или вообще невозможно, нами была разработана тест-система на основе дермальных фибробластов пациента с дисферлинопатией. В нашем исследовании мы взяли дермальные фибробласты, выделенные из дермальной ткани пациента с дисферлинопатией (мутация в гене DYSF, экзон 26). Фибробласты пациента были иммортализованы. Используя наработанный лентивирус LV-TRE-VP64-human-MyoD-T2A-dsRedExpress2 с тетрациклин-индуцибельным промотором (Tet-ON) клетки были генетически модифицированы и отселектированы для осуществления миогенной дифференцировки. В результате, после получения чистой популяции клеток и индукции экспрессии генов доксициклином с использованием инвертированного микроскопа AxioOberver.Z1 наблюдали слияние клеток и образование миофибриллярных структур. Для анализа эффективности миогенной дифференцировки был проведен Вестерн-блоттинг, который выявил положительную реакцию с моноклональными антителами к белку MyoD (sc-377460), размер бэнда соответствовал ожидаемому размеру белка MyoD (45 кДа). Затем, с целью анализа присутствия мРНК дисферлина в модифицированных миобластах была проведена ПЦР в реальном времени, которая выявила небольшую экспрессию дисферлина в экспериментальных образцах. Полученную MyoD-индуцированную клеточную линию миобластов можно использовать в качестве тест-системы для новых подходов к терапии дисферлинопатий.

Работа поддержана Программой повышения конкурентоспособности КФУ.

МОДИФИКАЦИЯ КЛЕТОК HEK293A С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR-CAS9 SAM ДЛЯ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВАЦИИ ГЕНА ДИСФЕРЛИНА

Ирина Георгиевна Старостина[1], Алиса Алмазовна Шаймарданова[1], Диана Рустамовна Аглиуллина[1], Валерия Владимировна Соловьева[1], Иван Антонович Яковлев[1, 4], Артур Александрович Исаев[2], Роман Вадимович Деев[2, 3], Альберт Анатольевич Ризванов[1]

[1] *Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия;*
[2] *Институт стволовых клеток человека, Москва, Россия;*
[3] *Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия*
[4] *Genotarget LLC, Москва, Россия*

fairin@mail.ru

Дисферлинопатии — группа мышечных дистрофий с аутосомно-рецессивным типом наследования, возникающие вследствие мутаций в гене дисферлина человека. Белок дисферлин (англ. Dysferlin, DYSF) играет ключевую роль в восстановлении сарколеммы при ее повреждении. Синтез дефектного белка приводит к нарушению репаративных процессов в мышечной ткани и последующей атрофии. Разнообразные исследования направлены на лечение этого наследственного заболевания, однако дисферлинопатия остается неизлечимой на данный момент. Одной из основных причин низкой эффективности методов лечения является отсутствие модели, наиболее точно воспроизводящей патологические процессы заболевания. Модели на основе животных широко используются, но ввиду значительных генетических различий они не способны в полной мере воспроизвести все особенности развития болезни в сравнении с человеком. Перспективным способом лечения дисферлинопатии в настоящее время является генная терапия и модельные системы, основанные на клеточных линиях человека, экспрессирующих дисферлин, которые представляют интерес для тестирования новых генно-терапевтических препаратов. Целью нашей работы было создание тест-системы с использованием технологии CRISPR-Cas9 SAM in vitro для разработки и скрининга препаратов для лечения дисферлинопатии. Активацию транскрипции мРНК гена DYSF в клетках HEK293A осуществляли с использованием полученных рекомбинантных лентивирусов, кодирующих факторы транскрипции MS2-P65-HSF1, dCas9-VP64 и специфическую гидовую РНК дисферлина. Селекцию успешно трансдуцированных клеток проводили рядом антибиотиков (зеоцин, бластицидин, гигромицин), специфичных соответственно каждому лентивирусу, с целью получения чистой популяции инфицированных клеток. Экспрессия белка дисферлина была подтверждена с помощью вестерн-блоттинга. Клеточная линия HEK293A с экспрессией дисферлина, полученная путем транскрипционной активации гена *DYSF* с использованием системы CRISPR-Cas9 SAM, может быть использована в дальнейших исследованиях терапевтического подхода путем редактирования РНК и ДНК клеток, а также для скрининга лекарственных препаратов при лечении дисферлинопатий человека.

Работа поддержана Программой повышения конкурентоспособности КФУ.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЖЕВОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ПАЦИЕНТОВ С МОРБИДНЫМ ОЖИРЕНИЕМ И НАЛИЧИЕМ/ОТСУТСТВИЕМ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА

Юрий Сергеевич Стафеев[1], Светлана Сергеевна Мичурина[1, 2], Никита Владимирович Подкуйченко[1, 2], Игорь Александрович Скляник[3], Екатерина Алексеевна Шестакова[3], Камиль Абусаидович Яхьяев[3], Анатолий Владимирович Юрасов[4], Александр Вячеславович Воротников[1], Михаил Юрьевич Меньшиков[1], Марина Владимировна Шестакова[3], Елена Викторовна Парфенова[1, 2]

[1] *Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава России, Москва, Россия;*
[2] *Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;*
[3] *Эндокринологический научный центр Минздрава России, Москва, Россия;*
[4] *Центральная клиническая больница № 1 ОАО РЖД, Москва, Россия*

yuristafeev@gmail.com

Введение. Ожирение и сахарный диабет 2 типа (СД2Т) в современной медицине являются ведущими причинами смертности населения. Особую роль в развитии инсулиновой резистентности (ИР), которая является основным молекулярным проявлением СД2Т, играет нарушение бежевой дифференцировки адипоцитов и их термогенной активности. Целью данной работы было изучить термогенный потенциал мезенхимных стромальных клеток жировой ткани (МСК ЖТ) пациентов с ожирением и наличием/отсутствием СД2Т.