

Геномное
секвенирование
и редактирование

|2019
NGS

СБОРНИК ТЕЗИСОВ

7-й Всероссийской научно-практической конференции
по геномному секвенированию и редактированию

22-23 мая 2019 года
Москва

Электронный вариант тезисов: <http://ngsconference.ru/archive/2019>

ISBN 978-5-88458-369-6

Программный комитет конференции:

Александр Габиров (ИБХ РАН)
Михаил Гельфанд (ИППИ РАН)
Валерий Даниленко (ИОГен РАН)
Артур Исаев (ООО «ЦГРМ «Генетико»)
Сергей Куцев (МГНЦ)
Сергей Лукьянов (РНИМУ им.Пирогова)
Всеволод Макеев (ИОГен РАН)
Егор Прохорчук (РНИМУ им.Пирогова)
Николай Равин (Центр «Биоинженерия» РАН)
Денис Ребриков (РНИМУ им.Пирогова)
Дмитрий Трофимов (НМИЦ АГП им.Кулакова)
Мария Школьникова (НИКИП им.Вельтищева)
Николай Янковский (ИОГен РАН)

Организационный комитет конференции:

Дмитрий Коростин (РНИМУ им.Пирогова)
Дмитрий Щербо (РНИМУ им.Пирогова)
Денис Ребриков (РНИМУ им.Пирогова)

ИЗУЧЕНИЕ МУТАЦИОННОГО СТАТУСА ГЕНОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В ПАТОГЕНЕЗЕ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ФОРМ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, МЕТОДОМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

П.А.Гервас¹, Е.В. Денисов², А.М. Киселев³, А.Ю. Молоков², Н.В. Чердынцева¹

¹НИИ Онкологии, Томский НИМЦ РАН, Томск,

²Томский государственный университет, Томск,

³НМИЦ им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург

e-mail: pgervas@yandex.ru

В настоящее время к числу РМЖ-ассоциированных генов относят BRCA1, BRCA2, CHEK2, NBS1, p53, ATM и др., наследственные мутации в которых драматически повышают вероятность развития заболевания до 85–100%. Для монголоидного населения Российской Федерации (буряты, якуты, алтайцы, тувинцы, хакасы и др.) мутации генов, обуславливающие риск развития наследственных форм РМЖ, остаются неизученными. Методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) были проанализированы лейкоциты периферической крови 26 пациенток монголоидного происхождения с признаками наследственного РМЖ (20 тужинок, 3 бурятки и др.) с целью поиска онкомаркеров диагностики, эффективности лечения и прогноза течения заболевания. Для подготовки библиотек использовали набор Hereditary Cancer Solution™ (SOPHiA GENETICS, Switzerland) с целью обогащения 27 генов, ассоциированных с наследственными онкологическими синдромами. Секвенирование выполнялось на платформе NextSeq500 (Illumina, США). Молекулярно-генетические нарушения были найдены в генах BRCA2, MUTYH, MLH1, NBN, ATM, APC. В генах BRCA2 и MUTYH найдены клинически значимые нарушения (highly или likely pathogenic), для генов MLH1, NBN, ATM, APC найдены замены с неизученной значимостью (unknown significance). Таким образом, анализ 26 образцов периферической крови с применением метода высокопроизводительного секвенирования позволил выявить молекулярно-генетические нарушения, ассоциированные с наследственными формами РМЖ у пациенток монголоидного происхождения. Полученные данные требуют изучения частоты встречаемости вариантов генов BRCA2, MUTYH и др. на расширенной выборке пациенток с наследственными формами РМЖ монголоидного происхождения, а так же здоровых добровольцах.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №18-29-0904

СПЕКТР МУТАЦИЙ В ГЕНЕ CDKL5, ВЫЯВЛЯЕМЫХ ПРИ ЭКЗОМНОМ СЕКВЕНИРОВАНИИ, И КЛИНИЧЕСКИЕ КОРРЕЛЯЦИИ

*Н.В. Барышникова^{1,2}, Е.Г. Окунева¹, А.А. Козина^{1,2,3}, И.Д. Федонюк⁴,
А.Ю. Красненко¹, К.Ю. Цуканов¹, В.В. Ильинский^{1,3,5}*

¹ООО «Генотек», Москва,

²РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва,

³НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва,

⁴РДКБ, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва,

⁵ИОГен им. Н.И.Вавилова, Москва

e-mail: nbaryshnik73@yandex.ru

Мутации в гене CDKL5 приводят к ранней детской эпилептической энцефалопатии 2 (Epileptic encephalopathy, early infantile, 2 (OMIM:300672), наследующейся по X-сцепленному доминантному типу. Заболевание характеризуется тяжёлой задержкой психомоторного развития и эпилепсией с началом до 5 мес, и встречается как у девочек, так и у мальчиков. Данные о мутациях и полиморфизмах в гене CDKL5 у российских пациентов единичные и в базе RettBase IRSA MECР2 Variation Database не представлены.

В гене CDKL5 нами обнаружено 15 вероятно патогенных вариантов у 15 обследованных (8 пациентов женского пола и 7 мужского) из 3000 обследованных с различными направляющими диагнозами. В 11 случаях были выявлены миссенс-мутации, в 3-х случаях – фрейм-шифт мутации (в 8, 16 и 18 экзонах), и 1 нонсенс-мутация (в 19 экзоне). Среди выявленных вариантов три были описаны ранее: с.2767С>Т(р.Arg923Cys), с.2908С>Т(р.Arg970*) и с.2200А>G(р.Thr734Ala)), остальные мутации были новыми.

У 12 пациентов (7 пациентов женского пола и 5 мужского) с мутациями в гене CDKL5 поводом для направления на секвенирование экзона являлось наличие эпилепсии и/или задержки психомоторного развития. У 3-х пациентов (2 пациентов мужского пола и 1 женского) без клинической картины, характерной для расстройства CDKL5, выявленные генетические варианты (два в 12 экзоне и один в 21 экзоне) могут быть расценены как редкие полиморфизмы. У 5 пациентов с мутациями в гене CDKL5 были обнаружены мутации в других генах, ассоциированных с заболеваниями со сходным фенотипом. Для оценки роли этих мутаций требуется продолжение исследования.

Наше исследование позволяет расширить знания о спектре мутаций и полиморфизмов в гене CDKL5, и продолжить анализ гено-фенотипических корреляций, что актуально для прогноза степени тяжести заболевания.

СПЕКТР ВЫЯВЛЕННЫХ МУТАЦИИ ПРИ СИНДРОМЕ УДЛИНЁННОГО ИНТЕРВАЛА QT (LQT) И ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФОРМАХ КАРДИОМИОПАТИЙ В РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ NGS.

*Е.Г. Окунева, Н.В. Барышникова, А.А. Козина, А.Ю. Красненко, О.И. Климчук,
Е.И. Суркова, В.В. Ильинский
ООО «Генотек», Москва
e-mail: elokuneva@bk.ru*

Обследовано 73 пациента с диагнозом LQT и 14 – кардиомиопатия (гипертрофическая, дилатационная, рестриктивная, неуточненного генеза) методом NGS («Клинический экзом»).

Молекулярно-генетическое исследование было проведено методом параллельного высокопроизводительного секвенирования нового поколения в лаборатории «Генотек» г.Москвы. ДНК-библиотеки готовились с помощью набора NEBNext® Ultra™ DNA LibraryPrepKitforIllumina (NewEnglandBiolabs) с использованием адаптеров для секвенирования на платформе Illumina, согласно протоколу производителя. Секвенирование проводилось на геномном анализаторе HiSeq2500 (Illumina) с использованием парных прочтений длиной 100 нуклеотидов.

Биоинформатическая обработка выполнена собственным программным решением компании Genotek. Аннотация мутаций и их патогенность предсказывалась согласно Стандартам и Руководству, разработанным ACMG, AMP и CAP для интерпретации мутаций, полученных с помощью секвенирования

Из 73 пациентов с LQT и 14-и патогенные и вероятно-патогенные мутации не выявлены. У остальных выявлено всего 91 мутация в генах, приводящих к LQT и другим формам нарушения сердечного ритма. Причём у 27-и пациентов выявлено более одной мутации в соответствующих генах. 24 мутации (26,4%) ранее были описаны в генетических базах данных как патогенные, остальные – ранее не описаны, либо характеризовались как мутации с неизвестным клиническим значением или вероятно доброкачественные. Примерно 50% всех выявленных мутации (46) находились в генах KCNE1 KCNH2 KCNQ1 и SCN5A; 45 мутаций в 18-и других генах, причём 7 их них – в гене ANK2, в котором мутации встречаются сравнительно редко при LQT.

Из 14-и пациентов с различными формами кардиомиопатий у всех были выявлены патогенные и вероятно-патогенные мутации. Причём в 3-х случаях диагноз был изменён.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ НЕЙРОНАЛЬНОГО ЦЕРОИДНОГО ЛИПОФУСЦИНОЗА, ВЫЯВЛЯЕМЫЕ ПРИ ЭКЗОМНОМ СЕКВЕНИРОВАНИИ

*А.А. Козина^{1,2,3}, Е.Г. Окунева³, Н.В. Барышникова^{1,3}, А.Ю. Красненко^{1,3},
К.Ю. Цуканов³, В.В. Ильинский^{1,2,3}*

¹РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва

²НИИ биомедицинской химии им. Ореховича, Москва

³ООО «Генотек», Москва

e-mail: doctor@genotek.ru

В результате экзомного секвенирования у 5 пациентов от 3 до 5 лет выявлены мутации в генах, связанных с развитием нейронального цероидного липофусциноза (НЦЛ). У двух пациентов выявлены мутации в гене TPP1, связанном с частым классическим позднейнфанальным НЦЛ 2 типа. У №1, мальчика 5 лет с дебютом в 2 года с развития судорог, выявлена патогенная описанная гомозиготная мутация с.622C>T (p.Arg208*) - образование стоп-кодона в 6 экзоне гена TPP1. У пациента №2, девочка 3х лет с дебютом в 2 года 4 месяца с фебрильных судорог, обнаружены 2 мутации в гене TPP1: описанная гетерозиготная мутация с.622C>T (p.Arg208*) - образование преждевременного стоп-кодона в 6-м экзоне, и гетерозиготная описанная мутация сайта сплайсинга с.89+5G>C. У пациента №3, мальчика 5 лет с дебютом заболевания с 2х лет, выявлена неописанная гомозиготная мутация с.396dupT (p.Val133fs) - инсерция со сдвигом рамки считывания в 4 экзоне - в гене CLN6, связанном с развитием варианта позднейнфанального 6 типа НЦЛ. У пациента №4, девочки 5 лет, дебют в 2,5 года с регресса речевого развития. Выявлена гомозиготная мутация с.525T>A (p.Cys175*) - образование стоп-кодона в 6 экзоне - в гене MFSD8, связанном с развитием варианта позднейнфанального 7 типа НЦЛ. У 5 пациента, мальчика 4х лет с дебютом в 1 год 9 месяцев (регресс моторных навыков, судороги), в гене KCTD7, связанном с развитием инфанального 14 типа НЦЛ, выявлены 2 описанные миссенс-мутации с.337T>C (p.Ser113Pro) и с.190A>G (p.Thr64Ala).

У всех пациентов отмечался регресс развития, судорожные приступы, атрофические изменения головного мозга. У больных с нейродегенерацией необходимо исключать группу НЦЛ, для чего целесообразно проведение экзомного секвенирования с целью поиска мутаций в том числе и в редких типах НЦЛ.

ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЙ ВАРИАНТ RS12722 (С/Т) COL5A1 ГЕНА СВЯЗАН С РИСКОМ РАЗРЫВА ПЕРЕДНЕЙ КРЕСТООБРАЗНОЙ СВЯЗКИ В РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

В.П. Пушкарёв^{1,2,5}, Д.А. Дятлов², Р.Р. Ахметьянов⁴, Ю.Э. Пушкарёва³, Л.Н. Поляк⁴

¹Центр спортивных инновационных технологий и подготовки сборных команд, Москва

²Уральский Государственный университет физической культуры, Челябинск

³Южно-Уральский Государственный медицинский университет, Челябинск

⁴Челябинская областная клиническая больница, Челябинск

⁵Медико-генетический центр «Проген», Москва

e-mail: v.p.pushkarev@gmail.com

Цель исследования: оценка влияния варианта последовательности rs12722 (С/Т) COL5A1 гена на риск разрыва передней крестообразной связки (ПКС) коленного сустава в европеоидной популяции Уральского региона России. Материалы и методы: основная группа включала 173 пациента с разрывом ПКС, контрольная группа – 370 человек без симптомов разрыва ПКС. Обе группы не отличались по полу, возрасту, росту, массе и индексу массы тела. Результаты: наблюдались следующие генотипические частоты (%): основная группа – Т/Т - 34,1; С/Т - 46,8; С/С - 19,1; контроль – Т/Т – 25,4; С/Т - 50,8; С/С - 23,8%. Генотипические частоты в обеих группах находились в равновесии Харди-Вайнберга. Выявлено существенное различие аллельных частот между группами ($p = 0,039$). Число людей с генотипом Т/Т против тех, у кого есть С аллель (С/Т+ С/С генотипы), в основной группе было достоверно выше, чем в контроле ($\chi^2 = 4,408$, $p = 0,036$ при 1 ст. св.; LR-тест = 4,325, $P = 0,038$ при 1 ст. св.). Отношение шансов равно 1,52 (95% доверительный интервал: 1,027-2,249). Выводы: впервые была показана ассоциация вариации rs12722 COL5A1 гена с риском разрыва ПКС в российской популяции.

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ UCP2 Ala55Val и UCP3 -55C/T ГЕНОВ РАЗОБЩАЮЩИХ БЕЛКОВ 2 И 3 ТИПОВ С АВТОНОМНОЙ РЕГУЛЯЦИЕЙ СЕРДЦА У СПОРТСМЕНОВ-ГРЕБЦОВ

*А.А. Мельников¹, А.С. Бобылев²,
Ярославское высшее военное училище противовоздушной обороны,
Ярославль,
¹ЯГПУ им. К.Д. Ушинского, Ярославль
e-mail: meln1974@yandex.ru*

В работе изучено влияние генетических полиморфизмов разобщающих белков UCP2 Ala55Val and UCP3 -55C/T на автономную регуляцию сердечного ритма (спектральные показатели ритма сердца) у спортсменов-гребцов (n=35). Результаты. Установлено, что полиморфизм UCP2 Ala55Val был ассоциирован с МПК и спектральными показателями ВСР в положении лежа. У спортсменов с генотипом UCP2 Val/Val уровни МПК и HF были выше, а отношение LF/HF ниже, чем у лиц с генотипами Ala/Ala и Ala/Val. Кроме того, полиморфизм UCP3 -55C/T ассоциировался с показателями ВСР в положении лежа и более существенно в ортостазе. У спортсменов с генотипом UCP3 T/T уровни МПК, HF и VLF в положении стоя были выше, чем у носителей генотипа C/C. Заключение. Генетические полиморфизмы UCP2 Ala55Val и UCP3 -55C/T, вероятно, вовлечены в автономную регуляцию сердца. Аллели UCP2 55Val и UCP3 -55T могут, по крайней мере, частично, отвечать за повышенную ВСР у высокотренированных спортсменов.

ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСКРИПТОМА КРОВИ ПОЗВОЛИЛО ВЫЯВИТЬ НОВЫЕ МАРКЕРЫ АДАПТАЦИИ К ВЫСОКОГОРНОЙ ГИПОКСИИ У ПРОФЕССИОНАЛЬНЫХ СПОРТСМЕНОВ

*А.С. Глотов¹, Е.С. Вашукова¹, А.Р. Шувалова¹, А.Д. Золотарева¹,
И.З. Зеленкова², Д.Е. Полев¹, А.В. Предеус³, О.С. Глотов¹, П.И. Лидов⁴,
М. Розина⁵, В.Л. Гоготова⁵*

¹СПбГУ, Санкт-Петербург

²Инновационный центр Российского олимпийского комитета, Москва

³Институт биоинформатики, Санкт-Петербург

⁴Федеральный центр подготовки спортивного резерва, Москва

⁵Союз конькобежцев России, Москва

e-mail: anglotov@mail.ru

Высокая интенсивность физических упражнений, особенно в условиях адаптации к гипоксии в высокогорье, приводит к серьезным изменениям молекулярно-биологических процессов в организме человека. Такие изменения являются важным показателем здоровья человека и его готовности к выполнению интенсивных физических нагрузок в будущем. Одним из наиболее адекватных методов оценки этого состояния может быть изменение уровня экспрессии генов до и после выполнения физических упражнений.

Нами проведено исследование транскриптома цельной крови человека у 7-ми высококвалифицированных спортсменов – конькобежцев. Забор биологического материала был проведен до и после выполнения нагрузки на высоте 1800 метров в период максимальной адаптации. Выявлен список дифференцированно экспрессируемых генов. Методами функциональной аннотации обнаружено изменение экспрессии генов следующих биологических путей: иммунной и адаптивной иммунной системы, МАРК- сигнального пути, белков внеклеточного матрикса, гемостаза, ЕСМ-ассоциированных белков, белков общего метаболизма, нейрональных систем, метаболизма липидов, треонина.

Данные находки позволяют предположить новые механизмы формирования устойчивости к физической нагрузке в условиях гипоксии и служить для коррекции индивидуальных программ подготовки спортсменов.

ОТЕЧЕСТВЕННЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ МИКРОЧИПЫ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ – НОВЫЙ ИНСТРУМЕНТ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО ГЕНОТИПИРОВАНИЯ СПОРТСМЕНОВ

Д.О. Фесенко^{1,2}, И.Д. Ивановский³, М.О. Аксенов⁴, И.И. Ахметов⁵

¹ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

²ООО «БИОЧИП-ИМБ», Москва

³ООО «Центр исследования ДНК», Москва

⁴РЭУ им. Г.В. Плеханова, Москва

⁵Liverpool John Moores University, Liverpool, UK

e-mail: dnarescenter@gmail.com

Создана технология гидрогелевых биологических микрочипов, позволяющая одновременно генотипировать от десятков до нескольких сотен полиморфизмов (SNP) и мутаций в геноме. К настоящему моменту в активе Института более 40 тест-систем для применения в медицине и других сферах. В 2018-2019 годах в тесном сотрудничестве с ведущими спортивными генетиками созданы биочипы на 26, 50 и 73 SNP для определения спортивной направленности, степени одаренности, психогенетических особенностей, корректировки тренировочного процесса. По мере развития спортивной генетики, уже разработанные тест-системы могут быть в кратчайшие сроки дополнены новыми полиморфизмами, значимыми для спортивного развития. Одна из особенностей технологии – высокая производительность: стандартная ПЦР-лаборатория может ежедневно генотипировать 200-300 образцов ДНК по выбранной панели SNP. Это обеспечивает реальные технические возможности для широкого внедрения спортивной генетики в отбор, специализацию и тренировочный процесс.

ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9 ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ ХОЛИНЕРГИЧЕСКОГО ДЕФИЦИТА В МОЗГЕ МЫШИ

*М.Ю. Степаничев¹, Ю.С. Спивак¹, Э.Б. Дашинимаев², Ю.С. Василенко²,
А.П. Большаков¹, О.А. Недогреева¹, А.А. Яковлев¹, Н.В. Гуляева¹*

¹ИВНД РАН, Москва

²ИБР им. Н.К. Кольцова РАН, Москва

e-mail: m_step_68@mail.ru

Болезнь Альцгеймера (БА) – нейродегенеративное прогрессирующее заболевание, ранние этапы которого характеризуются нарушением мнестических функций. Одной из центральных причин возникновения когнитивных нарушений при БА является холинергический дефицит. Нарушение холинергической нейротрансмиссии может быть обусловлено гибелью холинергических нейронов, угнетением активности холинацетилтрансферазы (ХАТ), нарушением экспрессии соответствующего гена. Интересно, что и у пациентов с БА, и в экспериментальных моделях на грызунах показана возможность длительного выживания нейронов, утративших свой холинергический фенотип.

В задачу настоящей работы входило создание конструкции на основе системы редактирования генома CRISPR/CAS9 для моделирования холинергического дефицита у взрослых животных. В ходе биоинформатического анализа были подобраны последовательности одноцепочечных гидовых РНК, способные создать делецию размером 41 нуклеотид в кодирующем участке гена *Chat*. Синтезированные нуклеотиды были клонированы в плазмиду LentiCRISPRv2GFP, которая была использована для продукции лентивирусных частиц. После наработки и концентрации вирусных частиц, их апплицировали в культуру 3T3NIH фибробластов мыши. С помощью флуоцитометрии было показано, что эффективность заражения клеток составила 2.66%. Анализ мутаций, проведенный с помощью T7 нуклеазы, выявил присутствие мутаций в гене *Chat* в случае использования как минимум двух из созданных конструкций. Проводятся эксперименты на культуре клеток NB41A нейробластомы мыши. Таким образом, в результате работы созданы конструкции, пригодные для использования в ткани млекопитающих и способные вызывать делеции в гене, кодирующем ХАТ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Президиума РАН по Программе ФИМТ.

РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МИОДИСТРОФИИ У ЖИВОТНЫХ

*Д.И. Пискарёв, Н.А. Слесаренко, С.В.Кузнецов
МГАВМиБ-МВА им К.И. Скрябина, Москва
e-mail: biology.daniil@gmail.com*

В нашем исследовании проводилось тестирование лекарства на животных, созданное на основе CRISPR-Cas9, для лечение миодистрофии у человека.

Для первичных тестирований на животных новорожденным мышам с мутацией гена дистрофина вводился комплекс нуклеазы Cas9 и направляющей РНК (sgRNA), которая нацеливается на нужный ген (DMDh). После инъекции поведение мышей наблюдали, отслеживая темпы наступления болезни, массу тела, и сохранность функций сердца. Через четыре недели после инъекции у них брались образцы тканей, и отправлялись на лабораторную диагностику. В тканях животных измерялось содержание мутантного белка и оценивалось количество «пропущенных экзонов» в последовательности ДНК путем глубокого секвенирования.

Чтобы проверить эффективность работы системы, необходимы были тестирования на крупных животных. Модельным организмом были выбраны собаки породы бигль, у которых от природы встречается та же мутация, что и у 13 процентов больных людей. Кроме того, симптомы болезни у собак напоминают таковые у человека и включают в себя кардиомиопатию.

В качестве средства доставки CRISPR-системы использовался аденоассоциированный вирус AAD9, который имеет повышенное сродство к мышечной ткани. ДНК, кодирующая Cas9 и направляющая РНК, вводилась в организм собак в составе двух разных вирусных частиц. В первом эксперименте двум щенкам в икроножную мышцу ввели вирусные частицы и через шесть недель оценили восстановление мышечной ткани. В подопытной мышце большинство волокон экспрессирует дистрофин, а суммарно его синтез восстановился на 60 процентов от нормы. В то же время в соседних мышцах экспрессия дистрофина составила не более двух процентов от нормы.

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА, КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ МЕТОД ТЕРАПИИ ЭКСПАНСИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

*Е.М. Шитик, А.А. Вельмискина, Д.В. Юдкин
ВБ «Вектор», Новосибирск
e-mail: shitik_ekaterin@mail.ru*

Заболевания, ассоциированные с экспансией тринуклеотидных повторов, преимущественно относятся к нейродегенерациям. Данные заболевания носят острый социальный характер, так как приводят к социальной дезадаптации, значительно сокращают продолжительность жизни населения и не имеют эффективной этиопатогенетической терапии. Наиболее распространенными представителями данной группы являются синдром ломкой X-хромосомы с частотой встречаемости 1 на 4000 мужского населения и миотоническая дистрофия с частотой встречаемости 1 на 10000 населения. Непосредственной причиной возникновения синдрома ломкой X-хромосомы является экспансия (CGG)_n повтора в 5'UTR гена FMR1, а причиной миотонической дистрофии является экспансия (CTG)_n повтора в 3'UTR гена DMPK.

Несмотря на сходную причину представленных заболеваний, патогенез их различен. При увеличении размера повтора в гене DMPK происходит наработка мРНК, токсичной для мышечных клеток, а в случае гена FMR1 количество мРНК значительно снижается. В рамках данного проекта мы изучаем влияние делеции тринуклеотидного повтора на экспрессию генов FMR1 и DMPK. Все работы проводятся на культурах клеток HEK293A и культурах ИПСК, полученных из В-лимфоцитов пациентов с соответствующими заболеваниями. Делеция тринуклеотидного повтора выполняется при помощи плазмиды pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) (Addgene plasmid: 48138).

Разработка генотерапевтических подходов для борьбы с экспансионными заболеваниями при помощи системы CRISPR-Cas9 внесет существенный вклад в развитие медицинской генетики и неврологии. Данная методика позволит улучшить качество жизни пациентов, что решит ряд социальных и экономических проблем, связанных с данными заболеваниями.

Работа выполняется при поддержке гранта РФФИ 18-29-07033.

TOBACCO PHYTOENDESATURASE GENE EDITING USING CRISPR/CAS9 TECHNOLOGY

*G.R. Gumerova, A.V. Chemeris, B.R. Kuluev
Institute of Biochemistry and Genetics RAS, Ufa
e-mail: gulnar.yas@mail.ru*

CRISPR/Cas9 system is one of the most promising method of gene editing in modern genetic engineering. This technique is based on microbial adaptive immune system and allowed to modify a specific genome in precise and predictable manner. CRISPR/Cas9 is a multipurpose technology for genetic engineering that relies on the complementarity of the guideRNA (gRNA) to a specific sequence and the Cas9 endonuclease activity. Researches on this area have shown that CRISPR/Cas9 is a great tool to edit many genes in a variety of plant species, including the model plant species as well as agriculturally important crops. Particularly it has broadened the agricultural research area, bringing in new opportunities to develop novel plant varieties with deletion of detrimental traits or addition of significant characters. Tobacco phytoendesaturase (PDS) gene is one of the most attractive sites for gene knockout/knock-in experiments. This protein is a key enzyme in carotenoid biosynthesis. Disruption of PDS expression leads to inhibition of carotene synthesis resulting in the formation of decolourized plants. These «white» plants can serve as a phenotypic marker for the determination of gene editing. Experiments on silencing of tobacco PDS gene using CRISPR/Cas9 technology and obtaining tobacco PDS - knockout plants are planned in our laboratory. This practice needs to test purchased commercial CRISPR vectors, which containing gene of Cas9 protein (pKIR1.1 and pK7WGF2::hCas9) and corresponding gRNA (pICH86966::AtU6p::sgRNA_PDS). Subsequently experiments on CRISPR/Cas9 mediated knock-in approaches in the PDS of various genes of interest were planned. Biolistic bombardment mediated delivery of CRISPR vectors to plant explants will be used.

THE MICROBIOME OF EXTREME LIVING SYSTEMS: BIODIVERSITY OF HALOPHILE BACTERIA AND ARCHAEA OF THE RHIZOSPHERE OF ATRIPLEX CANA

*S.H.A. Begmatov^{1,2}, O.V. Selitskaya², T.A. Kanapatskiy¹,
Y.Y. Berestovskaja¹, L.V. Vasilyeva¹*

¹*Winogradsky Institute of Microbiology, RAS, Moscow*

²*Timiryazev Agricultural Academy, Moscow*

e-mail: leeuwenhoekvan@gmail.com

Halophiles are considered to be one of the classes of extremophiles and their major role in the saline ecosystems to participate in a biogeochemical cycle of elements (nitrogen, sulfur, carbon, phosphorus and etc.), and to interact with other living for instance, in salinated soils and host plant microbiome, they are alleviating resistance of host plants to salt stress. Plants have a symbiotic relationship with these microorganisms, which increase their adaptation to potentially extreme conditions. Our studies are focused on understanding more ecological taxonomic groups of halophiles which directly or indirectly influence the growth of host plants. For more understanding, these mechanisms were performed Illumina sequencing of the V4 hypervariable region of the 16S rRNA genes amplified from total DNA of selected soils samples from the rhizosphere of *Atriplex cana* which is halophyte plant. Experiments carried out by standard lab protocols. The obtaining results demonstrate that the biodiversity of ecological taxonomic groups of including most halophilic represents (genera and families) of domains Bacteria. The presence of these taxonomic groups of bacteria and eubacteria indicated the important functions of their role in the living systems and biosphere. The investigating of biodiversity of halophile microorganisms, especially they associate with plant rhizosphere, by this, explaining these plant-microbe interactions in extreme ecosystems can be fundamental evidence for developing prospective biotechnological applications.

ИЗУЧЕНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО СООБЩЕСТВА, СПОСОБНОГО ПОРАЖАТЬ ПРОИЗВЕДЕНИЯ ТЕМПЕРНОЙ ЖИВОПИСИ 16-ГО ВЕКА ИЗ ГОСУДАРСТВЕННОЙ ТРЕТЬЯКОВСКОЙ ГАЛЕРЕИ

А.А. Жгун¹, Д.А. Авданина¹, М.П. Потапов¹, Е.А. Любавская²

¹ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва,

²Государственная Третьяковская галерея, Москва

e-mail: zzhgun@mail.ru

Микроорганизмы способны использовать для своего роста самые разнообразные субстраты. Наша работа связана с изучением состава микробиологического сообщества, способного поражать произведения темперной живописи. Для этого с разрешения главного хранителя Государственной Третьяковской галереи (ГТГ) в залах Живописи Древней Руси отобрали 51 пробу с поверхностей трех экспонатов темперной живописи 16-го века и 55 проб с окружающих зон, в том числе, с внутренних коммуникаций, где обнаружили видимые глазом обширные очаги микробиологического роста. Отобранные пробы использовали для получения культур микроорганизмов, которыми затем инокулировали созданные в реставрационной мастерской ГТГ макеты с отдельными лакокрасочными материалами, используемыми в темперной живописи. Доминантные бактериальные и грибные виды в культурах генотипировали по V3/V4 рДНК и ITS1, ITS2 – соответственно, в результате секвенирование по Сенгеру; последовательности 15-ти грибных изолятов депонировали в GenBank. Это позволило нам перейти к этапу NGS секвенирования для характеристики составов, как исходных микроорганизмов, так и полученных на их основе смешанных культур. Предварительные данные, полученные с использованием Illumina MiSeq, Nextera XT Index kit (Illumina, Inc., USA), показали сохранение в смешанных культурах доминантных представителей бактерий и грибов, присутствующих в исходных пробах. Поскольку смешанные культуры продемонстрировали эффективный рост на поверхностях большинства макетных материалов, полученные данные говорят о потенциальной опасности изучаемых микроорганизмов для темперных экспонатов, в случае отклонений от температурно-влажностных условий хранения. Работа поддержана грантом РФФИ 17-29-04349

АНАЛИЗ СОСТАВА МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ РЕАКТОРОВ БИООКИСЛЕНИЯ СУЛЬФИДНОГО КОНЦЕНТРАТА

*А.Г. Булаев
ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва
e-mail: bulaev.inmi@yandex.ru*

Биоокисление золотосодержащих сульфидных концентратов успешно используется более 30 лет. Целью работы было исследование микробных популяций, сформировавшихся в процессах биоокисления концентрата, содержащего 62 г/т Au, при 40 и 45°C, которые проводили в лабораторных биореакторах. При 45°C исследовали влияние источников углерода на процесс, внося в пульпу 0.02% мелассы или подавая CO₂ в пульпу реактора (0,01 л/мин). Состав микробных сообществ определяли с помощью секвенирования на платформе Illumina переменных участков генов 16S рРНК V3 и V4. Для каждой пробы анализировали около 10000 фрагментов средней длиной 486 нуклеотида. Биоокисление при 40°C позволило поднять извлечения золота из концентрата с 43 до 93%. В популяции преобладали бактерии 78% и 15%, бактерии и археи составляли минорную часть популяции. Биоокисление при 45°C в контрольном эксперименте и при использовании мелассы и CO₂ позволило повысить извлечение золота до 73, 81 и 84% соответственно. Бактерии в популяциях практически не детектировались. В контрольном эксперименте в популяции преобладали 35% и археи 59%. Добавление мелассы привело к увеличению доли до 70%, значительными были доли 18% и 11%. При подаче CO₂ доля возрастала до 31%, доли и составляли 38 и 27% соответственно. Полученные результаты позволяют сделать выводы о причинах зависимости эффективности биоокисления сульфидного концентрата от условий процесса, которые могут заключаться во влиянии на состав микробных популяций.

SEQUENCING OF A NOVEL *BACILLUS* BACTERIOPHAGE VB_BTS_B83, A PUTATIVE MEMBER OF A NEW PHAGE GENUS

E.G. Pilgrimova, O.A. Kazantseva, A.M. Shadrin
Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, RAS,
Pushchino
e-mail: e.pilgrimova@ibpm.ru

Bacteriophages (phages) are viruses that infect bacteria. Phages are widely used for the development of antibacterials, diagnostic systems and delivery medicines. For more efficient use of bacteriophages in medicine, veterinary medicine, agriculture and the food industry the studying of phages using whole genome sequencing is needed. Here we present a novel temperate bacteriophage B83 infecting *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* strains. B83 was isolated from its host strain *B. thuringiensis* VKM B-83 and phage genomic DNA was sequenced using Illumina with TruSeq DNA Sample Preparation Kit. The resulted reads were assembled into a single contig with average coverage 115 using SPAdes 3.12.0. The genomic sequence contains 49952 bp with GC-content of 35.8%. A total of 71 open reading frames were identified with RASTtk, of which 35 ORFs were then functionally assigned using BLAST and HHPred. A “headful” DNA packaging mechanism was predicted using PAUSE3 analysis and then confirmed experimentally. Using BLASTN and CoreGene3.5 we identified related phages which are unclassified and distinct from other phage genomes, so they may represent a new genus together with B83. The reported study was funded by RFBR according to the research project № 19-04-00300

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ КЛОНА BEIJING B0/W148 ПО СКОРОСТИ НАКОПЛЕНИЯ ШЛУ МУТАЦИЙ

*П.А. Хромова, В.В. Синьков, О.Б. Огарков
НЦ “Проблем здоровья семьи и репродукции человека”, Иркутск
e-mail: polina.and38@gmail.com*

Туберкулез (ТБ) – является одной из актуальных проблем мирового здравоохранения и входит в число десяти ведущих причин смерти на планете. Среди всех генотипов данного возбудителя особое эпидемическое значение имеют высоко- вирулентные и трансмиссивные субтипы штаммов генотипа Beijing. На территории РФ наиболее часто встречается субтип B0/W148. Данный субтип характеризуется наиболее высокими темпами роста популяции и развитием эпидемии МЛУ в России. Целью данной работы являлось изучение распределения мутаций в генах ЛУ среди штаммов выделенных на территории Российской Федерации. Среди последних опубликованных данных, исследовано 173 геномных последовательности (SRA NCBI). Было установлено, что из 169 геномов, 154 относились к семейству Beijing (91%), среди которых 119 геномов относились к кластеру B0/W148 (77%). Анализ филогенетического дерева позволил четко определить четыре эпидемических кластера. На основе данных наличия мутаций ЛУ среди геномов, относящихся к клону B0/W148, была определена распространенность МЛУ и ШЛУ (широкой лекарственной устойчивости) вариантов, которые составили 18% и 54% соответственно. Сравнение ЛУ-мутаций к противотуберкулезным препаратам между кластерами показало, что среди сравниваемых групп (4 и 5 кластер) имеются достоверно значимые различия распределения числа мутаций для МЛУ и ШЛУ ($\chi^2=4,7$; $p=0,03$). Кластер 4 характеризуется значимо меньшим количеством штаммов, несущих ШЛУ мутации ($\chi^2=6,3$; $p=0,01$). Можно предположить, что несмотря на преобладание ШЛУ мутаций среди основного числа геномов, принадлежащих субтипу B0/W148, в данной выборке также встречаются штаммы более медленно накапливающие ШЛУ мутации, что говорит о генетической гетерогенности всего субтипа B0/W148.

ИССЛЕДОВАНИЕ НОВЫХ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНОВ МУЛЬТИЛОКУСНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ-ТИПИРОВАНИЯ С ПОМОЩЬЮ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ВТОРОГО ПОКОЛЕНИЯ

*А.А. Шеленков¹, Ю.В. Михайлова¹, Ю.Г. Янушевич¹,
В.С. Фомина², М.Н. Замятин², Д.А. Шагин¹
¹Центральный НИИ Эпидемиологии, Москва,
²НМХЦ им. Н.И. Пирогова, Москва
e-mail: shelenkov@cmd.su*

Метод мультилокусного секвенирования-типирования (МЛСТ) является распространенным способом анализа структуры популяций патогенных бактерий с целью мониторинга циркуляции штаммов внутри конкретного медицинского учреждения и в общемировом масштабе. Результатом МЛСТ является сиквенс-тип штамма.

Разработаны схемы МЛСТ, в которых сиквенс-тип определяется по комбинации известных аллелей 7 консервативных генов конкретного вида бактерий. Длина таких генов составляет 400-600 нуклеотидов, и количество известных аллелей для каждого из них может достигать 600. Число известных сиквенс-типов может составлять более 4000. Ранее МЛСТ выполнялся путем секвенирования генов по Сэнгеру, однако с развитием секвенирования второго поколения (NGS), определение сиквенс-типов все чаще стали выполнять на основе биоинформатического анализа полных геномов бактерий.

В настоящей работе было проведено полногеномное секвенирование 23 клинических изолятов золотистого стафилококка и 70 синегнойной палочки (на платформе Illumina HiSeq. Сборка геномов была выполнена с помощью SPAdes, определение сиквенс-типов – по базе данных PubMLST (<http://pubmlst.org>). Был выявлен изолят, имевший ранее не описанный аллель гена *pta*; был найден изолят, имевший новый аллель гена *argE*, и два изолята, имевших новые сиквенс-типы. Последовательности новых аллелей были подтверждены путем секвенирования по Сэнгеру и депонированы в PubMLST (*pta_647*; *argE* - на рассмотрении).

Таким образом, NGS позволяет проводить быстрый, но при этом надежный, поиск новых аллелей генов МЛСТ и сиквенс-типов для большого количества клинических бактериальных изолятов. Полученные данные имеют важное значение для мониторинга популяции возбудителей клинически значимых инфекций.

ОТВЕТ МХА НА ЗАРАЖЕНИЕ ФИТОПАТОГЕННЫМИ БАКТЕРИЯМИ НА ТРАНСКРИПТОМНОМ И МЕТАБОЛОМНОМ УРОВНЯХ

Н.А. Сухих¹, Е.Д. Егорова¹, А.В. Предеус², С.В. Виноградова¹

¹ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва,

²Институт биоинформатики, Санкт-Петербург

e-mail: svetlana.vinogradova@biengi.ac.ru

Мох является модельным объектом и широко используется для изучения процессов клеточной и эволюционной биологии растений. В данной работе проводили анализ транскриптома и метаболома мха, зараженного биотрофными бактериями. Секвенирование транскриптома мха проводили на платформе SOLiD 4 (Life Technologies). Детекцию метаболитов проводили на газовом хроматомакс-спектрометре GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu).

В результате анализа данных в образцах на метаболомном уровне были обнаружены продукты конечной деградации аскорбиновой кислоты, участвующей в фотосинтезе и дыхании. На транскриптомном уровне происходит увеличение экспрессии генов, входящих в сингальный путь фотосинтеза у образцов мха инокулированного, в то время как наблюдается снижение уровня экспрессии этих генов и деградация хлоропластов. Также было показано, что на 5 день после инокуляции бактерией происходит повышение экспрессии генов, входящих в сигнальный путь биосинтеза флавоноидов. В процессе эволюции флавоноиды играли важную роль в адаптации растений к условиям грунта, различным стрессам, в том числе и патогенам. Кроме того, при инокуляции бактерией увеличивается экспрессия генов, входящих в сигнальный путь метаболизма тиамин. Ранее было показано, что тиамин играет важную роль в устойчивости к биотическому и абиотическому стрессу у растений.

Таким образом, нами было показано, что в ответ на воздействие изучаемых бактериальных патогенов экспрессирует защитные гены и активирует метаболические пути, участвующие в иммунном ответе.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-34-00822 мол_а на базе УНУ (регистрационный номер U-73547).

СОЗДАНИЕ БИБЛИОТЕКИ Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИХ АНТИГЕННОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ

*Игорь Иванов
ИБХ РАН, Москва
e-mail: ivigoral@gmail.com*

Есть ряд проблем, которые затрудняют идентификацию антигенной специфичности Т-клеточных рецепторов (ТКР). У больных тем или иным заболеванием, в крови одновременно встречается множество разных клонов Т-клеток, и специфичность подавляющего числа из них неизвестна из-за неполноты существующих баз данных. Также, у разных людей, больных одним и тем же заболеванием, могут встречаться совершенно разные клоны, реагирующие на одни и те же антигены. Мы работаем над методом конструирования библиотек вырожденных последовательностей ТКР, который позволит разработать алгоритм идентификации антигенной специфичности ТКР, а также, кластеризовать последовательности ТКР из образца в случае, если их антигенная специфичность неизвестна. Метод основан на машинном обучении, и для тренировки алгоритма необходим набор данных. Этот набор должен состоять из большого числа последовательностей генов ТКР, которые различаются между собой, а также, информацию о том, какие из них связываются с определенным антигеном, а какие нет. Метод генерирования обучающей выборки состоит в следующем:

- 1 — Создание библиотеки ТКР, основанной на последовательности с известной антигенной специфичностью. Библиотека генов ТКР генерируется с помощью мультиплексной ПЦР с нуклеотидной вырожденностью в варибельной части рецептора.
- 2 — Трансфекция Т-клеточной линии с генами ТКР, нокаутированными CRISPR-Cas9, плазмидой, содержащей созданную библиотеку.
- 3 — Клетки окрашиваются мультимерами, состоящими из HLA, флуоресцентной метки и антигена, к которому был специфичен исходный ТКР и сортируются в зависимости от того, связались ли они с мультимером.
- 4 — ТКР из каждой группы насортированных клеток секвенируются для определения последовательностей рецепторов, связавшихся и не связавшихся с антигеном.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛНОГЕНОМНЫХ СКОРОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ РИСКОВ МУЛЬТИФАКТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

*А.С. Ракитко, Я.В. Попов, И.И. Низамутдинов, В.В. Ильинский
ООО «Генотек», Москва
e-mail: rakitko@genotek.ru*

Доступность полногеномного генотипирования привела к существенному увеличению размеров изучаемых коллекций. Технологии мета-анализов проведенных ранее GWAS-исследований позволяют искать генетические ассоциации на выборках из более 1 миллиона образцов. Результатом таких работ могут выступать полигенные скоры, основанные на оценке суммарного вклада сотен тысяч генетических маркеров. На примере коронарной недостаточности мы оценили предсказательную силу предложенных ранее полногеномных скоров. В качестве тестовой выборки использовалась подвыборка из PennCath study. В выборку входило 1401 человек, из которых 933 больных (коронарная недостаточность) и 468 здоровых. Помимо генетической информации для образцов указывались пол, возраст, уровни триглицеридов, ЛПНП и ЛПВП. В качестве предсказательной модели использовался полигенный рискованный скор, основанный на анализе 6630150 SNP. Импутирование тестовой выборки производилось с помощью программы BEAGLE 5.0. С использованием 10-кратной кроссвалидации были протестированы модели логистической регрессии, случайных лесов и градиентного бустинга для бинарной классификации с учетом генетических и биохимических факторов риска. Для полигенного скор на тестовой выборке было получено значение AUC равное 0,783 (95% CI: 0,758-0,808), что означает предсказательную состоятельность используемого полигенного скор. Наибольшая точность бинарной классификации при добавлении в качестве предикторов пола и биохимических показателей достигалась в модели градиентного бустинга (ACC = 0,759; sd = 0,03). На примере коронарной недостаточности мы продемонстрировали, что полногеномные скоры могут существенно повышать точность предсказания возникновения мультифакторных заболеваний.

СИСТЕМА ДЛЯ АНАЛИЗА И ВИЗУАЛЬНОГО ПРЕДСТАВЛЕНИЯ МНОЖЕСТВЕННЫХ ГЕНОМНЫХ ДАННЫХ С АКЦЕНТОМ НА ГЕНОМНУЮ РЕГУЛЯТОРНУЮ СИСТЕМУ

А.А. Петкевич¹, А.А. Абрамов², И.А. Шевела³

¹РОНЦ им. Н. Н. Блохина, Москва,

²РУДН, Москва,

³НИУ МЭИ, Москва

e-mail: petkevich.alice@centaura.com

Геномные данные человека становятся чем-то большим, чем просто информация «только для исследований», они начинают широко внедряться в клиническую практику. Сегодня геномные данные необходимы прежде всего при диагностике, лечении или разработке лекарств для лечения наследственных заболеваний и онкологии, будь то наследственный рак или рак с преимущественно соматическими мутациями. Однако анализ таких данных остается проблемой для биомедицинского сообщества во всем мире. Во время этого исследования мы разработали программное обеспечение для полного анализа генома с акцентом на нарушения механизмов регуляции генома. 10 уникальных образцов от пациентов с неврологическими расстройствами, 10 образцов от пациентов с различными видами рака. Был разработан оригинальный конвейер от fastq до окончательно аннотированных уникальных вариантов. Визуальный анализ выполняется в виде куба OLAP. Использовался следующий стек: Python, C++, база данных NOSQL, PostgreSQL, система BI для представления данных в виде куба OLAP.

Наряду с рутинным описанием вариантов (тип мутации, altseq, refseq, кДНК, OMIM, ClinVar и/или другие ссылки на базы данных и т. д.) Были обнаружены сети регуляторов miRNA и генов в уникальных образцах с последующим профилированием miRNA биологического материала у тех же пациентов (стандартные протоколы для экстракции микроРНК с помощью наборов Exiqon, Nanodrop, PAGE, qPCR-RT) с предсказанием функциональной активности протеинов.

Мы планируем включить в платформу больше фильтров и продумать возможности реализации протоколов для проверки полученных данных.

ПОИСК ПАТТЕРНОВ ИЗМЕНЕНИЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ РВМС ЧЕЛОВЕКА ПРИ СТАРЕНИИ

А.А. Алексеев

МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

e-mail: alekseev@physics.msu.ru

Открытая база данных GEO содержит данные экспрессии клеток различных тканей человека, причём для некоторых датасетов указан возраст людей, у которых брались образцы. Из таких данных можно получить набор характерных кривых изменения средних величин экспрессии генов между группами разного возраста. Мы это сделали для клеток РВМС человека. Сопоставляя между собой результаты, полученные для отдельных генов по разным датасетам, можно получить подтверждение устойчивости и достоверности определения таких паттернов. Эти кривые, по нашему мнению, послужат исходной точкой при построении системно-биологических моделей отдельных аспектов старения человека, в том числе, модели развития инулин-резистентности. Кроме того, с помощью метода кластеризации получены данные о характерных группах скоррелированных изменений экспрессии различных генов в данном типе клеток при старении, что в дальнейшем позволит уточнить взаимосвязи элементов сигнальных путей и метаболических процессов, связанных с развитием возраст-зависимых патологий.

ТРАНСКРИПТОМНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ У ДОЛГОЖИВУЩИХ ЛИНИЙ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

З.Г. Гуватова^{1,2}, М.В. Шапошников³, Г.С. Краснов¹,
А.В. Кудрявцева¹, А.А. Москалев^{1,2,3}

¹ИМБ им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва,

²НИУ МФТИ Москва,

³Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар

e-mail: guvatova.zulfiya@mail.ru

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. 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 глутамат-цистеинлигазы Gclc, фермента, участвующего в синтезе глутатиона, приводят к увеличению продолжительности жизни *D. melanogaster*.

Для исследования молекулярных механизмов действия на продолжительность жизни вышеописанных интервенций мы изучили возрастную динамику изменений транскриптома долгоживущих *D. melanogaster*. 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 сверхэкспрессии 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.

TRANSCRIPTOMICS OF LONGEVITY: METHODS OF COMPARATIVE RNA-SEQ ANALYSIS

A. Kulaga, D. Toren, R. Tacutu

Institute of Biochemistry of the Romanian Academy, Bucharest, Romania

e-mail: natasharapova@gmail.com

Why do species have different lifespans? Why are the naked mole rats and bowhead whales resistant to cancer and hypoxia? Are there particular expression patterns that ensure long life and resistance to diseases and extreme conditions? These and other similar questions require careful transcriptomics analyses.

While for comparative genomics there are established methods based on multiple sequence alignments and phylogenetics, comparative transcriptomics is less developed and more challenging. Comparison of expression levels of different species involves many degrees of uncertainty and sources of potential errors include heterogeneity in samples, differences in sequencing equipment and sample preparation protocols, low quality of many de novo transcriptome and genome assemblies, potential errors in alignments and transcriptome assemblies, etc.

To address the above-mentioned challenges and gain some insights into the expression patterns of long-lived animals, we developed an approach for cross-species comparison. Using this gene expression analysis we evaluated the unique and similar expression patterns across multiple mammalian species with different lifespans.

Our findings showed a high degree of similarity between closely-related species and similar expression patterns between long-lived species (regulation of apoptosis, DNA repair, hypoxia resistance processes, etc). The results obtained advance our understanding of the evolution of longevity and adaptation to the stressful environment.

ULTRALONG SEQUENCING METHOD FOR DETERMINING THE SEQUENCE OF NUCLEOTIDE SEQUENCES OF GENES OF MAMMALIAN TLR

*Alexander E. Kalashnikov, Karel Novak
Czech Research Institute of Animal Genetics, Prague, Czech Republic
e-mail: aekalashnikov@yandex.ru*

Toll-like receptors belong to the pattern-recognition receptors (PRRs), which have evolved to recognize conserved features of bacterial and viral molecules. Their variability is supposed to contribute to the stability of the modern cattle breeds to the emerging infections. In the next step, the variability of the TLR genes should be associated with the differences in the ability to detect the pathogens. We used the approach developed earlier to screen for the polymorphism in TLR genes in a representative set of historical and modern cattle breeds from Russia. The pipeline included the steps of obtaining the overlapping amplification products from the coding regions of all ten bovine TLR genes, their subsequent purification and normalization. While the anti-bacterial group included TLR1, -2, -4, -5 and -6, the anti-viral group comprise TLR3, -7, -8, -9 and -10 (in spite of its unclear specificity). We used 275 animals, both bulls and cows, for analysis. The pooled samples containing equimolar concentrations of amplicons prepared from the pooled genomic DNA were sequenced on the PacBio platform. The assembly and visualization were carried out using the Unipro UNIGENE package (Okonechnikov et al., *Bioinformatics* 28:1166, 2012). PCR duplicates were removed and the SAM headers were made and reorganized. After identification of variations, Bayes's analysis was carried out followed by filtration on quality. The identified structural variants of TLRs were annotated according to their biological significance. Both new and already identified sites of variability, already annotated and documented in dbSNP, have been found. The data are needed for further breeding of local breeds in Russia with respect to their natural resistance to various diseases.

ISBN 978-5-88458-369-6



Подписано в печать 15.05.2019 г.

Заказ № 5599 Тираж: 300 экз.

Печать цифровая.

РПК «Премиум Принт»

Москва, ул. Миклухо-Маклая 8/3

8 (495) 363-87-53

www.premium-print.ru