



DATA DEPENDENT (DDA) И DATA INDEPENDENT ACQUISITION (DIA)  
СКОРОСТРЕЛЬНАЯ ПРОТЕОМИКА КАК КОМПЛИМЕНТАРНЫЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ  
СРАВНЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ОСТЕОГЕННОЙ  
ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ОСТЕОБЛАСТОВ И ИНТЕРСТИЦИАЛЬНЫХ КЛЕТОК  
АОРТАЛЬНОГО КЛАПАНА ЧЕЛОВЕКА

**Тараскин И.А., Хижина А.А., Постникова К.Н., Зайнуллина Б.Р.,  
Малашичева А.Б., Лобов А.А.**

ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

*taraskin.ia@phystech.edu*

Скорострельная протеомика – один из ключевых «омиксных» методов, методология которого быстро развивается. В классической data dependent acquisition (DDA) протеомике используется тандемная масс-спектрометрия с конкурентным выбором наиболее обильных ионов, что приводит к потере большого количества данных. Для решения этой проблемы были разработаны различные подходы, среди которых data independent acquisition (DIA) протеомика. В этом случае происходит систематическая изоляция и фрагментация целых фрагментов спектра, вместо отдельных ионов. Это позволяет сохранять информацию обо всех ионах, но приводит к сложно-интерпретируемым спектрам. Масс-спектрометры серии TimsToF (Bruker) с ионной подвижностью — это одна из технологических платформ, на которой возможна реализация этих двух подходов. Однако опубликованы лишь единичные сравнения эффективности DDA и DIA протеомики на базе TimsToF, проведенные главным образом на тестовых образцах.

Цель работы – сравнительный протеомный анализ реальных биологических образцов при помощи DDA и DIA подходов на масс-спектрометре TimsToF Pro. В качестве биологической задачи было выбрано сравнение молекулярных механизмов нормальной (остеобласты) и патологической (интерстициальные клетки аортального клапана, ИКК) остеогенной дифференцировки *in vitro* (n = 5). После выделения первичных культур, клетки культивировали в стандартных и остеоиндуктивных условиях, затем проводили выделение белка и стандартную переподготовку для скорострельной протеомики.

DIA подход позволяет получить более высокое покрытие протеома. Количество идентифицированных белковых групп составляет 5436 для DDA и 7883 для DIA. Эта разница сохраняется и после фильтрации данных: для дальнейшего анализа было использовано 3239 белковых групп для DDA и 4439 для DIA подхода. Примечательно, что только 40% всех обнаруженных белков были идентифицированы обоими методами.

Кластеризация изученных образцов на основе протеомных данных демонстрирует аналогичный паттерн. Мы видим четыре четких кластера, соответствующих исходным биологическим группам в обоих случаях. В то же время мы выявили значительные различия в дифференциально экспрессируемых белках между контрольными и дифференцированными клетками, обнаруженными разными подходами.

Таким образом, оба метода позволяют выявить белки, ассоциированные с изучаемыми нами биологическими процессам, однако, эти подходы скорее комплиментарные, а не взаимозаменяемы.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ № 18-14-00152-П.



В результате наибольшую цитотоксичность одновременно во всех трех линиях показали антисенсы на гены RPL13 и PSMC3. Жизнедеятельность клеток подавлялась на 40-70%, окислительный стресс повышался на 21-28% (в зависимости от клеточной линии).

#### Литература.

1. Farooqi A.A., ur Rehman Z., Muntane J. Antisense therapeutics in oncology: current status //OncoTargets and therapy. – 2014. – Т. 7. – С. 2035.
2. Dhuri K. et al. Antisense oligonucleotides: an emerging area in drug discovery and development //Journal of clinical medicine. – 2020. – Т. 9. – №. 6. – С. 2004.
3. Nedorezova D.D. et al. Deoxyribozyme-Based DNA Machines for Cancer Therapy //ChemBioChem. – 2020. – Т. 21. – №. 5. – С. 607-611.
4. Sciabola S. et al. PFRED: A computational platform for siRNA and antisense oligonucleotides design //PloS one. – 2021. – Т. 16. – №. 1. – С. e0238753.

### СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ СЕКРЕТОМОВ ШЕСТИ ТИПОВ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

**Лобов А.А.<sup>1</sup>, Хижина А.А.<sup>1</sup>, Клаузен П.Е.<sup>1</sup>, Котова А.В.<sup>1</sup>, Зайнуллина Б.Р.<sup>2</sup>,  
Енукашвили Н.И.<sup>1</sup>, Малашичева А.Б.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*arseniylobov@gmail.com*

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) имеют широкий терапевтический потенциал, который, прежде всего, связан с их биологически активным секретомом. Известно, что секретом МСК может способствовать регенерации тканей, снижать воспалительные реакции, индуцировать пролиферацию клеток и т.п. Более того, уже проводятся десятки клинических исследований по использованию секретомов МСК в терапии.

Состав и терапевтические свойства секретомов различаются в зависимости от источника для выделения и условий культивирования МСК. Тем не менее, существует лишь несколько работ по сравнительному анализу секретомов МСК из разных тканевых источников в одних условиях культивирования. На это накладываются и различные способы модификации секретомом МСК при помощи различных воздействий, например культивирования в условиях гипоксии. Перспективным представляется использование секретомом МСК на различных стадиях дифференцировки, однако, как и в случае сравнения разных типов МСК, в литературе нет систематических сравнений изменения состава секретомом различных МСК под действием дифференцировочных стимулов.

В рамках данной работы мы провели описание секретомом шести типов МСК в стандартных условиях культивирования и после индукции остеогенной дифференцировки. Для этого использовали первичные культуры МСК жировой ткани, МСК пульпы зуба, МСК связки зуба, МСК желе Уортона, остеобластов и гингивальных фибробластов. Для получения секретомом клетки культивировали в среде без сыворотки в течение 48 часов с последующим



выделением белка из кондиционированной среды и его скорострельным протеомным анализом.

На кластеризации по полученным протеомным данным, можно выделить четыре кластера, соответствующих (1) остеобластам, (2) МСК жировой ткани, (3) МСК желе Уортона и (4) мезенхимным клеткам зуба (МСК пульпы и связки зуба и гингивальные фибробласты). В ходе остеогенной дифференцировки состав секрета всех изученных клеток претерпевает значительные изменения, однако они сохраняют этот же паттерн кластеризации, что свидетельствует о тканеспецифичности секретомов МСК. Эта тканеспецифичность сохраняется и после дифференцировки.

Таким образом, мы описали разнообразие секретомов первичных культур МСК, что открывает возможности для подбора секрета с оптимальными биологическими свойствами для решения конкретных биомедицинских задач.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ номер 19-29-04082.

## ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ВЫРАБОТКИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К СПАРСОМИЦИНУ В ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ

**Логунов С.Е.<sup>1,2</sup>, Марьясина С.С.<sup>1</sup>, Донцова О.А.<sup>1</sup>, Сергиев П.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева  
*stepa.2003@bk.ru*

Спарсомицин – антибиотик бактериального происхождения, имеющий широкое применение как в медицине, так и в биотехнологии. Механизм его действия изучается очень активно, но до конца все подробности до сих пор не известны. Так, установлено, что основным местом связывания антибиотика с рибосомой является А-сайт пептидил-трансферазного центра [1]. Установлено, что спарсомицин связывается с А-сайтом пептидил-трансферазного центра и его связывание приводит к «замораживанию» пептидил-тРНК в Р-сайте. Спарсомицин способен ингибировать рост не только эукариотических клеток, но также и архей. Несколько работ по изучению возникновения устойчивости клеток к спарсомицину было выполнено на археях. Так, именно на археях было показано, что одним из вариантов возникновения устойчивости к спарсомицину является выключение метилирования одной из позиций в рРНК [2]. Также есть данные о том, что некоторые мутации в рРНК приводят к возникновению устойчивости к этому антибиотику [3].

В настоящей работе проведен эксперимент по идентификации других вариантов возникновения резистентности эукариотических клеток к спарсомицину. Для этого проведен CRISPR-скрининг на клетках линии Nap1. С помощью библиотеки лентивирусов Brunello [4], содержащей уникальные гидовые РНК, нацеленные на 19114 человеческих генов, получена библиотека нокаутов Nap1, содержащая клетки, несущие не менее 22523 различных гидовых РНК. Отбор на спарсомицине позволил вывести устойчивые к нему линии клеток. Методами высокопроизводительного секвенирования установлено, что среди отобранных клеток преобладают те, в которых имеются гидовые РНК, нацеленные на гены, отвечающие за



мутантными вариантами этой области. Мы удалили у мутантов сайты связывания инсульторных белков, сайт связывания p53 в различных комбинациях, а также изменили ориентацию всей области. Мы проводим облучение полученных линий дрозофилы на эмбриональной стадии развития, и с помощью метода FISH изучаем влияние этих замен на формирование контактов p53RE – *Xrp1* в пространстве ядер с помощью конфокальной микроскопии. Во-вторых, ген *Xrp1* был разделен на шесть частей, с целью найти область, ответственную за формирование контакта с p53RE. Каждый из этих фрагментов был помещен в репортерную конструкцию с геном GFP, а затем интегрирован в различные сайты генома. У полученных линий мы проверяем активацию репортера при облучении для проверки позиционных и ориентационных эффектов изучаемого взаимодействия.

Таким образом, наше исследование позволит выявить последовательности ДНК и белковые факторы, которые необходимы для формирования дальних взаимодействий энхансером p53RE 75C6.

Эта работа была поддержана грантом Российского научного фонда 20-14-00201.

## ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ NOTCH И ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА RUNX2

**Паншин Д.Д., Лобов А.А., Малашичева А.Б.**

ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

*dany.panshin@yandex.ru*

Внутриклеточный домен NOTCH и транскрипционный фактор RUNX2 – важные и консервативные регуляторы клеточной судьбы. Сигнальный путь Notch регулирует широкий спектр клеточных процессов в организме, играя важную роль в процессах эмбрионального развития и поддержании тканевого гомеостаза. Различные нарушения его регуляции влекут за собой аномалии развития и появление целого ряда заболеваний, в том числе рака. Основная роль транскрипционного фактора RUNX2 заключается в регуляции развития остеобластов и формировании костей в организме. В то же время, гиперэкспрессия RUNX2 характерна для метастатических раковых заболеваний и, по-видимому, его роль шире, чем контроль остеогенной дифференцировки.

Процессы, регулируемые сигнальным путем Notch и RUNX2, в значительной степени перекрываются, однако ранее не было показано прямой взаимосвязи этих сигнальных путей. Чтобы это проверить мы оценили эффект гиперэкспрессии RUNX2 и внутриклеточного домена NOTCH на экспрессию генов, связанных с этими сигнальными каскадами.

Для активации сигнального пути Notch и RUNX2 мы провели трансфекцию клеток HeLa плазмидами, несущими полноразмерный транскрипт RUNX2 и последовательность, соответствующую внутриклеточному домену NOTCH1 (N1ICD), после чего выделили РНК, и оценили уровень экспрессии RUNX2 и NOTCH, а также их генов-мишеней, при помощи ПЦР в реальном времени. Параллельно, из этих же образцов был выделен белок и проведён скорострельный протеомный анализ.



Активация RUNX2 в клетках HeLa приводила к увеличению экспрессии компонентов сигнального пути Notch (NOTCH1 и NOTCH2), а также гена-мишени Notch (HES1), что свидетельствует об активации этого сигнального пути при гиперэкспрессии RUNX2. Аналогичные данные были получены и в результате протемного анализа. Нам удалось идентифицировать белки, соответствующие 4053 генам, 3471 из которых были включены для статистического анализа. RUNX2 был детектирован во всех экспериментальных образцах, при трансфекции конструкциями с NICD и RUNX2, но не в контрольных клетках HeLa. Примечательно, что уровень RUNX2 в клетках трансфицированных обеими плазмидами, был достоверно ниже, чем уровень при трансфекции только конструкцией RUNX2. Можно предположить, что NICD активирует экспрессию RUNX2, но в то же время не дает ей подниматься выше определенного уровня.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ номер 18-14-00152-П.

## НОКАУТ ПО ГЕНУ *PTEN* ПРИВОДИТ К ЗАПУСКУ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОГО СТАРЕНИЯ В ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

**Парфенова П.С.<sup>1,2</sup>, Дерябин П.И.<sup>1</sup>, Шатрова А.Н.<sup>3</sup>, Бородкина А.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Группа механизмов клеточного старения, ФГБУН Институт цитологии РАН,  
Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>3</sup>Лаборатория динамики внутриклеточных мембран, ФГБУН Институт цитологии РАН,  
Санкт-Петербург, Россия

*sucrederaisin@gmail.com*

На сегодняшний день взаимосвязь клеточного старения и организма считается почти аксиомой современной биологии развития. А накопление старых клеток сопровождается развитием целого ряда возраст-ассоциированных патологических изменений. Помимо репликативного старения, связанного с укорочением теломер, сегодня выделяют другие типы клеточного старения, вызванные стрессовыми факторами (тепловой шок, оксидативный стресс и др.), накоплением онкогенов, потерей онкосупрессоров, а в случае раковых клеток – это старение, вызванное радио- и химиотерапией.

В настоящий момент известно, что мутация в гене *PTEN*, онкосупрессоре, может приводить к развитию уникального типа клеточного старения – *PTEN*-loss-induced senescence (PICS). Вместе с тем, его мутация или полная делеция обнаруживается в ряде раковых образований тканей мозга, легких, простаты и эндометрия. При этом в эндометрии в порядка 40% случаев развития гиперплазии и аденокарциномы *PTEN* оказывается мутирован, однако работы, в которых исследовался бы характер поведения нормальной здоровой ткани при делеции этого гена, практически отсутствуют. В связи с этим цель настоящего исследования заключается в характеристике эндометриальных стромальных клеток человека (эСК) с нокаутом по *PTEN*.

В данной работе эСК (линия 2804) были модифицированы с помощью лентивирусной CRISPR/Cas9 системы. Для корректного наведения эндонуклеазы Cas9 и нокаута гена *PTEN*



были подобраны три варианта смысловых гидРНК, комплементарных последовательностям первого экзона гена *PTEN*. Несмысловая гидРНК была использована в качестве контроля. ГидРНК были клонированы в модифицированную версию лентивектора lentiCRISPRv2. Выбор оптимальной гидРНК для нокаута гена *PTEN* был осуществлен при помощи методов PCR и Western Blotting.

Клетки с нокаутом по *PTEN* характеризовались остановкой пролиферации, увеличением размера и автофлуоресценции, активацией p53/p21/Rb и АКТ/mTOR сигнальных каскадов, усилением окрашивания на SA-b-Gal. Кроме того, в таких клетках выявлялось накопление активных форм кислорода и падение мембранного потенциала митохондрий, отражающие нарушение работы митохондрий. Совокупность полученных результатов свидетельствует об индукции преждевременного старения в ЭСК при нокауте *PTEN*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 19-74-10038).

## ИЗУЧЕНИЕ ОСТЕОИНДУКТИВНЫХ СВОЙСТВ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК В МОДЕЛИ СОКУЛЬТИВИРОВАНИЯ С ОСТЕОБЛАСТАМИ

**Переплетчикова Д.А.<sup>1</sup>, Костина Д.А.<sup>1</sup>, Карелкин В.В.<sup>2</sup>, Лобов А.А.<sup>1</sup>, Малашичева А.Б.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup>ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Р.Р. Вредена Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

*dasha\_perepletch@mail.ru*

Все мезенхимные стволовые клетки (МСК) способны дифференцироваться в адипо-, хондро- и остеогенном направлениях *in vitro*. В то же время, механизмы индукции и протекания дифференцировки МСК *in vivo* все еще фрагментарно изучены. Так, известно, что эндотелий способен индуцировать остеогенную дифференцировку МСК, а взаимодействие эндотелия и мезенхимных клеток является центральным в остеогенезе. Однако комплексной картины о молекулярных механизмах остеоиндукции при взаимодействии эндотелиальных клеток и МСК до сих пор нет.

Цель данной работы состоит в изучении молекулярных механизмов, влияющих на процессы дифференцировки МСК, обусловленных остеоиндуктивным эффектом эндотелиальных клеток. Была разработана система сокультивирования в условиях непосредственного контакта двух типов клеток: первичной культуры остеобластов и эндотелиальных клеток пупочного канатика. Методом ПЦР в реальном времени, мы оценивали изменения уровней экспрессии генов, вовлеченных в остеогенную дифференцировку, (1) в смешанной культуре остеобластов и эндотелиальных клеток, (2) в контрольных монокультурах остеобластов и эндотелия и (3) в культуре остеобластов и эндотелиальных клеток, разделенных после сокультивирования при помощи магнитного сортирования по эндотелиальному маркеру CD31. Эффективность сортировки оценивали с помощью анализа экспрессии маркера CD31. Отсортированные эндотелиальные клетки экспрессируют CD31, в отличие от отсортированных остеобластов и образцов смешанной культуры без сортирования, где уровень экспрессии CD31 значительно ниже. Это свидетельствует о высокой эффективности сортирования.



По результатам анализа экспрессии генов, вовлеченных в остеогенную дифференцировку, были выявлены значительные различия между контрольными культурами клеток и клетками в сокультивировании. В первую очередь в ко-культурах мы обнаружили повышение экспрессии компонентов и мишеней сигнального пути Notch: HEY1, DLL4, JAG. Также при сокультивировании происходит повышение экспрессии маркеров остеогенной дифференцировки (ACTA2 и RUNX2) и генов, связанных с эндотелиально-мезенхимным переходом (SNAIL и SLUG).

Таким образом, эндотелиальные клетки непосредственно влияют на процессы остеогенной дифференцировки МСК, а остеоиндуктивный эффект связан с активацией сигнального пути Notch. Для подтверждения этого мы планируем дополнить полученные данные экспериментами с сокультивированием клеток в бесконтактных условиях.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-74-10077.

## ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ RAPD-МАРКЕРОВ ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ *QUERCUS ROBUR* L. И *PINUS SYLVESTRIS* L.

**Петюренко М.Ю., Ржевский С.Г.**

ФГБУ Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии, Воронеж, Россия

*slavaosin@yandex.ru*

Различные методы генетической паспортизации и идентификации растений находят широкое применение в современном лесном хозяйстве, одним из них является проведение полимеразной цепной реакции со случайными RAPD-праймерами. Этот анализ позволяет оценивать полиморфизм ДНК с использованием одиночных коротких праймеров произвольной нуклеотидной последовательности.

В данной работе представлен результат использования RAPD-маркеров с целью анализа генетического полиморфизма для деревьев внутри видов *Pinus sylvestris* L. и *Quercus robur* L.

Для работы использовался материал, отобранный у дуба черешчатого 40-летнего возраста, произрастающего на лесосеменной плантации в Семилукском лесопитомнике Воронежской области, а также у лесных культур сосны обыкновенной, произрастающей в Кантемировском районе Воронежской области. Выделение ДНК из хвои производилось с использованием набора diaGene (Диаэм), а из вегетативных тканей дуба с применением СТАВ-метода. Для проведения ПЦР-реакции использовался следующий набор RAPD-маркеров: UBC-157, UBC-180, UBC-99, UBC-457, UBC-459, UBC-515. Условия амплификации и последовательности RAPD-маркеров были взяты из литературных данных. Электрофорез продуктов ПЦР проводился в 2,5% агарозном геле.

Все использованные RAPD-маркеры продемонстрировали наличие продуктов амплификации у обоих видов. Для сосны обыкновенной мономорфными оказались маркеры UBC-457 и UBC-515, для дуба все RAPD-маркеры проявили полиморфизм. Также ранее данный набор праймеров был использован для генотипирования различных представителей рода *Populus*, в том числе искусственно созданных сортов и гибридов, при этом все локусы оказались полиморфными.



## АКТИВАЦИЯ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ NOTCH В ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИВОДИТ К УВЕЛИЧЕНИЮ N-КОНЦЕВОГО АЦЕТИЛИРОВАНИЯ ГИСТОНА 1

**Репкин Е.А.<sup>1</sup>, Переплетчикова Д.А.<sup>1</sup>, Костина Д.А.<sup>1</sup>, Зайнуллина Б.Р.<sup>2</sup>,  
Малашичева А.Б.<sup>1</sup>, Лобов А.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*erepkin53@gmail.com*

Эндотелий способен воспринимать целый комплекс стимулов из кровотока и не только менять свою физиологию в ответ на эти стимулы, но и инструктировать подлежащие ткани к определенным физиологическим реакциям. Напряжение сдвига – это один из важных факторов, оказывающих значительное влияние на эндотелий и способный провоцировать различные патологии, например, приводить к эктопической кальцификации сердечно-сосудистой системы.

Сигнальный путь Notch связан как с напряжением сдвига, так и с кальцификацией сердечно-сосудистой системы. Из-за того, что передача сигнала Notch осуществляется за счет непосредственного контакта рецептора и лиганда на поверхности соседних клеток, этот сигналинг чувствителен к механическому напряжению. Можно предложить, что длительное воздействие напряжения сдвига приводит к дисрегуляции этого сигнального пути и изменениям в свойствах эндотелиальных клеток. Такие длительные воздействия часто ассоциированы с изменениями в эпигенетическом профиле.

Мы провели анализ изменений гистоновых кодов (анализ пост-трансляционных модификаций гистонов) эндотелиальных клеток в ответ на активацию сигнального пути Notch. Для этого проводили лентивирусную трансдукцию эндотелиальных клеток пупочного канатика человека конструкцией для оверэкспрессии внутриклеточного домена NOTCH1. Затем, проводили выделение гистонов из контрольных клеток и клеток с активированным Notch-сигналингом и их анализ при помощи скорострельной протеомики.

Среди модифицированных пептидов гистонов пептиды, ацетилированные на N-конце белка, имели сравнительно высокое обилие. Всего для статистического анализа было использовано 162 N-ацетилированных пептида, 21 из которых статистически значимо менял уровень экспрессии при активации сигнального пути Notch. 9 из них принадлежали подтипам гистона 1: H1-5, H1-3, H1-0, H1-4, H1-10. Для всех них было обнаружено увеличение количества N-ацетилированных пептидов при активации сигнального пути Notch. Гистон 1 изучен меньше других гистонов, однако известно, что его N-концевое ацетилирование может быть связано с эпигенетической регуляцией экспрессии.

Таким образом, активация сигнального пути Notch в эндотелиальных клетках приводит к изменениям их эпигенетического профиля.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 20-74-10077.



## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ УЧАСТИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА RUNX2 В РЕГУЛЯЦИИ ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

**Смирнова Д.В.<sup>1,2</sup>, Костина Д.А.<sup>1</sup>, Лобов А.А.<sup>1</sup>, Карелкин В.В.<sup>3</sup>, Малашичева А.Б.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО Национальный исследовательский институт ИТМО, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>3</sup>ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии  
имени Р.Р. Вредена Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

*d\_snirnova@scamt-itmo.ru*

Runx2 является ключевым регулятором остеогенной дифференцировки как при нормальной кальцификации и дифференцировке остеобластов, так и при патологической кальцификации, в частности, сосудов и клапанов сердца. Runx2 имеет множество генов-мишеней, а его экспрессия в свою очередь зависит от активности других сигнальных путей. Runx2 является звеном многих сигнальных каскадов, таких как Wnt, Notch, Sox9, Msx2, и сигнальный путь Hedgehog (Rutkovskiy, Stensl kken, и Vaage 2016).

Особый интерес вызывает взаимодействие сигнальных путей Runx2 и Notch. Молекулярные механизмы взаимовлияния сигнального пути Notch на Runx2 и механизмы его взаимодействия с другими сигнальными каскадами неизвестны. Runx2, по-видимому, не является прямой мишенью сигнального пути Notch, как это описано в ранних работах по изучению взаимодействия Notch и Runx2 (Garg et al., 2005), и в литературе практически не описано механизмов, за счет которых сигнальный путь Notch может регулировать его экспрессию (Hilton et al., 2008; Engin et al., 2008). В то же время известно, что как Runx2, так и сигнальный путь Notch влияют на остеогенную дифференцировку клеток. Остается неясным какую роль играет взаимодействие Runx2 и Notch в процессах минерализации и остеогенной дифференцировки клеток и может ли Runx2 влиять на активность сигнального пути Notch.

Целью работы являлось выяснить повлияют ли изменения в уровне продукции клетками Runx2 на активность сигнального пути Notch и будет ли этот эффект зависеть от типа клеток и условий культивирования. С помощью лентивирусной трансдукции мы активировали либо подавляли продукцию Runx2 в первичных клетках остеобластов человека, для которых свойственна экспрессия Runx2 и в эндотелиальных клетках пуповинной вены человека, которые в норме не экспрессируют Runx2. Влияние Runx2 на сигнальный путь Notch оценивали методом ПЦР в реальном времени по уровню экспрессии генов-компоненты сигнального пути Notch.

По результатам исследования было показано, что при повышении остеобластами продукции Runx2 происходит стимуляция их остеогенных свойств, а также повышается уровень транскрипции *HEY1*, прямой мишени сигнального пути Notch, в то время как в эндотелиальных клетках мы наблюдали снижение активности сигнального пути Notch в ответ на активацию продукции Runx2. Таким образом, мы показали, что Runx2 способен модулировать активность сигнального пути Notch.

Исследование выполняется при финансовой поддержке РФФ, проект № 18-14-00152п.



## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МЕЗЕНХИМНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

**Басович Л.С.<sup>1</sup>, Костина Д.А.<sup>2</sup>, Карелкин В.В.<sup>3</sup>, Успенский В.Е.<sup>4</sup>, Малашичева А.Б.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup>ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>3</sup>ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Р.Р. Вредена Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>4</sup>ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

*miloverova@yandex.ru*

Остеогенная дифференцировка клеток является основой образования костной ткани. В то же время патологическая остеогенная дифференцировка может приводить к патологиям сердечно-сосудистой системы таким, как, например, кальцинированный стеноз аортального клапана. Вопрос о том, почему возникают очаги патологической остеогенной дифференцировки, остается открытым, а механизмы инициации такой дифференцировки слабо понятными. Задачей данной работы было сравнить остеогенную дифференцировку нормальных остеобластов человека и интерстициальных клеток аортального клапана пациентов с аортальным стенозом.

Первичные культуры остеобластов человека получали из фрагмента бедренной кости пациентов, проходящих операционное лечение в НИИТО им. Вредена; первичные культуры интерстициальных клеток аортального клапана получали из фрагментов аортального клапана пациентов с кальцинирующим аортальным стенозом НМИЦ им. В.А. Алмазова. Клетки культивировали 3-5 пассажей и индуцировали остеогенную дифференцировку при помощи добавления в среду классического коктейля остеогенных факторов – дексаметазона, глицерофосфата кальция и аскорбиновой кислоты. На 7 сутки из клеток, в которых была индуцирована остеогенная дифференцировка, и из контрольных выделяли РНК для последующего анализа методом количественной ПЦР. По истечении 21 дня культуры тех же клеток окрашивали ализариновым красным для выявления центров связывания красителя с кристаллами фосфата кальция и оценки эффективности остеогенной дифференцировки.

Анализ экспрессии генов RUNX2, OPN и COL1A методом количественной ПЦР выявил значительно большее содержание проosteогенного гена RUNX2 в остеобластах по сравнению с интерстициальными клетками. При индукции дифференцировки содержание гена RUNX2 значительно увеличивалось и в остеобластах, и в интерстициальных клетках аортального клапана по сравнению с уровнем этого гена в недифференцированных клетках; уровень генов OPN и COL1A незначительно возрастал в обоих типах клеток при индукции остеогенной дифференцировки.

По уровню окраски ализарином после остеогенной дифференцировки остеобласты почти не отличались от интерстициальных клеток аортального клапана.

Мы полагаем, что уровень гена RUNX2 может определять ключевые тканеспецифические различия в клетках в норме и при патологии.

Исследование выполняется при финансовой поддержке гранта РФФИ, № 18-14-00152п



## КРЕНИГАЦЕСТАТ (LY3039478) КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ИНГИБИТОР КАЛЬЦИФИКАЦИИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

**Качанова О.С.<sup>1</sup>, Лобов А.А.<sup>1</sup>, Боярская Н.В.<sup>1</sup>, Шишкова А.А.<sup>1</sup>, Зайнуллина Б.Р.<sup>2</sup>,  
Пичугин А.А.<sup>1</sup>, Филиппов А.А.<sup>1</sup>, Успенский В.Е.<sup>1</sup>, Малашичева А.Б.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова Минздрава  
России, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*kachanovaos15@gmail.com*

Кальцификация сердечно-сосудистой системы – это распространенное нарушение, которое может быть как осложнением различных заболеваний, так и самостоятельной патологией. Среди отдельных форм этой патологии можно выделить кальцинирующую болезнь аортального клапана (КБАК). Несмотря на высокую смертность, хирургическая замена кальцинированного клапана все еще является единственным существующим вариантом лечения КБАК.

Остеогенная дифференцировка интерстициальных клеток клапана (ИКК) является одним из ключевых факторов развития КБАК. Ранее была показана роль сигнального пути Notch как в развитии КБАК, так и в остеогенной дифференцировке ИКК. Ингибирование передачи сигналов Notch в ИКК может рассматриваться как перспективный подход для лечения КБАК.

Цель данной работы – тестирование ингибиторов сигнального пути Notch для подавления остеогенной дифференцировки первичных культур ИКК, полученных от пациентов с КБАК.

После выделения ИКК из операционного материала пациентов с КБАК мы индуцировали их к остеогенной дифференцировке без или с добавлением селективных ингибиторов Notch, СВ-103 или кренигацестата. Эффективность дифференцировки оценивали по уровню кальцификации (окрашивание Ализарином красным) и ПЦР в реальном времени (оценка уровня экспрессии маркеров остеогенной дифференцировки). Изучение физиологического эффекта ингибиторов остеогенной дифференцировки проводили при помощи скорострельной протеомики с ионной подвижностью на платформе TimsToF Pro. Ингибитор СВ-103 не оказывает значимого ингибирующего воздействия на остеодифференцировку, в то время как кренигацестат полностью подавляет остеогенную дифференцировку ИКК и не демонстрирует очевидной цитотоксичности. При помощи протеомного анализа мы выявили потенциальные мишени кренигацестата. Нами было выявлено изменение экспрессии белков, ассоциированных с развитием скелета, например, фибриллина 1, и белков, ассоциированных с сердечно-сосудистыми заболеваниями, например, LMOD1. Однако функция большинства из обнаруженных белков не была описана в контексте КБАК ранее, что свидетельствует о недостаточном понимании механизма действия кренигацестата и фундаментальных механизмов остеогенной дифференцировки ИКК.

Таким образом, кренигацестат эффективно подавляет остеогенную дифференцировку ИКК, что делает его перспективным действующим веществом для доклинических исследований.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства Науки и Высшего Образования Российской Федерации (номер соглашения 075-15-2020-901).