




Институт теоретической и экспериментальной
биофизики РАН

МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ
«ДЕНЬ ДНК – 2019»

25 апреля 2019 г.

СБОРНИК ТЕЗИСОВ



Издательство «Синхробук»
Пуццино
2019

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

**МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ
«ДЕНЬ ДНК — 2019»**

25 АПРЕЛЯ 2019 г.

СБОРНИК ТЕЗИСОВ

Издательство «Синхробук»
Пушино
2019

Материалы конференции «День ДНК — 2019». 25 апреля 2019 г. Сборник тезисов / 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. Под редакцией зам. директора по науке ИТЭБ РАН к.б.н.
Левина С.Г. — Пушкино : ИТЭБ РАН, изд-во «Синхробук» (SynchrobookTM), 2019.

ISBN 978-5-91874-025-5

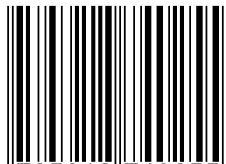
25 апреля 1953 года Джеймс Уотсон и Фрэнсис Крик, заявили в статье в журнале Nature (Watson J.D., Crick F.H.C. Molecular structure of nucleic acids // Nature. 1953. V. 171. P. 738—740), что молекула ДНК представляет собой двойную спираль. Статья заканчивалась предположением, что открытие структуры ДНК 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 году 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, 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.

Поначалу праздник был неофициальным, но потом, благодаря инициативе конгресса США, он приобрел статус национального праздника. В 2017 году День ДНК впервые отметили и в стенах Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН. Два года подряд в ИТЭБ РАН проходили семинары, приуроченные к этой дате. На этих семинарах пушинские и московские ученые рассказывали о разных аспектах работы с ДНК. В 2019 году семинар вырос в конференцию.

Первый доклад этой конференции посвящен истории генетики — выдающийся ученый и популяризатор науки С.Э. Шноль, расскажет о Н.К. Кольцове, который первым разработал гипотезу молекулярного строения и матричной репродукции хромосом, предвосхитившую главнейшие принципиальные положения современной молекулярной биологии и генетики. Далее участники конференции познакомят слушателей с работами, посвященными последним достижениям в изучении генов, геномов и ДНК-белковых взаимодействий. Во второй части конференции представители компаний Oxford Nanopore Technologies, Альбиоген, ГЕНЕТИКО, Гамма-ДНК сообщат о новейших системах секвенирования и последних разработках для расшифровки нуклеотидных последовательностей.

ISBN 978-5-91874-025-5



9 785918 740255 >

© ИТЭБ РАН, Пушкино, 2019

© Синхробук (SynchrobookTM), Пушкино, 2019

© Абакумова Ю.Ю., оформление, 2019

ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR-CAS В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ РАЗРАБОТКЕ

*Круглов А.А.², Груздева Н.А.^{1,2}, Шигина В.Е.^{1,2}, Кононов А.В.²,
Евдокимовская Ю.В.², Ерошова А.В.³, Дидук С.В.³, Басовский Ю.И.²,
Соловьев В.В.²*

¹ ФГБОУ ВПО Пушкинский государственный естественно-научный институт,
Пушино, Россия

² Департамент биоинженерии ЗАО “BIOCAD”, Россия

³ Департамент биотехнологий ЗАО “BIOCAD”, Россия

e-mail: kruglov.aa@biocad.ru

Система CRISPR-Cas была обнаружена в прокариотах как механизм, отвечающий за приобретенный иммунитет [1]. Она представляет собой локус повторяющихся последовательностей ДНК, кодирующих короткие РНК, и комплекс белков Cas, взаимодействующих с ними. Эффекторный белок CRISPR-систем второго класса представляет собой программируемую эндонуклеазу. Этот белок специфически связывается с комплементарными РНК-гиду участками ДНК и вносит в них разрывы. Успешное применение CRISPR-Cas для инженерии генома млекопитающих в 2013 году [2] повлекло за собой бум исследований, направленных как на дальнейшее развитие этого метода, так и на применение его в самых различных областях молекулярной биологии.

При создании клеточных линий-продуцентов фармацевтических препаратов возникают две задачи: обеспечить встраивание рекомбинантной ДНК в геном продуцента с целью его стабильной экспрессии, и изменить уровень экспрессии родных генов клеточной линии для достижения оптимальных производственных характеристик.

Система CRISPR-Cas была успешно применена для решения этих задач. Внесенный Cas-нуклеазой разрыв ДНК восстанавливается клеточными системами репарации. Репарация разрыва может идти по одному из двух основных механизмов: гомологичной рекомбинации

(HDR) и негомологичного соединения концов (NHEJ). Если в месте разрыва присутствует экзогенная ДНК, то процесс репарации приводит к её встраиванию в геном.

Ранее нами были обнаружены участки в геноме клеточной линии CHO обеспечивающие стабильный высокий уровень экспрессии трансгена. Мы оптимизировали метод CRISPR-интеграции, с использованием NHEJ [3] и применили его для интеграции экспрессионных кассет в заданные участки генома CHO. Были интегрированы экспрессионные кассеты, кодирующие последовательности легкой и тяжелой цепей моноклонального антитела. Полученная клеточная линия обладала стабильной продуктивностью на уровне 2 г/л.

Внесение программируемой нуклеазой разрывов в кодирующие последовательности в геноме применяется для получения клеточных линий, нокаутных по целевым генам. Мы применили такой подход для нокаута генов внутриклеточного иммунитета, служащих сенсорами на присутствие ДНК в цитоплазме. В результате были получены нокаутные по двум генам клеточные линии, обладающие повышенной продуктивностью и ростовыми характеристиками, сопоставимыми с исходной клеточной линией.

Помимо нуклеазы Cas9 в активной форме применяется также каталитически неактивная форма нуклеазы, которая в составе одной полипептидной цепи соединяется с различными функциональными доменами. В частности, dCas9, соединенная с факторами активации или репрессии транскрипции применяется для активации или подавления экспрессии определенных генов. В этом случае выбирается РНК-гид, комплементарный промотору целевого гена. Каталитически неактивная нуклеаза связывается с промотором, после чего соединенные с ней домены оказывают влияние на процесс транскрипции [4]. Нами были разработаны конструкции, позволяющие осуществлять активацию и репрессию целевых генов в клеточных линиях CHO и HEK293. Эффективность активаторов и репрессоров была подтверждена с использованием репортерной конструкции на основе люциферазы светляка *Photinus pyralis*.

Помимо наиболее изученной и чаще всего применяемой эндонуклеазы Cas9 из бактерии *Streptococcus pyogenes*, на данный

момент открыты ряд других Cas-нуклеаз. CRISPR-эндонуклеаза второго класса Cpf1 позволяет одновременно вносить разрывы в несколько участков в геноме [5]. Последовательности РНК-гидов Cas9 и Cpf1-нуклеаз отличаются, что позволяет использовать их в клеточной линии одновременно для выполнения различных задач. На основе этого нами были разработаны генетические конструкции, позволяющие параллельно активировать и ингибировать экспрессию различных генов в клеточных линиях-продуцентах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., and Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes // *Science* 315, 2007. 1709—1712.
2. Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., and Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems // *Science* 339, 2013, 819—823.
3. Suzuki K., Tsunekawa Y., Hernandez-Benitez R., Wu J., Zhu J., Kim E.J., Hatanaka F., Yamamoto M., Araoka T., Li Z., Kurita M., Hishida T., Li M., Aizawa E., Guo S., Chen S., Goebel A., Soligalla R.D., Qu J., Jiang T., Fu X., Jafari M., Esteban C.R., Berggren W.T., Lajara J., Nuñez-Delicado E., Guillen P., Campistol J.M., Matsuzaki F., Liu G.H., Magistretti P., Zhang K., Callaway E.M., Zhang K., Belmonte J.C. In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration // *Nature* 540 (7631), 2016, 144—149.
4. Gilbert L.A. et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes // *Cell* 154, 2013, 442—451.
5. Zetsche B., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Slaymaker I.M., Makarova K.S., Essletzbichler P., Volz S.E., Joung J., van der Oost J., Regev A., Koonin E.V., Zhang F. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system // *Cell* 163(3), 2015, 759—771.

ЭЛЕКТРОННАЯ МОДЕЛЬ ДНК

Якушевич Л.В.

Институт биофизики клетки Российской академии наук, Пущино, Россия

e-mail: kind-@mail.ru

Механические, электронные и другие физические аналоги живых систем, включая целостные организмы, отдельные органы, клетки и даже

биологические молекулы, помогают углубить наши знания о природе этих систем.

Цель данной работы — найти ответ на вопрос: можно ли построить электронную модель ДНК? Поиск ответа будет осуществляться методами математического моделирования. Будет представлен обзор основных работ по математическому моделированию электронного аналога молекулы ДНК, а также недавно полученные нами результаты исследований в этом направлении. Мы опишем кратко историю вопроса, начиная с первых работ Скотта [1] и Инглэндера [2], а также включая обсуждение наиболее важных работ по созданию механического аналога ДНК как предшественника электронного.

Мы покажем далее, что математическая часть задачи по созданию электронной модели ДНК, может быть решена в два этапа (1 и 2 на рис. 1). Первый сводится к поиску преобразования от динамической модели молекулы ДНК, к механическому аналогу ДНК. Второй — к поиску преобразования от механического аналога к электронному. Такой подход к решению задачи «подказала» нам классическая работа Скотта [1], где в качестве электронного аналога цепочки одинаковых маятников, была предложена джозефсоновская линия.

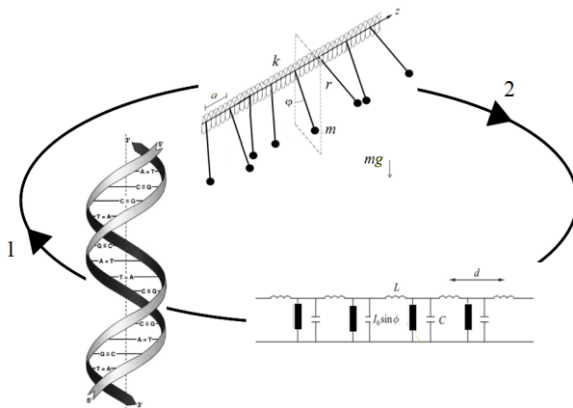


Рис. 1. Схема, иллюстрирующая двухэтапный метод построения электронного аналога ДНК

Двухэтапный метод позволяет рассчитать сначала параметры механического аналога для случая однородной (синтетической) ДНК

и неоднородной (нативной) ДНК [3]. Затем мы покажем, что аналогичный алгоритм может быть использован для построения математического преобразования от механического к электронному аналогу в случае однородной ДНК [4]. Мы покажем также, что этот метод может быть распространен и на случай неоднородной ДНК. Таким образом, с точки зрения математики ответ на вопрос: можно ли создать электронный аналог молекулы ДНК, представляется нам полностью положительным.

В заключении мы приведем подробное обсуждение достоинств и недостатков механического и электронного аналогов, перспективы их развития и применения в научных исследованиях, в приложениях и в преподавании.

ЛИТЕРАТУРА

1. Scott A.C. A nonlinear Klein-Gordon equation // Am. J. Phys. 37, 1, 1969, 52—61.
2. Englander S.W, Kallenbach N.R, Heeger A.J, Krumhansl J.A, Litwin S. Nature of the open state in long polynucleotide double helices: possibility of soliton excitations // PNAS 77, 12, 1980, 7222—7226.
3. Yakushevich L.V. On the mechanical analogue of DNA // J. Biol. Phys. 43, 1, 2017, 113—125.
4. Якушевич Л.В. Электронный аналог однородной ДНК // КИМ 9, 5, 2017, 787—796.

РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ — МЕХАНИЗМЫ И ПРИМЕНЕНИЕ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Ермаков А.М.

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

Клетки содержат множество некодирующих РНК, включая компоненты механизма генетической экспрессии, такие, как тРНК и рРНК, а также регуляторные РНК, влияющие на экспрессию других генов. Становится все более очевидным, что значительная часть генов всех организмов не кодирует белки, и что некодирующие РНК необыкновенно разнообразны.

Термин «РНК-интерференция» для феномена специфического подавления экспрессии генов при введении двухцепочечной РНК был предложен Andrew Fire (Fire et al., 1998; Timmons and Fire, 1998). В последующие годы эффективность РНК-интерференции была продемонстрирована у самых разнообразных беспозвоночных животных — трипаносомы, гидры, планарии, *C. elegans*, дрозофилы и некоторых других насекомых. Сиквенс-специфическое действие двухцепочечной РНК было также обнаружено и у позвоночных, в том числе на ранних стадиях развития млекопитающих. В ходе первых исследований РНК-интерференции при инъекциях двухцепочечной РНК в *C. elegans* были обнаружены основные свойства этого явления: эффективной при подавлении экспрессии оказывалась двухцепочечная РНК, соответствующая экзонам, в том числе 5' и 3' нетранслируемым областям (UTR), но не интронам или нетранскрибируемой промоторной части гена (Montgomery et al., 1998). Двухцепочечная РНК способна действовать в очень низких концентрациях. Расчеты показали, что эффективными оказываются концентрации, соответствующие всего нескольким молекулам двухцепочечной РНК на клетку. Одновременно были начаты исследования самого механизма РНК-интерференции с использованием как генетического, так и биохимического подходов. По мере выяснения действия двухцепочечной РНК в клетках беспозвоночных становилось все более ясно, что феномен РНК-интерференции имеет много общего с другим явлением, открытым за несколько лет до этого у растений — косупрессией.

Первый фермент, участвующий в работе системы РНК интерференции — это крупный мультидоменный белок названный DICER (от английского — нарезать на мелкие кусочки). Эта молекулярная машина обладает способностью к разрезанию длинной двухцепочечной РНК на мелкие кусочки длиной около 20 нуклеотидов (Dogini et al., 2013). Роль ножниц здесь играет домен РНКазы III, ему помогает АТФ зависимая хеликаза, расплетающая двухцепочечную молекулу РНК. Для связывания с разрезаемой молекулой РНК в белке Dicer присутствуют домены PAZ и домен, связывающий двухцепочечную РНК (dsRNA binding domain — dsRBD). В клетках разных тканей и в клетках различных групп живых организмов Dicer генерирует маленькие двухцепочечные РНК различной длины (от 20 до 31 нуклеотида).

Образованные белком Dicer малые двухцепочечные РНК расплетаются хеликазой и уже одноцепочечные РНК взаимодействуют со вторым белком — Ago. Он является членом белков семейства Аргонавт названных так из-за того, что мутация данного гена у растений приводила к образованию щупальцевидных листьев, напоминающих щупальца головоногого моллюска аргонавта. Белки семейства Аргонавт имеют 2 домена — PAZ и PIWI, первый домен играет роль связывания малых РНК, а второй домен структурно гомологичен РНКазе H. Филогенетически это семейство можно разделить на белки типа Ago, которые связывают микро и малые интерферирующие РНК, и белки типа Piwi, взаимодействующие с особым классом малых РНК, борющихся с транспозонами и которые называют взаимодействующими с пиви РНК.

Белки семейства аргонавта выполняют вторую стадию сайленсинга — взаимодействие со смысловой матричной РНК и обеспечивают подавление транскрипции, трансляции, или деградацию смысловой матричной РНК. С помощью них формируется комплекс RISC (RNA — induced silencing complex). Домен Piwi в белке Ago является РНК-азой, он и обеспечивает разрезание матричной РНК в месте взаимодействия с комплексом антисмысловой РНК и белка Ago. В процессе транскрипционного сайленсинга играет роль другой комплекс, в состав которого также входит белок аргонавт. Этот комплекс носит название RITS (RNA-induced initiation of transcriptional silencing). Он не вызывает деградацию матричной РНК, а приводит к остановке транскрипции на уровне химических и структурных модификаций ДНК (метилование ДНК, ацетилование и метилирование гистонов).

Уже сразу после открытия, РНК-интерференция стала использоваться как мощный и удобный способ специфического подавления экспрессии генов, исходя из их нуклеотидной последовательности, в том числе для массового скрининга функциональной роли генов и их транскриптов. Для этого применяется несколько подходов для экспериментальной реализации РНК интерференции в клетках или целом организме. Используются двухцепочечные РНК длиной от нескольких десятков нуклеотидов, малые микроРНК (siРНК) и шпилечные микроРНК (shРНК). Они могут доставляться в клетки либо уже в исходном синтезированном виде, либо в виде вектора, экспрессирующего нужную последовательность

микроРНК. В настоящее время проходят клинические испытания генотерапевтические препараты, созданные на основе векторов, транскрибирующих необходимые последовательности микроРНК ([Электронный ресурс]. URL: <https://clinicaltrials.gov/>).

ЛИТЕРАТУРА

1. Fire A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* // *Nature* 391, 1998, 806—811.
2. Timmons L. and Fire A. Specific interference by ingested dsRNA // *Nature* 395, 1998, 854.
3. Montgomery M.K. et al. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans* // *Proc Natl Acad Sci USA* 95(26), 1998, 15502—15507.
4. Dogini D.B., Pascoal V.D., Avansini S.H., Vieira A.S., Pereira T.C., & Lopes-Cendes I. The new world of RNAs // *Genetics and molecular biology* 37(1 Suppl), 2013, 285—293.
5. [Электронный ресурс]. URL: <https://clinicaltrials.gov/>

ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСКРИПТОМНЫХ ПРОФИЛЕЙ ДОЛГОЖИВУЩИХ ОСОБЕЙ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Гуватова З.Г.^{1,2}, Шапошников М.В.³, Краснов Г.С.¹, Кудрявцева А.В.¹,
Москалев А.А.^{1, 2, 3}

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

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

³ Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия

e-mail: guvatova.zulfiya@mail.ru

По мере старения населения возникает проблема качества жизни в пожилом возрасте, и изучение вопросов старения становится все более актуальным. Развитие высокопроизводительных технологий в области молекулярной биологии предоставило возможности для изучения генетических основ старения, что, в конечном счете, позволит разработать средства, способствующие активному долголетию.

Одним из потенциальных геропротекторов является бурый пигмент из некоторых водорослей — фукоксантин. Существует ряд исследований, демонстрирующих противовоспалительные, противоопухолевые и антиоксидантные эффекты фукоксантина. На модельных организмах, таких как *Drosophila melanogaster* и *Caenorhabditis elegans* нами было показано, что фукоксантин увеличивает продолжительность жизни и повышает стрессоустойчивость [1]. Дрозофила является наиболее удобным модельным объектом и для изучения механизмов функционирования «генов продолжительности жизни». Было показано, что мутация в гене *Enhancer of Zeste (E(z))*, кодирующего метилтрансферазу гистонов комплекса поликомб PRC2, и сверхэкспрессия гена каталитической субъединицы глутаматцистеинлигазы *Gclc*, фермента, участвующего в синтезе глутатиона, приводят к увеличению продолжительности жизни *D. melanogaster* [2, 3].

Для исследования молекулярных механизмов действия на продолжительность жизни вышеописанных интервенций мы изучили возрастную динамику изменений транскриптома долгоживущих *D. Melanogaster* [4, 5]. Транскриптомный анализ проводили с использованием контрольных и экспериментальных самок и самцов мух в возрасте 2 (молодые), 4 (зрелые) и 6 недель (старые). Для оценки влияния нейрональной оверэкспрессии *Gclc*, транскриптом голов и тораксов *D. melanogaster* был проанализирован отдельно. Двухцепочечную библиотеку кДНК готовили с использованием коммерческих наборов для Illumina, согласно протоколу производителя. Секвенирование проводили на приборе NextSeq500 System в режиме одно-концевых прочтений.

Анализ обогащения генов с помощью путей KEGG показал, что мутация в гене *E(z)* привела к модуляции генов, вовлеченных в метаболизм арахидоновой кислоты, аскорбата и альдарата, ретинола, порфиринов, ксенобиотиков. Причем, изменение профиля экспрессии у самок более выражено, чем у самцов. Известно, что при старении происходит нарушение регуляции экспрессии генов иммунной системы. Наши данные показывают, что долгоживущие *D. melanogaster* сохраняют профиль экспрессии генов, характерный для молодых особей, включая пониженную экспрессию генов, участвующих в иммунном ответе и хроническом воспалении.

Сравнение транскриптомных профилей тораксов и голов дрозофил со сверхэкспрессией *Gclc* выявило, что нейрональная сверхэкспрессия *Gclc*

в меньшей степени влияет на молекулярные процессы в тораксах, чем в головах. Среди дифференциально экспрессирующихся генов мы обнаружили гены, вовлеченные в различные сигнальные пути, такие как MAPK, FOXO, Notch, mTOR, Jak-STAT и TGF-бета. Несмотря на то, что изменения профиля транскрипции при сверхэкспрессии *Gclc* не так сильно выражены, как изменения, связанные с возрастом или полом, они ассоциированы с ключевыми процессами старения. Сверхэкспрессия *Gclc* предотвращает возраст-зависимое подавление клеточного дыхания и трансляции. Происходит активация рибосомных генов, что предполагает общее увеличение биосинтеза белка. При сверхэкспрессии *Gclc* подавляется большинство генов, участвующих в пути передачи сигналов цАМФ, активация которого является одним из отличительных признаков старения.

Секвенирование РНК мух, выращенных на фукоксантиновой диете, позволило выявить дифференциально экспрессирующиеся гены участвующие в различных клеточных процессах таких как трансляция, протеосомная деградация белков, углеводный метаболизм, окислительные фосфорилирование, апоптоз и т.д. Интересно, что фукоксантин приводит к изменению экспрессии большего числа генов у самцов по сравнению с самками. Наиболее представленные молекулярные пути, индуцированные фукоксантином у мух, связаны с долголетием, включая сигнальные пути MAPK, mTOR, Wnt, Notch и Hippo.

На сегодняшний день транскриптомные изменения, которые способствуют долголетию и предотвращают возраст-зависимое снижение биологических функций недостаточно хорошо изучены. Таким образом, полученные результаты имеют фундаментальное значение, и идентификация транскриптомных профилей долгоживущих особей будет полезна для понимания основных механизмов процесса старения и может предоставить дополнительные биомаркеры для оценки влияния генетических и фармакологических вмешательств, предотвращающих преждевременное старение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lashmanova E., Proshkina E., Zhikrivetskaya S., Shevchenko O., Marusich E., Leonov S., Melerzanov A., Zhavoronkov A., Moskalev A. Fucoxanthin increases lifespan of *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* // Pharmacol Res. 2015 Oct; 100:228—41. doi: 10.1016/j.phrs.2015.08.009.

2. Siebold A.P., Banerjee R., Tie F., Kiss D.L., Moskowitz J., Harte P.J. Polycomb Repressive Complex 2 and Trithorax modulate *Drosophila* longevity and stress resistance // Proc Natl Acad Sci USA 107, 169—174. doi:10.1073/pnas.0907739107.
3. Orr W.C., Radyuk S.N., Prabhudesai L., Toroser D., Benes J.J., Luchak J.M., Mockett R.J., Rebrin I., Hubbard J.G., Sohal R.S. Overexpression of glutamate-cysteine ligase extends life span in *Drosophila melanogaster* // J Biol Chem. 2005; 280:37331—37338. doi: 10.1074/jbc.M508272200.
4. Moskalev A., Shaposhnikov M., Proshkina E., Belyi A., Fedintsev A., Zhikrivetskaya S., Guvatova Z., Sadritdinova A., Snezhkina A., Krasnov G. The influence of pro-longevity gene *Gclc* overexpression on the age-dependent changes in *Drosophila* transcriptome and biological functions // BMC Genomics 2016; doi:10.1186/s12864-016-3356-0.
5. Moskalev A., Shaposhnikov M., Zemskaya N., Belyi A., Dobrovolskaya E., Patova A., Guvatova Z., Snezhkina A., Lukianova E., Kudryavtseva A. Transcriptome analysis reveals mechanisms of geroprotective effects of fucoxanthin in *Drosophila* // BMC Genomics 2017; doi: 10.1186/s12864-018-4471-x.

О МЕТОДЕ ДНК-КОМЕТ (COMET ASSAY)

Сирота Н.П.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия;
e-mail: sirota@itb.ru

В настоящее время молекулярно-цитологические исследования по оценке генотоксикологических свойств новых факторов проводятся в образцах, состоящих из большого количества биологического материала — от нескольких десятков тысяч до миллионов клеток. Клетки, присутствующие в таких образцах, представляют собой неоднородную популяцию, различающуюся по стадии клеточного цикла, антиоксидантному статусу, количеству внутриклеточных органелл, функциональной активности митохондрий, ферментативной активности, количеству рецепторов на поверхности клеточной мембраны и т.д. Существующие методы исследований в большинстве случаев не позволяют проводить прямую оценку взаимозависимости, например, между количеством/функциональным состоянием митохондрий и уровнем поврежденности ДНК в норме и при генотоксическом воздействии. Для такого рода оценок используют статистический анализ

результатов, полученных разными методами на не идентичных образцах биологического материала. Новые методы, позволяющие оценивать в одной и той же клетке как количество/функциональное состояние митохондрий, так и поврежденность геномной ДНК открыли бы перспективу для понимания причин и механизмов, лежащих в основе индивидуальной чувствительности к генотоксическому воздействию. В методе ДНК-комет используется иммобилизация живых клеток в агарозный гель в условиях, при которых не нарушается жизнедеятельность этих клеток. При приготовлении препаратов происходит пространственная фиксация клеток в агарозе, что позволяет исследователям наблюдать под микроскопом одну и ту же клетку в разные промежутки времени после ее иммобилизации. Эти препараты можно перемещать в пространстве, подвергать различным воздействиям, а затем возвращать на предметный столик микроскопа и находя интересные нас клетки получать вновь их цифровые изображения и проводить сравнительный анализ. Такие исследования в настоящее время можно проводить при наличии моторизованного микроскопа с записью координат сфотографированных полей зрения и при условии, если не происходит существенных изменений в морфологии изучаемых клеток. В исследованиях приводящих к существенным изменениям в клеточной морфологии, особенно в случаях малых количеств клеток, расположенных в поле зрения, всегда возникает вопрос о гарантированности того, что мы наблюдаем одно и то же поле зрения, т.е. стоит вопрос о визуальном доказательстве идентичности изучаемых полей зрения. Для визуального доказательства необходимо, наряду с исследуемыми клетками, присутствие в поле зрения объекта, сопоставимого по размерам с изучаемыми клетками, хорошо наблюдаемого в тех же условиях микроскопирования и, что наиболее существенно, не изменяющего свою морфологию в процессе всех манипуляций с препаратом. К тому же не должно быть влияния на присутствующие живые клетки. Мы предположили, что в качестве такого объекта можно использовать те же самые клетки, но после процедуры химической фиксации, например глутаровым альдегидом.

В работе использовали клетки асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) перевиваемые внутрибрюшинно самцам мышей SHK. Микроскопию препаратов проводили на микроскопе Люмам И-3 (Россия), оснащенном

цифровым фотоаппаратом Nikon CoolPix 995 (Япония) для получения цифровых изображений. Анализ повреждений ДНК в индивидуальных клетках проводили щелочной и нейтральной версией Comet assay. Анализ цифровых изображений проводили с использованием программы Морфологического Анализа Изображений Комет (МАИК) разработанной нами ранее.

В результате проведенных исследований мы показали, что ни воздействие высокой ионной силы, ни щелочная обработка, ни длительное воздействие протеиназы К и ДНКазы 1, ни последующий электрофорез в щелочных или нейтральных условиях не оказывали существенного влияния на морфологию ОФК. Наличия ДНК-комет также не наблюдалось.

Следовательно, можно сделать вывод о том, что при исследованиях с применением микроскопии можно использовать ОФК в качестве маркеров для визуального контроля идентичности наблюдаемых полей зрения.

БИОРАЗНООБРАЗИЕ НУКЛЕОТИДНОГО СОСТАВА ДНК

Зимин А.А.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
Пушино, Россия;
Пушинский государственный естественно-научный институт, Пушино, Россия
e-mail: zimmin@ibpm.pushchino.ru

Встречающаяся в природе модификация канонических оснований А, G, C и T может быть обнаружена в ДНК клеточных организмов и вирусов из всех доменов жизни.

У бактериальных вирусов (бактериофагов) это явление встречается особенно часто. Бактериофаги могут быть на Земле основным, но пока еще недостаточно исследованным источником таких «модифицированных» вариантов нуклеотидов. Нуклеотиды после модификации сохраняют функции спаривания оснований ДНК и кодирования, но и добавляют регуляторные и защитные функции для этих вирусов. У фагов модифицированные основания, по-видимому,

являются частью борьбы между бактериофагами и их хозяевами-бактериями.

Системы рестрикции и модификации типа II (R-M) в бактериях кодируют эндонуклеазы рестрикции для ограничения вторжения чужеродной ДНК при фаговой инфекции и проникновении других мобильных генетических элементов. Чтобы выжить бактериофаги используют модифицированные основания в ДНК для противодействия этим эндонуклеазам. Полностью или почти полностью модифицируются у ряда бактериофагов все четыре основания в ДНК. Например, 5-метилцитозин, заменяет весь цитозин в геноме фага XP12, 5-глюкозилированный- 8-гидроксиметилцитозин встречается у фага T4, дезоксиархеозин у фага 9g, а-путресцинилтимидин у Phi W-14, N6-метиладенин у некоторых фагов, кодирующих высокоэффективные аденин-метилтрансферазы и 5-гидроксиметилуридин у бациллярных бактериофагов SP8 и SPO1. Модификации оснований либо вводятся во время репликации ДНК через модифицированный dNTP, либо происходит пострепликационная ферментативная модификация белками, кодируемыми в геноме конкретного фага, такими как метилазы или гликозилтрансферазы. ДНК фага T4, модифицированная 5gmC, устойчива ко многим рестрикционными эндонуклеазами II типа, которые распознают последовательности, содержащие GC-пары. ДНК фага 9g устойчива примерно к 71% данных ферментов [1].

Эти модификации ответственны за ряд свойств фагов. Например, геномная ДНК Phi W-14 более компактно упакована в головку фага, чем T4 [2]. Геномная ДНК фага SPO1 с 5hmdU как оказалось имеет пониженную температуру плавления и измененную гибкость «хребта» ДНК при прохождении через нанопоры [3].

Две новые модификации оснований, 5- (2-аминоэтил) дезоксиуридин и 5- (2-аминоэтокси) метилдезоксиуридин, были недавно обнаружены в геномах фага псевдомонад M6 и сальмонеллезного бактериофага VII [4].

У эукариотических организмов некоторые модификации были эволюционно адаптированы для передачи эпигенетической информации. Первая половина этого доклада посвящена разнообразию модифицированных нуклеотидов ДНК, обнаруженных у бактериофагов. Уделено особое внимание классическому бактериофагу T4 (T2, T4, T6),

у которого впервые был открыт гидроксиметилцитозин в ДНК — первое из таких модифицированных оснований и находкам последних лет, сделанным при исследовании ряда других бактериофагов. В докладе рассматривается то, что известно о биогенезе и функции этих неканонических нуклеотидов. Во второй части доклада эти модификации ДНК рассматриваются в контексте экологии, взаимодействия между бактериовирусами и их хозяевами, а также эволюции и происхождении этих модификаций.

Исследование частично поддержано грантом РФФИ № 19-07-00996.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tsai R., Correa I.R., Xu M.Y., and Xu S.Y. Restriction and modification of deoxyarchaeosine (dG+)-containing phage 9 g DNA // Sci Rep 7, 2017, 8348.
2. Scraba D.G., Bradley R.D., Leyritz-Wills M., and Warren R.A. Bacteriophage phi W-14: the contribution of covalently bound putrescine to DNA packing in the phage head // Virology 124, 1983, 152—60.
3. Carson S., Wilson J., Aksimentiev A., Weigele P.R., and Wanunu M. Hydroxymethyluracil modifications enhance the flexibility and hydrophilicity of double-stranded DNA // Nucleic Acids Res 44, 2016, 2085-92.
4. Lee Y.J., Dai N., Walsh S.E., Muller S., Fraser M.E., Kauffman K.M., Guan C., Correa I.R., Jr., and Weigele P.R. Identification and biosynthesis of thymidine hypermodifications in the genomic DNA of widespread bacterial viruses // Proc Natl Acad Sci USA 115, 2018, E3116-E3125.

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ НАНОПОРОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ, РАЗРАБОТАННОГО КОМПАНИЕЙ OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES

Кузнецова О.В.

Oxford Nanopore Technologies, Oxford Science Park, UK

Olga.Kuznetsova@nanoporetech.com

Компания Oxford Nanopore Technologies разработала революционную платформу, которая использует прямой электронный метод анализа отдельных молекул ДНК или РНК. Платформа действует за счёт биологических белков (нанофор), образующих каналы в синтетической

мембране. Когда через мембрану проводится ионный ток, анализируемый материал проходит через нанопору, вызывая характерные колебания тока. Измерение этих колебаний позволяет считывать последовательность оснований ДНК или РНК в реальном времени.

Наше первое устройство, MinION, было разработано для применения, как в лаборатории, так и в полевых условиях. С тех пор, компания выпустила два устройства с более высокой производительностью (GridION и PromethION), с помощью которых стало возможно секвенировать и характеризовать более крупные геномы в рамках одного эксперимента.

Для дальнейшего упрощения процесса секвенирования, Oxford Nanopore предлагает программное обеспечение для автоматического анализа данных, позволяя исследователям легко и быстро получить ответ.

Растущий список публикаций по применениям нашей платформы включает обнаружение патогенов и их устойчивости к антимикробным препаратам в реальном времени, обнаружение структурных вариаций, метагеномный анализ, создание высококачественных эталонных геномов человека с помощью ультрадлиных прочтений, и секвенирование на Международной Космической Станции.

РАЦИОНАЛЬНАЯ ГЕНОМИКА И ТРАНСКРИПТОМИКА С OXFORD NANOPORE

*Василенко О.В.¹, Логачева М.Д.², Федотова А.В.², Лукашевич Н.А.³,
Малов В.О.³, Кольжецов Н.П.³, Иванушкина Н.Е.¹, Кочкина Г.А.¹,
Данилогорская А.А.¹, Пинчук И.П.¹, Озерская С.М.¹*

¹ Отдел «Всероссийская коллекция микроорганизмов», Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино, Россия

² Лаборатория эволюционной геномики ФББ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Факультет биотехнологии МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия.

e-mail: ovasilenko@gmail.com

Прогресс в области высокопроизводительного секвенирования (HTS) делает возможным очень многое из того, что было трудно достижимым или просто находилось за пределами реальных возможностей лаборатории

еще несколько лет назад. К таким задачам относились получение законченных геномных сборок даже прокариотических микроорганизмов и, тем более, геномов эукариот; получение надежных данных по сравнительному транскриптомному анализу, которое требовало и требует экстраординарной глубины секвенирования и последующей верификации. Последнюю проводят гораздо менее производительным методом ОТ ПЦР в реальном времени [1].

Простое увеличение масштабов эксперимента секвенирования — увеличение покрытия и количества биологических повторов становится возможным за те же средства благодаря продолжающемуся удешевлению стандартных объемов работы. Эта закономерность соблюдается для всех существующих на рынке платформ. Но то, что по-настоящему имеет право называться рациональным секвенированием ДНК и РНК — это комбинированное использование в конкретной задаче платформ, для которых характерны точные, короткие прочтения (Illumina или BGI) с теми, которые дают менее точные, но экстремально длинные риды (PacBio и Oxford Nanopore). Сочетание коротких и длинных чтений в гибридной сборке позволяет достичь лучшего результата, затратив многократно меньший объем секвенирования на каждой из платформ, что в итоге является более эффективным экономически.

Мы проиллюстрировали на примере полногеномного секвенирования трех видов грибов *Antarctomyces psychrotrophicus* Stchigel et Guarro 2001 ВКМ F-4686, *Pseudeurotium zonatum* J.F.H. Beuma 1937 ВКМ F-2054, *Leuconeuospora pulcherrima* (G. Winter) Malloch et Cain 1970 ВКМ F-4684 как использование гибридной сборки улучшает качество моделирования генома даже при скромном покрытии каждым способом (Illumina HiSeq 4000, и Oxford Nanopore MinIon).

Задачи анализа экспрессии генов методом секвенирования РНК также поддаются рационализации при помощи одновременного использования двух платформ. Само по себе длинное прочтение РНК дает существенную дополнительную информацию о транскриптах изоформ [2]. Но важнее другое. В транскриптомике сложилась довольно устойчивая парадигма, учение о «золотом стандарте», которое состоит в том, что данные глубокого прочтения (с большим покрытием) транскриптома следует верифицировать проверкой уровня экспрессии хотя бы небольшой выборки генов методом ОТ ПЦР в реальном времени. Это связано с тем, что подготовка библиотеки

и особенно биоинформатическая обработка данных — сложный, многоступенчатый процесс, в котором могут быть задействованы разные программы с разными установками (тримминга, картирования, поиска дифференциально экспрессирующихся генов). Для ОТ-ПЦР существуют стандарты, следование которым обеспечивает высокую точность и воспроизводимость результатов [3]. Эти стандарты уже приняты редакциями многих ведущих журналов (например, *Nucleic Acids Research*) в качестве необходимых к выполнению всеми потенциальными авторами. Для RNA-seq такие стандарты либо отсутствуют (для большинства объектов), либо представлены устаревшими ([Электронный ресурс]. URL: https://genome.ucsc.edu/ENCODE/protocols/dataStandards/RNA_standards_v1_2011_May.pdf (дата обращения 2011 г.)) разработками, что не лучшим образом сказывается на надежности и воспроизводимости результатов.

Однако сам метод ПЦР в реальном времени обладает и меньшей аналитической точностью, чем глубокое секвенирование (в связи с тем, что для нормализации данных в ПЦР-РВ используется один или небольшое количество референсных генов), и уступает последнему методу по производительности на порядки. В последнее время появилась принципиально новая возможность избежать многих искажений количественной картины экспрессии, — это дополнительное использование технологии нанопорового секвенирования с применением альтернативных «мокрых» и «сухих» алгоритмов.

Длинные чтения, характерные для этой технологии, позволяют прочесть транскрипты целиком и получить реалистичную картину всего транскриптома, различив паралогичные и другие близкие варианты, что уменьшает неопределенность картирования коротких фрагментов. Помимо этого, возможность использования более простых библиотек (как РНК без транскрипции, так и кДНК без стадии ПЦР) также увеличит точность количественной интерпретации. Из-за существенно меньшей производительности запуска по сравнению с платформой Illumina, нанопоровое чтение РНК не даст такой же величины покрытия, но вполне подтвердит и общую биологическую картину экспрессии, и примерную реальную картину дифференциальной экспрессии мажорной части генов, гораздо более полную, чем может дать ПЦР.

Мы предлагаем изменить парадигму в дифференциальной транскриптомике, исключив из обязательной части эксперимента

верификацию методом ПЦР, заменив его нанопоровым секвенированием. Считаем эту идею прогрессивной, способной рационализировать транскриптомику.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-04-01347-а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aransay A.M., Trueba J.L.L. (Eds) Field guidelines for genetic experimental designs in high-throughput sequencing // Springer International Publishing, Switzerland, 2016. 399 p.
2. Boldogkői Z., Moldován N., Balázs Z., Snyder M., Tombác D. Long-read sequencing — a powerful tool in viral transcriptome research // Trends in Microbiology, 2019. [Электронный ресурс]. URL: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.01.010>.
3. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments // Clin. Chem. 55(4): 2009, 611—622. [Электронный ресурс]. URL: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.

РЕКОНСТРУКЦИЯ ГЕНОМОВ МИКРООРГАНИЗМОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДАННЫХ МОНОМОЛЕКУЛЯРНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

*Соломенцев В.И., Сизова А.А., Скрыбин Ю.П., Кисличкина А.А.,
Майская Н.В., Иванов С.А., Фролов В.Б., Дентовская С.В.,
Анисимов А.П., Богун А.Г.*

ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии
и биотехнологии Роспотребнадзора, Оболенск

e-mail: bogun62@mail.ru

Введение. В настоящее время одним из наиболее перспективных методов изучения геномов микроорганизмов является мономолекулярное секвенирование. Данная технология позволяет получать прочтения большой длины, что облегчает реконструкцию полных геномов и позволяет изучать любые их особенности. Наиболее доступной платформой мономолекулярного секвенирования является MiniON британской компании Oxford Nanopore Technologies. В России данное

оборудование доступно с 2017 года, а стоимость стартового набора для проведения исследований, в который входит секвенатор MinION, а также набор реактивов составляет немногим более 100 000 рублей, что открывает широкие возможности для использования данного секвенатора в лабораториях разного уровня. В данной работе мы описываем опыт эксплуатации данного оборудования в отделе коллекционных культур ФБУН ГНЦ ПМБ.

Материалы и методы. Работы проводились на оборудовании MinION, производства компании Oxford Nanopore Technologies. Использовались ячейки FLO-MIN106, наборы для приготовления библиотек SQK-LSK108 Ligation Sequencing Kit 1D и Rapid Barcoding Sequencing (SQK-RBK004). ДНК выделялось методом фенол-хлороформной экстракции.

Результаты. Первоначально тестовый запуск осуществили в присутствии поставщика оборудования с использованием ДНК фага λ и соответствующего протокола для проверки оборудования. После завершения тестового эксперимента проточная ячейка был залита буфером для промывки и оставлена на ночь. На следующий день с использованием набора для приготовления библиотек посредством фрагментации ДНК и лигирования адаптеров SQK-LSK108 был проанализирован штамм *Y. pestis* C-678, затем *K. pneumoniae* и *St. aureus*, после каждого запуска мы заливали ячейку буфером для промывки. Однако нами было отмечено постепенное значительное снижение качества полученных данных после каждой промывки. Дальнейшая работа проводилась с использованием набора SQK-RBK004, позволяющим проводить быструю пробоподготовку и анализировать одновременно до 12 образцов. Нами проведено два раунда секвенирования с использованием двух проточных ячеек, всего было проанализировано 8 штаммов *Y. pestis*. С использованием программ Canu, Flye и Unicycler была проведена сборка бактериальных геномов. Программа Flye не позволила реконструировать последовательности хромосом только одного штамма — *Y. pestis* И-1996. Программы Canu и Unicycler позволили реконструировать последовательности хромосом двух штаммов каждая (Canu — штаммы *Y. pestis* C-197 и *Y. pestis* C-235, Unicycler — штаммы *Y. pestis* C-739 и *Y. pestis* И-1996). Использование трёх программ позволило реконструировать хромосомы всех штаммов чумного микроба.

ILLUMINA: ОБЗОР ПОРТФОЛИО РЕШЕНИЙ В ОБЛАСТИ NGS

Харламов В.Г.¹, Шаповалов И.С.

¹ ООО «Альбиоген»

e-mail: i.shapovalov@albiogen.ru

Компания ООО «АЛЬБИОГЕН» с 2015 года является эксклюзивным (единственным) официальным торговым представителем и дистрибьютором компании Illumina на территории Российской Федерации, Республики Беларусь, Республики Казахстан и Республики Узбекистан. С 2017 года «АЛЬБИОГЕН» является официальным дистрибьютором компании Lucigen (Biosearch Technologies), а с 2018 — компаний Verogen, IDT, CareDx, Vitrolife, Beckman Coulter, MBS. Это инновационные и стремительно развивающиеся компании, являющиеся мировыми лидерами в области геномных технологий и специализирующиеся на поставках оборудования, расходных материалов и программного обеспечения для секвенирования нового поколения (NGS) и анализа на ДНК-биочипах.

Компания Illumina является лидером в области высокопроизводительного секвенирования и биочипового анализа. Более 90% всех данных секвенирования нового поколения (Next Generation Sequencing; NGS) были получены на приборах, использующих технологию sequencing-by-synthesis. Эта проверенная временем и сотнями тысяч пользователей со всего мира технология NGS существует уже более 10 лет и является эталоном на рынке секвенирования.

Портфолио полногеномных секвенаторов, реактивов для подготовки библиотек и секвенирования компании Illumina позволяет выполнять задачи любого уровня, начиная от секвенирования ампликонов, геномов микроорганизмов и небольших панелей, до полных геномов человека, транскриптомов, больших соматических панелей и популяционных исследований. Основные преимущества технологии Иллюмина — высочайшее качество сырых данных, полная интеграция всех этапов секвенирования в одном приборе, широкий спектр доступных протоколов пробоподготовки и анализа полученных данных, большая приборная база.

Достоинства технологии высоко оценены научным и медицинским сообществами. Большое количество исследований в области анализа микробиологических сообществ, поиска патогенных организмов, генотипирования сельскохозяйственных животных и растений, поиска генетических причин заболеваний, оценки совместимости донорских тканей и анализа экспрессии было успешно проведено с использованием оборудования и реактивов Illumina.

Компания Illumina непрерывно работает над повышением производительности и снижением стоимости секвенирования, чтобы передовые разработки в области генетических исследований были доступны абсолютно всем.

ОПЫТ РАБОТЫ НА NOVASEQ 6000 (ILLUMINA)

*Миронова И.В.¹, Худая Е.А.¹, Еремян А.А.¹, Каймонов В.С.¹,
Померанцева Е.А.¹*

¹ ООО «ЦГРМ „ГЕНЕТИКО“», Москва, Россия

e-mail: mironova@genetico.ru

Массовое параллельное секвенирование широко используется в научных целях и молекулярно-генетической диагностике, и с каждым годом становится все более востребованным, в связи с развитием научных работ и медицинской генетики. Стоимость данного исследования пока остается довольно высокой, и не каждая лаборатория или пациент может позволить себе проведение данного анализа. Система секвенирования от компании Illumina — NovaSeq 6000 — является самым высокопроизводительным секвенатором в мире. Что позволяет значительно уменьшить стоимость исследования и благодаря своей масштабируемости подходит под любые задачи как в медицинской генетике, так и в различных научных проектах.

С помощью платформы NovaSeq 6000 (Illumina) лаборатория «ЦГРМ „ГЕНЕТИКО“» проводит секвенирование различных образцов ДНК. Основную часть из них составляет полноэкзомный и полногеномный анализ клинических образцов. Прибор позволяет загружать до 500 полных экзотов человека и до 48 полных геномов,

в зависимости от типа используемой химии для оборудования и проточной ячейки. Приготовление полноэкзомных библиотек осуществляется с помощью набора SureSelect^{XT} Human All Exon V7 (Agilent). Ранее использовались “TruSeq Exome Kit” (Illumina) и “TruSeq Exome Kit” вместе с гибридной частью от компании IDT. Для пробоподготовки полногеномных образцов используются реактивы “TruSeq Nano DNA” (Illumina) и “TruSeq DNA PCR-Free” (Illumina). Кроме того, лаборатория проводит секвенирование транскриптомов, метиломов, митохондриальной ДНК и различных научных образцов. Оценка полученных данных секвенирования проводится с использованием алгоритмов FastQC, SeqPurge, Sambalster и bedtools.

Для выбора оптимального протокола для подготовки экзомных библиотек проводилось сравнение трех наборов реагентов: “TruSeq Exome Kit” (Illumina), SureSelect^{XT} Human All Exon V7 (Agilent) и “TruSeq Exome Kit” с олигонуклеотидами от компании IDT. По результатам биоинформатического анализа данных, полученных при использовании набора от компании Illumina, доля целевых участков с покрытием не менее 10x для образцов составила $94.86\% \pm 4.08\%$, а комбинированного набора с зондами от компании IDT $97.05\% \pm 0.6\%$. При использовании реактивов Agilent доля целевых участков с покрытием 10x составила $99.68\% \pm 0.10\%$. Таким образом, SureSelect^{XT} Human All Exon V7 (Agilent) показал лучший результат и был выбран оптимальным набором для пробоподготовки полноэкзомных библиотек. С помощью него было подготовлено 894 образца, набора реактивов “TruSeq Nano DNA” 10 геномных библиотек и набора “TruSeq DNA PCR-Free” 32 образца. В запусках прибора NovaSeq 6000 (Illumina) в среднем было от 72 до 96 полноэкзомных образцов, и до 24 образцов геномов человека. Среднее покрытие для полноэкзомных библиотек составило 130x, доля целевых участков с покрытием не менее 10x составила $99.54\% \pm 0.10\%$. Для полногеномных библиотек среднее покрытие равнялось 41x.

По результатам проведенных анализов, NovaSeq 6000 (Illumina) показал хорошие результаты по среднему покрытию образцов и проценту целевых участков, покрытых не менее 10 раз. На данный момент этот прибор является самым высокопроизводительным оборудованием в лаборатории «ЦГРМ „ГЕНЕТИКО“» и позволяет

провести секвенирование большого количества образцов за меньшее количество времени. Кроме того, прибор может использоваться под разные задачи, как в науке, так и в медицине.

СРАВНЕНИЕ ПЛАТФОРМ Illumina HiSeq 2500 И MGISEQ-2000 НА ПРИМЕРЕ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВИРОВАНИЯ

*Горбачев А.А.¹, Белова В.А.², Кулемин Н.А.^{1,2}, Ребриков Д.В.²,
Коростин Д.О.²*

¹ Zenome.io, Москва, Россия;

² ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия;

e-mail: d.korostin@gmail.com

MGISEQ-2000 — это новый прибор от компании MGI Tech Co. Ltd. (дочерняя структура BGI Group). Данный прибор является конкурентом для таких платформ секвенирования второго поколения как NovaSeq и HiSeq (Illumina). В основе работы прибора лежат технологии DNB и cPAS (как и в предыдущей версии прибора BGISEQ-500), однако в MGISEQ-2000 была доработана реагентика и программное обеспечение. Технология cPAS является развитием ранее созданной технологии cPAL, разработанной компанией Complete Genomics.

Мы представляем результаты полногеномного анализа образца ДНК русской женщины, выполненного с использованием платформы MGISEQ-2000, а также Illumina HiSeq 2500. Мы провели сравнительный анализ с результатов секвенирования, выполненного для обоих приборов с использованием реагентов для парных концевых прочтений (PE150). Был проведен сравнительный анализ двух платформ по качеству секвенирования, количеству ошибок и характеристикам производительности и цены. Для большей детализации мы провели variant calling с использованием 4 различных программных пакетов.

В представленной работе мы сравниваем два геномных датасета, полученных в результате секвенирования на приборах Illumina HiSeq 2500 и MGISEQ-2000. В рамках нашего исследования стояла задача понять, может ли MGISEQ-2000 использоваться для полногеномного скрининга эмбрионов, поиска SNP и других задач, стоящих перед нашей лабораторией.

В результате проведенного исследования можно сказать, что MGISEQ-2000 генерирует датасет с похожими характеристиками на данные, получаемые с “золотого стандарта” NGS-анализа — прибора компании Illumina. Так, при сопоставимом объеме выходных данных: 101.37 Gb (MGISEQ) и 94.37 Gb (Illumina) мы наблюдаем сходные значения среднего покрытия 32.75X for MGISEQ-2000 vs 30.48X for HiSeq 2500 и практически идентичной картиной распределения покрытия.

Использование программ для анализа качества секвенирования также демонстрирует похожие результаты с некоторыми отличиями связанными в большей степени с предварительными этапами пробоподготовки, а не в качестве самого сиквенса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Drmanac R., Sparks A.B., Callow M.J., Halpern A.L., Burns N.L., Kermani B.G., et al. Human genome sequencing using unchained base reads on self-assembling DNA nanoarrays // *Science* 327, 2010, 78—81.
2. Specter M. The Gene Factory [Internet]. The New Yorker. The New Yorker; 2013 [cited 2018 Dec 25]. Available from: <https://www.newyorker.com/magazine/2014/01/06/the-gene-factory>.
3. Huang J., Liang X., Xuan Y., Geng C., Li Y., Lu H., et al. A reference human genome dataset of the BGISEQ-500 sequencer // *Gigascience* 6, 2017, 1—9.
4. Fehlmann T., Reinheimer S., Geng C., Su X., Drmanac S., Alexeev A., et al. cPAS-based sequencing on the BGISEQ-500 to explore small non-coding RNAs // *Clin Epigenetics*. BioMed Central 8, 2016, 123.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ «ПО ЗАДЕРЖКАМ»: ОСНОВЫ И ВОЗМОЖНОСТИ ТЕХНОЛОГИИ

Гуторов М.А., Григорьев А.В., Мантуров А.О.

ООО «Гамма-ДНК», Москва, Сколково, Россия;

e-mail: manturovao@gmail.com

За более чем полувековую историю развития биологических наук, прошедшую с момента открытия структуры ДНК, секвенирование стало одним из наиболее востребованных инструментов генетики и молекулярной

биологии [1]. С момента создания первой работоспособной технологии секвенирования [2] разработка новых методов реконструкции нуклеотидной последовательности по экспериментальным данным образовала, фактически, отдельное научно-техническое направление биологических исследований, включающее (и объединяющее) методы молекулярной биологии, технологии сенсорных систем, методы цифровой обработки сигналов и ряд других.

В 2013—2017 годы была сформирована и экспериментально обоснована оригинальная концепция секвенирования ДНК, реализация которой основана на оригинальном алгоритме, существенно отличающемся от ранее известных технических решений [1]. В 2015 году указанная концепция была положена в основу создания новой технологии секвенирования ДНК, для разработки, исследования возможностей и практической реализации которой была создана проектная компания «ГАММА-ДНК» [3].

В ходе реализации указанного Проекта разрабатывается прецизионная технология одномолекулярного секвенирования ДНК и будет спроектирован на её основе высокопроизводительный, высокоточный одномолекулярный секвенатор ДНК, работающий в масштабе реального времени, с техническими характеристиками, не уступающими ведущим мировым аналогам, но при этом позволяющий получить результаты полногеномного секвенирования со значительно меньшими стоимостными и временными затратами, чем у мировых аналогов, таких как секвенаторы Ion Proton компании Thermo Fisher Scientific (США) и PcfBio RS II компании Pacific Biosciences (США). Целью описываемого Проекта в целом, таким образом, является разработка технологии одномолекулярного секвенирования ДНК и развитие на её основе линейки одномолекулярных, безметочных, электронных секвенаторов ДНК.

Основой разрабатываемой технологии секвенирования является специальный алгоритм получения информации о нуклеотидной последовательности анализируемой ДНК, работа которого базируется на принципе секвенирования синтезом (Sequencing By Synthesis (SBS)), [4]. Базисом алгоритма является использование реакции полимеризации ДНК, наблюдение за детальной кинетикой которой позволит определить, какие именно и в какой последовательности нуклеотиды присоединяются

к полимеризуемой цепи ДНК. В ранее известных технических подходах к решению задачи определения вида присоединяемых нуклеотидов использовались те или иные метки (как правило, в форме флюоресцентных меток-красителей, которыми модифицировались используемые при проведении реакции нуклеотиды (см., например, [5—7] и др.). В отличие от известных подходов, в рамках разрабатываемого алгоритма предполагается использовать специфические «метки» во временной области, а именно, обнаруживать появление в ходе реакции полимеризации ДНК временной задержки присоединения нуклеотида определенного вида, концентрация которого искусственно понижена против концентраций трех остальных видов нуклеотидов [8—10]. Таким образом, в рамках данного алгоритма будет реализован режим «обратимой терминации» цепи ДНК (в противоположность известному подходу, ставшему классическим для ДНК-исследований — методу Сэнгера, [11]). Обнаружение фактов присоединения нуклеотидов планируется проводить на основе методологии детекции электронным сенсором разделения зарядов в ходе реакции полимеризации ДНК при присоединении к растущей цепи комплементарных нуклеотидов в реакционном растворе [12]. Ранее [13] экспериментально была показана возможность электронной детекции кинетики реакции полимеризации ДНК в поликлональной модели. В настоящей работе для одномолекулярной детекции планируется использовать так называемый одноэлектронный транзистор с предельной чувствительностью не хуже $0.1 e$ [14]. Применение указанного сенсора совместно с оригинальным алгоритмом сбора данных должно обеспечить выполнение заявленных показателей настоящего Проекта.

Проект поддержан Фондом «Сколково», соглашение о предоставлении гранта № Г2/18 от 29 марта 2018 года.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ребриков Д.В., Коростин Д.О., Шубина Е.С., Ильинский В.В. NGS: высокопроизводительное секвенирование // науч. эл. издание / под ред.: Д.В.Ребриков. — 2-е изд. (эл.). — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. 2015. — 235 с.
2. Sanger F., Coulson A.R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase // J. Mol. Biol. 94, 1975, 444—448.
3. Сайт компании ГАММА-ДНК. [Электронный ресурс]. URL: <https://gamma-dna.ru/index.php/#aboutproject> (дата обращения 25.03.2019).
4. Pettersson E., Lundeberg J., A.A. Generations of sequencing technologies //

- Genomics 93, 2009, 105—111.
5. Ronaghi M. et al. Real-time dna sequencing using detection of pyrophosphate release // *Analytical Biochemistry* 242, 1996, 84—89.
 6. M. Margulies et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors // *Nature* 437, 2005, 376—380.
 7. Nyren, P. The history of pyrosequencing // *Methods Mol. Biology* 373, 2007, 1—14.
 8. Мантуров А.О. (RU), Гугоров М.А. (RU). Способ секвенирования ДНК и устройство для его осуществления (варианты) : патент РФ на изобретение № RU 2539038 С1 от 02.11.2013.
 9. Башкиров В.И. (RU), Григорьев А.В. (RU), Гугоров М. А. (RU), Ильичев Э.А. (RU), Колесов В.В. (RU), Крутовский К.В. (DE), Мантуров А.О. (RU). Способ безметочного одномолекулярного секвенирования ДНК и устройство для его реализации : патент РФ на изобретение № RU 2679494 С1 от 26.12.2017.
 10. Григорьев А.В., Мантуров А.О. Кинетика диффузионно-ограниченной элонгации фрагмента ДНК // *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика*, Т. 14, № 2, 2014, С. 57—59.
 11. Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 1977, 5463—5467.
 12. Pourmand N., Karhanek M. et al. Direct electrical detection of DNA synthesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103(17), 2006, 6466—6470.
 13. Тарасов С.Е., Емец В.В., Гугоров М.А., Решетилов А.Н. Импедансная спектроскопия в современных электрохимических ДНК-биосенсорах // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. Т. 10, № 3, 2014, 43—50.
 14. Sapkov I.V., Soldatov E.S., Kolesov V.V. Using a focused ion beam for the creation of a molecular single-electron transistor // *Moscow University Physics Bulletin*, Т. 64. № 4, 2009, 384—388.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ — 2019

Зубов В.В.

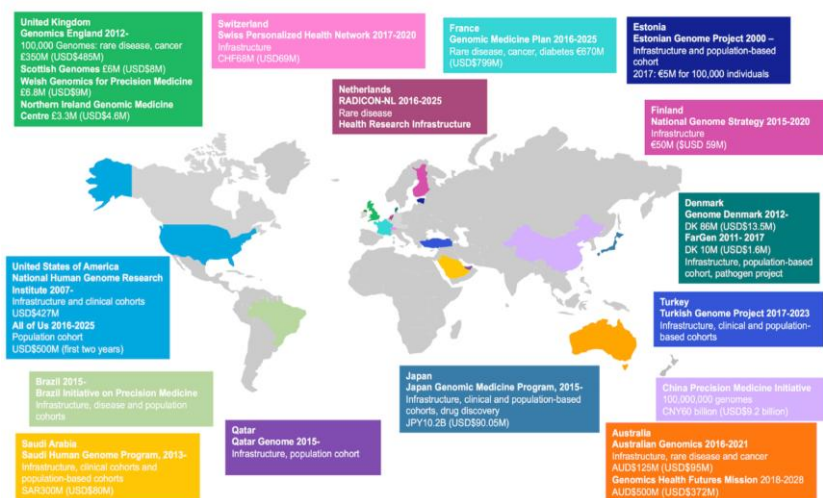
Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия.
e-mail: genseq@mail.ru

Быстрая эволюция технологий секвенирования ДНК и геномных секвенаторов привела к появлению многочисленных проектов, нацеленных на секвенирование индивидуальных геномов, и в первую очередь — геномов человека. Выполнение первого такого проекта (Project “Jim” —

секвенирование генома Джеймса Уотсона) заняло около двух лет (2005—2007) и обошлось в 2 млн дол. США. В конце 2007 года стартовал международный проект, предусматривающий секвенирование тысячи индивидуальных геномов (“The 1000 Genomes Project”), а в конце 2018 года в Великобритании был завершён «нацпроект» по секвенированию 100 тысяч геномов (“The 100 000 Genomes Project”, 2013—2018). В следующем подобном проекте, стартовавшем в 2019 году, британцы намерены за ближайшие пять лет секвенировать геномы уже пяти миллионов человек. Во Франции выполняется национальный проект “Genomic Medicine Plan” (2016—2025), нацеленный на создание широкой сети крупных региональных и федеральных геномных центров.

Ещё более быстрыми темпами развивается геномное секвенирование в США. Там в рамках проекта “The Precision Medicine Initiative” (PMI) в 2018 году было завершено полногеномное секвенирование миллиона человек. Не отстаёт от лидеров геномных гонок и Китай. Целью китайского проекта “China PMI” является секвенирование ста миллионов геномов (9,2 млрд дол. США, 2017—2030). Несколько менее крупных стран ориентируются на тотальное секвенирование всего своего населения (Катар, Саудовская Аравия, Исландия, Южная Корея, Дубай) [1].

Карта финансируемых правительствами национальных проектов (геномно-медицинских инициатив) [1]



Прогресс в сфере геномного секвенирования до недавних пор определялся в основном развитием мультимолекулярной флуоресцентной технологии SBS (sequencing by synthesis), разработанной компанией Illumina (США), и появлением на рынке всё более и более высокопроизводительных геномных секвенаторов. Последняя модель этой компании (NovaSeq 6000, 985 тыс. дол. США) способна за год оцифровать до 9 тыс. геномов. Ещё большую производительность должен иметь китайский флуоресцентный секвенатор MGISEQ-T7 (~1 млн дол. США), проходящий сейчас бета-тестирование.

Появление китайских конкурентов может привести к заметному снижению стоимости секвенирования геномов, но в ближайшем будущем возможны и более кардинальные перемены, связанные с появлением секвенаторов нового поколения — мономолекулярных.

Попытки разработать такие приборы предпринимались неоднократно. Наибольших успехов добилась компания Oxford Nanopore Technologies (UK), которой удалось повысить точность и производительность нанопорового секвенирования до приемлемого уровня. В результате в этом году в свободной продаже появились первые сравнительно дешёвые (165 тыс. дол. США) приборы, пригодные для массового секвенирования индивидуальных геномов человека (PromethION 24).

В ближайшие годы у компании Oxford Nanopore Technologies могут появиться конкуренты, разрабатывающие альтернативные мономолекулярные технологии секвенирования ДНК [2], но более вероятным представляется появление конкурентов, разрабатывающих аналогичные нанопоровые технологии геномного секвенирования [3].

ЛИТЕРАТУРА

1. Stark Z., Dolman L., Manolo T.A., Ozenberg B., Hill S.L. et al. Integrating Genomics into Healthcare: A Global Responsibility // *Am. J. Hum. Genet.* 104, 1, 2019, 13—20.
2. Способ безметочного одномолекулярного секвенирования ДНК и устройство для его реализации : патент РФ № RU 2679494 C1 от 26.12.2017.
3. Thomas O., Sagot B. Nanopore Sequencing : Patent Landscape Analysis, February 2019. (Ref.: KM19002). [Электронный ресурс]. URL: <https://www.knowmade.com/wp-content/uploads/2019/02/Nanopore-sequencing-2019-Patent-Landscape-FLYER.pdf>.

ОСОБЕННОСТИ ДНК-БЕЛКОВОГО УЗНАВАНИЯ

Сорокин А.А.^{1,2}

¹ Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия;

² Московский Физико-Технический Институт, Долгопрудный, Россия.

e-mail: lptolik@gmail.com

Основной дисциплиной, занимающейся анализом и предсказанием регуляторных сайтов, связывающихся с ними транскрипционных факторов, и типа регуляции в прокариотических геномах является биоинформатика. Эта дисциплина зародилась в 70-х годах прошлого века, как «ДНК лингвистика» и наибольшего развития она достигла в начале тысячелетия, когда была расшифрована последовательность большого количества геномов и появилась возможность и потребность в их функциональной аннотации, исследовании их схожести и различий.

Одна из основных парадигм биоинформатики заключается в том, что если две нуклеотидные последовательности похожи, они выполняют схожие функции. Такое представление зародилось, и было блестяще подтверждено при исследовании кодирующих участков генома. В самом деле, со сходных по последовательности генов, вследствие консервативности генетического кода, будут синтезированы похожие полипептиды, которые с большой вероятностью будут обладать сходными функциональными свойствами. Однако при описании регуляторных сайтов такой подход является гораздо менее эффективным.

Транскрипция, трансляция, редупликация и репарация это уникальные процессы, при которых происходит «чтение» последовательности ДНК или РНК за счет комплиментарного водородного связывания между нуклеиновыми основаниями. Напротив, во всех белково-нуклеиновых взаимодействиях определяющими являются физико-химические свойства нуклеотидной цепи, а не её нуклеотидная последовательность в чистом виде. Например, было показано, что белковая мимикрия, при которой специальный белок имитирует фрагмент ДНК для ингибирования бактериальной системы модификации-рестрикции, достигается за счет расположения отрицательно заряженных аминокислотных остатков в пространстве таким образом, что они создают электростатический потенциал сходный потенциалом ДНК.

Можно привести следующую аналогию: ДНК-связывающие белки (в том числе РНК- и ДНК-полимеразы) не умеют «читать» и рассматривают регуляторные сайты как ASCII-арт или фигурные стихи каллиграммы. При использовании такой аналогии каллиграммы можно рассматривать как регуляторные сайты, находящиеся внутри кодирующих областей, т.е. несущие как текстовый так и «графический» сигнал, а ASCII-арт является аналогом сайтов, имеющих только регуляторный «графический» смысл.

В рамках данной аналогии легко объяснить высокую вариабельность последовательности регуляторных сайтов: если посмотреть на каллиграмму видно, что замена одной буквы “m” на две “l” не приведет к заметному изменению рисунка, хоть и нарушит смысловую часть. В случае ASCII-арт возможна гораздо более свободная замена символов, например “|” можно поменять на “l” или “i”, а “@” на “o”, “c” и даже “m”, образ рисунка при этом заметно не изменится.

Как все аналогии, данная имеет свои границы применимости. Например, рисунок ASCII-арт образуется за счет дальних корреляций в последовательности букв, вследствие постоянного повторения строк фиксированной длины. ДНК сложно формировать паттерны за счет повторения строк, однако наличие кооперативных (термодинамическая стабильность) и дальнедействующих взаимодействий (электростатика), по-видимому, являются необходимыми для формирования «паралингвистических» паттернов физико-химических свойств, распознаваемых белками как регуляторные сайты.

Мы будем использовать представленную аналогию для рассмотрения последних достижений в экспериментальных исследованиях и моделировании ДНК-белковых взаимодействий. Мы покажем, как текстовые взаимодействия позволяют формировать визуальные паттерны из молекул ДНК и как формируются «паралингвистические» паттерны белково-нуклеинового узнавания в регуляторных областях.

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Круглов А.А., Груздева Н.А., Шигина В.Е., Кононов А.В., Евдокимовская Ю.В., Ерошова А.В., Дидук С.В., Басовский Ю.И., Соловьев В.В.</i> Применение технологии CRISPR-Cas в фармацевтической разработке	3
<i>Якушевич Л.В.</i> Электронная модель ДНК	5
<i>Ермаков А.М.</i> РНК-интерференция — механизмы и применение в молекулярной биологии	7
<i>Гуватова З.Г., Шапошников М.В., Краснов Г.С., Кудрявцева А.В., Москалев А.А.</i> Исследование транскриптомных профилей долгоживущих особей <i>Drosophila melanogaster</i>	10
<i>Сирота Н.П.</i> О методе ДНК-комет (comet assay)	13
<i>Зимин А.А.</i> Биоразнообразие нуклеотидного состава ДНК	15
<i>Кузнецова О.В.</i> Новые возможности применения нанопорового секвенирования, разработанного компанией Oxford Nanopore Technology	17
<i>Василенко О.В., Логачева М.Д., Федотова А.В., Лукашевич Н.А., Малов В.О., Кольжецов Н.П., Иванушкина Н.Е., Кочкина Г.А., Данилогорская А.А., Пинчук И.П., Озерская С.М.</i> Рациональная геномика и транскриптомика с Oxford Nanopore	18
<i>Соломенцев В.И., Сизова А.А., Скрыбин Ю.П., Кисличкина А.А., Майская Н.В., Иванов С.А., Фролов В.Б., Дентовская С.В., Анисимов А.П., Богун А.Г.</i> Реконструкция геномов микроорганизмов с использованием данных мономолекулярного секвенирования	21
<i>Харламов В.Г., Шаповалов И.С.</i> Illumina: обзор портфолио решений в области NGS	23
<i>Миронова И.В., Худая Е.А., Еремян А.А., Каймонов В.С., Померанцева Е.А.</i> Опыт работы на NovaSeq 6000 (Illumina)	24
<i>Горбачев А.А., Белова В.А., Кулемин Н.А., Ребриков Д.В., Коростин Д.О.</i> Сравнение NGS-платформ Illumina HiSeq 2500 и BGI MGISEQ-2000 на примере полногеномного секвенирования	26
<i>Гуторов М.А., Григорьев А.В., Мантуров А.О.</i> Секвенирование «по задержкам»: основы и возможности технологии	27
<i>Зубов В.В.</i> Секвенирование — 2019	30
<i>Сорокин А.А.</i> Особенности ДНК-белкового узнавания	33

Материалы конференции

«День ДНК — 2019»

25 апреля 2019 г.

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.

Под редакцией зам. директора по науке ИТЭБ РАН к.б.н. Левина С.Г.

Оформление и верстка Абакумовой Ю.Ю.

СПОНСОРЫ



<https://www.skygen.com/>



<http://www.albiogen.ru/>



<https://okabiolab.ru/>

