а также в регенеративной клеточной терапии.

Литература:

- [1] Wu Q, Liu J, Wang X, Feng L, Wu J, Zhu X, Wen W, Gong X. Organ-on-a-chip: recent breakthroughs and future prospects. Biomed Eng Online. 2020 Feb 12;19(1):9. doi: 10.1186/s12938-020-0752-0. PMID: 32050989; PMCID: PMC7017614.
- [2] Tandon N, Cannizzaro C, Chao PH, Maidhof R, Marsano A, Au HT, Radisic M, Vunjak-Novakovic G. Electrical stimulation systems for cardiac tissue engineering. Nat Protoc. 2009;4(2):155-73. doi: 10.1038/nprot.2008.183. PMID: 19180087; PMCID: PMC2775058.
- [3] Lluçia-Valldeperas A, Bragós R, Bayés-Genís A. Simultaneous Electrical and Mechanical Stimulation to Enhance Cells' Cardiomyogenic Potential. J Vis Exp. 2019 Jan 18;(143). doi: 10.3791/58934. PMID: 30735196.

Разработка микрофлюидной системы “кишечник-на-чипе”

Е.А. Горланкин¹, Л.Д. Беликова², К.А. Прусаков¹, А.В. Еремеев³, О.С. Лебедева², К.Г. Алдаров¹, М.Н. Бажутов¹, Д.В. Басманов¹

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

²Лаборатория клеточной биологии ФНКЦ ФХМ им. Лопухина ФМБА России

³Лаборатория трансляционной биомедицины ФНКЦ ФХМ им. Лопухина ФМБА России

В настоящее время основными моделями для тестирования лекарственных препаратов в доклинических испытаниях и для исследования течения заболеваний, являются животные модели и 2D-модели *in vitro*. Основной проблемой таких моделей является низкая репрезентативность получаемых результатов [1], что дополняется трудоемкостью исследований. Этим объясняется интерес к разработке 3D-моделей [2], в частности “органов-на-чипе”. Такие устройства могут повторять клеточные, физические, биохимические и геометрические особенности, позволяют проводить исследования с получением изображений высокого разрешения в реальном времени.

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

На первом этапе создали микроструктуру из полидиметилсилаксана (ПДМС). На втором этапе изготовили корпус для подключения ее к системе перфузии. Далее предстоит иммобилизовать стволовые клетки внутри микроканалов. Полимерную структуру покрывали белковым матриксом для адгезии клеток. Структура из ПДМС изготавливалась методом “мягкой” литографии путем литья полимера на кремниевую мастер-форму, получаемую с помощью методов оптической фотолитографии.

Были проведены эксперименты по иммобилизации клеток рака молочной железы мыши в структуре. Для этого поверхность каналов модифицировали при помощи крысиного коллагена (5 мг/мл) и экстрацеллюлярного матрикса. Далее в систему вводились клетки, которые инкубировались в условиях наличия и отсутствия потока жидкости в системе. В первом случае объема среды оказалось недостаточно для осаждения клеток. Во втором: прокачка осуществлялась в замкнутом объеме жидкости перистальтическим насосом. В этом случае целевая структура заполнилась клетками, но лишь малая часть осела в криптах.

По результатам проделанной работы можно сделать вывод, что выбранная модель микрофлюидного устройства является подходящей для работы с культурами клеток с использованием оптической микроскопии, однако, предстоит подобрать лучшие параметры генерации потока и организацию системы каналов.

Литература:

[1] M. Verhulsel et al. Lab Chip 2021, doi: 10.1039/D0LC00672F

[2] A.V. Eremeev et al. Cells 2021, doi: 10.3390/cells10071790

[3] M. Nikolaev et al. Nature 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2724-8



Короткоцепочечные жирные кислоты - маркеры состояния кишечной микробиоты

Л.В. Кузьменко, Я.Д. Шанский, Н.И. Хромых, Ю.А. Беспятых

ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, лаборатория молекулярной медицины, Москва, Россия

Короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), продуцируемые кишечной микробиотой человека, являются важными маркерами дисбиоза кишечника. Перспективным методом лечения кишечного дисбиоза является трансплантация фекальной микробиоты (ТФМ) здорового донора реципиенту.

Цель исследования – сравнение микробиологического профиля и содержания КЦЖК в образцах кала реципиентов и доноров ТФМ. Объект исследования – образцы кала реципиентов с нарушениями микробиоты кишечника ($n=22$) и здоровых добровольцев ($n=5$).

Качественный и количественный анализ КЦЖК после их кислотной экстракции из кала проводили методом газожидкостной хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием на газовом хроматографе «Кристалл 2000» («Хроматэк», Россия). Микробиологическое исследование проводили стандартными бактериологическими методами, идентификацию на анализаторах Vitek-2 (BioMerieux, Франция) и Erbascan (Erba Lachema, Чехия). Статистический анализ данных выполняли с помощью программного обеспечения Statistica 10.0 (StatSoft, 2011, США).

Результаты анализа КЦЖК показывают, что их пул в группе реципиентов снижен по сравнению с группой доноров. Исключение составляет капроновая кислота, различий в содержании которой между группами не выявлено. В группе реципиентов спектр КЦЖК сдвинут в сторону преобладания уксусной и пропионовой кислот.

В группе доноров данные микробиологических исследований соответствуют референтным значениям, что связано с условиями отбора индивидуумов в данную группу. В группе реципиентов после проведения ТФМ можно отметить: снижение доли условно-патогенных микроорганизмов (*Enterobacterales*, *Staphylococcus aureus*), повышение содержания представителей *Bifidobacterium*, *Lactobacillaceae*, *Bacteroidetes*. Некоторым реципиентам ТФМ проводилась повторно, по результатам чего наблюдались повышение содержания *Lactobacillaceae*.

Работа выполнена при финансовой поддержке АНО «Московский центр инноваций в здравоохранении» (договор № 2412-31/22).

Мониторинг *clostridioides difficile*-ассоциированной инфекции в условиях стационара

В.К. Куликова^{1,2}, А.В. Господарик¹, Н.Д. Прохорова¹, Т.Н. Калачнюк¹, Н.И.Хромых¹, Ю.А. Беспятых^{1,2}

¹ ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени Ю.М. Лопухина Федерального Медико-биологического Агентства», лаборатория молекулярной медицины, 119435, Москва, Россия

² Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева, 125047, Москва, Россия

Clostridioides difficile (*C. difficile*) - вид анаэробных спорообразующих грамположительных бактерий, является составной частью нормальной микрофлоры кишечника. *C. difficile*-ассоциированная болезнь - заболевание, развивающееся при избыточной колонизации *C. difficile*, патогенные свойства вегетативных форм которой способны продуцировать экзотоксины, вызывающие воспаления в стенке толстой кишки. Токсигенные штаммы *C. difficile* являются основными возбудителями инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) в стационаре.

Цель исследования - изучить частоту встречаемости заболеваний, вызываемых *C. difficile* у пациентов гастроэнтерологического отделения ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России в период 2021-2023 годов. Для выявления генов *C. difficile* и ее токсинов применялся метод ПЦР-РВ, дополнительно проводилось бактериологическое исследование. При выявлении бактериальной инфекции проводили анализ на С-реактивный белок (СРБ).

В исследование было включено 547 пациентов в возрасте от 19 до 88 лет (мужчин 46,6%, женщины 53,4%). По результатам ПЦР-РВ ДНК *C. difficile* была выявлена у 65 пациентов (11,9%), токсины А и В обнаружены у 32 пациентов (5,9 %). Нетоксигенные штаммы *C. difficile* чаще детектировались у мужчин (55 %) в возрасте до 40 лет. Токсигенные штаммы *C. difficile* с одинаковой частотой встречались у мужчин и женщин в возрасте до 40 лет.

При проведении анализа на СРБ было выявлено, что воспалительные процессы чаще развиваются у пациентов старше 40 лет. Превалирующее заболевание с высоким показателем СРБ - А0.47 энтероколит, вызванный *C. difficile* (токсигенный штамм), в группе с нетоксигенным штаммом - диагноз К 51.0 язвенный колит. У всех пациентов наблюдались выраженные нарушения баланса микробиоты согласно развернутому бактериологическому анализу.

В результате трехлетнего мониторинга было установлено увеличение количества пациентов с *C. difficile* с 6,6% до 7,9%. Частота обнаружения токсигенных штаммов *C. difficile* также увеличилась с 5,2% до 7,9%. Таким образом очевидно, что необходимо проводить профилактические манипуляции для уменьшения факторов риска развития *C. difficile*-ассоциированной инфекции.



Исследование модификаций тимидина бактериофагов, паразитирующих на бактериях *Acinetobacter*

А.А. Сильвестрова, Д.А. Широков, С.И. Ковальчук, В.В. Бабенко

Лаборатория геномных исследований и вычислительной биологии.

ДНК бактериофагов обогащена модифицированными нуклеотидами, которые различаются по своей химической структуре [1]. Эти модификации играют ключевую роль в защите вирусной ДНК от различных механизмов иммунитета хозяина, включая системы рестрикции-модификации, CRISPR-Cas и другие нуклеазы. Исследование химической структуры модифицированных оснований и механизмов их биосинтеза имеет большое значение для микробиологии. Это знание помогает исследователям понять, как вирусы взаимодействуют с клетками хозяина, эволюционируют, и уходят от иммунного ответа. Понимание механизмов модификации ДНК бактериофагов открывает возможности для разработки новых, более эффективных и специфичных подходов в фаготерапии, что делает бактериофаги перспективной альтернативой традиционным антибиотикам [2,3].

Ранее в нашей лаборатории был отсеквенирован уникальный геном бактериофага, паразитирующего на бактериях *Acinetobacter*. Особый интерес к этим бактериофагам обусловлен наличием нетипичных деполимераз. В рамках данного исследования осуществлялось изучение модификаций, присутствующих в геноме, с применением биоинформатических методов и масс-спектрометрии [4]. Нами было выдвинуто предположение о генах, отвечающих за образование этой модификации.

Литература:

- [1] P.Weigele and E. Raleigh *Chemical Reviews* **2016** 116 (20), 12655-12687 DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00114
- [2] H. Georjon, A. Bernheim, *Nat Rev Microbiol* 21, 686–700 2023, doi: 10.1038/s41579-023-00934-x
- [3] Y.Lee et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2018, doi: 10.1073/pnas.1714812115
- [4] Y. Zhang et al. *Exp Mol Med* 2022, doi:10.1038/s12276-022-00821-0

Оптимизация протокола приготовления TCR библиотек для профилирования репертуара Т-клеточных рецепторов

Д.Р. Уразаева^{1,2}, К.В. Сикамов^{1,2}, Н.В. Трусов^{1,3}, А.Ю. Горбачев¹

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

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

³ФГБУН “ФИЦ питания и биотехнологии”

Введение. Исследование репертуара Т-клеточных рецепторов (TCR) является одним из важных аспектов развивающихся методов диагностики и лечения различных аутоиммунных, онкологических, инфекционных и других заболеваний. В подходах приготовления TCR библиотек для секвенирования на основе РНК важным этапом является синтез кДНК, эффективность которого влияет на выявляемое разнообразие клонотипов.

Цель. Оптимизировать реакцию синтеза кДНК в лабораторном протоколе подготовки кДНК-библиотек для TCR секвенирования.

Методы. Из образцов крови здорового донора и мышей с индуцированным воспалением кишечника были выделены РВМС методом наслоения на фиколл, затем тризольным методом выделена РНК. Обратная транскрипция ставилась с помощью Mint-ревертазы. При синтезе кДНК сравнивали следующие варианты: (1) разная масса РНК матрицы на вход в реакцию, (2) синтез первой цепи кДНК с праймеров на константную часть Т-клеточного рецептора человека и мыши (α и β цепи отдельно) и с Oligo-dT праймера, (3) синтез второй цепи кДНК с использованием Template Switch Oligos (TSO) праймеров с LNA-G и без LNA-G на конце, (4) использование разных crowding агентов, повышающих локальную плотность реагентов смеси, IP-solution (“Евроген”) и полиэтиленгликоль PEG 4000 7.5%, а также без них. Методика приготовления кДНК библиотек была основана на публикации Мамедова и соавторов [1] и адаптирована для платформы секвенирования MGISEQ. В трех последовательных стадиях ПЦР вводились MGI адаптеры для секвенирования. В реакции использовались Tersus ДНК-полимераза и праймеры на константные части α и β цепей TCR генов. Синтез кДНК и приготовление библиотек из образцов человека проводилось в 2 технических повторах. Для образцов мышей были предварительно выбраны два набора компонентов из описанных выше вариантов: массы РНК по 150 и 500 нг, Oligo-dT праймер, TSO LNA-G праймер, PEG 4000 7.5%. Секвенирование проводилось на платформе MGISEQ-2000 в режиме PE-150. Обработка данных: первичная – с помощью Cutadapt, контроль качества – с использованием FastQC, выравнивание и сборка последовательностей TCR в программе MiXCR.

Результаты. По результатам обработки данных секвенирования и полученному разнообразию клонотипов TCR человека в каждом варианте были выбраны оптимальные параметры компонентов, используемых в синтезе кДНК. Для образцов мышей показана применимость выбранного протокола для профилирования Т-клеточных репертуаров.

Литература:

[1] Mamedov I. Z. [et al.]. Preparing unbiased T-cell receptor and antibody cDNA libraries for the deep next generation sequencing profiling // *Frontiers in Immunology*. 2013. (4). P. 456.

Оптимизация методики приготовления нормализованных библиотек прокариотической РНК с помощью дуплекс-специфичной нуклеазы

А.В. Ли^{1,2}, Н.В. Трусов^{1,3}, А.Ю. Горбачев¹

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

² МФТИ (НИУ)

³ ФГБУН "ФИЦ питания и биотехнологии"

РНК-секвенирование — это широко используемый подход к профилированию транскриптома. Популяция РНК преобразуется в библиотеку фрагментов кДНК с адаптерами, лигированными к одному или обоим концам. Известно, что тотальная бактериальная РНК содержит около 80-95% рибосомальной РНК (рРНК) при ее сборе во время экспоненциального роста. Следовательно, простое секвенирование тотальной РНК неэффективно, ввиду того что большинство прочтений будет отображать рРНК или транспортную РНК. Поэтому необходимо проводить процедуру нормализации кДНК, то есть повышать обнаружение более редких транскриптов матричной РНК.

Ранее в нашей лаборатории успешно применили метод нормализации, основанный на дуплекс-специфичной нуклеазе (ДСН) при транскриптомном анализе *Mycoplasma gallisepticum* [1]. ДСН — это дуплекс-специфичная нуклеаза, выделенная из гепатопанкреаса камчатского краба - термостабильная нуклеаза, обладающая специфичностью к двухцепочечной ДНК. Поскольку на данный момент нет оптимизированной методики приготовления нормализованных библиотек с помощью фермента ДСН для кДНК бактерий *E. coli*, было необходимо подобрать оптимальные условия протокола.

Для эксперимента была выделена бактериальная РНК из *E. coli* во время экспоненциального роста и обработана ДСН по трем различным протоколам, основное отличие которых было в синтезе второй цепи кДНК. Основная суть первого протокола заключается в применении особых адаптеров для одношагового лигирования для синтеза второй цепи кДНК. Во второй методике для синтеза второй цепи кДНК была использована специальная последовательность олигонуклеотидов, которая позволяет осуществить смену матрицы ввиду особых свойств Mint-ревертазы. В третьем протоколе синтез второй цепи осуществляется при совместной работе ферментов: РНКазы H и ДНК полимеразы I *E. coli* (фрагмент Кленова).

При использовании протокола с одношаговым лигированием итоговые библиотеки не были получены ввиду того, что не происходило присоединения адаптеров к фрагментам кДНК. При использовании протокола с переключением матрицы библиотеки были визуализированы с помощью электрофореза в агарозном геле и отсекужены, однако при анализе результатов оказалось, что рРНК не была удалена (процент рРНК до и после обработки ферментом ДСН составил 80-85%). Согласно результатам электрофореза и секвенирования было показано, что методика с РНКазой H и фрагментом Кленова позволяет значительно снизить процент рРНК (до 20%) по сравнению с контрольным образцом (80%).

Таким образом, был определен оптимальный протокол приготовления нормализованных библиотек для РНК-секвенирования прокариотических клеток, основанный на ферменте ДСН с использованием РНКазы H и фрагмента Кленова.

Литература:

[1] Pavel V. Mazin, Gleb Y. Fisunov, Alexey Y. Gorbachev, Kristina Y. Kapitskaya, Ilya A. Altukhov, Tatiana A. Semashko, Dmitry G. Alexeev, Vadim M. Govorun, Transcriptome analysis reveals novel regulatory mechanisms in a genome-reduced bacterium, *Nucleic Acids Research*, Volume 42, Issue 21, 1 December 2014, Pages 13254–13268.

Оптимизация протокола подготовки днк-библиотек для технологии секвенирования *mgiseq*

Семенов А.А.^{1,2}, Михайлычева М.В.^{1,2}, Авшалумов А.С.^{1,2}, Галямина М.А.^{1,2}, Уразаева Д.Р.^{1,2}, Горбачев А.Ю.^{1,2}

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

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Высокопроизводительное секвенирование давно стало одним из основных методов в биологии и медицине. Однако оно все еще остается достаточно дорогим для выполнения рутинных задач. В связи с этим существует необходимость разработки и оптимизации лабораторных протоколов с низкой себестоимостью. Основными этапами создания ДНК-библиотек, которые могут быть оптимизированы, являются: репарация концов ДНК-фрагментов, аденилирование концов (данные этапы можно объединить под единым термином ERAT (англ. End Repair and A-Tailing)), лигирование адаптеров, – служебных последовательностей, содержащих уникальные баркоды для идентификации образца и сайты отжига праймеров, амплификация.

Целью данного исследования была оптимизация лабораторного протокола подготовки ДНК-библиотек и его сравнение с существующим коммерческим протоколом MGI.

Материалы и методы исследования. После сбора информации из открытых источников и патентов коммерческих компаний были выявлены основные составляющие протокола пробоподготовки, которые затем были проверены и оптимизированы в данном исследовании. В качестве сравнения использовался коммерческий протокол от производителя (MGI Tech). Изменяемые параметры включали в себя: ГЦ-состав ДНК-фрагментов (три модельных организма), тип используемой полимеразы, количество этапов ERAT. Для оценки эффективности отдельных этапов использовались методы спектроскопии, флуориметрии и электрофореза в агарозном геле. Ключевые отличия между протоколами: проведение ERAT в один или два этапа, использование компонентов коммерческого набора MGI или собственно подобранных ферментов, используемые виды полимераз, геномный материал: *Mycoplasma hominis* (GC ~ 27%), *E.coli MG1655* (GC ~50%), *Mycobacterium smegmatis* (GC ~ 67-68%). Полученные таким образом библиотеки были отсеквенированы с помощью DNBSEQ-G400 (MGI Tech, Китай), часть в режиме парно-концевого чтения с длиной прочтения 100 нуклеотидов (PE100), часть – PE150, файлы с прочтениями в формате *.fastq были обработаны согласно стандартному алгоритму работы с геномными данными – оценка качества и фильтрация прочтений, сборка генома (пайплайн сборки Unicycler), выравнивание прочтений на собранный геном с помощью утилиты bwa mem и статистический анализ распределения однонуклеотидных замен, инсерций и делеций, выполненный с помощью разработанных скриптов с использованием языков программирования Python и R.

Результаты. По совокупности критериев (степень эффективности реакций на каждом этапе, количество и состав однонуклеотидных замен на одно прочтение, количество и состав инсерций и делеций, смещения в нуклеотидном составе, корреляции между смещениями и ГЦ-составом) были выявлены протоколы-лидеры. Был разработан пайплайн статистической обработки результатов секвенирования на предмет систематических ошибок в прочтениях.

Литература:

[1] MGI Universal DNA Library Prep Set User Manual

[2] <https://patents.google.com/patent/WO2018090373A1/en?assignee=MGI&oq=MGI+>



Профилирование Т-клеточного репертуара у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника

К.В. Сикамов^{1,2}, Д.Р. Уразаева^{1,2}, О.А. Колокольникова³, П.Л. Щербаков³, А.Ю. Горбачев¹

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

²Московский физико-технический институт (НИУ), Москва, Россия.

³АО “Группа компаний “Медси”, Москва, Россия.

Введение. Болезнь Крона (БК) и неспецифический язвенный колит (НЯК) принадлежат к группе воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК). Было показано, что у пациентов с ВЗК выделяется особая группа клонотипов Т-клеток, обладающих уникальными последовательностями в регионе CDR3 мРНК генов Т-клеточных рецепторов (TCR), что связано с аутоиммунной составляющей данных заболеваний [1]. Профилирование TCR репертуара позволит понять этиологические факторы, лежащие в основе данных заболеваний, и создать новые таргетные фармакотерапевтические препараты для их лечения.

Цель. Проанализировать профили TCR репертуаров у пациентов с диагностированной БК и НЯК, с учетом клонально расширенных клонотипов TCR в стадии обострения.

Методы. Образцы крови собраны от пациентов с дифференциально- диагностированными БК и НЯК при обострении и в ремиссии, а также от здорового контроля (ЗК). Мононуклеарные периферические клетки крови (РВМС) выделялись при помощи центрифугирования в градиенте плотности фиколла. РНК из РВМС была выделена тризольным методом. Синтез кДНК осуществлялся при помощи Mint-ревертазы. Использовалась последовательность олигонуклеотидов Template Switch Oligos (TSO), которые гибридизуются с дезоксирибонуклеотидами, добавленными вне матрицы РНК. Технические последовательности олигонуклеотидов, адаптеры для секвенирования, вводились при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР), с использованием Tersus ДНК-полимеразы и подобранных олигонуклеотидов на основе известных последовательностей константных доменов TCR генов. Секвенирование осуществлялось на платформе MGISEQ-2000 с использованием режима парноконцевых прочтений длиной 150 нуклеотидов (PE-150). Данные подвергались первичной обработке с помощью Cutadapt и контролю качества с использованием FastQC. Затем последовательности TCR выравнивались и собирались с помощью программы MiXCR. Статистический анализ и визуализация данных проводилась с использованием языка R и специализированных пакетов, таких как Immunarch.

Результаты. Для исследования клонотипов Т-клеток в образцах периферической крови человека была разработана методика для целевого обогащения кДНК последовательностями генов Т-клеточных рецепторов для технологии секвенирования MGISEQ, основанная на публикации Мамедова и соавторов [2]. Описанная методика была применена к образцам крови от пациентов с ВЗК и ЗК. Результаты показывают наиболее распространённые в общем репертуаре TCR клонотипы, идентифицированные в нескольких временных точках. Аминокислотные последовательности CDR3 региона данных клонотипов TCR проанализированы с использованием статистических методов R пакета Immunarch и VDJdb. Полученные профили TCR репертуаров были сравнены между тремя исследуемыми группами – БК, НЯК и ЗК.

Выводы. Определены и проанализированы изменения клонотипов TCR у пациентов с диагностированной БК и НЯК в стадии обострения, с учетом перепредставленных последовательностей CDR3 региона TCR.

Литература:

1. Rosati E. [et al.]. A novel unconventional T cell population enriched in Crohn’s disease // Gut. 2022.V 11 (71). С. 2194–2204.
2. Mamedov I. Z. [et al.]. Preparing unbiased T-cell receptor and antibody cDNA libraries for the deep next generation sequencing profiling // Frontiers in Immunology. 2013. (4). P. 456.

Выживание в организме хозяина: протеоеномное исследование адаптивных свойств клинических изолятов *Mycoplasma hominis*

К.В. Сикамов^{1,2}, О.В. Побегуц¹, М.А. Галямина¹, Д.Р. Уразаева^{1,2}, А.С. Авшалумов^{1,2},
М.В. Михайлычева^{1,2}, В.В. Бабенко³, И.П. Смирнов¹, А.Ю. Горбачев¹

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

²Московский физико-технический институт (НИУ), Москва, Россия.

³Лаборатория геномных исследований и вычислительной биологии ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва, Россия.

Введение. *Mycoplasma hominis* (*M.hominis*) принадлежит к классу Молликут, характеризующемуся малым размером генома, редукцией метаболических путей и транскрипционных факторов, а также отсутствием клеточной стенки. Однако, они успешно адаптируются к различным условиям организма хозяина, включая переход в состояние старвации, что приводит к значительной антибиотикорезистентности и усложняет прогнозы лечения. Изучение механизмов адаптации клинических изолятов к условиям жизни в организме хозяина может улучшить терапевтические подходы к лечению микоплазматических инфекций и связанных с ними заболеваний [1].

Цель. Провести сравнительный анализ фенотипа и протеоеномного профиля восьми клинических изолятов *M.hominis*, полученных от пациентов с урогенитальными инфекциями и лабораторного штамма Н-34.

Методы. Лабораторный штамм *M.hominis* Н-34 и восьми клинических изолятов *M.hominis* были получены из биологического материала больных урогенитальными инфекциями. Секвенирование геномов проводили на секвенаторе MGISEQ-2000 и PromethION. Для сборки геномов использовали Unicycler. Геномы аннотировали с помощью Bakta и BLAST. Протеоеномный анализ проводили с использованием системы Ultimate 3000 RSLC nano HPLC и Q Exactive Plus. Анализ протеоеномных данных выполнялся с помощью NextFlow конвейера QuantMS против базы данных на основе генома лабораторного штамма Н-34.

Результаты и обсуждение. Показано, что клинические изоляты *M.hominis* демонстрируют фенотипическое разнообразие, коррелирующее с их генетическим и протеоеномным профилями. Анализ геномных данных выявил различия в присутствии мобильных элементов, однонуклеотидные замены в генах энергетического метаболизма, генов мембранных белков и в структуре системы рестрикции-модификации I типа (RMI) между штаммами. Протеоеномный анализ выявил снижение уровня белков, связанных с клеточным делением, репликацией, трансляцией и ключевыми путями энергетического метаболизма у клинических изолятов по сравнению с лабораторным штаммом Н-34 *M.hominis*, указывая на функциональную перестройку в сторону состояния старвации. Зафиксировано изменение репертуара переменных мембранных белков у клинических изолятов, что может служить стратегией для избежания иммунной системы хозяина. Обнаружены дополнительные метилтрансферазы HsdM в клинических изолятах *M.hominis*, что указывает на их возможное участие в регуляции механизмов адаптации.

Выводы. Сравнительный протеоеномный анализ клинических изолятов *M.hominis* и лабораторного штамма Н-34 выявил две группы, связанные с фенотипом: Тк и Нк. Различия обусловлены адаптацией к стрессовым условиям организма хозяина. Результаты данной работы были опубликованы [3]. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00189.

Литература

1. Galyamina M.A. [et al.]. Analysis of the Adhesive-Invasive Potential of Two Morphologically Different Types of *Mycoplasma hominis* Colonies // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2022. V. 4 (173). С. 437–440.
2. Pobeguts O.V. [et al.]. Unraveling the adaptive strategies of *Mycoplasma hominis* through proteogenomic profiling of clinical isolates // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2024. (14).



Естественный отбор или регуляция генов: времязависимое переключение вирулентного фенотипа у адгезивно-инвазивной формы *E. coli*

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

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

²Московский физико-технический институт

Введение. Для *Escherichia coli* (*E. coli*) с адгезивно-инвазивным фенотипом (АИЕС) было показано, что пассирование на минимальной среде с пропионатом натрия (ПА) индуцирует формирование вирулентного фенотипа, тогда как пассирование с глюкозой приводит к снижению вирулентных свойств, причем это явление обратимо. Это дало возможность изучать механизм переключения фенотипа у изогенного штамма. Также показано, что в формировании вирулентного фенотипа участвует путь Эшвелла, отвечающий за метаболизм галактуронатов.

Цель. Определить временной диапазон обратимого переключения фенотипа АИЕС ZvL2 при культивировании на среде с добавлением ПА и глюкозы. Определить корреляцию уровня экспрессии генов, кодирующих белки, участвующие в пути Эшвелла с переключением фенотипа.

Материалы и методы. Изолят АИЕС ZvL2 получен от пациента с БК. Изолят культивировался на среде М9 с добавлением ПА до середины экспоненциальной фазы роста в течение пяти пассажей, после чего был переведен на среду М9 с добавлением глюкозы и также культивировался в течение пяти пассажей. Рост отслеживался по изменению оптической плотности. Для всех точек был выполнен гентамициновый тест с Сасо-2 для определения способности к адгезии-инвазии и с помощью РВ-ПЦР определены уровни транскрипции генов, кодирующих ферменты утилизации ПА, предположительно участвующие в регуляции переключения фенотипа. В качестве референса для оценки изменения уровня транскрипции был выбран ген *ggsA*.

Результаты. Гентамициновый тест показал, что вирулентные свойства ZvL2 изменяются постепенно: уже на первом пассаже на среде М9 с ПА наблюдается увеличение способности ZvL2 к адгезии-инвазии, однако максимальное значение достигается только к четвертому пассажу. При последующем культивировании ZvL2 на среде М9 с глюкозой, наблюдается постепенное снижение способности к адгезии к пятому пассажу, при этом способность к инвазии резко снижается уже во втором пассаже. По результатам РВ-ПЦР установлено, что при росте на ПА уровни транскрипции генов, кодирующих ферменты пути Эшвелла также растут постепенно и достигают максимального значения уже к третьему пассажу. При культивировании на среде с глюкозой уровни транскрипции этих генов достигают минимальных значений уже на втором пассаже.

Выводы. Показано, что увеличение уровня экспрессии генов, связанных с формированием вирулентного фенотипа ZvL2 строго коррелирует с увеличением способности к адгезии-инвазии изолята ZvL2. Обратимое постепенное увеличение (на среде М9 с ПА) и снижение (на среде М9 с глюкозой) способности к адгезии-инвазии АИЕС ZvL2 от пассажу к пассажу и сохранение вирулентного фенотипа в течение нескольких поколений свидетельствует о вкладе естественного отбора в переключение фенотипа.

Биоинформатический конвейер для автоматизированного парного соматического экзомного анализа: разработка и валидация

М. В. Бабанина^{1,3}, Н. А. Кулемин², А. Ю. Горбачев¹

¹Лаборатория протеомного анализа

²Лаборатория молекулярной генетики человека

³Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Введение. Один из важных аспектов в анализе геномных данных — это возможность воспроизведения результатов эксперимента при одинаковых условиях. Поэтому необходимо иметь единый конвейер для обработки экспериментальных данных.

Идентификация геномных вариантов опухолевой ДНК играет ключевую роль в понимании онкогенеза и определении стратегии лечения рака. С увеличением числа генетических исследований в последние десятилетия были разработаны программные пакеты, способные успешно определять различные виды геномных вариантов. Однако для получения наиболее полного списка геномных вариантов зачастую требуется объединение результатов вычислений нескольких программ. Пакет SomaticCombiner, например, предлагает решение этой задачи, объединяя списки геномных состояний, полученных различными алгоритмами, и предоставляя алгоритм оценки достоверности соматических мутаций. К сожалению, при всей диагностической полезности, файлы, генерируемые данным пакетом не совместимы с инструментами для аннотации геномных изменений при раковых заболеваниях. Исходя из этого проблема комбинации результатов работы нескольких программ-поисковиков, а также оценки достоверности найденных вариантов требует дальнейшего решения.

Цель. Разработать универсальный биоинформатический конвейер для автоматизации анализа данных парного экзомного секвенирования опухоли, включающий в себя модуль для объединения файлов формата «*.vcf», и оценки достоверности полученных вариантов.

Результаты. Был создан конвейер, состоящий из двух частей. Первая часть обрабатывает прочтения в формате fastq, проводит их очистку, выравнивание и объединение для поиска вариантов. Также собираются метрики качества секвенирования и выравнивания. Во второй части скрипта производится поиск наследственных и соматических геномных мутаций. Для обобщения результатов был создан скрипт на Python, формирующий единый vcf-файл для дальнейшей интерпретации пакетом PCGR. Поиск соматических вариантов осуществлялся с помощью программ Strelka2, Mutect2, Vardict и VarScan 2. Конвейер успешно прошел валидацию на искусственных данных, что позволило выбрать оптимальный набор программ для поиска соматических вариантов.

Литература:

1. Nakken S. [et al.]. Personal Cancer Genome Reporter: variant interpretation report for precision oncology // Bioinforma. Oxf. Engl. 2018. V. 34(10). P. 1778–1780.
2. Wang M. [et al.]. SomaticCombiner: improving the performance of somatic variant calling based on evaluation tests and a consensus approach // Sci. Rep. 2020. V. 10. P. 12898.

Количественный анализ целевых биологически активных пептидов в образцах кефира

М. А. Галямина, О.В. Побегуц, И.П. Смирнов, Н.М. Силаков, А.Ю. Горбачев

Лаборатория протеомного анализа

Кефир это пробиотический напиток, получаемый из молока путем брожения с помощью “кефирных грибков” - группы бактерий и микроорганизмов [1]. В данной работе были исследовано два образца кефира, для которых необходимо было провести количественный анализ пяти целевых пептидов. Для проведения данного анализа были получены пептидные экстракты представленных образцов и был проведен хромато-масс-спектрометрический анализ. Для оценки количественной представленности целевых пептидов в кефире были получены синтетические пептиды, идентичные целевым и также были получены “меченые” пептиды с добавлением одной аминокислоты. Для серии последовательных разведений чистой смеси из десяти синтетических пептидов был проведен хромато-масс-спектрометрический анализ с последующим регрессионным анализом по Пирсону. В результате была показана линейная зависимость интенсивности масс-спектрометрических пиков (МС-пиков) от концентрации синтетических пептидов. На основе полученных уравнений прямых для синтетических пептидов было рассчитано количество целевых пептидов в анализируемых образцах кефира. Также была рассчитана оценка потерь пептидов в процессе экстракции путем добавления синтетических пептидов в анализируемых образцах кефира. В итоге для каждого из целевых пептидов была рассчитана его концентрация в 1 мл исходного молочного продукта, что являлось задачей работы.

Литература:

1. Altay F. et al. A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: Microbiota, fermentation process and quality characteristics // Int. J. Food Microbiol. 2013. Vol. 167, № 1. P. 44–56.

Разнообразие профаговых интеграз *Staphylococcus aureus* и их связь с факторами вирулентности и антибиотикоустойчивости

К. Е. Медведев, М. А. Корниенко, Д. А. Беспятых, Е. А. Шитиков

Лаборатория молекулярной генетики микроорганизмов

Staphylococcus aureus – грамположительная бактерия, вызывающая широкий спектр инфекционных заболеваний. Важным источником факторов вирулентности стафилококков являются профаги – бактериофаги, интегрированные в бактериальную геномную ДНК. Профаги имеют высокую мозаичность, делая сложным установление связей между генами. Однако ранее была обнаружена связь некоторых факторов вирулентности с профаговыми интегразами – ферментами, отвечающими за интеграцию профагов в геном бактерии. Целью данной работы было изучение разнообразия профаговых интеграз на глобальной выборке *S. aureus* и оценка их связи с факторами вирулентности и антибиотикоустойчивости.

Из базы данных NCBI были загружены геномы 1300 штаммов *S. aureus*, для всех образцов *in silico* был определен секвенс-тип. Поиск профаговых последовательностей осуществлялся программой Phaster, в дальнейшем из анализа были исключены геномы, для которых профаговые последовательности определялись на краях хромосомы. Аннотацию профагов осуществляли с помощью ресурса PharoKka. Сайты интеграции профагов и точные границы определяли с использованием Vector NTI. Уточненные последовательности профагов сравнивали с геномами из базы международного комитета по таксономии вирусов (ICTV): деревья, основанные на парных расстояниях между геномами фагов, выводились с помощью программы ViPTree. Поиск факторов вирулентности осуществляли с использованием базы данных VFDB.

В исследование было включено 857 геномов *S. aureus*, содержащих профаговые последовательности не на краях хромосомы. Штаммы относились к 143 секвенс-типам, значительная часть геномов принадлежала к эпидемически значимым ST: ST8 (n=161), ST5 (n=118), ST398 (n=50). Суммарно, для штаммов коллекции было выявлено 3440 профаговых последовательностей, около половины из которых имели длину ~40 тыс п.о., что соответствует длине умеренных фагов стафилококков. Сравнение аннотированных последовательностей профагов и известных интеграз выявило 1532 соответствия: наиболее распространенными интегразами были Sa3 (n=590), Sa2 (n=357), Sa1 (n=178), Sa6 (n=146), Sa7 (n=117) и Sa5 (n=106). Интегразы Sa9, Sa8, Sa12 и Sa4 встретились в 12, 10, 9 и 7 профагах соответственно. Для полученных интеграз были определены как известные, так и ранее не описанные сайты интеграции. Также в ходе исследования были охарактеризованы четыре новых подтипа классических типов и пять новых типов интеграз. Филогенетический анализ профаговых последовательностей в большинстве случаев подтвердил соответствие следующим родам: *Peeveelvirus*, *Dubowvirus*, *Biseptimavirus*, *Phietavirus* и *Triavirus*. Анализ факторов вирулентности обнаружил их наибольшую представленность среди профагов, содержащих Sa3 интегразы; Sa3 наиболее часто были связаны с генами уклонения от иммунитета. Sa2 профаги несли PVL лейкотоксин, а Sa1 интегразы были ассоциированы с эксфолиативным токсином.

Работа выполнена за счет средств гранта РФФ 22-15-00443.



Влияние катионных антимикробных пептидов на тромбоциты человека

Мороз Г.Д.¹, Подоплелова Н.А.², Юдин М.С.³, Алиева С.Э.⁴,
Варижук А.М.³, Пантелеев М.А.², Лазарев В.Н.⁴, Панасенко О.М.¹

¹Лаборатория физико-химических методов исследования и анализа
²Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН
³Лаборатория структуры и функций биополимеров
⁴Лаборатория генной инженерии

Катионные антимикробные пептиды (кАМП) рассматриваются в качестве перспективной альтернативы традиционным антибиотикам ввиду практически отсутствующей бактериальной резистентности к ним. Для практического применения обычно рассматриваются синтетические короткие пептиды, которые могут обладать улучшенными свойствами по сравнению с их природными аналогами. Как потенциальные клинические препараты системного применения кАМП должны проходить тестирование в отношении их цитотоксичности и функциональной активности клеток крови, среди которых особое место занимают тромбоциты, участвующие в процессе её свертывания. Цель работы – исследовать цитотоксическое действие кАМП по отношению к тромбоцитам и влияние кАМП на их агрегацию.

Методы. В работе были использованы 9 кАМП, сконструированных на основе генома пиявки *Hirudo Medicinalis* и генома её микробиома: 3967 (FRIMRILRVLKL), 3967_1 (FRIMRILRVLK), 12530 (KFKKVIWKSFL), 536_1 (RWRLVCFLCRRKKV), 19347_2 (RPILIRVRRIRVI), 1545 (FLIGKAIKRKFCILRSVWNA), 716_2 (RLKRFKRVALRREKTARNFRSIVS), 2590 (EKRWRLLIFNYF) и 2022 (RAVIYKIPYNAIASRWIAPKKC). В качестве положительного контроля использовался известный цитотоксичный пептид пчелиного яда мелитин. Тромбоциты выделяли из периферической крови здоровых добровольцев, взятой в вакуумные пробирки с цитратом натрия. Цитотоксическую активность кАМП по отношению к тромбоцитам определяли методом проточной цитометрии (BD Accuri C6, BD Biosciences, США) с использованием аннексина А5-Alexa647, кальцеина-AM и CD62P-PE в качестве маркеров жизнедеятельности тромбоцитов. Влияние кАМП на агрегацию тромбоцитов оценивали методом оптической агрегометрии при стимуляции АДФ (10 мкМ) (Solar AP2110, Беларусь). Связывание кАМП с альбумином определяли методом микромасштабного термофореза (Monolith NT.115 MicroScale Thermophoresis, Nanotemper technologies, Германия).

Результаты. По цитотоксическому действию на тромбоциты кАМП можно расположить в следующем порядке: мелитин \gg 536_1 \approx 3967 \approx 2022 $>$ 3967_1 \approx 1545 \approx 2590 $>$ 12530 \approx 19347_2 \approx 716_2. Все пептиды практически не вызывали гибели тромбоцитов при концентрациях меньших 50 мкМ, тогда как мелитин разрушал мембраны тромбоцитов уже при концентрации 1 мкМ. Все пептиды ингибировали скорость и степень агрегации тромбоцитов при концентрациях, не вызывающих их гибель. В присутствии плазмы крови (10%) цитотоксический эффект пептидов значительно снижался. Методом микромасштабного термофореза было показано, что большинство исследуемых пептидов связываются с основным белком плазмы – альбумином (диапазон K_d 1-50 мкМ).

Вывод. При концентрациях, не вызывающих гибель клеток, все кАМП в той или иной степени препятствовали агрегации тромбоцитов. В присутствии плазмы крови цитотоксический эффект существенно снижался, по-видимому, в результате связывания с белками плазмы, в частности, с альбумином.

Глубокое изучение механизма действия пладиенолида Б с помощью термопрофилирования протеома

А.О. Гончаров¹, М.М. Лукина¹, И.П. Смирнов², В.О. Шендер¹

¹Лаборатория молекулярной онкологии

²Лаборатория протеомного анализа

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

Современные методы анализа термической стабильности белков в живых клетках позволяют объективно и на уровне всего протеома идентифицировать белковые мишени низкомолекулярных соединений. В сочетании с методами экспрессионной протеомики и секвенированием РНК становится возможным более глубокое изучение механизмов действия огромного числа лекарственных препаратов, что может помочь в разработке новых терапевтических стратегий.

Низкомолекулярные модуляторы сплайсинга – это перспективный класс противоопухолевых препаратов, некоторые представители которого в данный момент проходят клинические испытания. Однако, до сих пор не существует общепринятой теории, объясняющей цитотоксический эффект глобального ингибирования сплайсинга пре-мРНК в опухолевых клетках. Для более глубокого понимания механизма действия низкомолекулярного модулятора сплайсинга пладиенолида Б мы применили метод термопрофилирования протеома на клеточных линиях аденокарциномы яичника SKOV3 и эпителия фаллопиевых труб hTERT FT282.

В клетках линии SKOV3 нам удалось идентифицировать основную мишень пладиенолида Б – сплайсинговый фактор SF3B1, а также другие белки, находящиеся с ним в комплексе. Кроме того, в качестве потенциальных мишеней пладиенолида Б были идентифицированы белки-мишени сигнального пути Hippo-YAP1/TAZ. Примечательно, что один из этих белков – CTGF, кодируемый геном CCN2, обнаружил более значимое изменение представленности, даже по сравнению с основной мишенью – SF3B1. Вероятно, это может быть связано с прямым действием пладиенолида Б на клеточные процессы. В клетках линии FT282 нам не удалось идентифицировать SF3B1. Однако, мы обнаружили в качестве потенциальной мишени белок ABCB1, который обеспечивает транспорт большого количества соединений из клетки, включая чужеродные. Мы предполагаем, что ABCB1 может связываться и с пладиенолидом Б и выводить его из клеток, снижая эффективную концентрацию.

**Исследование механизма действия новой последовательной схемы
противоопухолевой терапии модулятором сплайсинга мРНК в комбинации с
ДНК повреждающим агентом**

Е.А. Свирина, М.М. Лукина, К.С. Ануфриева, П.В. Шнайдер, О.М. Иванова, Е.Н. Мочалова, М.П. Никитин, Р.В. Деев, А.В. Кашина, Е.А. Васильчикова, М.А. Лагарькова, В.М. Говорун, Г.П. Арапиди, В.О. Шендер

Лаборатория молекулярной онкологии

Значимой проблемой у пациентов с аденокарциномой яичника является развитие устойчивости опухолей к химиотерапии и большая вероятность рецидива. Поэтому разработка новых эффективных препаратов и схем лечения, которые могли бы предотвратить развитие химиорезистентности, является крайне актуальной задачей.

Известно, что в опухолях относительно нормальных тканей значительно изменяется регуляция сплайсинга мРНК, в связи с этим, аппарат сплайсосомы становится привлекательной мишенью для противоопухолевой терапии. Однако в клинических испытаниях I фазы ингибиторы сплайсинга только тормозили рост опухоли, но не элиминировали ее полностью.

В работе были использованы опухолевые клеточные линии: SKOV3, MESOV, TOV-112D, TOV-21G, A2780, HEY, Нер G2, HT-29, MDA-MB-231, A549, OVCAR3, CT26, а также линия нормального эпителия фаллопиев труб FT282. Протеомный анализ проводили с помощью масс-спектрометра Q Exactive HF. Жизнеспособность клеток оценивали с использованием реагента МТТ. Анализ клеточного цикла проводили на проточном цитометре NovoCyte. Метод ДНК-комет проводили, следуя инструкциям Тревигена. Для экспериментов *in vivo* использовали самок мышей Balb/c.

Нами была предложена последовательная комбинация терапии ингибитора сплайсинга пладиенолида В (PI-B) и цисплатина [1]. С помощью протеомного анализа мы обнаружили, что PI-B значительно снижает экспрессию белков, участвующих в репарации повреждений ДНК. С помощью метода ДНК-комет мы показали большее количество разрывов ДНК в клетках, обработанных комбинацией препаратов, по сравнению с монотерапией цисплатином. На основании результатов анализа клеточного цикла, мы предположили, что комбинация препаратов предотвращает арест раковых клеток в S-фазе, необходимой для репарации ДНК. Таким образом, предварительная обработка раковых клеток PI-B приводит к репликативному стрессу, накоплению обширных повреждений ДНК и делает клетки более восприимчивыми к последующему лечению цисплатином.

Мы показали, что развитие устойчивости к ингибитору сплайсинга PI-B не снижает чувствительность к предлагаемой комбинации. Мы апробировали и верифицировали терапевтический эффект предложенной комбинации на мышинной опухолевой модели *in vivo*: эффективность комбинации была подтверждена значимым ингибированием роста для опухолей, обработанных комбинацией PI-B (1 мг/кг) и цисплатина (2,5 мг/кг), по сравнению с контрольной группой.

Работа поддержана грантом РФФИ №22-15-00462 (*in vivo* эксперименты) и грантом министерства науки и высшего образования 075-15-2019-1669 (протеомный анализ).

Литература:

1. Ksenia S. Anufrieva, et.al., bioRxiv 2023.10.08.561421.

Исследование интерактома сплайсингового фактора SYNCRIP под действием цисплатина и его роли в возникновении химиорезистентности клеток аденокарциномы яичника

Арзумян Л.К., Иванова О.М., Шнайдер П.В., Лукина М.М., Арапиди Г.П., Шендер В.О.

Лаборатория молекулярной онкологии

Химиорезистентность является одной из главных проблем в лечении рака яичников, так как может привести к ограничению эффективности химиотерапевтических препаратов и возникновению рецидивов. Ранее нашей группой было показано, что погибающие под действием терапии опухолевые клетки могут секретировать сплайсосомные белки в составе внеклеточных везикул [1]. Такие секретомы, обогащенные сплайсосомными белками, способствуют возникновению более агрессивного и устойчивого к химиотерапии фенотипа у реципиентных опухолевых клеток. Для исследования возможной роли сплайсосомных белков, секретлируемых погибающими опухолевыми клетками, в формировании химиорезистентности был выбран белок SYNCRIP на основе проведенного ранее биоинформатического анализа. Нами было показано, что сверхэкспрессия SYNCRIP повышает пролиферацию опухолевых клеток SKOV3, а также способствует возникновению большей устойчивости клеток к действию цисплатина по сравнению с контрольными клетками. При этом, опухолевые клетки с нокдауном этого белка, наоборот, медленнее пролиферируют и становятся более чувствительными к цисплатину. Также нами было показано, что в клетки со сверхэкспрессией SYNCRIP быстрее выходят из-под ареста в S-фазе клеточного цикла под действием цисплатина. Чтобы выяснить как изменяются белки партнеры SYNCRIP под действием цисплатина, было проведено два типа иммунопреципитации этого белка из опухолевых клеток с помощью антител к метке FLAG и целевых антител к SYNCRIP с последующим масс-спектрометрическим анализом. После объединения двух наборов данных иммунопреципитации нами было идентифицировано 203 белка-партнёра SYNCRIP, которые связываются с ним при обычных условиях и 49 белков-партнёров SYNCRIP, которые связываются с ним под действием цисплатина. Мы выяснили, что под действием цисплатина SYNCRIP усиливает связь с белками, вовлечёнными в процессы взаимодействия с РНК (RNGTT, PLEKHA5, RAVR1, U2SURP, FAM120A), ДНК-репарации (MSH2, PAWR), а также в активации ATR-каскада в ответ на стресс (RFC5). При этом теряется связь с белками, связанными со сплайсингом мРНК и иммунным ответом, в частности с интерфероновым каскадом (DNX9) и дегрануляцией нейтрофилов (DSC1). Полученные данные демонстрируют, что повышенная представленность сплайсосомного белка SYNCRIP помогает клеткам лучше справляться с терапевтическим стрессом.

Литература:

[1]. Pavlyukov M. S. et al. Cancer cell 2018, doi: 10.1016/j.ccell.2018.05.012



Экспрессия компонентов внеклеточного матрикса и белков десмосомы в культурах нейроэпителлия и нейрональных предшественников, дифференцированных из изогенных линий ИПСК с различными аллельными состояниями гена *LRRK2*

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

Лаборатория клеточной биологии

Среди нейродегенеративных заболеваний болезнь Паркинсона (БП) занимает второе место по распространенности. Наследственные формы БП, составляющие 5–10% всех случаев, дают важнейшие ключи к пониманию механизмов, лежащих в основе нейропатологии. Самой распространенной мутацией, ассоциированной с наследственной формой БП, является мутация 6055G>A в гене *LRRK2*, кодирующем богатую лейциновыми повторами киназу 2 (*LRRK2*) [1]. Наиболее перспективными моделями для изучения роли *LRRK2* в патогенезе БП являются клеточные модели, основанные на индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (ИПСК) пациентов. В том числе, такие клеточные модели подходят для изучения белков внеклеточного матрикса, которые важны для поддержания гомеостатических процессов мозга, регуляции активности нейронов и синаптической пластичности, и дефицит которых может ускорять нейродегенерацию, ингибируя аутофагию и вызывая апоптоз [2]. Исследования в этом направлении могут расширить наше представление о патогенезе БП.

Целью нашей работы является изучение экспрессии компонентов внеклеточного матрикса и белков десмосомы в культурах нейроэпителлия и нейрональных предшественников, дифференцированных из изогенных линий ИПСК с различными аллельными состояниями гена *LRRK2* по мутации 6055G>A. Уровень мРНК исследуемых генов оценивали с помощью количественной ОТ-ПЦР. Экспрессию белков оценивали с помощью Вестерн-блоттинга. Для определения локализации исследуемых белков проводили иммуоцитохимическое окрашивание клеточных культур, зафиксированных параформальдегидом.

В результате работы будет проверена гипотеза о том, что состав внеклеточного матрикса и количество межклеточных контактов зависит от аллельного состояния гена *LRRK2* по мутации 6055G>A.

Литература:

[1] D.G Healy et al. The Lancet Neurology 2008, doi: 10.1016/S1474-4422(08)70117-0

[2] M. Cescon et al. Aging 2016, doi: 10.18632/aging.100924

Митохондриальная ДНК как активатор иммунологической компоненты патогенеза болезни Паркинсона, вызванной мутацией G2019S в киназе LRRK2

И. В. Копылова^{1,2}, Д. А. Грехнёв³, В. О. Шендер^{1,4}, Г. П. Арапиди^{1,4,5}, В. А. Вигонт³,
А. Н. Богомазова^{1,2}, М. А. Лагарькова¹, О. С. Лебедева^{1,2*}

¹ ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России; ² Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России; ³ Институт цитологии РАН; ⁴ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова;

⁵ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет);

Аминокислотная замена G2019S в киназе LRRK2 является наиболее распространённой мутацией среди пациентов, страдающих болезнью Паркинсона (БП), которая вызывается гибелью дофаминэргических нейронов (ДАН) в головном мозге. Известно, что данная мутация приводит к усилению киназной активности LRRK2, однако достоверно неизвестно, как это связано с гибелью ДАН. Ранее в нашей лаборатории с помощью технологии геномного редактирования CRISPR/Cas9 были созданы индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) с различными комбинациями аллелей: G2019S/G2019S, G2019S/wt, wt/wt, knockout (KO)/wt, KO/KO. Набор таких линий представляет полный спектр киназной активности LRRK2 от её максимума (G2019S/G2019S) до полного отсутствия (KO/KO) и может служить для выявления клеточных эффектов, зависящих от активности LRRK2.

Мы дифференцировали полученные ИПСК в ДАН, изучили в ДАН кальциевый сигналинг и провели протеомный анализ. Мы обнаружили нарушения депо-управляемого входа кальция в ДАН с гомозиготной и гетерозиготной мутацией G2019S, что может указывать на нарушения митохондрий, являющихся одним из основных депо кальция. Результаты протеомного анализа показали, что доза мутантного аллеля LRRK2 коррелирует с активацией врождённого иммунного ответа в ДАН. Мы предположили, что активация иммунного ответа может быть вызвана утечкой митохондриальной ДНК (мтДНК) из митохондрий с нарушенным балансом ионов кальция. Данные по изучению этого механизма в ДАН будут представлены на конференции.

Таким образом, набор созданных изогенных линий ИПСК был использован для оценки роли мтДНК в активации врождённого иммунного ответа на модели LRRK2-G2019S-ассоциированной БП.

Данная работа поддержана грантом 075-15-2019-1669 Министерства науки и высшего образования РФ.



Нокаут или гиперэкспрессия гена *UBE2A* приводят к нарушению Rho/ROCK сигнального пути и снижению скорости миграции нейрональных клеток

А.В Федоренко¹, Е. А. Хомякова¹, А.В. Сурдина¹, Е.К. Секретова¹, К.М. Климина²,
А.Н. Богомазова¹

1 - Лаборатория клеточной биологии; 2 - Лаборатория геномных исследований и вычислительной биологии.

X-сцепленная умственная отсталость по типу Насименто, или синдром Насименто – это редкая форма задержки умственного развития, впервые описанная в 2006 году и связанная с потерей функции или делециями гена *UBE2A*. Есть сведения, что не только делеции, но и дупликации участка X-хромосомы, содержащего ген *UBE2A*, приводят к умственной отсталости. В настоящее время неизвестно, какую роль играет ген *UBE2A* в развитии центральной нервной системы, однако существуют данные о его участии в митофагии, регуляции транскрипции, репарации ДНК. Ранее в нашей лаборатории была создана изогенная линия индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), отличающиеся по дозе гена *UBE2A*: нормальные ИПСК, ИПСК с нокаутом и гиперэкспрессией гена *UBE2A*. Данная изогенная система ИПСК была дополнена ИПСК пациента с синдромом Насименто, и полученная модельная клеточная система использована нами для изучения роли гена *UBE2A* в нейрогенезе.

В нашей работе 4 линии ИПСК модельной системы были дифференцированы в клетки нейрональных предшественников (НП) (PAX6+, Nestin+) и в нейросферы. Для полученных НП был проведен транскриптомный анализ, нейросферы были использованы для оценки скорости миграции НП.

В транскриптомном анализе было выявлено более 1200 дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) с повышенной экспрессией и более 1400 ДЭГ с пониженной экспрессией. При функциональном анализе генов с пониженной экспрессией в НП, полученных из ИПСК пациента, были выявлены нарушения экспрессии генов, связанных с онтологиями регуляции цитоскелета, развития аксонов и дендритов, а также регуляции синапсов. Анализ обогащения биохимических путей выявил один общий для этих онтологий сигнальный путь Rho/ROCK, нарушение которого, как известно, приводит к задержке нейронального развития. Сходные изменения профиля экспрессии генов мы наблюдали также при нокауте гена *UBE2A*, и, что удивительно, – при его гиперэкспрессии. Для функциональной верификации транскриптомных данных мы оценили скорость миграции НП из нейросфер, полученных из ИПСК и культивируемых в прикрепленном состоянии в течение 3 суток. Мы выявили сниженную скорость миграции НП с нокаутом и гиперэкспрессией гена *UBE2A*, что подтверждает данные транскриптома.

Таким образом, мы впервые показали, что аномалии дозы гена *UBE2A* ведут к снижению экспрессии генов RHO/ROCK сигнального пути в НП и к снижению клеточной подвижности.

Работа выполнена при финансировании РНФ, грант № 21-65-00017.



Получение фибробластоподобных производных ИПСК с нокаутом генов, кодирующих основные активирующие НК-клеточные лиганды

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

Лаборатория клеточной биологии

Персонализированная терапия на основе ИПСК должна решить проблемы, связанные с иммунным отторжением и применением иммуносупрессивной терапии. Однако остаются сомнения в толерантности иммунной системы в отношении пациент-специфичных производных ИПСК. Ранее в нашей лаборатории были получены сведения о чувствительности фибробластоподобных производных ИПСК (iPS-fibro) к аутологичным NK-клеткам в связи с нарушением экспрессии активирующих и ингибирующих лигандов на поверхности iPS-fibro [1]. При этом вклад отдельных лигандов в NK-клеточный ответ против iPS-fibro остается неизвестным. Данная работа посвящена получению iPS-fibro с нокаутом генов активирующих лигандов *NECTIN2*, *PVR*, *MICA* для дальнейшего определения наиболее значимого из них.

В ходе направленной дифференцировки ИПСК двух здоровых доноров были дифференцированы в iPS-fibro. Полученные клетки обладали характерной морфологией и экспрессировали основные маркеры фибробластов: CD44, CD73, CD90 и CD105. Нокаут генов NK-клеточных лигандов проводили с помощью системы CRISPR/Cas9. Для каждого из генов интереса на основе плазмиды PX458 были получены по три генно-инженерных конструкта с различными направляющими РНК (gRNA). Клетки линии HEK293 были использованы для предварительной оценки эффективности редактирования, которая составила для лучшей gRNA 78%, 83% и 90% для генов *NECTIN2*, *PVR* и *MICA*, соответственно. Далее были подобраны оптимальные условия для трансфекции iPS-fibro. Было показано, что электропорация iPS-fibro более эффективна, чем трансфекция различными коммерческими липофектантами. Более того, замена исходного Neon™ Buffer R на среду Opti-MEM™ делает этот метод более доступным. Используя оптимизированный протокол, были получены iPS-fibro с нокаутом генов *NECTIN2*, *PVR* и *MICA* путем сортировки негативной популяции. Полученные нокаутные iPS-fibro будут оценены на способность вызывать NK-клеточный ответ, что позволит оценить вклад каждого из лигандов (*NECTIN2*, *PVR* и *MICA*) в активацию NK-клеток.

Финансирование: Работа поддержана грантом РФФ №22–15–00250.

Литература:

[1] М.Е. Bogomiakova et al. Stem Cell Res Ther 2023, doi: 10.1186/s13287-023-03308-5



Нарушения морфологии и функции ядерных спеклов при ацидозе

Рубцов П.В., Шторк А.С., Сурдина А.В., Варижук А.М.

Лаборатория структуры и функций биополимеров

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

Целью данной работы была проверка рН-зависимости спеклов и возможности секвестирования в них SRSF при ацидозе. Изменения морфологии спеклов в модели ацидоза отслеживали на двух линиях клеток, предварительно зафиксированных в G2-фазе с использованием ингибитора CDK1 RO-3306. С помощью нуклеотропного оптического рН-сенсора подтверждали закисление нуклеоплазмы после обработки клеток буферным раствором с рН 6 в присутствии ионофоров. Морфологию спеклов в клетках с нативным рН и рН 6 оценивали по данным флуоресцентной микроскопии после окрашивания мечеными антителами к маркеру спеклов или специфичными зондами на основе олигонуклеотидов. Было установлено статистически значимое изменение кривизны и объема спеклов, отражающее их уплотнение в слабокислой среде, т.е. более эффективное LLPS. Эти изменения аналогичны наблюдаемым ранее при дефосфорилировании SRSF.

На основании полученных данных и опубликованных ранее было сделано следующее предположение: уплотнение спеклов при ацидозе обусловлено протонированием остатков фосфосерина (рКа 6.5), что в теории сказывается на распределении заряда в SRSF аналогично дефосфорилированию. Для проверки предполагаемого механизма эффекты рН были проанализированы в модельной системе с использованием синтетических пептидов – фрагментов мажорных SRSF. Набор пептидов включал нативный фосфорилированный вариант; мутантный вариант с S/E заменами (модель гиперфосфорилированного SRSF) и дефосфорилированный вариант. Методами турбидиметрии и просвечивающей микроскопии отслеживали LLPS в растворах пептидов с добавлением РНК и краудинг-агентов при различных рН.

Было установлено, что закисление среды до рН 6 стимулирует LLPS в системе с укороченным фосфорилированным пептидом; дефосфорилирование имеет аналогичный эффект в системе с удлиненным пептидом. Полученные данные согласуются с наблюдениями в клеточной модели ацидоза. Они подтверждают, что протонирование остатков фосфосерина при ацидозе стимулирует SRSF-зависимое LLPS, что приводит к уплотнению спеклов. Секвестирование SRSF в уплотненных спеклах – вероятная причина нарушений сплайсинга.



Особенности организации и возможность таргетирования G4-богатых суперэнхансеров

Ю.И. Павлова, О. М. Иванова, М.С. Юдин, А. В. Сурдина, Н. А. Баринов, Д.В. Клинов, А.М. Вარიжук

Лаборатория структуры и функций биополимеров

Гуаниновые квадруплексы (G4), обнаруженные в промоторах онкогенов, активно изучаются как потенциальные терапевтические мишени. Роль G4 в прочих регуляторных участках, включая энхансеры и суперэнхансеры (SE), исследована недостаточно, однако именно она может определять отклик на G4-стабилизирующие противоопухолевые агенты. В данной работе рассмотрены G4-обогащенные SE. Они способны активировать одновременно несколько генов, сближая промоторные участки в пределах топологически ассоциированного домена (ТАД) через образование биомолекулярных конденсатов. Этот процесс реализуется по механизму разделения фаз “жидкость-жидкость” (LLPS) и опосредован контактами медиаторного комплекса с гистон-связывающим маркером SE – BRD4. Целью данной работы была проверка обогащения SE G4-сайтами на полногеномном уровне, а также установление особенностей организации G4-богатых SE.

Значимость обогащения SE G4-сайтами была подтверждена с помощью рандомизированного теста на двух линиях клеток, в которых вероятные и подтвержденные G4 были картированы методами G4-seq и ChIP-seq соответственно. Степень обогащения относительно контроля возрастала при переходе от вероятных G4 к подтвержденным. G4-богатые SE отличала низкая нуклеосомная плотность при высокой локальной концентрации BRD4. Вытеснение гистоновых октамеров с примыкающей к G4 дцДНК было подтверждено нами в мононуклеосомной модели с электрофоретической детекцией сборки и разрушения нуклеосомы. Вытеснение ацетилированных гистонов, признанных основными сайтами связывания BRD4, компенсировалось умеренным средством BRD4 непосредственно к G4. Это было показано нами двумя независимыми методами *in vitro*. Эффективность связывания G4-BRD4 оказалась недостаточной для образования персистентных комплексов, но оптимальной для формирования биоконденсатов по механизму LLPS. Последнее было продемонстрировано нами методом флуоресцентной микроскопии с использованием меченого BRD4 и SE-G4 в составе дцДНК. В роли положительного контроля выступал фрагмент ацетилированного хроматина, в роли отрицательного – дцДНК без G4 и гистонов.

Результаты работы обобщает следующая предложенная нами схема организации SE: G4 поддерживают низкую локальную нуклеосомную плотность, но аналогично ацетилированным гистонам способствуют аккумуляции BRD4 и снижают критическую концентрацию этого белка, соответствующую LLPS. Из этого следует, что стабильные G4 в SE способствует сборке биоконденсатов с медиаторными комплексами и активации генов в пределах ТАД, а лиганды, нарушающие контакты BRD4-G4, могут оказывать согласованное действие на все гены в пределах ТАД. Последний тезис частично подтверждается данными ОТ-ПЦР. Протоонкогены из ТАД с консервативными G4-богатými SE демонстрируют более выраженное снижение экспрессии под действием известного G4-лиганда, чем гены с G4-промоторами, изолированные от SE. Таким образом, установленные нами особенности организации G4-богатых SE указывают на не учтенный ранее механизм действия G4-стабилизирующих малых молекул.

Клинический случай успешной генно-инженерной биологической терапии у пациента с болезнью Крона и врожденным поликистозом печени и почек

А.В.Коршунова, Т.Н.Калачнюк

ФГБУ ФНКЦ ФХМ имени Ю.М. Лопухина ФМБА, отделение гастроэнтерологии

Цель работы: описать клинический случай достижения клинико-эндоскопической ремиссии и разрешения почечной недостаточности у пациента с Болезнью Крона (БК) и врожденным поликистозом печени и почек на фоне генно-инженерной биологической терапии (ГИБТ).

Материалы и методы: Пациент Ч., 32 лет, поступил в гастроэнтерологическое отделение Центра с жалобами на учащенный до 10 раз неоформленный стул, обычного цвета, с примесью крови в каждой порции до 1 чайной ложки и светлой слизи, периодически – ноющие боли по ходу кишечника, общую слабость, снижение работоспособности и качества жизни. Проведено стационарное обследование.

Результаты исследования: из анамнеза известно, что в 2006 году в возрасте 17 лет впервые отметил факт учащения стула до 10 раз в сутки с примесью крови и слизи, появление боли в нижних отделах живота, при обследовании в течение года диагностирована внутрипросветная форма БК толстой кишки с сегментарным характером поражения. Также в ходе обследования выявлены множественные кисты в почках и печени. С учетом тяжести заболевания, в качестве противовоспалительной терапии был назначен курс метилпреднизолона в суточной дозе 16 мг в течение двух месяцев с постепенной редукцией дозы. В связи с частыми обострениями и неоднократными повторениями курсов метилпреднизолона, при попытке снижения его дозы, наблюдалось обострение заболевания, сформировалась гормонозависимость, в связи с чем в 2017 году к лечению добавлен азатиоприн в дозировке 150 мг в сутки. В 2017 году проведена лапароскопическая фенестрация кист левой почки. Из-за сохраняющейся активности воспалительного процесса в толстой кишке, в 2022 году пациенту было предложено участие в клиническом исследовании с целью инициации ГИБТ препаратом Озанимод, на фоне приема которого отмечал улучшение самочувствия, однако эндоскопической ремиссии достигнуть не удалось. Ввиду организационных трудностей использование препарата было прекращено. С 07.03.2023 года в связи с наличием неблагоприятных прогностических предикторов БК: ранний дебют, хроническое непрерывное течение, формирование гормонозависимости, было принято решение об инициации ГИБТ препаратом Устекинумаб в дозе 520 мг, с продолжением приема азатиоприна и метилпреднизолона с редукцией дозы. В биохимическом анализе крови перед стартом терапии отмечалось повышение креатинина до 135 мкмоль/л, СРБ до 5.78 мг/л, в копрограмме – кашицеобразная консистенция кала, эритроциты 25-30 в поле зрения, лейкоциты 80-85 в поле зрения, слизь в большом количестве, фекальный кальпротектин 585 мкг/гр. После второго введения Устекинумаба в дозе 90 мг подкожно в режиме 1 раз в 8 недель от 27.07.2023 года, выявлена нормализация уровня креатинина до 90 мкмоль/л. При обследовании от 15.08.2023 года удалось достичь клинико-эндоскопической ремиссии, преодолеть гормонозависимость с полной отменой метилпреднизолона. При колоноскопии от 18.08.2023 года выполнена биопсия – по данным гистологического исследования выявлена очаговая гиперплазия эпителия крипт слизистой оболочки ободочной кишки, то есть гистологическая ремиссия не достигнута, что не является целью терапии БК.

Заключение: приведенный клинический случай демонстрирует пример разрешения почечной недостаточности, преодоления гормонозависимости и достижения клинико-эндоскопической ремиссии на фоне правильного выбора препарата ГИБТ у пациента с БК и врожденным поликистозом печени и почек.

Адаптация ПВФК-биосенсора для диагностики антител к SARS-CoV-2

В.К. Куликова^{1,2}, К.А. Прусаков³, Р.И. Шакуров³, М.Н. Бажутов³, Д.В. Басманов³, Ю.А. Беспярых^{1,2}

¹ ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени Ю.М. Лопухина Федерального Медико-биологического Агентства», лаборатория молекулярной медицины, 119435, Москва, Россия

² Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева, 125047, Москва, Россия

³ ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени Ю.М. Лопухина Федерального Медико-биологического Агентства», лаборатория прикладных биомедицинских микросистем, 119435, Москва, Россия

Одной из актуальных задач современной клинической диагностики является разработка быстрых и эффективных методов качественного определения антител к инфекционным агентам. В настоящий момент для решения этой задачи на практике в основном применяются методы, основанные на ИФА и ИХЛА, имеющие ряд ограничений. Перспективной альтернативой являются безмаркерные методы детекции. В последние годы наиболее развиваемые из них основаны на явлении регистрации возбуждения длиннопробежных поверхностных элетромагнитных волн. В настоящей работе использовался биосенсор EVA 3.0 на поверхностных волнах в одномерном фотонном кристалле (ОФК) с двумерным пространственным разрешением [1]. Важнейшей характеристикой данного биосенсора, потенциально обеспечивающей преимущество по сравнению с уже используемыми на практике методами, является возможность одновременной регистрации событий в 396 точках.

Целью работы было оптимизировать ПВФК-биосенсор для реализации селективного метода диагностики антител к SARS-Co-2.

В ходе работы проводили модификацию поверхности двумя методами: система полиалиламин (1%) – глутаровый альдегид (0,1%) и APTES (5%) – глутаровый альдегид (0,1%). Нанесение первой поверхность осуществлялась непосредственно в системе биосенсора проточным вариантом. После модификации наносили рекомбинантный RBD-фрагмент S-белка SARS-Co-2 в концентрациях 1 и 5 мкг/мл. Детекция специфического связывания валидирована на сыворотке крови человека на поверхности ОФК в микрофлюидной кювете. Исследовалась сыворотка трёх типов: привитых вакциной КовиВак и Гам-КОВИД-Вак, а также не переболевших COVID-19. Все типы сыворотки были независимо характеризованы методом ИФА.

В результате работы были получены кривые сорбции, позволяющие выделить систему полиалиламин (1%)-глутаровый альдегид (0,1%) как более успешную. Получены кривые сорбции позволяющие успешно отделить друг от друга пациентов, привитых и не вакцинированных.

Литература:

1. Konopsky V. et al. Photonic crystal surface mode imaging for multiplexed and high-throughput label-free biosensing //Biosensors and Bioelectronics. – 2020. – Т. 168. – С.

Резекционная и резекционно-пластическая хирургия трахеогортанного сегмента

Антонов В.В., академик РАН, профессор Решетов И.В., член-корреспондент РАН, профессор Паршин В.Д.

ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России КБ №123

Актуальность: Дальнейшее развитие современной хирургии связана не только со спасением жизни больного, но и сохранением функции соответствующих органов, повышением качества жизни. Это относится как к онкологической, так и неонкологической практике. При этом использование накопленного опыта реконструктивных операций в соответствующих областях оказывается полезным. В последние десятилетия операции на трахее, гортани стали достаточно безопасными и вошли в клиническую практику с тенденцией повышения их безопасности. Однако, хирургия трахеогортанного сегмента остается уделом ограниченного круга специалистов.

Цель: на основании мультидисциплинарного подхода улучшить результаты, в т.ч. функциональные, хирургического лечения пациентов с онкологическими и неонкологическими заболеваниями трахеогортанного сегмента.

Материалы и методы: Это ретроспективное, мультидисциплинарное, многоцентровое исследование, охватывающее многолетнюю работу специалистов нескольких институтов. Неонкологические заболевания были представлены 1253 пациентами с рубцовым стенозом трахеи, которых оперировали с 2004 по 2023 год. У 86,7% пациентов этиопатогенетическим фактором было повреждение трахеи при ИВЛ. При первом обращении у 61,6% больных имелась трахеостома. У 73% больных сужение располагалось в верхних отделах дыхательного пути, в трахеогортанном сегменте. Всего было выполнено 5428 открытых и эндоскопических внутрипросветных операций. Радикальные операции заключались в удалении суженного сегмента и восстановлением дыхательного пути трахеогортанным анастомозом. Чаще применяли трахеопластику с Т-трубкой, которые также позволяли излечить пациента с сохранением пораженного сегмента. В этом отличие хирургической тактики при РСТ от таковой при опухоли.

Результаты: Операции по поводу РСТ стали достаточно безопасными. Всего умерли 9 человек после 5428 операций. Послеоперационные осложнения возникли в 1,4% случаев. Хорошие и отдаленные функциональные результаты получены у 89,8% больных.

Актуальность лечения опухоли трахеогортанного сегмента возрастает. В настоящее время имеется явная тенденция к заболеваемости, которая за 20-тилетний период выросла более, чем на 30%. Проведено 384 видеоларингеальных операции, из которых 367 (97%) в амбулаторных условиях. Среди операций, выполненных открытым способом, представлен опыт применения аддитивных технологий в реконструкции верхних отделов дыхательного тракта.

Выводы: Заболевания, поражающие трахео-гортанный переход являются зоной междисциплинарного интереса и взаимодействия, необходима конвергенция знаний и технологий между специалистами для максимально эффективной диагностики и лечения пациентов. Важно умение создавать объединенные междисциплинарные бригады для лечения конкретного больного, имея конечной целью не только спасение жизни, но и полноценную реабилитацию пациента. Это позволяет излечить с минимальным риском. Дальнейший прогресс связан с внедрением современных биологических материалов, клеточных технологий и регенеративной медицины.



Филолипидный анализ штаммов рода *Bacteroides*

Воробьева Е.А.¹, Козакова В.Д.¹, Силантьев А.С.¹, Нестеров М.С.², Кардонский Д.А.¹, Кашатникова Д.А.¹, Шагалева О.Ю.¹, Ефимов Б.А.¹, Захаржевская Н.Б.¹

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

² Лаборатория биоаналитических исследований ФГБУН НЦБМТ ФМБА России

Введение: Структурная и функциональная липидомика, как и общая метаболомика позволяют дать комплексную физиологическую оценку изучаемому объекту, а также дополнить описательную часть патогенеза ряда заболеваний, установив функциональные взаимосвязи с геномикой и протеомикой. Для микробиологии липидомика важна не только для описания структуры и функции мембран и внутриклеточных липидов, но и позволяет исследовать межклеточные коммуникации. Исследуя спектр липидов мембран, можно провести параллели с геномными данными для формирования дополнительной классификации микроорганизмов на основании липидных различий, что и стало целью данного исследования.

Материалы и методы: Исследование проводилось для 18 штаммов рода *Bacteroides*: *B. vulgatus* EBA 3-9, *B. dorei* EBA 7-24, *B. dorei* EBA 7-24. Липидомный анализ проводился методом ВЭЖХ-ВП-МС с использованием Agilent 6545XT AdvanceBio в режиме положительной ионизации образца; исследование проводилось в 3 биологических и 2 технических повторах для каждого из исследованных штаммов. Аннотация липидов была выполнена с использованием ПО MSDIAL и Skyline. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием Python.

Результаты: в результате аннотации данных панорамного липидомного анализа 18 штаммов рода *Bacteroides* был идентифицирован 761 липид, а также 3066 признаков (features), ассоциированных с исследованными пробами. Для ассоциированных с пробой соединений была построена матрица представленности для поиска уникальных липидов между группами исследованных штаммов рода *Bacteroides*. Идентифицированные уникальные липиды были использованы для построения филолипидного дерева на основе евклидового расстояния для исследованных штаммов рода *Bacteroides*, что позволило оценить подобие липидных профилей для исследованных штаммов. Сравнение филогенетического дерева с результатами филолипидного анализа позволяет говорить о высокой степени корреляции генетических и липидных данных.

Выводы: Липидомика может быть использована для построения аналога филогенетического дерева, однако необходимы дальнейшие исследования для оценки достоверности степени родства штаммов на основе филолипидного анализа.

Работа выполнена в рамках гранта РФФ 21-75-10172

Оценка протеомных эффектов везикул *Bacteroides fragilis* в культурах эпителия кишки

Д.А. Кашатникова¹, О.Ю. Шагалева¹, О.В. Побегуц², Д.А. Кардонский¹, Е.А. Воробьева¹, Казакова В.Д.
¹, А.С. Силантьев¹, Б.А. Ефимов¹, Д.С. Матюшкина³, Н.Б. Захаржевская¹

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

² Центр молекулярной медицины и диагностики ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

³ НИИ СБМ Роспотребнадзора

Изучение межклеточных коммуникаций, возникающих между микрофлорой и клетками кишечника, является важной задачей не только при исследовании патогенеза воспалительных заболеваний кишечника, но и при тестировании комплексных пробиотических препаратов. В рамках разработки пробиотического препарата, в основу которого входят везикулы отдельных видов рода *Bacteroides*, необходим простой и быстрый метод оценки основных молекулярных эффектов воздействия везикул на клетки кишечника. Известно, что мембранный полисахарид А *Bacteroides fragilis* обладает уникальными иммуномодулирующими свойствами, поэтому на примере данного вида было проведено исследование протеомных эффектов бактериальных везикул в отношении клеточных линий кишечника. В работе были использованы везикулы двух штаммов *Bacteroides fragilis* - энтеротоксигенного BOB25 (ETBF) и нетоксигенного штаммов JIM10 (NTBF). Выделенные везикулы были исследованы методами ТЭМ и NTA. Метод иммуноблоттинга был использован для поиска в составе везикул токсина и оценки воздействия везикул на структуру E-кадгерина. Протеомные эффекты везикул оценивали в течение 3х и 5ти часов в культурах клеток аденокарциномы толстой кишки (HT-29) и прямой кишки (SW837) методом двумерного электрофореза с последующей масс-спектрометрической идентификацией белковых отличий.

Методом иммуноблоттинга в везикулах токсигенного штамма был выявлен токсин, который способствовал деградации E-кадгерина. При этом гибели клеток в культурах под воздействием токсин-содержащих везикул выявлено не было. Согласно полученным протеомным данным оба типа везикул способствовали изменению относительного содержания белков, входящих в различные клеточные сигнальные каскады. Основные протеомные различия наблюдались на линии SW-837, под воздействием обоих типов везикул для белков, участвующих в реорганизации клеточного цитоскелета и пролиферации клеток (K2C8, FBLI1, FLNA, ARPC2, SPB5, AP1M1), белков-шаперонов (HYOU1, CALR, CALX, PDIA3, HSPB1) и белков, участвующих в углеводном обмене (ENOG, ENOA, IDHC). Наиболее значимыми оказались выявленные белки нуклеофозмин, серпин B3 и IL18 в культуре, обработанной везикулами NTBF. IL18 способствует хемотаксису дендритных клеток, которые через каскад активированных иммунных клеток способствуют секреции IL10, обуславливающего противовоспалительный эффект в эпителии кишечника. Таким образом при использовании метода двумерного электрофореза были зарегистрированы важные молекулярные события, масштаб которых будет явно более значительным при использовании панорамного ВЭЖХ-МС исследования протеомного отклика культур под влиянием везикул.

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

Противовоспалительное действие везикул *Bacteroides Fragilis* в животной модели DSS-индуцированного колита

Шагалеева О.Ю.¹, Кашатникова Д.А.¹, Кардонский Д.А.¹, Иванов В.А.², Воробьева Е.А.¹, Козакова В.Д.¹, Конанов Д.Н.³, Силантьев А.С.¹, Зоркина Я.А.⁴, Захаржевская Н.Б.¹

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

² Центр молекулярной медицины и диагностики ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

³ Лаборатория математической биологии и биоинформатики НИИ СБМ Роспотребнадзора

⁴ Лаборатория экспериментальной нейробиологии ФГБУ НМИЦ ПН им.В.П.Сербского

Применение про-, пре- и/или постбиотических препаратов может способствовать нормализации состава кишечной микробиоты при воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК), тем самым снижая активность воспаления. Для ряда представителей рода *Bacteroides* отмечены иммуномодулирующие эффекты везикул наружной мембраны. Также известно, что дисбаланс микробиоты отражается на метаболическом профиле летучих органических соединений (ЛОС), являющихся побочными продуктами метаболизма бактерий. Изменения в профиле ЛОС возможно использовать как инструмент диагностики ВЗК и оценки эффективности терапии. В данном исследовании мы предполагаем, что везикулы *Bacteroides fragilis* (JIM) могут влиять на тяжесть течения воспалительного процесса. Свою гипотезу мы проверяем на животной модели DSS индуцированного колита.

Исследование проводилось на мышах линии C57BL/6, возрастом 7-8 недель. Мыши были разделены на три группы: к(n=10), DSS(n=10), DSS+OMV(n=10). Эксперимент включал в себя два цикла воспаление/ремиссия, каждый по 10 дней. Группа DSS+OMV с 11-20 дни получала везикулы концентрацией 1мг/кг. Каждые 3 дня производили взвешивание мышей и забор образцов стула для детекции ЛОС с помощью ГХ-МС с парофазной экстракцией, а также для метагеномного секвенирования. Клинические проявления воспаления оценивали с помощью индекса активности заболевания (ИАЗ). В конце эксперимента животных выводили из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом. Для гистологического исследования толстую кишку извлекали из брюшной полости, фиксировали в формалине и заливали в парафиновые блоки, окрашивали гематоксилином и эозином.

В 1-5 дни эксперимента в группах DSS, DSS+OMV наблюдался одинаковый рост показателей ИАЗ. В следующие пять дней отмечались признаки ремиссии. Во второй цикл, появились значимые отличия в группах DSS и DSS+OMV. По клиническим показателям состояние животных группы DSS значительно ухудшалось, в то время как у животных группы DSS+OMV значения ИАЗ не превышали значений первых дней. Согласно данным, полученным с помощью ГХ-МС с парофазной экстракцией, соотношение ЛОС отличалось во всех анализируемых группах. При этом при воздействии OMV соотношения ЛОС стремились к исходным. Метагеномный анализ по 16s рРНК показал, что состав микробиоты в группе DSS+OMV после курса терапии стремился к первоначальному состоянию, в отличие от группы DSS, не получавшей лечение. Также положительное действие препарата на основе везикул показала гистологическая картина, где изменения в структуре ткани кишечника были менее выражены в группе DSS+OMV.

Препарат на основе везикул *Bacteroides fragilis* показал положительное терапевтическое действие. Для более выраженного долгосрочного терапевтического эффекта необходимо разработка комплексного препарата, позволяющего одновременно снижать активность воспалительного процесса и одновременно восстанавливать микробиоты.

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