

## Введение

Спинальная мышечная атрофия (СМА)— это нейродегенеративное заболевание, при котором нарушается работа нижних моторных нейронов. В большинстве случаев СМА летальна. По статистике один человек из 6000 страдает данной патологией, а каждый пятидесятый является носителем. Причиной заболевания является мутация в гене SMN1, которая приводит к снижению продукции белка SMN (survival of motor neuron), напрямую связанного с выживаемостью моторных нейронов.

Предшествующие исследования показали, что нехватка белка SMN влияет на функцию некоторых клеточных органелл, что приводит к клеточной гибели.

Главной целью нашего проекта было понять, действительно ли SMN играет роль в регуляции лизосомальной и митохондриальной активности и тем самым вносит вклад в развитие заболевания.

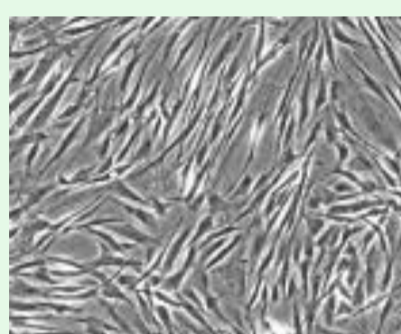
## Цели

Понять, как меняется лизосомальная и митохондриальная активность в фибробластах и эмбриональных клетках почек (HEK 293,

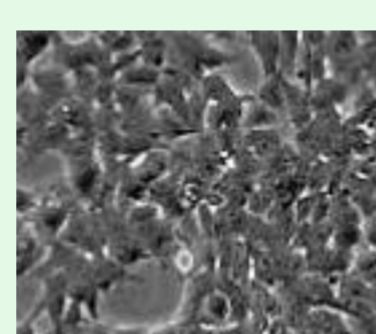
## Методы

### Модельные системы

Fibroblasts  
(Human skin cells)



HEK293T cells<sup>7</sup>  
(Human embryonic kidney)



### FLOW CITOMETRY & IMMNOFLUORESCENCE

Измерение лизосомальной и митохондриальной активности. Используемые красители:

- LysoTracker: окрашивает лизосомы;
- LysoSensor: окрашивает лизоомы, чем ярче, тем меньше pH, тем они более здоровые;
- Mitotracker: окрашивает митохондрии;
- JC-1: окрашивает митохондрии. Двойной маркер: чем они более здоровые, тем они краснее, потому что JC-1 проникает внутрь..

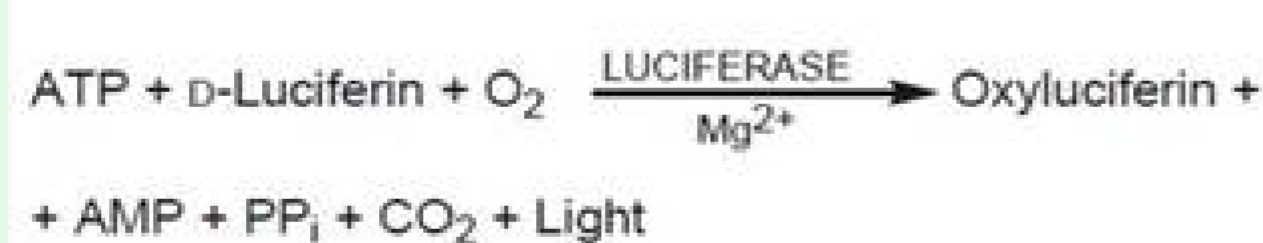
### РНК ИНТЕРФЕРЕНЦА & WESTERN BLOT

- Подавление трансляции SMN mRNA в HEK293T клетках чтобы создать модель СМА в клеточной культуре.
- Разделение массы белков, выделенных из разных клеточных компартментов, по молекулярной и измерение их количества.

### КЛЕТОЧНОЕ ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ

Выделение белков из ядра и цитоплазмы с последующим разделением с помощью Western Blot для определения положения TFEB (фактора транскрипции, регулирующего лизосомальную активность).

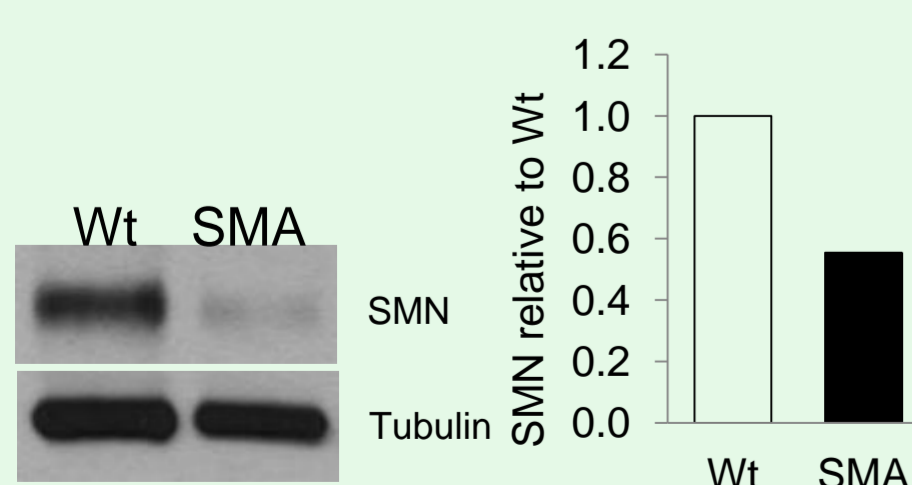
### ИЗМЕРЕНИЕ АТФ



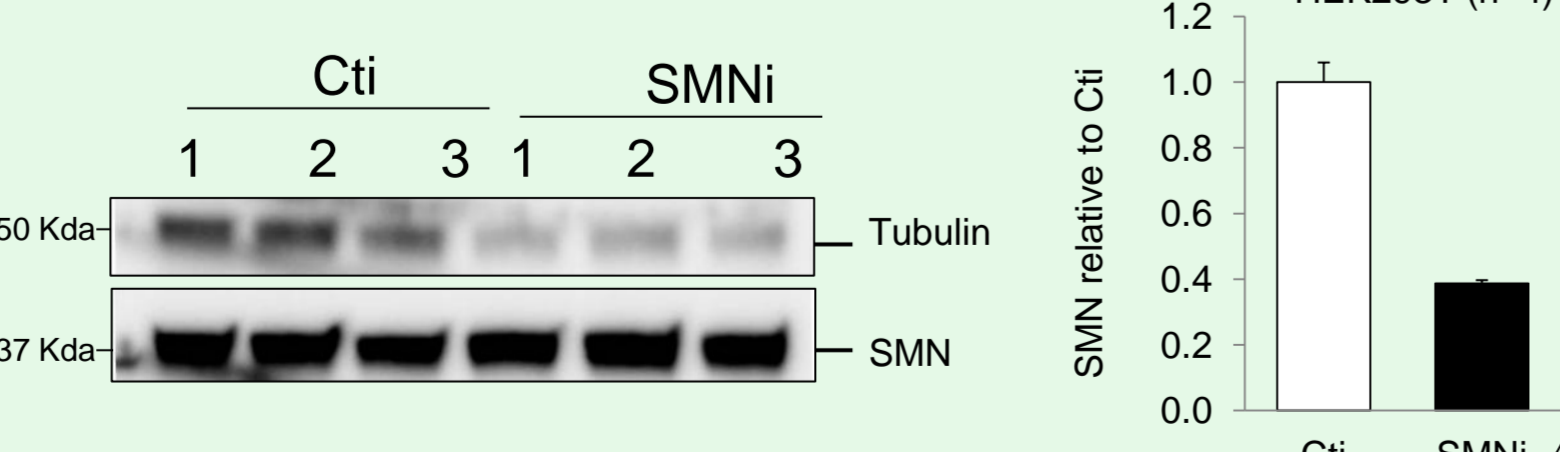
Измерение количества АТФ в клетках с помощью люминисценции

## НАШИ МОДЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ

1 Здоровые и СМА фибробласты

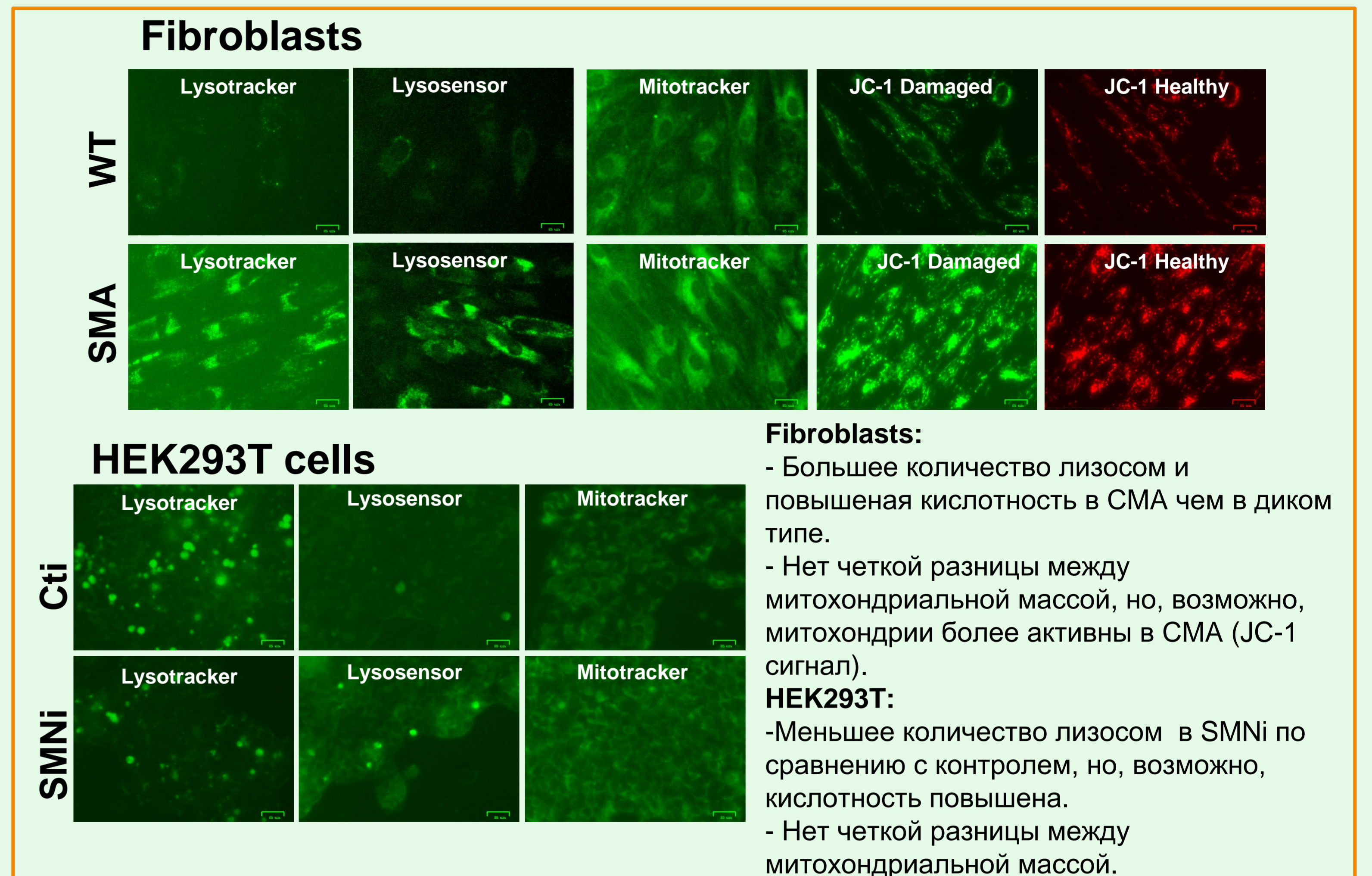


2 Контроль и HEK293T клетки, трансфицированные по гену SMN

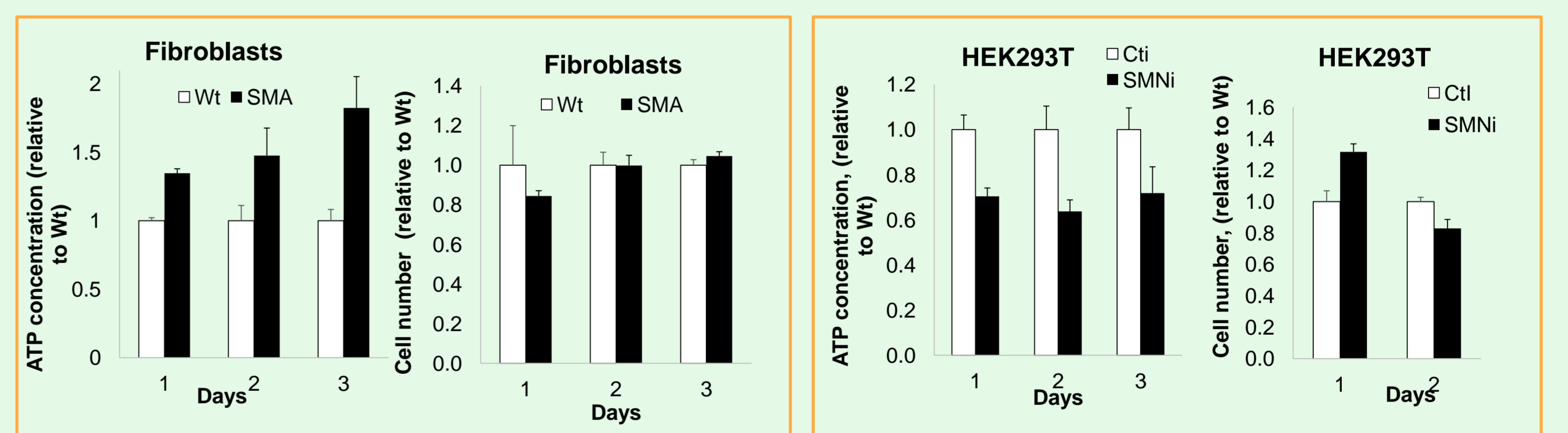


## РЕЗУЛЬТАТЫ

### 1. Изменения в митохондриальной и лизосомальной активности, измерение методами иммунофлуоресценции и FACS.



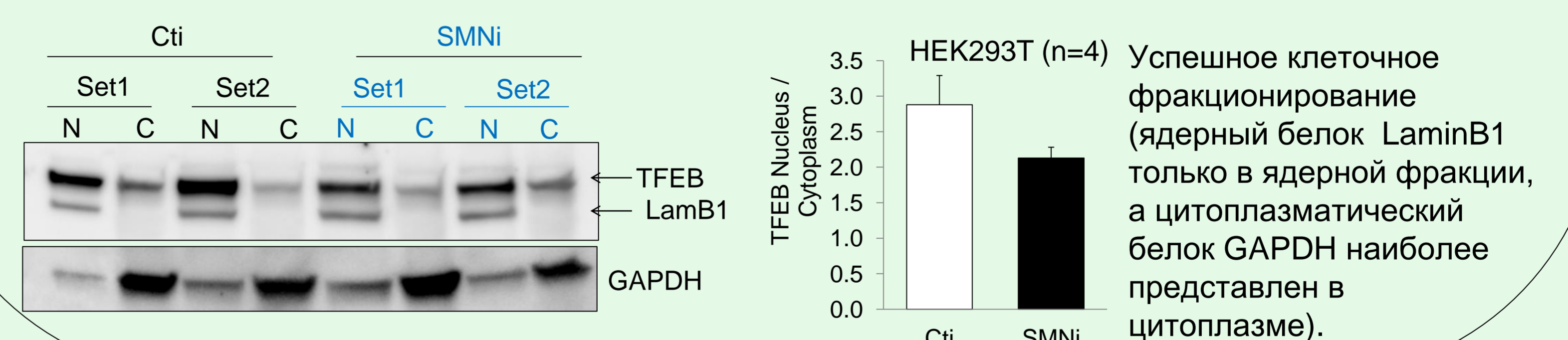
### 2. SMA фибробласты имеют повышенный уровень АТФ



**Фибробласты:** Больше АТФ в SMA по сравнению с контролем, несмотря одинаковое число клеток

**HEK293T:** Результаты не позволяют сделать однозначный вывод, хотя концентрация АТФ уменьшается, это может быть связано с различающимся числом клеток и техническими проблемами при подсчете

### 3. У клеток с дефицитом по SMN затруднена транслокация в ядро транскрипционного фактора TFEB - основного регулятора экспрессии генов, кодирующих белки лизосом по сравнению с контролем



## ВЫВОДЫ

- Мы получили разные результаты для HEK и фибробластов, возможно, это связано с тем, что фибробласты представляют собой естественную модель SMA, тогда как модель SMA на HEK индуцирована искусственно, и подвержена большей вариабельности
- С помощью различных методов мы показали, что масса лизосом, митохондрий и их активность повышена в SMA по сравнению с контролем
- Ранее описанные дефекты аутофагии могут быть причиной увеличения числа и кислотности лизосом, а также повышенной митохондриальной активности, которая, возможно, компенсирует нарушения метаболизма
- Нарушение транслокации TFEB в ядро из-за недостатка SMN может быть ключевым фактором перечисленных нарушений

