

Геномное
секвенирование
и редактирование

|2020
NGS

СБОРНИК ТЕЗИСОВ

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

20-21 мая 2020 года
Москва

Электронный вариант тезисов: <http://ngsconference.ru/archive/2020>

ISBN 978-5-88458-503-4

Программный комитет конференции:

Александр Габиров (ИБХ РАН)
Михаил Гельфанд (ИППИ РАН)
Валерий Даниленко (ИОГен РАН)
Артур Исаев (ООО «ЦГРМ «Генетико»)
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)

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ У ПАЦИЕНТОВ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ НА ФОНЕ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Е.С. Минина¹, А.К. Какойченкова^{1,2}

*¹Витебский государственный медицинский университет,
Витебск, Беларусь,*

²СООО «Nativita», Минск, Беларусь,

e-mail: l.mnn1551@gmail.com

Был выполнен анализ 56 транскриптомов клеток назального лаважа, полученных из базы данных GEO (GSE30326, GSE51392). В исследование были включены пациенты с обострением бронхиальной астмы (БА) на фоне пикорнавирусной инфекции (n=32), пациенты с БА и здоровые люди (без аллергопатологии), у которых проводилась стимуляция изолированных эпителиальных клеток препаратом полицитидиловой кислоты (n=24). Для анализа транскриптомных данных использовали программное обеспечение Transcriptome Analysis Console (TAC) Software, ThermoFisher.

У пациентов с БА и здоровых людей при моделировании вирусной инфекции наблюдалась активация сигнального пути эндотелиального ростового фактора, ИЛ-18, системы Toll-like рецепторов, интерферона альфа/бета, сигнального пути интерферона II (IFNG), снижение активности цилиарного сигнального пути и клеточного цикла. Следует отметить, что значимость данных путей была более выражена у здоровых пациентов.

При обострении БА на фоне пикорнавирусной инфекции в сравнении с состоянием после вирус-индуцированного обострения БА (через 7-14 дней) наблюдалась гиперэкспрессия ряда генов, участвующих в сигнальном пути эндотелиального ростового фактора, ИЛ-18, Toll-like рецепторов, интерферона альфа/бета и сигнального пути интерферона II (IFNG).

Таким образом, у пациентов с БА на фоне пикорнавирусной инфекции и в модели «БА на фоне вирусной инфекции» наблюдается активация сигнальных путей, направленных на мобилизацию системы адаптивного противовирусного иммунного ответа, связанного с повышенной продукцией интерферонов, активацией системы Toll-like рецепторов и ИЛ-18. При этом у пациентов с БА на фоне вирусной инфекции наблюдается иммуносупрессия в сравнении со здоровыми людьми (без аллергопатологии).

ВЫДЕЛЕНИЕ, СЕКВЕНИРОВАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ДВУХ ШТАММОВ SAM46 И SAM112 НОВОГО ВИДА БАКТЕРИОФАГА, ИНФИЦИРУЮЩЕГО ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ГРУППЫ *BACILLUS CEREUS SENSU LATO*

О.А. Казанцева, Э.Г. Пилигримова, В.А. Загородный, А.М. Шадрин
ФИЦ ПНЦ БИ РАН обособленное подразделение ФГБУН Институт
биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,
Пущино

e-mail: Olesyakazantseva@bk.ru

Группа *Bacillus cereus*, также известная как *B. cereus sensu lato* (sl), представляет собой группу грамположительных спорообразующих бактерий, включающих как патогенные, так и непатогенные штаммы. Некоторые из представителей *B. cereus* sl несут высокую опасность для жизни человека, так как способны вызывать острые пищевые отравления (например, штаммы видов: *B. cereus sensu stricto* (ss), *B. thuringiensis*, *B. cytotoxicus* и др.), а также сибирскую язву, смертельно опасное заболевание вызываемое *B. anthracis*. Принимая во внимание широкое распространение антибиотикорезистентности у бактерий, становится очевидным, что разработка препаратов с использованием бактериофагов, а также их бактериолитических ферментов (эндолизин) в качестве альтернативы антибиотикам может быть перспективным направлением в биотехнологии и медицине.

Изучали штаммы Sam46 и Sam112 нового бактериофага, способного инфицировать бактерии группы *B. cereus* sl. Бактериофаги Sam46 и Sam112 были выделены из двух различных образцов газонной почвы г. Самара. Для секвенирования выделенной фаговой ДНК была использована технология секвенирования Illumina. Сборка генома произведена с помощью программного обеспечения SPAdes 3.11.1, для анализа полноты сборки и определения концов геномной ДНК использованы инструменты Bandage и Bowtie2. Длина собранных и проанализированных геномов Sam46 и Sam112 составила 45419 н.п. и 45037 п.н. В результате поиска открытых рамок считывая с помощью инструмента RASTtk сервиса RAST было установлено 77 и 75 ОРС в геномах Sam46 и Sam112 соответственно. Нуклеотидные последовательности геномов идентичны друг другу на 96.9%, что, в соответствии с нынешними критериями таксономической классификации фагов, указывает на принадлежность фагов Sam46 и Sam112 к одному виду. Бактериофаги используют «headful» стратегию упаковки геномной ДНК, предсказанную с использованием выравнивания ридов (Bowtie2) и подтвержденную экспериментально с помощью рестрикционного анализа, а также с помощью секвенирования фрагментов концов ДНК, полученных в ходе метода RAPHЕ (Rapid amplification of phage ends), основанного на принципах RACE анализа, с соответствующими модификациями для анализа фаговых геномов. Таксономическое положение новых бактериофагов определяли в ходе сравнительного анализа с наиболее близкородственными бактериофагами, найденными в открытых базах данных, используя инструменты GET_HOMOLOGUES, GET_PHYLOMARKERS и FigTree. Трансмиссионная электронная микроскопия и сравнительный анализ показали, что бактериофаги являются вирулентными, обладают морфологией Myoviridae и удалены от ближайших родственных вирусов настолько, что могут представлять новый род внутри семейства Myoviridae.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-04-00300

ВЫДЕЛЕНИЕ, СЕКВЕНИРОВАНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ НОВОГО БАКТЕРИОФАГА IZHEVSK, ИНФИЦИРУЮЩЕГО *BACILLUS CEREUS* *SENSU LATO*

Э.Г. Пилигримова, А.В. Скорынина, А.О. Казанцева, С.Д. Байчер,
В.А. Кулябин, А.М. Шадрин
ФИЦ ПНЦ БИ РАН обособленное подразделение ФГБУН Институт
биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,
Пущино

e-mail: kanzleranemone@gmail.com

Некоторые виды бактерий из группы *Bacillus cereus* являются возбудителями пищевых отравлений и тяжелых заболеваний человека. Широко распространено мнение, что бактериофаги и их литические ферменты эндолизины могут стать одним из дополнительных или даже основных способов лечения бактериальных инфекций.

Мы представляем результаты изучения нового бактериофага *Izhevsk*, выделенного из образца почвы, отобранного в г. Ижевск, и заражающего представителей группы *Bacillus cereus*, а также описываем спектр активности его эндолизина. Секвенирование фаговой ДНК проводили с использованием платформы Illumina и наборов Truseq. Сборку генома проводили с использованием SPAdes 3.11.1, для анализа полноты сборки и определения концов геномной ДНК использовали Bandage и Bowtie2. Геном содержит 168350 п.н., 256 белок-кодирующих и 18 тРНК-кодирующих открытых рамок считывания, предсказанных в RAST. Бактериофаг использует short DTRs стратегию упаковки геномной ДНК и обладает концевыми повторами длиной 284 п.н. Для определения филогенетических взаимоотношений бактериофага с ближайшими родственными вирусами использовали GET_HOMOLOGUES и VICTOR. Трансмиссионная электронная микроскопия и сравнительный анализ показали, что бактериофаг является умеренным, обладает морфологией *Siphoviridae* и относится к роду, в который входят ранее описанные, но таксономически не классифицированные бактериофаги *Tsamsa* и *Diildio*. Данная работа способствует пониманию биоразнообразия фагов и может найти применение в разработке противомикробных препаратов, направленных на диагностику и лечение инфекций, а также предотвращение контаминации продуктов бактериями группы *Bacillus cereus*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-04-00300

ЭФФЕКТ ИСТОЧНИКОВ УГЛЕРОДА НА СОСТАВ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ РЕАКТОРОВ БИООКИСЛЕНИЯ ПИРИТ-АРСЕНОПИРИТНОГО КОНЦЕНТРАТА

А.Г. Булаев

ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

e-mail: bulaev.inmi@yandex.ru

Биогидрометаллургия повсеместно применяется для извлечения металлов из сульфидных концентратов. В данной работе определяли влияние источников углерода на биоокисление золотосодержащего концентрата (56% FeS₂ и 14% FeAsS). Биоокисление концентрата проводили в периодическом режиме в лабораторных реакторах при 40 и 50°C, плотности пульпы (Т : Ж) 1 : 5 в течение 40 сут. В первый реактор подавали 0.01 л/мин CO₂, в пульпу второго реактора вносили 0.02% мелассы в начале эксперимента и каждые 10 сут. Состав микробных сообществ определяли с помощью секвенирования на платформе Illumina участков генов 16S рРНК V3 и V4. При 40°C в первом реакторе было окислено 81% Ss, во втором – 78%, а в контрольном – 37%. При 50°C только CO₂ позволил интенсифицировать процесс биоокисления. В первом реакторе было окислено 94% Ss, во втором – 42%, а в контрольном – 45%. Интенсификация биоокисления сопровождалась увеличением численности микроорганизмов в 2–2.5 раза. Высокопроизводительное секвенирование выявило различия сообществ реакторов. Наиболее значительной была доля р. *Sulfobacillus*, *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum*, *Ferroplasma*, *Acidiplasma*. При 40°C на момент окончания эксперимента в 1, 2 и 3 реакторе доля последовательностей *Ferroplasma* составляла 82, 68 и 40%, *Sulfobacillus* – 15, 12 и 3%, *Acidithiobacillus* – 2, 18 и 35%, *Leptospirillum* – 1, 3 и 24%. При 50°C в 1, 2 и 3 реакторе доля последовательностей р. *Acidiplasma* составляла 25, 82 и 28%, *Sulfobacillus* – 30, 3 и 19%, *Acidithiobacillus* – 32, 14 и 52%. Таким образом, использование различных источников углерода позволяло значительно повысить интенсивность биоокисления сульфидного концентрата, так как влияло на численность микроорганизмов в пульпе биореакторов и на состав микробных сообществ.

ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ФЕКАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ НА МЕТАГЕНОМНЫЕ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПРОФИЛИ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ КРОНА

*Е.С. Жгун, Т.Н. Калачнюк, В.А.Веселовский, Д.Е. Федоров,
П.О. Тихонова, Е.Н. Ильина*

ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Москва

e-mail: al.androva@gmail.com

Сегодня болезнь Крона, характеризующаяся хроническим воспалением кишечного тракта, стала глобальной проблемой современного здравоохранения. Этиология заболевания является многофакторной и не до конца изученной, состоящей из генетических, иммунологических и микробиологических факторов. На микробиологическом уровне наблюдается сокращение разнообразия и снижение стабильности состава, которое во многом приводит к сокращению разнообразия бактериальных метаболитов, в том числе короткоцепочечных жирных кислот (КЖК).

Терапия заболевания является симптоматической и недостаточно эффективной, поэтому назрела необходимость поиска более эффективных и безопасных методов лечения. Недавние исследования выявили важную роль состава кишечной микрофлоры в возникновении и патогенезе болезни Крона, поэтому ее коррекция может стать эффективной альтернативой консервативному лечению.

В данной работе мы провели метагеномный анализ образцов фекалий 2 пациентов с болезнью Крона, прошедших процедуру трансплантации фекальной микробиоты (ТФМ). Метагеномное секвенирование образцов, собранных до и в течение 1 месяца после проведения ТФМ проводили на геномном анализаторе HiSeq2500 (Illumina Inc., США).

Метагеномный анализ исследованных образцов продемонстрировал, что колонизация кишечника пациента микробиотой донора показывает хороший результат с обогащением бактериями классов Clostridia и Bacteroidia. На уровне видов четко просматривается замещение *Escherichia coli* и обогащение *Fecalibacterium Prausnitzii*. Профили КЖК не восстанавливаются полностью до уровня здоровых индивидуумов, однако тенденция к его достижению однозначно прослеживается.

Понимание вклада конкретных микроорганизмов и метаболитов в патогенезе болезни Крона позволит разработать персонализированный подход к терапии заболевания.

ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗМЕНЕНИЙ, ВЫЯВЛЕННЫХ В ГЕНОМЕ *ACREMONIUM CHRYSOGENUM* ВКМ F4081D, ВЫСОКОАКТИВНОМ ПРОДУЦЕНТЕ ЦЕФАЛОСПОРИНА С

А.А. Жгун, Г.К. Нураева
Институт биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

e-mail: zzhgun@mail.ru

В настоящее время основным методом получения высокоактивных продуцентов вторичных метаболитов (ВМ) является многораундовый случайный мутагенез и селекции по целевому признаку. Улучшенные штаммы мицелиального гриба *Acremonium chrysogenum* являются основным источником для промышленного производства цефалоспорина С, важнейшей исходной субстанции для получения антибиотиков цефалоспоринового ряда 1-5-го поколений. У используемых высокоактивных штаммов выход цефалоспорина С увеличен в 100 и более раз. Однако в настоящее время нет четкого понимания молекулярных основ, приводящих к суперпродукции этого важнейшего ВМ. В данной работе провели полногеномное секвенирование высокоактивного продуцента *A. chrysogenum* ВКМ F4081D на платформе Illumina HiSeq («Illumina» США). Покрытие генома составляло 297.3 раз. Расшифрованные последовательности сравнили с ранее аннотированными последовательностями для генома исходного штамма дикого типа *A. chrysogenum* ATCC 11550 (GenBank: JPKY00000000.1). Выявили 3730 различий, 56 из которых относятся к группе HIGH, 525 – к группе MODERATE, 373 – LOW и 2769 – MODIFIER. Важнейшие изменения связаны с: 1) удалением «стресс-респонс» элементов; 2) максимальной «разгрузкой» внутриклеточного содержания S-аденозилметионина от использования в ряде путей метаболизма; 3) удалением путей биосинтеза альтернативных ВМ в результате делеций в биосинтетических генах; 4) сдвигами в системе ремоделирования хроматина; 5) множественными мутациями в протеин-киназах, цитохромах P450 и другие изменения. Для комплексного понимания и обобщения произошедших изменений, приведших к суперпродукции цефалоспорина С у мицелиального гриба *A. chrysogenum*, планируется проведение сравнительного транскриптомного и протеомного анализов.

Работа поддержана грантом РФФИ 19-04-01173

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО СООБЩЕСТВА, ИЗОЛИРОВАННОГО С ЭКСПОНАТОВ ТЕМПЕРНОЙ ЖИВОПИСИ 15-16 ВЕКОВ

*А.А. Жгун¹, М.П. Потапов², Д.А. Авданина², К.М. Климкина³,
В.А. Веселовский³, Е.А. Любавская⁴, Е.В. Троян⁴,
Д.Е. Федоров³, М.В. Шитов⁴,*

¹*Институт биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва*

²*Московский Политехнический Университет, Москва*

³*ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва*

⁴*Государственная Третьяковская галерея, Москва*

e-mail: zzhgun@mail.ru

Микроорганизмы являются важнейшим фактором, приводящим к повреждению произведений искусства, в частности, масляной живописи на холсте или темперной живописи. Ранее с разрешения Главного Хранителя музейных ценностей в залах Живописи Древней Руси основного исторического здания Государственной Третьяковской галереи (Лаврушинский пер., 10, Москва) отобрали микробиологические пробы с экспонатов темперной живописи 15-16 вв.: икона «Церковь Воинствующая», бюст Георгия Победоносца, икона «Св. Великомученик Димитрий Солунский». Для характеристики микробиомов в исходных пробах и соответствующих им культурам провели метагеномное секвенирование гипервариабельных районов рДНК бактерий (V3/V4) и грибов (ITS2) на платформе MISEq Illumina. Полученные данные (номер доступа BioProject: PRJNA606688, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA606688>) позволили всесторонне охарактеризовать разнообразие микроорганизмов, присутствующих, как на самих экспонатах, так и в непосредственной близости от них (на различных предметах и коммуникациях залов). В результате метагеномного секвенирования также обнаружили 10 доминантных грибов-деструкторов; их изолировали в чистые культуры и для них продемонстрировали биодеструкцию против основных лакокрасочных материалов, используемых в темперной живописи (Zhgun A, et. al, 2020, PLoS ONE 15(4):e0230591). В наибольшей степени заражению подверглась икона «Св. Великомученик Димитрий Солунский»; в наименьшей степени – темперная поверхность иконы «Церковь Воинствующая». Результаты наших исследований важны как для характеристики микробиологического сообщества музея в целом, так и для последующей совместной работы с отделом научной реставрации темперной живописи Государственной Третьяковской галереи.

Работа поддержана грантом РФФИ 17-29-04349

ДЛИННЫЕ ХИМЕРНЫЕ РИДЫ ДНК КАК СПОСОБ СНИЖЕНИЯ СЕБЕСТОИМОСТИ НЕИНВАЗИВНОГО ПРЕНАТАЛЬНОГО СКРИНИНГА

В.А. Белова¹, Д.А. Плахина², А.С. Ракитько², К.В. Цуканов², Д.О. Коростин¹

¹РНМУ им. Н.И. Пирогова, Москва

²ООО «Генотек», Москва

e-mail: d.korostin@gmail.com

Неинвазивный пренатальный скрининг (НИПС) проводится на раннем сроке беременности (от 9-12 недель гестации) для определения анеуплоидий в геноме плода с помощью методик высокопроизводительного секвенирования (NGS). В крови матери внеклеточная ДНК (внДНК) находится в виде фрагментов. Фрагменты материнской внДНК преимущественно имеют длину 166 п.о., а фрагменты внФДНК — 143 п.о. Технологии NGS соревнуются в двух областях: количестве прочитываемых в запуске молекул и длине прочтения, которая для современных секвенирующих платформ достигает 300 п.о. в одну. Однако уже при длине 40 п.о. 82% молекул будут однозначно прокартированы на геном человека. То есть для задачи НИПС увеличение длины рида не приносит дополнительной информации. Одним из ограничений более широкого внедрения теста является высокая себестоимость самого анализа, так как цена NGS все еще остается значительной.

Мы разработали протокол подготовки библиотек, который отличается от используемого в классических НИПС следующими элементами:

1. Фрагментация внДНК до коротких фрагментов;
2. Сайз-селект фрагментированной внДНК с двух сторон, в результате чего в образце остаются фрагменты, длина которых кластеризуется возле значений 40-50 п.о.;
3. Случайное лигирование фрагментов внДНК и формирование длинных (более 300 п.о.) химерных молекул ДНК, уже к которым лигируются адаптеры для секвенирования.

В результате подобранных нами условий пробоподготовки и наличию у производителя химии для секвенирования длинных ридов (Illumina Rapid Run PE250 для HiSeq 2500), нам удалось получить большее количество полезной для диагностики информации с каждого рида, чем в классическом НИПС. Размер фрагмента в тестовой выборке составил в среднем 43,8 п.о. Каждая пара ридов содержала в себе в среднем 2,37 фильтрованных фрагмента. Это примерно в 4,6 раза больше, чем в классическом НИПС, потому что во втором случае около половины из пар ридов будут отфильтрованы с помощью RepeatMasker или подобных инструментов для отбора уникальных регионов в геноме человека.

Для разработанной методики мы провели определение параметров чувствительности и специфичности на контрольной выборке из 145 образцов биоматериала от беременных. Полученные нами результаты чувствительности и специфичности не уступают таковым у других исследователей.

ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ФРАКЦИЯ РНК ПЛАЗМЫ КРОВИ КАК ИНСТРУМЕНТ ДИАГНОСТИКИ ОНКОЗАБОЛЕВАНИЙ

Родионов В.В., Лоломадзе Е.А., Кометова В.В.

НМИЦ АГП им.В.И.Кулакова Минздрава России, Москва

e-mail: 6332424@gmail.com

Поиск ранних предикторов злокачественных новообразований (ЗНО) при анализе наиболее доступных видов биоматериала – ключевое направление разработки новых диагностических систем. Один из перспективных скрининговых подходов в онкодиагностике получил название жидкостной биопсии. Жидкостная биопсия представляет собой одну из неинвазивных методик и включает в себя обнаружение и выделение циркулирующих опухолевых клеток, циркулирующих опухолевых нуклеиновых кислот и экзосом из плазмы крови у пациентов со злокачественными заболеваниями. Как правило при этом используют количественный анализ представленности отдельных молекул, в том числе и белковых, анализ последовательности нуклеиновых кислот, анализ метилирования ДНК и др.

Множество работ посвящено исследованию внеклеточной фракции ДНК при ЗНО. Анализ внеклеточной фракции нуклеиновых кислот плазмы крови дает возможность отслеживать генетическую гетерогенность опухоли в динамике (в ответ на применение различных методов лечения, подавляющих рост опухолевых клеток).

Вместе с тем активную пролиферацию трансформированных клеток при развитии опухолей сопровождают значительные изменения экспрессии определенных генов. Обнаружение тканеспецифичных транскриптов в составе внеклеточной РНК плазмы крови (внРНК) позволяет предположить, что представленность циркулирующих в плазме РНК связана с развитием патологического процесса непосредственно в первичном очаге. На наш взгляд, внРНК плазмы крови представляют практическую ценность в качестве молекулярно-генетических маркеров ранней диагностики в онкологии.

Исследование выполнено в рамках работ по Государственному заданию №АААА-А18-118053190012-9 «Разработка тест-системы для ранней диагностики рака молочной железы и рака яичников на основе анализа свободно циркулирующих (внеклеточных) РНК периферической крови».

ISBN 978-5-88458-503-4



Подписано в печать 14.05.2020 г.

Заказ № 7820 Тираж: 300 экз.

Печать цифровая.

РПК «Премиум Принт»

Москва, ул. Миклухо-Маклая 8/3

8 (495) 363-87-53

www.premium-print.ru