

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
Биологический факультет
Кафедра биохимии

VI межвузовская студенческая конференция

**СТУДЕНЧЕСКИЙ
БИОХИМИЧЕСКИЙ ФОРУМ
2026**

17-19 апреля 2026 г.

Материалы конференции

УДК 577
ББК 28.07

*Оргкомитет благодарит руководство Биологического факультета
МГУ за помощь в проведении конференции*

Оргкомитет конференции

А.Г. Катруха (председатель оргкомитета), В.М. Шатов
(ответственный секретарь), А.И. Заболотский, Н.А. Ломов,
М.В. Уфимцева, Д.В. Серебряная, Д.А. Адашева, В.В. Воинова,
Л.Л. Наумов, Л.К. Муранова, М.А. Замотина, Н.Н. Киреева.

СТУДЕНЧЕСКИЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ ФОРУМ – 2026

VI межвузовская студенческая конференция: 17-19 апреля 2026 г.,
Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет.

Материалы конференции/ Отв. ред. А.Г. Катруха.

Сост. В.М. Шатов, А.И. Заболотский.

Научное издание

VI межвузовская студенческая конференция
СТУДЕНЧЕСКИЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ ФОРУМ – 2026
17-19 апреля 2026 г.

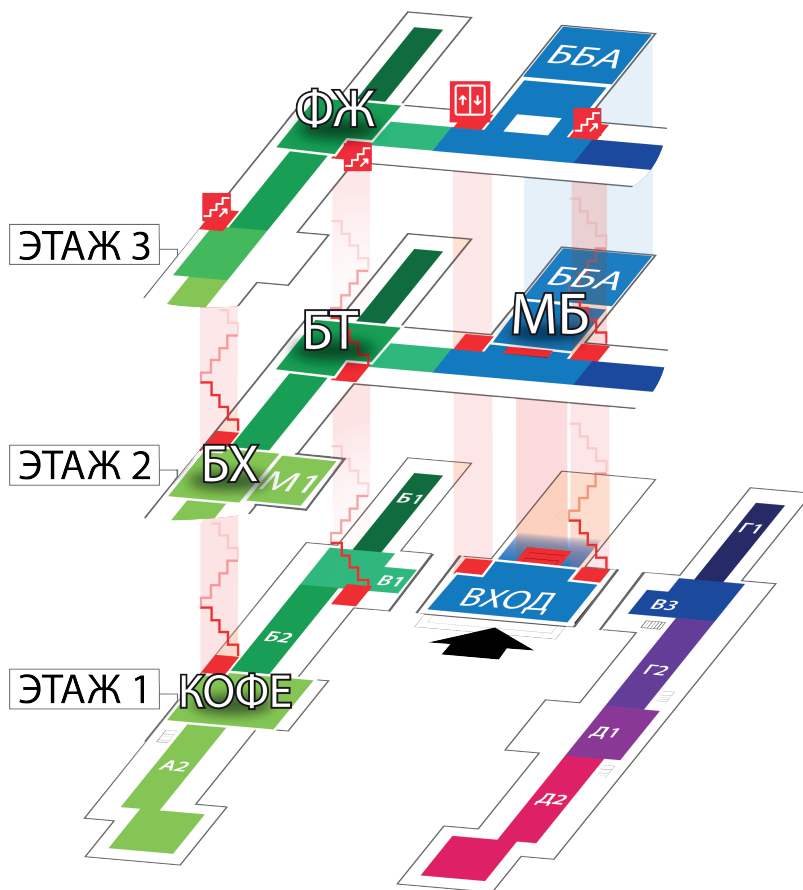
Составление и верстка: В.М. Шатов, А.И. Заболотский

Дизайн обложки: Т.С. У, Н.А. Болоченков

Дизайн: Т.С. У, Н.А. Болоченков

УДК 577
ББК 28.07

Схема здания Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова



Места размещения постерной сессии Студенческого биохимического форума обозначены: БХ - Биохимия, МБ - Молекулярная и клеточная биология, ФЖ - Физиология и медицинская биохимия, БТ - Биотехнология.

Партнеры мероприятия: КЛОНИНГ     
  ФАСИЛИТИ



Актуальная программа Студенческого биохимического форума доступна по QR коду или на сайте <https://studbiochemforum.ru/>



Контакты организаторов конференции
+7 905 511-77-13 Шатов Владислав Михайлович
+7 977 376-00-96 Уфимцева Мария Витальевна



Анализ механизма полифосфат-зависимого кальциевого сигнала в фибробластах кожи

А.М. Есинов (lotarec_firebreath@mail.ru)¹, Е.А. Есинова¹, А.Ю. Винокуров¹, А.Ю. Абрамов^{1,2}

¹ Орловский Государственный Университет им. И.С. Тургенева, Россия, Орёл

² UCL Queen Square Institute of Neurology, Великобритания, Лондон

Введение. Последнее время наблюдается возрастающий интерес исследователей к неорганическому полифосфату (ПолиФ), обнаруженному в широком спектре живых организмов и оказывающему значительное влияние на клеточную пролиферацию, что открывает перспективы его применения в биомедицине. С учетом показанной для ПолиФ способности выступать в качестве сигнальной молекулы (например, глиотрансммиттера), стимулирующей увеличение цитозольной концентрации кальция ($[Ca^{2+}]$), дальнейшие исследования в данном направлении могут в значительной степени расширить понимание механизма биологической активности полимера, что определяет актуальность настоящей работы.

Методы. В исследованиях использовали клеточную культуру фибробластов кожи человека, предоставленную ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России. Для измерения кальциевого сигнала использовали широкопольную флуоресцентную микроскопию с применением ратиометрического флуоресцентного зонда Fura-2 AM (5 мкМ). Для стимулирования увеличения $[Ca^{2+}]$ использовали синтезированный в ОГУ им. И.С. Тургенева ПолиФ со степенью полимеризации 65 (ПолиФ65) и АДФ в концентрациях 50 мкМ.

Результаты. Для выяснения источника поступления $[Ca^{2+}]$ в цитозоль были выполнены исследования после обработки клеток тапсигаргином (1 мкМ), а также в среде без кальция. Блокирование SERCA привело к полному исключению сигнала, тогда как в случае с бескальциевой средой он сохранялся, что говорит о ПолиФ-зависимом высвобождении $[Ca^{2+}]$, из эндоплазматического ретикулума (ЭПР). При этом ингибитор фосфолипазы C (PLC) U73122 (5 мкМ) приводил к кратному снижению амплитуды изменения $[Ca^{2+}]$ и доли ответивших клеток. В большинстве экспериментов с применением PPADS, который в концентрации 20 мкМ блокирует ряд P2X, а также некоторые P2Y рецепторы, выявлено практически полное исключение роста $[Ca^{2+}]$ в ответ на ПолиФ. При этом отмеченный в ряде случаев кальциевый сигнал может объясняться активацией других сигнальных систем, например, механорецепторов, что, однако, требует дополнительных исследований.

Выводы. В клеточной культуре фибробластов ПолиФ65 способен индуцировать кальциевый сигнал путём стимулирования высвобождения $[Ca^{2+}]$ из ЭПР, опосредованного активацией метаботропных пуринорецепторов и PLC.

Результаты получены при финансовой поддержке гранта, реализуемого в рамках Соглашения №075-15-2025-011 от 27 февраля 2025 г.

Механизмы цинк-зависимого повреждения сетчатки глаза при возрастной макулярной дегенерации

Т.А. Асаевич (*timurasaeovich@mail.ru*)¹, Н.Г. Шебардина², М.Л. Шишкин^{2,1}, Е.Ю. Зерный²

¹Первый МГМУ имени И.М.Сеченова, Россия, Москва

²НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) – одна из ведущих причин полной или частичной потери зрения у людей преклонного возраста. Важнейшим фактором развития ВМД является окислительный стресс, вызываемый фотоокислением липофусцина в пигментном эпителии сетчатки. Мобильные формы цинка, высвобождаемые во внеклеточную среду в этих условиях, могут выступать важным медиатором патологических процессов. Цель работы - характеристика изменения гомеостаза цинка при ВМД, а также поиск внеклеточных сигнальных факторов - мишеней свободного цинка.

Методы. Содержание цинка в водянистой влаге пациентов с ВМД, а также в кондиционной среде клеток пигментного эпителия сетчатки ARPE-19 определялось атомно-адсорбционной спектрометрией. Потенциальные внеклеточные мишени цинка были определены при помощи структурных классификаторов. Уровень секреции отобранных сигнальных факторов, экспрессируемых клетками ARPE-19 в кондиционную среду, устанавливался методом иммуноблоттинга. Способность ионов цинка координировать отобранные факторы определялась методом атомно-адсорбционной спектрометрии, сопряженной с равновесным диализом. Изменения четвертичной структуры белков в присутствии цинка анализировались методом динамического светового рассеяния (ДСР).

Результаты. Установлено более чем двукратное увеличение содержания цинка в образцах водянистой влаги пациентов с ВМД. На культуре клеток ARPE-19 показано, что окислительный стресс вызывает секрецию мобильных форм цинка в кондиционную среду. Впервые продемонстрировано, что внеклеточной мишенью Zn^{2+} в патологических условиях, может быть IGF-1. Установлено высокоаффинное связывание IGF-1 с ионами цинка, константа диссоциации $KD=7,46 \times 10^{-7}$ М. При помощи ДСР установлена способность IGF-1 к устойчивому комплексообразованию с ионами цинка, которое выражается в увеличении температуры плавления белка и изменении его четвертичной структуры. На клеточной модели показано, что окислительный стресс приводит к одновременному увеличению секреции Zn^{2+} и IGF-1.

Выводы. Полученные результаты указывают на возможность образования Zn^{2+} -связанного конформера IGF-1 в физиологических условиях, что может модулировать функциональные свойства этого белка.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 24-15-00171.

Исследование структуры и свойств α В-кристаллина дикого типа и его мутантной формы R163C

Е.В. Блинова (pan_kate@list.ru)^{1,2}, Ю.Ю. Стройлова²

¹ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Россия, Москва

² Отдел биохимии животной клетки, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, Россия, Москва

Введение. α В-кристаллин – малый белок теплового шока, играющий ключевую роль в протеостазе и предотвращении агрегации белков. Мутации в его гене приводят к развитию ряда заболеваний, таких как катаракта, патологии сердечных и скелетных мышц. Специфическая мутация R163C в С-концевом домене α В-кристаллина связана с дилатационной кардиомиопатией. Также известно, что α В-кристаллин подавляет фибриллизацию α -синуклеина, белка, который образует патологические агрегаты при болезни Паркинсона. Целью данной работы является сравнение структуры, олигомерного состояния и способности модулировать фибриллогенез альфа-синуклеина для α В-кристаллина дикого типа и мутантной формы R163C.

Методы. Для сравнения структуры дикого типа и мутанта использовали методы электрофореза в денатурирующих и нативных условиях, спектроскопию кругового дихроизма для оценки вторичной структуры и динамическое светорассеяние (DLS) для характеристики олигомерного состояния и термостабильности. Антиамилоидную активность оценивали, детектируя кинетику образования амилоидных структур с помощью флуоресценции тиофлавина Т. Для исследования морфологии агрегатов использовали метод трансмиссионной флуоресцентной микроскопии.

Результаты. С помощью методов электрофореза было обнаружено, что мутантный α В-кристаллин R163C образует несколько видов олигомеров, в том числе за счет образования дисульфидных связей. Однако, гидродинамический диаметр олигомеров α В-кристаллина в растворе меняется незначительно, и стабильность при нагревании до 60°C изменяется незначительно. Спектры кругового дихроизма не показали значимых различий во вторичной структуре α В-кристаллина дикого типа и R163C. Показано, что наличие мутации R163C увеличивает скорость образования фибрилл альфа-синуклеина при взаимодействии с α В-кристаллином.

Выводы. Обнаруженное в работе изменение олигомерной структуры и снижение шапероно-подобной активности мутантной формы α В-кристаллина R163C в отношении альфа-синуклеина может быть одной из причин патологических изменений в сердечных мышцах и других тканях у организмов, несущих данную мутацию.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 24-44-20003.

Свободные жирные кислоты не вызывают резистентности к инсулину в адипоцитах

П.А. Богданова (pbgdv@mail.ru)^{1,2}, Н.В. Поджуйченко², А.В. Воротников²

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²НМИЦ Кардиологии имени академика Е.И. Чазова, Россия, Москва

Введение. Свободные жирные кислоты (СЖК) считаются ключевым фактором в развитии резистентности к инсулину (ИР) в мышцах и печени. Роль СЖК в развитии ИР жировой ткани остается спорной. Адипоциты имеют разный фенотип, зависящий от адипогенной дифференцировки клеток-предшественников. В данной работе мы изучали влияние пальмитата (РА) и олеата (ОА) на адипоциты 3T3-L1 мышей, уделяя особое внимание их созреванию, накоплению липидов и поглощению глюкозы.

Методы. Адипоциты 3T3-L1 мыши культивировали и дифференцировали стандартно и для оценки влияния СЖК обрабатывали комплексами РА или ОА с альбумином (БСА). Транспорт глюкозы измеряли по поглощению [3H]-2-дезоксиглюкозы. Экспозицию транспортера глюкозы GLUT4 на клеточной мембране определяли методом флуоресцентной микроскопии в адипоцитах 3T3-L1, стабильно экспрессирующих химеру Мус-Glut4-mCherry. Экспрессию карнитинпальмитоилтрансферазы (CPT1) и термогенина (UCP1) определяли методом вестерн-блоттинга.

Результаты. Мы обнаружили, что после дифференцировки *in vitro* созревание адипоцитов сопровождается изменением их фенотипа, что связано с изменением экспрессии маркеров окисления жирных кислот (UCP1 и изоформ CPT1) в сторону накопления липидов. В процессе созревания адипоциты увеличивали поглощение глюкозы, в основном, инсулиннезависимым образом. Это было связано с повышенным выходом Мус-Glut4-mCherry на плазматическую мембрану в отсутствие инсулина. Ни РА, ни ОА не изменяли базального или стимулируемого инсулином поглощения глюкозы в незрелых или зрелых адипоцитах.

Выводы. При созревании адипоциты теряют маркеры окисления жиров (CPT1B, UCP1), предполагая изменение их фенотипа с бежевого на белый. Избыточный уровень СЖК не вызывает ИР в адипоцитах, а адипоциты даже увеличивают поглощение глюкозы при созревании, экспонируя GLUT4.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 23-75-00027

Влияние мутации L137M на структуру и свойства α В-кристаллина

Н.А. Бугалдай (*bugaldaj-n@yandex.ru*)¹, М.В. Медведева²

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. α В-кристаллин является шапероном, участвующим в поддержании нормального функционирования белков в хрусталике, мышцах, сердце и мозге [1]. Функция α В-кристаллина в значительной степени зависит от его α -кристаллинового домена. В состав этого домена входит L137 [2]. Целью данной работы является исследование влияния мутации L137M α В-кристаллина на его шапероноподобную активность.

Методы. Для изучения роли мутации L137M была получена рекомбинантная плаزمида методом сайт-направленного ПЦР мутагенеза. Мутантную и дикую формы белка нарабатывали в клетках *E. coli* с последующей очисткой, включающей осаждение сульфатом аммония, диализ и ионообменную хроматографию. Структурные изменения оценивали с помощью спектроскопии кругового дихроизма, нативного фореа, дифференциальной сканирующей калориметрии, триптофановой флуоресценции и динамического рассеяния света. Шапероноподобную активность мутантного белка оценивали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа с α -синуклеином и способности подавлять аморфную агрегацию каталазы.

Результаты. Введение мутации снижает термодинамическую стабильность белка. При этом мутант сохраняет способность формировать олигомеры. Также, и α В-кристаллин дикого типа, и α В-кристаллин с мутацией L137M взаимодействуют с α -синуклеином по результатам ИФА. Эксперименты с каталазой показали, что нет статистически значимой разницы в шапероноподобной активности белка дикого типа и белка с мутацией L137M.

Выводы. Было обнаружено, что мутация в лейцине по 137 положению в α -кристаллиновом домене α В-кристаллина не влияет на его способность к осуществлению шапероноподобной активности и не изменяет количество субъединиц в олигомере. При этом снижается термоустойчивость белка.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 24-44-20003.

Литература

1. Iwaki T., Kume-Iwaki A., Goldman J. E. Cellular distribution of alpha B-crystallin in non-lenticular tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 38, 31-39 (1990). 2. McFarland, R., Noroozi, R., Miller, A.P. et al. Dynamic fibrillar assembly of α B-crystallin induced by perturbation of the conserved NT-IXI motif resolved by cryo-EM. *Nat Commun* 15, 10336 (2024).

**Кислая фосфолипаза А2 из яда каменистого щитомордника
Gloydius saxatilis — аминокислотная последовательность и
фосфолиполитическая активность**

А.Е. Волков (*nitro-04@yandex.ru*)^{1,2}, А.А. Василевский², И.Ю. Торпыгин³,
Р.Х. Зиганшин²

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, Москва

³Институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Россия, Москва

Введение. Фосфолипазы А₂ — одни из ключевых токсинов яда змей, они играют важнейшую роль в развитии отравления при укусе. Они могут отличаться по структуре и иметь разные типы активностей: нейротоксическую, миотоксическую и другие. Этим белкам посвящена богатая научная литература, однако многие аспекты разнообразия их структуры и функций остаются невыясненными. Мы впервые изучили фосфолипазу А₂ из яда каменистого щитомордника *Gloydius saxatilis*, распространенного на Дальнем Востоке.

Методы. Эксклюзионная, обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография, химическая модификация и селективный гидролиз белков, секвенирование по Эдману, МАЛДИ, тандемная масс-спектрометрия, флуориметрия, статистическая обработка данных.

Результаты. В два этапа жидкостной хроматографии мы очистили фосфолипазу А2 из яда каменистого щитомордника *G. saxatilis*. МАЛДИ масс-спектрометрический анализ позволил установить среднее значение молекулярной массы, составившее $\approx 13,7$ кДа. Для секвенирования белка мы воспользовались сочетанием методов селективного протеолиза, ступенчатой деградации по Эдману и тандемной масс-спектрометрии. В результате мы выяснили полную аминокислотную последовательность новой фосфолипазы А2, состоящую из 122 остатков. Сравнение с фосфолипазами из яда других змей показало, что наиболее близким известным гомологом является белок из родственного вида *Gloydius intermedius*. С использованием флуорогенного субстрата 10-Рутене-РС при помощи флуориметрии и компьютерной обработки данных мы построили график зависимости удельной активности фермента от концентрации субстрата. Анализ этого графика позволил установить значения $V_{\max} \approx 70$ мкмоль/(мин $\times$ мг) и $K_m \approx 4,5$ мкМ.

Выводы. 1. Из яда щитомордника *G. saxatilis* очищена новая фосфолипаза А2. 2. Установлена полная аминокислотная последовательность новой фосфолипазы. 3. Впервые установлены кинетические параметры фосфолиполитической активности для фермента из яда змей рода *Gloydius*.

Работа выполнена при финансовой поддержке министерства науки и высшего образования Российской Федерации (номер электронного бюджета 13.2251.21.0160). Благодарим В.Г. Старкова и Ю.Н. Уткина за помощь в работе.

Получение и сравнение биохимических свойств неорганических пирофосфатаз *Pseudomonas aeruginosa* и *E. coli*.

А.А. Воронин (a.voronin2@g.nsu.ru)^{1,2}, И.П. Оскорбин¹, М.Л. Филипенко¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия

²Новосибирский национальный исследовательский университет, Новосибирск, Россия

Введение. Цитоплазматические пирофосфатазы необходимы для гидролиза пирофосфата, что смещает термодинамическое равновесие реакций синтеза ДНК, РНК и белков за счёт удаления образующегося пирофосфата. На практике пирофосфатазы применяются для увеличения эффективности полимеразных реакций, в том числе ПЦР и LAMP. На данный момент разнообразие пирофосфатаз описано слабо, а известные ферменты описаны фрагментарно. Таким образом, является актуальным получение новых пирофосфатаз и систематизированное описание биохимических свойств пирофосфатаз, перспективных для практических приложений.

Методы. Кодирующие последовательности пирофосфатаз *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* нарабатывали при помощи ПЦР и клонировали в вектор для экспрессии рЕТ28aМ посредством рестриктазно-лигазного метода. Отсутствие нуклеотидных замен в плаزمидах подтверждали секвенированием по Сэнгеру. Рекомбинантные пирофосфатазы нарабатывали в клетках *E. coli* штамма BL21 (DE3) рLysS и очищали металл-хелатной хроматографией. Субстратом для анализа активности служил пирофосфат натрия, количество фосфата после проведения реакции определяли колориметрическим методом с гептамолибдатом аммония.

Результаты. Было проведено клонирование, очистка и сравнение биохимических свойств пирофосфатаз *E. coli* и *Pseudomonas aeruginosa*, последняя была выделена впервые. Оптимальные условия для пирофосфатазы *E. coli* — 55 °С, pH 8,0, 50–100 мМ KCl, 4–8 мМ Mg²⁺; *P. aeruginosa* — 55 °С, pH 8,5, 50–100 мМ KCl, 4–8 мМ Mg²⁺. Оба фермента теряли активность со скоростью 1%/мин при +30°С при инкубации без субстрата. K_m составила 0,20 и 0,21 мМ, V_{max} 67,6 и 69,8 мкМ/мин для пирофосфатаз *E. coli* и *P. aeruginosa* соответственно.

Выводы. Показано, что пирофосфатазы *E. coli* и *P. aeruginosa* имеют практически идентичные биохимические характеристики, несмотря на 71% гомологию аминокислотных последовательностей. В дальнейшем выбрать оптимальный фермент для повышения эффективности *in vitro* полимеразных реакций.

Исследование поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 125012300657-2.

Влияние кислотно-основного состава буфера на эффективность лизиса и высвобождение группоспецифического антигена *Streptococcus pyogenes*

С.М. Воронцова (sofi.v2017@yandex.ru)^{1,2}, А.А. Семейкина², А.Е. Урусов²

¹Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Институт фармации и биотехнологии, Россия, Москва

²Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Россия, Москва

Введение. *Streptococcus pyogenes* — грамположительная бактерия, вызывающая ангину, скарлатину и стрептодермию. При скрытом течении или неправильной терапии возможны тяжелые инвазивные инфекции и аутоиммунные осложнения. Иммунохроматографические тесты (ИХА) — доступный и быстрый метод диагностики, не требующий оборудования или специальных навыков. Для самостоятельного применения необходим простой этап пробоподготовки. Затруднение могут вызывать многослойность бактериальной стенки и присутствие в мазке остатков пищи, клеток эпителия, слизи и других микроорганизмов флоры. Цель работы — оптимизировать буфер для экстракции антигена. Это позволит разработать экспресс-тест для выявления стрептококковых инфекций.

Методы. Для реализации ИХА использованы моноклональные антитела к стрептококку А, культура клеток стрептококка А, латексные частицы. Конъюгацию частиц с биореагентами проводили с помощью карбодиимидно - сукцинимидной сшивки. Изучен и оптимизирован двухкомпонентный буфер для экстракции антигена. Проверены разновидности фосфатного и Трис буферов. Варьировались молярности основ (10-100 мМ) и pH (7,5-9,5) и концентрации неионогенных детергентов: Tween-20, TritonX100 и Pluronic F68 (0, 0,05, 0,1 и 1 %). Эффективность оценивали по чувствительности, специфичности и воспроизводимости, что позволило добиться высокой надежности ИХА.

Результаты. Разрушение клеточной стенки с полным высвобождением группоспецифического антигена обеспечивает нестабильная азотистая кислота – окислитель и нитрозирующий агент. Ее получают смешением буферов перед проведением анализа. Использование 50 мМ Na-фосфатного буфера (pH=7.5) с содержанием уксусной кислоты 150 мМ в буфере 1 позволило увеличить чувствительность тест-системы с 10^7 до 10^5 КОЕ/мл. Добавление в рабочий буфер 2 детергента TritonX100 (0,5%) способствовало снижению порога определения до 10^3 КОЕ/мл и снижению риска ложноположительных результатов из-за неспецифического связывания компонентов мазка.

Выводы. Оптимизированы параметры буферов для эффективной экстракции антигена стрептококка А из биологического образца. Данное исследование ляжет в основу разработки высокочувствительного экспресс-теста для быстрой и точной диагностики заболевания.

Направленный мутагенез как инструмент оптимизации каталитических и других биохимических свойств рекомбинантной декстраназы

Я.Д. Горинов (y4r9@yandex.ru)¹, П.В. Волков^{1,2}

¹ Университет науки и технологий МИСИС, Москва

² ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

Введение. Синхронно с развитием методов моделирования белковых структур, возникает необходимость в алгоритме, позволяющем прогнозировать аминокислотные замены, отвечающие заданным функциональным требованиям. В данной работе рассматривается получение рекомбинантной декстраназой RpDex49 с измененной структурой, обладающей увеличенной активностью в области более низких значений температур, что является довольно важной проблемой для медицины, где применение этого фермента ограничено низкой активностью в физиологических условиях организма.

Методы. На основании гипотезы о связи между диапазонами термостабильности фермента и температурного оптимума его активности были произведены аминокислотные замены в конформационно-жесткой области третичной структуры RpDex49: D432N, T363A, D432E, I414A. Первые три замены были предложены вблизи активного центра, тогда как четвертая обеспечивала уменьшение гидрофобного взаимодействия между звеньями β -спирали, находящимися под каталитической щелью. Амплитуды конформационных колебаний определялись в процессе белковой динамики через расчет нормальных мод колебаний. В качестве референсной модели использовалась на 98,95% гомологичная структура декстраназы гриба *P.miniululeum*.

Результаты. Рекомбинантные формы мутантных ферментов успешно экспрессировали в штамме GS115 метилотрофных дрожжей *P.pastoris*. Измерение активности КЖ показало сдвиг максимума активности 55→50 °C для всех замен. При этом сохранение остаточной активности в целевом диапазоне (30-40 °C) оказалось наибольшим для D432N и I414A, а именно 70% от максимальной активности при 40 °C, тогда как у нативного белка она падает до 45%. При сравнительном анализе произведенных изоформ белка наиболее термодинамически стабильным при 50 °C оказались замены D432N и T363D, продемонстрировав падение активности всего на 40% в течение 30 мин, что довольно хорошо согласуется с расширенным профилем температурной активности для данных модификаций.

Выводы. Предлагаемая в исследовании стратегия расчета аминокислотных замен может быть транслирована и на другие ферменты, что расширит область их применения в медицине, пищевой промышленности и биотехнологии в случаях, когда требуется работа в заданных температурных режимах.

Исследование выполнено при поддержке Фонда Содействия Инновациям, заявка СтС-509389.

Идентификация опухоль-специфичных антител методом молекулярного дисплея

Я.А. Деев (*jakobsf205@gmail.com*)^{1,2}, Ю.А. Мокрушина¹, С.С. Терехов¹, И.В. Смирнов¹

¹ГНЦ РФ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

²Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Репертуары опухоль-инфильтрирующих В-лимфоцитов (Т1В) представляют интерес как источник вариантов антител, потенциально распознающих антигены опухолевых клеток. Для их анализа применяются методы молекулярного дисплея, основанные на селекции клонов из библиотек антител по связыванию с клетками-мишенями. Целью работы была идентификация опухоль-специфичных антител Т1В методом молекулярного дисплея.

Методы. Использовали нативно спаренные библиотеки одноцепочечных переменных фрагментов антител (scFv), полученные с использованием микрофлюидных технологий из репертуаров Т1В. Селекцию клонов проводили методом дрожжевого дисплея с использованием опухолевых клеток. Динамику обогащения клонов оценивали проточной цитометрией по уровню окрашивания дрожжевых клеток с использованием флуоресцентно меченных anti-FLAG антител. Клональный состав оценивали методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) переменных областей антител с анализом последовательностей CDR3 тяжелой цепи.

Результаты. Проточная цитометрия показала увеличение доли FLAG-дрожжевых клеток после раундов отбора на опухолевых клетках, что свидетельствует об обогащении опухоль-специфичных клонов. Анализ CDR3 тяжелой цепи показал обогащение отдельных клонов при снижении клонального разнообразия. В ходе селекции были идентифицированы два клон scFv: доля первого увеличилась с 0,63% до 36%, второго – с 0,007% до 72,6%. Отобранные клоны scFv были реконструированы в формате полноразмерных иммуноглобулинов класса IgG. Иммунопреципитация с последующим масс-спектрометрическим анализом позволила идентифицировать виментин и рецептор PDGF (PDGFR) в качестве мишеней.

Выводы. Метод молекулярного дисплея позволяет проводить селекцию антител из дрожжевых библиотек биоразнообразия репертуаров Т1В. Селекция приводит к клональному обогащению и позволяет идентифицировать опухоль-специфичные клоны антител. Идентифицированные антитела могут быть использованы для изучения опухоль-ассоциированных антигенов и молекулярных механизмов их распознавания, а также для создания иммунотерапевтических агентов на основе антител для таргетной терапии рака.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ по Соглашению № 075-15-2025-488

MnSTARD3L из гребешка *Mimachlamys nobilis* – неспецифичный переносчик ксантофиллов

Е.Е. Доминник (dominnikjr@gmail.com)^{1,2}, Ю.Б. Слонимский², Н.А. Егоркин^{2,3}

¹ Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

² ФИЦ биотехнологии РАН, Россия, Москва

³ Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. *Mimachlamys nobilis* – экономически значимый вид двустворчатых моллюсков, золотистая окраска которых объясняется наличием желтых пигментов – каротиноидов. Их накопление коррелирует с экспрессией гена, кодирующего STARD3-подобный белок MnSTARD3L, несущий предполагаемый липид-связывающий домен START семейства. Ранее для START-домена гомологичного белка из тутового шелкопряда BmCBP была продемонстрирована способность к связыванию и переносу каротиноидов, а гомологичный белок человека HsSTARD3 к переносу каротиноидов не способен. Так как способность MnSTARD3L связывать или переносить каротиноиды ранее не исследовалась, целью данной работы являлась функциональная характеристика MnSTARD3L как потенциального каротиноид-связывающего белка.

Методы. Рекомбинантный START-домен MnSTARD3L был наработан в экспрессионном штамме *E. coli* C41(DE3) для получения апоформы, а также в клетках C41(DE3), несущих дополнительные плазмиды, кодирующие ферменты синтеза каротиноидов. Высокоочищенный белок получали методами металл-аффинной и эксклюзионной хроматографии. Дополнительно связывание MnSTARD3L с каротиноидами проверяли путем их доставки *in vitro*. Способность к связыванию и переносу каротиноидов белком MnSTARD3L исследовали методом гель-фильтрации с полноспектральной детекцией. Экстракты каротиноидов из клеточных мембран или каротиноид-связывающих белков анализировали методами обращенно-фазовой ВЭЖХ, ТСХ и масс-спектрометрии.

Результаты. Установлено, что MnSTARD3L способен к связыванию ксантофиллов при реконституции комплексов с каротиноидами *in vitro*. При экспрессии в клетках *E. coli*, продуцирующих каротиноиды, MnSTARD3 оказывается неспособным связывать бета-каротин или эхиненон, однако способен связывать зеаксантин и астаксантин. Примечательно, что наиболее эффективно белок извлекает из клеток редкие продукты окисления зеаксантина, такие как апо-9-родоксантинон и, предположительно, триоксоэпшпольксантон, не проявляя собственной оксидазной активности в отношении каротиноидов. MnSTARD3L способен к селективной передаче каротиноидов в другие белки: зеаксантина в BmCBP и апо-9-родоксантинона в AnaCTDH.

Выводы. MnSTARD3L способен образовывать комплексы с некоторыми ксантофиллами, что может объяснить его участие в накоплении каротиноидов в тканях морского гребешка.

Применение хомогенетической системы на основе оксидазы D-аминокислот (DAAO) для модуляции уровня АФК в β -клетках островков Лангерганса и оценки влияния на секрецию инсулина

М.В. Журавлева (06042003maria@gmail.com)¹, Р.М. Карпов², А.А. Можеев^{2,3}

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, Москва

³Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова, Москва, Россия

Введение.

Сахарный диабет 1 типа (СД1) - аутоиммунное заболевание, сопровождающееся утратой функционально активных β -клеток поджелудочной железы. Считается, что некроз β -клеток возникает под воздействием активных форм кислорода (АФК) и провоспалительных цитокинов. Данные *in vivo* и *in vitro* демонстрируют расхождения. Противоречия обусловлены отсутствием методов селективной индукции АФК без активации вышестоящих компонентов сигнальных каскадов. Для решения проблемы разработана хомогенетическая система, обеспечивающая контролируемую генерацию H_2O_2 в β -клетках.

Методы. Была собрана плазмидная конструкция Ins2-HyPer7-DAAO, обеспечивающая контролируемую генерацию H_2O_2 . Добавление D-аминокислот приводит к их окислению под действием DAAO, что способствует локальному накоплению H_2O_2 , детектируемой с помощью генетически кодируемого биосенсора HyPer7. Активация конструкции и изменение уровня АФК регистрировались методом TIRF. Эксперименты проводились на островках Лангерганса, выделенных из мышей линии C57Bl/6 и трансдуцированных аденоассоциированными вирусами серотипа DJ (AAV-DJ). Функциональная активность островков оценивалась методом ИФА. Также была продемонстрирована возможность хирургической доставки AAV-DJ с плазмидной конструкцией *in vivo* в поджелудочную железу мыши.

Результаты. В ходе работы показано, что добавление D-норвалина приводит к активации конструкции и индуцированной продукции H_2O_2 , что подтверждается изменением флуоресцентных характеристик биосенсора HyPer7. Моделирование окислительного стресса сопровождается изменением уровня секреции инсулина. Успешная доставка и экспрессия конструкции Ins2-HyPer7-DAAO *in vivo* в островках Лангерганса была подтверждена иммуногистохимическим анализом.

Выводы. Полученные данные демонстрируют возможность использования системы для изучения роли АФК в регуляции функции β -клеток.

Исследование выполнено в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ № 124051400036-4.

Разработка многокомпонентного повехностного ДНК-зонда для точного обнаружения однонуклеотидных вариантов

К.А. Зеленин (mr.kzelenin100@gmail.com)¹, М.Ю. Бобкова¹, Д.А. Кадырова¹

¹Национальный исследовательский университет ИТМО, Россия,
Санкт-Петербург

Введение. Быстрая и точная идентификация однонуклеотидных вариантов (SNV) необходима для диагностики инфекций, выявления мутаций и мониторинга антибиотикорезистентности патогенов, включая *Mycoplasma genitalium*. Существующие методы ограничены длительностью анализа, потребностью в достаточном количестве материала и недостаточной селективностью к SNV. Особенно актуальна разработка сенсоров, способных работать при низких концентрациях аналита и в условиях поверхностной иммобилизации. Целью работы стала разработка нового быстрого и точного 4WJ ДНК-сенсора для высокоселективной детекции SNV и сравнение его функциональности на поверхности и в растворе.

Методы. Был сконструирован бинарный 4WJ ДНК-сенсор, включающий длинную f-«руку», короткую SNV-специфичную m-«руку» и универсальный молекулярный маячок (UMB). F и m-руки содержали аналит-связывающий и UMB-связывающий домены. UMB был модифицирован флуорофором (5') и гасителем (3'). Сенсор иммобилизовали на поверхности агарозных бусин посредством стрептавидин-биотиновой системы, m-олигонуклеотид был биотинилирован, а к агарозным бусинам прикреплен стрептавидин. Проведена оптимизация концентраций компонентов, определены фактор селективности, предел обнаружения и кинетика гибридизации в растворе и на поверхности методом флуоресцентной регистрации на планшетном ридере Tecan Spark. Для оценки кинетики использовались 2 параметра – $t_{1/2}$ и время выхода на плато.

Результаты. Сборка 4WJ-конструкции в присутствии целевой последовательности приводила к раскрытию шпильки UMB и увеличению флуоресценции. Анализ показал высокую селективность сенсора к однонуклеотидным заменам: различие сигналов между полностью комплементарной и SNV-содержащей последовательностью обеспечило высокий фактор селективности. Оптимизация концентраций компонентов снизила предел обнаружения до низких концентраций аналита. Иммобилизованная система на агарозной поверхности сохранила чувствительность и специфичность сенсора. Кинетический анализ показал сокращение времени детекции до менее чем 2 минут.

Выводы. Разработан поверхностный многокомпонентный 4WJ ДНК-сенсор, обеспечивающий быструю и селективную детекцию SNV в низких концентрациях. Конструкция демонстрирует эффективную работу как в растворе, так и на поверхности, что расширяет возможности практического применения в молекулярной диагностике инфекционных и генетических заболеваний.

**Кальциевые осцилляции, как механизм поддержания
инсулинорезистентности в сенесцентных мультипотентных
стромальных клетках жировой ткани**

*С.С. Каменков (kams200303@gmail.com)¹, В.И. Чечехин¹, К.Ю. Кулебякин¹,
Е.С. Чечехина¹*

¹МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. При старении мультипотентных стромальных клеток (МСК) жировой ткани происходит развитие инсулинорезистентности и нарушение их адипогенной дифференцировки. Эти изменения могут приводить к нарушению метаболизма жировой ткани. В норме действие инсулина приводит к активации канонических PI3K и MAPK сигнальных каскадов, регулирующих метаболизм, клеточное деление и дифференцировку. Ранее нами было показано снижение чувствительности к инсулину у МСК пожилых доноров, связанное с повышенным базальным уровнем активности канонических инсулиновых сигнальных каскадов. Однако механизмы, опосредующие развитие инсулинорезистентности на фоне старения, оставались неизвестными.

Методы. Сенесцентные и молодые МСК получены от доноров > 65 лет и < 45 лет соответственно. Уровень белков оценивался методом вестерн-блоттинга с разделением фракций. Локализация белка внутри клеток определялась с помощью иммуноцитохимии. Изменение уровня внутриклеточного кальция оценивалось по данным микроскопии с использованием Ca^{2+} -чувствительного флуоресцентного красителя Fluo-8.

Результаты. В данной работе мы показали, что сенесцентные МСК при воздействии инсулина развивают высокоамплитудные кальциевые осцилляции, которые не наблюдаются в клетках молодых доноров. Одновременно с этим в МСК пожилых доноров мы обнаружили повышенный уровень ядерного PTEN – ингибитора инсулинового сигнального каскада. По данным иммуноцитохимии воздействие инсулином в сенесцентных МСК приводило к повышению уровня данного белка в ядре, которое не наблюдалось в молодых клетках. Возникающие осцилляции, вероятно, усиливают Ca^{2+} -зависимые механизмы переноса PTEN, тем самым способствуя его ядерному накоплению.

Выводы. Таким образом, при развитии инсулинорезистентности в сенесцентных МСК происходит переключение инсулинового сигнального каскада с канонических путей на кальций-зависимый ответ. Инсулин-зависимые высокоамплитудные кальциевые осцилляции способствуют повышению уровня ядерного PTEN. Накопление данного белка в ядре способствует поддержанию генетической стабильности и останавливает клеточный цикл. Такая адаптация приводит к метаболической дисрегуляции и развитию возраст-ассоциированных патологий.

Работа поддержана грантом РНФ #25-75-30005.

Оптимизация условий получения всех фенотипов протеасом человека

А.О. Каракчиева (karakchievaa21@gmail.com)¹, Г.А. Саратов², А.А. Кудряева², А.А. Белогуров²

¹Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, Москва

Введение. Протеасомы представлены в клетках несколькими фенотипами, иммуно-, тимо-, спермато- и конститутивной протеасомами, различающимися набором каталитических субъединиц. Эти фенотипы формируют различные профили протеолиза и выполняют тканеспецифические функции: от поддержания протеостаза до презентации антигенов. Целью данной работы являлась оптимизация условий выделения всех фенотипов протеасом из эукариотических систем экспрессии для последующего изучения их функциональных свойств и оценки в качестве терапевтических мишеней.

Методы. Были созданы генетические конструкции, кодирующие субъединицы протеасом PSMB4, PSMB5, PSMB8, PSMB11 и PSMA8, слитые с НТВН-тэгом. Препараты экспрессировали в стабильных клеточных линиях HEK293T, Raji, HeLa и Ramos. Выделение осуществляли с помощью стрептавидин-агарозы с последующим отщеплением тэга TEV-протеазой и гель-фильтрацией на колонке Superose 6. Каталитическую активность оценивали с использованием флуорогенных пептидных субстратов (Suc-LLVY-AMC, Boc-LRR-AMC, Z-LLE-AMC) и белковых субстратов (MBP, казеин).

Результаты. Для всех фенотипов протеасом были подобраны оптимальные клеточные линии, обеспечивающие воспроизводимую экспрессию. Наибольшая эффективность отделения TEV-протеазы при гель-фильтрации достигается в буфере с 1M NaCl. Полученные препараты демонстрировали каталитическую активность как на пептидных, так и на белковых субстратах, при этом профили расщепления флуорогенных субстратов соответствовали ожидаемым для каждого фенотипа, что подтверждает корректность сборки и субъединичного состава выделенных комплексов.

Выводы. Разработанный подход позволяет получать все известные фенотипы человеческих протеасом в рекомбинантной системе, что устраняет необходимость использования животных тканей и обеспечивает стандартизацию препаратов. Созданная панель протеасом может служить универсальным инструментом как для фундаментальных исследований, например, сравнительного анализа субстратной специфичности фенотипов и изучения механизмов антигенного процессинга, так и для прикладных задач, включая скрининг фенотип-селективных ингибиторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ 23-74-00053.

Идентификация белкового окружения короткой изоформы SRP19

Д.К. Ковалева (kovdinnk@gmail.com)^{1,2}, Е.О. Поряднева^{2,3}, А.С. Дерябин², Ю.П. Рубцов²

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, Москва

³ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова, Россия, Москва

Введение. SRP (signal recognition particle) — рибонуклеопротеиновый комплекс, обеспечивающий ко-трансляционный транспорт секреторных и мембранных белков к ЭПР. Белок SRP19 необходим для стабилизации спиралей 7SL РНК в ядрышке. Результаты Ribo-seq демонстрируют, что в naïve/resting Т-клетках преимущественно экспрессируется ранее не охарактеризованная изоформа SRP19, укороченная с С-конца (short), тогда как при активации доминирует классическая изоформа (long). Переключение в экспрессии изоформ указывает на их возможное функциональное расхождение, поэтому целью данной работы стало сравнительное исследование белкового окружения обеих изоформ для выявления уникальных взаимодействий.

Методы. В клетках линии HEK293Т транзистентно сверхэкспрессировали short и long SRP19, слитые с биотинлигазой TurboID-3xFLAG. Методами вестерн-блот (WB) анализа и полисомного профилирования проверяли возможность рекомбинатных белков образовывать SRP-комплексы. Белковое окружение изоформ маркировали TurboID-зависимым биотинилированием с последующей аффинной очисткой на стрептавидин-агарозе и идентификацией белков методом LC-MS/MS. Протеасомную деградацию оценивали количественным WB анализом клеток, обработанных ингибитором протеасомы MG132.

Результаты. WB анализ клеточных лизатов показал наличие обеих изоформ в ядерных фракциях. Полисомный профиль продемонстрировал ассоциацию SRP19 long с рибосомными субъединицами, тогда как SRP19 short преимущественно детектировался в верхних фракциях градиента. Белковое окружение SRP19 long было обогащено белками биогенеза рибосом, компонентами SRP-комплекса и ассоциированными рибосомными белками. Для SRP19 short характерно обогащение белками ремоделирования хроматина и факторами сплайсинга. Обработка ингибитором протеасомы MG132 вызывала выраженное накопление только SRP19 short.

Выводы. Анализ распределения в полисомном градиенте и состава белкового окружения изоформ показали, что укороченная изоформа SRP19 не входит в состав SRP. Напротив, данные указывают на её вероятное участие в процессах ремоделирования хроматина и регуляции сплайсинга. При этом клеточные уровни обеих изоформ SRP19, по-видимому, определяются балансом между стабилизацией в составе белковых комплексов и протеасомной деградацией.

Разработка модели фибротических изменений для исследования биодоступности IGF в первичной культуре кардиофибробластов

К.В. Ковалева (*xenia.v.kovaleva@mail.ru*)¹, Д.В. Серебряная¹

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Сердечная недостаточность (СН) - крайне распространенная патология, которой часто сопутствуют фибротические изменения миокарда. Протеолитические фрагменты связывающего IGF белка IGFBP-4, образующиеся в результате специфичного протеолиза под действием протеазы PAPP-A, являются прогностическими маркерами СН. Высвобождающийся в ходе протеолиза IGF способствует сохранению жизнеспособности клеток сердца. Активация данного процесса показана при различных патологических состояниях, сопровождающих патогенез СН, таких как гипертрофия и воспаление. Однако на данный момент ещё не известно, происходит ли в ходе развития фиброза миокарда усиление PAPP-A-зависимого протеолиза IGFBP-4. В связи с чем, целью нашей работы стала разработка модели развития фиброза в первичной культуре кардиофибробластов неонатальных крыс для исследования динамики протеолиза IGFBP-4.

Методы. Первичные культуры кардиофибробластов получали из неонатальных крыс. Фиброз моделировали тремя способами: добавлением к культурам 15 нг/мл TGF- β , разбавлением клеточной плотности при посадке культур и комбинацией действия TGF- β и разбавления. Эффективность моделирования оценивали с помощью иммуноцитохимического анализа и Вестерн-блоттинга на α -SMA; окрашиванием внеклеточного матрикса красителем FITC и анализом скорости зарастания царапины в культурах. Концентрацию NT-фрагментов IGFBP-4 измеряли методом иммунофлуоресцентного анализа «сэндвич»-типа.

Результаты. Содержание кардиофибробластов в полученных культурах составило $90\% \pm 2\%$. TGF- β и разбавление не имели негативного влияния на жизнеспособность культур. Фибротические изменения наблюдали в форме статистически значимого увеличения содержания α -SMA во всех типах экспериментальных культур. Увеличение содержания внеклеточного матрикса и скорости зарастания царапины наблюдали только в обработанных TGF- β культурах. Спустя 24 часа от начала реакции уровень PAPP-A-зависимого протеолиза IGFBP-4 возрастал соответственно в 2 и в 3 раза в разбавленных культурах и в культурах комбинированного действия TGF- β и разбавления.

Выводы. Фибротические изменения значимо и положительно влияют на PAPP-A-специфичный протеолиз IGFBP-4. Комбинированная модель разбавления клеточных культур и инкубации с TGF- β является наиболее эффективным способом моделирования фибротических изменений в контексте анализа протеолиза.

Сравнительный анализ кинетических и иммунохимических свойств нативной и рекомбинантной ЛДГ-1 кролика и исследование экспрессии в первичной культуре из сердца крысы при гипоксии

*К.А. Лавров (kirill.lavrov.andreevich@gmail.com)¹, А.С. Аннамухамедова¹,
О.М. Щукина¹, О.В. Компаньева¹*

¹ Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) — фермент анаэробного метаболизма, катализирующий обратимое превращение пирувата в лактат с участием NAD^+/NADH и поддерживающий энергетический и редокс-баланс при гипоксии. Изоформа ЛДГ-1 экспрессируется в сердце и регулируется HIF при снижении уровня кислорода. Цель работы — получить нативную и рекомбинантную ЛДГ-1 кролика, сравнить их кинетические параметры и исследовать экспрессию ЛДГ-1 в первичной культуре сердца крысы в условиях гипоксии.

Методы. Нативную ЛДГ-1 выделяли из сердец кролика и фракционировали сульфатом аммония, проводили хроматографии на DEAE-целлюлозе и на Affi-Gel Blue. Рекомбинантную ЛДГ-1 экспрессировали в *E. coli* и очищали из растворимой фракции методом IMAC на TALON. Кинетические параметры по NADH и пирувату определяли при pH 7,0, по NAD^+ и лактату — при pH 9,0. Первичную культуру получали из сердец двухдневных крыс и анализировали иммуноцитохимией. Гипоксию моделировали добавлением CoCl_2 (50–500 μM) на 24–48 ч; жизнеспособность клеток оценивали по восстановлению аламарового синего, индукцию HIF-1 α — иммуноблоттингом с нормализацией на β -актин.

Результаты. Удельная активность рекомбинантной ЛДГ-1 при восстановлении пирувата была выше, чем у нативной (152 против 44 $\text{мкмоль}\cdot\text{мг}^{-1}\cdot\text{мин}^{-1}$) из-за отсутствия субстратного ингибирования. Константы Михаэлиса (KM) для нативной и рекомбинантной ЛДГ-1 составили 495–905 и 750–1472 μM по лактату, 80–105 μM и 164–282 по NAD^+ , 25 и 102–136 μM по пирувату и 28–57 и 214–304 μM по NADH. В результате иммунохимического анализа показано, что антитела к ЛДГ-1 взаимодействуют с рекомбинантным белком с меньшей аффинностью, чем с нативным. Гипоксия была смоделирована в первичной культуре клеток сердца неонатальной крысы при концентрации хлорида кобальта 500 μM . Было показано, что в результате гипоксии экспрессия ЛДГ-1 возрастает.

Выводы. Кинетические параметры рекомбинантной и нативной ЛДГ-1 отличаются. Удельная активность рекомбинантного белка при восстановлении пирувата выше из-за отсутствия субстратного ингибирования при высоких концентрациях пирувата. Нативная ЛДГ-1 лучше распознается антителами; CoCl_2 (500 μM) индуцирует её экспрессию в первичной культуре сердца крысы.

Leu/Pro замены в гидрофобном ядре молекулы сердечного тропомиозина изменяют его физико-химические свойства

К.К. Лапшина (lapshina.2003@gmail.com)^{1,2}, В.В. Нефёдова²

¹МГУ имени М.В.Ломоносова, физический факультет, кафедра биофизики, Россия, Москва

²ФИЦ Биотехнологии РАН, Россия, Москва

Введение. Нарушение структуры сердечной изоформы тропомиозина Trpm1.1 – регулятора тонкого филамента – может быть ассоциировано с наследственными кардиомиопатиями. Trpm обладает структурой coiled-coil, организованной в гептадные повторы с гидрофобным ядром, в которой присутствуют локальные стабилизирующие аминокислотные кластеры. Мы проанализировали три ранее обнаруженные Leu/Pro замены L43P, L57P и L64P с целью выяснить, какие механизмы лежат в основе их патогенности.

Методы. В исследовании применялись дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК), вискозиметрия, ограниченный протеолиз трипсином и идентификация фрагментов при помощи масс-спектрометрии, соосаждение Trpm с F-актином и тропонином (Tn); были проведены эксперименты в искусственной подвижной системе.

Результаты. По данным ДСК термостабильность всех изученных мутантов снижается, при этом вариант Trpm1.1 L64P сохраняет наибольшую стабильность N-концевой части. Вязкость, отражающая силу концевых взаимодействий молекул Trpm, драматичным образом – в 4 раза – понижается у Trpm1.1 L43P относительно WT, тогда как вязкость растворов Trpm1.1 L57P и L64P близка к таковой для WT. Во всех мутантах выявлены дополнительные (в сравнении с Trpm1.1 WT) сайты протеолиза трипсином, частично различающиеся между тремя образцами. Сродство всех мутантных Trpm к F-актину снижается до 20-25% от насыщения филаментов Trpm1.1 WT, но восстанавливается в присутствии Tn комплекса. Соосаждение с фрагментом субъединицы TnT (TnT₁) показало увеличение аффинности Trpm1.1 L57P к F-актину, чего не наблюдалось для Trpm1.1 L43P. Функционально, только для Trpm1.1 L43P отсутствует кальциевая регуляция реконструированных тонких филаментов.

Выводы. Мы полагаем, что критическую роль в регуляции тонкого филамента играет возможность взаимодействия Trpm с участком TnT₁. Дестабилизация N-конца молекулы Trpm приводит к ослаблению как концевых взаимодействий, так и взаимодействия с TnT₁. Положение мутации относительно стабилизирующих кластеров, а также относительно близости к N-концу вызывает разные эффекты. Предположительно, основываясь на перечисленных факторах, возможно прогнозировать патогенность Leu/Pro замен внутри гидрофобного кора Trpm.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 22-14-00059-П. Лапшина К.К. является стипендиатом Фонда «БАЗИС» (№ 25-2-1-60-1).

**Разработка тест-системы для определения концентрации
натрийуретического пептида В-типа в сыворотке крови крыс с
гипертрофией миокарда**

*А.В. Макеева (arinam200231@gmail.com)¹, М.М. Артемьева¹, В.Е. Шенн¹,
Д.В. Серебряная¹*

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Гипертрофия миокарда – это функциональное увеличение толщины мышечной стенки сердца, которое развивается в связи с повышением нагрузки на сердечно-сосудистую систему. Для изучения гипертрофии миокарда зачастую применяются *in vivo* технологии с использованием модельных животных. Диагностику гипертрофии миокарда у человека проводят с помощью измерения концентрации натрийуретического пептида В-типа в крови методом флуороиммунного анализа. Однако данный метод валидации гипертрофии у крыс используется гораздо реже, поскольку существующие тест-системы немногочисленны. В связи с чем, разработка доступной тест-системы для определения концентрации BNP в сыворотке крыс является актуальной научной задачей.

Методы. На первом этапе работы нами были изучены все доступные у производителя NuTest моноклональные антитела, специфичные к BNP человека и подходящие для флуороиммунного анализа «сэндвич»-типа. Затем девять комбинаций антител были протестированы на специфичность к различным стандартам: человеческому синтетическому BNP, выделенному из крови крыс BNP и сыворотке крови крыс с гипертрофией миокарда. Специфичность всех использованных пар антител оценивали по величине интенсивности флуоресценции Европия, выраженной в условных единицах CPS (counts per second).

Результаты. Полученные данные свидетельствуют о том, что пары антител 24C5cc–Ab2Eu* и 50E1cc–26E2Eu* имеют наибольшую аффинность к BNP человека и BNP выделенному из крови крыс. Остальные семь пар антител также были способны связывать BNP, но с гораздо меньшей эффективностью. Однако при измерении концентрации белка в сыворотке крови крыс с гипертрофией миокарда, было показано, что самой высокой специфичностью обладает пара антител 50E1cc–130ccEu* в то время как пары 24C5cc–Ab2Eu* и 50E1cc–26E2Eu* способны узнавать BNP, но не показывают прямой зависимости интенсивности флуоресценции от степени разведения образца. Для остальных шести пар антител специфичность связывания пептида в сыворотке крови крыс не была обнаружена.

Выводы. Таким образом, нами была разработана тест-система для определения концентрации BNP в сыворотке крови крыс методом флуороиммунного анализа «сэндвич»-типа с использованием пары антител 50E1cc–130ccEu*.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 24-25-00051.

Сравнение кинетических параметров метилзависимых эндонуклеаз рестрикции для изучения специфичности к метилированным субстратам

В.Г. Мартюшова (*v.martyushova@g.nsu.ru*)¹, С.Е. Седых¹, А.Г. Мартюшова¹

¹Новосибирский государственный университет, Россия, Новосибирск

Введение. Метилирование ДНК — ключевой эпигенетический механизм, регулирующий экспрессию генов и стабильность генома. Он играет критическую роль в развитии различных заболеваний человека, включая онкологические и нейродегенеративные. Также отслеживание изменений паттернов метилирования важно для сельскохозяйственных растений в различных условиях среды.

Метилзависимые эндонуклеазы рестрикции — перспективный инструмент для анализа эпигенетического ландшафта геномов. Для их эффективного использования при подготовке библиотек для нанопорового секвенирования необходима количественная оценка субстратной специфичности. Определение кинетических параметров (константы Михаэлиса-Ментен, K_m , и максимальной скорости, V_{max}) для полностью метилированных, полуметилированных и неметилированных сайтов позволяет точно описать селективность ферментов и обосновать их применение в изучении эпигенетических изменений.

Методы. В данной работе были изучены кинетические параметры метилзависимых эндонуклеаз *GlaI* и *BlsI*. Измерения проводили с набором синтетических двухцепочечных олигонуклеотидов, различающихся числом 5-метилцитозинов в сайтах узнавания. Образование продукта регистрировали в реальном

времени по увеличению интенсивности флуоресценции. Значения K_m и V_{max} для каждого фермент-субстратного комплекса получали нелинейной регрессией зависимости начальной скорости от начальной концентрации субстрата уравнением Михаэлиса-Ментен с использованием программного кода на Python.

Результаты. Показано, что для обеих эндонуклеаз рестрикции K_m значительно снижается с увеличением степени метилирования сайта узнавания, что свидетельствует о более высоком сродстве ферментов к метилированным сайтам по сравнению с неметилированными. Для *GlaI* значения K_m лежат в диапазонах 612-2756 нМ (метилированные) и 2756-4616 нМ (неметилированные), для *BlsI* - 2.4-275 нМ (метилированные) и 150-2316 нМ (неметилированные). Значения V_{max} различаются незначительно, указывая, что лимитирующей стадией катализа является образование фермент-субстратного комплекса.

Выводы. Таким образом, была подтверждена высокая селективность проанализированных метилзависимых эндонуклеаз рестрикции к метилированной ДНК, что характеризует их как эффективный инструмент для селективной фрагментации метилированных участков генома.

Оптимизация характеристик флуороген-активирующего белка p_{ico}FAST в качестве генетически кодируемой метки.

Д.А. Мустафин (*denis.a.mustafin@yandex.ru*)^{1,2}, С.А. Краснова², М.С. Баранов^{2,3}, Ю.А. Богданова^{2,3}

¹Московский физико-технический институт (НИУ), Россия, Долгопрудный

²ГНЦ ИБХ РАН, Россия, Москва

³РНИМУ имени Н. И. Пирогова, Россия, Москва

Введение. Использование флуороген-активирующих белков, таких как FAST (Fluorescence-Activating and Absorption-Shifting Tag, 125 а.о., 14 кДа), – перспективное направление в области флуоресцентного мечения. Они устойчивы к фотообесцвечиванию и не требуют времени и присутствия кислорода в среде для развития флуоресценции, за счет использования в качестве флуорофора нековалентно связывающихся внешних флуорогенов. Ранее в нашей лаборатории был получен уменьшенный с N-конца вариант FAST (nanoFAST, 98 а.о.). В ходе разработки его сплит-формы было обнаружено, что N-концевой фрагмент (далее p_{ico}FAST, 87 а.о.) способен самостоятельно связывать флуороген арилиден-имидазолонного ряда HBR-DOM2 с развитием флуоресценции. Оптимизации свойств p_{ico}FAST посвящена данная работа.

Методы. Библиотеки клонов получали методом случайного мутагенеза с отбором по интенсивности флуоресценции отдельных колоний. Библиотеки клонов с заменами в N- и C-концевом участках, а также в положениях I49 и V66 при помощи насыщающего сайт-направленного мутагенеза. Последовательности улучшенных вариантов были получены секвенированием по Сэнгеру. Структурные модели вариантов белка получили при помощи AlphaFold.

Результаты. Всего было проанализировано в сумме 7.3*10⁴ колоний. В первом раунде случайного мутагенеза было отобрано 10 улучшенных вариантов. Для ряда улучшенных вариантов структурной моделью было предсказано смыкание β -складок с N- и C-концов и формирование меньшего флуороген-связывающего кармана, чем у nanoFAST. Модели 3 вариантов предсказывают корректное расположение E46 и Y42 (нумерация полноразмерного FAST), критичных для связывания HBR-DOM2. Матрицей для второго раунда были выбраны 2 из них. Часто замены локализовались на N- и C-концевых участках и в положениях I49 и V66, расположенных вблизи внутреннего кармана, поэтому был проведен насыщающий мутагенез. В результате 2 раунда мутагенеза было обнаружено 2 заметно более ярких варианта. Для одного из них было предсказано увеличение объема флуороген-связывающего кармана.

Выводы. Было получено 2 улучшенных варианта белка, которые требуют дальнейшей характеристики и исследования их свойств в имаджинге. Полученные варианты потенциально могут стать наименьшей генетически кодируемой меткой на данный момент.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 24-74-00013

Изучение влияния секретома мезенхимных стромальных клеток на клетки Лейдига при повреждении доксорубицином

Н.В. Нагибин (nagibinnv@ty.msu.ru)¹, А.О. Монакова¹, Liang Yingying¹, А.Ю. Ефименко¹

¹ Медицинский научно-образовательный институт, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Введение. Химиотерапия при онкологических заболеваниях имеет большое количество неблагоприятных последствий и побочных эффектов, одним из которых является мужское бесплодие. Ранее было показано, что при локальном введении секретома мезенхимных стромальных клеток (МСК) человека происходит восстановление сперматогенеза на модели токсического повреждения доксорубицином у мышей за счет регуляции микроокружения сперматогониальных стволовых клеток (ССК). Важнейшими клетками микроокружения ССК являются клетки Лейдига, в связи с этим было изучено влияние секретома МСК на повреждённые доксорубицином клетки Лейдига в модели *in vitro*.

Методы. Из семенников мышей выделяли клетки Лейдига. На 2-й день после выделения добавляли среду для культивирования или среду для культивирования с доксорубицином в ранее подобранной повреждающей концентрации 1 мкМ. На 3 день заменяли среду на бессывороточную среду ДМЕМ или секретом МСК. На 5-й день собирали среду с клеток Лейдига и затем измеряли концентрацию тестостерона методом иммуноферментного анализа (ИФА). Клетки Лейдига после сбора среды фиксировали 10% формалином и окрашивали флуоресцентным красителем DAPI. После фотографировали 5 полей зрения и оценивали количество ядер с помощью программы ImageJ.

Результаты. При воздействии 1 мкМ доксорубидина на клетки Лейдига наблюдали существенное снижение продукции тестостерона по сравнению с интактным контролем, при этом количество клеток Лейдига в культуре значимо снижалось. Добавление секретома МСК приводило к увеличению выживаемости повреждённых клеток Лейдига и значимому увеличению концентрации тестостерона в среде культивирования этих клеток.

Выводы. Воздействие доксорубидина на клетки Лейдига *in vitro* приводит к снижению концентрации секретируемого этими клетками тестостерона. Добавление секретома МСК к поврежденным доксорубицином клеткам Лейдига приводит к повышению концентрации секретируемого тестостерона, по-видимому, преимущественно за счёт увеличения выживаемости клеток Лейдига.

Исследование выполнено при поддержке государственного задания МГУ имени М. В. Ломоносова.

Кинетика и термодинамика 20S протеасомы в присутствии спермина

РА Оганов (*gorky1868@gmail.com*)^{1,2}, ГА Саратов², АА Кудряева², АА Белогуров

¹Кафедра биохимии, Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, Москва

Введение. 20S протеасома - олигомерный протеолитический комплекс с молекулярной массой около 750 кДа. Модуляция её активности рассматривается как перспективный терапевтический подход: ингибирование протеасомы применяется при лечении онкологических и ряда аутоиммунных заболеваний, тогда как активация может способствовать деградации патологических белковых агрегатов. В настоящей работе изучался возможный механизм действия природного активатора протеасомы, спермина, с применением кинетических и термодинамических методов.

Методы. Препараты 20S и 26S протеасом получали аффинной хроматографией из клеток НЕК293Т, стабильно экспрессирующих субъединицу PSMB4 с НТВН-тэгом. Для оценки активности препарат протеасомы (10 мкг/мл) преинкубировали со спермином (0,001–10 мМ) в течение 30 мин при 37 °С, после чего вносили субстрат Suc-LLVY-АМС до конечной концентрации 20 мкМ. Кинетические кривые гидролиза анализировали на соответствие модели Михаэлиса–Ментен. Влияние спермина на конформационное состояние и термостабильность протеасомы оценивали методами дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) и дифференциальной сканирующей флуориметрии (ДСФ).

Результаты. Показана выраженная селективность действия спермина: при концентрации 1 мМ химотрипсиноподобная активность 20S протеасомы возрастала десятикратно, тогда как активность 26S практически не изменялась. Кинетические кривые гидролиза Suc-LLVY-АМС обнаруживали отклонение от модели Михаэлиса–Ментен и гистерезисное поведение, свидетельствующие о конформационных переходах и субстратном ингибировании. По данным ДСФ и ДСК, связывание спермина повышало температуру плавления 20S протеасомы, что указывает на переход комплекса в альтернативное конформационное состояние.

Выводы. Совокупность полученных данных позволяет предложить модель, в которой спермин индуцирует конформационный переход 20S протеасомы в активное состояние, недоступное в составе 26S комплекса, что объясняет наблюдаемую селективность активации.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 23-74-00053

Исследование субклеточной динамики и цитотоксических эффектов гипотиоциановой кислоты

Г.С. Олейник (*lapisvivus@mail.ru*)^{1,2}, В.В. Чебаненко², А.И. Костюк^{2,3}, Д.С. Билан²

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, Москва

³Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Россия, Москва

Введение. В очагах воспаления под действием миелопероксидазы (МПО) образуется смесь окислителей, в частности гипотиоциановая кислота (HOSCN). Для выяснения конкретных механизмов цитотоксичности HOSCN необходимо изучать ее изолированное влияние на клетки. Однако HOSCN крайне нестабильна, что приводит к трудностям при работе с ней. Мы оптимизировали протокол синтеза HOSCN, что позволило исследовать субклеточную динамику и метаболические эффекты данного окислителя на культуре клеток нейробластомы мыши Neuro2a.

Методы. Клеточные эффекты HOSCN исследовали путем обработки культуры Neuro2a экзогенной добавкой окислителя, синтезированного по оптимизированному протоколу. В ходе работы оценивали следующие параметры: жизнеспособность и динамика гибели (флуоресцентная микроскопия; йодид пропидия, CellEvent Green, SyTox Red), сценарий гибели (проточная цитофлуориметрия; аннексин V), метаболическая активность (флуориметрия; Alamar Blue). Регистрацию субклеточной динамики распространения HOSCN проводили при помощи панели версий флуоресцентного сенсора Nurocrates 2 с направленной экспрессией в разных компартментах клетки (флуоресцентная микроскопия).

Результаты. В ходе оценки жизнеспособности клеток Neuro2a был установлен диапазон доз HOSCN для изучения эффектов различной степени. Низкие дозы приводили к активации метаболизма, в то время как высокие – значительно угнетали его. На ранних этапах гибель клеток является строго зависимой от активации каспазы 3/7. При этом данные, полученные при помощи SyTox Red, позволяют предположить участие гасдермина Е и протекание пироптоза. Наконец, на поздних временах часть клеточной популяции демонстрирует апоптотический сценарий гибели. Мы также установили, что способность HOSCN проникать в компартменты клетки не одинакова, что в будущем позволит установить ключевые мишени цитотоксичности.

Выводы. Было обнаружено наличие различных клеточных эффектов и как минимум двух сценариев гибели Neuro2a в ответ на HOSCN. Также была продемонстрирована явная субклеточная динамика окислителя.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 23-75-30023

Термочувствительность ионного канала TRPV1 зависит от его клеточной локализации: роль эндоплазматического ретикулула

Д.Ю. Печинко (pechinko.darya@yandex.ru)^{1,2}, Е.О. Петухова^{2,1}, Д.И. Мальцев^{2,3}

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Россия, Москва

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, Москва

³Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр мозга и нейротехнологий» Федерального медико-биологического агентства Российской Федерации

Введение. TRPV1 — неселективный катионный канал, участвующий в температурной чувствительности, ноцицепции и восприятии ацидоза. Его активация запускает деполяризующие токи и повышает уровень цитозольного кальция. Помимо плазматической мембраны, TRPV1 присутствует в мембранах эндоплазматического ретикулула (ЭР). Активация этого внутриклеточного пула вызывает высвобождение кальция из ЭР, модулируя многие клеточные процессы. Однако способность ЭР-TRPV1 выступать внутриклеточным термосенсором оставалась неизученной.

Методы. Клетки HEK293TN трансфицировали конструкциями pCAGGS-hTRPV1-p2A-tdTomato и pCS2+CMV-GCaMP6s (эксперимент) или только pCS2+CMV-GCaMP6s (контроль). Через 15-18 часов методом эпифлуоресцентной микроскопии регистрировали кальциевые ответы на программируемое нагревание (39, 41, 43 °C) и добавление капсаицина. Стимуляцию проводили в растворе Кребса-Рингера (KRS), содержащем Ca^{2+} , а затем в бескальциевой среде ($\text{KRS}\Delta\text{Ca}^{2+}$) с последующей обработкой капсаицином и иономицином.

Результаты. В клетках, экспрессирующих hTRPV1, нагрев в среде с Ca^{2+} вызывал значительный рост уровня цитозольного кальция. В бескальциевой среде температурный ответ исчезал, но сохранялся ответ на капсаицин. В контрольных клетках ни нагревание, ни капсаицин не индуцировали изменений цитозольного Ca^{2+} , при этом введение иономицина подтверждало наличие запасов Ca^{2+} в ЭР.

Выводы. Температурная чувствительность TRPV1 зависит от его локализации: ЭР-ассоциированный пул TRPV1 не имеет её, обладая при этом лиганд-зависимостью. Таким образом, мембранный пул TRPV1 служит термо- и ноцицептором, а ЭР-ассоциированный пул TRPV1 функционирует как лиганд-зависимый регулятор внутриклеточного кальциевого гомеостаза. Данный механизм может лежать в основе дифференциального восприятия физиологических и патологических сигналов.

Исследование паттернов связывания ингибитора сплайсинга с белками-мишенями методом термопрофилирования

Т.А. Проскуряков (*toxiphee@gmail.com*)¹, А.О. Гончаров^{1,2}, Е.А. Свирина¹, В.О. Шендер^{1,3}

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

²РНИМУ им. Н.И. Пирогова (Пироговский университет), Россия, Москва

³ГНЦ ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, Москва

Введение.

Анализ термической стабильности белков в сочетании с масс-спектрометрической детекцией является эффективным подходом для идентификации белковых мишеней низкомолекулярных соединений в живых клетках. Один из вариантов этого подхода, анализ изменения интегральной растворимости протеома (PISA, Proteome Integral Solubility Alteration), обеспечивает высокую производительность и упрощенную пробоподготовку. Однако оценка интегрального показателя, площади под кривой, сопровождается потерей части информации и затрудняет интерпретацию результатов. Цель исследования - модифицировать PISA для выявления паттернов взаимодействия ингибитора сплайсинга.

Методы. Мы использовали клетки аденокарциномы яичника SKOV3, обработанные ингибитором сплайсинга пладиенолидом Б (Pl-B). Затем были проведены термопрофилирование и протеомный анализ для выявления изменения термической стабильности белков. Для валидации полученных данных были сделаны вестерн-блоттинг с термопрофилированием и RT-qPCR.

Результаты. Дифференциальный протеомный анализ выявил в клетках SKOV3 основную мишень Pl-B – компонент сплайсосомы SF3B1, и позволил обнаружить значимое снижение представленности для белка CTGF. Мы предположили, что Pl-B связывается с SF3B1, и это сопровождается удержанием интрона гена CCN2, кодирующего CTGF. Для подтверждения гипотезы мы инкубировали клетки SKOV3 с Pl-B (100 нМ, 1 час) и провели вестерн-блоттинг

с термопрофилированием (37-54 °С, 3 минуты), который показал повышение термостабильности для SF3B1, тогда как для CTGF было выявлено снижение представленности без термостабилизации. С помощью RT-qPCR мы подтвердили удержание интрона гена CCN2 при действии Pl-B.

Выводы. Метод PISA позволил идентифицировать белки, чувствительные к воздействию Pl-B, - SF3B1 и CTGF. Ортогональные методы показали, что выявленные изменения обусловлены прямым связыванием Pl-B с SF3B1 и вторичным эффектом - снижением уровня CTGF вследствие удержания интрона. Полученные данные демонстрируют необходимость комбинирования PISA с другими методами валидации для разграничения прямых и косвенных эффектов, что подчеркивает потенциал системного исследования механизмов действия малых молекул в живых клетках.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 25-15-00520.

Биофизические и структурные свойства красного флуоресцентного белка Katushka M1_S2insVGED и его модифицированных неканоническими аминокислотами вариантов

И.А. Прохоров (privalbus@gmail.com)¹, И.А. Капранов², А.С. Белоусов², Д.В. Серебряная^{1,3}

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Центр исследования молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний, Московский физико-технический институт, Россия, Москва

³Институт нейронаук и нейротехнологий РНИМУ имени Н.И. Пирогова, Россия, Москва

Введение. Флуоресцентные белки широко используются в биологии, однако многие аспекты их структурно-функциональной организации остаются малоизученными. Мы показали, что в некоторых условиях хромофор перспективного красного флуоресцентного белка Katushka M1_S2insVGED может фотоизомеризоваться. Для изучения механизма этого процесса мы ввели в его хромофор неканонические аминокислоты 3-йод- (IY) и 3-хлортирозин (CIY), которые модифицировали его конформационную подвижность и pK. Мы проанализировали pH-чувствительность полученных белков и параметры фотоконверсии, которая может быть использована для визуализации процессов, происходящих в компартментах клетки с низким значением pH.

Методы. Методом ПЦР-мутационеза получали последовательности Katushka M1_S2insVGED с заменой кодона тирозина хромофора на кодон TAG и C-концевым 6xHis. Белки экспрессировали в *E. coli*. Для экспрессии мутантных белков использовали ортогональную систему трансляции, состоящую из специфичных тРНК и АРСазы. Белки очищали с помощью МХАХ. Измеряли поглощение, стационарную и время-разрешённую флуоресценцию в различных условиях. Осуществляли кристаллизацию и PCA препаратов белка.

Результаты. IY-мутант Katushka M1_S2insVGED показал ряд отличий от белка дикого типа: батохромный сдвиг максимума поглощения хромофора на 8 нм; сокращенное время жизни флуоресценции (1350 пс против 2050 пс у белка дикого типа); увеличенная pH-стабильность; увеличенная доля «синей» и «зелёной» форм хромофора. Katushka M1_S2insVGED обладает фотоконверсией (из «жёлтой» формы в «красную»), наиболее эффективной при pH 4,5 и накачке 450 нм. Введение CIY в хромофор Katushka M1_S2insVGED ограничивает способность к фотоконверсии. Согласно структурным исследованиям фотоконверсия является цис-транс-изомеризацией хромофора.

Выводы. Katushka M1_S2insVGED обладает pH-зависимой фотоконверсией, сопровождающейся цис-транс-изомеризацией хромофора. Введение IY в хромофор приводит к снижению эффективности фотоконверсии, увеличению pH-стабильности, батохромному сдвигу максимума поглощения, уменьшению среднего времени жизни флуоресценции и увеличению выхода «синей» и «зелёной» форм хромофора.

Исследование механизма действия модулятора сплайсинга пре-мРНК пладиенолида Б на модели аденокарциномы яичников

П.А. Стекольников (polinastekolnikova@yandex.ru)^{1,2}, Е.А. Свирина², М.М. Лукина², А.О. Гончаров²

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. академика Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва

Введение. На сегодняшний день задачи по разработке новых подходов к терапии онкологических заболеваний являются особо актуальными в связи с развитием химиорезистентности и частыми случаями рецидива. Так, одними из активно тестирующихся в клинических испытаниях препаратов, являются модуляторы сплайсинга пре-мРНК — малые молекулы с выраженной цитотоксичностью против опухолевых клеток.

Ранее нашей группой было обнаружено, что предобработка опухолевых клеток ингибитором сплайсинга пладиенолидом Б увеличивает их чувствительность к ДНК-повреждающим препаратам. С целью выяснения механизма цитотоксического действия пладиенолида Б нами была создана резистентная к данному модулятору сплайсинга клеточная линия SKOV3. При этом было отмечено, что у резистентных клеток сохранялась повышенная чувствительность к ДНК-повреждающим препаратам.

Методы. С целью выявления компенсаторных путей, устанавливающихся в резистентных клетках, был проведен транскриптомный, протеомный и метаболомный анализ чувствительных и устойчивых к пладиенолиду Б клеток линии SKOV3.

Результаты. По сравнению с чувствительными у резистентных клеток возрастает экспрессия генов, связанных с окислительным фосфорилированием, при этом снижается экспрессия генов, связанных с катаболизмом углеводов. Результаты протеомного анализа согласуются с транскриптомными данными, так у резистентных клеток относительно чувствительных наблюдается снижение представленности ферментов катаболизма глюкозы и увеличением представленности ферментов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), обеспечивающих протекание части реакций ЦТК в обратном направлении. Данный механизм может компенсировать угнетение гликолиза, восполняя пул интермедиатов ЦТК через аминокислоты, поддерживая энергетический баланс. Полученные данные подкрепляются результатами метаболомного анализа: наблюдается повышенное содержание ряда аминокислот и снижение уровня интермедиатов гликолиза в резистентных клетках.

Выводы. Устанавливающиеся в резистентных клетках компенсаторные метаболические перестройки указывают на возможный механизм цитотоксического действия пладиенолида Б через нарушение метаболизма и энергетического баланса опухолевой клетки.

Работа поддержана грантом РНФ №25-15-00520.

**Внеклеточные везикулы сенесцентных МСК нарушают
инсулин-индуцированную ядерную транслокацию p-Akt в
молодых клетках**

Т.М. Тажигулова (menshikova.t03@gmail.com)¹, С.С. Каменков¹, В.И. Чечехин¹, Е.С. Чечехина¹

¹ФФМ МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. В развитие инсулинорезистентности МСК жировой ткани при старении значительный вклад вносят паракринные эффекты, опосредованные внеклеточными везикулами сенесцентных клеток. Akt является ключевым медиатором инсулинового сигналинга, а его ядерная транслокация необходима для регуляции экспрессии генов. Целью данной работы было исследование влияния внеклеточных везикул сенесцентных мезенхимных стромальных клеток (МСК) на инсулин-индуцированное изменение локализации фосфорилированного Akt (p-Akt) в молодых клетках.

Методы. В исследовании использовали МСК молодых (< 45 лет) и пожилых (> 65 лет) доноров. Внеклеточные везикулы (ВВ) выделяли из кондиционированной среды методом центрифугирования на концентраторах с размером пор 300 кДа. МСК молодых доноров инкубировали с ВВ сенесцентных клеток в течение 2 суток, затем стимулировали инсулином в течение 15-20 минут. Сенесцентные МСК обрабатывали везикулами молодых клеток по аналогичному протоколу. Субклеточную локализацию p-Akt оценивали методами иммуноцитохимии с конфокальной микроскопией и вестерн-блоттинга ядерной и цитоплазматической фракций.

Результаты. В клетках молодых доноров стимуляция инсулином приводила к значимому повышению содержания p-Akt в ядре по сравнению с нестимулированным контролем. Обработка везикулами сенесцентных клеток без добавления инсулина значительно не изменяла базальный уровень ядерного p-Akt. Однако предварительная инкубация с везикулами сенесцентных МСК полностью блокировала инсулин-индуцированное повышение ядерного p-Akt. Сенесцентные МСК характеризовались значимо более низким содержанием ядерного p-Akt по сравнению с молодыми клетками как в базальных условиях, так и после стимуляции инсулином. При этом везикулы молодых клеток не оказывали значительного модулирующего эффекта на инсулин-индуцированную ядерную транслокацию p-Akt в сенесцентных МСК, она сохранялась на прежнем низком уровне.

Выводы. Полученные данные демонстрируют паракринный механизм распространения инсулинорезистентности через внеклеточные везикулы, реализующийся на уровне нарушения ядерного импорта p-Akt. Сенесцентные клетки сами характеризуются сниженным содержанием ядерного p-Akt, воспроизводя через свой секретом в молодых клетках фенотип, присущий им самим.

Работа поддержана грантом РНФ #25-75-30005.

АМРК α 2 опосредует активацию mTORC2 в клетках эндотелия в ответ на голодание по глюкозе

АН Тихонов (TikhonovAN@ty.msu.ru)^{1,2}, НВ Поджуйченко², АЮ Ханчаев², АВ Воротников²

¹Факультет Биоинженерии и Биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²НИИЦ Кардиологии имени академика Е.И. Чазова

Введение. Эндотелиальные клетки чувствительны к колебаниям питательных веществ, включая дефицит глюкозы, что требует координированной метаболической адаптации. АМР-активируемая протеинкиназа (АМРК) и механистическая мишень рапамицина (mTOR) представлены в клетках двумя комплексами mTORC1 и mTORC2, и являются ключевыми регуляторами клеточного метаболизма. Мы исследовали роль каталитических изоформ АМРК α в регуляции активности комплексов mTOR в клетках эндотелия пупочной вены человека (HUVEC) при глюкозном голодании.

Методы. Клетки HUVEC культивировали в среде M199 (5 mM глюкозы) и 10% FBS, голодание вызывали сменой среды без глюкозы. Экспрессию АМРК α 1, АМРК α 2, обеих изоформ одновременно (pan-АМРК α), или ключевого компонента mTORC2 (Rictor) подавляли с помощью shRNA и лентивирусной трансдукции. Активность АМРК и mTOR оценивали методом вестерн-блоттинга по уровню фосфорилирования их ключевых субстратов (ACC, p70S6K1, Akt и SGK1). Поглощение глюкозы клетками определяли с помощью [³H]-2-дезоксиглюкозы в качестве трейсера. Для статистического анализа использовали t-критерий Стьюдента или однофакторный ANOVA.

Результаты. Мы выяснили, что голодание по глюкозе ведет к активации обеих изоформ АМРК α , а потеря основной изоформы АМРК α 1 – к компенсаторному повышению экспрессии АМРК α 2. Активность mTORC1 не зависела ни от голодания, ни от АМРК. АМРК α 2 была необходима и достаточна для транзиторной активации mTORC2 и фосфорилирования его субстратов - Akt (Ser473) и SGK1 (Thr256). Выключение оси АМРК α 2–mTORC2 (подавлением экспрессии АМРК α 2, АМРК α 1/2 или Rictor) отменяло активацию mTORC2. Однако это не влияло на вызванное голоданием увеличение поглощения глюкозы клетками.

Выводы. Выявлен изоформ-специфический сигнальный модуль, в котором АМРК α 2 транзиторно активирует mTORC2 в ответ на голодание клеток по глюкозе. Однако данная сигнальная ось функционально не связана с адаптационным механизмом — усилением поглощения глюкозы. Таким образом, эндотелиальные клетки обладают высокой метаболической устойчивостью, обеспечиваемой альтернативными сигнальными путями – основными регуляторами адаптации к дефициту питательных веществ.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 23-75-00027.

Применение генетически кодируемого флуоресцентного биосенсора для изучения динамики активных форм серы

А. Фервиль (aflevi57@gmail.com)¹, Л.Л. Наумов^{2,3}, Д.С. Билан^{2,3}

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Государственный Научный Центр Российской Федерации, Институт биорганической химии. им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Россия, Москва

³Федеральный Центр Мозга и Нейротехнологий ФМБА России, Россия, Москва

Введение. Нарушение редокс-баланса в клетке приводит к окислительному стрессу, он является ключевым событием при развитии многих патологических состояний в организме (диабет 1 и 2 типа, болезнь Альцгеймера, онкологические заболевания, ишемическая болезнь сердца и др.). В последнее время повышенный интерес вызывает группа химических соединений, объединенных названием “активные формы серы” (АФС), к ним относится непосредственно сера, сероводород, персульфиды (RSSH), а также полисульфиды (H₂(S)_n). Среди эффектов АФС в разных тканях можно выделить вазодилатацию сосудов, регулирование экспрессии генов путем сульфидирования гистоновых белков, формирование долговременной потенциации в нейронах, модуляцию воспалительных процессов и т.д. Для регистрации АФС в нашей работе мы использовали генетически кодируемый флуоресцентный биосенсор PersIk, который селективно реагирует на пер/полисульфиды. Преимущество данного инструмента состоит в возможности регистрации динамики АФС в живых системах любого уровня сложности.

Методы. Чувствительность и максимальную амплитуду ответа биосенсора на экзогенные полисульфиды определяли с помощью прижизненной флуоресцентной микроскопии на клеточной линии HeLa с локализацией PersIk в различных компартментах. Для анализа динамики эндогенных полисульфидов *in vivo* использовали модельный объект *Danio rerio*. Доставку гена биосенсора в ткань *Danio rerio* проводили при помощи инъекции мРНК биосенсора в оплодотворенную икру с последующей регистрацией флуоресцентного сигнала. Для создания стабильной трансгенной линии *Danio rerio* с экспрессией PersIk в нейронах использовали систему Tol-2 трансгенеза.

Результаты. Мы протестировали функционирование биосенсора PersIk в различных внутриклеточных компартментах в ответ на увеличение концентрации полисульфидов во внешней среде. Мы также исследовали динамику эндогенных полисульфидов *in vivo* в тканях мальков *Danio rerio* в классической модели воспалительной реакции, вызванной механическим повреждением хвостового плавника. Также нами была создана трансгенная линия рыб *Danio rerio* со стабильной экспрессией сенсора в нейронах.

Выводы. Нами была проведена детальная характеристика биосенсора PersIk. Мы продемонстрировали возможность применения PersIk как в системе *in vitro* в клеточных культурах, так и *in vivo* в тканях *Danio rerio*.

Клонирование и валидация гепатоспецифичной промотор-инсулиновой кассеты для будущей AAV-опосредованной генной терапии диабета

Г.Б. Хулхачиев (*hulhacievgava@gmail.com*)^{1,2}, А. Мазлум¹, В.С. Ледяева¹, С.Г. Феоктистова¹

¹Лаборатория геномной инженерии Центра Живых Систем МФТИ, Россия, Долгопрудный

²Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV) - одна из ведущих платформ генной терапии, что обусловлено благоприятным профилем безопасности и эффективности. Ключевой этап разработки AAV-терапии инсулинозависимого диабета (MODY 10) — проектирование и валидация терапевтического генетического конструкта. Зрелый инсулин образуется из проинсулина (B–C–A) под действием пропротеинконвертаз (PC), экспрессируемых β -клетках поджелудочной железы: в результате протеолиза удаляется C-пептид и остаются A- и B-цепи, соединённые дисульфидными связями. Чтобы обеспечить продукцию инсулина в клетках, отличных от β -клеток, например гепатоцитах, кодирующая последовательность инсулина необходимо модифицировать так, чтобы его процессинг осуществлялся повсеместно экспрессируемыми конвертазами и не зависел от β -клеточных PC. В данной работе конструируются и тестируются две конструкции — с конститутивной и гепатоцитарно-специфической экспрессией — обе несут PC-независимый вариант инсулина и формируют основу для дальнейших исследований AAV-опосредованной генной терапии.

Методы. Для гепатоспецифичной и конститутивной экспрессии инсулина получены две конструкции: pLiv-INS-V5-P2A-GFP и pCMV-INS-V5-P2A-GFP соответственно. Нуклеотидную последовательность конструкции подтвердили рестрикцией и NGS. Для подтверждения специфичности экспрессии конструкта проводили трансфекцию клеточных линий НерG2, а также HeLa и HEK293; через 48 ч измеряли секрецию инсулина и C-пептида (ИФА) и оценивали процессинг/локализацию методом иммуноцитохимического окрашивания.

Результаты. Тканеспецифичная экспрессия инсулина подтверждена для клеточной линии НерG2. Конститутивная экспрессия инсулина под контролем CMV промотора обеспечивала секрецию инсулина и C-пептида в клеточных линиях HEK и HeLa в соотношении ~1:1. В результате иммуноцитохимического окрашивания была подтверждена колокализация инсулина и V5 в секреторном пути.

Выводы. Получены и валидированы две экспрессионные кассеты — CMV и гепатоцитарно-специфичная — обе с PC-независимым расщепляемым инсулином. Конструкции готовы к упаковке в AAV для исследований *in vivo* и служат основой для таргетной AAV-терапии сахарного диабета MODY10.

Структурные и функциональные эффекты кардиомиопатических мутаций в гене TRPM1

Е.И. Шепелёв (shepelyove@yandex.ru)^{1,2}, А.М. Матюшенко¹

¹ФИЦ Биотехнологии РАН, Россия, Москва

²Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, кафедра биохимии, Россия, Москва

Введение. Тропомиозин (Trpm) – актин-связывающий белок, являющийся ключевым участником регуляции мышечного сокращения. Мы исследовали влияние аминокислотных замен R105H, A211V, I253V, D254N, D258V и A277T на его свойства. В базе данных NCBI ClinVar эти мутации обнаружены во всех мышечных изоформах Trpm у пациентов с патологиями различных типов мышц. Мы исследовали замены в Trpm1.1 – основной изоформе миокарда. Эти мутации ассоциированы с развитием заболеваний сердца.

Методы. В работе использовали рекомбинантные препараты Trpm1.1, продуцированные в клетках E.coli (C41) и очищенные методом ионообменной хроматографии. Структурные свойства белков исследовали методами дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) и кругового дихроизма (КД). Функциональные свойства Trpm изучали методом вискозиметрии и соосаждения с фибриллярным актином.

Результаты. В начале исследовали влияние замен на структуру молекулы Trpm1.1. Замены I253V и A277T не приводили к изменению структуры, их профили плавления ДСК совпадали с кривой для Trpm1.1 WT и представляли собой кривую с тремя переходами. Замены A211V, D254N и D258V приводили к стабилизации молекулы, выраженной в сдвиге температуры всех переходов в сторону более высоких температур в сравнении с молекулой WT. Замена R105H отличалась от всех снижением общей энтальпии и смещением третьего перехода в сторону низких температур, что указывает на дестабилизацию N-концевой части Trpm1.1. Данные ДСК хорошо соотносились с данными, полученными методом КД. Первая производная кривой плавления во многом напоминала профиль ДСК для всех препаратов. Это указывает на то, что все эффекты мутаций связаны с изменением стабильности α -спиралей. Все препараты кроме R105H повышали сродство тропомиозина к F-актину. Примечательно, стабилизация структуры приводила к повышению аффинности Trpm к актину, а дестабилизация к снижению. Этот эффект не связан с изменениями в силе концевых взаимодействий между молекулами Trpm, что часто определяет кооперативность взаимодействия Trpm с F-актином. Избыточная вязкость растворов мутантных белков отличалась только у препарата D254N (0,2712 мПа*с по сравнению с 0,204 мПа*с для WT).

Выводы. Все исследованные мутации в разной степени влияли на структуру и функции Trpm. Была обнаружена зависимость, что аминокислотные замены, приводящие к стабилизации структуры Trpm приводили к увеличению его аффинности к F-актину и наоборот.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ



Оптимизация протокола экспансии TILs для рака молочной железы

А.Д. Кучевская (angelinakuch@gmail.com)

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, Москва

Введение. Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TILs) играют ключевую роль в противоопухолевом иммунитете. TIL-терапия эффективна при меланоме и рассматривается как перспективный подход при раке молочной железы (РМЖ). Однако стандартизованные протоколы экспансии TILs для РМЖ отсутствуют, что ограничивает внедрение метода. Цель работы — оптимизировать протокол экспансии TILs из ткани РМЖ и оценить связь характеристик опухоли с эффективностью культивации.

Методы. Использовали образцы ТНРМЖ, люминального А и В (HER2-). После диссоциации выполняли сортировку CD4+ и CD8+ Т-клеток с выделением CD39+PD1+ фракции, не относящейся к двойным положительным по этим маркерам; оценивали инфильтрацию и экспрессию CD137, CD39, PD1, TIM-3. Фрагменты опухоли культивировали в условиях ИЛ2+ и ИЛ2+, ИЛ21+, анти-PD1+. Анализировали пролиферацию, фенотип и цитотоксичность. Исходные и экспансированные клетки использовали для ТКРβ секвенирования с оценкой клонального разнообразия и перекрытия репертуаров.

Результаты. Образцы люминального подтипа характеризовались низкой инфильтрацией (CD45+ 30%) и высоким Ki-67 (>70%). Выраженный рост TILs отмечался при комбинации ИЛ-2, ИЛ-21 и Ниволумаба. В ходе культивации наблюдалось увеличение доли CD4+ Т-клеток при снижении CD8+ популяции. В ряде образцов выявлялись CD8+CD39+CD103+ Т-клетки, что может указывать на опухоль-реактивные резидентные Т-клетки. CD8+ Т-клетки после культивации показали умеренную цитотоксичность, свидетельствующую о сохранении эффекторного потенциала. ТКРβ анализ выявил снижение клонального разнообразия после культивации и частичное перекрытие исходных и экспансированных репертуаров. При блокаде PD1 наблюдалось увеличение частоты отдельных клонотипов, указывая на сохранение пролиферативного потенциала опухоль-реактивных клонов.

Выводы. Эффективность экспансии TILs определяется молекулярным подтипом опухоли и степенью лимфоцитарной инфильтрации. Экспансия из низкоинфильтрированных образцов нецелесообразна; перспективен отбор опухолей с высокой инфильтрацией и Ki-67, что может быть обусловлено их большей иммуногенностью.

Профаг λ кодирует иммунную систему Septu, которая активируется SSB белком фага T4

А.В. Пашинцева (anastasia.pashintseva2@gmail.com)¹, А.А. Держаев¹, О.А. Котовская¹, А.Б. Исаев¹

¹Лаборатория анализа метагеномов, Сколковский институт науки и технологий, Россия, Москва

Введение. Взаимодействие фагов и бактерий часто описывается как «гонка вооружений». Чтобы адаптироваться к постоянной угрозе фаговой инфекции, бактерии выработали множество защитных стратегий. В последние годы были открыты десятки новых противовирусных систем иммунитета, и было показано, что многие из них действуют по принципу абортивной инфекции — убивая инфицированную клетку после распознавания продуцируемых фагом стимулов (триггеров). Однако триггеры активации большинства защитных систем до сих пор неизвестны. Septu — это абортивная система иммунитета, состоящая из двух доменов: PtuA — сенсора АВС-АТФазы и PtuB — эффектора эндонуклеазы HNH. Мы заметили, что классический профаг *Escherichia coli* λ кодирует гомологи белков PtuAB, ранее обозначенных как Ea31 и Ea59. Учитывая транскрипционную активность этого локуса в профаге, мы предположили, что λ кодирует активный вариант системы Septu для защиты от других фагов.

Методы. Молекулярное клонирование (методы KLD и Гибсона), эффективность бляшкообразования, выделение геномной ДНК с помощью фенол-хлороформа, анализ жизнеспособности клеток, РНК-секвенирование и анализ данных транскриптома, сборка генома и анализ вариантов, множественное выравнивание последовательностей.

Результаты. Экспрессия системы Septu λ обеспечивала защиту от T4 и родственных фагов, от фагов семейства Queuovirinae и неклассифицированного фага Bas61. Мутации, внесенные в каталитические домены эндонуклеазы PtuB и АТФ-связывающие мотивы Walker A и Walker B PtuA, приводили к потере защиты. Чтобы понять, как инфекция T4 активирует Septu, мы отобрали мутировавшие варианты фага, уклоняющиеся от защиты (эскейперы), и идентифицировали мутации в белке gp32, участвующем в репликации и связывающем одноцепочечную ДНК. Экспрессия гена gp32 T4 в присутствии Septu λ достаточна для индукции токсичности, тогда как при наличии мутации в белке PtuB она не проявляется.

Выводы. Наши результаты позволяют идентифицировать новую систему иммунитета у наиболее изученного профага λ , активную против T4, фагов подсемейства Queuovirinae и неклассифицированного фага Bas61, и установить, что белок SSB фага T4 является её триггером.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 22-74-10089.

Адаптации фаговых тРНК к избеганию бактериальной иммунной системы PARIS

М.В. Александрова (*marialekswork@gmail.com*)^{1,2}, С.Ю. Белухина¹, А.Б. Исаев¹

¹Сколковский институт науки и технологий, Россия, Москва

²НИУ ВШЭ, Россия, Москва

Введение. Бактерии обладают разнообразными иммунными системами, и бактериофаги находятся в состоянии постоянной эволюционной гонки для борьбы с ними. Иммунная система PARIS (Phage Anti-restriction Induced defence System) ограничивает инфекцию, расщепляя хозяйские тРНК. Фаг T5 кодирует свои тРНК, устойчивые к расщеплению. Сравнение других пар иммунная система-устойчивая фаговая тРНК привело к вопросу: испытывают ли тРНК фагов эволюционное давление со стороны защитных систем бактерий и какие мутации в тРНК фагов закрепляются под этим давлением. Известно какие структурные особенности тРНК обеспечивают устойчивость и являются ли они функциональными – принимают участие в трансляции.

Кроме мутационного анализа, для понимания эволюционных принципов адаптации фагов мы планируем проанализировать тРНК в близкородственных T5 фагах. Это позволит сопоставить естественное разнообразие тРНК с чувствительностью к одной системе защиты.

В процессе анализа литературы мы обнаружили что фаги могут кодировать тРНК-подобные структуры, которые мы хотим рассмотреть как возможные прямые ингибиторы тРНК таргетирующих систем. Изучение этих элементов поможет выяснить, разнообразие стратегий обхода защиты присущих фагам, и как разнообразие тРНК и тРНК-подобных элементов в геноме коррелирует с адаптацией к различным иммунным системам.

Методы. Клонирование тРНК: Gibson в вектор pBAD (промотор *agaBAD*), мутагенез: направленный, методом KLD, устойчивость к PARIS: анализ EOP (Efficiency of Plating), поиск тРНК-подобных генов: tRNAscan-SE, проверка функциональности тРНК: нонсенс кодон и супрессорная тРНК

Результаты. Устойчивость лизиновой фаговой тРНК к системе PARIS определяется сочетанием мутаций в участках молекулы: D-loop и антикодонном стебле; отдельные изменения не обеспечивают защиты. Функциональные эксперименты с репортёрной системой GFP с Ochre-кодоном и превращением фаговых тРНК в супрессорные продемонстрировали, что устойчивые тРНК могут поддерживать трансляцию. Поиск и анализ тРНК-подобных генов выявил, что они продолжают сохранять тРНК-подобную 3D структуру.

Выводы. Формирование устойчивости фаговых тРНК к защитным системам определяется комбинацией мутаций и особенностями конкретной антифаговой системы, что отражает сложный характер коэволюции фагов и бактерий.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (224-74-10089)

Регуляторная роль вышележащей открытой рамки считывания в синтезе протеоформ MCRS1

А.А. Афанасьева (AfanasyevaAA@ty.msu.ru)¹, Н.М. Шенелев^{2,3}, М.П. Рубцова^{2,3}

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Лаборатория химии нуклеопротеидов, химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

³Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, Москва

Введение. Ген *MCRS1* кодирует многофункциональный белок — регулятор клеточного цикла, транскрипции, модификаций хроматина, сигнального пути mTOR, целостности centrosom и динамики микротрубочек. Его сверхэкспрессия ассоциирована с онкогенезом. Согласно данным рибосомного профилирования, мРНК *MCRS1* содержит в 5'-нетранслируемой области (5'-НТО) активно транслируемую вышележащую открытую рамку считывания (uORF), которая перекрывает первый старт-кодон кодирующей последовательности (AUG1), но завершается перед вторым (AUG2). Это позволяет клетке синтезировать две протеоформы MCRS1, различающиеся N-концевыми последовательностями и, предположительно, функциональными свойствами. Настоящее исследование посвящено выяснению регуляторной роли данной uORF в контроле выбора старт-кодона и соотношения синтезируемых протеоформ.

Методы. Были созданы репортерные конструкции: под промотором EF1α — uORF–MCRS1–P2A–Fluc, под SV40 — Rluc для нормализации. Вклад альтернативных старт-кодонов оценивали мутациями со сдвигом рамки считывания, переводя AUG1 или AUG2 с прилегающим контекстом в другую рамку относительно кодирующей последовательности. Также получены конструкции с инактивированной uORF. Трансфекцию проводили в клетках HEK293T, активность люцифераз определяли методом двойного люциферазного анализа.

Результаты. В клетках HEK293T активность Fluc/Rluc для дикого типа с активной uORF составляла 19,12, а при её инактивации возрастала до 41,82, подтверждая репрессирующую роль uORF. При трансляции только с AUG1 или AUG2 активность была сходной (10,89 и 10,63). В отсутствие uORF активность при использовании только AUG1 достигала 36,63, а при AUG2 — 23,09. Таким образом, uORF подавляет инициацию на AUG1 примерно в 3,4 раза, на AUG2 — в 2,2 раза, сильнее ингибируя первый старт-кодон и смещая реинициацию к AUG2.

Выводы. uORF в 5'-НТО гена MCRS1 является репрессором трансляции. Оба старт-кодона в кодирующей последовательности MCRS1 функциональны. uORF в 5'-НТО гена MCRS1 функционирует как переключатель, который способствует реинициации трансляции на втором старт-кодоне MCRS1, тем самым контролируя соотношение синтезируемых протеоформ MCRS1.

Влияние альтернативных изоформ фактора транскрипции RUNX3 человека на экспрессию генов-мишеней

А.О. Батин (*artyom.batin.2000@gmail.com*)^{1,2}, Т.С. Краснова², П.М. Рубцов²

¹Факультет Биотехнологии и Биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН, Россия, Москва

Введение. Транскрипционный фактор RUNX3 относится к семейству RUNX, которое характеризуется наличием высоко консервативного ДНК-связывающего домена runt. RUNX3 может выполнять функцию как онкосупрессора, так и протоонкогена, в зависимости от молекулярного окружения. Гены семейства RUNX содержат два промотора: P1 и P2, с которых транскрибируются альтернативные изоформы, содержащие различное количество экзонов. RUNX3 имеет, по меньшей мере, три изоформы (p46, p44, p33). На основе анализа литературы было установлено, что RUNX3 влияет на экспрессию таких генов, как EPOC4, BCL2, CCR7, WNT5a, GZMB, GDF-6, ABCB1, SOD3 и CHOP. Цель настоящей работы – выяснение роли изоформ RUNX3 человека в регуляции экспрессии генов-мишеней.

Методы. В работе использовали плазмиды на основе вектора pCDNA3.1(+), кодирующие изоформы p46, p44 и p33 RUNX3 человека. Промоторные фрагменты генов EPOC4, BCL2, CCR7, WNT5a, GZMB, GDF-6, ABCB1, SOD3 и CHOP амплифицировали на геномной ДНК человека и встраивали в репортерный вектор pGL3-basic перед геном люциферазы светлячка. Для оценки влияния изоформ RUNX3 на транскрипцию с промоторов исследуемых генов использовали котрансфекцию клеток HEK293 человека плазмидами, кодирующими изоформы RUNX3, и репортерными плазмидами. Активность люциферазы в лизатах клеток определяли с помощью набора TransDetect Double-Luciferase Reporter Assay Kit. Люминесценцию измеряли на ридере Chameleon VI Multilabel detection platform (HIDEX). Значения активности люциферазы светлячка нормировали по активности люциферазы Renilla.

Результаты. Экспрессия изоформ RUNX3 в трансфицированных клетках HEK293, а также стабильность белков и способность к транслокации в ядра клеток была подтверждена с помощью иммуноблотинга. Определение люциферазной активности показало, что изоформы p46 и p44 сходным образом влияют на активность промоторов исследуемых генов в использованной системе экспрессии в отличие от изоформы p33.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о зависимости уровней экспрессии генов-мишеней фактора транскрипции RUNX3 от соотношения альтернативных изоформ этого белка в клетках.

Комбинированная терапия глиом человека онколитическим вирусом VV-GMCSF-Lact и ингибитором киназы Akt

А.А. Бывакина (mytrilliangularity@gmail.com)¹, Н.С. Васильева¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Россия, Новосибирск

Введение. Онколитический вирус VV-GMCSF-Lact обладает высокой цитотоксической активностью и противоопухолевой эффективностью в отношении глиом человека как *in vitro*, так и *in vivo*. Ранее мы показали, что чувствительность клеток глиом человека к действию VV-GMCSF-Lact обратно пропорциональна уровню активированной киназы Akt в этих клетках. Киназа Akt участвует в процессах ингибирования апоптоза и, соответственно, может являться мишенью при таргетной терапии глиом в комбинации с VV-GMCSF-Lact.

Методы. Изменение жизнеспособности клеток иммортализованных линий глиом (U87 MG, U343 MG) и микроглии (HMC3) человека под действием VV-GMCSF-Lact, ингибитора киназы Akt перифозина и их комбинации оценивали с использованием резазурина. Анализ апоптотических процессов в клетках глиом, обработанных комбинацией препаратов, проводили методом проточной цитометрии при окрашивании клеток Аннексином V и PI (пропидий йодид). Для оценки жизнеспособности клеток глиом, астроцитомы (CCF-STTG1) и микроглии человека в составе гомо- и гетеротипических сфероидов при совместном действии вируса и перифозина сфероиды окрашивали диацетатом флуоресцеина (живые клетки), PI (мертвые клетки) и Hoechst 33342 (ядра клеток). Оценку противоопухолевой эффективности комбинации препаратов проводили на модели подкожных синграфтов глиомы GL261 мыши.

Результаты. Показано, что использование VV-GMCSF-Lact в комбинации с перифозином увеличивает чувствительность клеток глиом к действию вируса и усиливает апоптотическую гибель опухолевых клеток. Использование комбинации препаратов приводит к снижению жизнеспособности клеток в составе как гомо-, так и гетеротипических сфероидов. Применение комбинации VV-GMCSF-Lact и перифозина для терапии глиом *in vivo* требует дальнейшего исследования.

Выводы. Согласно данным исследований *in vitro* применение VV-GMCSF-Lact в комбинации с ингибитором киназы Akt является перспективной терапевтической стратегией и позволит уменьшить терапевтическую дозу вируса. Данные пилотных исследований *in vivo* свидетельствуют о вероятной псевдопрогрессии опухоли при иммунотерапии вирусным агентом и необходимости введения в терапевтическую схему противовоспалительных препаратов.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 24-14-00390, <https://rscf.ru/project/24-14-00390/>

Разработка CAR-T клеток с мембраносвязанным интерлейкином-2 для усиления их пролиферативной и противоопухолевой активности

Э.А. Васильева (*vasilyeva-elina.com@mail.ru*)¹, И.И. Патеев¹, В.В. Решетников¹, М.В. Баранов¹

¹ Научно-технологический университет «Сириус», Россия, Сириус

Введение. Резистентные и рецидивирующие опухоли (лимфома, множественная миелома) часто не поддаются стандартной химиотерапии и лучевой терапии. CAR-T-терапия позволяет достичь ремиссии, однако её эффективность ограничена истощением Т-клеток, которое проявляется снижением пролиферации, ослаблением противоопухолевой активности и короткой продолжительностью действия CAR-T-клеток. Основные причины истощения — хроническая стимуляция онкоантигенами, автономная активация CAR-конструкта и иммуносупрессивное микроокружение опухоли. Интерлейкин-2 (IL-2) способен аутокринно поддерживать пролиферацию, выживание и активацию Т-клеток. В настоящей работе исследовано влияние коэкспрессии CAR и мембраносвязанного IL-2 (mbIL-2) на пролиферативную и противоопухолевую активность CAR-T-клеток.

Методы. ДНК-конструкции, кодирующие мРНК mbIL-2, получали в двух вариантах — с линкером (G4S)₃ и без него — методом Golden Gate. Отсутствие мутаций подтверждали секвенированием по Сэнгеру. Плазмиды линеаризовали по сайту рестрикции AhiI и использовали в качестве матрицы для *in vitro* транскрипции. Функциональность mbIL-2 оценивали в тестах на активацию и пролиферацию человеческих РВМС с помощью красителя CellTrace и по уровню экспрессии маркеров CD25 и CD3 (проточная цитометрия). Для оценки свойств CAR-T-клеток проводили ко-трансфекцию мРНК CAR-FMC63 и мРНК mbIL-2 в первичные человеческие Т-клетки. Цитотоксичность определяли в ко-культуре с CD19⁺ линиями Raji и Nalm-6.

Результаты. Получены две конструкции мРНК mbIL-2: с гибким (G4S)₃-линкером и без него. Дизайн включает трансмембранный домен для закрепления на мембране и Fc-фрагмент IgG4 человека для презентации цитокина на поверхности эффекторных клеток. Функциональность mbIL-2 подтверждена в тестах на активацию и пролиферацию человеческих РВМС. Оценен эффект ко-экспрессии CAR и mbIL-2 в Т-клетках человека на цитотоксическую активность в отношении CD19⁺ опухолевых линий Raji и Nalm-6.

Выводы. Мембраносвязанный IL-2 (mbIL-2) за счёт аутокринного действия является перспективным решением проблемы истощения CAR-T-клеток. Его коэкспрессия с CAR может потенциально оказывать позитивное воздействие на пролиферативную и цитотоксическую активность CAR-T-клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственной программы «Сириус» (Соглашение № 18-03 от 10.09.2024).

Роль сиртуина-3 в регуляции гибели клеток, индуцированной альфа-токоферилсукцинатом

М.А. Виноградов (*winogradow_matwej@outlook.com*)¹, М.А. Япрынцева^{2,1}

¹Факультет фундаментальной медицины МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Россия, Москва

Введение. Сиртуин-3 (Sirt3) — деацетилаза с преимущественной локализацией в матриксе митохондрий. Особый интерес вызывает двойственная роль Sirt3 в онкогенезе. В различных типах опухолевых клеток Sirt3 может или предотвращать их гибель, способствуя канцерогенезу, или выполнять проапоптотическую функцию и выступать в роли онкосупрессора. Альфа-токоферилсукцинат (α -TOS) является модифицированной формой витамина Е, которая ингибирует сукцинатдегидрогеназный комплекс дыхательной цепи. α -TOS эффективно подавляет пролиферацию и вызывает гибель опухолевых клеток, не оказывая выраженного влияния на нормальные клетки.

Методы. В качестве моделей были выбраны две клеточные линии рака легкого человека: U1810 и A549. Нокадаун гена SIRT3 проводили в клетках с его высоким уровнем посредством трансдукции лентивирусными частицами, содержащими малые шпилечные РНК, нокаут — методом CRISPR-Cas9. В клетках с низким уровнем Sirt3 проводили оверэкспрессию гена путем трансфекции плазмидами. Уровни белков оценивали методом вестерн-блоттинга с последующей денситометрией. Развитие апоптоза оценивали по появлению активной формы каспазы-3 и расщеплению поли(АДФ-рибоза)-полимеразы. Относительную жизнеспособность клеток определяли с помощью флуориметрического анализа alamarBlue и клоногенного теста. Статистическую значимость результатов оценивали с использованием непарного t-критерия Стьюдента, U-критерия Манна-Уитни или двухфакторного дисперсионного анализа в зависимости от типа и распределения данных.

Результаты. Базальный уровень Sirt3 в клетках линии A549 в три раза превышал аналогичный показатель в линии U1810. Примечательно, что α -TOS дозозависимо индуцировал апоптоз в клетках U1810, в то время как клетки A549 с высоким уровнем экспрессии SIRT3 не подвергались апоптозу даже при высоких концентрациях α -TOS (200 мкМ). Как нокаут, так и нокадаун SIRT3 в клетках A549 приводил к значительному снижению жизнеспособности клеток при обработке α -TOS. Напротив, оверэкспрессия SIRT3 в линии U1810 ослабляла апоптотическое действие α -TOS.

Выводы. Уровень Sirt3 прямо коррелирует с устойчивостью клеток рака легкого к действию α -TOS, что указывает на защитную роль Sirt3 в опухолевых клетках.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 23-74-30006.

Исключение суперинфекции иновирусом M13 в клетках *Escherichia coli*

А.Д. Голубева (*nastya_golubeva_02@inbox.ru*)¹, С.Ю. Козлова¹, А.Б. Исаев¹

¹ Сколковский институт науки и технологий, Россия, Москва

Введение. Бактериофаги семейства *Inoviridae* способны длительно существовать внутри бактериальной клетки в виде плазмиды или встраиваясь в ее геном (то есть способны к лизогенизации) и часто кодируют защитные гены, предоставляющие экологические преимущества своему хозяину. Некоторые из таких генов вовлечены в исключение суперинфекции – защиту своего хозяина от заражения другими фагами. Для модельного иновируса M13, заражающего *E. coli* через F-пили, явление исключения суперинфекции показано не было. Однако белок фага M13 gp3 является гомологом белков, обеспечивающих исключение суперинфекции у родственных M13 иновирусов, заражающих *P. aeruginosa*. Данная работа посвящена изучению способности фага M13 исключать суперинфекцию в *E. coli* и роли белка gp3 в этом процессе.

Методы. Лизогены вариантов M13 получали путем заражения штамма *E. coli* BW39773, содержащего F-плазмиду, фаговыми частицами соответствующих вирусов. Способность бактериофагов заражать клетки *E. coli* оценивали методом измерения образуемых фагом бляшек на чашках с бактериальными газонами. Ген M13 gp3 нарабатывали методом ПЦР, после чего клонировали его в плазмиду pBAD256 под индуцибельный арабинозный промотор. Полученную конструкцию трансформировали в штамм *E. coli* BW39773, после чего проверяли его устойчивость к заражению фагами M13 и MS2 при отсутствии индукции и при индукции 0,2% раствором арабинозы. Аналогично штамму с вектором, содержащим gp3, получали штамм *E. coli* BW39773, содержащий геном M13 с делецией gp3.

Результаты. Лизогены M13 были устойчивы к заражению самим M13. Те же лизогены не были восприимчивы к заражению РНК-содержащим MS2 фагом, также использующим F-пили в качестве рецептора, что указывает на возможность блокирования F-пилей M13 в процессе исключения суперинфекции. Клетки *E. coli*, содержащие вектор с gp3, были одинаково восприимчивы к MS2 и M13 фагам в присутствии и отсутствии арабинозы, что может быть связано с недостаточной концентрацией белка gp3 в клетке в условиях эксперимента. Клоны *E. coli*, при трансформации их M13 с делецией gp3, не были жизнеспособны, что может указывать на необходимость гена gp3 для успешной репликации вируса внутри клетки.

Выводы. M13 способен исключать суперинфекцию *E. coli* F-специфичными фагами M13 и MS2. Белок gp3 не обеспечивает исключение суперинфекции M13 в *E. coli* в условиях эксперимента.

**Получение мозговых органоидов из ИПСК пациентов с
спиноцеребеллярной атаксией 17 типа для изучения морфологии
первичной реснички**

А.Д. Жукова (alisazhukova2020@gmail.com)^{1,2}, И.Б. Алиева^{2,1}, Е.И. Олехнович¹, М.А. Лагарькова¹

¹ФНКЦ ФХМ им. Ю. М. Лопухина, Россия, Москва

²НИИ ФХБ им. А. Н. Белозерского МГУ, Россия, Москва

Введение. Первичная ресничка является ключевой сенсорной органеллой клетки, активно участвующей в сигналинге, в том числе в клетках головного мозга. Экспансия в ассоциированном с ресничкой гене *TTBK2*, кодирующем киназу тубулинов и тау-белков *TTBK2*, приводит к развитию такого нейродегенеративного заболевания, как спиноцеребеллярная атакия 11 типа (SCA11). Однако существуют типы SCA, развивающиеся в результате экспансии в генах, напрямую не связанных с первичной ресничкой. Например, в случае SCA17 мутация возникает в гене *TBP*, кодирующем транскрипционный фактор TBP. При этом результаты анализа транскриптома мозговых органоидов пациента с SCA17 продемонстрировали сниженный уровень экспрессии целого сета генов, ассоциированных с первичной ресничкой. При SCA17 поражаются нейроны мозжечка, коры головного мозга, среднего мозга. Поэтому мозговые органоиды, полученные из клеток пациентов, могут быть рабочей моделью для анализа структурных изменений первичной реснички в нейронах, ассоциированных с SCA17.

Методы. В данной работе применялись такие методы, как получение мозговых органоидов из клеток доноров, дизайн праймеров, количественная ОТ-ПЦР, трансмиссионная электронная микроскопия и иммуноцитохимическое окрашивание.

Результаты. Были получены органоиды среднего мозга из нейрональных прогениторных клеток, дифференцированных из ИПСК двух пациентов, здоровой носительницы мутации и трех здоровых доноров. Подобраны праймеры к генам *DYNC2H1* и *TRAF3IP1*, продемонстрировавшим сниженную экспрессию по данным анализа транскриптома. Проведена оценка экспрессии *DYNC2H1* и *TRAF3IP1* с помощью количественной ОТ-ПЦР, в результате чего выявлен достаточно высокий для дальнейшего анализа уровень экспрессии. Отработана методика пробоподготовки и получены образцы для электронно-микроскопического анализа органоидов. Ультратонкие срезы, изготовленные из этих образцов, проанализированы методом трансмиссионной электронной микроскопии. На полученных препаратах выявлены первичные реснички и описана их структура. Данные иммуноцитохимического окрашивания будут представлены на конференции.

Выводы. Органоиды среднего мозга, полученные из клеток пациентов, больных SCA17, являются перспективной моделью для изучения морфологии первичной реснички при SCA17.

Роль сигнальных путей DNAM-1 и NKG2D в иммунном распознавании кардиальных производных ИПСК

Э.А. Кастуева (elyakastueva@gmail.com)^{1,2}, Д.К. Шерман¹, М.Е. Богомякова^{1,3}, А.Н. Богомазова^{1,3}

¹ФНКЦ ФХМ им. Ю.М.Лопухина, лаборатория клеточной биологии, Россия, Москва

²Биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, Россия, Москва

³Центр «Генетическое репрограммирование и геновая терапия» ФНКЦ ФХМ им. Ю.М.Лопухина, Россия, Москва

Введение. Дифференцированные производные индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) рассматриваются как перспективный источник клеток для регенеративной медицины. Особый интерес представляют кардиальные производные ИПСК как инструмент для моделирования болезней и терапии сердечной недостаточности. Ранее в нашей лаборатории была показана чувствительность дифференцированных производных ИПСК к цитотоксическому действию НК-клеток. Целью данного исследования является изучение роли активирующих рецепторов в иммунном ответе НК-клеток на кардиальные производные ИПСК.

Методы. Кардиальные производные были получены методом направленной дифференцировки ИПСК, их характеристику проводили с помощью иммуноцитохимии и проточной цитометрии. Активность НК-клеток определяли по степени их дегрануляции при сокультивировании с клетками-мишенями.

Результаты. Анализ экспрессии НК-клеточных лигандов показал, что по сравнению с исходными фибробластами, использованными для репрограммирования, кардиальные производные ИПСК (iPS-CD) характеризуются повышенной экспрессией лигандов активирующих рецепторов DNAM-1 (PVR и Nectin-2) и NKG2D (MICA). В то же время экспрессия B2M и HLA-I — лигандов ингибирующих рецепторов — была снижена. Таким образом, на поверхности iPS-CD формируется профиль, смещённый в сторону преобладания активирующих сигналов. Функциональные иммунные тесты подтвердили высокую чувствительность iPS-CD к НК-клеточному ответу. Эксперименты с блокирующими антителами продемонстрировали, что блокирование NKG2D и DNAM-1 снижает цитотоксический ответ НК-клеток против iPS-CD. Более того, функциональная блокада NKG2D подавляет дегрануляцию аутологических НК-клеток до значений, характерных для исходных фибробластов.

Выводы. Высокий иммунный ответ НК-клеток на iPS-CD обусловлен смещением профиля поверхностных лигандов в активирующую сторону. Снижение дегрануляции НК-клеток при функциональной блокаде рецепторов NKG2D и DNAM-1 указывает на целесообразность редактирования генов их лигандов для создания гипоиimmunогенных клеток.

РНФ № 25-25-00945

Функциональная характеристика длинной некодирующей РНК *CHOL*

К.М. Кашафетдинова (*katilia22102003@gmail.com*)¹, О.Ю. Буренина^{2,3}

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Сколковский институт науки и технологий, Россия, Москва

³Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Холангиокарцинома (ХЦР) — второй по распространенности первичный рак печени после гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК). Хирургическая резекция является единственным эффективным методом лечения, но чаще всего заболевание выявляют уже на неоперабельной стадии. Актуален поиск биомаркеров для раннего выявления ХЦР и дифференциальной диагностики от гистологически сходной ГЦК. Одними из таких биомаркеров могут быть длинные некодирующие РНК (днРНК). ДнРНК крайне тканеспецифичны, так как участвуют в регуляции клеточных процессов, а их экспрессия часто меняется при канцерогенезе. Возможность их обнаружения в биологических жидкостях с последующим количественным анализом методом ОТ-кПЦР позволяет рассматривать многие днРНК как перспективные диагностические маркеры. Ранее в нашей научной группе была обнаружена новая, предположительно онкогенная, днРНК *CHOL*, активно экспрессирующаяся в образцах опухолей пациентов с ХЦР, но не ГЦК.

Методы. На основе кДНК, полученной из образцов ХЦР и клеток HepG2, создали векторы для сверхэкспрессии *CHOL* с использованием системы Sleeping Beauty. После трансфекции в линии Huh7 и HepG2 провели селекцию стабильных экспрессионных линий. Методом ОТ-кПЦР подтвердили повышенную экспрессию изоформ *CHOL* и изучили их влияние на экспрессию предполагаемых генов-мишеней, выявленных при транскриптомном анализе. Также провели фенотипические тесты, оценивающие скорость миграции и пролиферации полученных линий.

Результаты. Из клеток HepG2 и Huh7 получено 18 линий, экспрессирующих 9 изоформ *CHOL* с разным составом экзонов. Фенотипический анализ показал: клетки, экспрессирующие основные изоформы *CHOL* и варианты с делецией экзона 9 имеют повышенную скорость пролиферации, при этом скорость миграции не меняется относительно контрольных линий. ОТ-кПЦР выявила снижение количества мРНК гена *KLF4* при сверхэкспрессии основных изоформ *CHOL*, тогда как уровень мРНК гена *ATF3* оставался без изменений. Уточнение механизма требует проведения дополнительных экспериментов, однако полученные данные подтверждают онкогенную роль *CHOL*.

Выводы. Созданы стабильные клеточные линии, сверхэкспрессирующие разные изоформы *CHOL*. Основные изоформы усиливают пролиферацию клеток Huh7. Некоторые изоформы снижают уровень мРНК гена *KLF4*, но не влияют на ген *ATF3*. Подтверждены функциональная неоднородность изоформ и онкогенная роль *CHOL*.

Роль клеточного фактора репарации 53BP1 в ранних этапах репликации ВИЧ-1

Э.И. Киреева (*ellinakireeva@gmail.com*)¹, О.Е. Щигал^{2,3}

¹ Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

² Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

³ НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ, Россия, Москва

Введение. В жизненном цикле ВИЧ-1 участвуют не только вирусные, но и клеточные белки. Например, в ходе интеграции вирусной кДНК в клеточный геном возникают повреждения ДНК, для репарации которых требуются киназы DNA-PK и ATM. Мы установили, что белок 53BP1, являющийся мишенью этих киназ, фосфорилируется в ходе трансдукции клеток псевдовиром на основе генома ВИЧ-1, в связи с чем мы предположили, что 53BP1 может быть важен для репликации ВИЧ-1.

Методы. Для сборки лентивирусных векторов на основе генома ВИЧ-1 (далее псевдовirus) проводили кальций-фосфатную котрансфекцию клеток НЕК293Т тремя плазмидами с последующим концентрированием псевдовirusов через 48 и 72 ч после трансфекции. Титр псевдовirusа определяли с помощью проточной цитофлуориметрии. С помощью флуоресцентной микроскопии в клетках НЕК293Т оценивали образование локусов 53BP1 через 6, 8, 14, 16, 18, 24 ч после трансдукции псевдовirusами. Нокаут гена 53BP1 в клеточной линии НЕК293Т проводили с помощью системы CRISPR/Cas9 с использованием гидовых РНК к целевому гену. Через 21 ч после трансдукции клеток с нокаутом 53BP1 псевдовirusами, кодирующими ген люциферазы, измеряли уровень люминесценции люциферазной реакции.

Результаты. Анализ микрофотографий показал, что при трансдукции клеток псевдовirusами происходит формирование большего числа локусов 53BP1, чем в контрольных клетках, к которым вирус не добавляли. Количество локусов 53BP1 через 14 ч после трансдукции увеличивается в два раза и сохраняется на этом уровне до 24 ч после трансдукции. В клетках с нокаутом 53BP1 происходит уменьшение сигнала люциферазы по сравнению с контрольными клетками на 70%, следовательно, как минимум один из ранних этапов репликации ВИЧ-1 нарушается в отсутствие 53BP1.

Выводы. Трансдукция клеток НЕК293Т псевдовirusами приводит к формированию локусов 53BP1, количество которых двукратно увеличивается через 14 ч после трансдукции. Нокаут 53BP1 негативно влияет на репликацию ВИЧ-1 в клетках НЕК293Т, следовательно, 53BP1 является положительным фактором ранних этапов репликации ВИЧ-1.

Кинетика компактизации хроматина на фоне нокаута когезина

А.Р. Коваленко (kovalenkonasta063@gmail.com)^{1,2}, Е.П. Казаков^{1,2}, И.И. Куреев^{1,2}

¹НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Россия, Москва

²Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Комплексы архитектурных белков (когезины, конденсины I и II и др.) обеспечивают организацию и регуляцию интерфазного хроматина и процесс митотической компактизации. В ходе митоза исчезают признаки интерфазной организации, обусловленные активностью экструдирующего когезина. При этом активности конденсинов I и II в митозе приводят к организации хроматина в совокупность петель. При этом остаются нераскрытыми механизмы взаимодействия интерфазных (когезин) и митотических SMC-комплексов (конденсины I и II) между собой при переходе клетки к митозу. Целью нашей работы стало изучение кинетики компактизации хроматина в ходе митотической компактизации и роли когезина в этом процессе.

Методы. В работе использовалась клеточная линия HCT116, модифицированная системой ауксин-индуцибельного дегрона субъединицы Rad21 когезинового комплекса. Исходя из кинетики деградации Rad21, предварительно оцененной по снижению интенсивности EGFP в составе конструкции Rad21-AID2-EGFP, ауксин добавляли за 2 часа до индукции преждевременной конденсации хромосом (РСС) Каликулином А с целью моделирования процесса митотической компактизации. Новосинтезированную ДНК метили EdU с разным временным интервалом до добавления Каликулина А. Изготавливали хромосомные препараты по стандартной методике, проводя детекцию EdU методом клик-химии и докрашивая DAPI. Препараты исследовали на инвертированном флуоресцентном микроскопе. Анализ колокализации между сигналами DAPI и EdU проводили в программе ImageJ (1.54p) с использованием плагин Colocalization Colormap и Coloc2.

Результаты. Добавление тимидина в концентрации 2 мМ после репликативного мечения с помощью EdU позволяет значительно снизить его эффект последствия. Была подтверждена эффективность системы индуцибельного нокаута с помощью анализа когезии сестринских хроматид в хромосомных препаратах. Анализ изображений показал, что колокализация EdU и DAPI постепенно увеличивается от момента мечения вплоть до 2 часов после введения метки и изменяется в соответствующих временных точках при нокауте Rad21.

Выводы. Максимальная степень компактизации реплицированного хроматина при индукции РСС достигается через 2 часа после репликативного мечения и зависит от статуса когезина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Некоммерческого Фонда развития науки и образования «Интеллект».

Разработка клеточных линий для аффинной очистки и исследования деградации белков c-Fos и Rgs4 в протеасомах

К.С. Козлова (k6170332k@yandex.ru)^{1,2}, А.В. Морозов²

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Институт молекулярной биологии им. Энгельгардта РАН, Россия, Москва

Введение. Протеасомы разрушают большинство внутриклеточных белков до пептидов. В нервной системе протеасомы играют особую роль. В частности, в нейронах мышей были выявлены встроенные в мембрану протеасомы, разрушающие внутриклеточные белки с образованием пептидов, которые высвобождаются во внеклеточное пространство и модулируют активность других нейронов. Отдельные биологически активные пептиды еще не охарактеризованы. Однако известны некоторые потенциальные белки-субстраты. Таким образом, выявление таких пептидов позволит получить новые данные о механизме коммуникации между клетками нервной системы.

Методы. Используя имеющиеся литературные данные и результаты биоинформатического анализа структуры, были подобраны потенциальные белки-кандидаты: c-Fos и Rgs4. Были получены лентивирусные конструкции, которые в качестве генетического материала несли гены c-Fos и Rgs4 мыши, слитые с последовательностями, кодирующими сайт TEV протеазы и HTBS метку. Получены препараты псевдовирюсов, с помощью которых было проведено редактирование генома клеток НЕК 293Т. Для валидации полученных клеточных линий использовали ПЦР, ПЦР-РВ, иммуноблоттинг. Аффинную очистку белков из клеток проводили с помощью стрептавидин-агарозы. Кинетику деградации химерных белков в протеасомах оценивали после их инкубации с коммерческим препаратом 20S протеасом методом иммуноблоттинга.

Результаты. Разработаны две клеточные линии IG2-mc-Fos-HTBS и IG2-mRgs4-HTBS, синтезирующие химерные белки c-Fos и Rgs4, слитые с последовательностями для их аффинной очистки. В клетках были выявлены вставки в геномную ДНК, показана экспрессия генов и накопление химерных белков. Показано, что инкубация клеток с ингибитором протеасом MG132 способствует накоплению химерного белка c-Fos, но мало сказывается на накоплении химерного белка Rgs4. Из клеток получены высокоочищенные препараты белков c-Fos и Rgs4. При инкубации белков с препаратом коммерческих 20S протеасом выявлено, что белок c-Fos разрушается через 2 часа после начала инкубации. При этом наблюдается существенное замедление его деградации в присутствии ингибитора протеасом MG132. Напротив, частичная деградация Rgs4 была обнаружена только после 48-часовой инкубации с препаратом протеасом.

Выводы. Полученные линии представляют собой удобный инструмент для наработки и аффинной очистки белков c-Fos и Rgs4. Полученные рекомбинантные белки могут быть использованы для идентификации биологически активных пептидов, модулирующих активность нейронов.

Двойная стратегия фаговых киназ: перепрограммирование клеточного метаболизма и подавление антифаговой защиты

В.А. Колотова (*vera_kolotova@list.ru*)^{1,2}, М.А. Скутель², О.А. Котовская², А.Б. Исаев²

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Центр молекулярной и клеточной биологии, Сколковский институт науки и технологий, Россия, Москва

Введение.

Наше исследование сосредоточено на двух родственных киназах. Киназа 07 бактериофага Т7 (Gr0.7) и её биоинформационно предсказанного гомолога (киназа f.259). Несмотря на гомологию, киназы принадлежат к разным филогенетическим группам и по-разному влияют на уровень защиты от различных бактериальных иммунных систем. Gr0.7 состоит из 3-х доменов: N-концевой киназный домен (NTD), спиральный линкер (CC) и C-концевой (shut-off, CTD).

Методы. Для создания плазмидных конструкций применялись методы клонирования Gibson Assembly (NEB) с последующей трансформацией и работой в клетках *E. coli* K-12 BW25113, содержащих плазмиды, кодирующие различные защитные системы бактерий. Для определения количества фагов в среде и исследования влияния экспрессии анти-иммунного белка на фаговую инфекцию применялся классический тест ЕОР (эффективность бляшкообразования). Для понимания роли каждого домена в ингибировании транскрипции был использован анализ жизнеспособности клеток. Для более полного понимания структуры Gr0.7 применялся AlphaFold.

Результаты. С помощью анализа жизнеспособности клеток мы определили, что основным фактором, определяющим клеточную токсичность, является домен shut-off в комбинации со спиральным линкером. Данные моделирования AlphaFold3 указывают на потенциальное взаимодействие киназного домена с субъединицами бактериальной РНК-полимеразы, что может лежать в основе наблюдаемой цитотоксичности. Мы также показываем, что помимо контроля клеточного метаболизма, Gr0.7 является ингибитором систем бактериального иммунитета. Более того, экспрессии одного лишь киназного домена достаточно для подавления активности разнообразных систем рестрикции-модификации (РМ), включая типы I (EcoB, EcoK1, EcoR124), III (EcoP1), а также РМ-подобной системы BREX. В тоже время, для других иммунных систем Gr0.7 выступает как триггер. Наша работа показывает, что наличие Gr0.7 активирует РМ-подобную систему BREX Gao и токсин-антитоксин систему ShosTA.

Выводы. Наша работа раскрывает функции одного из ключевых анти-иммунных белков Т7 бактериофага, полученные данные могут внести вклад в поиск новых антимикробных препаратов.

Транскрипционный фактор FOXM1 как фактор устойчивости аденокарциномы яичника к цисплатину

А.Д. Королев (korolevad@ty.msu.ru)^{1,2}, П.В. Шнайдер¹, И.В. Бекбаева¹, В.О. Шендер^{1,3}

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

²Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

³Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, Москва

Введение. Секреты погибающих под действием химиотерапии клеток аденокарциномы яичника увеличивают в реципиентных опухолевых клетках экспрессию генов, связанных с регуляцией клеточного цикла и репарацией ДНК, и повышают их химиорезистентность. Биоинформатический анализ показал, что значительная часть этих изменений обусловлена активностью транскрипционного фактора FOXM1, уровень которого также повышается в реципиентных опухолевых клетках под действием секретов. Это указывает на ключевую роль FOXM1 в цитопротективном действии секретов. Цель работы — изучение вклада FOXM1 в цитопротективный эффект секретов опухолевых клеток, погибающих под действием цисплатина.

Методы. В работе использовали клеточную линию аденокарциномы яичника SKOV3 с нокаутом гена *FOXM1*, полученным методом геномного редактирования CRISPR-Cas9. Был проведен сравнительный транскриптомный анализ клеток SKOV3 дикого типа и с нокаутом гена *FOXM1*. Для оценки влияния FOXM1 на цитопротективный эффект секретов реципиентные опухолевые клетки SKOV3 дикого типа и с нокаутом гена *FOXM1* инкубировали с секретами погибающих под действием цисплатина и контрольных клеток SKOV3 дикого типа и с нокаутом гена *FOXM1*.

Результаты. Транскриптомный анализ подтвердил функциональный нокаут гена *FOXM1* и изменение представленности его мишеней. Секреты погибающих опухолевых клеток с нокаутом гена *FOXM1* не вызывали устойчивости к цисплатину, тогда как секреты погибающих опухолевых клеток дикого типа индуцировали ее только у реципиентных опухолевых клеток дикого типа. Инкубация опухолевых клеток с нокаутом гена *FOXM1* с секретами погибающих опухолевых клеток дикого типа повышала уровень белка FOXM1 в реципиентных опухолевых клетках, что указывает на возможную передачу этого фактора от донорных клеток. Однако цитопротективный эффект при этом отсутствовал, что свидетельствует о необходимости активации эндогенной экспрессии *FOXM1*.

Выводы. Цитопротективный эффект секретов погибающих под действием цисплатина клеток аденокарциномы яичника SKOV3 зависит от экспрессии гена *FOXM1* как в донорных, так и в реципиентных опухолевых клетках.

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

«Динамика накопления и анализ локализации различных форм протеасом в клетках аденокарциномы прямой кишки под действием интерферона-гамма»

А.Ю. Кравченко (*nkravchenko145@gmail.com*)^{1,2}, А.В. Морозов²

¹Калужский государственный университет им. К. Э. Циолковского, Россия, Калуга

²Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Россия, Москва

Введение. Протеасомы разрушают большинство внутриклеточных белков. Известны различные формы протеасом. Кроме стандартных (конститутивных) протеасом (Кп) клетки синтезируют иммунные протеасомы (Ип), отличающиеся набором каталитических субъединиц. Ип играют ключевую роль в иммунологических реакциях и клеточном ответе на стресс. Синтез Ип активируется под действием интерферона- γ (ИФН- γ). Однако, детальных исследований динамики накопления Ип в клетках под действием ИФН- γ практически неизвестно. Кроме того, не проводилось исследований, направленных на выявление различий в локализации Кп и Ип в одних и тех же клетках.

Методы. В работе была использована репортерная линия аденокарциномы прямой кишки человека SW620B8-mCherry-B5-GFP, экспрессирующая субъединицы Кп ($\beta 5$) и Ип ($\beta 5i$), слитые с флуоресцентными белками GFP и mCherry, соответственно. Клетки инкубировали с 1000 ЕД/мл рекомбинантного ИФН- γ в течение 2, 4, 8, 10, 24, 28, 32, 48, 52, 56 и 72 часов. Анализ экспрессии субъединиц протеасом проводили с помощью ПЦР-РВ, иммуноблоттинга, проточной цитофлуориметрии, флуоресцентной и конфокальной микроскопии. Активность субъединиц протеасом оценивали с помощью флуоресцентной пробы Me4BodipyFL-Ahx3Leu3VS.

Результаты. Показано, что экспрессия гена, кодирующего субъединицу Ип $\beta 5i$, начинает возрастать в клетках спустя 4–8 часов после добавления ИФН- γ . Химерная субъединица начинает накапливаться в лизатах клеток спустя 8–10 ч и встраиваться в состав протеасом через 10 ч после начала инкубации с цитокином. Через 56 часов наблюдается максимальное накопление химерных субъединиц $\beta 5i$ -mCherry. При этом, спустя 48 часов в клетках наблюдается снижение уровня GFP и количества химерного белка $\beta 5$ -GFP. Эти данные отражают перестройку пула протеасом в клетке: увеличение количества Ип и снижение количества Кп под действием ИФН- γ . Кроме того, в околядерной области клеток SW620B8-mCherry-B5-GFP были выявлены структуры, содержащие почти исключительно Ип, что указывает на пространственное разделение различных форм протеасом в клетках, связанное с их функциональными различиями.

Выводы. Полученные данные расширяют представления о клеточном ответе на стимуляцию провоспалительными цитокинами и могут быть использованы при подборе и анализе действия лекарственных препаратов.

Исследование специфичности экспрессии белка под промотором гена Vglut1 в глутаматергических нейронах

Е.М. Крылова (elizaveta.krylova.2004@mail.ru)^{1,2}, Н.В. Баль²

¹Национальный исследовательский университет "Высшая школа экономики", Россия, Москва

²Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Россия, Москва

Введение. В ходе различных исследований учёные сталкиваются с задачей экспрессии генов в строго определённой группе нейронов, которая часто решается использованием специфичных промоторов. Например, одним из самых популярных промоторов является промотор возбуждающих нейронов Camk2a, который используется в исследованиях, связанных с патологией возбуждения/торможения, таких как эпилепсия, однако в последнее время его специфичность ставится под сомнение. Поэтому важной задачей является разработка более специфичного промотора для возбуждающих нейронов. За основу был взят промотор гена Vglut1 (Slc17a7), который, по данным литературы, обеспечивает специфическую экспрессию в возбуждающих нейронах [1,2]

Методы. Сборка векторов проводилась с помощью методов рестрикции, ПЦР и синтеза генов. Точность сборки проверялась секвенированием. Вставка производилась в вектор AAV. Результаты показаны на срезах коры и гиппокампа мыши. Анализ специфичности производился с помощью иммуногистохимии. Обработка изображений - ImageJ.

Результаты. Мы обнаружили высокую специфичность экспрессии флуоресцентного белка в возбуждающих нейронах. Уровень неспецифичной экспрессии в тормозных нейронах составляет 0 - 1,6% на различных срезах мозга. Неспецифичная экспрессия в нейроглиальной культуре коры составляет 2,3%.

Выводы. Промотор гена Vglut1 показывает высокую специфичность экспрессии в глутаматергических нейронах гиппокампа и коры. Вектор AAV подходит в качестве вектора для конструкций с Vglut1.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-15-2024-548

Литература

1. Egashira, Y., Mori, Y., Yanagawa, Y. et al. Development of lentiviral vectors for efficient glutamatergic-selective gene expression in cultured hippocampal neurons. Sci Rep 8, 15156 (2018). 2. Zhang GR, Li X, Cao H, Zhao H, Geller AI. The vesicular glutamate transporter-1 upstream promoter and first intron each support glutamatergic-specific expression in rat postrhinal cortex. Brain Res. 2011 Mar 4;1377:1-12. doi: 10.1016/j.brainres.2010.12.040. Epub 2010 Dec 21.

mHSP70 и AQP1 как перспективные мишени для подавления миграции клеток глиобластомы

А.С. Куркин (*andrey-k0@mail.ru*)^{1,2}, Р.Б. Лихоманова², М.А. Шевцов²

¹Биологический факультет СПбГУ, Россия, Санкт-Петербург

²Институт цитологии РАН, Россия, Санкт-Петербург.

Введение. Помимо внутриклеточной локализации, отдельные представители белков теплового шока, в частности HSP70, способны экспонироваться на поверхности плазматической мембраны опухолевых, но не нормальных клеток. Показано, что мембранно-связанная форма Hsp70 (mHSP70) активно вовлечена в регуляцию миграции и инвазии. Наряду с этим, ключевую роль в клеточной подвижности играют белки семейства аквапоринов (AQP), которые обеспечивают формирование ламеллоподий и филоподий. Аквапорин-1 (AQP1), также гиперэкспрессирован в опухолевых клетках и вносит вклад в различные аспекты патогенеза, значительно увеличивая миграционный и инвазивный потенциал. Это позволяет рассматривать их в качестве перспективных терапевтических мишеней – как по отдельности, так и в комбинации.

Методы. В работе использовали клеточные линии глиомы крысы C6 и глиобластомы человека T98G, положительные по mHSP70 и AQP1. Клетки получали в Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия). Ингибиторы применяли в концентрациях, не влияющих на жизнеспособность клеток, по данным МТТ: для mHSP70 – VER-155088 и YM-1 (по 1 мкМ), для AQP1 – Васопазид II (5 мкМ). Влияние ингибиторов на общее содержание HSP70 в клетках оценивали методом вестерн-блот, на экспрессию mHSP70 – методом проточной цитофлуориметрии. Миграционную и инвазивную активность клеток исследовали с помощью теста на застывание царапины с использованием автоматической системы прижизненного наблюдения Image ExFlurer (LCI, Корея) и трансвелл-анализа соответственно. В качестве контроля во всех экспериментах использовали клетки, необработанные ингибиторами.

Результаты. Выбранные молекулы не влияли на общее содержание HSP70, однако по данным проточной цитофлуориметрии Васопазид II, VER-155088, а также их сочетанное применение достоверно снижали представленность mHSP70 на плазматической мембране – в 1,26; 1,33 и 1,53 раз соответственно. В тесте на застывание раны наиболее выраженный эффект наблюдали при сочетанном применении ингибиторов: комбинации Васопазид II с VER-155088 или YM-1 полностью подавляли миграцию (конечная площадь раны не отличалась от начальной). Трансвелл-анализ также подтвердил, что совместное применение ингибиторов существенно снижает инвазивный потенциал клеток по сравнению с каждым агентом в отдельности.

Выводы. Результаты демонстрируют, что сочетанное ингибирование mHSP70 и AQP1 значительно подавляет миграционную активность и инвазивный потенциал глиобластомы, что может быть перспективным в терапии.

Изучение активности анти-рестрикционных белков OCR и SAMase против систем фосфотиорирования ДНК Dnd и Ssp

Н.А. Майоров (major.e841@gmail.com)^{1,2}, М.А. Скутель², А.Б. Исаев²

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Центр молекулярной и клеточной биологии, Сколковский институт науки и технологии, Россия, Москва

Введение. Длительное сосуществование бактерий и бактериофагов привело к эволюционной гонке вооружений, развитию у бактерий противовирусных защитных систем и появлению у фагов механизмов их обхода. Одним из распространённых направлений такой контр-адаптации являются анти-рестрикционные белки, подавляющие системы рестрикции и модификации. К ним относятся OCR, действующий как ДНК-мимик и связывающий рестрикционные комплексы, и SAMase, анти-рестрикционный фактор, активность которого для ряда систем связывают с нарушением SAM-зависимых процессов. Отдельный интерес представляют защитные системы Dnd и Ssp, в основе которых лежит фосфотиорирование ДНК и распознавание своего и чужого без классического метилирования. В данной работе было исследовано влияние OCR и SAMase на эффективность защиты, обеспечиваемой системами Dnd и Ssp, а также возможная токсичность экспрессии этих ингибиторов для клетки-хозяина.

Методы. Были использованы плазмидные конструкции, содержащие защитные системы Dnd и Ssp, и плазмиды, кодирующие OCR и SAMase, трансформированные в *E. coli* K-12 BW25113. В качестве модельных фагов использовали T7 и SXT, а также их варианты с делецией гена 0.3 для OCR и SAMase соответственно. Степень защиты определяли с помощью ЕОР-тестов, и по кривым роста культуры на плейт-ридере. Токсичность экспрессии SAMase оценивали по изменению параметров роста бактериальной культуры.

Результаты. Показано, что OCR и SAMase снижают эффективность защиты, обеспечиваемой системами Dnd и Ssp. Важным наблюдением является нативный эффект, делеция гена 0.3 в геномах фагов приводила к снижению инфекционности на фоне активности Dnd и Ssp, тогда как фаги с интактным 0.3 сохраняли способность к эффективному заражению. Дополнительно отмечено, что экспрессия SAMase может сопровождаться токсическим эффектом для клетки-хозяина, проявляющимся изменением параметров роста.

Выводы. Впервые показано, что OCR и SAMase, способны ингибировать защитные системы Dnd и Ssp, основанные на фосфотиорировании ДНК. Полученные данные расширяют спектр известных мишеней анти-рестрикционных факторов и указывают на потенциально различающиеся механизмы действия. Для OCR это согласуется с моделью ДНК-мимикрии и взаимодействия с рестрикционными комплексами, тогда как эффект SAMase представляется интригующим, поскольку Dnd и Ssp не используют метилирование и не предполагают SAM-зависимого распознавания.

Исследование эффективности каталитического расщепления 5'-флэп содержащей ДНК эндонуклеазой FEN1 и влияние белка RPA на этот процесс

Е.Н. Малаховская (evg.malakh.it@gmail.com)^{1,2}, Ю.С. Красикова¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Россия, Новосибирск

²Новосибирский государственный университет, Россия, Новосибирск

Введение. Флэп-эндонуклеаза 1 (FEN1) принимает участие в процессинге фрагментов Оказаки и в эксцизионной репарации оснований (BER). Субстратом FEN1 является ДНК, содержащая выступающий из дуплекса одноцепочечный участок (структура «5'-флэп»). Такие структуры образуются в процессе синтеза ДНК с вытеснением цепи. Репликативный белок А (RPA) является основным белком, связывающим одноцепочечную ДНК в клетках эукариот. Многочисленность молекул RPA в клетке предполагает, что образующийся в процессе BER 5'-флэп может быть связан этим белком. Целью данной работы является исследование зависимости эффективности расщепления флэп-содержащей цепи FEN1 от длины 5'-флэпа, а также изучение влияния RPA на выход продуктов реакции расщепления, катализируемой FEN1.

Методы. Гель-электрофорез в ПААГ.

Результаты. Фермент FEN1 эффективно расщепляет 5'-флэпы длиной не менее 2 нуклеотидов в составе ДНК-структур, содержащих 5'-флэп в комбинации с разрывом (ником). Выход продуктов расщепления растет с увеличением длины 5'-флэпа до 30 нуклеотидов. На этих ДНК-структурах RPA значительно ингибирует реакцию, начиная с длины флэпа 9 нуклеотидов. ДНК, содержащие область равновесных нуклеотидов (область, в которой праймер и запирающий праймер комплементарны одному участку матрицы), расщепляются более эффективно, чем ДНК, содержащие ник. Кроме того, эффективность их расщепления не зависит от длины 5'-флэпа. Влияние RPA на этих структурах начинается с флэпа длиной 30 нуклеотидов. Также в работе исследован механизм формирования протяженных 5'-флэпов.

Выводы. Показано, что природным субстратом FEN1 является ДНК, содержащая область равновесных нуклеотидов не менее 1 н.о. Именно область равновесных нуклеотидов вносит решающий вклад в эффективность каталитического расщепления. Данные о зависимости каталитической активности FEN1 от структуры и длины 5'-флэпа согласуются со структурой FEN1, полученной методом РСА (PDB ID: 3Q8K). RPA ингибирует расщепление FEN1 ДНК-структур, содержащих 5'-флэп и ник. На ДНК, содержащих 5'-флэп и область равновесных нуклеотидов, его влияние ограничивается размером флэпа 30 нуклеотидов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 25-74-30006

Влияние гена *UBE2A* на динамику убиквитинирования гистона H2B и экспрессию генов при нейральной дифференцировке ИПСК

Р.В. Миронов (rwmironov@gmail.com)^{1,2}, А.Н. Богомазова¹, М.А. Лагарькова^{1,2}

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

²Кафедра иммунологии, биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Дисфункция X-сцепленного гена *UBE2A*, кодирующего одноимённый E2 убиквитин-конъюгирующий фермент, является причиной развития синдрома умственной отсталости по типу Насименто. Предполагается, что ключевая роль *UBE2A* в развитии связана с моноубиквитинированием гистона H2B по лизину 120 (H2BK120ub), эпигенетической модификацией, связанной с индукцией транскрипции. Однако генные мишени этой модификации на ранних этапах дифференцировки остаются неизвестными. Цель работы — охарактеризовать динамику H2BK120ub и экспрессии генов-маркеров, индуцируемых в ходе нейральной дифференцировки ИПСК, для определения ключевой временной точки для последующего анализа методом хроматиновой иммунопреципитации с полногеномным секвенированием (ChIP-seq).

Методы. Была использована изогенная клеточная модельная система, созданная на основе ИПСК здорового донора: ИПСК с нокаутом гена *UBE2A* и с индуцируемой сверхэкспрессией гена *UBE2A*. Были использованы также ИПСК пациента с синдромом Насименто с делецией в локусе Xq24, захватывающей *UBE2A*. Нейральную дифференцировку ИПСК проводили методом двойного SMAD-ингибирования в течение 144 ч. Уровень моноубиквитинирования гистона H2B оценивали при помощи Вестерн-блоттинга с антителами к H2BK120ub на 48, 96 и 144 ч дифференцировки. В эти же сроки оценивали экспрессию генов, индуцируемых на начальных стадиях дифференцировки, при помощи количественной ОТ-ПЦР.

Результаты. При нейральной дифференцировке ИПСК наиболее высокий уровень H2BK120ub в норме наблюдается на 96-144 ч. Сверхэкспрессия гена *UBE2A* в целом повышает уровень этой модификации. Нокаут или делеция гена *UBE2A* приводит к общему снижению уровня H2BK120ub, причем различия с контролем наиболее выражены на 96 ч. На этой же временной точке при нейральной дифференцировке ИПСК наблюдается максимальная разница между нормой и нокаутом в экспрессии генов *PAX6*, *PAMR1*, *HES5*, *NOS2*.

Выводы. Изменение дозы гена *UBE2A* нарушает динамику уровня убиквитинирования H2BK120ub на ранних этапах нейральной дифференцировки ИПСК. Пик различий по уровню H2BK120ub и экспрессии генов-маркеров между нормой и нокаутом приходится на 96 ч нейральной дифференцировки, что делает эту временную точку оптимальной для дальнейшего анализа методом ChIP-seq.

Роль ВТВ доменов в регуляции сумоилирования TRIM28 и их потенциал в эпигенетическом редактировании

В.К. Морозова (leraholod448@gmail.com)^{1,2}, Я.В. Лобанова^{2,3}, С.В. Женило^{2,3}, Е.Б. Прохорчук^{2,3}

¹ПМГМУ им. И.М. Сеченова, Россия, Москва

²АНОО ВО «Университет «Сириус», Россия, федеральная территория «Сириус»

³Лаборатория геномики и эпигеномики позвоночных, ФИЦ Биотехнологии РАН, Россия, Москва

Введение.

TRIM28 - транскрипционный корепрессор, который привлекается к генам-мишеням KRAB-белками и через сумоилирование рекрутирует гистоновые деацетилазы и метилтрансферазы. KRAB домены широко используются в качестве эпигенетических эффекторов, обеспечивающих репрессию генов без изменения их ДНК последовательности. Недавно показано, что ВТВ домен белка Kaiso способен усиливать сумоилирование TRIM28, подобно KRAB домену. Настоящая работа направлена на поиск ВТВ/POZ белков, способных регулировать сумоилирование TRIM28, и оценку потенциала их ВТВ доменов как аналогов KRAB-доменов в эпигенетическом редактировании.

Методы. С помощью программы Pairwise Structure Alignment (RSCB PDB) был проведен отбор ВТВ-доменов, наиболее схожих по структуре с ВТВ доменом Kaiso. Были получены плазмидные конструкции для экспрессии выбранных ВТВ доменов. Влияние ВТВ-доменов на сумоилирование TRIM28 анализировали с помощью котрансфекции в клетках НЕК293 с последующим вестерн-блоттингом. Были получены плазмидные конструкции эпигенетических редакторов на основе TALEN и dCas9, содержащие выбранные ВТВ домены. Оценку репрессивной активности редакторов проводили с помощью котрансфекции в клетки модельной системы, в которой eGFP находился под целевым промотором, и последующей проточной цитометрии

Результаты. На основании структурного анализа были идентифицированы ВТВ/POZ белки, обладающие высокой степенью гомологии ВТВ домена с ВТВ доменом Kaiso. Среди анализируемых ВТВ-доменов было выявлено несколько кандидатных белков, которые увеличивали уровень сумоилирования TRIM28 в условиях котрансфекции. Исследована репрессивная активность ВТВ домен-содержащих эпигенетических редакторов.

Выводы. Выявлены ВТВ-домены, структурно схожие с Kaiso, усиливающие сумоилирование TRIM28. Определена их способность выступать в составе эпигенетических редакторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта государственной программы Федерального округа «Сириус» «Научно-технологическое развитие Федерального округа «Сириус» (соглашение № 21-03 от 27.09.2024)

Ингибирование ZMPSTE24 как фактор изменения NHEJ-репарации в клетках фибросаркомы

В.Р. Осипова (osipova1910v@gmail.com)^{1,2}, С.В. Лаврушкина², И.И. Киреев²

¹ Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

² НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Введение. Репарация двунитевых разрывов ДНК (DSB) критически важна для поддержания геномной стабильности опухолевых клеток. ZMPSTE24 - металлопротеаза, обеспечивающая процессинг преламина А и формирование зрелой ядерной ламина. Показано, что ингибиторы ZMPSTE24 (лопинавир и фозиноприл) вызывают накопление преламина А и изменение механических свойств ядра. Однако нарушение баланса форм ламина А может влиять на процессы восстановления DSB, в том числе на негомологичное соединение концов (NHEJ). Цель работы - оценить влияние ингибирования ZMPSTE24 на эффективность NHEJ в клетках фибросаркомы HT1080.

Методы. Клетки HT1080 инкубировали 48 ч с лопинавиром (50 мкМ) или фозиноприлом (20 мкМ). DSB индуцировали этопозидом (0,5 мкМ, 24 ч). Репарацию анализировали на фиксированных клетках (через 40 мин, 6 и 24 ч) методом иммуноцитохимии по маркерам γ H2AX и 53BP1 с количественной оценкой числа и интенсивности фокусов. Для прижизненного анализа клетки транзигентно трансфицировали плазмидой 53BP1-GFP и отслеживали динамику формирования и исчезновения фокусов в реальном времени.

Результаты. Анализ фиксированных препаратов показал, что ингибирование ZMPSTE24 сопровождается повышением исходного уровня повреждений ДНК, а также усиленным формированием фокусов γ H2AX и 53BP1 после индукции двунитевых разрывов. По сравнению с контролем наблюдалась замедленная динамика их исчезновения, что указывает на изменение процессов восстановления DSB. Прижизненные наблюдения продемонстрировали наличие различных паттернов репарации в контрольных клетках, включая варианты с быстрым разрешением повреждений. В условиях ингибирования ZMPSTE24 происходило смещение распределения этих паттернов: увеличивалась доля клеток с накоплением трудноразрешимых фокусов 53BP1, а скорость их исчезновения существенно снижалась.

Выводы. Ингибирование ZMPSTE24 в клетках фибросаркомы HT1080 замедляет динамику репарации индуцированных разрывов ДНК по пути NHEJ.

Авторы благодарят Программу развития МГУ (ПНР 5.13) и ЦКП "Субдифракционная микроскопия и спектроскопия" МГУ за предоставление доступа к оборудованию

Влияние трансдукции мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека аденовирусными конструкциями с геном костного морфогенетического белка-2 на остеогенный потенциал внеклеточных везикул

Д.С. Пайметьева (paimetjeva.daria@yandex.ru)^{1,2}, В.П. Басина¹, И.А. Недурובה¹, Т.Б. Бухарова¹

¹ *ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Россия, Москва*

² *Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва*

Введение. Секретом мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) включает внеклеточные везикулы (ВВ), которые участвуют в регуляции регенеративных процессов, а потому могут применяться для стимуляции остеогенеза. Одним из способов повышения терапевтической эффективности ВВ является их обогащение регуляторными молекулами за счет генетической модификации донорских клеток. Цель работы: изучение влияния ВВ, полученных из ММСК жировой ткани человека, трансдуцированных аденовирусными конструкциями, несущими ген костного морфогенетического белка-2 (BMP-2), на индукцию остеогенной дифференцировки ММСК.

Методы. Генетически-модифицированные ММСК получены путем трансдукции аденовирусными векторами, несущими ген BMP2. Выделенные ультрацентрифугированием ВВ охарактеризованы с помощью метода динамического светорассеяния, просвечивающей электронной микроскопии, анализа траектории наночастиц и вестерн-блоттинга. Способность ВВ индуцировать остеогенную дифференцировку ММСК ЖТ исследовали по экспрессии остеогенных маркеров с помощью ПЦР в реальном времени и минерализации внеклеточного матрикса путем окрашивания ализариновым красным.

Результаты. ВВ обладали характерной морфологией, средний гидродинамический диаметр составил 140 нм, подтверждено наличие поверхностных маркеров (CD9, CD81, CD63). В результате инкубации ММСК ЖТ с ВВ, полученными из интактных клеток, на 14 день наблюдалось повышение уровня экспрессии транскрипционного фактора RUNX2, что указывает на активацию ранних этапов остеогенной дифференцировки. При этом, воздействие везикул, полученных из трансдуцированных клеток, приводило к повышению экспрессии гена щелочной фосфатазы (ALPL) и выраженной минерализации внеклеточного матрикса, что свидетельствует о смещении транскрипционного профиля в сторону поздней остеогенной дифференцировки.

Выводы. Таким образом, ВВ из клеток, генетически модифицированных аденовирусными конструкциями, содержащими ген BMP2, усиливают остеогенную дифференцировку ММСК ЖТ.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «МГНЦ».

Роль апоптоза в формировании секретом-опосредованной лекарственной устойчивости аденокарциномы яичников

С.О. Проволович (sofiprovovl@gmail.com)^{1,2}, П.В. Шнайдер¹, А.А. Манукян¹, В.О. Шендер^{1,3}

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

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

³Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Россия, Москва

Введение. Аденокарцинома яичника — это агрессивная и тяжело диагностируемая форма рака. На данный момент для её терапии успешно применяются химиопрепараты на основе платины. Однако у большинства пациентов развивается химорезистентность при повторном лечении. По последним данным приобретение химорезистентности может быть опосредованно компонентами секретома от погибающих опухолевых клеток. При этом цитопротективный эффект секретома снижается при ингибировании апоптоза у погибающих донорных клеток. Однако молекулярные механизмы данного явления остаются неясными.

Методы. Донорные клетки аденокарциномы яичника SKOV3 инкубировали с цисплатином и без него на бессывороточной среде в течение 7 часов. Далее от клеток отбирали среду для получения фракции секретома 0-7 часов. После этого к клеткам добавляли новую среду без цисплатина. Процедуру повторяли для получения фракций секретома 7-24 часов и 24-48 часов. Далее мы инкубировали реципиентные клетки SKOV3 с фракциями секретома, а затем с цисплатином, после чего оценивали их жизнеспособность при помощи МТТ-теста. Для всех фракций секретомов был проведен протеомный анализ и вестерн-блоттинг. Параллельно на протяжении 48 часов мы отслеживали активность каспаз-3/7 и изменение концентрации цитозольного кальция в донорных клетках при помощи генетически кодируемого сенсора jRCaMP1a.

Результаты. По результатам МТТ-теста, наибольший вклад в развитие химорезистентности реципиентных опухолевых клеток вносит фракция секретома 24-48 часов. Из данных, полученных методом протеомного профилирования, видно, что эта фракция обогащена белками сплайсосомы, а также белками, регулирующими транскрипцию и метаболизм РНК. Этот временной промежуток также совпадает с пиком кальциевого сигнала в донорных клетках и повышением активности каспаз.

Выводы. Клеточная гибель донорных клеток SKOV3, индуцированная цисплатином, сопровождается повышенной секрецией белков сплайсосомы, которые, предположительно, могут влиять на развитие химорезистентности у реципиентных опухолевых клеток.

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

**Взаимодействия dCas9 с нуклеосомами, содержащими гистон
H3.3: анализ методами микроскопии одиночных частиц и
гель-электрофореза**

*Е.А. Рощина (kate-5830@mail.ru)¹, О.В. Гераськина^{1,2}, В.М. Студитский^{1,3},
А.В. Феофанов^{1,2}*

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Институт биологии гена Российской академии наук, Россия, Москва

³Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, USA

Введение. Системы CRISPR-dCas активно изучаются для нацеленного воздействия на определенные участки генома. Они эффективно связываются со свободной от белков ДНК, тогда как их способность к взаимодействию с нуклеосомной ДНК требует детального исследования, в том числе и для нуклеосом, в состав которых входят варианты гистонов. Из-за отсутствия структурных данных о том, как Cas9 нацеливается на ДНК в нуклеосомах, принципы, регулирующие нацеливание Cas9 на эукариотический геном, остаются неясными.

Цель работы — изучить влияние гистона H3.3 который присутствует в транскрипционно-активном хроматине на взаимодействие комплекса dCas9-гРНК с нуклеосомами в зависимости от положения таргетной последовательности.

Мононуклеосомы, имеющие в составе октамера гистонов канонический гистон H3 или вариант H3.3, собирали на ДНК-матрице, содержащей позиционирующую нуклеосому последовательность 601 и донор-акцепторную пару флуоресцентных меток Cy3 и Cy5.

Методы. Взаимодействие этих нуклеосом с dCas9-гРНК, нацеленным на участки вблизи диады и входа ДНК в нуклеосому, анализировали методом гель-электрофореза и микроскопии одиночных частиц на основе Фёрстеровского резонансного переноса энергии.

Результаты. Показано, что присутствие H3.3 приводит к усилению связывания нуклеосом с dCas9-гРНК при расположении РАМ-мотива как вблизи диады, так и около границы нуклеосомы. Наиболее выраженные изменения в структуре нуклеосом в комплексе с dCas9-гРНК наблюдались вблизи границы нуклеосомы, соответствовали отворачиванию ДНК от октамера гистонов и указывали на повышенную подвижность ДНК в нуклеосомах, содержащих H3.3.

Выводы. Результаты уточняют механизмы взаимодействия dCas9 с нуклеосомами в контексте транскрипционно-активного хроматина и важны для учета эпигенетических особенностей при разработке генетических технологий с использованием системы CRISPR-dCas9.

Работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования РФ (контракт №075-15-2024-539).

Анализ нерепликативных белков вирусов семейства *Qinviridae*

И.В. Селифонов (selifonov2002@gmail.com)

Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Согласно современным представлениям о систематике вирусов, подавляющее большинство вирусов с РНК-геномом отрицательной полярности (группа V по Балтимору) группируются в монофилетический таксон - тип *Negarnaviricota*. Эта группа охватывает широкий круг хозяев и включает ряд важных патогенов человека и животных. Многие (-)оцРНК-вирусы на данный момент не были выделены и известны только по метагеномным данным. Среди них - вирусы семейства *Qinviridae*, геном которых представлен двумя молекулами РНК и кодирует два белка: репликазу и капсидный белок. Изначально эти вирусы были обнаружены у членистоногих и нематод, однако впоследствии они были найдены у растений. Вирусы семейства *Qinviridae* не имеют генов транспортных белков, и механизмы их репликации и межклеточного транспорта в организме растения неизвестны. В данной работе изучается эволюция N-белков *Qinviridae*, на примере капсидного белка (*QinNP*) вируса клевера RCQRV исследуются их локализация и функции.

Методы. Методы молекулярной филогенетики, предсказание структуры белков с использованием AlphaFold, получение рекомбинантных конструкций, транзientная экспрессия чужеродных генов в растениях с помощью агроинфильтрации, флуоресцентная конфокальная микроскопия.

Результаты. Согласно построенному выравниванию N-белков *Qinviridae*, последовательности вирусов растений содержат консервативную вставку длиной порядка 150 аминокислотных остатков вблизи N-конца, которая отсутствует у вирусов животных. При этом на филогенетическом дереве, построенном по последовательностям N-белков, вирусы животных четко отделены от вирусов растений. В структурах, предсказанных AlphaFold2, вставка соответствует дополнительному домену, содержащему четыре альфа-спирали и небольшой антипараллельный бета-лист. Химерные варианты *QinNP*, содержащие GFP на N- или C-конце, образуют в растительной клетке мелкие включения, ассоциированные с поверхностью ЭПР (но не колокализирующиеся с ним). Включения *QinNP*-mRFP имеют более выраженную структуру и часто повторяют форму ЭПР. Эксперименты с репортерной конструкцией PVX-POL-GFP не подтверждают участие *QinNP* в межклеточном транспорте и в регуляции пропускной способности плазмодесм.

Выводы. N-белки вирусов семейства *Qinviridae*, заражающих растения, содержат дополнительный домен с неизвестной функцией, отсутствующий в N-белках вирусов животных. В клетке белок *QinNP* склонен к агрегации и имеет сродство к ЭПР. *QinNP* не обеспечивает комплементацию межклеточного транспорта в системе с репортером PVX-POL-GFP.

Система BREX типа IV ассоциирована с фосфотиолированием ДНК и проявляет антифаговую активность в гетерологичной системе экспрессии

Смирнов А. Е. (alexandr.jeday@gmail.com)^{1,2}, Дёмкина А. О.², Скутель М. А.², Исаев А. Б.²

¹Биологический факультет, кафедра иммунологии, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Центр молекулярной и клеточной биологии, Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

Введение. Самые распространённые в прокариотических геномах противофаговые системы рестрикции-модификации (РМ) различают собственную и чужеродную ДНК по наличию метилирования нуклеотидов. Однако также существуют системы *dnd* и *ssp*, которые используют для этой цели другой тип модификации — фосфотиолирование (РТ) — замену атома кислорода на атом серы в сахарофосфатном остове ДНК. Эту модификацию осуществляют белки с PAPS-редуктазным доменом, который встречается в составе кластеров других защитных систем, например в BREX типа IV. Тип IV отличается от других BREX заменой белка метилтрансферазы на белок с PAPS-редуктазным доменом. Мы предположили, что этот вариант системы способен использовать РТ-модификацию.

Методы. В ходе работы мы проанализировали ДНК 6 штаммов с системой BREX IV из коллекции DSM с помощью ВЭЖХ-МС и обработкой йодом (I2). Проведено РТ-секвенирование (РТseq). Для осуществления гетерологичной экспрессии BREX IV мы клонировали геномный кластер из *Denitrovibrio acetiphilus* в плазмиду pET41, трансформировали *E. coli* и провели делецию гена нуклеоид-связывающего белка H-NS. С целью определения эффективности работы системы использовался метод EOP.

Результаты. В ДНК штаммов, несущих систему BREX IV, идентифицирована РТ-модификация в динуклеотидах AA. Обнаружен сайт вносимой модификации: 5'-AAG-3'. Получен штамм *E. coli* BL21AI ΔH-NS pET41_BREX_IV, демонстрирующий защиту от широкого спектра бактериофагов, в особенности против лямбда-подобных, P2, LF82, и Q ϕ en0. Доказано функционирование BREX IV как системы рестрикции-модификации путём получения модифицированных лизатов фага P2.

Выводы. Система BREX IV типа является системой рестрикции-модификации, осуществляющей фосфотиолирование ДНК по сайту 5'-AAG-3'.

Так же соавторами работы являются Ярема П. О.², Котовская О. А.². Работа была выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда 22-74-10089. Масс-спектрометрия была выполнена на базе передового масс-спектрометрического центра Сколтеха при поддержке внутренних грантов Сколтеха.

Новый аналог Верубулина – антипролиферативная активность и действие на микротрубочки цитоскелета нормальных и опухолевых клеток

Е.В. Соколова (lillsy.small@gmail.com)¹, Ю.А. Неменющая², А.С. Чуркина³, К.Н. Седенкова²

¹Биотехнологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

³НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ, Россия, Москва

Введение. Микротрубочки (МТ) – один из компонентов цитоскелета клетки, полые неветвящиеся динамические структуры, состоящие из димеров белка тубулина, образуют радиальную сеть в интерфазе и формируют веретено деления во время митоза. МТ используются в качестве мишени для химиотерапевтических препаратов, поскольку их разрушение приводит к блоку митозов и, как следствие, гибели клеток. Известны соединения, связывающиеся с колхициновым участком тубулина (колхицин, Комбретастин А4). Эти вещества используют для лечения онкобольных, однако они обладают рядом побочных эффектов, связанных с их высокой токсичностью и слабой избирательностью в отношении опухолевых клеток (выраженным повреждающим эффектом на нормальные клетки организма, включая эндотелий сосудов). Поэтому, несмотря на широкое использование упомянутых веществ в клинической практике, поиск нацеленных на МТ препаратов продолжается.

Методы. В ходе настоящего исследования был синтезирован пиримидин 1 (6-изопропил-N-(4-метоксифенил)-N,2-диметилпиримидин-4-амин) – аналог высокоэффективного ингибитора полимеризации тубулина Верубулина, в котором бициклическое хиназолиновое ядро заменено на пиримидиновый фрагмент с гидрофобными алифатическими заместителями. Чтобы изучить его биологические эффекты, на клетки аденокарциномы MCF7 и эндотелия Ea.hy926 *in vitro* воздействовали пиримидином 1 в дозах, выбранных на основании МТТ теста. Далее (1) проводили иммуноцитохимическое окрашивание МТ и выявление хромосом с помощью DAPI; (2) анализировали состояния системы МТ в интерфазе и митозе; а также (3) проводили количественный анализ доз-зависимых изменений митотического индекса.

Результаты. Пиримидин 1 обладает доз-зависимым действием на опухолевые клетки: (1) повышение концентрации вызывало пропорциональное разрушение МТ; (2) нарушалась организация системы МТ как в интерфазе, так и в митозе. Низкие дозы избирательно действовали на митозы, а система МТ интерфазных клеток оставалась интактной, повреждения затрагивали периферические концы МТ, но не их общую организацию.

Выводы. В минимальных низкотоксичных дозах пиримидин 1 эффективно действует на активно делящиеся опухолевые клетки, нарушая формирование митотического веретена и приводя к блоку митозов на стадии метафазы. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 25-23-00127.

Функциональные и метаболические особенности дифференцировки стромальных клеток роговицы человека

М.А. Сотникова (*m.sotnikova1@g.nsu.ru*)

Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ИЦиГ СО РАН, Россия, Новосибирск

Введение. Травмы глаза — одна из основных причин снижения зрения вследствие нарушения прозрачности роговицы. Ведущую роль играет фиброз, обусловленный дифференцировкой кератоцитов в фибробласты и миофибробласты. Разработка клеточной терапии для восстановления стромы требует понимания метаболических механизмов этой трансформации. Эндометаболомный скрининг методом ВЭЖХ-МС/МС позволяет выявить внутриклеточные маркеры, определяющие функциональный фенотип клеток и прозрачность роговицы.

Методы. Первичные культуры кератоцитов (СК) и фибробластов (CF) выделены из лентикул. Дифференцированные кератоциты (dСК) и миофибробласты (Муо) получены *in vitro* в бессывороточной среде либо с добавлением TGF- β 1. Пролиферацию и миграцию оценивали на xCELLigence; экспрессию молекул адгезии — проточной цитометрией; морфологические особенности — флуоресцентной микроскопией. Анализ 385 метаболитов выполнен методом ВЭЖХ-МС/МС. Достоверность различий оценивали ANOVA, кластеризацию — методами PCA, PLS-DA и MDS.

Результаты. Согласно данным импедансного анализа, фибробласты обладали высокой пролиферативной и миграционной активностью по сравнению с кератоцитами, тогда как миофибробласты демонстрировали максимальную функциональную активность, экспрессировали α -SMA и проявляли сократительную способность, что подтверждало их фибротический фенотип. Метаболомный скрининг выявил 147 метаболитов с достоверными различиями между фенотипами, преимущественно липидов и ацилкарнитинов. Метод PCA не показал разделения кератоцитов с дифференцированными кератоцитами и фибробластов с миофибробластами. MDS подтвердило соответствие метаболических изменений биологической последовательности дифференцировки СК→CF→Муо с частичной реверсией dСК.

Выводы. Дифференцировка кератоцитов в фибробласты и миофибробласты изменяет метаболический профиль клеток. Метаболом фибробластов и миофибробластов отличался от кератоцитов, ревертированные кератоциты занимали промежуточное положение. Различия в уровнях липидов и ацилкарнитинов указывают на вовлеченность метаболических путей в фиброгенез роговицы, что обосновывает перспективность метаболомного скрининга для выявления маркеров клеточных фенотипов в клеточной терапии.

Работа выполнена по госзаданию Минобрнауки FWNR-2025-0016

Характеристика взаимодействия нуклеоид-ассоциированных РНК и крестообразной ДНК с белком HU

А.Р. Стрежнева (*strezhneva.ar@phystech.edu*)^{1,2}, А.А. Семёнов^{1,2}, А.Ю. Горбачёв¹

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

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Россия, Долгопрудный

Введение. Белок HU – гистоноподобный белок, который может связываться с различными формами ДНК, РНК, а также играет роль шаперона во взаимодействии нуклеоид-ассоциированных РНК4 (наРНК4) и ДНК, влияя на конформацию нуклеоида. Состоит из двух субъединиц: α и β . В ходе экспериментов по транспозонному мутагенезу были идентифицированы наРНК4, которые предположительно связаны со сменой фенотипа *E. coli* в сторону АИЕС. В связи с этим были выдвинута следующая гипотеза: взаимодействие наРНК4 и белка HU играет роль в регуляции вирулентности АИЕС. Выяснение природы взаимодействия наРНК4 и HU с ДНК может помочь в поиске мишеней для лечения болезни Крона и определения механизма её возникновения.

Методы. Для исследования были выбраны наРНК4-305, расположенная между генами *prgE* и *codB*, и наРНК4-330, расположенная между генами *prgV* и *prgC*. Для отработки методики анализа изменения электрофоретической подвижности в геле был проведён эксперимент с разными концентрациями $HU\alpha\beta$ и постоянным количеством крДНК с FAM-меткой. Нарботка ДНК-матрицы для дальнейшей транскрипции наРНК при помощи T7 РНК-полимеразы проводилась с помощью вложенной ПЦР. Присоединение флуоресцентной метки к наРНК проводилось при помощи модифицированной лабораторной TdT. Для подтверждения взаимодействия $HU\alpha\beta$ и наРНК4 был проведён анализ изменения электрофоретической подвижности в геле. Получение конструкторов на основе векторов pET28a(+) с вставками генов *hupA* и *hupB*, кодирующих субъединицы $HU\alpha$ и $HU\beta$, было проведено с помощью реакций рестрикции и лигирования.

Результаты. Расчёты константы связывания $HU\alpha\beta$ и крДНК показали значение, близкое к теоретическому. Подтверждена возможность присоединения флуоресцентно меченого FAM-ddNTP к РНК при помощи TdT. Показано образование комплексов при взаимодействии наРНК4 и $HU\alpha\beta$.

Выводы. При помощи анализа изменения электрофоретической подвижности в геле было подтверждено специфичное связывание гетеродимера $HU\alpha\beta$ с крДНК и с наРНК4, константа связывания $HU\alpha\beta$ и крДНК оказалась близка к теоретической.

**Сравнение защитных свойств берберина и его производного
C10Berb в модели цисплатин-индуцированного старения
миобластов человека**

Н.Ю. Строчкова (StroNatala@yandex.ru)^{1,2}, М.А. Челомбитько²

¹*Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва*

²*Институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Россия, Москва*

Введение. Химиотерапевтический препарат цисплатин, применяемый при лечении ряда онкологических заболеваний, имеет цитостатическую активность. Этим обусловлено его побочное действие – преждевременное старение здоровых клеток. Алкалоид растительного происхождения берберин способен смягчать токсичность берберина. Однако, высокие концентрации берберина обладают собственной генотоксичностью, обусловленной накоплением соединения в ядре. Чтобы предотвратить повреждение ДНК, было синтезировано производное берберина с децилоксикарбонилметильным заместителем – C₁₀Berb. За счёт алкильного заместителя соединение имеет митохондриальную локализацию и обладает свойствами разобщителя митохондриального дыхания и окислительного фосфорилирования. В данной работе проводилось дальнейшее изучение свойств C₁₀Berb, а также сравнение его защитной способности с таковой берберина в модели цисплатин-индуцированного старения миобластов человека.

Методы. Гистохимическая оценка проявления ассоциированной со старением β -галактозидазы, определение содержания белков AMPK и ERK вестерн-блоттингом, оценка степени накопления берберина и C10Berb, оценка индекса старения (ИС) проточной цитометрией

Результаты. Анализ биодоступности показал, что C10Berb лучше усваивается клетками, чем берберин. При этом из сравнения влияния на ИС (рассчитан по формуле: $ИС = ((nAF - 1) + 5 \times (nD - 1))/2$, где nAF – автофлуоресценция липофусцина, а nD – диаметр клетки) следует, что C10Berb также обладает лучшими геропротекторными свойствами, чем предшественник, в диапазоне концентраций от 100нМ до 500нМ. Также было обнаружено, что C10Berb эффективнее снижает долю β -гал-положительных клеток, чем берберин. Более того, анализ разобщающей активности показал, что C10Berb является мягким разобщителем митохондриального дыхания и окислительного фосфорилирования, в то время как берберин подобными свойствами не обладает. В ходе анализа вестерн-блоттингом было обнаружено, что C10Berb стимулирует активность AMPK и подавляет - ERK.

Выводы. Таким образом, C10Berb обладает лучшими защитными свойствами, чем берберин, и является более перспективным для снижения цисплатин-индуцированной токсичности.

Анализ аллельной экспрессии гена SIX3 на изогенных линиях культуры клеток ИПСКч с делецией гена SIX2

А.Р. Тархова (annatarhova49901@gmail.com)^{1,2}, А.А. Хабарова¹, В.С. Фишман^{1,3}, П.А. Сальников^{1,2}

¹*Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, Новосибирск*

²*Факультет естественных наук НГУ, Россия, Новосибирск*

³*Научно-технологический университет "Сириус", Россия, Сочи*

Введение. Семейство генов SIX (Sine Oculis Homeobox) кодирует транскрипционные факторы, играющие важную роль в формировании тканей и органогенезе человека. В данной работе рассматривается клинический случай: пациент имеет дисморфизмы лица, аутистические черты, тугоухость и ограниченную мобильность в суставах. У него была обнаружена делеция SIX2, включающая границу доменов между SIX2 и SIX3. Профили экспрессии этих генов различаются: SIX3 экспрессируется в глазах и переднем мозге, SIX2 - практически во всех органах за исключением вышеперечисленных. Несмотря на первичный генетический анализ клиническая картина имеет признаки нарушения работы интактного SIX3.

Методы. Для достоверного анализа влияния делеции SIX2 на экспрессию SIX3 вне генетического фона пациента необходимы изогенные линии. Для их получения в культуру клеток ИПСК здорового человека при помощи CRISPR/Cas9 была внесена делеция как у пациента. Анализ полученных клеточных линий проводился с помощью NGS. ИПСК пациента, изогенные линии, а также исходная линия здорового человека, в качестве контрольной, дифференцировались в нейрональные предшественники (NPC). Анализ аллельной экспрессии гена SIX3 в NPC оценивался с помощью UMI (Unique Molecular Identifiers) опосредованного таргетного секвенирования и аллель специфичных библиотек кДНК. Аллели идентифицировали по SNV (single nucleotide variant). Биоинформатический анализ проводился с использованием программ BowTie2, STAR и IGV.

Результаты. Были получены 2 изогенные линии клеток ИПСК человека с делецией SIX2, аналогичной имеющейся у пациента, и проведена дифференцировка ИПСК (здорового человека, пациента и изогенных линий) в NPC. При анализе транскриптов гена SIX3 соотношение аллелей в NPC здорового человека составило 50/50, а в NPC пациента и изогенных линиях отношение аллеля с делецией к аллелю дикого типа составило 92/8.

Выводы. При делеции гена SIX2 с удалением границы домена в нейрональных предшественниках наблюдается аллельный дисбаланс экспрессии интактного SIX3 в сторону увеличения экспрессии аллеля с делецией.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственной программы Федерального округа «Сириус» «Научно-технологическое развитие федерального округа «Сириус» (Соглашение №26-03 от 27.09.2024).

**Внеклеточные везикулы макрофагов как фактор
иммуномодуляции при инфекции *Mycobacterium abscessus***

Ю.С. Фомичева (yulia.s.fomicheva@gmail.com)^{1,2}, А.С. Григоров¹, Е.Г. Салина³, О.С. Быченко¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, Москва

²Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

³Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН, Россия, Москва

Введение. *Mycobacterium abscessus* – второй по распространенности возбудитель пневмонии среди нетуберкулезных микобактерий. Иммуномодулирующая терапия – один из перспективных подходов к лечению, который может дополнить лечение антибиотиками, при этом иммунные механизмы используются для усиления действия антимикробных препаратов. Инфекция макрофагов внутриклеточными бактериями индуцирует секрецию внеклеточных везикул (160 нм), содержащих компоненты фагоцитов и бактерий и играющих роль в иммунорегуляции. Изучение состава и иммуномодулирующих свойств везикул, секретируемых макрофагами при заражении *M. abscessus*, а также механизмов взаимодействия бактерий и иммунной системы хозяина представляют собой важную научно-прикладную проблему.

Методы. Макрофаги RAW 264.7 инфицировали *Mycobacterium abscessus* ATCC19977 (MOI 1 : 10). Внеклеточные везикулы выделили из стерильной культуральной жидкости (набор EchoEasy, Qiagen). Везикулами обработаны макрофаги, выделенная из образцов тотальная РНК использована для высокопроизводительного секвенирования (Illumina). Уровень гликолиза оценивали методом теста гликолитического стресса (измерение ECAR).

Результаты. В ходе настоящей работы получены и охарактеризованы везикулы, секретируемые макрофагами RAW264.7, инфицированными *M. abscessus*, и без инфекции. Протеомный анализ выявил 159 уникальных для инфицированных клеток белков, участвующих в процессах антиген-презентации, клеточного транспорта и апоптоза. В результате сравнительного анализа транскриптомов макрофагов, обработанных двумя типами везикул, обнаружено 752 дифференциально экспрессирующихся гена. Функциональный анализ выявил активацию TLR-опосредованного MyD88-зависимого пути, пути, опосредованного NOD-подобными рецепторами, подавление митохондриальных функций. Выявлено повышение экспрессии IL-8 и активация гликолиза в макрофагах после обработки везикулами, секретируемыми при инфекции.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о наличии иммуномодулирующих свойств у везикул, секретируемых инфицированными *Mycobacterium abscessus* макрофагами.

Функциональная роль микроРНК внеклеточных везикул трематод *Opisthorchis felinus* в регуляции генов клеточного цикла человека

Э.С. Фукс (*e.fuks1@g.nsu.ru*)^{1,2}, М.Ю. Пахарукова^{2,1}

¹Новосибирский государственный университет, факультет естественных наук, Россия, Новосибирск

²Лаборатория молекулярных механизмов патологических процессов ИЦиГ СО РАН, Россия, Новосибирск

Введение. МикроРНК – консервативный инструмент посттранскрипционного сайленсинга, распространенный, в том числе, среди паразитических организмов. Описторхоз, вызываемый трематодой *Opisthorchis felinus*, связан с развитием неоплазии желчных протоков и других тяжелых гепатобилиарных заболеваний. Механизмы воздействия паразитов на холангиоциты человека остаются недостаточно изученными. Одним из наиболее вероятных посредников этого взаимодействия являются внеклеточные везикулы, содержащие микроРНК.

Цель работы: валидация предсказанных генов-мишеней некодирующих РНК *O. felinus* в геноме человека среди негативных регуляторов клеточного цикла.

Методы. Предсказание энергии связывания РНК дуплексов с помощью биоинформатических методов (RNAhybrid), генетическое клонирование, подготовка и трансформация компетентных клеток, секвенирование по методу Сэнгера, классические культуральные методы исследования.

Результаты. В рамках работы проведен скрининг 16 мажорных везикулярных микроРНК миметиков *O. felinus* с последующей оценкой пролиферации и миграции холангиоцитов человека H69. Выбраны микроРНК, наиболее значимо влияющие на функциональную активность клеток (пролиферацию и миграцию). Для выбранных микроРНК предсказаны гены-мишени в геноме человека среди негативных регуляторов клеточного цикла: p15, p16, p18, p27, p53, FKBP1A, Smurf2, Rb1, SERPINE1. Получено 9 конструкций на основе вектора pmirGlo, содержащих районы 3'UTR генов-мишеней, обогащенные сайтами посадки микроРНК. Корректность полученных вставок подтверждена секвенированием по методу Сэнгера. Валидацию предсказанных генов-мишеней микроРНК *O. felinus* в геноме человека проводили с помощью двойного люциферазного теста.

Выводы. Таким образом, полученные данные подтверждают, что микроРНК внеклеточных везикул *O. felinus* функционально взаимодействуют с 3'-UTR генов негативных регуляторов клеточного цикла человека, модулируя пролиферативную и миграционную активность холангиоцитов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 24-44-00048.

Эпигенетическое редактирование моноаллельных генов на модельной системе НЕК293

П.Р. Чирков (*pavel.chirkov.00@list.ru*)^{1,2}, Я.В. Лобанова^{3,2}, Е.Б. Прохорчук^{3,2}, С.В. Женило^{3,2}

¹РНИМУ им. Н.И. Пирогова, институт Биомедицины, Россия, Москва.

²Лаборатория геномики и эпигеномики позвоночных, ФИЦ Биотехнологии РАН, Россия, Москва

³НТУ Сириус, Россия, Федеральная территория "Сириус"

Введение. Моноаллельная экспрессия генов представляет собой состояние, при котором экспрессируется только один из двух аллелей. Особый интерес вызывает случайная моноаллельная экспрессия, которая может отвечать за дебют ряда заболеваний (нарушения врожденного иммунитета) за счет переключения с интактного аллеля на мутантный. Настоящая работа посвящена разработке и валидации эпигенетических редакторов на основе KRAB- и VTB-доменов для направленной модуляции экспрессии моноаллельных генов.

Методы. В качестве модельной системы использовали HEK293 клетки. Наличие двух аллелей было подтверждено методом ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру. Промоторные регионы подтвержденных моноаллельных генов были заклонированы в лентивирусный вектор miniCMVeGFP, с которым была проведена вирусная трансдукция для получения стабильной экспрессии в клеточной линии HEK293. Были подобраны и заклонированы оптимальные для выбранных промоторов последовательности гайдовых РНК в конструкции с эпигенетическими редакторами. Эпигенетические редакторы трансфецировали в HEK293, проводили отбор пурамицином. Для оценки эффективности редактирования проводили проточную цитометрию.

Результаты. Анализ данных транскриптома HEK293 и клонов, полученных из данной линии, выявил три гена, с моноаллельной экспрессией: CDC25a, SND1, TRIM25, наличие однонуклеотидных полиморфизмов в которых было подтверждено в геномной ДНК. Были получены клетки HEK293 экспрессирующие eGFP под целевыми промоторами этих генов. Получены конструкции на основе вектора рх459 с выбранными гайдовыми последовательностями, и эпигенетическими редакторами KRAB-dCas9-DNMT3a-DNMT3l или VTB-dCas9-DNMT3a-DNMT3l. Получены результаты с оценкой эффективности редактирования выбранных генов.

Выводы. В клетках HEK293 гены CDC25a, SND1 и TRIM25 являются моноаллельными. Подавление их экспрессии может быть достигнуто с помощью эпигенетических редакторов.

Работа поддержана грантом государственной программы Федерального округа «Сириус» «Научно-технологическое развитие Федерального округа «Сириус» (соглашение № 21-03 от 27.09.2024)

ИНДУКТОР БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА ПОДАВЛЯЕТ ОСТЕОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

М.В. Щебетина (*mshchebetina@mail.ru*)¹, В.А. Усачёв¹, К.Ю. Кулебякин¹

¹Московский Государственный Университет им. М. В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Ключевыми процессами, определяющими дифференцировку клеток являются синтез новых белков и перестройка внеклеточного матрикса. Продукция матриксных и цитозольных белков, в свою очередь, требует постоянного вовлечения системы белков теплового шока. В настоящей работе представлены данные о влиянии индуктора белков теплового шока - геранилгеранилацетона (ГГА) на процессы остеогенной и адипогенной дифференцировки мезенхимных стволовых клеток (МСК).

Методы. В работе были использованы методы культивирования и дифференцировки МСК, микроскопии одиночных клеток, ОТ-ПЦР и качественного протеомного анализа клеточных лизатов методом масс-спектрометрии.

Результаты. Предобработка клеток ГГА в течение суток увеличивает количество клеток, отвечающих антиостеогенными кальциевыми осцилляциями. При проведении остеогенной дифференцировки МСК добавление ГГА вызывает снижение её эффективности. Анализ генов-маркеров остеогенеза выявил снижение экспрессии RUNX2 и OSX, но не OCN. При этом добавление ГГА не оказывает значительного эффекта на адипогенную дифференцировку МСК. По данным протеомного анализа, обработка МСК ГГА приводит к снижению содержания в клетках 54 белков. Анализ данного набора белков выявил значительное снижение уровня активаторов аденилатциклаз. Гены белков данного набора – гены кальмодулинов, способные активировать ряд изоформ аденилатциклаз. Протеомный анализ выявил, что под воздействием ГГА в МСК наблюдается снижение уровня ряда белков: CFL1, LASP1 и TRPM1. Эти белки, как мы предполагаем, вовлечены в остеогенную дифференцировку через модуляцию актинового цитоскелета.

Выводы. Эффект ГГА на популяцию стволовых клеток может быть значительно шире, чем представлялся раньше. Ингибирование аденилатциклазного сигнального каскада в сочетании с подавлением экспрессии белков, регулирующих актиновый цитоскелет, приводит к существенному снижению эффективности остеогенной дифференцировки МСК.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда №25-75-30005 "Регуляция процессов обновления клеток в организме, фундаментальной основы длительного сохранения функциональной активности органов и тканей, здоровья и активного долголетия человека" и при поддержке Программы развития МГУ, проект № 23-Ш04-11.

ФИЗИОЛОГИЯ И МЕДИЦИНСКАЯ БИОХИМИЯ



Хомогенетическая модель болезни Паркинсона

Т.А. Загороднева (zagorodnevata63@gmail.com)^{1,2}, В.Г. Кругть^{1,3}, О.В. Подгорный^{2,3}, В.В. Белоусов^{1,3}

¹РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

²ГНЦ ИБХ РАН, Россия, Москва

³Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА РФ, Россия, Москва

Введение. Изучение патогенеза болезни Паркинсона (БП), поиск ранних маркеров и разработка эффективной терапии остаются актуальными задачами. Существующие генетические и токсические модели на животных лишь частично воспроизводят патогенез БП. Полагая ключевую роль окислительного стресса и митохондриальной дисфункции в дофаминергических (ДА) нейронах чёрной субстанции (SNpc), мы применили хомогенетический подход на основе оксидазы D-аминокислот (DAAO) для субстрат-зависимой генерации H₂O₂ в различных компартментах этих нейронов. Поэтому цель работы — создание новой хомогенетической модели БП на животных и оценка воспроизведения основных патогенетических признаков заболевания.

Методы. Для селективной экспрессии DAAO в цитоплазме и митохондриях дофаминергических нейронов SNpc были созданы конструкции под контролем промотора гена, кодирующего тирозингидроксилазу крысы (rTH). Эти конструкции упаковывали в аденоассоциированные вирусы (AAV) и вводили стереотаксически в SNpc мышей. Хомогенетическую продукцию H₂O₂ индуцировали пероральным введением D-норвалина (D-Nva) с питьевой водой. Паркинсоноподобную патологию оценивали с помощью поведенческих тестов (открытое поле и ротарод), определения концентрации дофамина и его метаболита ДОФУК в стриатуме и иммуногистохимического анализа.

Результаты. Тест ротарода выявил значимое снижение времени удержания у животных с хомогенетической генерацией H₂O₂ в матриксе митохондрий и у группы с введением нейротоксина МРТР. В обеих группах ВЭЖХ-ЭХД показала резкое снижение уровня дофамина в стриатуме, вызванное гибелью ДА нейронов в чёрной субстанции (SNpc) и уменьшением плотности их проекций в стриатуме. Отношение ДА/ДОФУК осталось неизменным, что указывает на снижение биосинтеза дофамина, а не на ускорение его метаболизма MAO. В хомогенетической модели гибель ДА нейронов развивалась постепенно в течение 2 недель (в отличие от классической модели с МРТР).

Выводы. Таким образом, мы разработали новую хомогенетическую модель БП, воспроизводящую ключевые морфологические и фенотипические признаки заболевания: двигательный дефицит, избирательную гибель ДА нейронов и дегенерацию их проекций в стриатум, а также снижение уровня ДА в стриатуме. Созданная модель демонстрирует ключевую роль окислительного стресса в митохондриях, но не в цитоплазме в развитии нейродегенерации.

Проект поддержан РФФ, грант № 23-75-30023

Исследование форм секреции опухоль-ассоциированных микроРНК трансформированными клетками

А.А. Борисова (*a.borisova5@g.nsu.ru*)^{1,2}, Е.И. Иванова^{1,2}, С.Н. Тамкович^{1,2}

¹Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Россия, Новосибирск

²Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е. Н. Мешалкина, Россия, Новосибирск

Введение. Известно, что микроРНК представляют собой перспективные биомаркеры для диагностики и прогнозирования течения онкологических заболеваний, что обусловлено их ролью в регуляции экспрессии генов и канцерогенезе. МикроРНК секретируются клетками в составе внеклеточных везикул либо нуклеопротеиновых комплексов (НПК). Выявление преобладающей формы циркуляции микроРНК имеет решающее значение для оптимизации их использования в качестве онкомаркеров для «жидкостной биопсии» при различных заболеваниях. Целью работы является исследование формы циркуляции микроРНК, секретируемых линиями, имитирующими рак молочной железы (РМЖ) и рак яичников (РЯ), а также сравнение уровня опухоль-ассоциированных микроРНК в составе экзосом крови здоровых и больных РМЖ и РЯ женщин.

Методы. Экзосомы и НПК получены из кондиционной среды 6 клеточных линий, в том числе имитирующих РМЖ и РЯ (BT-549, MCF-7, EFO-21, SKOV-3), а также из плазмы крови здоровых женщин (n=19) и больных РМЖ (n=17) и РЯ (n=20). Размер РНК оценивали методом капиллярного электрофореза. Уровень опухоль-ассоциированной miR-101 определяли с помощью обратной транскрипции с ПЦР в режиме «реального времени».

Результаты. Показано, что клетки секретируют РНК преимущественно в составе экзосом, при этом доля высокомолекулярной РНК секретируется как в составе экзосом, так и НПК. С помощью ПЦР в режиме «реального времени» установлено, что как псевдонормальные, так и опухолевые клетки секретируют miR-101 преимущественно в составе экзосом. Были выявлены достоверные отличия между группой здоровых женщин и больных РМЖ и РЯ в уровне miR-101 в составе экзосом плазмы ($p=0,029$ и $p=0,0084$, соответственно). Уровень miR-101 достоверно снижен у пациенток с РМЖ с инвазией опухоли в сосуды ($p=0,038$), также выявлена корреляция между уровнем miR-101 и наличием инвазии опухоли в сосуды ($R=-0,614$). Сравнение уровней микроРНК в экзосомах онкологических больных на разных стадиях заболевания показало, что уровень miR-101 снижен у больных со II стадией РМЖ по сравнению с I стадией, а у больных РЯ с III стадией по сравнению со II стадией.

Выводы. Полученные результаты указывают, что экзосомы являются более перспективным источником микроРНК-онкомаркеров по сравнению с белковыми комплексами для диагностики и мониторинга РМЖ и РЯ.

Роль стресс-гранул в адаптации мышинных эмбрионов к условиям *in vitro* культивирования

В.В. Будник (*v.budnik@g.nsu.ru*)^{1,2}, А.В. Ромащенко²

¹Новосибирский государственный университет, Россия, Новосибирск

²Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, Новосибирск

Введение. Субоптимальные параметры, типичные для *in vitro* культивирования индуцируют клеточный ответ на стресс (ISR), механизмы которого у преимплантационных эмбрионов мало изучены. Важную роль в формировании стресс-ответа играют стресс-гранулы (СГ) – динамичные цитоплазматические структуры, включающие нетранслируемые мРНК, факторы инициации (eIF3 η) и РНК-связывающие белки. У соматических клеток СГ участвуют в репрессии трансляции, ингибировании апоптоза и контроле качества мРНК. Однако их роль и сам факт образования в преимплантационных эмбрионах мыши остаются неизученными. Целью исследования является изучение роли СГ в формировании клеточного ответа эмбрионов мыши на кратковременное изменение условий их *in vitro* культивирования.

Методы. Эмбрионы получали методами *in vitro* и *in vivo* оплодотворения. Культивировали от зиготы до бластоцист в среде KSOM при концентрации натрия пирувата/глюкозы 0,1 mM (пониженная), 0,2 mM (контроль) и 0,3 mM (повышенная). Группы с пониженными концентрациями питательных веществ дополнительно культивировали при добавлении модуляторов сборки СГ (сальобринал, ингибитор PERK). Для идентификации СГ использовалось иммуногистохимическое окрашивание эмбрионов на eIF3 η и G3BP1.

Результаты. Исследование показало достоверное увеличение количества СГ в эмбрионах на стадии двух клеток как при снижении концентрации глюкозы или пирувата, так и повышении концентрации глюкозы. Ко-локализация сигналов eIF3 η и G3BP1 подтвердила специфичность идентифицированных структур как СГ. Добавление ингибитора PERK значимо снижало количество СГ как при дефиците пирувата, так и глюкозы, тогда как сальобринал усиливал их образование только в условиях дефицита пирувата. Анализ выживаемости показал, что изолированное изменение концентрации субстратов не влияет на жизнеспособность эмбрионов, однако добавление модуляторов вызывает статистически значимое снижение выживаемости.

Выводы. Фармакологическая модуляция ISR ответа значимо влияет на пренатальное развитие, в частности снижает жизнеспособность эмбрионов, что указывает на адаптивную роль стрессового ответа, а также потенциально может влиять на постнатальное развитие. Полученные данные подчеркивают необходимость строгого контроля метаболического состава сред в репродуктивных технологиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке бюджетного проекта FWNR-2025-0019

**Регионарные особенности сосудосуживающего влияния
продуцируемых разными изоформами NADPH-оксидаз активных
форм кислорода**

О.А. Власкина (vlaskinao90@gmail.com)¹, А.А. Швецова¹, Д.К. Гайнуллина¹

¹ Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Рецептор-зависимая вазоконстрикция сопряжена с повышением продукции активных форм кислорода (АФК) в клетках сосудов. Одним из основных источников АФК в клетках сосудов являются NADPH-оксидазы (NOX). Они представлены рядом изоформ (NOX1-NOX4, DUOX1-2; NOX5 отсутствует у крыс). Однако вопрос об экспрессии и функциональной роли отдельных изоформ NOX в артериях разных органов недостаточно изучен. В связи с этим, целью данной работы стало оценить уровни экспрессии изоформ NOX и вазомоторную роль продуцируемых ими АФК в артериях скелетных мышц (икроножная артерия), почек (междольевые артерии) и головного мозга (базилярная артерия) у взрослых крыс.

Методы. Оценку уровня мРНК каталитических субъединиц изоформ NOX проводили методом ПЦР в реальном времени. В функциональных экспериментах регистрировали сократительные ответы изолированных кольцевых сегментов артерий в изометрическом режиме с использованием системы wire myograph. Вазомоторную роль АФК, продуцируемых разными изоформами NOX, в вызванных агонистом рецепторов тромбоксана A2 U46619 сократительных реакциях оценивали с использованием изоформ-специфических ингибиторов NOX: NOX1 (ML-171, 1 мкМ), NOX1/NOX4 (GKT137831, 10 мкМ) и NOX2 (GSK2795039, 1 мкМ).

Результаты. Во всех исследованных артериях была обнаружена мРНК NOX2; мРНК NOX4 была представлена в почечных артериях, но отсутствовала в базилярной артерии; мРНК DUOX1 была обнаружена только в базилярной артерии. Экспрессия мРНК NOX1, NOX3 и DUOX2 оказалась ниже порога детекции во всех исследованных артериях. В функциональных экспериментах ингибитор NOX2 вызывал статистически значимое снижение вызванных U46619 сократительных ответов базилярной артерии и артерий почек (до $73 \pm 6\%$ и $54 \pm 10\%$, соответственно), но не артерии икроножной мышцы. Ингибиторы NOX1 и NOX1/4 не оказали статистически значимого эффекта на сократительные реакции всех исследуемых артерий.

Выводы. Таким образом, полученные данные указывают на регионарную специфичность экспрессии и функциональной роли изоформ NOX в сосудах. АФК, продуцируемые NOX2, вовлечены в рецептор-зависимую вазоконстрикцию почечных и базилярных артерий, но не артерий икроножной мышцы.

Взаимосвязь НАД и ТДФ с гликемией в модели стрептозотоцин-индуцированного диабета у крыс

К.А. Гапон (*garonksenia7@gmail.com*)¹, А.В. Граф², А.В. Артюхов³, В.А. Алешин³

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва

³НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Тиаминдифосфат (ТДФ) и никотинамидадениндинуклеотид (НАД) являются коферментами ключевых реакций окислительного метаболизма и обмена углеводов, нарушаемых при сахарном диабете, в т. ч. индуцированном стрептозотоцином (СТЗ). Ранее показан защитный эффект тиамина и ТДФ в моделях диабета при приёме в течение 2-3 месяцев. Целью работы было оценить защитный эффект однократного введения устойчивого к гидролизу метиленового аналога ТДФ (мТДФ), исследовав его влияние на уровень глюкозы, содержание ТДФ и НАД в модели диабета, индуцированного СТЗ.

Методы. Для индукции диабета самцам крыс Wistar вводили СТЗ в дозе 65 мг/кг, через 10 дней проводили забор образцов тканей. Развитие диабета оценивали по уровню глюкозы в крови: животных с концентрацией глюкозы $\geq 12,1$ ммоль/л относили к группе диабета, остальных – к недиабетическому контролю (НДК). Другие крысы получали физраствор вместо СТЗ – в качестве интактного контроля. Также на 4 день все животные получали инъекцию физраствора или мТДФ (10 мг/кг). Уровень НАД оценивали в метанол-уксусных экстрактах печени энзиматически с помощью формиатдегидрогеназы. Концентрацию ТДФ в крови измеряли энзиматически с помощью транскетолазы, а концентрацию глюкозы – с помощью тест-полосок. Для статистического анализа использовали двухфакторную ANOVA с тестом Тьюки и корреляции Пирсона.

Результаты. Диабет развился у 14 крыс из 26. Введение мТДФ снижало уровень глюкозы у крыс с диабетом с $28,6 \pm 4,4$ до $18,4 \pm 4,6$ ммоль/л. У интактных контрольных животных и группы НДК уровень глюкозы значимо не менялся от мТДФ. Содержание НАД в печени составило 942 ± 268 нмоль/г, а концентрация ТДФ в крови – 305 ± 39 нмоль/л; оба показателя не менялись значимо от СТЗ (вне зависимости от развития диабета) или мТДФ. У крыс с диабетом ($n = 14$) выявлены корреляции между глюкозой и НАД ($r = 0,77$, $p = 0,05$) и между глюкозой и ТДФ ($r = -0,61$, $p < 0,01$), отсутствующие у контрольных крыс ($n = 21$) и НДК ($n = 12$).

Выводы. Однократное введение мТДФ снижает уровень глюкозы в модели диабета. Выявлены специфические для патологического состояния корреляции между уровнем глюкозы и содержанием НАД и ТДФ.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 23-74-10036.

Анализ иммунологического и метаболомного профиля у пациентов с сепсисом

П.П. Гусева (guseva-2004@mail.ru)^{1,2}, М.Г. Бязрова¹, А.В. Филатов^{1,2}

¹Лаборатория иммунохимии, ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Россия, Москва

²Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Сепсис – это патологическое состояние, вызванное неконтролируемым иммунным ответом на инфекцию, ведущее к системному воспалению, органной дисфункции и высокой летальности. Ключевое значение имеют ранняя диагностика и своевременная терапия, однако единого диагностического теста для раннего выявления и прогноза сепсиса не существует. Целью работы стал поиск специфических биомаркеров для создания диагностической платформы, способной повысить эффективность терапии.

Методы. Для оценки иммунологического профиля были рекрутированы 46 пациентов с сепсисом, 24 здоровых добровольца и 42 пациента с тяжелыми несептическими инфекциями. Из цельной крови выделяли РВМС, окрашивали панелью конъюгатов антител (CD3-APC-Cy7, CD19-PC7, CD8-FITC, CD27-APC, CD69-PE, CD19-PE, CD27-APC, CD38-PC7) и анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии. В плазме крови с помощью мультиплексного анализа определяли концентрации 48 цитокинов, а также с помощью метода ВЭЖХ-МС/МС концентрации 36 метаболитов полиненасыщенных жирных кислот - оксипинов.

Результаты. Было показано, что у пациентов с сепсисом снижен процент общих В- и Т-лимфоцитов, но увеличена доля эффекторных Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов по сравнению со здоровыми добровольцами. У пациентов с сепсисом, а также с несептическими инфекциями отмечалось увеличение процента плазмобластов по сравнению со здоровыми добровольцами. При этом у больных сепсисом доля плазмобластов была ниже, чем у пациентов с несептическими инфекциями. Мультиплексный анализ цитокинов продемонстрировал повышение концентраций как провоспалительных (IL-6, TNF- α и др.), так и противовоспалительных цитокинов (IL-10, IL-1RA и др.) у пациентов с сепсисом по сравнению с двумя другими группами. Результаты комплексного анализа профиля оксипинов позволили разделить группы доноров на кластеры с помощью алгоритма PLS-DA. На основании показателя значимости переменных (VIP > 1,5) были определены оксипины, обеспечивающие наибольший вклад в кластеризацию: 14,15-DHET, 11,12-DHET, AA, 10-HDoHE, 9-HpODE и DHA.

Выводы. Сепсис характеризуется выраженными изменениями состава клеточных субпопуляций Т- и В-лимфоцитов, профиля цитокинов и оксипинов. Комплексный анализ иммунологического и метаболомного профиля позволяет дифференцировать пациентов с сепсисом не только от здоровых добровольцев, но и от пациентов в тяжёлом состоянии другой этиологии.

Влияние произвольной беговой тренировки на транскриптомные и функциональные изменения артерий головного мозга при стенозе сонных артерий у крыс

А.А. Дружинина (*druzhininaarinaal@gmail.com*)¹, К.А. Богоуцкой², А.А. Борзыл²

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Институт медико-биологических проблем РАН, Россия, Москва

Введение. Физическая активность является мощным нефармакологическим средством нейропротекции при гипоперфузии головного мозга, в том числе при стенозе сонных артерий (ССА), однако механизмы ее влияния на церебральные сосуды исследованы мало. Цель работы: сравнить влияние ССА на транскриптом и регуляцию тонуса артерий головного мозга у сидячих и предварительно тренированных крыс.

Методы. Использовали три группы самцов крыс Wistar: ложнооперированную сидячую (ЛО-СИД) и две группы с ССА – сидячую (ССА-СИД) и тренированную (ССА-БЕГ, произвольный бег в колесе в течение 4 недель до ССА). ССА моделировали наложением серебряных клипс на обе общие сонные артерии. Через двое суток у части крыс ($n=6$ в каждой группе) выделяли средние мозговые артерии (СМА) для полногеномного РНК-секвенирования (NextSeq 550, Illumina). Методом DESeq2 идентифицировали дифференциально экспрессируемые гены (DЭГ , $\text{TPM} > 1$, $\text{padj} \leq 0.01$ и $|\text{FC}| \geq 1.25$). У остальных крыс лазерной спекл-контрастной визуализацией оценивали авторегуляцию кровотока в ветвях СМА при ступенчатом снижении артериального давления (АД; 5 взятий 5% объема циркулирующей крови каждые 5 мин).

Результаты. У ССА-СИД по сравнению с ЛО-СИД выявлено 138 ДЭГ, у ССА-БЕГ по сравнению с ССА-СИД – 102 ДЭГ. Сравнение групп ССА-БЕГ и ЛО-СИД выявило лишь 2 ДЭГ, что указывает на нормализацию транскриптомного профиля. Экспрессия 55 генов была снижена при ССА, но повышена после тренировки: среди них гены, связанные с регуляцией сократительного аппарата (*Pdlim3*, *Palld*), Ca^{2+} -сигналикации (*Casq1*, *Casq2*, *Hrc*, *Ppp1r12c*) и внеклеточного матрикса (*Lamc2* и *Itga8*). Напротив, экспрессия 10 генов была повышена при ССА, но снижена после тренировки (*Edn1*, *Pgf*, *Ngfr* и др.). У ССА-СИД наблюдалось нарушение авторегуляции мозгового кровотока: при снижении АД диаметр артерий не изменялся, а объемная скорость кровотока значительно снижалась. В группе ССА-БЕГ, как и в группе ЛО-СИД, артерии расширялись, поддерживая неизменным кровоток при снижении АД.

Выводы. Таким образом, предварительная физическая нагрузка сглаживает влияние ССА на транскриптом артерий мозга крысы. Выявленные транскриптомные изменения могут лежать в основе сохранения авторегуляции мозгового кровотока, обеспечивая нейропротекторный эффект тренировки.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 23-15-00331.

Слепая кишка как источник TNF в модели острой гепатотоксичности у мышей

П. А. Карякина (*kyryakina.polina06@yandex.ru*)^{1,2}, Ф. А. Сысонов^{1,2}, С. А. Недоспасов^{1,2}, Е. О. Губернаторова^{1,3}

¹Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

²Биологический факультет и Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

³Центр высокоточных генетических технологий для медицины, Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Введение. Острая гепатотоксичность (ОГТ) - быстроразвивающееся состояние, вызванное нарушением функций печени и некрозом тканей. Одной из распространённых моделей является Липополисахарид/Д-Галактозамин зависимая ОГТ (ЛПС/Д-Гал). Известно, что фактор некроза опухоли (TNF) играет ключевую роль в патогенезе ОГТ в этой модели, однако источники и регуляция его системной продукции остаются недостаточно изученными. Целью этого исследования было определить ключевую ткань, вносящую основной вклад в системную продукцию TNF при ЛПС/Д-Гал-индуцированной ОГТ.

Методы. Мышам линии C57BL/6 с полной резекцией слепой кишки или удалением её компартмента индуцировали ЛПС/Д-Гал ОГТ, после собирали кровь на ИФА и биохимический анализ, наблюдали за их выживаемостью. Также изучали изменение массового индекса органов при патогенезе ОГТ.

Результаты. Анализ изменений массового индекса органов у мышей через 6 часов после индукции ЛПС/Д-Гал ОГТ показал его значимое снижение в печени и слепой кишке. Оказалось, что мыши дикого типа, лишённые слепой кишки, выживают и имеют сниженную системную продукцию TNF в модели ЛПС/Д-Гал ОГТ, тогда как мыши с интактной слепой кишкой погибают. ИФА-анализ подтвердил, что слепая кишка служит основным источником циркулирующего TNF, причём продукция цитокина была сосредоточена в её лимфоидной структуре — цекальной бляшке. Дальнейшее хирургическое удаление исключительно цекальной бляшки также обеспечило 100% выживаемость, полностью воспроизводя защитный эффект удаления слепой кишки.

Выводы. Таким образом, впервые установлено, что слепая кишка, а именно её лимфоидная структура, цекальная бляшка, является важным источником летальной системной продукции TNF в модели ЛПС/Д-Гал-индуцированной ОГТ, что определяет ее как новую ткань-мишень для потенциальных терапевтических вмешательств.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ №19-75-30032.

Роль L-DOPA и рецептора GPR143 в регуляции ангиогенеза в овариальном фолликуле на модели синдрома поликистозных яичников

А.А. Кисель (alinnakisel@yandex.ru)

Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. L-ДОФА рассматривается не только как предшественник катехоламинов, но и как самостоятельная сигнальная молекула. Её эндогенным рецептором является GPCR GPR143. В пигментном эпителии сетчатки L-ДОФА через GPR143 регулирует ангиогенез, модулируя баланс VEGF/PEDF. Экспрессия GPR143 за пределами глаза и кожи изучена недостаточно, хотя транскриптомные данные показывают высокий уровень в ооцитах яичников и доимплантационных эмбрионах. Ангиогенез в яичнике критически важен для фолликулогенеза и протекает на протяжении всего овуляторного цикла. В связи с этим целью работы стало исследование локализации и функциональной активности рецептора GPR143 в яичнике и ранних эмбрионах мыши, а также оценка роли L-DOPA в регуляции ангиогенеза.

Методы. Исследование проведено на мышах линии C57BL/6. Локализацию GPR143 определяли иммуногистохимически и с помощью РТ-ПЦР. Концентрацию L-ДОФА в яичниках измеряли методом ВЭЖХ. Функциональную активность GPR143 изучали в органотипической культуре целых яичников с добавлением L-ДОФА (0,1; 1; 10 мкМ). Секрецию PEDF в среду определяли методом ИФА.

Результаты. GPR143 экспрессируется исключительно в ооцитах на всех стадиях роста фолликулов и отсутствует в гранулёзных клетках и строме яичника. В доимплантационных эмбрионах белок выявляется на всех стадиях — от зиготы до бластоцисты. Концентрация L-ДОФА в яичнике сопоставима с плазменной, при этом тирозингидроксилаза в яичнике не экспрессируется, что указывает на поступление лиганда из кровотока. В органотипической культуре L-ДОФА (наиболее выражено в концентрации 1 мкМ) статистически значимо увеличивал секрецию антиангиогенного фактора PEDF. Эксперименты на модели синдрома поликистозных яичников показали восстановление баланса PEDF/VEGF при введении L-DOPA.

Выводы. Таким образом, рецептор GPR143 экспрессируется в ооцитах и доимплантационных эмбрионах млекопитающих и является функционально активным. Его лиганд L-DOPA, поступающий в яичник из кровотока, регулирует ангиогенез путём стимуляции секреции PEDF. Полученные данные открывают перспективу использования L-DOPA как регулятора ангиогенного баланса в норме и при патологии яичников.

Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП ИБР им. Н.К. Кольцова РАН, при поддержке гранта РНФ № 23-24-00621

Изменение количества активных зон выделения дофамина в волокнах дофаминергических нейронов при моделировании болезни Паркинсона in vitro и in vivo

Л.В. Курышева (l.v.kurysheva@gmail.com)¹, А.А. Колачева²

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Лаборатория нервных и нейроэндокринных регуляций, Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Введение. Дегенерация дофаминергических нейронов nigrostriатной системы при болезни Паркинсона (БП) начинается с аксонов и ретроградно распространяется к телам клеток. Молекулярные механизмы аксонопатии остаются малоизученными; однако нейротрансмиссия дофамина, вероятно, претерпевает значительные изменения уже на ранних стадиях дегенерации. Для выделения дофамина из терминали необходимы белки активной зоны (Bassoon, RIM, Munc13), компоненты SNARE-комплекса (синтаксин, синаптотагмин и др.), а также везикулы, наполненные нейротрансмиттером посредством везикулярного транспортера моноаминов 2-го типа (VMAT2). Согласованная работа этих элементов обеспечивает кальций-зависимое высвобождение медиатора.

Целью данного исследования явилась оценка начальных изменений активных зон выделения дофамина при моделировании БП in vivo или in vitro.

Методы. Моделирование БП in vitro проводили на первичной культуре дофаминергических нейронов среднего мозга мышей (E13.5). В 7-й день культивирования клетки обрабатывали 5 или 10 мкМ 1-метил-4-фенилпиридинием (МФП+) в течение 6 ч. Моделирование БП in vivo выполняли на мышцах C57Bl/6 путем введения возрастающих доз МФТП (8, 10, 12, 16, 20, 26 и 40 мг/кг) каждые 24 ч. Доклиническую и клиническую стадии оценивали через 24 ч после 2-й и 7-й инъекций соответственно. На моделях подсчитывали варикозные расширения дофаминергических нейронов (ИГХ на мембранный транспортер дофамина) и определяли количество активных зон выделения дофамина (ИГХ на RIM) после конфокальной микроскопии.

Результаты. Было показано, что добавление 5 или 10 мкМ МФП+ к первичной культуре нейронов среднего мозга мыши снижает медиану длины нейритов дофаминергических нейронов, но не влияет на количество тел нейронов. Плотность активных зон в волокнах дофаминергических нейронов достоверно снижалась лишь при воздействии 10 мкМ МФП+, однако их размер увеличивался уже после обработки 5 мкМ МФП+.

Выводы. Таким образом, активные зоны выделения дофамина оказываются подвержены перестройке на самых ранних этапах дегенерации дофаминергических нейронов при моделировании БП.

Исследование выполнено за счет гранта РНФ № 24-74-10054.

Динамика экспрессии генов в локомоторной и дыхательной скелетных мышцах мышей после месячного космического полета

Л.Ж. Мамешова (linamateshova@yandex.ru)¹, П.А. Панкратьева^{2,3}, М.А. Машкин³, С.В. Другова³

¹ Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

² Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

³ Институт медико-биологических проблем РАН, Россия, Москва

Введение. Длительное пребывание в условиях космического полета (КП) оказывает выраженное негативное влияние на организм, в частности, на скелетные мышцы, участвующие в поддержании позы и локомоциях. Эти изменения связаны как со снижением уровня их двигательной активности, так и с другими факторами КП (невесомость, изменение радиации, магнитного поля и т.д.). В работе изучали влияние месячного КП и последующего восстановления на транскриптом четырехглавой мышцы бедра и диафрагмы – мышцы, сохраняющей уровень своей двигательной активности во время полета.

Методы. Исследование проводилось в рамках программы биоспутника БИОН-М №2. Четырехглавая мышца бедра и реберная часть диафрагмы были выделены у самцов мышей C57BL/6 контрольной виварной группы и полетной группы: сразу после, через 1, 5 и 30 сут. после 28-сут. КП (n=3-11 в каждой группе). Для исследования транскриптома использовали метод РНК-секвенирования.

Результаты. КП не повлиял на массу тела, но привел к снижению массы четырехглавой мышцы бедра. После космического полета в четырехглавой мышце бедра изменилась (преимущественно снизилась) экспрессия более сотни белок-кодирующих генов, ассоциированных с энергетическим метаболизмом, митохондриальными ферментами и саркомерными белками. На протяжении пяти суток послеполетного восстановления наблюдались выраженные противоположные изменения экспрессии этих генов и активация генов внеклеточного матрикса и воспалительного ответа. Изменения транскриптома в диафрагме были значительно менее выражены или отсутствовали на всех исследуемых временных точках.

Выводы. Сопоставление изменений транскриптома в дыхательной и локомоторной мышцах позволило выявить влияние снижения двигательной активности и других факторов КП на экспрессию генов. Впервые охарактеризована динамика экспрессии генов в локомоторной мышце во время восстановления после КП.

Передача сигнала через TNFR1 на стромальных клетках необходима для патогенеза летальной гепатотоксичности у мышей.

К.Е. Меньшиков (*kmensikov53@gmail.com*)^{1,2}, Ф.А. Сысонов^{1,2}, М.С. Друцкая^{1,3}, Е.О. Губернаторова^{1,4}

¹Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта РАН, Россия, Москва

²Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Россия, Москва

³Научно-технологический университет «Сириус», Россия, Краснодарский край, Федеральная территория «Сириус»

⁴Центр высокоточных генетических технологий для медицины, Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Россия, Москва

Введение. Острая гепатотоксичность (ОГТ) — опасное для жизни состояние, развивающееся при отравлениях или инфекциях. Известно, что мыши с делецией гена фактора некроза опухоли (TNF) или его рецептора первого типа (TNFR1) выживают в модели липополисахарид/Д-Галактозамин-зависимой ОГТ (ЛПС/Д-Гал ОГТ). Однако, вклад TNFR1 на разных стадиях патогенеза ОГТ остаётся не до конца изученным.

Методы. У TNFR1-KO и мышей дикого типа (wt), а также костномозговых химер, полученных с использованием этих линий, индуцировали ЛПС/Д-Гал ОГТ. Была изучена системная и тканеспецифичная продукция TNF методом ИФА, проведён биохимический и гистологический анализ повреждения печени, гематологический анализ крови и анализ экспрессии генов методом RT-qPCR на разных временных точках.

Результаты. Динамика продукции системного TNF, изменения иммунных популяций в крови и инфильтрации клеток в печень не отличалась у TNFR1-KO и мышей дикого типа. У TNFR1-KO мышей, несмотря на неизменную локальную экспрессию и продукцию TNF в печени, не наблюдалось выраженного макроповреждения органа. Для дифференциации вклада TNFR1 в иммунных и стромальных клетках в развитие ЛПС/Д-Гал ОГТ были созданы костномозговые химеры: TNFR1-KO→wt, реципиенты дикого типа, восстановленные костным мозгом TNFR1-KO мышей, и wt→TNFR1-KO, реципиенты TNFR1-KO, получившие костный мозг дикого типа. Устойчивыми к ОГТ оказались wt→TNFR1-KO, но не TNFR1-KO→wt. Кроме того, группы значительно отличались по уровню макроповреждения печени.

Выводы. Полученные данные указывают на ключевую роль TNFR1, экспрессируемого стромальными клетками, в развитии летальной гепатотоксичности и подчеркивают важность этого рецептора скорее на финальной стадии патогенеза ОГТ, а не для развития системного воспаления.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ №19-75-30032.

Эффективность трансдуцированных обкладочных клеток обонятельной выстилки, экспрессирующих нейротрофические факторы, в экспериментальной терапии болезни Альцгеймера

А.И. Мухина (anpattukhina367@gmail.com)^{1,2}, Г.А. Фурса², А.В. Чадин², В.С. Шишкина²

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²НМИЦ психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского Минздрава России, Россия, Москва

Введение. Болезнь Альцгеймера (БА) - нейродегенеративное заболевание с прогрессирующим когнитивным дефицитом и накоплением β -амилоида ($A\beta$) и рТau в головном мозге (ГМ). Перспективным подходом является разработка генно-клеточных препаратов (ГКП) на основе трансдуцированных адено-векторами (AdV) с терапевтическими трансгенами обкладочных клеток (ОК) обонятельной выстилки. Особый интерес представляют гены фактора роста нервов (NGF) и нейротрофина-3 (NT-3). Получение ОК безопасно и малоинвазивно. Однако терапевтическая эффективность ОК и ГКП на их основе, экспрессирующих NGF и NT-3, в терапии БА не изучена.

Методы. БА моделировали стереотаксическим билатеральным введением $A\beta$ 1-42 самкам крыс Вистар в зону гиппокампа (ГК) CA1. Через 8 недель модель валидировали с помощью теста водный лабиринт Морриса для оценки когнитивных функций и подтверждали повышением уровней 1-42 $A\beta$ и рТau. ОК крыс, трансдуцированные AdV с трансгенами NGF (ОК-NGF) и NT-3 (ОК-NT-3), также были трансплантированы в CA1. Через 4 недели после трансплантации ГКП оценивали экспрессию NGF и NT-3, 1-42 $A\beta$ и рТau in vivo в ГК и близлежащих тканях методом иммуно-ферментного анализа.

Результаты. Модель БА была подтверждена значимыми нарушениями пространственной памяти у экспериментальных животных, время поиска платформы возросло в 2,5 раза относительно контроля, а в ГК и близлежащих тканях ГМ наблюдали значительное увеличение уровня белков рТau и 1-42 $A\beta$. Уровень NGF и NT-3 снизился в 1,98 и 4 раза. После трансплантации трансдуцированных ОК содержание NGF и NT-3 в ткани ГМ увеличилось в 3,1 и 3,4 раза относительно контроля и в 2,2 и 2,3 раза относительно группы с экспериментальной БА. Также наблюдалось снижение количества белков рТau и 1-42 $A\beta$: трансплантация ОК-NGF уменьшила содержание рТau в 1,92 раза, а трансплантация ОК-NT-3 снизила уровень $A\beta$ 1-42 в 3,6 раза.

Выводы. Значимое увеличение содержания NGF и NT-3 в тканях ГМ показывает, что впервые разработанные нами конструкторы эффективно функционируют. Их трансплантация снизила уровень патологических белков при экспериментальной БА, что может замедлить развитие заболевания. Такие генно-клеточные препараты крайне перспективны в терапии БА.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 22-15-00141.

Альтерации β -адренергической регуляции предсердий у мышей с моделью острого воспаления

И.С. Николаев (*nikolayev-ilya-stan_2005@mail.ru*)

Казанский государственный медицинский университет, Россия, Казань

Введение. Для моделирования воспаления широко используется внутрибрюшинная инъекция липополисахарида (ЛПС). В дозе 2–6 мг/кг ЛПС вызывает у мышей системное воспаление, которое сопровождается выбросом провоспалительных цитокинов и развитием окислительного стресса. Эти процессы часто приводят к сердечной дисфункции, где одной из ключевых мишеней могут выступать бета-адренорецепторы (β -АР).

Методы. Сократимость регистрировали на изолированных предсердиях. Изучали влияние неселективной стимуляции β -АР изопротеренолом (10–100 нМ), а также селективной активации бета1, 2 и 3-АР. Флуоресцентной микроскопией оценивали синтез оксида азота (NO) и активных форм кислорода (АФК).

Результаты. Применение ЛПС индуцировало оксидативный стресс в предсердиях: концентрация гидроперекисей выросла на 30%, малонового диальдегида — на 36%, а активность СОД снизилась на 16% относительно контроля. Сократимость показала ослабление положительного инотропного ответа на изопротеренол и β 1-агонист добутамин на 35% и 46% соответственно у ЛПС-мышей. Ответ на β 2-агонист не изменился, а стимуляция β 3-АР BRL усилила реакцию на 37%. Иммунофлуоресценция выявила значительное снижение мембранной локализации β 1-АР и слабое уменьшение β 3-АР. У ЛПС-мышей зафиксировано увеличение продукции NO в ответ на агонисты бета1-, бета2- и бета3-АР на 7%, 2% и 6% соответственно, а также повышение уровня АФК при активации β 1- и β 2-АР на 14% и 24%, но не менялась при активации β 3-АР.

Выводы. Индукция острого воспаления вызывает окислительный стресс и ослабляет бета-адренергическую стимуляцию сократимости предсердий. Ключевую роль в ослаблении положительной инотропной реакции может играть повышенная продукция оксида азота, зависящая от сигнализации через бета1- и бета3-АР, а также снижение присутствия на мембране бета1-АР. Изменения в адренергической регуляции после введения ЛПС, вероятно, усугубляют окислительный стресс, стимулируя продукцию активных форм кислорода. Таким образом, альтерации бета-адренергической сигнализации в ответ на острое воспаление могут способствовать развитию сердечных дисфункций.

Литература

1) Gao, F. Catalpol ameliorates LPS-induced inflammatory response by activating AMPK/mTOR signaling pathway in rat intestinal epithelial cells // European journal of pharmacology. 2023, №960. 176125

Влияние транскрипционного фактора TBX5 на клеточную организацию и синхронизацию Ca²⁺-транзитов в культурах неонатальных кардиомиоцитов крысы

М.К. Нифонтова (punksnotdead6912@gmail.com)¹, О.Б. Пустовит¹

¹ Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Репрограммирование неонатальных кардиомиоцитов (НКМЦ) является перспективным подходом для моделирования нативного миокарда. Тканеинженерные конструкции на основе НКМЦ могут применяться для изучения биоэлектрических свойств сердца, терапии патологий сердца, в *in vitro* тестированиях лекарственных препаратов. Способность транскрипционного фактора TBX5 индуцировать пейсмекерный фенотип и признаки ткани проводящей системы сердца в культуре НКМЦ ранее не изучена. В данной работе оценивали сложность клеточных структур и возникающих (Ca²⁺)-транзитов в культурах НКМЦ крысы с индуцированной гиперэкспрессией TBX5.

Методы. Из изолированных желудочков сердца крыс получена первичная культура кардиомиоцитов. Через сутки проведена трансдукция лентивирусным вектором (VSV-G) для экспрессии TBX5; подтверждение компетентности трансдукции велось с использованием проточной цитометрии при помощи вектора, экспрессирующего GFP. Для визуализации Ca²⁺-транзитов использовался Ca²⁺-чувствительный флуоресцентный зонд Fluo-4A. Анализ изображений клеточных кластеров проведен с помощью ПО ImageJ и OriginPRO (V.9.0). Ca-активность проанализирована с помощью программы Spiky. Статистическая обработка велась с помощью ПО GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США).

Результаты. Установлено, что в контрольной и трансдуцированной TBX5 культурах формируются кластеры кардиомиоцитов, демонстрирующие сократительную активность, колебания цитоплазматической концентрации кальция ([Ca²⁺]_i), и синхронизацию Ca-транзитов. В трансдуцированных TBX5 культурах доля миокардиальных элементов и суммарная площадь кластеров больше, выше длина миокардиальных тяжей, а также морфологические параметры кластеров: периметр, коэффициент элонгации, фрактальная размерность. В контрольной группе выше изопериметрический коэффициент, коэффициент компактности, разброс расстояний между кластерами. Группа "TBX5" обладает большей внутри- и межкластерной синхронизацией Ca²⁺-транзитов, их большей продолжительностью и скоростью нарастания [Ca²⁺]_i.

Выводы. Репрограммирование НКМЦ с помощью TBX5 способствует усложнению клеточных конгломератов и их функциональной синхронизации. Можно предположить, что TBX5 усиливает самоорганизацию кардиомиоцитов, приводит к увеличению их «пейсмекерной» компетентности; культуры НКМЦ приобретают фенотип, схожий с нативным пейсмекером сердца.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ № 24-75-00023

Хроническое воздействие аторвастатина сопровождается снижением сосудосуживающего влияния продуцируемых NADPH-оксидазами активных форм кислорода в артериях разных органов мыши

К.П. Остапчук (ksyu.ostapchuk@mail.ru)¹, Г.Ф. Закирьянова², А.А. Швецова², Д.К. Гайнуллина²

¹ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ, Россия, Москва

² Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Статины являются часто назначаемой группой лекарственных препаратов, в том числе при терапии сердечно-сосудистых заболеваний. Однако их влияние на механизмы регуляции сосудистого тонуса слабо изучено. Целью работы стало оценить влияние хронического приема аторвастатина на сосудосуживающее влияние продуцируемых NADPH-оксидазами (NOX) АФК в артериях разных органов мыши.

Методы. Самцы мышей линии BALB/с в течение 1 месяца получали аторвастатин с питьевой водой (средняя доза 10 мг/кг). Объектами исследования служили артерии мозга (базилярная артерия), тонкого кишечника (брыжеечные артерии), скелетных мышц (артерии икроножной мышцы). Регистрацию сократительных ответов изолированных сегментов артерий на агонист рецепторов тромбоксана A₂ U46619 или α 1-адренорецепторов метоксамин проводили в изометрическом режиме. Вазомоторную роль NADPH-оксидаз исследовали с использованием пан-ингибитора VAS2870 (3 мкМ). Оценку содержания мРНК каталитических субъединиц NOX2 и NOX4 проводили методом ПЦР в реальном времени.

Результаты. Диаметр, максимальная сила сокращения, реакции эндотелий-зависимого расслабления на ацетилхолин не изменялись в результате приема аторвастатина в исследуемых артериях. Прием аторвастатина приводил к ослаблению сократительных реакций базилярной артерии на U46619, но не артерий брыжейки и икроножной мышцы на метоксамин. VAS2870 практически полностью подавлял вызванные U46619 сократительные ответы в базилярной артерии обеих групп животных. В артериях брыжейки и икроножной мышцы VAS2870 также приводил к ослаблению сокращения на метоксамин; этот эффект был менее выражен в артериях животных, потреблявших аторвастатин. Содержание мРНК каталитических субъединиц NOX2 и NOX4 в артериях брыжейки не было изменено в результате потребления аторвастатина.

Выводы. Аторвастатин обладает прямым влиянием на механизмы регуляции сосудистого тонуса, приводя к ослаблению сократительных ответов артерий головного мозга, а также снижению сосудосуживающего влияния продуцируемых NOX АФК в артериях тонкого кишечника и скелетных мышц у мышей. Исследование выполнено в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова.

Эффекты периодической нормобарической гипоксии у самцов и самок крыс Wistar разного возраста: поведенческие и биохимические аспекты

О.И. Патявина (helga.ola5@yandex.ru)¹, С.Д. Кабиольская¹

¹ Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Нормобарическая гипоксия (НГ) – это недостаточная оксигенация организма, возникающая при пониженном парциальном давлении кислорода и нормальном атмосферном давлении. Негативное воздействие НГ на ЦНС обусловлено возникновением окислительного стресса, воспаления, некроза, апоптоза и проявляется головными болями, снижением концентрации внимания и когнитивными нарушениями. В ответ на гипоксию в организме активируются защитные механизмы, среди которых: компоненты антиоксидантной системы, транскрипционные и нейротрофические факторы.

Методы. Исследование выполнялось на самцах и самках крыс Wistar в возрасте 2 («молодые») и 4 («взрослые») месяцев. В первой части эксперимента животных разделили на группы «гипоксия» (8% O₂, 2 ч/день, 5 суток подряд) и «контроль» (нормоксия). Далее оценивали поведение в приподнятом крестообразном и сложном пищевом лабиринтах. Во второй части выделили группы: «1-дневная гипоксия», «5-дневная гипоксия» и «контроль». После соответствующего воздействия у всех животных взяли кровь и образцы мозга (фронтальная кора, гиппокамп, стриатум). В крови определяли активность ферментов глутатионовой системы, в структурах мозга – экспрессию генов HIF-1 α , GPx4, BDNF и cas-3.

Результаты. Анализ поведенческих показателей крыс выявил повышение тревожности и снижение исследовательской активности у молодых самцов и снижение способности к обучению у взрослых самцов после периодической НГ (ПНГ), при этом не было показано влияния гипоксии на поведение самок крыс. Во второй серии эксперимента было показано, что однократная НГ приводит к увеличению активности глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы у молодых самцов и аналогичному изменению глутатионредуктазы у взрослых самцов; после пятикратного воздействия активность ферментов снижалась до уровня контроля. У самок не наблюдалось изменений в работе антиоксидантных ферментов. Также результаты исследования демонстрируют, что изменение экспрессии целевых генов (HIF-1 α , GPx4, BDNF и cas-3) в мозге у самцов происходит после однократной гипоксии, а после ПНГ значения возвращаются к контрольным значениям; у самок же изменения наблюдаются только после пятикратного воздействия.

Выводы. Таким образом, влияние НГ на самцов проявляется тревожно-когнитивными нарушениями (при пятикратной НГ), сдвигами активности антиоксидантных ферментов и экспрессии генов (при однократной НГ), у самок же изменения экспрессии генов регистрируются лишь после пятикратного воздействия при стабильности поведения и антиоксидантов.

Выживаемость, миграция и способность к дифференцировке нейральных стволовых/прогениторных клеток обонятельной выстилки при экспериментальной болезни Альцгеймера

В.Ю. Покидько (*lily19nika@gmail.com*)^{1,2}, Е.К. Карсунцева¹, А.Д. Воронова¹, О.В. Степанова¹

¹НМИЦ психиатрии и наркологии им. В.П.Сербского Минздрава России, Россия, Москва

²Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Болезнь Альцгеймера (БА) – нейродегенеративное заболевание, при котором патологические изменения ткани головного мозга (ГМ) вызывают когнитивные нарушения. Перспективным подходом к терапии БА является персонализированная клеточная терапия с применением нейральных стволовых/прогениторных клеток (НСПК) обонятельной выстилки (ОВ). К их преимуществам относятся безопасное для пациента получение и способность к дифференцировке *in vivo*, позволяя в перспективе восполнять утраченные нейроны при БА. Однако нет данных о применении этих клеток при терапии БА. Цель работы: изучить выживаемость, миграцию и способность к дифференцировке *in vivo* НСПК из ОВ при экспериментальной БА.

Методы. НСПК были получены из ОВ крыс [1] и охарактеризованы по одновременной экспрессии специфических маркеров *sox-2* и *nestin*. Моделирование БА проводили на самках крыс линии Вистар в возрасте 4 месяцев путем стереотаксического билатерального введения пептида бета-амилоида 1–42 в зону гиппокампа СА1. Для валидации модели оценивали когнитивные функции крыс в тесте водный лабиринт Морриса через 8 недель после инъекции. НСПК, меченые прижизненным мембранным красителем PKH26, в количестве 100 тыс. клеток трансплантировали в ГМ животным с экспериментальной БА по тем же координатам. Через 4 недели проводили оценку выживаемости, миграции и дифференцировки *in vivo*, выявляя маркеры нейронов (*b-III-tub*) и астроцитов (GFAP) в ткани ГМ.

Результаты. Полученные НСПК одновременно экспрессировали маркеры *sox-2* и *nestin*. Смоделированная БА была подтверждена выявленными значимыми нарушениями пространственной памяти. На экспериментальной модели БА было показано, что НСПК выживают в течение 4 недель в гиппокампе и мигрируют в мозолистое тело и кору больших полушарий. Кроме того, единичные НСПК дифференцируются в нейроны и астроциты *in vivo*.

Выводы. Впервые выявленные выживаемость, миграция и способность к дифференцировке *in vivo* НСПК из ОВ определяют потенциал этих клеток для разработки препаратов для персонализированной клеточной терапии БА.

Работа поддержана грантом РНФ № 22-1500141 П.

Литература

1. Stepanova O.V. et al. Bull Exp Biol Med. 2020.

Изучение абсорбции и биодоступности пролекарственных конъюгатов пиридоксина и кеторолака

М.Н. Сарынин (MaNSarynin@kpfu.ru)¹, Д.Ю. Гришаев¹, О.С. Васильева¹, Ю.Г. Штырлин¹

¹НОЦ Фармацевтики КФУ, Россия, Казань

Введение. Кеторолак относится к группе НПВС с анальгезирующей и противовоспалительной активностью. По мощности анальгезирующего эффекта он превосходит многие известные НПВС, однако, несмотря на высокую анальгетическую активность применение кеторолака ограничено риском серьезных побочных эффектов. Ранее в нашей исследовательской группе были синтезированы трис- и тетракиспроизводные пиридоксина и кеторолака, обладающие высокой анальгетической активностью и безопасностью *in vivo*.

Методы. В рамках данной работы проведена оценка абсорбции и биодоступности эфиров кеторолака и пиридоксина *in vitro* и *in vivo* методом ВЭЖХ-МС. Анализ внутриклеточного транспорта трис- и тетракиспроизводные пиридоксина и кеторолака проводили на культуре клеток аденокарциномы кишечника Сасо-2, морфофункционально аналогичной барьерному эпителию ЖКТ. Контролями проницаемости служили пропранолол (высокая проницаемость) и ранитидин (низкая проницаемость). Оценку фармакокинетических параметров и биодоступности исследуемых соединений проводили при однократном внутрижелудочном введении в плазме крыс в широком временном диапазоне (0 – 96 часов).

Результаты. Установлено, что значения коэффициента проницаемости для эфиров кеторолака и пиридоксина (P_{app} см/с) составили 8.1×10^{-8} и 6.4×10^{-8} см/с. Полученные величины превосходят показатель ранитидина (0.6×10^{-10} см/с) и кеторолака трометамин (4.3×10^{-8} см/с), что свидетельствует о высокой способности исследуемых соединений к пассивной диффузии через монослой клеток Сасо-2. В ходе оценки биодоступности при однократном внутрижелудочном введении тетракиспроизводного пиридоксина и кеторолака наблюдалось значительное увеличение периода полувыведения ($T_{1/2}$) кеторолака трометамин (в 3-6 раз в зависимости от введенной дозы). Среднее время удержания эфира кеторолака и пиридоксина в системном кровотоке (MRT) так же увеличивалось и составило 7 – 20 часов в зависимости от введенной дозы.

Выводы. Полученные данные согласуются с наблюдаемым нами ранее пролонгированным действием трис- и тетракиспроизводных пиридоксина и кеторолака и позволяют отнести данные соединения к перспективным кандидатам в лекарственные средства с высокой анальгетической активностью.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности №FZSM-2025-0005.

**Эндоканнабиноидная система является мишенью действия
аторвастатина в моторных синапсах мышцы**

Д.С. Спесивцев (spesivcev2004@mail.ru)¹, П.О. Богачева¹

¹ Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Аторвастатин - это лекарственный препарат, снижающий уровень холестерина в организме. Ряд исследований показал негативные побочные эффекты статинов, в том числе в скелетных мышцах и моторных синапсах. Эндоканнабиноиды (анандамид и 2-арахидоноилглицерин (2-АГ)) являются важными ретроградными регуляторами в этих синапсах, взаимодействуя с СВ1-рецепторами. О влиянии статинов на эндоканнабиноидную регуляцию работы синапсов известно мало.

Целью работы являлось выявление эффектов хронического приема аторвастатина на эндоканнабиноидную сигнализацию в моторных синапсах мышцы.

Методы. Мыши в течение 4 недель получали перорально ДМСО или аторвастатин (10 мг/кг), после на изолированном нервно-мышечном препарате m. EDL с помощью стеклянных микроэлектродов регистрировали спонтанные миниатюрные потенциалы концевых пластинок (МПКП).

Результаты. У мышей, принимавших ДМСО, анандамид (10 мкМ) не влиял на параметры МПКП, а 2-АГ (1 мкМ) приводил к увеличению амплитуды, не затрагивая другие параметры. Синтетический агонист СВ-рецепторов WIN55212-2 (20 мкМ) увеличивал частоту МПКП. Эти данные соответствуют ранее полученным нами на животных, пивших простую воду. Таким образом, хронический прием ДМСО никак не повлиял на уже известные нам эффекты эндоканнабиноидов. Однако у мышей, принимавших аторвастатин, анандамид начал увеличивать амплитуду МПКП, не влияя на другие параметры спонтанной секреции. В то же время 2-АГ утратил влияние на амплитуду МПКП. Синтетический агонист WIN55212-2 сохранил свое действие и так же увеличивал частоту МПКП. Антагонист СВ1-рецепторов AM6545 (1 мкМ) не изменял параметры МПКП, что говорит об отсутствии фоновой эндогенной активности этих рецепторов.

Выводы. Таким образом, на фоне хронического приема аторвастатина два основных эндоканнабиноида, 2-АГ и анандамид, изменили свои эффекты в моторных синапсах m. EDL мышцы. Синтетический агонист же сохранял свой эффект, что указывает на неизменное присутствие СВ1-рецепторов на мембране в условиях хронического приема статинов. Полученные результаты не могут быть связаны с появлением тонической активности СВ1-рецепторов, так как их блокатор, AM6545, не оказал собственного влияния. Они могут являться следствием перестроек активности ключевых ферментов и сигнальных каскадов эндоканнабиноидной системы и, безусловно, требуют дальнейшего изучения.

Оптимальные референсные гены для ОТ-ПЦР в мозге крыс разных возрастных групп в депрессивно-подобном состоянии

Е.В. Терновая (ternovaya.e.v@gmail.com)^{1,2}, О.В. Надей¹

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Россия, Санкт-Петербург

²Санкт-Петербургский национальный исследовательский академический университет им. Ж.И. Алферова РАН, Россия, Санкт-Петербург

Введение. Большое депрессивное расстройство (БДР) - распространенное заболевание, которое характеризуется снижением качества жизни. БДР сопровождается рядом патологических изменений, приводящих к дисрегуляции экспрессии генов, что обуславливает необходимость предварительной валидации эталонных генов. Поэтому целью работы была оценка стабильности экспрессии эталонных генов (Gapdh, Pgk1, Eef1a1, Hmbs, Ppia, Ywhaz, Tbp, Helz) в медиальной префронтальной коре (мПФК), в вентральном (ВГ) и дорсальном (ДГ) гиппокампе крыс разных возрастных групп при развитии депрессивно-подобного состояния (ДПС).

Методы. Самцы крыс Wistar возрастом 1,5 месяца (молодые, n=10), 10 Месяцев (взрослые, n=10) и 20 месяцев (пожилые, n=14) подвергались протоколу хронического непредсказуемого умеренного стресса в течение 7 недель для моделирования ДПС. Формирование ДПС оценивали с помощью теста предпочтения сахарозы, поведенческих тестов (тест принудительного плавания и «открытое поле») и измерения уровня кортикостерона в плазме крови (ИФА). Экспрессию эталонных генов оценивали методом ОТ-ПЦР в реальном времени, их стабильность оценивали с помощью программы RefFinder, объединяющей алгоритмы geNorm, NormFinder, BestKeeper и delta-Ct.

Результаты. К концу эксперимента у животных уровень кортикостерона был достоверно выше, чем у крыс контрольной группы, что подтвердило развитие ДПС. Анализ стабильности выявил специфичность референсных генов и для области мозга, и для возрастной группы. Внутри возрастных групп генами с высокой стабильностью в мПФК оказались Tbp/Ywhaz для молодых, Helz/Gapdh для взрослых и Eef1a1/Ppia для пожилых крыс. Наиболее стабильными генами в ВГ молодых животных стали Pgk1/Helz, взрослых - Ppia/Eef1a1 и Ppia/Pgk1 пожилых. В ДГ молодых и взрослых крыс наиболее стабильными оказались гены Pgk1/Gapdh, у пожилых - Gapdh/Hmbs.

Выводы. Таким образом, была выявлена выраженная специфичность референсных генов для определенной области мозга и возрастной группы. Полученные данные свидетельствуют о необходимости предварительной валидации референсных генов с учетом области мозга и возраста животных для корректной нормализации данных ОТ-ПЦР при изучении депрессивного расстройства.

Работа выполнена в рамках гос. задания ИЭФБ РАН (075-00264-26-00).

Мембранный холестерин как ключевой фактор, стабилизирующий нервно-мышечную активность

А.Д. Тупицына (arina.tupitsyna2014@yandex.ru)^{1,2}, Н.С. Фёдоров¹, А.И. Маломуж¹, А.М. Петров^{1,3}

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

²Казанский федеральный университет, Казань, Россия

³Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

Введение. Мембранный холестерин является ключевым компонентом плазматической мембраны, организующим липидные рафты и модулирующим активность интегрированных в них белков. Особенно богаты холестерином плазматическая мембрана нервного окончания и постсинаптическая мембрана скелетного мышечного волокна, а также области Т-трубочек. При этом данных о роли мембранного холестерина в функционировании периферического синапса млекопитающих недостаточно. В связи с этим, целью настоящего исследования стала оценка состояния нервно-мышечного синапса в условиях снижения уровня мембранного холестерина.

Методы. Эксперименты проведены на изолированном нервно-мышечном препарате диафрагмы мышцы с использованием методов электрофизиологии, тензометрии и флуоресцентного имиджинга. Снижение уровня мембранного холестерина достигалось аппликацией метил- β -циклодекстрина (M β CD, 30 мМ, 20 мин).

Результаты. Согласно данным маркирования мембран флуоресцентной меткой филиппин III, плазматическая мембрана нервно-мышечного препарата «теряет» при аппликации M β CD порядка 40% холестерина. Это сопровождается увеличением уровня спонтанной квантовой секреции ацетилхолина на 231%, что частично устранялось при блокаде L-типа кальциевых каналов. Полное устранение эффекта M β CD отмечалось в присутствии блокатора ванилоидных TRPV1 каналов и механочувствительных пьезо-каналов. Экстракция мембранного холестерина вызывала выраженную деполяризацию мышечного волокна на 39%. Эта деполяризация частично устранялась блокадой L-типа кальциевых каналов и ванилоидных TRPV1 каналов. Кальциевый имиджинг показал усиление притока кальция в скелетное мышечное волокно. Окрашивание липофильным красителем FM1-43 продемонстрировало формирование мембранных дефектов сарколеммы. M β CD-индуцированное уменьшение уровня холестерина в плазматической мембране мышечных волокон приводило к драматическому снижению силы мышечных сокращений (более чем на 70%).

Выводы. Таким образом, холестерин можно рассматривать в качестве молекулярного “стабилизатора”, ограничивающего приток кальция в нервное окончание и мышечное волокно, что контролирует экзоцитоз нейромедиатора и мембранный потенциал сарколеммы, соответственно.

Характеристика антиоксидантных свойств растительного метаболита пиридоксина

А.С. Христоролюбова (ASKhristolyubova@kpfu.ru)¹, О.В. Бондарь¹, Р.М. Хазиев¹, Ю.Г. Штырлин¹

¹ Научно-образовательный центр фармацевтики, Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Россия, Казань

Введение. Окислительный стресс характеризуется повышенным содержанием активных форм кислорода, способствующих развитию осложнений у пациентов с сахарным диабетом, нейродегенеративными, сердечно-сосудистыми и другими заболеваниями. В продолжение систематических исследований по разработке лекарственных средств на основе природного соединения пиридоксина [1] в настоящей работе было изучено влияние растительного метаболита пиридоксина – 6-гидроксипиридоксина на ферментативный комплекс антиоксидантной защиты клеток человека, в частности, на супероксиддисмутазу и общий антиоксидантный статус клеток.

Методы. Первичные клетки фибробластов кожи человека (HSF) культивировали в течение 7 дней с 6-гидроксипиридоксином в различной концентрации. Общий антиоксидантный статус клеток человека оценивали посредством реакции нейтрализации радикала ABTS. Для определения активности супероксиддисмутазы в лизатах клеток использовали реакцию супероксид анион-радикалов с 2-(4-иодфенил)-3-(4-нитрофенол)-5-фенилтетразолиевым хлоридом (INT) с образованием красного формазанового красителя. Супероксиддисмутазу из лизатов клеток нейтрализует супероксид анион-радикал и ингибирует образование окрашенного формазана.

Результаты. 6-гидроксипиридоксин значительно увеличивает общий антиоксидантный статус клеток HSF, что было выявлено по нейтрализации лизатами клеток радикала ABTS. Также под действием 6-гидроксипиридоксина в концентрациях 50 и 100 μM увеличивается интенсивность нейтрализации супероксида под действием супероксиддисмутазы клеток. Дальнейшее повышение концентрации до 300 μM сопровождается угнетением пролиферации и снижением антиоксидантного статуса клеток.

Выводы. Таким образом показано, что 6-гидроксипиридоксин защищает клетки человека от окислительного стресса и представляет интерес в качестве природного антиоксиданта-цитопротектора.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности № FZSM-2026-0025.

Литература

1. Shtyrln, Y.G.; Petukhov, A.S.; Strelnik, A.D.; Shtyrln, N.V.; Iksanova, A.G.; Pugachev, M.V.; Pavelyev, R.S.; Dzyurkevich, M.S.; Garipov, M.R.; Balakin, K.V. Russ. Chem. Bull. 2019, 68 (5), 911-945.

Влияние индукции овуляции хорионическим гонадотропином человека на гормональный статус и экспрессию овариальных генов у самок крыс с дегидроэпиандростерон-индуцированным синдромом поликистозных яичников

Е.Е. Черненко (llystdi@gmail.com)¹, А.С. Печальнова¹, К.В. Держач¹, А.О. Шпаков¹

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова, Россия, Санкт-Петербург

Введение. Синдром поликистозных яичников (СПКЯ) является одним из наиболее часто встречающихся эндокринных расстройств, ведущих к бесплодию у женщин. При стандартном протоколе индукции овуляции используют хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) в высоких дозах, что повышает риск развития синдрома гиперстимуляции яичников у пациенток с СПКЯ. Целью данной работы являлось изучение влияния индукции овуляции ХГЧ на экспрессию генов стероидогенеза в яичниках крыс с дегидроэпиандростерон (ДГЭА)-индуцированным СПКЯ.

Методы. Использовали самок крыс Wistar. СПКЯ-крысам ежедневно в течение 3 недель подкожно вводили ДГЭА, а контрольным крысам – его растворитель. Для оценки развития СПКЯ через 3 недели введения ДГЭА забирали кровь для определения уровней эстрадиола, прогестерона и тестостерона методом ИФА. Далее СПКЯ-крыс с низким прогестероном делили на группы: СПКЯ, СПКЯ+Г4 и СПКЯ+Г24, после чего им вводили Фоллимаг и дважды Цетротид, а через 48 ч – ХГЧ. Затем в яичниках крыс методом ПЦР измеряли экспрессию генов-компонентов овариального стероидогенеза для оценки эффекта от введения ХГЧ, соответственно через 4 (СПКЯ+Г4) и 24 ч (СПКЯ+Г24).

Результаты. После введения ДГЭА в сравнении с контрольной группой в крови СПКЯ-крыс уровень тестостерона был достоверно повышен, прогестерона – в незначительной степени снижен. После обработки ХГЧ отмечали значимое повышение уровня прогестерона у СПКЯ-крыс. Анализ генной экспрессии в яичниках крыс СПКЯ+Г4 показал повышение экспрессии генов *Egr* и *Sox2*, маркеров овуляции, а также стероидогенных генов – *Star*, *Cyp11a1* и *Cyp17a1* и гена рецептора лютеинизирующего гормона *Lhcgr*. Через 24 ч после введения ХГЧ (СПКЯ+Г24) эти изменения затухали, в то время как экспрессия гена *Lhcgr* значимо снижалась.

Выводы. Трехнедельное введение ДГЭА самкам крыс приводило к развитию характерных признаков СПКЯ. Впервые показано, что введение ХГЧ самкам с ДГЭА-индуцированным СПКЯ не только стимулировало овариальный стероидогенез, но и вызывало (через 4 ч) повышение в яичниках экспрессии ряда генов стероидогенеза и овуляции.

Влияние сверхэкспрессии изоформ фосфатазы STEP в стриатуме мышей с нокаутом гена Ptpn5 на поведение и метаболизм биогенных аминов в мозге

А.С. Щербакова (a.shsherbakova1@g.nsu.ru)^{1,2}, Д.В. Базовкина², Н.В. Хоцкин²

¹*Факультет естественных наук НГУ, Россия, Новосибирск*

²*Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, Новосибирск*

Введение. Стриатумспецифичная протеинтирозинфосфатаза STEP является важным фактором нейропластичности. Белок STEP имеет пять изоформ, наиболее изучены STEP46 и STEP61. Эти изоформы имеют разную структуру и функциональные особенности, однако их дифференциальные функции в ЦНС остаются недостаточно изученными. Целью было исследование влияния сверхэкспрессии изоформ белка STEP в стриатуме мышей линии Ptpn5 KO (с нокаутом гена, кодирующего белок STEP) на поведение и метаболизм биогенных аминов в мозге.

Методы. С помощью стереотаксиса в стриатум самцов мышей с нокаутом гена Ptpn5 были введены вирусные конструкторы AAV-Syn-Ptpn5_STEP46 и AAV-Syn-Ptpn5_STEP61, обеспечивающие в нейронах мыши сверхэкспрессию изоформ STEP46 и STEP61. Через 5 недель поведение этих мышей изучали в тестах “открытое поле”, “приподнятый крестообразный лабиринт” и “Ротарод”. Динамику обучения с положительным подкреплением оценивали с помощью установки “PhenoMaster” в модуле «оперантная стенка», экспрессию генов - методом real-time ПЦР, а уровень белков - Вестерн-блот анализом. Содержание норадреналина, дофамина, серотонина и их метаболитов в структурах мозга оценивали с помощью ВЭЖХ. Анализ данных проводили однофакторным ANOVA с последующим пост-хок анализом по Фишеру.

Результаты. Была подтверждена сверхэкспрессия изоформ STEP46 и STEP61 в стриатуме мышей, получивших конструкторы AAV-Syn-Ptpn5_STEP46 и AAV-Syn-Ptpn5_STEP61, соответственно. Сверхэкспрессия изоформ STEP46 и STEP61 не оказала влияния на показатели двигательной активности в тесте «открытое поле» и тревожно-подобного поведения в тесте ПКЛ. Была обнаружена тенденция к улучшению показателей моторных функций у группы «STEP61» ($p=0.06$). Только сверхэкспрессия изоформы STEP46 привела к улучшению динамики обучения в модуле «оперантная стенка», что сопровождалось повышением уровня серотонина и его метаболита 5-ГИУК в среднем мозге ($p < 0,05$). Не было найдено влияния сверхэкспрессии изоформ STEP46 и STEP61 на метаболизм катехоламинов в исследованных структурах мозга.

Выводы. Таким образом, результаты исследования вносят вклад в определение функциональной специализации изоформ STEP в регуляции поведения и синаптической пластичности.

Работа поддержана бюджетным проектом FWNR-2025-0021



Получение и очистка анти-CD3 DARPin в E.coli для сайт-специфического декорирования липидных наночастиц и селективной доставки мРНК-CAR в человеческие CD3⁺ Т-клетки

С. А. Ярмачкова (250542@siriusuniversity.ru)¹, И. И. Памеев¹, А. Я. Дахневич¹, М. В. Баранов¹

¹Научный центр трансляционной медицины, направление «Медицинская биотехнология», Научно-технологический университет «Сириус», Россия, Сириус

Введение. Липидные наночастицы (ЛНЧ) перспективны для доставки мРНК,

в частности, для генерации CAR-T-клеток in vivo. Для селективного нацеливания на Т-лимфоциты необходима функционализация ЛНЧ лигандами, например, рекомбинантными DARPin. Их получение в E. coli отличается высокой скоростью, низкой себестоимостью, малым размером и стабильностью, что удобно для декорирования частиц.

Методы. Сконструировали плазмиды на основе вектора pET30(a)+ с N-концевыми His-, TRX-тагами и сайтом протеолиза энтеропептидазы. После трансформации E. coli Shuffle T7 Express белок индуцировали 0,7 мМ ИПТГ (18 ч, 25 °C). Клетки лизировали ультразвуком. DARPin очищали металлохелатной хроматографией, удаляли таги энтеропептидазой и проводили анионообменную очистку. Последовательность белка подтверждали масс-спектрометрией.

Специфичность подтверждали окрашиванием клеток Jurkat (CD3⁺ и CD3-) конъюгатом DARPin-FITC. ЛНЧ с мРНК-GFP получали микрофлюидным смешиванием и декорировали через липид-ПЭГ-малеимид. Размер и ζ-потенциал определяли динамическим светорассеянием. Трансфекцию оценивали на клетках Jurkat и PBMC, анализируя долю GFP⁺ клеток в CD3⁺ популяции методом проточной цитометрии.

Результаты. Сконструированы экспрессионные векторы и оптимизирован протокол очистки рекомбинантного DARPin от N-концевых тагов. DARPin показал высокую аффинность и специфичность к человеческому CD3: на клетках Jurkat (CD3⁺) доля окрашенных клеток превысила 80 %, на CD3 — не более 3 %. Декорированные DARPin липидные наночастицы обеспечили эффективную и селективную доставку мРНК-CAR-GFP в Т-клетки: доля GFP⁺ клеток в CD3⁺ популяции составила более 85%, подтвердив перспективность белка для таргетной доставки в Т-лимфоциты in vivo.

Выводы. Разработанный метод получения рекомбинантного DARPin в E. coli технологичен и экономичен. Полученный белок обеспечивает специфичную доставку мРНК-ЛНЧ в Т-лимфоциты для перспективной генерации CAR-T in vivo.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственной программы «Сириус» (Соглашение № 18-03 от 10.09.2024).

Наночастицы СаР повышают эффективность дцРНК для подавления роста и токсинообразования у *Fusarium graminearum*

П.Е. Багдасарова (polina44815283v@gmail.com)^{1,2}, А.А. Стахеев¹, В.Е. Тихомирова^{1,3}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, Москва

²НИУ ВШЭ, Факультет биологии и биотехнологии, Россия, Москва

³Химический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

Введение. *Fusarium graminearum* - опасный патоген злаков, снижающий урожай и продуцирующий микотоксины, в том числе дезоксинивалененол (ДОН), угрожающие здоровью. Эффективность фунгицидов падает из-за резистентности и токсичности, что делает актуальной разработку экологичных методов защиты. Технология РНК-интерференции (РНКи) позволяет избирательно подавлять гены патогена с помощью двуцепочечных РНК (дцРНК). Однако нестабильность дцРНК в окружающей среде ограничивает их применение. Перспективное решение - инкапсуляция в наночастицы. Наночастицы фосфата кальция (СаР) биосовместимы и связывают нуклеиновые кислоты, но их потенциал для доставки дцРНК в защите растений ранее не изучался.

Методы. В работе использовали штамм *F. graminearum* MFG 58918, выделенный из пшеницы в Краснодарском крае. дцРНК синтезировали *in vitro* с помощью набора HiScribe® T7 High Yield RNA synthesis kit и вносили в жидкую среду Муго (500 нг/мл) с последующей инокуляцией суспензией конидий. Выделение РНК проводили на 4-е сутки (RNeasy Plant Mini Kit). Относительную экспрессию генов *Tri5* и *FgVe1* оценивали методом ОТ-ПЦР в реальном времени (2- $\Delta\Delta C_t$, референс - *Tef1 α*). Содержание ДОН определяли с помощью ВЭЖХ.

Результаты. В работе показано, что ген *FgVe1* *F. graminearum* является эффективной мишенью для РНК-интерференции: внесение специфической дцРНК снижало его экспрессию в среднем в 20 раз, что также подавляло экспрессию генов биосинтеза ДОН и пигмента гриба. Впервые для доставки дцРНК применены безопасные и дешёвые наночастицы фосфата кальция (СаР) с оптимальным соотношением СаР:дцРНК = 5:1. Выявлено, что свободная дцРНК активна около 4 дней, тогда как комплекс с СаР обеспечивает пролонгированную защиту до 10–14 дней. Доказан двойной механизм действия: подавление роста патогена и снижение накопления ДОН на 70–78%.

Выводы. Полученные результаты демонстрируют перспективность использования наночастиц СаР для стабилизации дцРНК и открывают путь к созданию экологически безопасных биопрепаратов пролонгированного действия против возбудителей фузариоза зерновых.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 23-74-30003

Конструирование и характеристика липосомальных адъювантов на основе рекомбинантного аллергена Art v 3

Д.С. Завойко (zavoyko.dasha@gmail.com)^{1,2}, Д.Н. Мельникова^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, Москва

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Россия, Долгопрудный

Введение. Рост аллергических заболеваний требует инновационных подходов к аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ). Несмотря на статус АСИТ как единственного метода, воздействующего на этиологию аллергии, ее эффективность ограничена риском системных реакций при использовании нестандартизированных экстрактов или рекомбинантных аллергенов. Применение липосомальных носителей может решить эти проблемы за счет пролонгированного высвобождения аллергена, снижения пиковых концентраций в крови и минимизации риска анафилаксии. Целью данной работы были разработка и конструирование липосом в качестве адъювантов для рекомбинантного клинически значимого аллергена пыльцы полыни Art v 3, относящегося к липид-транспортующим белкам (LTP) семейства PR-14 и индуцирующего перекрестные аллергические реакции.

Методы. Рекомбинантный аллерген Art v 3 экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3). Анионные липосомы, состоящие из 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолина, 1,2-дистеароил-sn-глицерофосфоглицерола и холестерина, в соотношении 2:2:1, соответственно, были получены методом экструзии. В ходе работы были сконструированы липосомы: (1) с инкапсулированным Art v 3 с массовым соотношением белок : липид 0,2 и 0,6; (2) с инкапсулированным и адсорбированным белком; (3) с адсорбированным аллергеном. Методами динамического светорассеяния и электрофоретического светорассеяния определяли гидродинамический диаметр, индекс полидисперсности и дзета-потенциал липосом. Также была проведена оценка эффективности инкапсуляции аллергена в липосомы и оценена долговременная стабильность.

Результаты. Наиболее перспективным вариантом для дальнейших исследований являются липосомы с инкапсулированным Art v 3 с массовым соотношением белок : липид 0,6. Эти липосомы показали высокую степень инкапсуляции аллергена (75%) и наибольшую стабильность при долговременном хранении.

Выводы. Полученные результаты позволят сформировать основу для создания безопасных препаратов АСИТ против аллергии, вызванной белками класса LTP.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-25-00964).

Плазмидный вектор с промоторами гена EEF1A1 китайского хомячка и цитомегаловируса обеспечивает корректный относительный уровень биосинтеза тяжелых и легких цепей афукозилированного мкАт бенрализумаб

В.Г. Зуйкова (accelerandos@yandex.ru)¹, Д.О. Стронина¹, Н.А. Орлова¹, И.И. Воробьев¹

¹Лаборатория биоинженерии клеток млекопитающих, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Россия, Москва

Введение. Для сборки функциональных IgG критически важен баланс синтеза тяжелых (ТЦ) и легких цепей (ЛЦ), его нарушение может приводить к накоплению свободных цепей, агрегации и снижению выхода целевого продукта. Бицистронные векторы с IRES, не всегда позволяют точно настроить этот баланс. В работе исследовано применение двухпромоторной системы для антитела бенрализумаб: ЛЦ под контролем гибридного промотора CMV/EEF1A1 человека, ТЦ - под промотором EEF1A1 китайского хомячка. Для усиления трансляции в 5'-UTR ЛЦ встроены клеточный IRES p27/WAF, а селективный маркер DHFR экспрессируется с ТЦ через вирусный IRES EMCV. Цель работы - оценить, обеспечивает ли такая конфигурация корректный относительный уровень биосинтеза цепей афукозилированного моноклонального антитела бенрализумаб.

Методы. Сконструирована плазида с двумя транскрипционными единицами для экспрессии бенрализумаба: ТЦ под промотором EEF1A1 (с IRES EMCV и геном DHFR) и ЛЦ под гибридным промотором CMV/EEF1A с клеточным IRES p27 в 5'-UTR. Вектором трансфицировали клетки CHO 4BGD FUT8-/-, провели селекцию и амплификацию метотрексатом. Экспрессию анализировали вестерн-блоттингом (антитела к ТЦ, ЛЦ и Fc) для дифференцировки свободных цепей и собранных IgG, продуктивность оценивали ИФА.

Результаты. Вестерн-блоттинг культуральной среды выявил свободные легкие цепи (ЛЦ), но их уровень не превышал сигнал ЛЦ в составе полных IgG. Тяжелые цепи детектировались только в гетеродимерах H2L2, свободные ТЦ отсутствовали. Основным продуктом были полностью собранные антитела с минимальным уровнем агрегатов. Продуктивность амплифицированных пулов достигала не менее 200 мг/л, что соответствует типичным значениям для бенрализумаба.

Выводы. Использование комбинации промоторов гибридного CMV/EEF1A человека и EEF1A китайского хомячка в сочетании с дополнительными IRES-элементами позволяет достичь сбалансированной экспрессии тяжелых и легких цепей афукозилированного антитела. Предложенная векторная конфигурация может быть рекомендована для разработки промышленных продуцентов рекомбинантных антител.

Повышение эффективности продукции вирусоподобных частиц NanoMEDIC для доставки рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas путем нокаута FKBP12 в клетках-продуцентах HEK293T

А.В. Ксенофонтова (*nastyaksen2003@gmail.com*)¹, Н.А. Круглова¹

¹Институт биологии гена РАН, Россия, Москва

Введение. Одним из перспективных методов доставки в клетки геномных редакторов CRISPR/Cas является доставка гидовой РНК (гРНК) и нуклеазы в форме рибонуклеопротеиновых (РНП) комплексов в составе вирусоподобных частиц (VLP). VLP – это не способные к репликации частицы, спонтанно собирающиеся из структурных белков вирусов HIV или MMLV. Один из описанных типов VLP, NanoMEDIC, показал высокую активность при тестировании на разных моделях. В этом типе частиц упаковка РНП комплексов осуществляется за счет индуцируемой аналогом рапамицина димеризации Cas-нуклеазы и структурного белка HIV Gag, слитых соответственно с доменами FRB и FKBP12. Продукция VLP NanoMEDIC происходит в клеточной линии HEK293T, в которой присутствует эндогенный белок FKBP12. По этой причине часть белков FRB-Cas может связываться с клеточным FKBP12, что может снижать эффективность упаковки РНП комплексов в частицы и, следовательно, эффективность генетического редактирования. Мы предположили, что системе доставки NanoMEDIC можно усовершенствовать, используя для продукции частиц клетки с нокаутом *FKBP12*.

Методы. Для проверки этой гипотезы мы получили такую клеточную линию путем трансфекции клеток HEK293T плазмидами, кодирующими нуклеазу SpCas9 и гРНК против локуса FKBP12, и отбора клонов методом Вестерн блоттинга. Клоны с нокаутом использовали для продукции VLP с нуклеазой AsCas12a и гРНК против репортера Venus. Эффективность полученных частиц оценивали по уровню нокаута Venus в клеточной линии 293-Venus на 6-й день после трансдукции методом проточной цитофлуориметрии.

Результаты. По сравнению с VLP, полученными в исходных клетках HEK293T, VLP, наработанные в клонах с нокаутом FKBP12, показали более высокую редактирующую активность. Оптимизация соотношения плазмид, кодирующих FKBP12-Gag и FRB-AsCas12a, для трансфекции клеток-продуцентов VLP также позволила повысить редактирующую активность VLP NanoMEDIC.

Выводы. Нокаут FKBP12 в клетках-продуцентах HEK293T позволил повысить эффективность продукции VLP NanoMEDIC. В дальнейшем продукция частиц в HEK293T с нокаутом FKBP12 и исходных клетках будет проведена в большом формате (15-см чашек Петри), а оценка эффективности будет проведена на различных генных и клеточных моделях.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 22-15-00381-П

Фоторасщепляемые циклические направляющие РНК для регулируемой светом системы CRISPR/Cas9

Ф.М. Мещанинов (f.meshchaninov@g.nsu.ru)

Факультет естественных наук НГУ, Россия, Новосибирск

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Россия, Новосибирск

Введение.

Создание управляемых систем редактирования генома на основе CRISPR/Cas9 находит применение в научных исследованиях и при создании методов терапии генетических заболеваний. Ранее была продемонстрирована возможность изменения активности системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 при использовании циклических фоторасщепляемых направляющих РНК (сгРНК). Функциональность таких сгРНК должна быть заблокирована вплоть до облучения. В результате облучения происходит расщепление фотолинкера в составе циклической РНК, линейаризация сгРНК с восстановлением ее функциональности и активация системы CRISPR/Cas9. В данной работе для циклизации сгРНК мы предложили подход, позволяющий соединять внутреннее и концевое положение бис-алкинмодифицированной сгРНК с помощью бис-азида с образованием циклической РНК типа "лассо". Целью работы являлось получение циклических сгРНК и исследование эффективности регуляции системы геномного редактирования в зависимости от размера цикла.

Методы. Все РНК получены твердофазным фосфитамидным синтезом. Циклизацию РНК проводили методом клик-химии. В качестве субстрата для генетической модификации использовали плазмиду. Для облучения использовали свет с длиной волны 365 нм. Для анализа и выделения нуклеотидных последовательностей использовали гель-электрофорез.

Результаты. Были получены циклические фоторасщепляемые сгРНК, с размерами циклов от 12 до 42 нуклеотидов. При сравнительном анализе была выявлена зависимость степени инактивации системы при циклизации сгРНК от размера циклического фрагмента. Среди изученных вариантов сгРНК с 30-нуклетидным циклическим фрагментом обладала наилучшими характеристиками: снижение эффективности расщепления модельной плазмиды в 4,7 раз при использовании циклической сгРНК, и повышение эффективности расщепления в 2,4 раза после облучения.

Выводы. Было показано, что с использованием циклических фоторасщепляемых сгРНК, можно активировать систему геномного редактирования CRISPR/Cas9 в нужное время в нужном месте. Использование данного метода регуляции активности CRISPR/Cas9 является перспективным для использования в научных исследованиях и лечении генетических заболеваний.

Исследование поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 125012300656-5

Метод быстрого скрининга для обнаружения событий редактирования генома в культурах клеток

Е.В. Моргацкая (*e.morgatskaia@gmail.com*)¹, В.С. Вьюшков¹, Н.А. Ломов¹

¹ Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. При редактировании генома целевые мутации возникают не в каждой клетке, поэтому выявление клеток с нужными мутациями является трудоемким процессом. Классическая ПЦР требует выделения ДНК, что долго и дорого при массовом скрининге. ПЦР без выделения ДНК (прямая ПЦР, пПЦР) упрощает скрининг, но коммерческие наборы имеют высокую стоимость. Ранее мы предложили протокол пПЦР [1], состоящий в осаждении небольшого количества клеток, их лизисе в ПЦР-буфере с протеиназой К и последующей ПЦР в той же пробирке. Цель новой работы: разработка упрощенного метода пПЦР — без стадии осаждения — и подбор оптимальных условий реакций. Мы определили минимальное количество клеток, необходимое для реакции; долю объема реакции, которую может составлять суспензия клеток; влияние длины ПЦР-продукта на эффективность пПЦР. Также на примере транслокации MLL-AF6 мы оценили минимальную долю клеток с мутацией, выявляемую новым методом.

Методы. Работу вели с суспензионной культурой клеток человека LCL (RPMI 8866) и клоном LCL, обладающим транслокацией MLL-AF6. В новом методе пПЦР суспензию клеток добавляли напрямую в лизирующий буфер, без осаждения клеток. Затем в ту же пробирку вносили праймеры и полимеразу. Выход ПЦР-продуктов измеряли денситометрически после электрофореза.

Результаты. Новый метод пПЦР оказался более чувствительным: достаточно всего лишь ~10 клеток в реакции, в отличие от предыдущего варианта, для которого было необходимо более 100 клеток в реакции. Объем клеточной суспензии в диапазоне 2,5%—10% объема реакции не влиял на эффективность ПЦР. Для более длинных ПЦР-продуктов чувствительность ниже: в случае ПЦР-продуктов до 1000 п.н. достаточно ~10 клеток в реакции, в то время как для ПЦР-продуктов около 2000 п.н. требовалось более 60 клеток. Новый метод позволил обнаружить целевую транслокацию MLL-AF6, содержащуюся в 0,1% клеток, что говорит о высокой чувствительности метода.

Выводы. Предложенный метод пПЦР ускоряет скрининг клеток и может использоваться даже при невысокой эффективности редактирования генома. Малое количество клеток, необходимое для реакции, позволяет начать скрининг, не дожидаясь достижения культурой большой плотности.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ №24-15-00093

Литература

1. Lomov, N.A., et al., Direct ENIT: An easy and reliable tool for gRNA efficacy verification by tracking induced chromosomal translocation. *MethodsX*, 2020. 7: p. 101104.

Влияние эрадикационной терапии *H. pylori* на динамику резистоста кишечника

Е.Р. Пономарева (*elizavettunina@mail.ru*)¹, М.Н. Сунягина¹, С.Р. Абдулхаков¹, Т.В. Григорьева¹

¹Институт фундаментальной медицины и биологии КФУ, Россия, Казань

Введение. Эрадикационная терапия *H. pylori* является провоцирующим фактором для изменений в микробиоте кишечника, что приводит к нежелательным побочным эффектам, а также фактором развития антибиотикорезистентности общей микрофлоры. Данные изменения характеризуются колебанием резистоста, совокупности генов антибиотикорезистентности микроорганизмов, что приводит к селекции устойчивых штаммов и представляет собой опасность для общественного здравоохранения. Целью настоящего исследования явилась оценка динамики кишечного резистоста у пациентов, проходящих стандартную тройную эрадикационную терапию инфекции *H. pylori*.

Методы. В исследовании приняли участие 15 пациентов с подтвержденной инфекцией *H. pylori*, принимающие двухнедельную эрадикационную терапию: эзомепразол 20 мг, кларитромицин 500 мг, амоксициллин 1000 мг, висмута трикалия дицитрат 240 мг, Закофальк дважды в день. Образцы кала пациентов были собраны до начала лечения, сразу после окончания лечения и спустя месяц после окончания лечения. ДНК из образцов была выделена с помощью набора FastDNA Spin Kit. Библиотеки для секвенирования были подготовлены с помощью набора NEBNext Ultra II. Секвенирование было проведено на платформах FASTASeq 300 и HiSeq 1000. Прочтения были картированы на базу генов антибиотикорезистентности CARD с помощью программы bowtie2. Подсчет выровнявшихся прочтений был осуществлен с помощью программы FeatureCounts. Статистическую значимость оценивали с помощью попарного теста Манна-Уитни с поправкой Бенджамини-Хохберга.

Результаты. После терапии количество генов устойчивости возросло по 13 классам антибиотиков, включая мультирезистентные. Через месяц их число снизилось в 12 группах, среди которых аминогликозиды, фторхинолоны, макролиды, тетрациклины и другие, а также отмечено снижение устойчивости к мупиноцину и рифамицинам.

Выводы. Несмотря на значительное увеличение количества генов антибиотикорезистентности вследствие приема терапии в большей части групп их количество значительно снижается через месяц после завершения терапии. Кроме того, количество генов устойчивости к мупиноцин-подобным антибиотикам и рифамицинам спустя две недели сократилось и не вернулось к исходной точке через месяц, однако тенденция к этому имеется.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной КФУ на выполнение государственного задания в сфере научной деятельности (№ FZSM-2026-0005)

Мультимодальная визуализация опухолевых клеток с помощью новых генетически кодируемых репортерных систем

И.Е. Рожкова (*irishka.irinka.ira090304@yandex.ru*)¹, А.Н. Габашвили¹, А.О. Сосновцева², А.А. Дресвянникова¹

¹Институт общей физики им. А. М. Прохорова Российской академии наук, Россия, Москва

²Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Россия, Москва

Введение. Молекулярная визуализация является одним из основных инструментов для создания и усовершенствования моделей опухолей *in vivo*, использование репортерных генов является ключевым элементом в данной области. Для преодоления ограничений, специфичных для различных методов визуализации, и усиления преимуществ нами были созданы 2 новые генетические конструкции, разделенные элементом внутреннего сайта посадки рибосом (IRES) и содержащие 2 репортерных гена под контролем SV40 промотора. Вышележащий ген в обеих конструкциях кодирует белки бактериальных инкапсулинов *Quasibacillus thermotolerans* (Qt), способных окислять Fe^{2+} до Fe^{3+} с образованием магнитных наночастиц (МНЧ). Нижележащий ген кодирует люминесцентный белок: люциферазу светлячка (Fluc)/ NanoLuc (Nluc).

Методы. Методом трансфекции были получены вирусные векторы Qt-Fluc и Qt-Nluc, которыми заражали клетки карциномы легкого Льюис мыши (LLC). Для оценки накопления железа использовали окраску по Перлсу и ИСП-МС, а также с помощью магнитометрии. Люминесцентный сигнал исследовали при помощи спектрофотометрии и оптической томографии. Полученные клетки использовали для моделирования подкожных опухолей у мышей C57BL и оценки сигналов меток *in vivo*.

Результаты. Было установлено, что экспрессия вставок интереса в полученных клетках стабильно сохраняется. Люминесцентный сигнал люциферазы в клетках устойчивый и интенсивный, особенно от репортера Nluc, имеет дозозависимый характер и растет с увеличением количества клеток в образце. Было также доказано дозозависимое накопление железа в клетках и образование МНЧ внутри инкапсулинов, соответственно, т.е. была подтверждена функциональность двух репортерных генов. Исследование *in vivo* показало приживляемость клеток в мышах.

Выводы. Полученные конструкторы стабильно экспрессируются в клетках млекопитающих с сохранением функциональной активности. Данные конструкции представляют собой уникальную и воспроизводимую платформу для неинвазивного исследования опухолей. Модифицированные клетки LLC приживляются в мышах с сохранением сигналов обеих меток, что перспективно для усовершенствования единственной воспроизводимой модели карциномы легкого мыши.

Создание лентивирусных векторов с модифицированной поверхностью для трансдукции Т-лимфоцитов

Е.Д. Семенченко (*elizaweta.semenchenko@mail.ru*)^{1,2}, И.Р. Муфтахутдинов¹, Е.М. Мерзляк¹

¹Государственный научный центр Российской Федерации Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, Москва

²Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Лентивирусные векторы широко используются для доставки генов. Путем псевдотипирования, то есть замены белков оболочки вируса на другие белки, можно изменять тропизм лентивируса и избирательно нацеливать его на таргетные популяции клеток. Для целевой трансдукции Т-лимфоцитов можно использовать корецепторы Т-клеточного рецептора, среди которых CD3 и CD8 (поверхностный маркер Т-лимфоцитов и их субпопуляции – Т-киллеров, соответственно). Данная работа посвящена созданию системы адресной доставки генов в Т-лимфоциты на основе лентивирусных векторов.

Методы. Лентивирусы, несущие ген GFP и псевдотипированные антителом к CD3 (aCD3), CD80 или комбинацией aCD3+CD80, использовали для трансдукции мононуклеарных клеток периферической крови человека (мононуклеаров). Лентивирусы, несущие ген GFP и псевдотипированные разными вариантами антитела к CD8 (aCD8 VNH или aCD8 scFv), использовали для трансдукции мононуклеаров и цельной крови человека. Эффективность трансдукции оценивали с использованием проточной цитометрии.

Результаты. По результатам проточной цитометрии было показано, что вирусные частицы, псевдотипированные aCD3 и aCD3+CD80, трансдуцировали мононуклеары с приблизительно одинаковой эффективностью 36,4% и 35,4%, соответственно. Одного CD80 было недостаточно для трансдукции. Использование для трансдукции комбинации aCD3+CD80 сдвигало соотношение популяций CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов в сторону CD8+ Т-клеток по сравнению с использованием только aCD3, а также способствовало активации Т-лимфоцитов по результатам определения маркеров активации CD25, CD69 и CD137 методом проточной цитометрии. Вирусные частицы, псевдотипированные aCD8 VNH и aCD8 scFv, показали эффективность трансдукции мононуклеаров 61,8% и 31,2%, соответственно. При трансдукции цельной крови эффективность трансдукции лентивирусами, псевдотипированными aCD8 VNH и aCD8 scFv, составила 21,2% и 23,8%, соответственно.

Выводы. Действие системы на основе псевдотипированных лентивирусных векторов было оценено на мононуклеарах и цельной крови человека. Было показано, что система эффективна для таргетной трансдукции разных субпопуляций Т-лимфоцитов *in vitro*.

Роль альбумин-связывающего домена в циркуляции и таргетной доставке HER2-специфичных липосом

Е.В. Серова (bykatr@mail.ru)

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, Москва

Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Для доклинической оценки противоопухолевых препаратов необходимы инструменты, позволяющие количественно отслеживать динамику роста опухоли *in vivo*. Неинвазивная флуоресцентная визуализация на животных моделях позволяет отслеживать опухолевые процессы в реальном времени. Повышение времени циркуляции адресных наночастиц в крови – один из способов увеличения их опухолевого накопления и повышения контрастности сигнала.

Методы. Сконструированы флуоресцентные липосомы, направленные против HER2 (human epidermal growth factor receptor 2). В качестве адресного модуля использовали DARP_{in}_9-29 (Designed Ankyrin Repeat Protein), обладающий высокой аффинностью к HER2. Были получены две конструкции: DARP-Lip и гибридный вариант с альбумин-связывающим доменом бактериального белка *Staphylococcus aureus* (DARP-ABD-Lip). Размер и ζ -потенциал липосом измеряли с использованием Z-sizer. Специфическое связывание с HER2 оценивали методом проточной цитометрии *in vitro*. Биораспределение исследовали на мышах линии Balb/c с сингенными HER2-положительными опухолями.

Результаты. Полученные липосомы имели средний гидродинамический диаметр около 129 нм и отрицательный ζ -потенциал (-29 мВ), что указывает на коллоидную стабильность. Оба варианта демонстрировали связывание с HER2 *in vitro*. В экспериментах *in vivo* включение альбумин-связывающего домена приводило к увеличению соотношения «опухоль/фон» по сравнению с липосомами без ABD.

Выводы. Интеграция альбумин-связывающего домена в состав адресного модуля повышает диагностическую эффективность HER2-направленных липосом за счёт увеличения времени циркуляции и усиления контрастности опухолевого сигнала. Полученные данные подтверждают целесообразность использования ABD для оптимизации тераностических наноконструкций

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант №24-14-00088 “Таргетированные флуоресцентные липосомы как система для неинвазивной оптической детекции первичных опухолей и удаленных метастазов HER2/EpCAM-положительных карцином”.

**Снижение фоновой активности оптогенетической системы
VphP1-QPAS1 при белом освещении в растениях**

Э.С. Суркова (*ellina.sur@gmail.com*)^{1,2}, Е.С. Омелина², Н.В. Баттулина²,
А.А. Загорская³

¹Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Россия, Новосибирск

²Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Россия, Новосибирск

³Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, Новосибирск

Введение. Регуляция экспрессии трансгенов в растениях традиционно осуществляется химическими индукторами, что ограничивает пространственно-временной контроль и может вызывать побочные эффекты. Оптогенетические системы — альтернативный подход, основанный на управлении транскрипцией светом. Бактериальная система VphP1-QPAS1 активируется ближним инфракрасным светом (БИК, 780 нм) и является ортогональной эндогенным фоторецепторам растений. Однако её применение осложняется нежелательной активацией при белом освещении. Целью работы являлась модификация системы VphP1-QPAS1 для снижения фоновой активности при белом свете и оценка возможности её применения в растениях.

Методы. Классические методы клонирования (в т.ч. сборка по Гибсону), транзиентная агроинфильтрация листьев табака *Nicotiana benthamiana*, получение трансгенных линий томата *Solanum lycopersicum*, анализ экспрессии pEGFP эпифлуоресцентной микроскопией.

Результаты. Модификации системы VphP1-QPAS1 путем комбинации с контролируемыми синим светом белком VVD и AsLOV2 доменом, несущим сигналы ядерного экспорта (NES), не устраняли нежелательную активацию VphP1-QPAS1 при белом освещении. Однако модификация с использованием домена AsLOV2 в сочетании с дегроном снижала уровень активации репортерного гена в транзиентно трансформированных листьях *N. benthamiana* при белом свете. При воздействии БИК света наблюдалось усиление сигнала pEGFP. В трансгенных растениях томата *S. lycopersicum* получены предварительные данные о сохранении светозависимой регуляции экспрессии и вариабельности уровня сигнала между независимыми линиями.

Выводы. Показана возможность уменьшения фоновой активации VphP1-QPAS1 при белом освещении за счёт AsLOV2-зависимого дегрона. Модифицированная система обладает потенциалом для применения в исследованиях растений и биотехнологии, в том числе для подходов, направленных на повышение устойчивости растений к неблагоприятным условиям, вредителям и вирусным заболеваниям.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 22-74-10118-П.

**Разработка, аналитическая и клиническая валидация
ПЦР-тест-системы на основе аллельной дискриминации TaqMan
для генотипирования мутаций MYBPC3:p.R820W(R818W) и
MYH7:p.E1883K, ассоциированных с гипертрофической
кардиомиопатией *Felis catus***

А.С. Суслова (asuslova2022@gmail.com)¹, Б. Яздурдыев¹, Т. А. Болотникова^{1,2}, О.И. Болотникова^{1,3}

¹ ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Россия, г. Санкт-Петербург

² ООО «Бигль», Россия, г. Санкт-Петербург

³ ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», Россия, г. Петрозаводск

Введение. Гипертрофическая кардиомиопатия — распространенная наследственная патология Кошки домашней. У ряда предрасположенных пород заболевание ассоциировано с мутациями MYBPC3:p.R820W(R818W) и MYH7:p.E1883K. Методы секвенирования по Сэнгеру и ПЦР-РВ с модифицированными (LNA-/MGB-) зондами отличаются высокой стоимостью и технической сложностью. Цель работы — разработка и валидация экономически доступной мультиплексной ПЦР-РВ тест-системы на основе аллельной дискриминации TaqMan с использованием немодифицированных зондов.

Методы. Для дизайна олигонуклеотидов использовали программное обеспечение SnapGene, Primer-BLAST и IDT OligoAnalyzer. Рекомбинантные плазмиды pJET1.2 содержали дикотипные и мутантные участки генов MYBPC3 и MYH7, собранные методом ПСА. ДНК выделяли из цельной крови здоровых животных и носителей (лаборатория «Поиск», Санкт-Петербург) пятью методами при варьировании объёма биообразца. Для каждой комбинации «метод × объём» получили девять независимых измерений порогового цикла (Ct). Аналитическая валидация включала оценку робастности, сходимости, воспроизводимости и определение рабочего интервала значений Ct. Диагностические характеристики рассчитали методом Уилсона с доверительным интервалом 95%.

Результаты. Разработанная ПЦР тест-система дифференцирует дикотипные и мутантные формы аллелей генов MYBPC3 и MYH7. Оптимальным признали протокол выделения «Реалбест» (АО «Вектор-Бест», РФ) при объёме биоматериала 100–150 мкл. Рабочий интервал пороговых циклов для канала FAM составил 23,7–33,6 Ct (ДТ-96 (ООО «ДНК-Технология», РФ)) и 24,8–33,8 Ct (LightCycler 96 (Roche, Швейцария)), что подтверждено на 29 образцах. Диагностическая специфичность достигла 94,5% (95% ДИ 75,5–98,7), чувствительность — 100% (95% ДИ 72,2–100,0).

Выводы. Предложенная мультиплексная ПЦР-РВ система с немодифицированными зондами сочетает высокую эффективность с экономической доступностью, рекомендована к внедрению в ветеринарную практику.

Новый рекомбинантный антиген вируса болезни Ньюкасла - иммунохимические свойства и протективность

Е.П. Умарова (liza.shinkarenko@gmail.com)¹, Е.М. Рябчевская¹

¹Кафедра вирусологии, биологический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Вирус Болезни Ньюкасла (ВБН) – возбудитель высококонтагиозного заболевания птиц. Применяемые в настоящее время живые и инактивированные вакцины основаны на вирусах I и II генотипов, которые удалены от наиболее актуального и патогенного VII генотипа и не способны обеспечить полную защиту птиц, поэтому разработка актуальной рекомбинантной вакцины – перспективное направление борьбы с ВБН.

Ранее в нашей лаборатории на основе HN-гликопротеина ВБН был разработан рекомбинантный антиген – Castle1. В его состав были включены два фрагмента, содержащие линейные нейтрализующие эпитопы. Фрагмент 1 (341-368 а.о.) был включен в трех вариантах, соответствующих наиболее часто встречающимся аминокислотным последовательностям, а фрагмент 2 (242-256 а.о.) – консервативен.

Методы. Непрямой твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), вестерн-блот анализ, электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле, трансформация бактерий (*E. coli*) плазмидой с целевым геном, индукция экспрессии целевого белка, выделение белка в денатурирующих условиях из бактериальных клеток, афинная хроматография, диализ, электрофорез белков в 8-20% ПААГ, иммунизация и отбор крови

Результаты. Охарактеризованы антигенные свойства Castle1 с использованием иммунных сывороток и изучена его протективность. В работе было подтверждено, что неохарактеризованные сыворотки, полученные с птицефабрики, иммунны к разным изолятам ВБН (в том числе генотипа VII). Показано, что эти сыворотки эффективно взаимодействуют с Castle1. Сыворотки с наиболее высокими титрами к Castle1 были проанализированы методом вестерн-блот анализа. Выявлено, что фрагменты, входящие в состав Castle1, различаются по своим антигенным свойствам.

Выводы. Показана частичная защита птиц после иммунизации. Выживаемость кур в опытной группе составила 30%. Сделан вывод о том, что для создания универсальной вакцины необходимо также использовать нейтрализующие эпитопы F-белка ВБН. На основе анализа изолятов, наиболее часто встречающихся за последние 10 лет в России, разработана генетическая конструкция рекомбинантного F-белка. Выражаем благодарность Е.Ю. Боравлевой и А.С. Гамбарян за неоценимую помощь в работе с птицами.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 25-14-00045.

Влияние микроструктурированных пленок из поли-3-оксибутирата с инкапсулированными статинами на морфологию клеточной линии SH-SY5Y

В. Фань, С. Вэнь (wenxian_ffan@163.com, 1651487889@qq.com)¹, Л.И. Попова¹, Е.А. Акулина^{1,2}

¹Биологический факультет МГУ-ППИ, Китай, Шэньчжэнь

²Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Клеточная линия SH-SY5Y является удобным и воспроизводимым модельным объектом для исследования нейрональной дифференцировки *in vitro*. Вместе с тем контроль данного процесса с помощью применения биологических подложек с инкапсулированными биоактивными веществами остаётся недостаточно изученным, что определяет актуальность разработки материалов-носителей и подбора эффективных комбинаций индукторов.

Методы. Плёнки из поли-3-оксибутирата (ПОБ) с инкапсулированным симвастатином (2, 4, 6, 8 и 10%, м/м) изготавливали методом отлива на металлических формах с лазерной гравировкой ориентированной микроструктуры различных размеров (15-35, 15-50, 15-75, 30-35, 30-50 и 30-75 мкм), где первое число соответствует ширине выступа, второе - ширине бороздки; часть полимерных образцов покрывали полилизинном. Для покрытых и непокрытых плёнок была проведена оценка высвобождения симвастатина. Жизнеспособность клеток определяли с использованием теста ССК-8. Дифференцировку SH-SY5Y на пластике/плёнке ПОБ проводили в различных средах с добавлением стимулирующих веществ, таких как ретиноевая кислота (РА), глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1) и симвастатин, с оценкой морфологии и формирования нейритов с помощью световой и флуоресцентной микроскопии. Экспрессию маркеров анализировали методом проточной цитометрии.

Результаты. Показано, что симвастатин в концентрации 0,5 мкМ обеспечивает максимальный рост нейритов при сохранении высокой жизнеспособности (97,3% относительно контроля; ССК-8, 8-е сутки). Добавление РА вызывало выраженное снижение экспрессии некоторых поверхностных маркеров, включая CD24 и CD15; добавление GLP-1 усиливало данный эффект. Для микроструктурированных плёнок ПОБ было выявлено, что варианты микрорельефа 30–50 и 30–75 мкм усиливают формирование нейритов в отличие от вариантов с более узким выступом (15 мкм) и меньшим шириной бороздки (35 мкм). Покрытие полилизинном снижало начальный выброс и кумулятивное высвобождение симвастатина из ПОБ примерно на 50% по сравнению с непокрытыми плёнками.

Выводы. Микроструктурированные биогибридные каркасы на основе ПОБ-плёнок с инкапсулированным симвастатином представляют собой практический подход к модуляции нейрональных признаков SH-SY5Y *in vitro*.

Анализ эффективности генной экспрессии в двунаправленных векторных системах при использовании различных промоторов

Т.С. Царегородцева (*tanyatsa03@gmail.com*)¹, А.И. Аюпова¹, В.В. Соловьева¹, А.А. Ризванов¹

¹НИЛ «Генные и клеточные технологии», ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Россия, Казань

Введение. Разработка генетических систем, обеспечивающих одновременную экспрессию нескольких генов, является одной из приоритетных задач современной генной инженерии для лечения полигенетических заболеваний. Наибольший интерес в этом контексте вызывают двунаправленные векторные конструкции, в которых транскрипция двух генов инициируется регуляторными элементами, ориентированными в противоположные стороны. В работе оценено влияние комбинаций и ориентации регуляторных последовательностей на экспрессию генов *co3EGFP* и *co3mCherry* в составе рекомбинантных аденоассоциированных вирусных векторов (AAV).

Методы. Двунаправленные генетические конструкции были созданы путём субклонирования кодон-оптимизированных кДНК генов *co3EGFP* и *co3mCherry*. Была проведена трансфекция клеток НЕК293Т для анализа эффективности экспрессии трансгенов с использованием флуоресцентной микроскопии, ПЦР-РВ и вестерн-блот анализа.

Результаты. Все четыре двунаправленные конструкции pAAV-CBh-CMVen/co3mCherry-CMV/co3EGFP, pAAV-CMV-CMVen/co3mCherry-CBh/co3EGFP, pAAV-CMV/co3mCherry-CBh-CMVen/co3EGFP и pAAV-CBh/co3mCherry-CMV-CMVen/co3EGFP продемонстрировали функциональную активность после трансфекции клеток НЕК293Т. Через 48 часов наблюдалась характерная флуоресценция, а вестерн-блот анализ подтвердил экспрессию белков co3EGFP (27 кДа) и co3mCherry (26,7 кДа). Количественная ПЦР показала, что уровень мРНК генов *co3EGFP* и *co3mCherry* был статистически выше в тех конструкциях, где соответствующие гены находились под контролем промотора CBh по сравнению с CMV-контролируемыми вариантами.

Выводы. Исследование показало сопоставимую экспрессию EGFP и mCherry в двунаправленных конструкциях по данным флуоресцентной микроскопии и вестерн-блота. При этом промотор CBh обеспечивает более высокий уровень стабильной экспрессии по сравнению с CMV.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. ПРОЕКТ № FZSM-2026-0022.

Получение гибридного белка на основе модифицированного цитокина TRAIL с металлсвязывающей последовательностью для онкотерапии.

О.А. Царькова (olga20040603@yandex.ru)¹, А.А. Исакова^{1,2}, А.В. Яголович^{1,2}, Н.В. Позднякова³

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, Москва

³НИИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Россия, Москва

Введение. Создание рекомбинантных белков для таргетной терапии онкологических заболеваний является одним из приоритетных направлений современной биотехнологии. В частности, перспективной мишенью для терапии являются рецепторы смерти цитокина TRAIL. Модифицированный цитокин TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) индуцирует гибель опухолевых клеток путем апоптоза, не затрагивая при этом здоровые клетки. Целью исследования было получение модифицированного цитокина TRAIL с металлсвязывающей последовательностью и его конъюгация с радиоактивным металлом.

Методы. Генетическая конструкция, кодирующая модифицированный цитокин TRAIL с металлсвязывающей последовательностью, была трансформирована в клетки *E. coli* штамма SHuffle B для экспрессии гибридного белка. Гибридный белок мTRAIL-МСП был очищен из растворимой клеточной фракции методами металл-аффинной и ионообменной хроматографии. Цитотоксическая активность модифицированного цитокина TRAIL с металлсвязывающей последовательностью была исследована с помощью колориметрического теста WST-8. Конъюгация с радионуклидом проводилась в физрастворе с последующей очисткой методом гель-фильтрации. Биораспределение конъюгата было изучено с помощью однофотонной эмиссионной компьютерной томографии на здоровых мышах.

Результаты. Был получен высокоочищенный рекомбинантный цитокин иTRAIL-МСП. Высокая цитотоксическая активность гибридного белка была подтверждена на опухолевых клеточных линиях человека. Визуализация биораспределения конъюгированного белка с радионуклидом в организме здоровой мыши показала накопление в легких, печени и селезенке. Конъюгат элиминировался из организма в течение 24 часов.

Выводы. Разработанный гибридный белок мTRAIL-МСП представляет собой перспективную биотехнологическую платформу для создания терапевтических препаратов на основе конъюгатов с радионуклидами. Сочетание селективной цитотоксической активности TRAIL и возможности меченая радиоактивными изотопами открывает путь к созданию агентов для одновременной диагностики (визуализации) и комбинированной терапии опухолей с гиперэкспрессией рецепторов смерти.

Полуколичественная оценка онко-ассоциированных внеклеточных нановезикул плазмы при опухолях ЖКТ с помощью колориметрического AuNP-аптасенсора

О.Е. Шемякин (olegshem@bk.ru)¹, Т.В. Шаронова¹, А.В. Малек¹

¹ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова, Научная лаборатория субклеточных технологий, Россия, Санкт-Петербург

Введение. Поздняя диагностика опухолей желудочно-кишечного тракта остаётся ключевой причиной высокой смертности. Перспективным источником неинвазивных маркеров для жидкостной биопсии являются внеклеточные нановезикулы (ВНВ), отражающие молекулярный профиль опухоли. Однако стандартные методы детекции ВНВ часто требуют сложной приборной базы или имеют ограничения по чувствительности. В работе исследован AuNP-аптасенсор, принцип работы которого основан на феномене обратимого ингибирования фермент-миметической (пероксидазоподобной) активности наночастиц золота одноцепочечными ДНК-аптамерами; ранее продемонстрирована его применимость в задачах онкологической диагностики и мониторинга [1]. **Цель** — оценить потенциал полуколичественной оценки онко-ассоциированных ВНВ плазмы для дифференциации пациентов с раком поджелудочной железы (РПЖ) и здоровых доноров.

Методы. Образцы плазмы доноров и пациентов получали на базе НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова. ВНВ выделяли из плазмы двухфазной полимерной системой. Для аптасенсинга AuNP инкубировали с ДНК-аптамером 5 мин, затем с ВНВ 30 мин; после внесения ТМВ реакцию проводили 15 мин при 37°C, останавливали H₂SO₄ и измеряли A₄₅₂. Межгрупповые различия оценивали критерием Манна–Уитни.

Результаты. AuNP-аптасенсор формировал воспроизводимый колориметрический отклик при добавлении ВНВ плазмы. Для аптамера M17 (n=22) выявлено статистически значимое увеличение нормализованной фермент миметической активности у пациентов по сравнению со здоровыми донорами (Манн–Уитни, p<0,001).

Выводы. AuNP-аптасенсор обеспечивает быструю полуколичественную оценку онко-ассоциированных ВНВ плазмы. Использование аптамера M17 позволяет дифференцировать пациентов с РПЖ и здоровых доноров (p<0,001), что указывает на перспективы применения технологии для скрининга и диагностики. Следующий шаг — расширение выборки и валидация панели аптамеров.

Исследование выполнено в рамках научной темы (шифр НКФР-2024-0014; рег. № 1023022000032-9).

Литература

1. Sharonova, T.V. (2025) Diagnostics and monitoring of colorectal cancer with AuNP-APTASENSOR, Koloproktologia. doi:10.33878/2073-7556-2025-24-4-92-105.

Анализ работы промоторов PGUT1 и РТН11, и элементов IRES вируса картофеля Y и вируса гравировки табака в *Pichia pastoris*.

Е.В. Щетинина (friz120612@gmail.com)¹, Д.С. Калинин², А.Н. Федоров², И.Э. Грановский²

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биотехнологический факультет

²Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, Москва, Россия

Введение. Экспрессионные кассеты, для одновременной продукции нескольких белков, интересны в качестве платформы для метаболической инженерии и синтетической биологии. Однако количество доступных регуляторных элементов для конструирования экспрессионных кассет в *Pichia pastoris* ограничено. Данная работа посвящена характеристике таких элементов – промоторов и участков внутренней посадки рибосомы (IRES). В качестве промоторов были выбраны PGUT1 - индуцируется глицерином и репрессируется глюкозой - и РТН11 – его дерепрессия происходит при истощении тиамина в среде культивирования. Их сила была охарактеризована относительно популярного промотора PAOX1. IRES-элементы позволяют получать полицистронные конструкции для экспрессии нескольких ОРС под контролем одного промотора и терминатора. В данной работе были исследованы IRES-элементы вируса картофеля Y (PVY) и вируса гравировки табака (TEV).

Методы. Уровень экспрессии флуоресцентных белков анализировали с использованием проточного цитометра.

Результаты. Получены генетические конструкции, содержащие под контролем промотора PAOX1, PGUT1 или РТН11 последовательно: ген зеленого флуоресцентного белка EGFP, IRES PVY или TEV и ген красного флуоресцентного белка mKate2. В качестве контроля использовались конструкции, в которых промотор перед экспрессионной кассетой был удален, а также с геном EGFP под контролем промотора PAOX1. Были получены рекомбинантные штаммы *P. pastoris* с интегрированными в хромосому экспрессионными кассетами.

Выводы. Установлено, что активность промотора PGUT1 составляла порядка 10 – 15 % от активности PAOX1. С одной стороны это способно обеспечить достаточный уровень экспрессии вспомогательных белков, а с другой – не создавать конкуренции за внутренние ресурсы клетки для целевого белка. Активность промотора РТН11 составляла порядка 20 – 35 % от активности PAOX1 и подавлялась в богатой питательной среде. IRES-элементы вирусов PVY и TEV в *P. pastoris* выступают в качестве слабых самостоятельных промоторов и не обеспечивают эффективную внутреннюю посадку рибосомы.

Влияние преднамеренных однонуклеотидных замен на функциональные характеристики гибридационных ДНК-наномашин

Д.В. Юрасова (*yurasovadv@niuitmo.ru*)¹, У.Е. Кононова¹, Д.А. Горбенко¹

¹Национальный исследовательский университет ИТМО, Россия, Санкт-Петербург

Введение. Нуклеиновые кислоты являются ключевыми маркерами вирусных инфекций, включая респираторно-синцитиальный вирус (RSV-A). Альтернативой классическим методам (qPCR, RT-qPCR), имеющим ряд ограничений, являются гибридационные каталитические ДНК-наномашин (DNM). Однако для любых гибридационных подходов в обнаружении нуклеиновых кислот сохраняется проблема баланса между чувствительностью и селективностью. В данной работе представлена шестикомпонентная ДНК-наномашин с шестью крюками для захвата флуорогенного субстрата (F-sub) и преднамеренными однонуклеотидными заменами (ОНЗ) в аналит-связывающих участках. Такая конструкция ДНК-наномашин позволила увеличить точность обнаружения RSV-A и разрешила проблему аффинности/селективности.

Методы. Геном RSV-A анализировали в NCBI для поиска уникального региона вируса. Вторичная структура РНК-мишеней была проанализирована с использованием UNAFold и NUPACK для расчета термодинамических свойств. Для определения пределов детекции (LOD) осуществляли сборку компонентов DNM (F-sub 200 нМ, DNM 20 нМ, свободное плечо 20 нМ и аналит в диапазоне концентраций 1-1000 рМ), инкубировали при 55°C на водяной бане в течение 1 и 3 часов, после чего измеряли флуоресценцию на микропланшетном ридере Spark (Tecan). На основании полученных данных строили калибровочные кривые зависимости флуоресценции от концентрации аналита. LOD определяли как точку пересечения калибровочной линии с пороговой линией.

Результаты. Разработаны 3 варианта DNM (6DNM, 6HDNM, m6HDNM). LOD данных конструкций составили 3,9 рМ и 2,3 рМ (6DNM), 0,5 рМ и 0,02 рМ (6HDNM), 0,3 рМ и 0,05 рМ (m6HDNM). Пиковая селективность разработанных конструкций составила: для 6DNM 75% при 50 пМ, для 6HDNM до 85% при 20-5 пМ, для m6HDNM до 95% при концентрациях 20-5 пМ. Значения выше 80% достигаются в диапазоне 10-100 пМ. Перекрестная реактивность с вирусом парагриппа человека 3 типа, имеющим схожие клинические проявления, не наблюдалась.

Выводы. Полученные результаты показывают, что характеристики m6HDNM по всем параметрам превосходят характеристики бинарных зондов и более ранних вариантов 6DNM и 6HDNM, а пиковое значение фактора селективности (91%) доказывает независимость m6HDNM от случайных мутаций.

Работа выполнена при поддержке гранта Государственного задания FSER-2025-0019

Влияние поли(АДФ)-рибозилирования на рост и развитие оомицета *Phytophthora infestans*

С.А. Якунина (*Sofyaya03@gmail.com*)¹, Н.А. Спеченкова¹

¹Государственный научный центр Российской Федерации Институт биологической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН), Россия, Москва

Введение. Фитофтороз, вызываемый оомицетом *Phytophthora infestans*, ежегодно обуславливает потери урожая картофеля и томатов на сумму от 3 до 10 миллиардов долларов США. Резистентность патогена к фунгицидам требует поиска новых молекулярных мишеней. Поли(АДФ)-рибозилирование – обратимая посттрансляционная модификация, регулирующая репарацию ДНК, экспрессию генов и апоптоз у эукариот. Установлено участие данного механизма в жизненных циклах фитопатогенных грибов, однако его роль у патогенных оомицетов ранее не изучалась.

Методы. Геном штамма *P. infestans* VZR ViR21a секвенировали с использованием технологии PacBio. Идентификацию генов PiPARP1, PiPARP2 и PiPARG проводили методами биоинформатического анализа. Функциональную роль генов оценивали с помощью РНК-интерференции, обрабатывая колонии оомицета специфичными дцРНК (150 нг/мл) или фармакологическим ингибитором активности PARP 3-аминобензамидом (ЗАВ, 1 мМ). Экспрессию генов оценивали методом ОТ-ПЦР, уровень поли(АДФ)-рибозилированных белков – иммуноферментным анализом. Вирулентность тестировали на листьях картофеля сорта Гала, инокулированных суспензией зооспор.

Результаты. Филогенетический анализ показал, что PiPARP2 является близким ортологом PARP2 из *A. thaliana* и *H. sapiens*, тогда как PiPARP1 содержит дубликацию доменов WGR, REG и CAT. дцРНК обеспечили 10–15-кратное снижение экспрессии соответствующих генов. Ингибирование роста колоний наблюдали только при супрессии гена PiPARP2 и обработке ЗАВ. Выявлена прямая корреляция между скоростью роста мицелия и уровнем накопления поли(АДФ)-рибозилированных белков. дцРНК против PiPARG повышала уровень модифицированных белков вследствие подавления PAR-деградации, но не влияла на рост колоний. В тесте на листьях ЗАВ в концентрациях 50 и 100 мМ полностью подавлял развитие симптомов фитофтороза.

Выводы. Впервые показано, что поли(АДФ)-рибозилирование, опосредованное преимущественно PiPARP2, является критическим регулятором роста мицелия и колонизации растения-хозяина *P. infestans*. Разработка подходов к ингибированию PARP представляется перспективным для защиты растений от фитофтороза.

Исследование выполнено при поддержке РНФ (грант № 23-74-30003).

Содержание

Секция: Биохимия.....	4
Анализ механизма полифосфат-зависимого кальциевого сигнала в фибробластах кожи ...	5
Механизмы цинк-зависимого повреждения сетчатки глаза при возрастной макулярной дегенерации	6
Исследование структуры и свойств α B-кристаллина дикого типа и его мутантной формы R163C.....	7
Свободные жирные кислоты не вызывают резистентности к инсулину в адипоцитах	8
Влияние мутации L137M на структуру и свойства α B-кристаллина	9
Кислая фосфолипаза A2 из яда каменистого щитомордника <i>Gloydius saxatilis</i> — аминокислотная последовательность и фосфолиполитическая активность	10
Получение и сравнение биохимических свойств неорганических пирофосфатаз <i>Pseudomonas aeruginosa</i> и <i>E. coli</i>	11
Влияние кислотно-основного состава буфера на эффективность лизиса и высвобождение группоспецифического антигена <i>Streptococcus pyogenes</i>	12
Направленный мутагенез как инструмент оптимизации каталитических и других биохимических свойств рекомбинантной декстраназы	13
Идентификация опухоль-специфичных антител методом молекулярного дисплея	14
MnSTARD3L из гребешка <i>Mimachlamys nobilis</i> – неспецифичный переносчик ксантофиллов	15
Применение хемотропической системы на основе оксидазы D-аминокислот (DAAO) для модуляции уровня АФК в β -клетках островков Лангерганса и оценки влияния на секрецию инсулина.....	16
Разработка многокомпонентного повехностного ДНК-зонда для точного обнаружения одонуклеотидных вариантов	17
Кальциевые осцилляции, как механизм поддержания инсулинорезистентности в сенесцентных мультипотентных стромальных клетках жировой ткани	18
Оптимизация условий получения всех фенотипов протеасом человека	19
Идентификация белкового окружения короткой изоформы SRP19	20
Разработка модели фибротических изменений для исследования биодоступности IGF в первичной культуре кардиофибробластов	21
Сравнительный анализ кинетических и иммунохимических свойств нативной и рекомбинантной ЛДГ-1 кролика и исследование экспрессии в первичной культуре из сердца крысы при гипоксии.....	22
Leu/Pro замены в гидрофобном ядре молекулы сердечного тропомиозина изменяют его физико-химические свойства	23
Разработка тест-системы для определения концентрации натрийуретического пептида В-типа в сыворотке крови крыс с гипертрофией миокарда	24
Сравнение кинетических параметров метилзависимых эндонуклеаз рестрикции для изучения специфичности к метилированным субстратам	25
Оптимизация характеристик флуороген-активирующего белка picoFAST в качестве генетически кодируемой метки.....	26
Изучение влияния секретомы мезенхимных стромальных клеток на клетки Лейдига при повреждении доксорубином.....	27

Кинетика и термодинамика 20S протеасомы в присутствии спермина.....	28
Исследование субклеточной динамики и цитотоксических эффектов гипотиоциановой кислоты.....	29
Термочувствительность ионного канала TRPV1 зависит от его клеточной локализации: роль эндоплазматического ретикулума	30
Исследование паттернов связывания ингибитора сплайсинга с белками-мишенями методом термопрофилирования	31
Биофизические и структурные свойства красного флуоресцентного белка Katushka M1_S2insVGED и его модифицированных неканоническими аминокислотами вариантов	32
Исследование механизма действия модулятора сплайсинга пре-мРНК пладиенолида Б на модели аденокарциномы яичников	33
Внеклеточные везикулы сенесцентных МСК нарушают инсулин-индуцированную ядерную транслокацию р-Akt в молодых клетках.....	34
AMPK α 2 опосредует активацию mTORC2 в клетках эндотелия в ответ на голодание по глюкозе	35
Применение генетически кодируемого флуоресцентного биосенсора для изучения динамики активных форм серы	36
Клонирование и валидация гепатоспецифичной промотор-инсулиновой кассеты для будущей AAV-опосредованной генной терапии диабета.....	37
Структурные и функциональные эффекты кардиомиопатических мутаций в гене TPM1	38
Секция: Молекулярная и клеточная биология.....	39
Оптимизация протокола экспансии TiLs для рака молочной железы.....	40
Профаг λ кодирует иммунную систему Septu, которая активируется SSB белком фага T4.....	41
Адаптации фаговых ТРНК к избеганию бактериальной иммунной системы PARIS.....	42
Регуляторная роль вышележащей открытой рамки считывания в синтезе протеоформ MCRS1	43
Влияние альтернативных изоформ фактора транскрипции RUNX3 человека на экспрессию генов-мишеней.....	44
Комбинированная терапия глиом человека онколитическим вирусом VV-GMCSF-Lact и ингибитором киназы Akt	45
Разработка CAR-T клеток с мембраносвязанным интерлейкином-2 для усиления их пролиферативной и противоопухолевой активности.....	46
Роль сиртуина-3 в регуляции гибели клеток, индуцированной альфа-токоферилсукцинатом.....	47
Исключение суперинфекции иновирусом M13 в клетках Escherichia coli.....	48
Получение мозговых органоидов из ИПСК пациентов с спиноцеребеллярной атаксией 17 типа для изучения морфологии первичной реснички	49
Роль сигнальных путей DNAM-1 и NKG2D в иммунном распознавании кардиальных производных ИПСК.....	50
Функциональная характеристика длинной некодирующей РНК CHOL	51
Роль клеточного фактора репарации 53BP1 в ранних этапах репликации ВИЧ-1.....	52
Кинетика компактизации хроматина на фоне нокаута когезина.....	53
Разработка клеточных линий для аффинной очистки и исследования деградации белков c-Fos и Rgs4 в протеасомах.....	54
Двойная стратегия фаговых киназ: перепрограммирование клеточного метаболизма и подавление антифаговой защиты	55

Транскрипционный фактор FOXM1 как фактор устойчивости аденокарциномы яичника к цисплатину	56
Динамика накопления и анализ локализации различных форм протеасом в клетках аденокарциномы прямой кишки под действием интерферона-гамма.....	57
Исследование специфичности экспрессии белка под промотором гена Vglut1 в глутаматергических нейронах.....	58
mHSP70 и AQP1 как перспективные мишени для подавления миграции клеток глиобластомы	59
Изучение активности анти-рестрикционных белков OCR и SAMase против систем фосфотиорирования ДНК Dnd и Ssp	60
Исследование эффективности каталитического расщепления 5'-флэп содержащей ДНК эндонуклеазой FEN1 и влияние белка RPA на этот процесс	61
Влияние гена UBE2A на динамику убиквитинирования гистона H2B и экспрессию генов при нейральной дифференцировке ИПСК.....	62
Роль ВТВ доменов в регуляции сумоилирования TRIM28 и их потенциал в эпигенетическом редактировании.....	63
Ингибирование ZMPSTE24 как фактор изменения NHEJ-репарации в клетках фибросаркомы	64
Влияние трансдукции мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека аденовирусными конструкциями с геном костного морфогенетического белка-2 на остеогенный потенциал внеклеточных везикул	65
Роль апоптоза в формировании секретом-опосредованной лекарственной устойчивости аденокарциномы яичников	66
Взаимодействия dCas9 с нуклеосомами, содержащими гистон H3.3: анализ методами микроскопии одиночных частиц и гель-электрофореза	67
Анализ нерепликативных белков вирусов семейства Qinviridae	68
Система BREX типа IV ассоциирована с фосфотиолированием ДНК и проявляет антифаговую активность в гетерологичной системе экспрессии.....	69
Новый аналог Верубулина – антипролиферативная активность и действие на микротрубочки цитоскелета нормальных и опухолевых клеток.....	70
Функциональные и метаболические особенности дифференцировки стромальных клеток роговицы человека	71
Характеристика взаимодействия нуклеоид-ассоциированных РНК и крестообразной ДНК с белком HU	72
Сравнение защитных свойств берберина и его производного C10Berb в модели цисплатин-индуцированного старения миобластов человека	73
Анализ аллельной экспрессии гена SIX3 на изогенных линиях культуры клеток ИПСК с делецией гена SIX2	74
Внеклеточные везикулы макрофагов как фактор иммуномодуляции при инфекции Mycobacterium abscessus	75
Функциональная роль микроРНК внеклеточных везикул трематод Opisthorchis felineus в регуляции генов клеточного цикла человека	76
Эпигенетическое редактирование моноаллельных генов на модельной системе HEK293 ..	77
Индуктор белков теплового шока подавляет остеогенную дифференцировку мезенхимных стволовых клеток человека.....	78
Секция: Физиология и медицинская биохимия.....	79
Хемогенетическая модель болезни Паркинсона	80

Исследование форм секреции опухоль-ассоциированных микроРНК трансформированными клетками.....	81
Роль стресс-гранул в адаптации мышинных эмбрионов к условиям <i>in vitro</i> культивирования.....	82
Регионарные особенности сосудосуживающего влияния продуцируемых разными изоформами NADPH-оксидаз активных форм кислорода.....	83
Взаимосвязь НАД и ТДФ с гликемией в модели стрептозотоцин-индуцированного диабета у крыс.....	84
Анализ иммунологического и метаболомного профиля у пациентов с сепсисом	85
Влияние произвольной беговой тренировки на транскриптомные и функциональные изменения артерий головного мозга при стенозе сонных артерий у крыс	86
Слепая кишка как источник TNF в модели острой гепатотоксичности у мышей	87
Роль L-DOPA и рецептора GPR143 в регуляции ангиогенеза в овариальном фолликуле на модели синдрома поликистозных яичников	88
Изменение количества активных зон выделения дофамина в волокнах дофаминергических нейронов при моделировании болезни Паркинсона <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	89
Динамика экспрессии генов в локомоторной и дыхательной скелетных мышцах мышей после месячного космического полета	90
Передача сигнала через TNFR1 на стромальных клетках необходима для патогенеза летальной гепатотоксичности у мышей	91
Эффективность трансдуцированных обкладочных клеток обонятельной выстилки, экспрессирующих нейротрофические факторы, в экспериментальной терапии болезни Альцгеймера.....	92
Альтерации β -адренергической регуляции предсердий у мышей с моделью острого воспаления	93
Влияние транскрипционного фактора TBX5 на клеточную организацию и синхронизацию Ca^{2+} -транзитов в культурах неонатальных кардиомиоцитов крысы	94
Хроническое воздействие аторвастатина сопровождается снижением сосудосуживающего влияния продуцируемых NADPH-оксидазами активных форм кислорода в артериях разных органов мыши.....	95
Эффекты периодической нормобарической гипоксии у самцов и самок крыс Wistar разного возраста: поведенческие и биохимические аспекты	96
Выживаемость, миграция и способность к дифференцировке нейральных стволовых/прогениторных клеток обонятельной выстилки при экспериментальной болезни Альцгеймера.....	97
Изучение абсорбции и биодоступности пролекарственных конъюгатов пиридоксина и кеторалака	98
Эндоканнабиноидная система является мишенью действия аторвастатина в моторных синапсах мыши	99
Оптимальные референсные гены для ОТ-ПЦР в мозге крыс разных возрастных групп в депрессивно-подобном состоянии.....	100
Мембранный холестерин как ключевой фактор, стабилизирующий нервно-мышечную активность.....	101
Характеристика антиоксидантных свойств растительного метаболита пиридоксина.....	102
Влияние индукции овуляции хорионическим гонадотропином человека на гормональный статус и экспрессию овариальных генов у самок крыс с дегидроэпиандростерон-индуцированным синдромом поликистозных яичников	103

Влияние сверхэкспрессии изоформ фосфатазы STEP в стриатуме мышей с нокаутом гена Ptpn5 на поведение и метаболизм биогенных аминов в мозге	104
Секция: Биотехнология	105
Получение и очистка анти-CD3 DARPin в E.coli для сайт-специфического декорирования липидных наночастиц и селективной доставки мРНК-CAR в человеческие CD3 ⁺ T-клетки	106
Наночастицы CaP повышают эффективность дцРНК для подавления роста и токсинообразования у <i>Fusarium graminearum</i>	107
Конструирование и характеристика липосомальных адъювантов на основе рекомбинантного аллергена Art v 3.....	108
Плазмидный вектор с промоторами гена EEF1A1 китайского хомячка и цитомегаловируса обеспечивает корректный относительный уровень биосинтеза тяжелых и легких цепей афукозилированного мкАт бенрализумаб	109
Повышение эффективности продукции вирусоподобных частиц NanoMEDIC для доставки рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas путем нокаута FKBP12 в клетках-продуцентах HEK293T	110
Фоторасщепляемые циклические направляющие РНК для регулируемой светом системы CRISPR/Cas9	111
Метод быстрого скрининга для обнаружения событий редактирования генома в культурах клеток.....	112
Влияние эрадикационной терапии <i>H. pylori</i> на динамику резиста кишечника	113
Мультимодальная визуализация опухолевых клеток с помощью новых генетически кодируемых репортерных систем	114
Создание лентивирусных векторов с модифицированной поверхностью для трансдукции Т-лимфоцитов	115
Роль альбумин-связывающего домена в циркуляции и таргетной доставке HER2-специфичных липосом	116
Снижение фоновой активности оптогенетической системы BphP1-QPAS1 при белом освещении в растениях	117
Разработка, аналитическая и клиническая валидация ПЦР-тест-системы на основе аллельной дискриминации TaqMap для генотипирования мутаций MYBPC3:p.R820W(R818W) и MYH7:p.E1883K, ассоциированных с гипертрофической кардиомиопатией <i>Felis catus</i>	118
Новый рекомбинантный антиген вируса болезни Ньюкасла - иммунохимические свойства и протективность	119
Влияние микроструктурированных пленок из поли-3-оксипропионата с инкапсулированными статинами на морфологию клеточной линии SH-SY5Y.....	120
Анализ эффективности генной экспрессии в двунаправленных векторных системах при использовании различных промоторов.....	121
Получение гибридного белка на основе модифицированного цитокина TRAIL с металлсвязывающей последовательностью для онкотераностики	122
Полуколичественная оценка онко-ассоциированных внеклеточных нановезикул плазмы при опухолях ЖКТ с помощью колориметрического AuNP-аптасенсора	123
Анализ работы промоторов PGUT1 и PTH11, и элементов IRES вируса картофеля Y и вируса гравировки табака в <i>Pichia pastoris</i>	124
Влияние преднамеренных однонуклеотидных замен на функциональные характеристики гибридизационных ДНК-наномашин	125

Влияние поли(АДФ)-рибозилирования на рост и развитие оомицета <i>Phytophthora infestans</i>	126
---	-----