



Институт теоретической
и экспериментальной биофизики РАН

МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ

«ДЕНЬ ДНК – 2023»



25 апреля 2023 года

СБОРНИК ТЕЗИСОВ

Издательство «Синхробук»
Пушино
2023

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт теоретической и экспериментальной биофизики
Российской академии наук

**МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ
«ДЕНЬ ДНК – 2023»**

25 апреля 2023 года

СБОРНИК ТЕЗИСОВ

Издательство «Синхробук» (Synchrobook™)
Пушино
2023

Материалы конференции «День ДНК – 2023». 25 апреля 2023 года. Сборник тезисов /
сост. сост. пресс-служба ИТЭБ РАН: к.б.н. Перевязова Т.А., к.б.н. Дюкина А.Р.,
к.б.н. Зубов В.В.; оформление Абакумовой Ю.Ю. – Пушкино: ИТЭБ РАН, изд-во
«Синхробук» (Synchrobook™), 2023. 40 с.

ISBN 978-5-91874-910-4



© ИТЭБ РАН, Пушкино, 2023
© Синхробук (Synchrobook™), Пушкино, 2023
© Абакумова Ю.Ю., оформление, 2023

СОДЕРЖАНИЕ

Международный День ДНК	5
<i>Алексеев Я.И., Игнатов К.Б., Сафонов Д.Г., Кузнецова Ю.О., Першин А.А., Петров А.И., Резник В.С., Чубинский-Надеждин И.В., Курочкин В.Е.</i> Разработка первого отечественного полногеномного секвенатора Нанофор СПС: успехи, проблемы, перспективы	7
<i>Афанасьева В.А., Каменских К.А., Евдокимовский Э.В., Ермаков А.М.</i> Определение паттернов микроРНК в слоне методом нанопорового секвенирования	8
<i>Жданова Е.С., Ермаков А.М.</i> Повышение точности таксономического определения микробиоты и микобиоты с помощью нанопорового секвенирования	10
<i>Зимин А.А., Никулин Н.А., Никулина А.Н.</i> Бактериофаговая трансдукция и бактериофаговая терапия	12
<i>Зубов В.В.</i> Секвенирование – 2023.....	15
<i>Клеценко Е.В.</i> Нуклеиновые кислоты против антител. Быстрые и портативные молекулярные методы выявления инфекций	17
<i>Колотова А.А., Ломовская Я.В., Фадеев Р.С., Ермаков А.М.</i> Определение транскриптомного профиля миелоидного лейкоза методом нанопорового секвенирования.....	18
<i>Кольжецов Н.П., Шавкунов К.С., Озолин О.Н.</i> Использование нанопорового секвенирования и методов биоинформатического анализа в исследованиях на примере ископаемого образца.....	20
<i>Масулис И.С., Гриневич А.А., Якушевич Л.В.</i> Нелинейная динамика открытых состояний в замкнутых кольцевых молекулах ДНК. Модельные исследования и эксперимент	22
<i>Сергеева О.В.</i> Использование малых интерферирующих РНК для валидации потенциальной терапевтической мишени РНК-хеликазы DDX3	25
<i>Сирота Н.П., Пикалов В.А., Смирнова. Е.Н., Розанова О.М., Белякова Т.А.</i> ДНК повреждающие эффекты ускоренных ионов углерода	26
<i>Томилов В.Н., Абдурашитов М.А., Гончар Д.А., Снежкина А.В., Краснов Г.С., Кудрявцева А.В., Дегтярев С.Х.</i> Эпигенетический NGS-портрет человека: сравнительный анализ метилирования сайтов RCGY в геномах	29

<i>Хмелькова Д.Н.</i> Секвенирование ДНК нового поколения и интерпретация данных NGS в клинических целях	31
<i>Чемерис А.В., Гарафутдинов Р.Р., Сахабутдинова А.Р., Чемерис Д.А.</i> Небиологическое применение молекул ДНК	32
<i>Эрдынеева Д.Б., Шабалина Е.Ю., Зоригт Д., Петерсен Е.В., Ермаков А.М., Гудков Д.А.</i> Организация геномных исследований в Центре внедрения геномных технологий МФТИ.....	35
СПОНСОРЫ.....	39

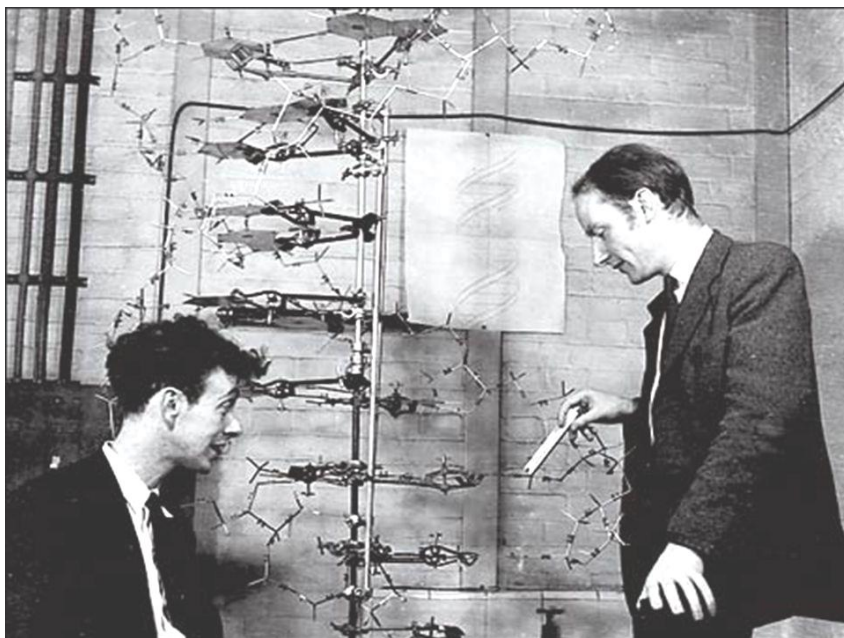
МЕЖДУНАРОДНЫЙ ДЕНЬ ДНК В ИТЭБ РАН

Ежегодно 25 апреля в разных странах мира отмечается необычный праздник – Международный День ДНК (DNA Day), в знак признания важности генетики и научных достижений, сделанных в этой области.

25 апреля 1953 года Джеймс Уотсон и Фрэнсис Крик заявили в статье в журнале «Nature» [*Watson J.D., Crick F.H.C. Molecular structure of nucleic acids // Nature. 1953. V. 171. P. 738–740*], что молекула ДНК представляет собой двойную спираль. Статья заканчивалась предположением, что открытие структуры ДНК может объяснить механизмы копирования генетического материала. В этой небольшой статье, занявшей ровно одну страницу журнала, было описано самое выдающееся открытие, по крайней мере, в области биологии и медицины, а может, и самое выдающееся открытие в истории науки вообще. В 1962 г. Уотсон и Крик получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине «за открытия в области молекулярной структуры нуклеиновых кислот и за определение их роли для передачи информации в живой материи». Очевидно, что открытие пространственной структуры ДНК совершило революцию в мире науки и повлекло за собой целый ряд новых открытий, без которых нельзя представить не только современную науку, но и современную жизнь в целом.

Поскольку открытие ученых дало мощный толчок для развития науки на качественно новом уровне, 25 апреля считается днем рождения молекулярной биологии, а также международным днем ДНК. Ровно 50 лет спустя после открытия Уотсона и Крика, 25 апреля 2003 года, было объявлено, что проект по расшифровке генома человека подходит к долгожданному завершению. В этот день под патронажем Национального института исследования генома человека (подразделение Национального института здравоохранения США) впервые был проведен День ДНК. Постепенно его начали праздновать по всему ми-

ру. В этот день во всем мире проводятся научные конференции, семинары и другие просветительские мероприятия. В 2017 году День ДНК впервые отметили в стенах Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН, и с тех пор этот праздник науки проходит в ИТЭБ РАН ежегодно.



Джеймс Уотсон (р. 1928 г.) и Фрэнсис Крик (1916–2004) объясняют структуру ДНК на примере сделанной ими модели. Фото из открытых источников

Традиционно на этой конференции ученые рассказывают слушателям о различных аспектах работы с нуклеиновыми кислотами, а также о новейших системах секвенирования и последних разработках для расшифровки нуклеотидных последовательностей.

РАЗРАБОТКА ПЕРВОГО ОТЕЧЕСТВЕННОГО ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНАТОРА НАНОФОР СПС: УСПЕХИ, ПРОБЛЕМЫ, ПЕРСПЕКТИВЫ

*Алексеев Я.И.^{1,2}, Игнатов К.Б.³, Сафонов Д.Г.², Кузнецова Ю.О.²,
Першин А.А.², Петров А.И.¹, Резник В.С.¹, Чубинский-Надеждин И.В.¹,
Курочкин В.Е.¹*

¹ Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Общество с ограниченной ответственностью «Синтол», Москва, Россия

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

e-mail: jalex@syntol.ru

В 2018–2020 годах при поддержке Министерства Здравоохранения Российской Федерации коллективом разработчиков из Института аналитического приборостроения РАН и ООО «Синтол» была выполнена опытно-конструкторская работа на тему: «Разработка аппаратно-программного комплекса, набора реагентов и расходных материалов для расшифровки последовательности нуклеиновых кислот патогенных микроорганизмов методом массового параллельного секвенирования», шифр «Сиквенс-Био».

В результате выполнения работы в 2020 году был создан опытный образец прибора для полногеномного секвенирования ДНК Нанофор СПС, программное обеспечение по управлению и анализу полученных на приборе данных, а также расходные материалы и реагенты, необходимые для реализации метода секвенирования путем синтеза с оптической детекцией флуоресценции и использованием обратимо-терминированных 3'-азидометил модифицированных флуоресцентно-меченных дезокси-нуклеозидтрифосфатов.

В течение 2021–2022 годов проведены исследования по совершенствованию программного обеспечения, оптимизации наборов реагентов, направленные на повышение надежности и эффективности работы опытного образца прибора и качества получаемых на нем данных.

По программному обеспечению управления прибором были доработаны структура и интерфейс программы формирования и описания протоколов исследования, проведена оптимизация протокола секвенирования.

Разработаны алгоритмы автоматической фокусировки оптической системы на верхнюю и нижнюю поверхности проточной ячейки.

Разработана программа тестирования работы гидравлической системы перед началом выполнения протокола секвенирования.

Разработана программа анализа и визуализации трехмерной структуры кластеров, а также оптимизирован алгоритм анализа данных при

большой плотности кластеров, в частности, улучшено распознавание «слипшихся» кластеров.

Оптимизированы условия иммобилизации якорных олигонуклеотидов на поверхностях проточной ячейки с целью достижения равномерности покрытия и обеспечения контролируемой загрузки кластерами.

Оптимизированы реакционные смеси для изотермической мостиковой амплификации кластеров, реагенты для удаления защитных групп и отщепления флуоресцентных красителей, реакционные смеси для включения флуоресцентно-меченных дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, а также реакционные смеси для расщепления первой и второй цепей ампликонов в кластерах, обеспечивающие парноконцевое чтение расшифровываемой последовательности ДНК.

В ходе работ было установлено, что критическим, определяющим длину и качество секвенирования является этап включения модифицированных дезоксирибонуклеозидтрифосфатов.

В настоящее время проводятся исследования, направленные на увеличение длины и улучшение качества секвенирования путем синтеза, в частности, оптимизируются структура фермента, включающего модифицированные дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, структуры красителей и линкеров, входящих в состав модифицированных дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, а также компонентные составы реакционных смесей.

В 2023 году осуществлен запуск малой серии приборов Нанофор СПС, а также всех необходимых для обеспечения его работы расходных материалов и реагентов отечественного производства.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАТТЕРНОВ МИКРО-РНК В СЛЮНЕ МЕТОДОМ НАНОПОРОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Афанасьева В.А., Каменских К.А., Евдокимовский Э.В., Ермаков А.М.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

Молекулы микроРНК представляют собой класс небольших некодирующих РНК и принимают участие в транскрипционной и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов путём ингибирования информационной РНК (мРНК). Изучение микроРНК в настоящее время является одной из наиболее активных сфер исследований в области геномики, так как многочисленные работы показали, что эти молекулы являются ключевыми регуляторами многочисленных генетических программ, имеющих отношение к онкологическим, сердечно-сосудистым заболеваниям, а также расстройствам

нервной системы. МикроРНК участвуют в большом числе патологических процессов, и это дает возможность их применения в качестве биомаркера для диагностических и терапевтических целей, но главное – для ранней диагностики заболевания.

МикроРНК содержится не только внутри клетки, значительная её часть мигрирует за пределы клеток и обнаруживается в биологических жидкостях организма, таких как кровь, моча, слюна. Такие молекулы называются циркулирующими микроРНК, их появление вне клетки может являться результатом как гибели клеток и их последующего лизиса, так и результатом активной секреции микроРНК живыми клетками. Клетки высвобождают микроРНК в составе экзосом и микровезикул, в то время как микроРНК клеток, находящихся в стадии апоптоза или некроза, может циркулировать в составе апоптотических телец и белковых комплексов [1]. МикроРНК обладают высокой специфичностью к типам тканей или клеток и могут отражать физиологическое и патологическое состояние клетки в зависимости от специфичности происхождения содержимого экзосом. Это позволяет использовать специфические микроРНК для определения начала и прогрессирования заболевания [2]. Были также продемонстрированы чувствительность микроРНК и зависимость их уровня от прогрессирования заболевания или ответа на терапию. При этом микроРНК являются высокостабильными молекулами, устойчивыми к изменению pH, длительному нахождению при комнатной температуре и к действию эндогенных рибонуклеаз [3]. Такая стабильность позволяет эффективно выделять циркулирующие микроРНК из биологических жидкостей, их количество может быть измерено с высокой чувствительностью и специфичностью с помощью ПЦР в реальном времени, ДНК-микрочипов и метода секвенирования. Применение технологий секвенирования позволяет выявить все молекулы микроРНК, находящиеся в образце, и определить их паттерны.

Таким образом, микроРНК можно считать перспективными биомаркерами заболеваний, поскольку они отвечают нескольким важным критериям, таким как высокая специфичность, чувствительность, высокая стабильность и независимость определения. Благодаря этим преимуществам микроРНК можно применять для точной диагностики, прогнозирования прогрессирования заболевания, определения направления лечения, а также оценки реакции на лечение.

Целью настоящего исследования являлась разработка методики выделения микроРНК отечественными наборами, а также методики подготовки библиотек микроРНК, пригодных для секвенирования на нанопоровом секвенаторе.

Нами был разработан модифицированный протокол выделения микроРНК из слюны с помощью набора для выделения РНК суммарной и мик-

роРНК из клеток и тканей фирмы Биолабмикс (Россия). Из полученной микроРНК была синтезирована кДНК. Для этого использовали метод полиаденилирования 3' конца с помощью полиА полимеразы из бактерии *E. coli* (NEB, Великобритания). Далее с помощью набора Mint (Евроген, Россия) и специализированных праймеров путем переключения цепи была получена кДНК с фланкирующими адапторными последовательностями, которые затем использовали для амплификации библиотеки кДНК. Для получения нужных по размеру фрагментов, несущих искомые последовательности микроРНК использовали метод разделения в агарозном геле с последующей экстракцией вырезанных фрагментов ДНК. Данные образцы использовали непосредственно для секвенирования. Библиотеки для секвенирования готовили с использованием набора LSK109 (Oxford Nanopore, Великобритания). Секвенирование проводили на приборе MinION, с использованием ячеек MIN-FLO106D. Далее после бейзколлинга программой Guppy 6.4.2 полученные последовательности анализировали на предмет наличия искомых последовательностей микроРНК, точности секвенирования и идентификацию найденных микроРНК. В итоге исследования нами было установлено, что разработанный подход к секвенированию микроРНК позволяет выявить и изучить спектр микроРНК, выделенной из слюны человека. В настоящее время мы продолжаем оптимизацию и развитие методики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Valadi H., Ekström K., Bossios A., Sjöstrand M., Lee J.J., Lötvall J.O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells // Nat. Cell Biol. 2007;9:654–659.
2. Wu X., Somlo G., Yu Y., Palomares M.R., Li A.X., Zhou W., Chow A., Yen Y., Rossi J.J., Gao H. De novo sequencing of circulating miRNAs identifies novel markers predicting clinical outcome of locally advanced breast cancer // J. Transl. Med. 2012;10:42.
3. Allegra A., Alonci A., Campo S. et al. Circulating microRNAs: new biomarkers in diagnosis, prognosis and treatment of cancer (review) // Int. J. Oncol. 2012. V. 41, № 6. P. 1897–1912.

ПОВЫШЕНИЕ ТОЧНОСТИ ТАКСОНОМИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОБИОТЫ И МИКОБИОТЫ С ПОМОЩЬЮ НАНОПОРОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Жданова Е.С., Ермаков А.М.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия
e-mail: dla_lisa@mail.ru

Концепция секвенирования с использованием нанопор была впервые предложена в 1980-х годах и была разработана и усовершенствована

за последние три десятилетия. Сейчас широко используемым коммерческим продуктом являются секвенирующие ячейки от компании Oxford Nanopore Technologies, поступившие в продажу в 2014 году. Уже тогда секвенаторы от Oxford Nanopore могли соперничать с Illumina MiSeq. Простота подготовки библиотек и использования, возможность длинных прочтений вместе со скоростью считывания делает нанопоровые секвенаторы перспективными для использования в диагностических целях и сфере персонализированной медицины [1].

Основным ограничением секвенирования MinION является невысокая точность считывания по сравнению с технологиями коротких считываний. Когда прибор MinION был впервые представлен, точность считывания составляла менее 60%. В последние годы эта точность повысилась и достигла примерно 95%, что соответствует точности технологии секвенирования с длинными считываниями PacBio, но все еще не дотягивает до 99% точности, обеспечиваемой платформами с короткими считываниями по типу Illumina [2]. Преимущества длинных считываний перевешивают низкую точность считывания для некоторых сфер. Так, для анализа микробиоты ЖКТ длинные прочтения имеют ряд преимуществ.

Бактериальные клетки, населяющие толстую кишку, в 10 раз превосходят по численности клетки животных и оказывают глубокое влияние на иммунологические, пищевые и физиологические процессы в организме хозяина. Часть бактерий относят к некультивируемым, и для получения полной картины видового разнообразия бактериального сообщества используется секвенирование 16s РНК. Существующие методы основаны на использовании Illumina и коротких консервативных участков оперона 16s РНК. Как следствие, отсутствует возможность определения видового состава и получения целостной картины, при этом полученные результаты обладают малым количеством ошибок. При захвате полного ампликона и секвенирования на ячейках MinION глубина покрытия увеличивается, можно идентифицировать виды и штаммы, но с большой погрешностью. Так было до недавнего времени.

В ходе дальнейшего развития продукта Oxford Nanopore представил и выпустил в продажу новое поколение ячеек и наборов для подготовки библиотек, которые в режиме simplex позволяют получать точность на уровне Q20, а при варианте анализа duplex – Q30 [3]. Таким образом, в ячейках Oxford Nanopore достигается точность длинных чтений, сравнимая с точностью коротких прочтений Illumina, что является несомненным преимуществом нанопорового секвенирования.

Мы показали, что при даже при секвенировании на ячейках и наборах поколения 106D с фильтрацией ридов на уровне Q10 региона V3-V4 на Oxford Nanopore и Illumina при оценке таксономического разнообразия

микробиоты кишечника обнаруженная корреляция достигает 98%. Это указывает на то, что несмотря на более низкую точность секвенирования, нанопоровый подход позволяет оценивать таксономическое разнообразие сравнимого с получаемым при анализе ридов Illumina. При секвенировании модельных сообществ по полному 16S гену и региону V3–V4 показано, что в этом случае полный ген позволяет более точно определить разнообразие микробиоты в модельных сообществах, нежели анализ короткого региона. Таким образом, внедрение нанопорового секвенирование в анализ микробиоты на основе новой химии и анализа всего гена 16S позволит определять более точно разнообразие микробных сообществ и значительно снизить стоимость проводимого исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Smith C., Halse T.A., Shea J., Modestil H., Fowler R.C., Musser K.A., Escuyer V., Lapiere P.* Assessing Nanopore Sequencing for Clinical Diagnostics: a Comparison of Next-Generation Sequencing (NGS) Methods for *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Clin. Microbiol.* 2020 17;59(1):e00583-20.
2. *Wang Y., Zhao Y., Bollas A. et al.* Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications // *Nat Biotechnol* 39, 1348–1365 (2021).
3. *Luo J., Meng Z., Xu X., Wang L., Zhao K., Zhu X., Qiao Q., Ge Y., Mao L., Cui L.* Systematic benchmarking of nanopore Q20+ kit in SARS-CoV-2 whole genome sequencing // *Front Microbiol.* 2022 Oct 13;13:973367.

БАКТЕРИОФАГОВАЯ ТРАНСДУКЦИЯ И БАКТЕРИОФАГОВАЯ ТЕРАПИЯ

Зимин А.А., Никулин Н.А., Никулина А.Н.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр „Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук“», г. Пущино, Россия
e-mail: dr.zimin8@yandex.ru

Широкое распространение мультирезистентных штаммов бактерий увеличивает интерес к фагам как альтернативе антибиотиков. С другой стороны, горизонтальный перенос бактериальных генов бактериофагами за счет трансдукции является одной из наиболее негативных сторон этих антибактериальных агентов. Фаговую трансдукцию характеризуют как перенос бактериальной ДНК между бактерией, инфицированной бактериофагом – донором генов, и другой бактерией, также чувствительной

к трансдуцирующему бактериофагу. Основным механизмом участия фагов в изменчивости у бактерий считают бактериофаговую трансдукцию. На роль трансдукции в природе указывает метагеномный анализ вириомов, который показал, что бактериальные гены находят у большинства бактериофагов. Трансдукция считается основной движущей силой эволюции бактерий, а частицы трансдуцирующих бактериофагов являются генетическими резервуарами бактериального разнообразия [1]. Традиционно трансдукцию подразделяют на два типа: общую и специализированную [2, 3]. Общая трансдукция характеризуется упаковкой любого бактериального гена в фаговую частицу вместо ДНК фага из-за нарушений упаковки генома. Это приводит к передаче любого гена бактерии-донора к бактерии-реципиенту. Общая трансдукция происходит в литическом цикле бактериофага и примерно у 1 из 10 000–100 000 потомков фага [3]. При общей трансдукции вирусная ДНК отсутствует внутри трансдуцирующей частицы, а присутствует только трансдуцирующаяся бактериальная ДНК. Бактериофаги, способные к общей трансдукции, могут представлять собой инструменты для синтетической биологии, а их потенциальная экологическая роль очень существенна. Бактериофаги путем трансдукции предоставляют бактериям гены, кодирующие различные свойства приспособленности: расширение спектра биохимических реакций, повышение скорости роста и приспособленности физиологии бактерий к новым условиям среды. При развитии популяции трансдуктантов может произойти распространение этой популяции в новую среду обитания. Недавно открыта латеральная трансдукция, которая является частью фагового жизненного цикла. Благодаря переносу ДНК в сотни тысяч пар нуклеотидов латеральная трансдукция является ведущей силой в быстрой эволюции бактерий.

Бактериофаг T4 и многие родственные ему фаги не способны к трансдукции за счет неканонического состава их геномной ДНК. Казалось бы, это делает их идеальными агентами фаговой терапии. Но и среди T4-подобных фагов нами были обнаружены эффективные трансдюсеры. В ходе их изучения была исследована трансдукция детерминант антибиотикорезистентности плазмид pBR322, pBR325 и рекомбинантной плазмиды pVT123, содержащей фрагмент ДНК фага T4 с генами *hoc-segE-uvrW* псевдо-T-четными бактериофагами RB42, RB43 и RB49 [2, 3]. Установлено, что эффективность трансдукции детерминант антибиотикорезистентности плазмиды pBR322 из *recA*⁺ и *recA*⁻ донорных штаммов *E. coli* существенно не отличается [3]. Исследована котрансдукция пар плазмид pET-3a-pLysE и pET-3a-pLysS фагом T4alc7 [2]. Показано, что маркеры антибиотикорезистентности указанных выше пар плазмид котрансдуцируются с высокой частотой. Проведен анализ плазмидных ДНК из ко-

трансформантов и котрансдуктантов, содержащих указанные выше пары плазмид. Показано, что с помощью фага T4alc 7 могут быть получены как мономерные, так и олигомерные формы плазмид и что этот бактериофаг может быть использован для котрансдукции биплазмидных систем сверхсинтеза белков в различные штаммы *E. coli* [2]. Получены мутанты бактериофага RB43 по типу негативных колоний RB43-03 и RB43-13 и с их помощью осуществлена котрансдукция маркеров антибиотикорезистентности плазмид pET-3a и pLysE [2]. Исследована частота возникновения трансдуктантов, устойчивых к псевдо-T-четным бактериофагам, с помощью которых они были получены, определена чувствительность резистентных трансдуктантов к 31 RB-бактериофагу, а также к бактериофагам T2, T4, T5, T6, T7 и BF23. Проведено определение ограничения псевдо-T-четных бактериофагов *in vivo* системами модификации-рестрикции хромосомной, фаговой и плазмидной локализации [3]. Показана трансдукция плазмид с молекулярной массой до 62 000 пар нуклеотидов [4]. Показана трансдукция гена устойчивости к антибиотиком плазмидной локализации в лабораторный и природный штаммы *E. coli*, происходящая в кишечнике мыши [5, 6]. На основе нетрансдуцирующих бактериофагов был разработан безопасный фаговый препарат для терапии колибактериозов у поросят [7]. Проведено изучение влияния температуры на трансдукционную способность и литическую активность бактериофагов RB43 и RB49 [8]. Данный доклад посвящен изучению экологии трансдукции у различных T4 фагов в экспериментах нашей научной группы.

Исследование поддержано Российским Научным Фондом (№ 22-25-00669).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ogunseitán O.A.* Genetic transduction in freshwater ecosystems // *Freshw Biol.* 2008;53:1228–1239.
2. *Tanyashin V.I., Zimin A.A., Boronin A.M.* The Cotransduction of pET System Plasmids by Mutants of T4 and RB43 Bacteriophages // *Microbiology.* V. 72, № 6, 2003, p. 694–700. DOI: 10.1023/B:MICI.0000008372.06477.43.
3. *Tanyashin V.I., Zimin A.A., Shlyapnikov M.G., Boronin A.M.* Transduction of Plasmid Antibiotic Resistance Determinants with Pseudo-T-Even Bacteriophages // *Russian Journal of Genetics.* V. 39, № 7, 2003, p. 761–772. DOI: 10.1023/A:1024748903232.
4. *Зимин А.А., Васильева Е.Л., Васильева Е.А., Фишман К.С., Сузина Н.Е.* Исследование трансдукции плазмид бактериофагами T4-типа: трансдукция в природных условиях, выделение новых трансдуцирующих бактериофагов, изучение трансдукции плазмид в отсутствие селекции антибиотиком и трансдукция низкокопийных плазмид // *Бюллетень Московского общества испытателей природы. Отдел биол., т. 114, вып. 3, 2009, прил. 1, ч. 1., с. 330–337.*

5. *Zimin A.A., Vasilyeva E.L., Murashev A.N.* The study of plasmid transduction in the experimental system of phage therapy using laboratory animals // Abstracts of the 4 International Conference on “Science and Business” October 15–18. 2007, Pushchino, p. 262–265.
6. *Зимин А.А., Васильева Е.Л., Мурашев А.Н.* Конструирование модели для доклинических исследований фаговых препаратов // Материалы XVI Международной конференции: «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии». Ялта-Гурзуф, 2008, с. 221–222.
7. *Скобlikов Н.Э., Кононенко С.И., Осепчук Д.В., Москаленко Е.А., Авдиенко В.В., Зимин А.А.* Выделение и отбор нетрансдуцирующих бактериофагов для противоколибактериоз-ных препаратов // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2016. № 122. С. 554–566.
8. *Никулина А.Н., Коцаев А.Г., Зимин А.А.* Изучение влияния температуры на трансдукционную способность и литическую активность бактериофагов RB43 и RB49 // Труды Кубанского государственного аграрного университета, принята к печати.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ – 2023

Зубов В.В.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия
e-mail: genseq@mail.ru

В этом году исполняется 70 лет открытию двойной спирали ДНК, а 16 лет назад (в мае 2007 года) было завершено секвенирование первого индивидуального генома человека [1]. И человеком этим стал Джеймс Уотсон, которому недавно (6 апреля) исполнилось 95 лет. В результате появилась новая единица исчисления – WGS (Whole Genome Sequencing), используемая как для описания производительности современных секвенаторов, так и для оценки масштабов геномных исследований.

В I квартале этого года начались продажи секвенатора NovaSeq X (Illumina, США, 895 000 дол. США), способного секвенировать до 64 геномов человека в день (>20 000 WGS в год). И уменьшить стоимость WGS до 200 дол. США. Производительность предыдущей флагманской модели компании Illumina (NovaSeq 6000) была примерно в 2 раза ниже. У конкурентов из Китая флагманская модель BGISEQ-T7 рассчитана на 20 000 WGS в год, причём в каталоге китайских разработчиков (MGI) в этом году появились секвенаторы BGISEQ-T10x4 и BGISEQ-T20x4, способные оцифровать за день до 180 геномов (>60 000 WGS в год). И WGS в Китае уже сейчас стоит меньше 200 дол. США.

Недавно на рынке геномного секвенирования появились и другие конкуренты, среди которых можно выделить компанию Element Bioscience с секвенатором Avity™ (269 000 дол. США), продажи которого стартовали в марте прошлого года. В начале этого года представители Element Bioscience объявили о значительных скидках на расходные реагенты, позволяющих уменьшить стоимость WGS до 200 дол. США. Заслуживает упоминания также компания Singular Genomics, выпустившая в продажу геномный секвенатор G4 в декабре прошлого года. А компания Ultima Genomics (США) обещает уменьшить стоимость WGS до 100 дол. США, хотя сроки выхода на рынок её секвенатора UG 100™ ещё не определены.

В основном подобные компании ориентируются на флуоресцентные технологии секвенирования, построенные на сканировании меченых флуорофорами мультимолекулярных кластеров ДНК. Длина секвенируемых фрагментов ДНК при этом невелика (обычно 100×2 или 150×2 п.о.), поэтому в ближайшем будущем лидерами рынка WGS могут стать конкуренты, ориентирующиеся на секвенирование длинных ридов (long read sequencing). Например, компания Pacific Biosciences начала продажи мономолекулярного флуоресцентного секвенатора Revio (799 000 дол. США), позволяющего секвенировать риды длиной до 20 000 п.о. (~1000 дол. США за WGS). Примерно столько же стоит секвенирование генома человека и на появившейся недавно в продаже модели нанопорового секвенатора компании Oxford Nanopore (PromethION P2 Solo, 10 455 дол. США). Причём нанопоровое секвенирование позволяет оцифровывать риды длиной более 100 000 п.о., а сравнительно высокая стоимость нанопорового WGS обусловлена не столько экономическими причинами, сколько ценовой политикой компании.

Крупные проекты по секвенированию индивидуальных геномов человека ориентируются преимущественно на использование флуоресцентных секвенаторов NovaSeq 6000 (Illumina, США) и BGISEQ-T7 (MGI, Китай). Причём самые крупные из них рассчитаны на секвенирование миллионов геномов (Китай – 100 млн WGS, Великобритания – 5 млн WGS, Евросоюз и США – по 1 млн WGS). Запущено и несколько менее амбициозных проектов, предусматривающих секвенирование десятков или сотен тысяч индивидуальных геномов человека [2]. Например, в Великобритании в этом году стартовала двухлетняя программа, предусматривающая секвенирование геномов 100 тысяч новорождённых [3].

Масштабы подобных проектов и программ ограничиваются в основном стоимостью WGS, которая в этом году заметно уменьшилась, и у многих сервисных компаний не превышает 400 дол. США (~33 тыс. руб. при 30-кратном покрытии генома). Рекордные показатели демонстрируют компания DanteLabs

(Италия), у которой секвенирование генома стоит всего 199 Евро (~16,5 тыс. руб.), и Nebula Genomics (США). Последняя утверждает, что WGS без обработки и анализа данных у них стоит 175 дол. США (с обработкой – 450 дол. США), причём секвенирование проводится в китайском Гонконге.

Услуги по полногеномному секвенированию в России сейчас предоставляют уже несколько компаний. Стоимость WGS у них стартует от 900 дол. США (70 тыс. руб., без обработки данных и учёта стоимости доставки ДНК в Германию), но секвенирование в российских лабораториях стоит ещё дороже (ООО «Геномед» – 1270 дол. США; ООО «Атлас» – 1300 дол. США; ООО «Эвоген» – 1320 дол. США; ООО «Генотек» – 1330 дол. США; ПАО «ЦГРМ «Генетико» – 1500 дол. США). Эти цены быстро меняются, причём в этом году такие изменения могут оказаться кардинальными.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Wheeler D.A., Srinivasan M., Egholm M., Shen Y., Chen L., McGuire A., He W., Chen Y.J., Makhijani V., Roth G.T., Gomes X., Tartaro K., Niazí F., Turcotte C.L., Irzyk G.P., Lupski J.R., Chinault C., Song X.Z., Liu Y., Yuan Y., Nazareth L., Qin X., Muzny D.M., Margulies M., Weinstock G.M., Gibbs R.A., Rothberg J.M.* The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing // *Nature*. 2008 Apr 17;452(7189):872-6. doi: 10.1038/nature06884. PMID: 18421352.
2. *Chu A.T.W., Fung J.L.F., Tong A.H.Y., Chow S.M., Chan K.Y.K., Yeung K.S., Lo H.M., Hong Kong Genome Project, Chung B.H.Y.* Potentials and challenges of launching the pilot phase of Hong Kong Genome Project // *J. Transl. Genet. Genom.* 2022;6:290–303.
3. A UK program will sequence the genomes of 100,000 newborn babies | CNN – <https://edition.cnn.com/2023/03/19/health/newborn-genomes-programme-uk-genomics-scen-spc-intl/index.html>

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ ПРОТИВ АНТИТЕЛ. БЫСТРЫЕ И ПОРТАТИВНЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ ИНФЕКЦИЙ

Клещенко Е.В.

АО «Сайенс Медиа Проджектс», PCR.NEWS, главный редактор
e-mail: klesch990@gmail.com

Во время пандемии COVID-19 стало очевидным, что тесты для выявления вируса должны быть не только точными, но и быстрыми. Чтобы затормозить распространение инфекции. Инфицированных индивидов необходимо определять при первых симптомах, а в идеале – до появления симптомов. Эта цель не может быть достигнута, если образец нужно транспортировать в лабораторию, поскольку получение результата откладывается на сутки. По-

этому портативные тесты на вирусные антигены начали дополнить или даже вытеснить тесты, основанные на анализе нуклеиновых кислот. Причины понятны: как для амплификации, так и для секвенирования нужны специальные инструменты, следовательно, возникают ограничения по скорости, портативности, возможности проводить работу вне лаборатории. Тем не менее, молекулярные тесты продолжают развиваться и в этом направлении.

Появляются быстрые тесты на основе ПЦР. Проведение термического цикла в полевых условиях осуществляется за счет оригинальных технических решений.

С ними успешно конкурируют тесты на основе изотермической амплификации, для которых не требуется термический цикл. Помимо широкоизвестного LAMP, появилось множество изотермических методов. В качестве примера можно привести тесты Luciga и «Эвотек Мирай Геномикс». Среди их преимуществ по сравнению с ПЦР – не только отсутствие требований к термоциклированию, но и скорость реакции.

Интерес представляют методы детекции на основе распознавания таргетной последовательности с помощью CRISPR, такие как SHERLOCK и DETECTR.

Свое место на рынке экспресс-тестирования ищет нанопоровое секвенирование в комбинации с изотермической амплификацией (LAMPORe).

В научных публикациях можно встретить и более необычные варианты детекции нуклеиновых кислот вирусов, такие как MARVE (ДНК-зонды и бумажный носитель, сложенный в виде «оригами», или ДНК-наноприманка (nanobait) – система для мультиплексной идентификации вирусов, в которой применяются конструкция на основе ДНК и нанопоровое зондирование.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТРАНСКРИПТОМНОГО ПРОФИЛЯ МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА МЕТОДОМ НАНОПОРОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Колотова А.А., Ломовская Я.В., Фадеев Р.С., Ермаков А.М.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия
e-mail: anas.kolotowa2010@yandex.ru

Транскриптом – это набор всех молекул РНК, транскрибированных из генома в данной клетке, на определенной стадии развития и при определенных физиологических или патологических условиях. Транскриптомный профиль можно рассматривать как снимок временного состояния клетки, и, таким образом, его анализ предоставляет не только информацию о функции генов, но и раскрывает детали пластичности генома, модификаций отдельных транскриптов и профиль экспрессии генов. Для изучения транскриптома применяется технология секвенирования РНК

(RNA-seq) с целью сравнения транскриптомов двух или более образцов и определения транскриптов с различающейся экспрессией [2]. Этот подход широко используется при изучении механизмов различных заболеваний.

Острые миелоидные лейкозы (ОМЛ) представляют собой клональные опухолевые заболевания кроветворной ткани, связанные с мутацией в клетке-предшественнице гемопоэза, следствием которой становятся блок дифференцировки и бесконтрольная пролиферация незрелых миелоидных клеток. FLT3 является членом семейства рецепторных тирозинкиназ класса III, которое также включает рецептор фактора роста тромбоцитов (PDGFR), рецептор колониестимулирующего фактора макрофагов (FMS) и рецептор фактора стволовых клеток (с-KIT), с которыми он имеет одинаковую структуру [3]. Этот белок функционирует как рецепторная тирозинкиназа, которая при связывании с лигандом запускает каскад сигнальной трансдукции, активирующий сигнальные пути STAT5, RAS/MAP, PI3K/AKT, которые регулируют рост, пролиферацию и продолжительность жизни гемопоэтических клеток [1]. Активирующие мутации в гене FLT3, включая внутренние тандемные дупликации (ITDs) и миссенс-точечные мутации в домене тирозинкиназы (TKD), являются молекулярными аномалиями, наиболее часто наблюдаемыми в клетках крови пациентов с ОМЛ. Мутации в гене FLT3 приводят к независимой от лиганда активации рецептора, в результате чего каскад реакций становится более продолжительным и происходит неконтролируемая активация генов, ответственных за пролиферацию клеток, в частности, сигнальных путей STAT5, RAS/MAP, PI3K/AKT [4]. Многие исследования показывают, что пациенты с мутациями FLT3 имеют худший прогноз, чем пациенты без изменений FLT3. Наличие мутации FLT3-ITD прямо коррелирует с низкой общей выживаемостью, и поэтому именно эта мутация стала широко распространенным фактором прогноза у пациентов с нормальным кариотипом. Больные ОМЛ с мутацией FLT3-ITD имеют неблагоприятный прогноз заболевания и короткую среднюю продолжительность жизни.

Целью исследования было проанализировать транскриптомы двух клеточных линий – THP-1 FLT3-wt и MV4-11 FLT3-ITD+ в нативном состоянии и при обработке химиотерапевтическим препаратом Квирзатиниб (Quirzatinib) для определения дифференциально экспрессирующихся генов. Выделение РНК проводили набором innuPREP RNA Mini Kit 2.0 (Analytik Jena, Германия), постановку реакции обратной транскрипции проводили с помощью набора для синтеза кДНК Mint (Евроген, Россия). Нанопоровое секвенирование проводили с помощью прибора MinION компании Oxford Nanopore Technologies с набором нативных баркодов EXP-NBD 104 и EXP-NBD 114. Анализ дифференциальной экспрессии генов и путей обогащения проводили с помощью локально установленного веб-приложения iDEP.96.

В результате анализа было получено 29885 экспрессируемых генов, выделены гены с наибольшей экспрессией. Для экспериментальной группы TNP-1 FLT3-wt найдено 146 генов с пониженной регуляцией и 152 гена с повышенной регуляцией в сравнении с контролем. Для экспериментально группы MV4-11 FLT3-ITD+ найдено 184 гена с пониженной регуляцией и 200 генов с повышенной регуляцией в сравнении с контролем. Также для каждой группы было проведено несколько анализов путей обогащения: Hallmark, KEGG, GSEA и GO по нескольким свойствам: клеточные компоненты, молекулярные функции и биологические процессы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Блау О.В.* Мутации генов при острых миелоидных лейкозах // Клиническая онкогематология. 2016;9(3):245–56. doi: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-245-256.
2. *Круглова Н.А., Филатов А.В.* Метод секвенирования РНК (RNA-SEQ) в иммунологических исследованиях // Иммунология. 2017; 38(2): 112–117. DOI: 10.18821/0206-4952-2017-38-2-112-117.
3. *Grafone T., Palmisano M., Nicci C., Storti S.* An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: biology and treatment // *Oncol Rev.* 2012;6(1):e8–e8. doi:10.4081/oncol.2012.e8.
4. *Gu T., Nardone J., Wang Y. et al.* Survey of Activated FLT3 Signaling in Leukemia // *PLoS ONE.* 2011;6(4):e19169. doi: 10.1371/journal.pone.0019169.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАНОПОРОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ И МЕТОДОВ БИОИНФОРМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА В ИССЛЕДОВАНИЯХ НА ПРИМЕРЕ ИСКОПАЕМОГО ОБРАЗЦА

Кольжецов Н.П., Шавкунов К.С., Озолин О.Н.

Лаборатория функциональной геномики прокариот, Институт биофизики клетки
РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН
kolya.kolzhecov@mail.ru

Современные геномные исследования не могут обойтись без методов высокопроизводительного секвенирования. Среди спектра доступных на сегодняшний день технологических решений отдельно стоит выделить так называемое «нанопоровое секвенирование».

В основе данного метода лежит использование молекул белков-пор, встроенных в мембрану. Через них, под действием электрического тока, могут проходить различные соединения, в частности одноцепочечные молекулы ДНК и РНК. Азотистые основания в составе нуклеиновых кис-

лот отличаются по размеру и, перекрывая отверстие поры, вызывают различное снижение силы тока через пору. Данное изменение можно детектировать, а затем расшифровать в текстовую последовательность. Наличие специального моторного белка, расплетающего двойную спираль ДНК за счет хеликазной активности, позволяет ограничивать скорость прохождения молекулы, что обеспечивает повышение точности расшифровки нуклеотидов.

Метод нанопорового секвенирования обладает большим количеством положительных качеств: высокой производительностью, быстротой и относительной простотой подготовки ДНК библиотек, возможностью прямого секвенирования РНК и определения метилированных оснований в ДНК и, самое главное, большой длиной прочтений. Последний факт позволяет более качественно восстанавливать геномные последовательности *de novo* и закрывать пробелы в геномах, прочтенных другими методами (Illumina, Ion Torrent, MGISEQ). Немаловажным преимуществом является постоянное совершенствование нанопоровой технологии, позволяющее повышать точность и скорость прочтения, а также развивать алгоритмы анализа данных. Большое количество доступных инструментов позволяет фильтровать и классифицировать прочтения, совершать сборку метагеномов, проверять различные гипотезы при помощи методов выравнивания.

Технология зарекомендовала себя для решения широкого спектра задач, в том числе и таких, которые связаны с исследованием микробиомов. Важно, что для нанопорового секвенирования нет необходимости проводить этап ПЦР, который может влиять на представленность последовательностей, принадлежащих тем или иным видам организмов в сообществе.

В данной работе мы рассказываем об опыте применения нанопорового секвенирования для изучения микробного сообщества из тонкого кишечника ископаемого *Bison priscus*.

Прочтения исследуемого нами древнего образца были получены с тотальной ДНК, выделенной из кишечного содержимого, а также после инкубации этого содержимого в анаэробных условиях. Прочтения были обработаны двумя различными способами: при помощи алгоритма Kraken2, который является классификатором последовательностей, и сервера MG-RAST, предоставляющего пайплайн для получения разнородной информации об образце. Оба метода анализа помогли выявить доминирование прочтений, принадлежащих психрофильным видам бактерий в образце, выделенном непосредственно из фекалий, и сформулировать гипотезу об их экспансии в кишечном содержимом после смерти бизона. Анаэробное культивирование выявило присутствие клостридий.

В целом, нужно отметить, что технология нанопорового секвенирования, являясь достаточно простой в освоении, может быть применена для ши-

рокого спектра научных и прикладных задач, как сама по себе, так и в сочетании с другими методами расшифровки последовательности ДНК.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Kim D., Song L., Breitwieser F.P. and Salzberg S.L.* Centrifuge: rapid and sensitive classification of metagenomic sequences // *Genome Res.* 2016. 26(12): 1721–1729.
2. *Kolmogorov M., Bickhart D.M., Behsaz B., Gurevich A., Rayko M., Shin S.B., Kuhn K., Yuan J., Pevlikov E., Smith T.P.L. and Pevzner P.A.* MetaFlye: scalable long-read metagenome assembly using repeat graphs // *Nature Methods.* 2020. 17(11): 1103–1110.
3. *Kolmogorov M., Yuan J., Lin Y. and Pevzner P.A.* Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs // *Nature Biotechnology.* 2019. 37(5): 540–546.
4. *Li H.* Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences // *Bioinformatics.* 2018. 34(18): 3094–3100.
5. *Nikolskiy P. and Shidlovsky F.* Preliminary data from the study of the intact 50 000 YBP frozen mummy of the Anyuy steppe bison (Anyuy River, Arctic Far East). 2014.
6. *Wang Y., Zhao Y., Bollas A., Wang Y. and Au K.F.* Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications // *Nature Biotechnology.* 2021. 39(11): 1348–1365.

НЕЛИНЕЙНАЯ ДИНАМИКА ОТКРЫТЫХ СОСТОЯНИЙ В ЗАМКНУТЫХ КОЛЬЦЕВЫХ МОЛЕКУЛАХ ДНК. МОДЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТ

Масулис И.С., Гриневич А.А., Якушевич Л.В.

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ
РАН, Пущино, Россия;
e-mail: kind-@mail.ru

При изучении функциональных свойств различных участков ДНК широко используются генетические конструкции, созданные на базе плазмид, содержащих гены флуоресцентных белков. Обычно изучаемые участки интегрируют в промежуточные области, расположенные между генами флуоресцентных белков. Динамические свойства таких конструкций, возможность образования и распространения в них локальных конформационных возмущений – солитонов, а также связь динамических свойств с функциональными мало исследованы. Также недостаточно изученным вопросом остается роль торсионного момента и его минимальные пороговые значения, необходимые для процесса транскрипции.

Одна из первых работ, посвященных такого рода исследованиям, была выполнена в 2021 году [1]. В этой работе динамика открытых состояний (транскрипционных пузырей), образующихся в изучаемом участке

в результате взаимодействия промоторов с РНК полимеразой, моделировалось как движение солитонов (кинков) в потенциальном поле локального окружения в генетических конструкциях *appY_red* (Red) и *appY_green* (Green) (рис. 1), созданных на базе плазмиды pPF1 [2].

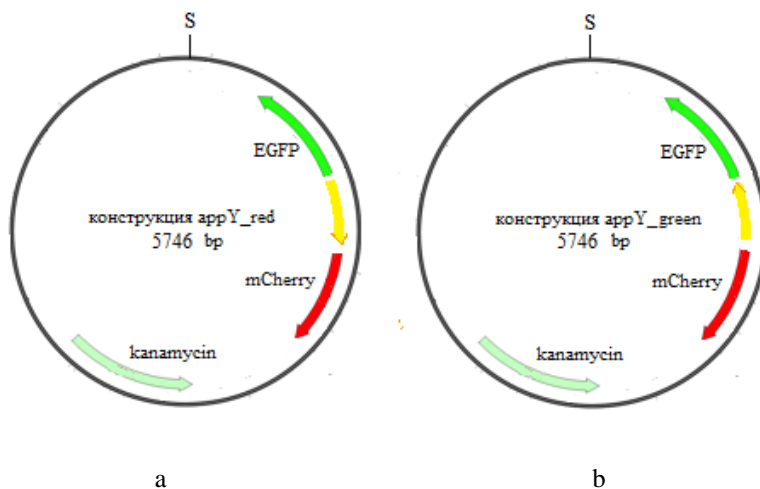


Рис. 1. Схематическое изображение двух генетических конструкций: *appY_red* (a) и *appY_green* (b). Желтым цветом обозначен исследуемый участок, зеленым – ген EGFP, красным – ген mCherry, светло-зеленым – ген Канамисин. Точка S указывает на начало нумерации нуклеотидной последовательности

В работе [1] была построена нелинейная математическая модель, имитирующая внутреннюю подвижность молекулы ДНК, найдены приближенные решения модельных уравнений, описывающие поведение открытых состояний в ДНК, построены энергетические профили потенциального поля для конструкций Red и Green. С помощью этих энергетических профилей удалось объяснить поведение кинка и предсказать преимущественное направление движения кинка (транскрипционного пузыря) в направлении гена красного белка mCherry в первом случае и в направлении гена зеленого белка EGFP во втором.

Чтобы проверить это предсказание и выявить роль торсионного момента и его минимальные значения, необходимые для процесса инициации транскрипции, мы провели экспериментальное исследование поведения кинков в конструкциях Red и Green. О направлении и интенсивности транскрипции судили по изображениям, полученным с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM 6000 B (рис. 2 A, D).

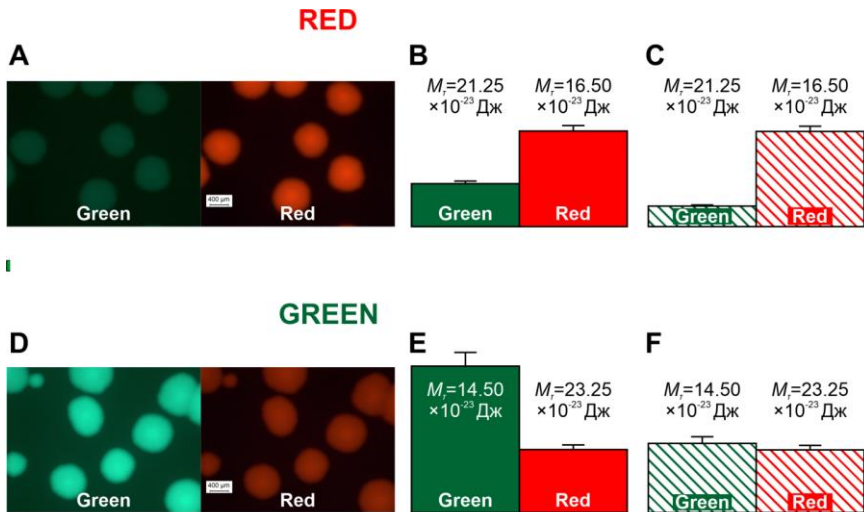


Рис. 2. Изображения флуоресценции колоний клеток *E. coli*, трансформированных плазмидными конструкциями *Red* (A) и *Green* (D). Диаграммы интенсивности свечения клеток, полученные с помощью программы *ImageJ* без учета параметра яркости свечения флуоресцентных белков для конструкций *Red* (B) и *Green* (E), и нормированные диаграммы с учетом параметра яркости свечения флуоресцентных белков для конструкций *Red* (C) и *Green* (F). Пороговые значения M_t казаны на диаграммах

Мы также улучшили нелинейную математическую модель, которая использовалась в работе [1], включив в модельные уравнения слагаемые, учитывающие постоянный торсионный момент ДНК. Улучшенная модель дала возможность оценить пороговые значения торсионного момента M_t , индуцированного РНК полимеразой во время транскрипции генов красного или зеленого белков (рис. 2 В, С, Е, F).

Сравнение данных, полученных экспериментальным путем, и результатов моделирования показало, что динамические факторы и, в частности, торсионный момент, который вносит важный вклад в эффективность инициации транскрипции, существенно влияют на поведение кинка, имитирующего формирование и миграцию открытых состояний ДНК, что и было целью нашего исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Гриневич А.А., Масулис И.С., Якушевич Л.В.* Математическое моделирование поведения транскрипционного пузыря в плазмиде *ppf1* и ее модификациях. Связь между энергетическим профилем плазмиды и направлением транскрипции // *Биофизика*, 2021, Т. 66, № 2, С. 248–258.
2. *Masulis I.S., Babaeva Z.Sh., Chernyshov S.V., Ozoline O.N.* Visualizing The Activity Of *Escherichia Coli* divergent promoters and probing their dependence on superhelical density using dual-colour fluorescent reporter vector // *Scientific Reports*, 2015. V. 5. P. 11449.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК ДЛЯ ВАЛИДАЦИИ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ МИШЕНИ РНК-ХЕЛИКАЗЫ DDX3

Сергеева О.В.

АО «ГенТерра»

e-mail: o.sergeeva@genterra.ru

Синтетические препараты на основе нуклеиновых кислот приобретают всё большую популярность в качестве терапевтических средств. Уже больше 15 препаратов на основе миРНК и антисмысловых олигонуклеотидов получило одобрение от Управления по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA) и Европейского агентства по лекарственным средствам (EMA) [1]. Применение терапевтических нуклеиновых кислот нацелено на модулирование экспрессии генов и привлекает внимание за счет высокой специфичности и длительности действия для лечения наследственных и приобретенных заболеваний. Однако также имеется ряд проблем, связанных с деградацией олигонуклеотидов под действием нуклеаз и неспецифичностью действия при наличии гомологичных мишеней, а также активацией иммунитета. Для решения этих вопросов ведется поиск новых химических модификаций синтетических нуклеиновых кислот, адресных методов доставки и специфичных новых мишеней для терапии [2]. В рамках данной работы мы валидировали РНК-хеликазу DDX3 в качестве мишени для терапии синтетическими миРНК в гепатоцитах, а также охарактеризовали потенциальный новый биомаркер – длинную некодирующую РНК LL35 *in vitro* и *in vivo*. Мы показали, что эффективность ингибирования мРНК DDX3 синтетическими миРНК *in vitro* и *in vivo* влияет на фенотип гепатоцитов, а при снижении уровня мРНК более чем на 85% приводит к гибели клеток, что необходимо принимать во внимание при разработке терапии на основе этой мишени. Полученные данные демонстрируют необходимость комплексного подхода к поиску как новых мишеней для терапии, так и применения синтетических нуклеиновых кислот в качестве те-

рапевтических агентов. На территории РФ найдется не более 3–4 биотехнологических компаний, предлагающих комплексный подход к разработке потенциальных терапевтических олигонуклеотидов. Так биотехнологическая компания АО ГенТерра предлагает полный спектр услуг по дизайну, синтезу и очистке синтетических миРНК, антисмысловых олигонуклеотидов, аптамеров, гидовых РНК для ингибирования генов-потенциальных мишеней для терапии *in vitro* и *in vivo*, а также специализируется на синтезе праймеров, химически модифицированных олигонуклеотидов, флуоресцентно-меченых зондах, применяемых в ПЦР, ОТ-ПЦР, флуоресцентной гибридизации *in situ*, генотипировании и других методах молекулярной биологии и диагностики, а также разработку биоаналитических методов (ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС), дополнительных методов очистки, проверку на эндотоксины и тестированию миРНК/антисмысловых РНК *in vitro/in vivo*, а также оценке жизнеспособности, миграции и апоптоза в клетках. Команда АО ГенТерра открыта к новому сотрудничеству и проектам как в области молекулярной диагностики, так и в научной сфере.

Исследование поддержано грантом РФФ № 19-74-00119.

ЛИТЕРАТУРА

1. Goga A., Stoffel M. Therapeutic RNA-silencing oligonucleotides in metabolic diseases // Nat. Rev. Drug Discov. 2022. V. 21. P. 417–439.
2. Kulkarni J., Witzigmann D., Thomson S., Chen S., Leavitt B., Cullis P., Meel R. The current landscape of nucleic acid therapeutics // Nat. Nanotechnol. 2021. V. 16. P. 630–643.

ДНК-ПОВРЕЖДАЮЩИЕ ЭФФЕКТЫ УСКОРЕННЫХ ИОНОВ УГЛЕРОДА

Сирота Н.П.¹, Пикалов В.А.², Смирнова Е.Н.¹, Розанова О.М.¹,
Белякова Т.А.³

¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

² Институт физики высоких энергий имени А.А. Логунова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Протвино, Россия

³ Физико-технический центр Физического института им. П.Н. Лебедева, Протвино, Россия

e-mail: sirota@iteb.ru

Ускоренные ионы рассматриваются в мире как перспективный метод для радиотерапии онкологических заболеваний. В России на базе ускорительных научных центров созданы экспериментальные установки для проведения те-

стовых испытаний. Одна из них «Радиобиологический стенд на углеродном пучке У-70» в г. Протвино на базе НИЦ «Курчатовский институт» – ИФВЭ. Эта установка предназначена для исследований на ускоренных ионах углерода в диапазоне энергий 150–450 МэВ/нуклон.

В исследованиях противоопухолевого действия ионов углерода используют четыре режима облучения: до и после пика Брэгга, а также в узком и модифицированном (расширенном) пиках Брэгга. С нашей точки зрения, для целей ионной радиотерапии наиболее перспективным является использование узкого пика Брэгга, который обладает по сравнению с расширенным пиком большей линейной потерей энергии, что обуславливает его более высокую биологическую эффективность. В узком пике Брэгга происходит максимальная потеря энергии ускоренными ионами углерода, и самое важное – ширина пика Брэгга не превышает 2 мм, что позволяет точнее облучать мишень. Оборудование установки позволяет использовать все режимы облучений.

Основной мишенью при действии излучений на клетки является молекула ядерной ДНК. ДНК-повреждающие эффекты можно оценивать различными методами. В связи с особенностями физического взаимодействия ускоренных ионов с биологическими объектами и технической спецификой ускорителей существует необходимость адаптации старых и разработки новых молекулярных методов для определения повреждений ДНК при действии ионов углерода. В настоящем исследовании мы использовали два подхода: оценка уровня первичных структурных повреждений в ДНК индивидуальных клеток или нуклеоидах методом «комета-тест» (Comet assay) и изучение экспрессии мРНК ряда генов в клетках асцитной карциномы Эрлиха и ЕМРТ, облученных *in vivo*, ускоренными ионами углерода с энергией 450 МэВ/нуклон в узком пике Брэгга. Важно отметить, что облучению одновременно подвергались как препараты для исследований методом Comet assay, так и клетки асцитной карциномы Эрлиха и ЕМРТ, используемые для выделения тотальной РНК для последующей оценки экспрессии ряда генов методом ПЦР в реальном времени. Препараты для исследований методом Comet assay готовились в двух модификациях: препараты первой группы подвергались процедуре лизиса немедленно после приготовления препаратов и хранились до момента облучения согласно опубликованной нами процедуре; вторая группа препаратов представляла собой живые клетки, иммобилизованные в легкоплавкую агарозу. Эти препараты готовили в день облучения, помещали в среду RPMI1640 и хранили в ней до момента облучения ускоренными ионами углерода.

Для одновременного облучения препаратов из обеих групп мы разработали и изготовили специальные держатели, которые полностью вписывались в поле облучения ускоренными ионами углерода. Размер этого поля представлял собой круг диаметром 6 см. Равномерность облучения в пределах всего поля составляла не ниже 95%. В верхнем ряду держателя располагали 4 препарата

с нуклеоидами, а в нижнем ряду находились 4 препарата с живыми опухолевыми клетками. Сформированный таким образом объект помещали в водный фантом с прецизионной 3D-системой перемещения. В узком пике Брэгга была выполнена серия облучений дозами 2, 4 и 8 Гр. Измерение дозы при облучении проводилось с помощью плоскопараллельной ионизационной камеры, откалиброванной по показаниям клинического дозиметра UNIDOS webline (PTW Freiburg, Германия) с ионизационной камерой Farmer 30013.

В результате проведенных исследований было обнаружено, что ДНК-повреждающие эффекты более сильно выражены при облучении живых клеток по сравнению с реакцией в нуклеоидах тех же клеток (рис.). Интересно отметить, что на препаратах, облученных аналогичными дозами рентгеновского излучения, с увеличением дозы не регистрировалось достоверного превышения уровня % TDNA (содержание ДНК в хвосте кометы, которое характеризует степень повреждения), по сравнению с облучением ускоренными ионами углерода. Полученные результаты, возможно, отражают специфику действия ионов углерода на ДНК клетки, поскольку известно, что при действии ускоренных частиц образуются сложные кластерные повреждения ДНК, по структуре отличающиеся от таковых при действии фотонного излучения. Облучение живых клеток приводило к достоверному повышению уровня повреждений в первичной структуре ДНК при всех исследованных дозах. Мы полагаем, что это различие связано с функционированием внутриклеточных систем контроля целостности структуры ДНК.

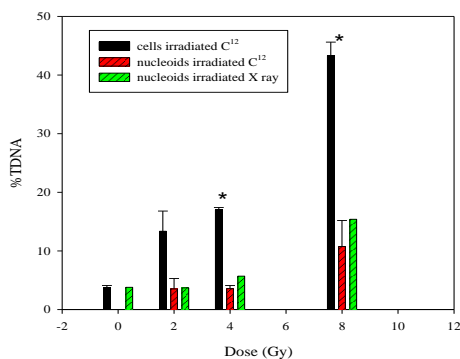


Рисунок. Зависимость уровня поврежденности ДНК (%TDNA) в нуклеоидах либо живых клетках ЕМРТ от дозы облучения ускоренными ионами углерода или рентгеновским излучением (mean ± SEM).
* – $p < 0,05$ отличия от контроля

Таким образом, разработана методика облучения клеток, позволяющая регистрировать повреждения ДНК при облучении высокоэнергетическими ионами углерода. Получена дозовая зависимость выхода %TDNA, что свидетельствует о значительном качественном и количественном различии действия ионов углерода на ДНК клеток.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЙ NGS-ПОРТРЕТ ЧЕЛОВЕКА: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТИЛИРОВАНИЯ САЙТОВ RCGY В ГЕНОМАХ

*Томилов В.Н.¹, Абдурашитов М.А.¹, Гончар Д.А.¹, Снежкина А.В.²,
Краснов Г.С.², Кудрявцева А.В.^{2,3}, Дегтярев С.Х.¹*

- ¹ СибЭнзайм, Новосибирск
 - ² Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Москва
 - ³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии»
Министерства здравоохранения РФ
- e-mail: vicont@sibenzyme.ru

Интерес к анализу метилирования геномной ДНК в последнее время неуклонно растёт, что вызвано важной ролью этой эпигенетической модификации для нормального функционирования клеток. Особенное внимание при этом уделяется aberrантному метилированию различных участков ДНК, возникающим при малигнизации клеток, поскольку такие нарушения могут быть использованы для диагностики онкологических заболеваний [1–3]. Однако накоплению данных по метилированию геномной ДНК препятствует ряд трудностей, связанных с недостатками используемых методов, а также с трудоемкостью и дороговизной такого рода исследований [4–5].

Ранее нами был предложен простой метод определения положения метилированных сайтов R(5mC)GY в геноме человека, основанный на расщеплении ДНК метилзависимой ДНК-эндонуклеазой Glal и секвенировании образуемых фрагментов генома на NGS-приборе. Этот метод был использован для установления значительного числа метилированных сайтов в геноме клеточной линии Raji с помощью секвенирования на приборе Illumina MiSeq. Анализ результатов показал хорошее соответствие с данными, полученными при локус-специфическом определении статуса метилирования ряда генов-онкосупрессоров путем Glal-ПЦП-анализа [6].

В продолжении исследований было решено провести более масштабное секвенирование Glal-фрагментов геномов малигнанных клеточных линий Raji и U-937, а также немалигнantly клеточной линии L-68 для выявления различий в метилировании сайтов RCGY с учётом того, что метод секвенирования Glal-фрагментов не позволяет выявлять все метилированные цитозиновые основания генома, так как расщепление может происходить лишь по сайтам узнавания ферментов. Другим ограничением разрабатываемого метода является возможность секвенирования фрагментов лишь определенного диапазона длин, связанная

с принципами работы современных секвенирующих машин. Однако, как было показано, метилирование в менее GC-богатых участках генома, таких как «берега CpG-островков» и отдаленных энхансерах, также важно для регуляции генной активности и может использоваться для различения опухолевых и нормальных клеток [7, 8]. Полученные нами результаты указывают на то, что число выявляемых метилированных сайтов в геноме достаточно велико и превышает число, определяемое с помощью ДНК-чиповых технологий (например, с помощью Illumina Infinium). Это дает возможность проводить сравнительный анализ с целью выявления позиций, перспективных в качестве эпигенетических маркеров заболеваний. Важным преимуществом нового метода является его простота по сравнению с методами, основанными на аффинном связывании метилированных участков и/или бисульфитной конверсии, которые все еще трудоемки и дорогостоящи [9, 10].

Итогом работы стало картирование метилированных сайтов RCGY в геномах двух малигнанных клеточных линий и контрольной клеточной линии фибробластов легких. Проведенный анализ выявил существенные отличия по метилированию генов, повторов, CpG-островков между тремя геномами. Обнаружены различия по степени метилирования различных групп повторов, которые, возможно, могут быть использованы в диагностических целях при условии разработки достаточно чувствительных методов анализа. Создана база данных, содержащая результаты картирования метилированных сайтов в геномах. Полученные данные по метилированию регуляторных участков различных генов, сопоставленные с ранее опубликованными данными, могут быть использованы для поиска маркеров метилирования для диагностики онкологических и некоторых других заболеваний. Таким образом, разработанный простой и нетрудоемкий метод картирования метилированных сайтов R(5mC)GY в геномах может быть использован на практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Tollefsbol T.O.*, Ed. Epigenetics in human disease. Amsterdam, New York: Academic Press; 2012.
2. *Brookes E., Shi Y.* Diverse epigenetic mechanisms of human disease. *Annu Rev. Genet.* 2014;48:237-68.
3. *García-Giménez J.L.*, Ed. Epigenetic biomarkers and diagnostics. London: Academic Press; 2015.
4. *Laird P.W.* Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis // *Nat. Rev. Genet.* 2010;11:191–203.
5. *Fouse S.D., Nagarajan R.P., Costello J.F.* Genome-scale DNA methylation analysis // *Epigenomics.* 2010;2:105–17.

6. *Abdurashitov M.A., Tomilov V.N., Gonchar D.A., Kuznetsov V.V., Degtyarev S.K.* Mapping of R(5mC)GY sites in the genome of human malignant cell line Raji // *Biol Med (Aligarh)*. 2015;7:BM-135-15.
7. *Irizarry R.A., Ladd-Acosta C., Wen B., Wu Z., Montano C., Onyango P., Cui H., Gabo K., Rongione M., Webster M., Ji H., Potash J.B., Sabunciyan S., Feinberg A.P.* The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores // *Nat. Genet.* 2009;41:178-86.
8. *Aran D., Hellman A.* DNA methylation of transcriptional enhancers and cancer predisposition // *Cell*. 2013;154:11-3.
9. *Umer M., Herceg Z.* Deciphering the epigenetic code: an overview of DNA methylation analysis methods // *Antioxid Redox Signal*. 2013;18:1972-86.
10. *Laird P.W.* Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis // *Nat. Rev. Genet.* 2010;11:191-203.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ ДНК НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ДАННЫХ NGS В КЛИНИЧЕСКИХ ЦЕЛЯХ

Хмелькова Д.Н.

Публичное акционерное общество «Центр Генетики и Репродуктивной Медицины «Генетико», Москва, Россия
e-mail: khmelkova@genetico.ru

Секвенирование ДНК нового поколения (next generation sequencing, NGS) – сравнительно новый метод исследования, который, тем не менее, уже достаточно прочно вошел в клиническую практику при диагностике наследственных моногенных заболеваний и постепенно приобретает популярность в области онкогенетики. К преимуществам метода относится его высокопроизводительность, позволяющая выявлять генетические варианты в любом количестве генов в ходе одного исследования, вплоть до полного экзона или полного генома. Вместе с тем, у метода есть свои недостатки, основными из которых являются достаточно высокая стоимость и сравнительно долгие сроки выполнения исследования. Кроме того, как и у любого лабораторного метода, у секвенирования нового поколения есть свои ограничения.

Интерпретация данных NGS в клинических целях обладает рядом особенностей и требует определенных знаний и навыков. Существуют российские и международные клинические рекомендации по интерпретации данных NGS, однако, несмотря на то, что предоставленные рекомендации позволяют стандартизовать процесс интерпретации результатов, в реальной практике они оказываются недостаточно подробными, чтобы исключить вариабельность интерпретации различными клиническими лабораториями и специалистами.

Отдельную сложность представляет интерпретация клиницистами полученного в результате секвенирования результата (заключения). С учетом большого спектра различных находок, которые могут быть выявлены в ходе NGS и вынесены в заключение, клиницисты могут столкнуться со сложностями, как в процессе консультирования пациентов, так и в части принятия решений на основе полученного результата.

Представленный доклад посвящен вопросам преимуществ и недостатков метода NGS в контексте применения в клинической практике, особенностям клинической интерпретации данных и плюсам и минусам внедрения метода NGS в рутинную клиническую практику.

НЕБИОЛОГИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛ ДНК

Чемерис А.В.¹, Гарафутдинов Р.Р.¹, Сахабутдинова А.Р.¹, Чемерис Д.А.²

¹ Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

² ООО ГЕНВЕД, Москва, Россия

e-mail: chemeris@anrb.ru

Прежде чем перейти к вопросам небιοлогического применения ДНК, все же нужно коснуться истории открытия и исследования этого биополимера, функция которого долго оставалась неясна. Итaк, изучение ДНК насчитывает чуть более полутора столетий после того, как Ф. Мишер в 1869 г. открыл доселе неизвестное вещество, назвав его нуклеином [1], позже переименованным в нуклеиновую кислоту. Но ушло много времени, чтобы определить все составные части и прочие особенности этого уникального биополимера, причем в этом весьма активное участие приняли наши соотечественники, чему уделено внимание в статье, посвященной ранним исследованием нуклеина [2]. Лишь после того как выяснилось, что углевод, входящий в состав нуклеина (к тому времени известного как тимонуклеиновая кислота), представлен 2-дезоксидрибозой [3], его стали (и то не сразу) называть дезоксирибонуклеиновой кислотой, или ДНК. Одно из первых обозначений этой кислоты как «desoxyribonucleic» приводится в статье, доказавшей причастность ДНК к передаче наследственной информации [4]. Чуть позже появилось и нынешнее обозначение этой кислоты без буквы «s» как «deoxyribonucleic». По всей видимости, одно из первых упоминаний в русскоязычной литературе этого вещества как «дезоксирибонуклеиновой кислоты», или «ДНК» встречается лишь в 1955 г. [5], поскольку до этого ее называли просто нуклеиновой кислотой, тимонуклеиновой кислотой, ядерной нуклеино-

вой кислотой, дезоксирибозной нуклеиновой кислотой дезоксипентозного типа, а также нуклеопротеидом. Но к тому времени произошло еще одно эпохальное открытие (первым нужно считать открытие самого нуклеина) в виде установления в 1953 г. структуры ДНК как двойной спирали [6].

С тех пор наши знания об этом биополимере многократно увеличились, причем настолько, что благодаря появившимся новым технологиям ДНК представляет интерес теперь не только как универсальное вещество наследственности. При этом потребовалось несколько десятилетий до того как молекулы ДНК попытались использовать в небиологических целях в виде самособирающихся наноструктур [7], для молекулярных вычислений, получивших название «ДНК-компьютинг» [8], для ДНК-криптографии и ДНК-стеганографии [9], для долговременного хранения различных данных [10]. Но еще раньше оригинальную идею о радикальной миниатюризации элементов записи, хранения и извлечения дискретной информации на молекулярно-атомном уровне с использованием нуклеиновых кислот высказал известный советский ученый М.С. Нейман [11]. Однако настоящий интерес к небиологическому применению ДНК возник после упомянутой выше статьи Л. Адлемана [8]. При этом наибольшие успехи в деле небиологического применения ДНК достигнуты в хранении небиологической информации, а новый всплеск интереса к этому вызвала статья G.M. Church и соавт. [12], однако они в ней допустили принципиальную ошибку, предложив однобитное кодирование с плотностью записи один бит на нуклеотид в виде $A,C \leftrightarrow 0, G,T \leftrightarrow 1$. Вообще, комбинаций двух нуклеотидов из четырех возможных может существовать 3 варианта, но для подобной цели только один из них правильный. Исходя из того, что ДНК состоит из двух типов азотистых оснований – пуринов (А и G) и пиримидинов (С и Т), нами предложено именно их использовать для отображения в однобитном формате цифровых данных, представленных «0» и «1». Приняв во внимание, что пиримидины (Pu) несколько мельче пуринов (Pu), последними логичнее кодировать «1», а пиримидины тогда будут соответствовать «0» (впрочем, можно и наоборот). Такой способ отображения цифровых данных молекулами ДНК (олигонуклеотидами), состоящими из пиримидинов и пуринов, был назван нами «двойной пиримидин-пуриновой (PuPu) кодировкой» – $C,T \leftrightarrow 0; A,G \leftrightarrow 1$ [13]. При подобной ДНК-цифровизации возникает ситуация, схожая с имеющей место при кодировании генетической информации избыточностью генетического кода, тогда как здесь налицо «избыточность компьютерно-нуклеинового кода», выражающаяся в том, что «0» и «1» можно на выбор в реальной последовательности кодировать цитозином либо тиминном, и аденином или гуанином, соответственно, что крайне важно для использования при хранении цифровых данных наиболее подходящих нуклеотидных последовательностей.

Еще раз возвращаясь к Адлеману, можно привести одно его высказывание, с которым нельзя не согласиться – *DNA is essentially digital*, но он при этом не рассматривал ДНК как состоящую из пуринов и пиримидинов, и поэтому напрашивается уточнение: «ДНК, как набор пиримидинов и пуринов, абсолютно цифровая молекула».

Основную роль в небιологическом применении ДНК играет биологический принцип комплементарности азотистых оснований, согласно которому в двойной спирали ДНК аденин спаривается с тиминином, а гуанин – с цитозином. Хотя недавно показано, что в тех же молекулярных вычислениях (и не только) допустимы отдельные неспаривания [14], но комплементарность в целом все равно остается главенствующей.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Byrne J., Dahm R.* Friedrich Miescher and the 150th anniversary of the discovery of DNA // *Biomics*. 2019. V. 11(3). P. 249–258. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-23.
2. *Гарафудинов Р.Р., Чемерис А.В.* «Российский след» в ранних исследованиях нуклеиновых кислот // *Biomics*. 2019. Т. 11(3). С. 266–281. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-25.
3. *Levene P.A., London E.S.* The structure of thymonucleic acid // *J. Biol. Chem.* 1929. V. 83. P. 793–802. doi: 10.1016/S0021-9258(18)77108-1.
4. *Avery O.T., MacLeod C.M., McCarty M.* Studies of the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* Type III // *J Exp Med.* 1944. V. 79(2). P. 137–158. DOI: 10.1084/jem.79.2.137.
5. *Белозерский А.Н., Абелев Г.И.* К вопросу об единстве химической структуры ядерного материала растительных и животных клеток // *Вестн. Моск. ун-та. (Сер. физ.-мат. и естеств. наук)*. 1955. № 9. Вып. 6. С. 103–108.
6. *Watson J.D., Crick F.H.C.* A structure for deoxyribose nucleic acid // *Nature*. 1953. V. 171(4356). P. 737–738. DOI: 10.1038/171737a0.
7. *Seeman N.C.* Nucleic acid junctions and lattices // *J. Theor. Biol.* 1982. V. 99(2). P. 237–247. DOI: 10.1016/0022-5193(82)90002-9.
8. *Adleman L.M.* Molecular computation of solutions to combinatorial problems // *Science*. 1994. V. 266(5187). P. 1021–1024. DOI: 10.1126/science.7973651.
9. *Clelland C.T., Risca V., Bancroft C.* Hiding messages in DNA microdots // *Nature*. 1999. V. 399(6736). P. 533–534. DOI: 10.1038/21092.
10. *Bancroft C., Bowler T., Bloom B., Clelland C.T.* Long-term storage of information in DNA // *Science*. 2001. V. 293(5536). P. 1763–1765. DOI: 10.1126/science.293.5536.1763c.
11. *Нейман М.С.* Некоторые принципиальные вопросы микроминиатюризации // *Радиотехника*. 1964. Т. 19(1). С. 3–12.
12. *Church G.M., Gao Y., Kosuri S.* Next-generation digital information storage in DNA // *Science*. 2012. V. 337(6102). P. 1628. DOI: 10.1126/science.1226355.

13. *Garafutdinov R.R., Chemeris D.A., Sakhabutdinova A.R., Kiryanova O.Y., Mikhaylenko C.I., Chemeris A.V.* Encoding of non-biological information for its long-term storage in DNA // *Biosystems*. 2022. V. 215–216. P. 104664. DOI: 10.1016/j.biosystems.2022.104664.
14. *Nikitin M.P.* Non-complementary strand commutation as a fundamental alternative for information processing by DNA and gene regulation // *Nat. Chem.* 2023. V. 15(1). P. 70–82. DOI: 10.1038/s41557-022-01111-y.

ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ЦЕНТРЕ ВНЕДРЕНИЯ ГЕНОМНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ МФТИ

*Эрдынеева Д.Б.¹, Шабалина Е.Ю.¹, Зоригт Д.¹, Петерсен Е.В.¹,
Ермаков А.М.^{1,2}, Гудков Д.А.^{1,3}*

- ¹ Московский Физико-Технический Институт, Долгопрудный, Россия
 - ² Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия
 - ³ ООО «Омнином», г. Истра, Россия
- e-mail: gudkovdenis@gmail.com

Генетические исследования являются одними из наиболее перспективных мировых технологий. Интеграция новых генетических технологий в клиническую практику открывает большие перспективы для персонализации медицинской помощи и разработки, а также проведения большего количества точных и неинвазивных исследований [1].

В России, начиная с 2019 года, реализуется Федеральная научно-техническая программа развития генетических технологий [2]. В ее рамках предполагается комплексное решение задач ускоренного развития генетических технологий, в том числе технологий генетического редактирования. Программой предусмотрены создание и развитие на базе научных и образовательных организаций лабораторий и центров, проведение научных исследований и разработок с применением генетических технологий, включая разработку биологических препаратов, диагностических систем и иммунобиологических средств для здравоохранения, биотехнологий для сельского хозяйства и промышленности.

В Центре Внедрения геномных технологий, функционирующем на базе МФТИ, в соответствии с этой программой реализуются исследования по различным направлениям.

В структуре хромосомной патологии человека 45% случаев относятся к анеуплоидиям половых хромосом, а 25% приходится на группу

аутосомных трисомий, самыми частыми из которых являются трисомии по хромосомам 21, 18, 13 (Тр21, Тр18, Тр13). Ввиду отсутствия методов коррекции данных патологий необходимо совершенствовать методы пренатального тестирования, в качестве основной стратегии профилактики хромосомных болезней, при этом делая акцент на неинвазивных методах, поскольку в иных случаях в 1,5–2% случаев инвазивных методов дородовой диагностики может происходить самопроизвольное прерывание беременности [3]. Также возникает риск инфицирования плода. В связи с этим была разработана мультиплексная тест-система (40-plex) ddPCR с использованием универсальных зондов с LNA-вставками, чтобы надежно различать эуплоидные и анеуплоидные образцы. Разработка мультиплексной ddPCR осуществлена с учётом распределения Пуассона. Анализ 60 клинических образцов плазмы (30 образцов для проверки анализа и 30 эуплоидных образцов), подтверждённых методом NGS, показал 100% точность. Также представляет проблему выделение свободноциркулирующей ДНК плода из биологического образца матери и ее консервация [4] для дальнейшего анализа. На базе Центра была произведена разработка соответствующих технологий, что позволило создать базу для проведения на базе Центра полного цикла неинвазивного пренатального скрининга начиная с обработки биологических образцов.

Ведется работа по разработке генетических панелей, предназначенных для интерпретации результатов генетических исследований, в частности, панель для оценки стрессоустойчивости. Стрессоустойчивость в широком смысле определяется как жизнестойкость, на нее влияют как факторы окружающей среды, так и индивидуальные генетические особенности. Исследования генетических факторов жизнестойкости, включая исследования на близнецах, предположили наследуемость на уровне 52% [5]. Обширный обзор литературы и проведенных исследований позволил составить генетическую панель стрессоустойчивости, состоящую из 60 наиболее актуальных полиморфизмов, взаимосвязанных с жизнестойкостью (ADRB2, APOE и др.). Данная панель была протестирована на российской выборке.

Для определения спортивных особенностей после анализа литературы были собраны две генетические панели, включающие в себя генетические маркеры выносливости (15 генов, вкл. ACOXL, CAMK1D, CLSTN2 и др.), а также быстроты и силы (19 генов, вкл. ARHGEF28, CACNG1, CALCR и др.), поскольку были установлены ассоциации данных генов с предрасположенностью к определенным видам спорта. Данные панели уже протестированы на российской выборке, получены первые результаты.

Также ведется разработка прототипа панели нормировочных (контрольных) генов для дизайна молекулярно-диагностической панели для анализа образцов солидных опухолей методом ОТ-ПЦР-РВ. Выбор нормировочных генов является крайне важным, так как экспрессия анализируемых генов сильно зависит от стабильности экспрессии выбранных референсных генов во всех исследуемых образцах. Для опухолевых тканей необходимо учитывать, что биоптаты всегда содержат разное количество опухолевых клеток, часто менее 50%. В рамках исследования 11 видов рака (эндометрия, желудка, шейки матки, глиобластомы и др.) были протестированы 40 генов-кандидатов: 30 генов, которые часто используются в качестве референсных при проведении ОТ-ПЦР-РВ для человеческих образцов (*GAPDH*, *ACTB*, *PS18*, *IPO8* и проч.) и 10 потенциальных пан-опухолевых референсных генов (*MBTPS1*, *HNRNPA0*, *SF3A1* и проч.) [6]. Гены *GGNBP2*, *RTF1* и *CIAO1* стабильно экспрессируются во всех рассмотренных типах рака и имеют по одному аннотированному сплайс-варианту, поэтому были выбраны в качестве нормировочных. На данном этапе проводится оптимизация условий ОТ-ПЦР-РВ и валидация разработанной панели.

Таким образом, на данный момент задачи, предусмотренные первым этапом Федеральной программы развития генетических технологий [2], на базе Центра Внедрения Геномных Технологий МФТИ выполнены в полной мере. В перспективе будут разработаны лабораторные регламенты проведения анализа методом ОТ-ПЦР-РВ с использованием разработанных подписей для определения микросателлитной нестабильности и мутационной нагрузки солидных опухолей. Также будут разработаны прототипы транскриптомных подписей: 1) для прогноза ответа пациентов с глиобластомой на химиотерапию; 2) для дифференциальной диагностики глиобластомы и других опухолей головного мозга, прежде всего – глиом низкой степени злокачественности; 3) для прогноза выживаемости пациентов при ряде раковых опухолей и др.

Исследование было выполнено при использовании ресурсов ЦКП МФТИ «Прикладная генетика» (грант №075-15-2021-684, гос. задание 730000Ф.99.1.БВ10АА00006).

ЛИТЕРАТУРА

1. Chan I.S., Ginsburg G.S. Personalized medicine: progress and promise // Annual review of genomics and human genetics. 2011. Т. 12. Р. 217–244.
2. Постановление Правительства РФ от 22 апреля 2019 г. № 479 «Об утверждении Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 годы».
3. Zimmermann B. et al. Novel Real-Time Quantitative PCR Test for Trisomy 21 // Clin. Chem. 2002. V. 48. № 2. Р. 362–363.

4. *Ehrich M. et al.* Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: A study in a clinical setting // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2011. V. 204, № 3. P. 205.e1–205.e11.
5. *Amstadter A.B., Myers J.M., Kendler K.S.* Psychiatric resilience: Longitudinal twin study // *Br. J. Psychiatry.* 2014. V. 205, № 4. P. 275–280.
6. *Krasnov G.S. et al.* Pan-cancer analysis of TCGA data revealed promising reference genes for qPCR normalization // *Front. Genet.* 2019. V. 10, № MAR. P. 1–11.

СПОНСОРЫ

SkyGen

ООО «SkyGen»



NEXTGENSEQ. TECH

ООО «Альгавитапро» NextGenSeq
Rus – Официальный дистрибьютор
Cegat GmbH

**GEN
TERRA**

ООО «Гентерра»



ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ

ООО «ДНК-Технология»

СИНТОЛ
НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННАЯ КОМПАНИЯ

ООО «Синтол»



SibEnzyme

ООО «СибЭнзим»

**Материалы конференции
«День ДНК – 2023»
25 апреля 2023 года**

СБОРНИК ТЕЗИСОВ

Составители
пресс-служба ИТЭБ РАН:
к.б.н. Перевязова Т.А.,
к.б.н. Дюкина А.Р.,
к.б.н. Зубов В.В.
Оформление Абакумовой Ю.Ю.

