



2022
NGS

10-Я ВСЕРОССИЙСКАЯ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
ЦЕНТРОВ ГЕНОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
МИРОВОГО УРОВНЯ

ГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ И РЕДАКТИРОВАНИЕ

СБОРНИК ТЕЗИСОВ

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
“Российский национальный исследовательский
медицинский университет имени Н.И. Пирогова”
(ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России)

«Геномное секвенирование и редактирование»

**СБОРНИК ТЕЗИСОВ
10-й Всероссийской научно-практической
конференции центров геномных исследований
мирового уровня**

Москва
РНИМУ им. Н.И. Пирогова
2022

УДК 577.21
ББК 28.04
Г27

Г27 «Геномное секвенирование и редактирование»
СБОРНИК ТЕЗИСОВ 10-й Всероссийской научно-практической
конференции центров геномных исследований мирового уровня.
Москва: РНИМУ им. Н.И. Пирогова, 2022. — 12 с.

ISBN 978-5-88458-605-5

В сборнике представлены тезисы докладов-участников конференции, посвящённые новейшим методам анализа и модификации генома различных видов организмов, включая человека.

УДК 577.21
ББК 28.04

ISBN 978-5-88458-605-5

© Составители, 2022
© ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова, 2022

Полиморфизм тополей Москвы на основе данных глубокого секвенирования участков полового локуса

Борхерт Е.В.¹, Пушкина Е.Н.¹, Краснов Г.С.¹, Новаковский Р.О.¹, Повхова Л.В.¹, Костина М.В.², Дмитриев А.А.¹, Мельникова Н.В.¹

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

² Московский педагогический государственный университет, Москва

sashai@inbox.ru

Представители рода Тополь (*Populus*) широко распространены на территории России и представляют большой интерес для озеленения, благодаря способности эффективно очищать воздух от загрязнения и выделять большое количество кислорода, что особенно актуально для крупных мегаполисов. Тополя являются двудомными ветроопыляемыми растениями, и различные виды тополя легко скрещиваются, образуя естественные межвидовые гибриды, что приводит к высокому полиморфизму и затрудняет определение систематического статуса. Исследования последних лет позволили установить последовательности ДНК полового локуса различных видов рода *Populus*, однако генетическое разнообразие этого участка генома в настоящее время недостаточно охарактеризовано. Цель работы – установление различий между представителями секций *Aigeiros* и *Tacamahaca*, широко распространенными на территории Москвы, на основе ДНК-полиморфизмов полового локуса и идентификация полоспецифичных полиморфизмов.

Растительный материал собирали в период цветения тополя для точной идентификации пола растений. Выделение ДНК проводили ЦТАБ методом. При подготовке ДНК-библиотек для высокопроизводительного секвенирования использовали две последовательные полимеразные цепные реакции для амплификации целевых участков и добавления к ним последовательностей, необходимых для секвенирования на платформе Illumina. Методом таргетного глубокого секвенирования на приборе MiSeq для 288 растений тополя определены нуклеотидные последовательности 20 участков полового локуса со средней длиной 450 нуклеотидов. Среднее число прочтений на образец составило 10 тыс. Полученные прочтения обрезали по качеству с использованием Trimmomatic и картировали на половой локус генома мужского растения *P. trichocarpa* “Stettler 14” (https://phytozome-next.jgi.doe.gov/info/PtrichocarpaStettler14_v1_1) с помощью BWA-MEM. Поиск полиморфизмов проводили freeBayes для участка хромосомы 18 (нуклеотидные позиции с 16 202 696 по 16 391 068), соответствующего половому локусу генома тополя.

Выполненное исследование позволило с высокой точностью идентифицировать полоспецифичные полиморфизмы представителей секций *Aigeiros* и *Tacamahaca*, существенно дополнив данные о генетическом разнообразии полового локуса тополей, необходимые для установления ключевых различий мужских и женских растений на уровне ДНК. Полученные результаты представляют ценность для разработки тест-систем для идентификации пола тополя – использование в озеленении городов только мужских растений тополя позволит решить проблему пуха (опушенных семян, образующихся только на женских растениях), и максимально эффективно использовать это дерево для улучшения экологической ситуации. Кроме того, данные о полиморфизме полового локуса способны внести вклад в филогенетические исследования рода *Populus*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов 18-34-20113 и 20-34-90159.

Сборка генома фитопатогена льна *Colletotrichum lini* на основе чтений Oxford Nanopore Technologies

Сигова Е.А.^{1,2}, Дворянинова Е.М.^{1,2}, Пушкова Е.Н.¹, Кудрявцева Л.П.³,
Рожмина Т.А.³, Мельникова Н.В.¹, Дмитриев А.А.¹

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

²Московский физико-технический институт, Москва

³Федеральный научный центр лубяных культур, Торжок

sigova.ea@phystech.edu

Colletotrichum lini наносит существенный ущерб льноводству, вызывая антракноз, приводящий к потерям урожая. Отсутствие последовательности полного генома этого фитопатогена препятствует его изучению на молекулярном уровне, поэтому целью данной работы являлось получение сборки генома *C. lini*. Высокомолекулярная ДНК выделена из высокопатогенного штамма *C. lini* № 811, предоставленного Институтом льна (г. Торжок, Россия). Из выделенной ДНК проведено удаление коротких фрагментов с использованием набора Short Read Eliminator Kit (Circulomics). Библиотека ДНК подготовлена и секвенирована на платформе Oxford Nanopore Technologies (ONT; секвенатор MinION, ячейка R9.4.1) в соответствии с протоколом производителя (набор SQK-LSK109). В результате получено 1.7 млрд.н., параметр N50 составил 15.7 т.н. Обработку исходного сигнала проводили с применением Guppy 6.0.1 с различными порогами фильтрации среднего качества чтения (`min_qscore`) – от 7 до 10. После удаления адаптеров с помощью Porechop 0.2.4 для каждого значения `min_qscore` выполнены сборки с использованием приложений Canu 2.2, Flye 2.8.1, Miniasm 0.3-r179, NextDenovo 2.5.0, Ra 0.2.1, Raven 1.5.1, Shasta 0.8.0, SmartDenovo и Wtdbg-cns 1.1 (Wtdbg2 0.0) и проведен сравнительный анализ результатов. Наиболее полные и протяженные сборки получены при значениях `min_qscore` = 7-8, так как при значениях `min_qscore` = 9-10 покрытие генома оказывалось недостаточным. Средняя длина сборок с полнотой более 80% (согласно BUSCO) варьировала в диапазоне от 48.1 до 53.5 млн.п.н. Сборки с наибольшей полнотой для каждого значения `min_qscore` получили с использованием Flye (максимальное значение – 93.7%, `min_qscore` = 8), а с наименьшей – с применением Miniasm (менее 30% во всех четырех случаях). Наиболее протяженная сборка получена сборщиком Flye из данных с `min_qscore` = 7: длина сборки – 53.4 млн.п.н., N50 – 4.4 млн.п.н., число контигов – 42. Таким образом, на основе длинных чтений платформы ONT получена первая сборка генома *C. lini*, что даёт возможность проводить дальнейшие детальные исследования этого фитопатогена льна на молекулярном уровне.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант 22-16-00169.

Сравнение нового поколения зондов Agilent SureSelect All Exon V8 с предыдущей версией V7

Белова В.А., Шмитко А.О., Павлова А.С., Афасижев Р.Н., Черанев В.В., Табанакова А.А., Поникаровская Н.Г., Ребриков Д.В., Коростин Д.О.

*Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ, Москва
verusik.belova@gmail.com*

Большинство наборов для экзомного обогащения библиотек ДНК предназначены для секвенирования на приборах Illumina. Ранее нам удалось адаптировать протокол обогащения для платформы MGI с зондами Agilent SureSelect Human All Exon v6. В данном исследовании мы сфокусировались на сравнении более новых зондов Agilent SS Human All Exon v7 и v8.

20 библиотек человеческой геномной ДНК разделили на 2 пула по 10 библиотек, и провели 2 повторности обогащений этих пулов, используя наборы Agilent v7 и v8 по протоколу RSMU_exome. Секвенирование проводили в режиме PE100 на DNBSEQ-G400 со средней величиной покрытия 100x. В результате был получен набор данных, состоящий из 40 пар FASTQ файлов для 40 экзотов. Для сравнения протоколов проводили нормализацию данных до 50 М ридов и биоинформатический анализ с помощью программ FastQC, Trimmomatic, BWA, Picard, BCFtools. Также провели сравнение BED файлов наборов v7 и v8, содержащих геномные координаты целевых регионов.

Результаты: Target size набора v8 равен 35,24 Мб, набора v7 = 35,8 Мб, пересечение BED файлов составляет 98,42% (34,84 Мб). Из v7 исключено 2,76%, а в v8 включено 1,15% таргета. Получена информация (хромосомные координаты, Gene ID, аннотация) об уникальных target regions включенных в v7 (0,96 Мб) и v8 наборы (0,4 Мб). Подавляющее большинство изменений конкретных регионов имеет размер в несколько нуклеотидов, что говорит о «юстировке» производителем конкретных целевых областей. При этом изменение фрагментов большей длины (>30 п.н.) связано с обновлением информации в последних версиях баз данных. Так, пересечение с актуальной БД Gencode v39 уникальных регионов v8 дизайна составило 0,33 Мб, v7 дизайна - всего 0,09 Мб.

Качество WES библиотек не выявило значимых отличий по количеству on-target, off-target reads, % duplicates. Отличие в пользу набора v8 обнаруживается для метрики median target coverage, равной x53,4, в то время как для v7 = x48,6. Также, доля таргета покрытая не менее 10 раз для v8 равна 96,28%, для v7 = 95,08%. При этом доля таргета покрытая x20 меньше для набора v7 почти на 5% (88,07% для v7 против 92,96% для v8), что говорит о более высоком качестве обогащения для набора v8. Значение параметра Fold₈₀, отражающего равномерность покрытия, для пула экзотов v8 (mean = 1,72) лучше, чем в пуле v7 (mean = 2,13). Среднее количество SNV и indel для экзота v7 равно 25 736 и 743, для v8 = 25 558 и 699. Из-за того, что размер BED файлов для наборов отличается, мы сравнили результаты коллинга вариантов только для общих регионов v7 и v8 (34,84 Мб): среднее количество вариантов для экзотов v8 было выше на 3,06% для SNV и на 8,49% для indels, чем для экзотов v7.

Роль герминального варианта rs587782583 в гене BRCA2 в патогенезе рака яичников

Валова Я.В.^{1,2}, Прокофьева Д.С.¹, Мингажева Э.Т.^{1,3}, Махиянова Г.Р.¹, Харина О.К.¹, Э.К. Хуснутдинова^{1,3}

¹ Башкирский государственный университет, кафедра генетики и фундаментальной медицины, Уфа

² ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», Уфа

³ Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа

Q.juk@yandex.ru

Рак яичников (РЯ) занимает шестое место в структуре онкологических заболеваний у женщин и имеет один из самых высоких показателей смертности среди новообразований женских половых органов.

Цель работы поиск варианта rs587782583 в гене BRCA2 среди больных РЯ и здоровых женщин из РБ.

Материалом для исследования послужили образцы ДНК, выделенные из венозной крови 245 пациенток с РЯ и 350 здоровых женщин. Поиск мутации проводили методом анализа кривых плавления с высокой разрешающей способностью (HRM).

В ходе проведенного исследования вариант rs587782583 в гене BRCA2 был обнаружен только у пациентки с наследственным РЯ в ходе таргетного секвенирования, но не выявлен в общей выборке больных РЯ (n=245) и в контроле (n=350). По функциональной роли обнаруженный вариант представляет собой миссенс мутацию и на уровне белка приводит к замене лизина на треонин. Однако клинический эффект в контексте развития синдрома наследственного РМЖиРЯ этой мутации изучен недостаточно. У носительницы варианта диагностирован наиболее агрессивный тип опухоли- серозная аденокарцинома высокой степени злокачественности.

Таким образом, наши данные указывают на низкую частоту встречаемости варианта rs587782583 в гене BRCA2 среди женщин из Республики Башкортостан.

Исследование поддержано программой развития биоресурсных коллекций ФАНО. Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 20-34-90003; Республики Башкортостан №210/1; Президента РФ №МК-3208.2022.1.4; государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ №075-03-2021-193/5.

Получение более специфичных и активных вариантов SpyCas9 редактора путем белковой эволюции

Давлетшин А.И., Спасская Д.С., Тютяева В.В., Гарбуз Д.Г., Карпов Д.С.

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

artem.dav7@yandex.ru

Редактирование геномной ДНК имеет огромное значение в фундаментальной науке, биотехнологии и медицине. В настоящее время система CRISPR/Cas9 из *Streptococcus pyogenes* является наиболее простой и удобной системой редактирования геномной ДНК. Однако довольно высокая внецелевая активность ограничивает применение данной системы в терапии наследственных заболеваний человека.

Цель нашей работы - получение новых вариантов SpyCas9, обладающих как повышенной специфичностью, так и активностью. При получении новых вариантов SpyCas9 использовали известные мутации, повышающие специфичность редактирования ДНК, а также вводили новые, полученные случайным мутагенезом. Оценка специфичности и активности мутантных вариантов SpyCas9 проводили в дрожжевой тест-системе, основанной на инактивации гена ADE2, которая ведет к окрашиванию колоний в красный цвет. В этой системе белковой эволюции получен ряд

Нами получен набор из более, чем 35 вариантов белка SpyCas9. Варианты, показавшие наибольшую активность в дрожжевой тест-системе, далее были протестировали на специфичность. Полученные высокоактивные и высокоточные варианты белка SpyCas9 продемонстрировали высокую специфичность (в 10 раз большую по сравнению с диким типом) без значительного ущерба для целевой активности редактирования ДНК.

Полученные нами высокоспецифичные и высокоактивные варианты SpyCas9 могут служить перспективными кандидатами для дальнейшего улучшения технологии редактирования генома.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-14-00377.

NGS в криминалистике

Полякова А.В., Тюрина А.Ю., Рябухина М.В.

ЭКЦ МВД России, Москва

anastasia.polyakova08@yandex.ru

Применение ДНК-технологий для раскрытия и расследования преступлений, розыска лиц, пропавших без вести, и установления личности неопознанных трупов сделало ДНК-анализ неотъемлемой частью современной криминалистики. До недавнего времени генетическая дактилоскопия основывалась исключительно на методе капиллярного электрофореза.

Генетические анализаторы с лазериндуцированной флуоресцентной детекцией стали основными приборами экспертно-криминалистических ДНК-лабораторий, позволяющими проводить исследования различных участков митохондриальной и ядерной ДНК человека. Однако применение традиционной технологии анализа ДНК не всегда достаточно.

В тех случаях, когда лицо, оставившее след, остается неустановленным, необходимо получение дополнительной розыскной информации, например, о признаках его внешности.

Использование в криминалистике технологии массового параллельного секвенирования позволяет решать задачи, связанные с ДНК-идентификацией личности, а также определять фенотипические признаки человека (цвет радужки глаз, волос, кожи) и его этногеографическое происхождение.

Isolation, sequencing and characterization of the *Bacillus*-infecting temperate bacteriophage B13

Kazantseva O.A., Pilgrimova E.G., Shadrin A.M.

Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms,

*Pushchino, Russia
andrey2010s@gmail.com*

Bacterial viruses (bacteriophages) are the most abundant biological entities on Earth. As of May 2022, 493 phage genera of the class Caudoviricetes (tailed phages) are known, which is doubtless only the tip of the iceberg. Particularly interesting are temperate phages preserved in their host cell in the form of prophages, which may not be easy to identify using conventional cultivation-based approaches. In this work, the new temperate bacteriophage B13 preying on the *Bacillus cereus* group members was isolated and described. The B13 prophage was induced from the host strain *Bacillus cereus* B-13 (All-Russian Collection of Microorganisms) using mitomycin C. Phage DNA was sequenced on the Illumina platform, and the genome was assembled using SPAdes 3.11.1. The B13 genome is a linear dsDNA molecule with the length of 36,864 bp and the GC-content of 34.8%. The B13 genome contains 53 CDSs, as predicted by RASTtk. Thirty out of the 53 CDSs (57%) were functionally annotated using BLASTp and HHpred and classified into several functional modules: DNA packaging and structural module, lytic module, DNA replication and recombination module, prophage maintenance module. The predicted tail proteins of B13 are typical of tailed bacteriophages with the siphovirus morphotype. It was predicted using PhageTerm and then confirmed experimentally through DNA restriction analysis that B13 uses the headful DNA packaging strategy. As revealed by BLASTn analysis, B13 has no close relatives among the known viruses. The closest relative, *Bacillus* phage phi4J1, is 32% identical to B13, meaning that B13 belongs to a new high-rank viral taxon: genus or even a family.

The research was funded by the Russian Science Foundation, project number 22-15-00385.

Выделение, секвенирование и характеристика умеренного бактериофага Enterococcus фВ1578

Казанцева О.А., Семкин Д.А., Шадрин А.М.

*ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,*

*Пушино, Россия.
olesyakazantseva@bk.ru*

Представители рода *Enterococcus* широко распространены в природе. Некоторые штаммы данного рода, приобретая ряд факторов патогенности, способны вызывать серьезные инфекционные заболевания. Особую опасность представляет распространение антибиотикорезистентных видов *E. faecium* и *E. faecalis*. Важную роль в возникновении устойчивости бактерий к антибиотикам играют мобильные генетические элементы. В частности, имеются подтверждения того, что присутствие в бактериальной клетке профагов может способствовать приобретению бактерией-хозяином генов устойчивости к антибиотикам и факторов патогенности. На данный момент точно неизвестно насколько велика роль бактериофагов в процессе приобретения энтерококками антибиотикорезистентности и вирулентности.

В данной работе мы описываем выделение и даём генетическую характеристику умеренного бактериофага фВ1578, инфицирующего бактерии рода *Enterococcus*. фВ1578 был выделен из штамма *Enterococcus* sp. VKM B-1578 при индукции митомицином С. Секвенирование ДНК фВ1578 проводили на платформе Illumina, с последующей сборкой генома с помощью SPAdes 3.15.0. Геном фВ1578 представляет собой линейную дцДНК длиной 40 049 п.н. и GC-составом 36,0%. Геном фВ1578 содержит 59 открытых рамок считывания, 40 (67,8%) из которых были функционально аннотированы с использованием BLASTp (NCBI) и HHPred. Рестрикционный анализ ДНК показал, что фВ1578 использует «headful» стратегию упаковки ДНК. Трансмиссионная электронная микроскопия и филогенетический анализ показали, что бактериофаг имеет морфотип «siphovirus» и филогенетически удален от ближайших родственных вирусов настолько, что может являться представителем нового рода внутри семейства Siphoviridae.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 22-15-00385.

Характеристика микробиома залов Древнерусского искусства Государственной Третьяковской галереи

**Жгун А.А.¹, Потапов М.П.¹, Авданина Д.А.¹, Климкина К.М.²,
Веселовский В.А.², Троян Е.В.³, Федоров Д.Е.², Шитов М.В.³**

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт Биоинженерии им. К.Г. Скрыбина, Москва

² ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва,

³ Государственная Третьяковская галерея, Москва

e-mail: zzhgun@mail.ru

В залах Древнерусского искусства Государственной Третьяковской галереи (ГТГ) собрана коллекция уникальных произведений темперной живописи, которые в силу природы используемых органических материалов являются хорошим субстратом для роста различных микроорганизмов. С разрешения Т.С. Городковой, главного хранителя музейных предметов ГТГ, с экспонатов и поверхностей помещений мы отобрали свыше 100-та проб в залах Домонгольского периода (№56), Ростово-суздальской школы (№57) и Иконописи XVI–XVIII вв. (№61). Мы также получили соответствующие культуры микроорганизмов и определили доминантных биодеструкторов против панели макетов с отдельными органическими материалами, используемыми в темперной живописи и при ее реставрации. Характеристику микробиомов в исходных пробах и соответствующих им культурах провели после метагеномного секвенирования гипервариабельных районов рДНК бактерий (V3/V4) и грибов (ITS2) на платформе MISeq Illumina, номер доступа BioProject: PRJNA606688, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA606688>, [Zhgun A, et. al, 2020, PLoS ONE 15(4):e0230591]. Доминантными представителями плесневых грибов оказались ранее охарактеризованные биодеструкторы из семейств *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Ulocladium*, *Simplicillium* и *Microascus*. В составе микробиома ряда проб, отобранных с темперной поверхности икон, мажорными представителями бактерий были *Stenotrophomonas*, а грибов – *Aspergillus*. Показали на макетах, их совместное заражение повышает эффективность биодеструкции. Всего в изученных пробах охарактеризовали примерно 700 бактерий и 300 грибов. Такое расширение знания о микробиологическом сообществе в ГТГ важно не только с фундаментальной точки зрения, но и для разработки превентивных и экстренных мер борьбы с биопоражением, в случае возникновения нештатных ситуаций в музеях.

Важнейшие изменения в геномах, происходящие при улучшении грибных продуцентов вторичных метаболитов классическим методом

Жгун А.А.

ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт Биоинженерии им. К.Г. Скрябина, Москва
zzhgun@mail.ru

Основным способом повышения продукции вторичных метаболитов (ВМ) у мицелиальных грибов является классический метод улучшения (CSI), связанный с многораундовым случайным мутагенезом и скринингом. Метод позволил, начиная с 1950-х, получить важнейшие промышленный штаммы, у которых выход фармацевтически-значимых ВМ увеличен в 100–1000 и более раз по сравнению с природными изолятами. До последнего времени не было сведений о молекулярных основах этих изменений, то есть тех положительных мутациях, отбираемых в процессе скрининга, совокупность которых позволяет получить штамм-суперпродуцент по целевому ВМ.

В настоящее время единственным объектом, для которого всесторонне охарактеризованы принципиальные изменения в геномах улучшенных штаммов, является *Penicillium chrysogenum*, продуцент пенициллина G. Однако до конца непонятно, насколько эти изменения универсальны для программ CSI мицелиальных грибов. В связи с этим целью нашей работы был поиск ключевых изменений в геномах двух других грибных продуцентов, *Acremonium chrysogenum* и *Aspergillus terreus*, у которых выходы антибиотика цефалоспорина С и холестерин-понижающего средства ловастатина увеличены в ~300 и ~200, раз соответственно. Для этого на платформе Illumina HiSeq 2500 определили последовательности геномов высокоактивных штаммов *A. chrysogenum* НУ (ВКМ F-4081D) и *A. terreus* НУ (№43-16) и сравнили с аннотированными в GenBank последовательностями для исходных штаммов диких типов. Среди множества изменений выделяются два класса: мутации, приводящие к потере продукции альтернативных (целевому) ВМ и изменения в генах глобальной регуляции ВМ. Эти изменения могут носить универсальный характер, поскольку показаны и при улучшении *P. chrysogenum*. Такое знание может иметь практический выход для таргетированного получения грибных штаммов-суперпродуцентов ВМ.

Идентификация генов α -галактозидазы и β -ксилазазы в геномной последовательности *Humisphaera borealis*

Наумов Д.Г.

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН,
Москва

daniil_naumoff@yahoo.com

Планктомицеты класса Phycisphaerae представлены аэробными и анаэробными гетеротрофными бактериями, населяющими широкий спектр морских и наземных местообитаний, однако их функции в экосистемах пока изучены слабо. *Humisphaera borealis* M1803T – один из немногочисленных охарактеризованных планктомицетов этого класса, его геном был недавно секвенирован (GenBank, CP063458.1). Известно, что планктомицеты обычно обладают большим гликолитическим потенциалом, а их геномы кодируют широкий спектр гликозил-гидролаз. Согласно базе данных CAZy (<http://www.cazy.org/>), геном этого организма содержит 54 гена, кодирующих белки, гомологичные ранее известным гликозил-гидролазам. Целью настоящей работы был поиск кандидатов на роль генов α -галактозидазы и β -ксилазазы в геноме типового штамма *Humisphaera borealis*.

Ферменты с эндо- β -ксилазазными активностями (К.Ф. 3.2.1.8 и К.Ф. 3.2.1.32) отнесены в базе данных CAZy к 17-ти семействам гликозил-гидролаз: GH3, GH5, GH6, GH8, GH9, GH10, GH11, GH16, GH18, GH26, GH30, GH43, GH44, GH51, GH62, GH98 и GH141. Среди них лишь пять (GH5, GH10, GH18, GH62 и GH141) оказались представлены у *H. borealis*, каждое из них одним белком. Мы провели исследование всех этих белков. Для белков IPV69_11765 (GH18) и IPV69_13055 (GH5) удалось обнаружить более близких гомологов, обладающих иными гликозил-гидролазными активностями. У представителя семейства GH10 гликозил-гидролаз (IPV69_18965) оказался разрушенным активный центр фермента. Мы рассматриваем белки из семейств GH62 (IPV69_21845) и GH141 (IPV69_20890) как наиболее вероятных кандидатов на роль β -ксилазазы, обеспечивающей микроорганизму способность утилизировать ксилан, являющийся одним из ключевых полимеров клеточной стенки растений. Ферменты с α -галактозидазной активностью (К.Ф. 3.2.1.22) представлены в семи семействах гликозил-гидролаз: GH4, GH27, GH31, GH36, GH57, GH97 и GH110. В геноме *H. borealis* оказались закодированы белки трёх из них: GH36 (IPV69_08310), GH57 (IPV69_20015) и GH110 (IPV69_17405). Проведённый анализ позволил нам рассматривать IPV69_08310 в качестве наиболее вероятного кандидата на роль α галактозидазы. Полученные в работе результаты продемонстрировали большое значение горизонтального переноса генов в эволюции гликозил-гидролаз из семейств GH5, GH18, GH36, GH62, GH110 и GH141 у планктомицетов.

Высокоэффективный GMP-совместимый протокол производства клеточного продукта на основе CD34+ гемопоэтических стволовых клеток с нокаутом гена CCR5 опосредованным трансфекцией мРНК CCR5-Uco-TALEN в условиях закрытой автоматизированной системы CliniMACS Prodigy

Шакирова А.^{1,2}, Сергеев В.^{1,2,4}, Муслимов А.^{1,2}, Карпов Т.^{1,2}, Лепик К.^{1,2},

Попова М.^{1,2}, Фезе Б.³, Кулагин А.¹

¹ ПСПбГМУ им. ак. И.П.Павлова, Санкт-Петербург

² АГСТ, Санкт-Петербург

³ Университетский Медицинский Центр Гамбург-Эппендорф, Гамбург, Германия

⁴ НМИЦ Онкологии им. Н.Н.Петрова, Санкт-Петербург

lepikv@gmail.com

Цель данного исследования состояла в разработке протокола производства клеточного продукта гемопоэтических стволовых клеток с высокоэффективным нокаутом CCR5 на основе закрытой автоматизированной платформы CliniMACS Prodigy с использованием мРНК, кодирующей CCR5-Uco-hetTALEN [Schwarze et al 2021], а также оценке потенциала приживления и восстановления кроветворения после трансплантации в модели *in vivo* с анализом безопасности процедуры редактирования.

Используя разработанный протокол, мы подтвердили высокую степень целевой активности CCR5-Uco-hetTALEN в локусе CCR5 (до 93,7%) как с помощью подходов ddPCR и NGS. Согласно NGS из Top-10 предсказанных *in-silico* потенциальных нецелевых сайтов, нецелевая активность (2,53-5,12%) наблюдалась только в локусе CCR2. С помощью TEG-seq было обнаружено пятнадцать дополнительных потенциальных нецелевых сайтов. За исключением гена CCR2, все потенциальные нецелевые локусы были расположены в интронах или некодирующих областях генома. После трансплантации отредактированных клеток мышам линии NSG все животные контрольной (N=10) и опытной (N=10) групп были живы на момент окончания наблюдения без достоверной разницы в массе тела между ними ($p>0,05$). Данные проточной цитометрии показали приживление и восстановление нескольких линий лимфоидных и миелоидных гемопоэтических клеток без существенных различий между группами.

Вывод. Таким образом, мы разработали воспроизводимый в клиническом масштабе, совместимый с GMP протокол для нокаута CCR5 в первичных гемопоэтических стволовых клетках человека, который воспроизводимо демонстрирует высокую эффективность редактирования гена CCR5. Мы продемонстрировали благоприятный профиль безопасности для дальнейшей разработки продукта.

ДЛЯ ЗАМЕТОК

Научное издание

**«Геномное секвенирование и редактирование»
СБОРНИК ТЕЗИСОВ
10-й Всероссийской научно-практической
конференции центров геномных исследований
мирового уровня**

Подписано в печать 16.05.2022
Формат 60×90 1/16. Усл. печ. л. 1,5. Тираж 200 экз. Заказ № 22-22.

Отпечатано ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова
Минздрава России, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1.
www.rsmu.ru

ISBN 978-5-88458-605-5



9 785884 586055 >