

Министерство науки и высшего образования РФ
Казанский (Приволжский) федеральный университет
Институт фундаментальной медицины и биологии
Научный центр «Регуляторная геномика»

ЖИЗНЬ ГЕНОМОВ
Life of Genomes, 2022
Международная конференция
Сборник тезисов

Казань
2022

Жизнь геномов / Life of Genomes, 2022: международная конференция
(23–24 ноября 2022, Казань) // Сборник тезисов. — Казань: НЦ «Регуляторная геномика» ИФМиБ КФУ, 2022. — 45 с. —
<http://lifeofgenomes.r-genomics.com/abstract/>

Сборник содержит тезисы международной конференции Жизнь геномов / Life of Genomes, 2022, организованной на базе научного центра «Регуляторная геномика» Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета. Конференция проведена в Казани с 23 по 24 ноября 2022 года при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект № 075-15-2021-1344).

Организационный комитет

О. А. Гусев
Е. И. Шагимарданова
А. Г. Кадиров
Т. Б. Андрюшкин

Графические материалы

Г. Р. Газизова

Оглавление

Локализация мутаций безантоциановости ржи с использованием геномных данных	5
Роль метилирования мяРНК в сплайсинге на мышинных и клеточных моделях	7
Исследование механизмов реализации миссенс вариантов в гене PAX6	8
Анализ транскриптомных и композиционных сдвигов в клетках головного мозга крысы в моделях агрессии	10
Изменение транскриптома иммунных клеток под действием химиотерапии при раке молочной железы.....	12
Полиморфизм G894T гена эндотелиальной синтазы оксида азота у пациентов с саркоидозом Бека.....	13
Влияние экспрессии гена β -субъединицы геранилгеранилтрансферазы I на формирование многоклеточного таллома <i>Marchantia polymorpha</i>	15
Бакуловиральная экспрессия белков. Механизм работы и применение	17
Разнообразие и дифференциальная экспрессия микроРНК в скелетных мышцах человека с различным соотношением быстрых и медленных волокон	19
Анализ экспрессии генов гемоглобинов в псаммореобионтных комарах-звонцах ' <i>Orthocladiinae acuticauda</i> ' и <i>Robackia demeijerei</i> (Diptera, Chironomidae)	21
Гетероплазмия митохондриальной ДНК как один из факторов старения и взаимосвязанные терапевтические маркеры здорового старения	22
Высокопроизводительное клонирование плазмиды pUC19 как универсальный метод оценки копийности митохондриальной ДНК в ходе исследования процессов старения.....	23
Первая сборка генома психротолерантного фитопатогенного гриба <i>Microdochium nivale</i>	24
Экспрессия белка DNMT3A1	26
Использование современных сверточных архитектур нейронных сетей для предсказания экспрессии гена по последовательности промотора	27
Влияние модификаций в структуре направляющих РНК на функционирование системы CRISPR/CAS9 IN VITRO*	29
Гетероплазмия мтДНК в скелетных мышцах пожилых людей: почему это сложно?	31
Экспрессионные особенности макрофагов у больных тройным негативным раком молочной железы в зависимости от статуса PD-L1	32
Отличительные особенности биохимического состава плодов облепихи алтайской селекции	33
Невирусные носители как средства доставки нуклеиновых кислот в клетки миомы матки с целью генной терапии.....	36

Пространственное полнотранскриптомное профилирование опухолей яичника с помощью технологии 10x Genomics Visium	38
Breed-specific patterns of early myogenesis, nitric oxide metabolism, and post-hatch growth in relation to genetic diversity and divergent selection in chickens.....	40
From feed regulation to regulated feeding: intestinal microbiome and performance optimization in broiler chickens in response to antibiotic and probiotic treatment	41

Локализация мутаций безантоциановости ржи с использованием геномных данных

Буланов А. Н.^{1*}, Зыкин П. А.¹, Андреева Е. А.^{1,2}, Цветкова Н. В.¹, Войлоков А. В.²

¹ Кафедра генетики и биотехнологии, СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

² Лаборатория генетики и биотехнологии растений, СПбФ ИОГен РАН, Санкт-Петербург, Россия

* an.bulanov20002014@gmail.com

Ключевые слова: рожь, антоцианы, картирование, геном

Цель работы: локализация мутаций, приводящих к отсутствию антоциановой окраски зёрен ржи. В исследовании использовалось сопоставление результатов экспериментов по картированию рецессивных мутаций безантоциановости классическими методами генетического анализа, результатов секвенирования и аннотирования генома ржи [1, 2] и транскриптомных данных. Ранее были получены результаты картирования шести мутаций безантоциановости (vi1...vi6) относительно микросателлитных и CAPS-маркеров, локализованных в хромосомах ржи. Это позволило картировать исследуемые мутации в пределах конкретных участков на хромосомах ржи: vi1 – 7R, vi2 – 4R, vi3 – 3R, vi4, vi5, vi6 – 2R. Данное исследование было направлено на уточнение локализации мутаций безантоциановости и идентификации конкретных структурных или регуляторных генов, ответственных за мутации.

Метод: проводился *in silico* ПЦР известных микросателлитных маркеров на опубликованных геномах ржи (Rye_Lo7_2018_v1p1p1 и HAU_Weining_v1.0) [1, 2] для картирования их в координатах собранных хромосом. Учитывая неполную аннотацию свободнодоступных геномов, проведен поиск и маскирование участков, содержащих транспозоны с помощью ПО EDTA (<https://github.com/oushujun/EDTA>), *ab initio* поиск и аннотация кодирующих участков с использованием собственных и свободнодоступных транскриптомов ржи (всего 44 транскриптома) с помощью ПО Augustus (<https://bioinf.uni-greifswald.de/augustus/>), функциональная аннотация кодирующих участков в Gene Ontology терминологии и выбор генов, участвующих в пути синтеза флавоноидов, из списка всех аннотированных генов, наложение собственных транскриптомов семенных оболочек нескольких линий на сборку генома для определения экспрессирующихся в данной ткани генов.

Результат: В Петергофской генетической коллекции поддерживаются линии, характеризующиеся наличием рецессивных мутаций, приводящих к отсутствию накопления антоцианов в зерне и, в большинстве случаев, в вегетативных органах (колеоптиль, листья, стебель). Описано шесть неаллельных мутаций безантоциановости (vi1...vi6), которые ранее были картированы относительно молекулярных маркеров на хромосомах ржи. В 2021 году были опубликованы нуклеотидные последовательности генома ржи [1, 2], собранные в псевдомолекулы. Нами были заново проаннотированы геномы ржи из 2-х источников, определены координаты генов, участвующих в синтезе и контроле синтеза антоцианов и их биосинтетических предшественников, а также, координаты маркеров, которые на предыдущих этапах были использованы для картирования мутаций. При сравнении координат генетических маркеров и генов был составлен список генов-кандидатов для мутаций vi1...vi6. Для мутации vi1 предложен ген-кандидат транскрипционный фактор MYB61, vi2 в качестве гена-кандидата предложен ген лейкоцианидиндеоксигеназы 1, vi3 — один из генов дигидрофлавонол-4-редуктазы, кластер из которых присутствует на хромосоме 3, vi4 и vi5 — ген-ортолог кукурузы R-S, vi6 — ген флавонон-3-диоксигеназы.

Выводы: на основании сопоставления генетических карт и геномных последовательностей предложены гены-кандидаты шести мутаций безантоциановости ржи.

Благодарность: Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в соответствии с соглашением № 075-15-2022-322 от 22.04.2022 о предоставлении гранта в виде субсидии из федерального бюджета

Российской Федерации. Грант предоставлен для государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

Ссылки

1. Rabanus-Wallace, M.T., Hackauf, B., Mascher, M. et al. Chromosome-scale genome assembly provides insights into rye biology, evolution and agronomic potential. *Nat Genet.* 2021; 53: 564–573.
2. Li, G., Wang, L., Yang, J. et al. A high-quality genome assembly highlights rye genomic characteristics and agronomically important genes. *Nat Genet.* 2021; 53: 574–584.

Роль метилирования мяРНК в сплайсинге на мышинных и клеточных моделях

Болихова А.К.^{1*}, Марьясина С.С.², Аверина О.А.², Донцова О.А.^{3,4}, Сергиев П.В.^{2,3,4}

¹ Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Институт функциональной геномики, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Химический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁴ Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

* anastasia_b7@mail.ru

Ключевые слова: сплайсинг, мяРНК, метилирование, кинетика

Сплайсинг — ключевой этап созревания большинства молекул РНК в эукариотической клетке. Данный процесс осуществляется сплайсосомой, центральная часть которой включает шесть малых ядерных РНК (мяРНК). Изменения в структуре мяРНК могут оказывать значительное влияние на точность и скорость сплайсинга.

В данной работе мы стремились понять роль метилирования мяРНК в сплайсинге. Анализ проводили на примере двух модификаций: m⁶Am30 в U2 мяРНК и m²G72 в U6 мяРНК.

В исследовании использовали клетки Hela S3 дикого типа и две дочерные линии, полученные инактивацией генов метилтрансфераз, отвечающих за указанные модификации. Также проводили анализ сплайсинга в мышах, нокаутных по генам данных метилтрансфераз.

Высокопроизводительное секвенирование тотальной РНК из клеток Hela S3 и органов мышей позволило выявить разницу в экспрессии генов и соотношении альтернативно-сплайсированных форм РНК у линий дикого типа и линий, нокаутных по метилтрансферазам. Результаты подтвердили с помощью ПЦР и ПЦР в реальном времени.

На клеточных моделях оценили скорость сплайсинга у дикого типа и нокаутов. Для этого клетки в течение небольших промежутков времени инкубировали с этилиуридином, а затем выделяли новосинтезированную РНК методами климхимии. Изменение соотношения сплайсированной и несплайсированной форм РНК определили с помощью ПЦР в реальном времени и высокопроизводительного секвенирования [1]. Удалось показать, что скорость сплайсинга ниже в клетках, нокаутных по исследуемым метилтрансферазам, при этом степень замедления сплайсинга при исчезновении каждой из модификаций различна для разных интронов.

Таким образом, нами показано значительное влияние модификаций мяРНК U2 и U6 на сплайсинг, как на клеточных линиях, так и на мышинных моделях, а также проведена количественная и качественная оценка этого влияния.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ #21-64-00006.

1. Palozola KC, Donahue G, Zaret KS. EU-RNA-seq for in vivo labeling and high throughput sequencing of nascent transcripts. STAR Protoc. 2021;2(3):100651.

Исследование механизмов реализации миссенс вариантов в гене PAX6

Васильева Т.А.^{1*}, Филатова А.Ю.², Марахонов А.В.¹

¹ Лаборатория генетической эпидемиологии, ФГБНУ «МГНЦ», Москва, Российская Федерация

² Лаборатория функциональной геномики, ФГБНУ «МГНЦ», Москва, Российская Федерация

* vasilyeva_debrie@mail.ru

Ключевые слова: молекулярные последствия, несинонимичные замены, PAX6, клинический полиморфизм

Цель работы: изучить влияние несинонимичных вариантов нуклеотидной последовательности гена PAX6, обнаруженных в когорте больных с врожденной аниридией (ВА) и фенотипами аниридийного спектра, на экспрессию гена и функцию кодируемого им транскрипционного фактора в разных клеточных контекстах. В отношении большинства мутаций гена PAX6 действует механизм гаплонедостаточности, функциональные последствия миссенс-мутаций могут быть сложнее, менее предсказуемы, и механизмов их реализации может быть несколько.

Методы: Молекулярно-генетические и цитогенетические методы. В исследование включены 365 пациентов из 294 семей с ВА и другими фенотипами. Проведено секвенирование гена PAX6 и мультиплексная лигаза-зависимая амплификация проб (MLPA анализ). Бионформатический анализ. Предсказание патогенного характера и возможных последствий миссенс вариантов PAX6 проведено *in silico* с помощью ряда предсказательных алгоритмов. Проанализированы известные из базы HGMD связи миссенс-замен с различными глазными фенотипами. Анализ научной литературы позволил собрать информацию об уже проведенных функциональных исследованиях для шести известных вариантов [1], а также *in silico* предсказаниях молекулярных последствий для известных патогенных миссенс вариантов, приходящихся на парный домен PAX6 [2]. Для проведения функционального анализа разработана тест система на основе репортерного гена люциферазы.

Результат: Проведена ДНК-диагностика и обнаружены патогенные варианты нуклеотидной последовательности гена PAX6 или делеции хромосомной области 11p13 у 365 пациентов из 294 семей с ВА и другими фенотипами. Крупные делеции выявлены у 95 пробандов, нонсенс – у 75, сдвига рамки считывания – у 50, нарушающие сплайсинг – у 39, потеря стоп-кодона – у 14, варианты в 5'-UTR – у 6, потеря старт-кодона – у 3 и миссенс варианты – у 12 пробандов, что составило 4,1%, от всех обнаруженных патогенных изменений гена PAX6. В нашей выборке миссенс-замены оказались ассоциированы с несколькими разными фенотипами, которые по ведущему, самому яркому, поражению одной из структур глаза подразделяются на несколько подгрупп: классическая ВА (3 пробанда, две мутации: с.34G>C p.(Gly12Arg), с.357C>G p.(Ser119Arg)), изолированная гипоплазия фовеа с ахроматопсией (1 пробанд, с.214G>A p.(Gly72Ser)), частичная атрофия зрительных нервов (2 пробанда, 2 мутации: с.19G>C p.(Gly7Arg), с.177G>T p.(Arg59Ser)), хориоретинальная колобома (с.581G>A p.(Gly194Glu)), микрофтальм (с.151G>A p.(Gly51Arg), с.164A>C p.(Lys55Thr)) и мягкий аниридийный фенотип (с.778A>G p.(Asn260Asp)). Функциональный анализ для выявленных миссенс вариантов ранее не проводился.

Для проверки функционального действия выбранных несинонимичных вариантов нуклеотидной последовательности разработана тест-система, состоящая из двух экспрессионных векторов. Первый вектор экспрессирует непосредственно белок PAX6 человека, а также зеленый флуоресцентный белок для контроля эффективности трансфекции. Для исследования трансактивационной активности исследуемого белка создан ряд конструкций на основе модифицированного вектора psiCHECK-2. Данный вектор экспрессирует два гена люцифераз: *Firefly* и *Renilla*. Люцифераза *Renilla* экспрессируется под контролем SV40 промотора и является нормировочной, тогда как экспрессия люциферазы *Firefly* находится под контролем минимального промотора, содержащего один или несколько известных сайтов связывания различных доменов PAX6 (в т.ч. LE9, SIMO, P3 элементы). Котрансфекция вектора, содержащего PAX6 и люциферазного вектора в модельную клеточную линию с последующим измерением

относительного уровня активности люцифераз *Renilla/Firefly* позволит оценить транскрипционную активность белка PAX6 в норме и при введении исследуемых несинонимичных вариантов.

Выводы: Выявленное при миссенс заменах разнообразие фенотипов может, хотя бы частично, объясняться различными механизмами этиопатогенеза. Для определения молекулярных последствий различных миссенс-мутаций всякий раз необходимо проведение дополнительного функционального исследования *in vitro*.

Благодарность: Исследование поддержано грантом РФФ № 22-25-00824.

Ссылки

1. Xie Q, et al. Gene regulation by PAX6: structural-functional correlations of missense mutants and transcriptional control of Trpm3/miR-204. *Mol Vis.* 2014;20:270-282.
2. Alibés A. et al. Using protein design algorithms to understand the molecular basis of disease caused by protein-DNA interactions: the Pax6 example. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(21):7422-7431.

Анализ транскриптомных и композиционных сдвигов в клетках головного мозга крысы в моделях агрессии

Гайнуллина А.Н.*¹, Сабиров М.С.¹, Несмелов А.А.², Билялов А.И.², Кожемякина Р.В.³, Шагимарданова Е.И.², Гербек Ю.Э.³, Гусев О.А.², Романов Р.А.¹

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

³ Федеральный исследовательский центр институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

* anastasiia.gainullina@gmail.com

Ключевые слова: секвенирование одиночных клеток, экспрессия генов, гипоталамус, крысиная модель агрессии

Цель работы: Экспериментальная модель, где группы крыс *Rattus norvegicus* имеют разный (высокий и низкий) уровень агрессии благодаря направленной селекции по поведенческим характеристикам, используется для исследования агрессии, передающейся на генетическом уровне. Будучи созданы под руководством академика Дмитрия Беляева в Институте цитологии и генетики Сибирского отделения АН СССР в середине прошлого века, такие модели и по сей день представляют большой научный интерес и продолжают активно исследоваться на геномном и транскриптомном уровнях. В настоящем исследовании для выявления клеточной и молекулярной природы агрессии у шести взрослых крыс из каждой группы было осуществлено секвенирование одиночных клеток гипоталамуса.

Метод: Последовательности сырых ридов секвенирования были выровнены на референсную последовательность крысиного генома последней версии. Благодаря уникальным клеточным идентификаторам весь пул выровненных ридов был разделен на группы, соответствующие отдельным клеткам. Каждая полученная группа в дальнейшем анализировалась как экспрессионный профиль отдельной клетки. Из полученного набора клеток были отфильтрованы низкокачественные клетки, дубликаты и клетки крови. Далее все образцы были проинтегрированы с помощью пайплайна обработки данных секвенирования одиночных клеток. В полученном пуле клеток были идентифицированы все основных клеточные типы мозга: нейроны, олигодендроциты, астроциты, эпендима, танициты, микроглия. Для дальнейшего анализа различий между двумя группами крыс был выбран подход изучения транскриптомных и композиционных сдвигов в конкретных клеточных типах¹. Транскриптомный анализ в свою очередь представлен как анализом дифференциальной экспрессии отдельных генов, так и анализом представленности модулей, представляющих собой совокупность генов, объединённых в единую функциональную группу (канонические пути, а также регулоны, полученные методом SCENIC²).

Результат: В первую очередь были проанализированы нейрональные клетки. Для этого гетерогенные группы нейронов были разбиты на различные подтипы. В качестве идентификационных меток для функционально специализированных пулов нейронов были использованы различные нейропептиды и нейротрансмиттеры. Композиционный анализ нейронов показал, что, во-первых, агрессивные крысы имеют тенденцию сдвига в сторону кластеров, маркирующихся генами, чьи продукты являются организаторами реакции организма на стресс, а также гормонами Sst и Trh, вовлеченными в процесс секреции гормонов щитовидной железы. Эти результаты согласуются с нашим независимым анализом с помощью метода SCENIC, поскольку среди регулонов SCENIC, обогащенных в клетках агрессивных мышей, есть Thra+ регулон. Thra представляет собой ТФ, который опосредует биологическую активность гормона щитовидной железы. Более того, согласно литературным данным, мыши с вариантами гена Thra проявляют депрессивный, тревожный и ASD фенотипы. Во-вторых, у агрессивных крыс также наблюдается тенденция к сдвигу состава нейронов в сторону кластера Adcyap+/Bdnf+. Клетки этого скопления принадлежат вентромедиальному ядру гипоталамуса. Активность его клеток принято считать ответственной за провоцируемое стрессом агрессивное поведение.

Выводы: Крысы с разным уровнем агрессии имеют различия в транскриптомных профилях клеток гипоталамуса.

Благодарность: Исследование поддержано грантами № 075-15-2021-1075 "Использование генетических технологий для поиска биомаркеров, моделирования и терапии заболеваний человека" (руководитель — Воротеляк Екатерина Андреевна) и № 2021-1930-ФП5-8627-4241 «Регуляторная транскриптомика для оценки потенциала модификации генома и изучения регенерации в животноводстве» (руководитель — Гусев Олег Александрович).

Ссылки

1. Viktor Petukhov, Anna Igolkina, Rasmus Rydbirk, Shenglin Mei, Lars Christoffersen, Konstantin Khodosevich, Peter V. Kharchenko. Case-control analysis of single-cell RNA-seq studies // bioRxiv 2022.03.15.484475
2. Aibar, S., González-Blas, C., Moerman, T. et al. SCENIC: single-cell regulatory network inference and clustering. Nat Methods 14, 1083–1086 (2017)

Изменение транскриптома иммунных клеток под действием химиотерапии при раке молочной железы

Герашенко Т.С.^{1*}, Патышева М.Р.¹, Фролова А.А.², Федоров А.А.¹, Ямщиков П.С.¹, Брагина О.Д.³, Денисов Е.В.¹

¹ Лаборатория биологии опухолевой прогрессии, НИИ онкологии Томского НИМЦ, Томск, Россия

² Лаборатория молекулярной онкологии и иммунологии, НИИ онкологии Томского НИМЦ, Томск, Россия

³ Отделение радионуклидной диагностики, НИИ онкологии Томского НИМЦ, Томск, Россия

* t_gerashchenko@oncology.tomsk.ru

Ключевые слова: рак молочной железы, иммунная система, химиотерапия, секвенирование единичных клеток

Цель работы: изучение транскрипционных изменений и популяционного состава иммунных клеток периферической крови пациенток с трижды-негативным раком молочной железы (ТНРМЖ) в динамике неoadъювантной химиотерапии (НАХТ) с помощью секвенирования РНК единичных клеток.

Методы. Из венозной крови, забранной до начала химиотерапевтического лечения, на 3 и 21 сутки после введения 1 курса химиотерапии, методом обогащения на градиенте плотности фиккол-урографина (плотность 1,077 г/см³) получены мононуклеарные клетки. Оценка концентрации и жизнеспособности клеток (Calcein/DRAQ7) проведена с помощью проточной цитофлуориметрии (Cytotflex, Beckman Coulter, США). С помощью таргетной панели Immune Response по технологии Rhapsody Express (Becton Dickinson, США) подготовлены РНК библиотеки с последующим секвенированием на платформе NextSeq 2000 (Illumina, США). Биоинформатический анализ данных выполнен с применением пакетов программ Seurat и SingleR.

Результаты: В пуле мононуклеарных клеток периферической крови идентифицированы ключевые популяции: В клетки (CD79⁺), NK клетки (KIR2DL⁺), моноциты (CD14⁺), Т-цитотоксические клетки (CD8⁺), Т хелперы (CD4⁺), а также их клетки-предшественники. На 3 сутки после НАХТ наблюдалась гиперэкспрессия генов *VAX*, *CXCR4* и *CD69*, опосредующих апоптоз лимфоцитов и NK клеток, хемотаксис и пролиферацию лимфоцитов; в крови селективно истощалась популяция моноцитов (до 1%). На 21 сутки после НАХТ наблюдалась гиперэкспрессия генов *CD14*, *S100A9*, *CXCL8*, *CCL4*, *CCL5* и др., опосредующих выход моноцитов в кровь, миграцию их в ткани, хемотаксис иммунных клеток и воспаление; в крови увеличивалась популяция моноцитов (до 38%), уменьшалась популяция Т и NK клеток.

Вывод. Химиотерапия влияет на количественный и качественный популяционный состав мононуклеаров и изменяет транскриптомный профиль моноцитов в сторону провоспалительной активации.

Благодарность: Исследование поддержано грантом РФФИ №22-75-10128

Полиморфизм G894T гена эндотелиальной синтазы оксида азота у пациентов с саркоидозом Бека

Глуткина Н.В.^{1*}, Зинчук Вл.В.²

¹ УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

² УЗ «Гродненская университетская клиника», Гродно, Беларусь

* glutkina@mail.ru

Ключевые слова: саркоидоз; генотип

Цель работы: оценка распределения частот аллелей и генотипов полиморфизмов G894T гена эNOC-3 у пациентов с саркоидозом Бека.

Метод. Объектом исследования были 30 пациентов с саркоидозом Бека, не получавшие патогенетической терапии. Забор крови выполнялся локтевой вены в состоянии покоя в шприц. Определение полиморфизма G894T гена эндотелиальной синтазы оксида азота проводили методом полимеразной цепной реакции на амплификаторе Rotor Gene-Q (Qiagen, Германия). Дискриминацию аллелей осуществляли средствами программного обеспечения амплификатора, в основе которых лежит зависимость интенсивности флуоресценции соответствующего красителя от количества копий исследуемого участка гена. Статистический анализ осуществляли с помощью программного обеспечения Statistica 10.0 (StatSoft). Распределение генотипов изучаемого полиморфного локуса проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга по критерию χ^2 Пирсона. При нормальном распределении количественных признаков статистическую значимость различий оценивали по t-критерию для независимых выборок, данные описывали: среднее \pm стандартное отклонение. При распределении, отличающемся от нормального, статистическую значимость различий определяли по критерию Манна-Уитни. Результаты представляли в виде: медиана [25 перцентиль; 75 перцентиль]. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результат: была проведена оценка распределения частот аллелей полиморфизмов G894T гена эNOC-3 у пациентов саркоидозом. Распределение полиморфных вариантов изучаемого гена в данной выборке не отклоняется от равновесия Харди-Вайнберга, что свидетельствует об отсутствии сторонних влияний (мутации, дрейф генов, не случайное скрещивание) на генетическую структуру данной выборки. При оценке встречаемости генотипов полиморфизма G894T у обследуемых лиц нами было выявлено, что гомозиготный доминантный генотип (GG) имеется у 56,7% выборки. Гетерозиготный генотип изучаемого полиморфизма был определен у 36,7% тестируемых лиц. Частота встречаемости рецессивного гомозиготного генотипа (TT) у данного контингента составляет всего 6,6%. Результаты свидетельствуют, что в данной выборке генотип TT встречается в 8,5 раза реже, чем генотип GG, и в 5,5 раза реже, чем генотип GT. Можно предположить, что в условиях стресса, эти различия могут быть более выражены и иметь значения для определения должного уровня функциональных резервов организма. В частности, нами было показано, что полиморфизм G894T гена эндотелиальной синтазы оксида азота участвует в формировании прооксидантно-антиоксидантного баланса и кислородтранспортной функции крови, а при нарушении кислородного обеспечения организма может иметь значение для развития окислительного стресса.

Саркоидоз является распространенным системным воспалительным заболеванием неизвестной природы, имеющим множество клинических масок: от бессимптомных до серьезных поражений различных органов и систем, для которого характерен типичный гранулематозный характер воспаления, возникающий в генетически восприимчивом организме под действием триггеров окружающей и внутренней среды, обладающих антигенными свойствами [Визель А.А. и др., 2021]. Значимость этой патологии в настоящее время определяется повышением его частоты, обусловленное возрастающей урбанизацией населения, тяжелым прогрессирующим течением, для которого в наибольшей степени известны легочные манифестации саркоидоза, но многообразие его клинических проявлений свидетельствует о

системном характере заболевания, что связано с его патогенезом, с широким кругом как проявлений гранулематозного воспаления, так и неспецифических (метаболических, аутоиммунных) синдромов [Французевич Л.Я. и др., 2021].

Регуляция гена эНОС-3 представляет собой сложный процесс, в результате которого конечная концентрация этого фермента является следствием действия многих факторов, включая активность промоторного ответа, действие факторов, обеспечивающих различный период полужизни мРНК, регуляцию экспрессии в ответ на различные физиологические стимулы [Кравченко Н.А., Ярмыш Н.В., 2008].

В нашем исследовании установлено, что распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов G894T гена эндотелиальной NO-синтазы в исследуемой популяции сопоставимы с данными других регионов. Особенности полиморфизмов указанного гена необходимо учитывать при оценке клинического статуса данного контингента и аэробных возможностей. Кроме того, следует обозначить важным определению содержания метаболитов NO в крови при этой патологии. Выявление определенных взаимосвязей между состоянием L-аргинин-NO системы и течением саркоидоза дает надежду на то, что последующие расширенные исследования позволят получить более убедительные результаты в этом аспекте.

Выводы: Полученные результаты указывают, что распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов G894T гена эндотелиальной NO-синтазы в исследуемой популяции сопоставимы с данными других регионов. Особенности полиморфизмов указанного гена необходимо учитывать при оценке клинического статуса данного контингента и аэробных возможностей.

Ссылки

1. Визель А.А., Горблянский Ю.Ю., Илькович М.М. и др. Фиброзирующий саркоидоз: от понимания к перспективе лечения. *Практическая пульмонология*. 2021;1:61–73.
2. Кравченко Н.А., Ярмыш Н.В. Регуляция экспрессии эндотелиальной NO-синтазы и дисфункция сосудистого эндотелия при сердечно-сосудистой патологии. *Цитология и генетика*. 2008;42(4):69–80.
3. Французевич Л.Я., Бобков А.П., Джайн М. и др. Фенотипирование ангиотензин-1-превращающего фермента у пациентов с системными проявлениями саркоидоза. *Лечебное дело*. 2021;2:78–87.

Влияние экспрессии гена β -субъединицы геранилгеранилтрансферазы I на формирование многоклеточного таллома *Marchantia polymorpha*.

Джабраилова С.М.^{1*}, Шарипова М.Р.¹, Валеева Л.Р.¹

Институт Фундаментальной медицины и биологии, КФУ, Казань, Россия

* penguinaz00@gmail.com

Ключевые слова: пренилирование, многоклеточность, *Marchantia polymorpha*, печеночные мхи

Цель работы: определить влияние экспрессии гена β -субъединицы геранилгеранилтрансферазы I на формирование многоклеточного таллома печеночного мха *Marchantia polymorpha*.

Переход к многоклеточному плану организации – один из наиболее значимых этапов в эволюции - происходил независимо по меньшей мере в 25 разных группах организмов [Niklas, 2014]. Среди эукариот первой группой многоклеточных стали растения: многоклеточные красные водоросли (Rhodophyta) возникли около 1.6 млрд лет назад. Однако, механизмы, обеспечивающие регуляцию развития многоклеточного организма, наиболее хорошо изучены на примере животных. Это объясняется, в частности, тем, что все многоклеточные животные предположительно произошли от общего одноклеточного предка. В отличие от животных, в царстве Растений переход к многоклеточности происходил шесть раз, что осложняет изучение механизмов этого перехода [Coates et al., 2015].

Формирование сложноорганизованных многоклеточных структур регулируется различными процессами на геномном, молекулярном и клеточном уровнях, включая полярный рост клеток, пролиферацию, миграцию клеток, клеточную трансдукцию межклеточную адгезию, межклеточную коммуникацию. В свою очередь, все перечисленные механизмы регулируются множеством белков, в том числе Rho ГТФазами и G-белками, многие из которых подвергаются специфической посттрансляционной модификации – пренилированию. Пренилирование, или липидирование, путем присоединения пренильных остатков (фарнезила и геранилгеранила), обеспечивает приобретение белками новых свойств, в том числе способности интегрироваться в липидные мембраны клеток. Тем самым, пренилирование белковых молекул является одной из ключевых посттрансляционных модификаций [Running, 2014]. Механизмы пренилирования консервативны для всех эукариот, в том числе и для растений. Было показано, что пренилтрансферазы играют важную роль в регуляции роста, развития и ответа на абиотические и биотические стрессовые факторы у растений, в том числе у бриофитов (зеленые и антоцеротовые мхи, печеночники) – эволюционно наиболее древней группы наземных растений. *Marchantia polymorpha* является одним из наиболее хорошо изученных представителей класса печеночников и перспективным модельным организмом для изучения молекулярно-генетических аспектов развития растений, обусловленным филогенетическим расположением, быстрым ростом, сравнительно небольшими размерами генома, а также наличием отработанных методов молекулярной биологии и генетики.

Методы: Методом редактирования генома CRISPR/Cas9 нами были получены линии *M. polymorpha* с нокаутированным геном β -субъединицы (GGB) геранилгеранилтрансферазы I (PGGT I). На основе нокаутных линий растений *M. polymorpha* путем агробактериальной трансформации были получены растения-комплементанты с восстановленным фенотипом растений дикого типа, экспрессирующие ген GGB, сопряженный с геном флуоресцентного белка-метчика (Citrine или tdTomato). Наличие полноразмерных вставок генов ggb и флуоресцентного белка подтверждали секвенированием. Далее провели масс-спектрометрический анализ протеома растений-мутантов Δ GGB и растений дикого типа. Биоинформационный анализ с использованием баз данных NCBI дифференциально экспрессирующихся белков позволил выявить их функции,

локализацию в клетке, способность подвергаться пост-трансляционным модификациям, в частности, пренилированию, а также распространенность среди различных таксономических групп растений.

Результаты: Растения-нокауты сохраняли жизнеспособность и многоклеточное строение, однако не образовывали характерный дорсо-вентральный таллом и состояли из нетипичных округлых клеток, собранных в плотные каллусоподобные структуры. Мы предполагаем, что данный фенотип обусловлен нарушениями в процессе пренилирования белков-мессенджеров. При проведении масс-спектрометрического анализа было обнаружено 12 белков, характерных для растений дикого типа, и 36 белков, характерных для растений-нокаутов *ΔGGB*. Было показано, что как мутанты, так и растения дикого типа экспрессируют белки, задействованные в процессах фотосинтеза, биосинтеза белка и ответа на стресс, такие как лектины и герминоподобные белки. Однако в отличие от растений дикого типа, у мутантных растений отсутствуют фасциклин-подобные белки, отвечающие за регуляцию роста и развития растения, и слабо представлены сингальные белки.

Выводы: Таким образом, мы обнаружили, что прекращение активности β -субъединицы геранилгеранилтрансферазы I приводит к нарушению организации таллома растений *M. polymorpha*, что может быть связано с изменением активности пренилируемых белков-мессенджеров.

Благодарность: Исследование выполнено при поддержке стипендии Президента СП-3391.2021.4.

Ссылки

1. Coates, J. Understanding “green” multicellularity: Do seaweeds hold the key? [Text] / J. Coates, E. Umm, B. Charrier. // *Frontiers in Plant Science*. – 2015. – V. 5. – P. 1-6..
2. Niklas, K. J. The evolutionary-developmental origins of multicellularity. // *American Journal of Botany* – 2014. – V. 101. – P. 6 – 25.
3. Running, M.P. The role of lipid post-translational modification in plant developmental processes. // *Front Plant Sci*. – 2014. – V. 5. – P. 1 – 9.

Бакуловирусовая экспрессия белков. Механизм работы и применение

Джапарова Анастасия Геннадьевна^{1*}

¹ ГАОУ ВО ЛО «ЛГУ им.А.С. Пушкина», ВНИИ защиты растений

* nastyadzh@mail.ru

Ключевые слова: Бакуловирусовая экспрессия белков, рекомбинантные бакуловирuсы, заражение насекомых, инфицирование клетки, доставка гена, рекомбинантный белок.

Цель работы: Определить механизм бакуловирусовой экспрессии, сформировать представление об этом методе, продвинуть его в научной среде и сформировать интерес к применению в исследованиях.

Метод: анализ иностранной литературы, анализ современных отечественных статей и исследований.

Результат: В ходе работы было рассмотрено семейство патогенных вирусов для членистоногих, преимущественно для насекомых, их строение и взаимодействие с клетками. [1] Была показана безопасность для человека. В клетках млекопитающих не транскрибируются гены бакуловирuсов, потому что нет нужного промотора, репликация не происходит, не образуются нуклеокапсиды. [2] На основе таких свойств существует система экспрессии (БЭС) - метод получения рекомбинантного белка, путем заражения клеточных линий насекомых специальными бакуловирuсами. Для этого существует три методики. Во-первых, используют трансфекцию насекомых. Этот метод является наиболее трудоемким, так как необходима дополнительная очистка рекомбинантного вируса. Во-вторых, можно использовать клетки бактерий, таких как *Escherichia coli*. Этот метод является наиболее популярным. Как и в первом случае, происходит процесс поглощения свободной молекулы ДНК из среды и встраивание. Однако это все происходит в бактериях. В-третьих, можно использовать рекомбинацию *in vitro*. В этом случае происходит сайт-специфическая рекомбинацию, когда обмен происходит в определенных участках генома и не требует большого сходства с бакуловирусовой ДНК. [3] [4]

Также в работе были предоставлены материалы о уже существующем применении БЭС. Оно активно используется в медицинских исследованиях, для создания лекарств от рака (выделение веществ, предотвращающих распространение и рост опухоли [5], вызывающие апоптоз-самоуничтожение раковых клеток [6], предотвращающие метастазирование [7]), выделения необходимых для человека белков (β -интерфероны [8], белки коннексины [9] и пептиды эндотелины [10]), или конструирование вирусоподобных частиц для вакцин (грипп [11], гепатит Е [12] и бешенства [13]).

Вывод: Бакуловирусовая экспрессия является безопасной и удобной системой для выделения сложных белков. Этот метод является очень перспективным. Хочется верить, что в скором времени бакуловирусовая экспрессия будет очень известна и популярна в российском медиа.

Ссылки

1. Murray Moo-Young. Comprehensive Biotechnology. // 2011. С.324-325.
2. Абдурахманов Ж.М. Аширов О.Н. Азимова Ш.С. Бакуловирусовая система экспрессии, как безопасная и эффективная система для получения рекомбинантных белков. // Молекулярная биология. 2019. С.1-4.
3. Белжеларская С. Н. Бакуловирусовые системы экспрессии рекомбинантных белков в клетках насекомых и млекопитающих. // Молекулярная биология. 2011. Том 45. № 1. С. 142-159.
4. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение // 2002. С.144-150.
5. Kinoshita Y., Hua J., Masuda A. Expression and purification of biologically active human granulocyte macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) using silkworm baculovirus expression vector system. // Protein Expression and Purification. 2019. P. 69-74.
6. Эдельвейс Э.Ф., Баландин Т.Г., Мишин А.В., Горделий В.И. Бакуловирусовая экспрессия коннексина 26 в клетках насекомых Sf9. // Труды 53-й научной конференции МФТИ. 2010. С. 39-40
7. Fan M., Zhang G. Siglec-15 Promotes Tumor Progression in Osteosarcoma via DUSP1/MAPK Pathway. // Original research article. 2021. С.34-39

8. Вагина И.Н., Анопrienко О.В., Захарук Е.А., Строковская Л.И. Перенос гена β -интерферона в клетки млекопитающих рекомбинантным бакуловирусным вектором. // 2002. С. 219-224.
9. Эдельвейс Э.Ф., Баландин Т.Г., Мишин А.В., Горделий В.И. Бакуловирусная экспрессия коннексина 26 в клетках насекомых Sf9. // Труды 53-й научной конференции МФТИ. 2010. С. 39-40.
10. Мишин А. В. Получение и стабилизация рекомбинантного человеческого эндотелинового рецептора. // Диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук. 2016. С. 25-27.
11. Петухова Н.В. , Иванов П.А., А.И. Мигунов А.И. Вирусоподобные частицы – новая стратегия для создания противогриппозных вакцин. // Проблемы вирусологии Российский журнал. 2013. С. 10-14.
12. Гордейчук И.В. Вакцины против гепатита Е. // В мире вирусных гепатитов. 2014. С.6 -19.
13. Astray R.M., Pereira C.A. Production of Rabies VLPs in Insect Cells by Two Monocistronic Baculoviruses. // 2021 Molecular Biotechnology. 2021. P.1-13.

Разнообразие и дифференциальная экспрессия микроРНК в скелетных мышцах человека с различным соотношением быстрых и медленных волокон

Желанкин А.В.^{1*}, Юльметова Л.Н.¹, Генерозов Э.В.¹

¹ Лаборатория молекулярной генетики человека, ФГБУ ФНКЦ Физико-химической медицины ФМБА России
* zhelankin.andrey@gmail.com

Ключевые слова: скелетные мышцы, микроРНК, мышечные волокна, транскриптом, секвенирование

Соотношение быстрых и медленных волокон в разных скелетных мышцах человека достаточно вариабельно и во многом детерминируется на генетическом уровне. Быстрые и медленные волокна различаются как морфологически, так и по белковому и транскриптомному профилям. В данном исследовании мы использовали высокопроизводительное секвенирование малых РНК для изучения вклада микроРНК в состав волокон скелетных мышц.

В исследование были включены десять мужчин-спортсменов в возрасте до 40 лет, которые дали письменное информированное согласие на участие в данном исследовании. Спортсмены были разделены на две группы на основе соотношения типов волокон скелетных мышц и типа тренировочной деятельности. В первую группу (*type1*, $n = 5$) вошли спортсмены на выносливость (стайеры) с преобладанием медленных мышечных волокон. Вторая группа (*type2*, $n = 5$) включала силовых атлетов или спринтеров с преобладанием быстрых мышечных волокон. Образцы ткани латеральной широкой мышцы бедра (*vastus lateralis*) были получены с помощью биопсии иглой Бергстрема с аспирацией под местной анестезией 2% раствором лидокаина. Образцы биопсии немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C . Площадь поперечного сечения волокон (*CSA*, *fiber cross-sectional area*) для быстрых и медленных волокон оценивали после иммуногистохимического окрашивания участка ткани первичными антителами к изоформам тяжелой цепи миозина (*MHC*, *myosin heavy chain*). Малые РНК выделяли из образцов тканей с помощью набора *miRNeasy Mini Kit* (*Qiagen*, Германия). Библиотеки для секвенирования малых РНК готовили с помощью набора *NEBNext Small RNA Library Prep Set for Illumina* (*New England Biolabs*, США). Библиотеки секвенировали с помощью системы *MiSeq* (*Illumina*, США) с 50 циклами в режиме одноконцевых прочтений. Для анализа микроРНК были отобраны прочтения с длиной от 16 до 28 нуклеотидов со средним количеством по всем образцам более 2 и присутствующие как минимум в 10% образцов. С помощью программы *QuickMIRSeq* прочтения после обрезки адаптеров были выровнены на базу данных микроРНК, и были рассчитаны значения экспрессии микроРНК в *CPM* (*counts per million*). Транскриптомы были предварительно получены для всех образцов с помощью секвенирования РНК, очищенной от рибосомальной РНК.

Среднее количество прочтений на образец составило 1,09 млн (от 0,91 до 1,53 млн). В среднем, 95% прочтений приходилось на микроРНК. Общее количество детектированных микроРНК в образце составило от 346 до 399. Однако, порядка 80% прочтений приходилось на одну высокопредставленную микроРНК, специфичную для мышечной ткани, *miR-1-3p*.

Анализ главных компонент (*PCA*) на основе данных секвенирования микроРНК показал, что образцы из двух групп образуют два разных кластера на графике *PCA P1-P2*. Повышение уровней *miR-206*, *miR-501-3p* и *miR-185-5p* и понижение уровней *miR-499a-5p* и *miR-208-5p* было обнаружено в группе с преобладанием быстрых волокон по сравнению с группой с преобладанием медленных волокон (*quasi-likelihood F-test* в *EdgeR*, $p < 0,05$ и $\log_2FC > 1$). Четыре из этих микроРНК происходили от митронов – участков интронов генов, несущих гены микроРНК, и две из них (*miR-208b-3p* и *miR-499a-5p*) имели сильные корреляции в экспрессии со своими генами-носителями (*MYH7* и *MYH7B*, соответственно). Мишени матричной РНК (мРНК) были найдены для микроРНК со средним значением *CPM* ≥ 20 по данным базы *miRTarBase*, учитывая

взаимодействия, которые были экспериментально подтверждены по крайней мере тремя методами. Корреляции между экспрессией миРНК и их генов-мишеней рассчитывались на основе значений *CPM*. Было выявлено 26 взаимодействий микроРНК-мРНК с высокой корреляцией. Примечательно, что три из этих взаимодействий принадлежали *miR-206*, что указывает на ее регуляторные связи с экспрессией генов *ESR1*, *NR1H3* и *ANXA1*. Была построена сеть взаимодействий между дифференциально экспрессированными микроРНК и их генами-мишенями.

Таким образом, совместный анализ микроРНК и транскриптомов в образцах скелетных мышц человека с различным составом волокон позволил описать разнообразие микроРНК, их дифференциальную экспрессию и потенциальные взаимодействия с их генами-носителями или генами-мишенями. Профили микроРНК различались между образцами с преобладанием быстрых или медленных волокон. Пять выявленных дифференциально экспрессированных микроРНК можно разделить на три группы: микроРНК, экспрессия которых положительно коррелировала с генами-носителями; микроРНК, экспрессия которых не коррелировала с генами-носителями; и одна каноническая микроРНК, экспрессия которой коррелировала с некоторыми из их целевых мРНК. В основном, изменения в экспрессии микроРНК между группами можно объяснить изменениями в транскриптоме, а не наоборот. Для примерно двухсот генов, которые были дифференциально экспрессированы между группами, не было обнаружено четких доказательств влияния микроРНК на экспрессию их целевых мРНК.

Анализ экспрессии генов гемоглобинов в псаммореобионтных комарах-звонцах '*Orthoclaadiinae acuticauda*' и *Robackia demeijerei* (Diptera, Chironomidae)

Ковалевская К.М.^{1*}, Шайхутдинов Н.М.^{2,3}, Гоголева Н.Е.² Козлова О.С.², Газизова Г.Р.², Шагимарданова Е.И.², Поздеев И.В.⁴, Пржиборо А.А.⁵, Гусев О.А.^{2,6}

¹ НЦ «Регуляторная геномика», ИФМиБ КФУ, Казань, Россия

² НИЛ «Экстремальная биология», ИФМиБ КФУ, Казань, Россия

³ Центр наук о жизни, Сколковский институт науки и технологий, Россия

⁴ Пермский филиал ФГБНУ «ВНИРО», Пермь, Россия

⁵ Зоологический институт РАН, Москва, Россия

⁶ Университет Джунтэндо, Центр интегративных медицинских наук RIKEN

* tinagrechka@gmail.com

Ключевые слова: комары-звонцы, поиск гемоглобинов, псаммореобионты, экспрессия генов

В ходе данной работы был проведен анализ транскриптомов и найдены последовательности гемоглобинов, характерные для '*O. acuticauda*', *R. demeijerei*, *P. tamanigrum* и *P. tonnoiri*. Поиск проводился с использованием в качестве референса гемоглобинов экстремофильного галотолерантного комара-звонца *Baeotendipes noctivagus*. Выравнивание строилось алгоритмом MAFFT, построение филогенетических деревьев выполнено программой MEGA11. По результатам работы мы обнаружили, что количество гемоглобинов в анализируемых видах меньше, чем в референсном виде - 19 и 22 по сравнению с 46 у *B. noctivagus*. Это может свидетельствовать об адаптации изучаемых реофильных комаров-звонцов к богатой кислородом среде. Также нами был проведен анализ экспрессии генов гемоглобинов в контрольных условиях и в условиях теплового шока на личиночной стадии в обоих видах псаммореофильных комаров, а также в остальных исследуемых видах, кроме референсного, на основе данных полиА РНК-секвенирования, полученных с помощью Illumina HiSeq2500 секвенатора.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 20-44-07002 и Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

Гетероплазмия митохондриальной ДНК как один из факторов старения и взаимосвязанные терапевтические маркеры здорового старения

Козенков И.И.1*, Татаркина М.А. 1, Лобанова В.В. 1, Попадьян К.Ю.1, 2, Ефименко Б.Э.1

¹ Центр геномных исследований, БФУ им. И. Канта, Калининград, РФ

² Федеральная политехническая школа Лозанны, Лозанна, Швейцария

* ivankozenkov@gmail.com

Ключевые слова: митохондрия, гетероплазмия, эгоистичные мутации, мутационный спектр, здоровое старение

Цель работы: Провести анализ ассоциаций генетических маркеров (гетероплазмия митохондриальной ДНК) с фенотипическими и психоневрологическими маркерами здорового старения. Среди множества возможных движущих сил старения митохондриальный геном выделяется как возможный главный драйвер, так как он управляет процессом формирования митохондриальных соматических мутаций, что, в свою очередь, приводит к проявлению основных фенотипических признаков старения — нейродегенерации и мышечной дистрофии. В совокупности сочетание высокой скорости мутаций и внутриклеточного отбора может привести к тому, что митохондриальный геном с возрастом станет более «опасным» (реактивным) и накопит эгоистичные мутации. Непролиферирующие (постмитотические) ткани наиболее уязвимы для таких эгоистичных мутантов. Митохондриальные соматические делеции в нейронах и клетках скелетных мышц накапливаются с возрастом у всех людей и поэтому связаны с нормальным процессом старения (здоровым старением), характеризующимся общим ослаблением умственных и физических возможностей человека. Митохондриальные соматические делеции (как и другие варианты гетероплазмии) вредны, но даже в здоровой популяции существует огромная вариабельность возраста, в котором впервые проявляется фенотипический порог гетероплазмии мтДНК, и скорости ее распространения: у кого-то первая делеция становится обнаруживаемой в 20 лет, у кого-то в 60 лет ; у одних людей делеции чрезвычайно быстро размножаются и в конечном итоге приводят к гибели клетки-хозяина всего за 10 лет, у других этот процесс дегенерации растягивается более чем на 50 лет.

Метод: Выборка из 300 человек в возрасте старше 45 лет, биопсийная экстракция мышечной ткани из коленного или бедренного суставов, выделение и обогащение фракции митохондрий из мышечной ткани, выделение митохондриальной ДНК, глубокое секвенирование мтДНК на платформах Illumina MiSeq и BGI, биоинформатический анализ данных секвенирования и экстракция данных о гетероплазмии, статистическая корреляция с фенотипическими и психоневрологическими маркерами здорового старения.

Результат: Анализ массива данных по гетероплазмии в мтДНК и связанных с ними данных нейропсихиатрических тестов у 300 пациентов с широким фенотипическим описанием (образ жизни, физическая и умственная активность, вид труда - тяжелый, легкий, вредный или стрессовый) показал, что некоторые терапевтические маркеры лучше коррелирует с возрастным процессом старения, а не ассоциированным с болезнью.

Выводы: Предложенные фенотипические маркеры здорового старения могут служить надежной и селективной диагностикой в исследовании заболеваний, связанных с возрастными нарушениями физиологии. Предложенные терапевтические маркеры могут служить надежным и селективным диагностическим инструментом, коррелирующим с уровнем гетероплазмии в мышечной ткани пожилых людей.

Благодарность: Исследование поддержано грантом РФФ 21-75-20145 «Поиск и анализ детерминант соматической митохондриальной гетероплазмии пожилых людей».

Высокопроизводительное клонирование плазмиды pUC19 как универсальный метод оценки копийности митохондриальной ДНК в ходе исследования процессов старения.

Козенкова Е.И.^{1*}, Татаркина М.А.¹, Лобанова В.В.¹, Скрипская В.В.¹, Гончаров А.Г.¹

¹ Центр геномных исследований, Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Калининград, РФ

* ekozenkova1@gmail.com

Ключевые слова: митохондрия, гетероплазмия, мутационный спектр, здоровое старение

Цель работы: Создание стандарта копийности мтДНК - плазмиды pUC19 со вставками генов из ядерного (b-actin) и митохондриального (TRNF) человеческого генома с целью оценки копийности при проведении анализа ПРЦ в реальном времени при работе с выявлением гетероплазмии митохондриальной ДНК при старении. В данном исследовании использовалась плазида pUC19, в которую были последовательно заклонированы гены b-actin и TRNF.

Метод: Участок b-actin был выделен из человеческой ядерной ДНК и амплифицирован с помощью ПЦР, вырезан и очищен из агарозного геля после электрофореза и вставлен в плазмиду pUC19 по сайтам рестрикции BamHI и EcoRI. TRNF был выделен из человеческой митохондриальной ДНК и амплифицирован с помощью ПЦР, вырезан и очищен из агарозного геля после электрофореза и вставлен в плазмиду pUC19 по сайтам рестрикции HindIII и XbaI. Данные, полученные с помощью нескольких различных методов (флуориметрическое определение концентрации ДНК с интеркалирующим красителем, ПЦР в реальном времени, гель-электрофорез и денситометрия геля) хорошо коррелируют между собой.

Результат: получена плазида pUC19 с заклонированными генами ядерного и митохондриального человеческого генома для дальнейшей оценки копийности митохондриальной ДНК при старении.

Выводы: в ходе эксперимента получена плазида pUC19 с заклонированными генами ядерного и митохондриального человеческого генома для дальнейшей оценки копийности митохондриальной ДНК при старении.

Благодарность: Исследование поддержано грантом «Поиск и анализ детерминант соматической митохондриальной гетероплазмии пожилых людей», (21-75-20145).

Первая сборка генома психротолерантного фитопатогенного гриба *Microdochium nivale*

Маренина Е.А.^{1*}, Церс И.Д.¹, Ткаченко А.А.², Потапенко Е.В.^{3,4}, Мураева О.А.⁵, Гоголева Н.Е.¹, Гоголев Ю.В.¹, Горшков В.Ю.¹

¹ Федеральный Исследовательский Центр Казанский Научный Центр Российской Академии Наук, Казань, Россия

² Лаборатория «Компьютерные технологии», Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

³ Институт Эволюции, Университет Хайфы, Хайфа, Израиль

⁴ Кафедра эволюционной и экологической биологии, Университет Хайфы, Хайфа, Израиль

⁵ Институт Биоинформатики, Санкт-Петербург, Россия

* ekat.marenina@gmail.com

Ключевые слова: гибридная сборка генома, снежная плесень, *Microdochium nivale*, факторы вирулентности

Цель работы: сборка и аннотация генома высоковирулентного штамма психротолерантного фитопатогенного аскомицета *Microdochium nivale*. Этот гриб вызывает вредоносное заболевание розовая снежная плесень озимых зерновых культур. В многоснежные годы это заболевание может приводить к потере до 70% урожая. В нашем исследовании мы применили гибридную сборку на основе прочтений Oxford Nanopore и Illumina для расшифровки и аннотации первой последовательности генома *M. nivale*. Аннотированные гены этого гриба были классифицированы в метаболические пути для выяснения генетического потенциала *M. nivale* к синтезу факторов вирулентности и опасных для человека микотоксинов.

Методы: Подготовка библиотек для секвенирования проводилась по стандартным протоколам. Полученные прочтения Nanopore и Illumina были отфильтрованы по минимальной длине и качеству с помощью Nanofilt и FastQC, MultiQC, fastp, соответственно. Геном *M. nivale* был собран с помощью ассемблера Canu v.1.8. Смежность и полнота сборки оценивались с помощью QUAST и BUSCO, соответственно. Границы транскриптов мРНК определяли с помощью картирования прочтений Illumina RNA-Seq. Функции белков *M. nivale* были предсказаны с помощью программы Mantis с использованием наборов скрытых марковских моделей эталонных белков *Ascomycota* из баз данных PFAM, TCDB, NCBI и KEGG. Информация из баз данных GO, KEGG, KOG и CAZy была объединена с аннотацией генов *M. nivale* и использована для автоматической классификации генов по функциональным категориям с помощью языка программирования R. Объединенная классификация на основе вышеупомянутых баз данных была создана, проверена и отредактирована вручную.

Результат: С помощью гибридной сборки на основе прочтений Oxford Nanopore и Illumina расшифрована нуклеотидная последовательность генома *M. nivale*. Размер генома составил 37 029 846 п.н., которые были распределены по 16 скаффолдам, 12 из которых были длиннее 1 Мб. С помощью картирования ридов, соответствующих транскриптам генов *M. nivale*, а также с помощью предсказания генов, кодирующих тРНК и рРНК, в сборке генома выявлено 11 963 гена (в том числе 11 788 генов, кодирующих белки). Чтобы лучше понять генетический потенциал *M. nivale* и получить удобную референсную последовательность для транскриптомных исследований этого вида, идентифицированные гены были аннотированы и разделены на иерархические трехуровневые функциональные категории. С использованием РНИ-base в геноме *M. nivale* были идентифицированы продукты генов, которые лучше всего соответствуют критериям факторов вирулентности. В эту категорию вошли секретлируемые белки и микотоксины, такие как фузонизин, охратоксин В, афлатоксин и глиотоксин.

Выводы: Проведена сборка и аннотация последовательности генома *M. nivale*. Выявлены гены, продукты которых, по всей вероятности, определяют вирулентность исследуемого фитопатогена. Обнаружены метаболические пути *M. nivale*, отвечающие за синтез опасных для человека микотоксинов.

Благодарность: Работа выполнена при поддержке государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.

Экспрессия белка DNMT3A1

Мишина Е.Н.¹ *

¹ Центр Нейронаук, Кембриджский Центр Международного Исследования, Москва, Россия

*mishinaelnik1408@mail.ru

Ключевые слова: нейрон, мозг, ингибитор, DNMT3A1

Цель работы: Анализ влияния ингибиторов АПФ и Ифенпродил на экспрессию белка DNMT3A1 в клетках головного мозга. В экспериментальных условиях нейроны, культивированные из гиппокампальной области мозга, обрабатывались препаратами АПФ или Ифенпродил.

В случае синаптической стимуляции или без нее мы либо применяли ингибиторы при активации нейронов, либо же оставляли их нетронутыми.

Метод: Мы разделили нейроны на 8 групп: Контрольная группа АПФ\ без АПФ; Контрольная группа Ифенпродил\ без Ифенпродила; Стимуляция АПФ\ без АПФ; Стимуляция Ифенпродил\ без Ифенпродила. Вводя такие ингибиторы, мы вызывали синаптическую стимуляцию, которая заставляет нейроны быть более активными за более короткий промежуток времени. Затем мы сравнивали активные нейроны с их базальным состоянием, или неврологическим состоянием без лечения, чтобы лучше понять синаптическую стимуляцию.

Результат: Эксперимент показал, что работа АПФ и Ифенпродил несколько отличается. АПФ полностью подавляет работу NMDA-рецепторов, тогда как Ифенпродил лишь частично замедляет работу NMDA-рецепторов

Выводы: Такие результаты могут быть связаны с тем, что после стимуляции глутамат-связывающей части NMDA-рецепторов полностью блокируется АПФ. В то же время Ифенпродил блокирует только субъединицы GluN1 и GluN2B NMDA-рецептора, следовательно, ингибируя лишь часть подтипа NMDA-рецепторов.

Благодарности: Я хотел бы поблагодарить доктора Gonca Bayraktar за то, что она наставляла меня на протяжении всего процесса исследования, а также позволила мне использовать снимки нейронов для дальнейшего анализа и графической модификации в научном программном обеспечении.

Ссылки

1. Gonca Bayraktar et al. Synaptic control of DNA methylation involves activity-dependent degradation of DNMT3A1 in the nucleus. *Neuropsychopharmacology* (2020) 0:1–11.
2. Gonca Bayraktar and Michael R. Kreutz. Neuronal DNA Methyltransferases: Epigenetic Mediators between Synaptic Activity and Gene Expression? *The Neuroscientist* (2017);1 –15

Использование современных сверточных архитектур нейронных сетей для предсказания экспрессии гена по последовательности промотора

Пензар Д.Д.^{1,2*}, Ногина Д. С.¹, Мещеряков Г.³, Зинкевич А.¹, Кулаковский И.В.³

¹ Группа биоинформатики, Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. Ломоносова, Москва, Россия

² Лаборатория системной биологии, ИОГЕН РАН, Москва, Россия

³ Группа регуляции биосинтеза белка, Институт белка РАН, Пушкино, Россия

* dmitrypenzar1996@gmail.com

Ключевые слова: регуляция экспрессии гена, сверточные нейронные сети, массовый параллельный эксперимент с репортерами

Цель работы: построить модель на основе машинного обучения для предсказания уровня экспрессии гена по его промоторной последовательности.

Методы: В работе использовались данные конкурса DREAM 2022 по предсказанию экспрессии гена с использованием данных по активности миллионов промоторных последовательностей [1]. Уровни экспрессии генов под контролем случайных промоторов были измерены авторами конкурса в ходе массового параллельного эксперимента с репортерами [1].

Для решения задачи предсказания экспрессии по последовательности была использована архитектура EfficientNetV2 [2], которая на начало 2022 года была признана наилучшей в задачах обработки изображений. Архитектура была адаптирована нами для работы с нуклеотидными последовательностями - блоки для работы с двумерными изображениями были заменены на блоки для работы с одномерными сигналами, было изменено количество блоков и порядок их следования. Помимо этого residual connections исходной архитектуры были заменены конкатенацией, что, как было показано для DenseNet[3], улучшает сходимость нейросети и помогает работать с шумными данными.

Последовательности кодировались в одномерный сигнал при помощи однобитового эффективного кодирования. Для аугментации данных, последовательность промотора передавалась модели как в прямом, так и в обратно-комплементарном виде, с явным указанием ориентации.

Модель обучалась при помощи процедуры OneCycleLearningRate [4] с применением оптимизатора AdamW [5].

Результаты: Качество обученной модели оценивалось авторами на нескольких группах последовательностей, в том числе высоко- и низкоактивные промоторы, нативные промоторы генома дрожжей, и промоторы с однонуклеотидными заменами. Полученная нами модель заняла первое место в конкурсе, победив несколько десятков прочих решений в большинстве сценариев.

Выводы: сверточных нейронных архитектур достаточно для работы с последовательностями малого размера, при этом достижения из области работы с изображениями могут переноситься на область работы с нуклеотидными последовательностями, существенно улучшая качество получаемых моделей.

Благодарности: Исследование поддержано грантом «Аллель-специфичная доступность хроматина и генетические детерминанты патологий» (РНФ 20-74-10075).

Ссылки

1. Predicting gene expression using millions of random promoter sequences, <https://www.synapse.org/#!Synapse:syn28469146/wiki/617075>
2. Mingxing Tan, Quoc V. Le. EfficientNetV2: Smaller Models and Faster Training. Arxiv, 2104.00298
3. Huang et al., Densely Connected Convolutional Networks. Arxiv, 1608.06993
4. Leslie N. Smith. Cyclical Learning Rates for Training Neural Networks. Arxiv, 1506.01186
5. Ilya Loshchilov, Frank Hutter. Decoupled Weight Decay Regularization. Arxiv, 1711.05101

Влияние модификаций в структуре направляющих РНК на функционирование системы CRISPR/CAS9 IN VITRO*

Прохорова Д.В.^{1*}, Толстова П.О.¹, Купрюшкин М. С.¹, Довыденко И.С.¹, Переверзев И.М.¹, Пышный Д.В.¹, Степанов Г.А.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия

* prohorova1994@gmail.com

Ключевые слова: система CRISPR/Cas9, модификации направляющих РНК, N6-метиладенозин, 5-метилцитидин, псевдоуридин, фосфорилгуанидиновая группировка

Цель работы: Изучить влияние природных модифицированных мономеров и фосфорилгуанидиновых (ФГ) групп в структуре направляющих РНК на функционирование системы CRISPR/Cas9 *in vitro*. В качестве модификаций были выбраны N6-метиладенозин (m6A), 5-метилцитидин (m5C), псевдоуридин (Ψ) и ФГ-группы. Впервые были сконструированы и описаны новые химерные направляющие РНК, содержащие как единичные, так и несколько ФГ-групп. Были проведены *in vitro* эксперименты по оценке: эффективности расщепления различных ДНК-субстратов комплексами белка Cas9 с модифицированными направляющими РНК, и специфичности системы CRISPR/Cas9 при использовании модифицированных направляющих РНК.

Метод: Методом T7 транскрипции *in vitro* были синтезированы серии sgРНК и tracrРНК с разной глубиной природных модифицированных мономеров. Немодифицированные crРНК, а также химерные РНК/ДНК ФГ-модифицированные crРНК были получены с помощью твердофазного синтеза.

Для определения влияния модификаций в составе направляющих РНК на активность и специфичность системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 *in vitro*, были использованы два метода: расщепление плазмидного субстрата с последующим электрофорезом в агарозном геле или расщепление флуоресцентно меченых ДНК-субстратов с последующим анализом с помощью капиллярного гель-электрофореза. Для оценки специфичности системы CRISPR/Cas9 *in vitro* с модифицированными направляющими РНК были сконструированы и синтезированы 16 ДНК-субстратов с мисматчами в области протоспейсера, среди которых десять содержали однонуклеотидную мутацию, поочередно в позициях 1–10 протоспейсера, а остальные шесть двухнуклеотидную мутацию в области 9–20 протоспейсера, и контрольный ДНК-субстрат. Результаты были проанализированы с помощью капиллярного гель-электрофореза. Эффективность расщепления рассчитывали, как процент интегрированной площади пиков продукта по отношению к сумме пиков субстрата и продукта.

Результат: В ходе работы было установлено, что оптимизация времени реакции и глубины природной модификации направляющих РНК позволяет достичь наибольшей эффективности гидролиза модельных ДНК-субстратов. Кроме того, замена канонических нуклеотидов на их модифицированные аналоги в направляющих РНК приводит к повышению специфичности системы CRISPR/Cas9 *in vitro* по сравнению с немодифицированным вариантом. Также впервые была продемонстрирована возможность формирования каталитически активных комплексов белка Cas9 с химерными направляющими РНК, содержащими ФГ-группы. Было показано, что включение как единичных, так и нескольких фосфорилгуанидиновых группировок в РАМ-дистальном районе направляющих РНК позволяет сохранить высокую эффективность гидролиза ДНК-субстратов и увеличить точность системы CRISPR/Cas9 *in vitro*.

Выводы: Таким образом, использование природных модифицированных нуклеотидов и фосфорилгуанидиновых групп в структуре направляющих РНК позволяет контролировать активность и повышать специфичность системы CRISPR/Cas9 *in vitro*. Полученные результаты важны для разработки новых эффективных направляющих РНК, позволяющих уменьшить как цитотоксичность компонентов системы, так и неспецифические эффекты при редактировании. Фундаментальные знания о влиянии

данных модификаций в направляющих РНК на свойства системы CRISPR/Cas9 могут быть использованы для дальнейшей разработки стратегий улучшения систем геномного редактирования.

Благодарность: Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ № 21-64-00017 и государственного задания ИХБФМ СО РАН № 122022100238-7.

Гетероплазмия мтДНК в скелетных мышцах пожилых людей: почему это сложно?

Татаркина М.М.^{1*}, Лобанова В.В.¹, Ефименко Б.Э.¹, Козенков И.И.¹

¹ Центр Геномных Исследований, БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия

* tatarkina.maria.al@gmail.com

Ключевые слова: митохондрии, мтДНК, старение, скелетные мышцы, эгоистичные мутации

Цель работы: Исследование спектра соматических мутаций мтДНК в скелетных мышцах людей. Данное исследование проводилось на группе из 350 человек в возрасте от 40 до 95 лет.

Старение — это чрезвычайно сложный процесс, связанный с многочисленными фенотипами. Считается, что соматические мутации в митохондриальном геноме (мтДНК) являются одним из наиболее важных факторов старения из-за высокой скорости мутагенеза мтДНК.

Например, было показано, что вредные соматические делеции мтДНК в нейронах и скелетных мышцах накапливаются с возрастом, приводящим к нейродегенерации и мышечной дистрофии. Постмитотические ткани являются наиболее уязвимыми для соматических мутаций мтДНК из-за возможности клонального расширения эгоистичной (с вредным вариантом) мтДНК в клетке. Мы предполагаем, что соматическое мутационное бремя мтДНК может быть чувствительным маркером биологического возраста.

Методы: биопсийная экстракция мышечной ткани из коленного или бедренного суставов, выделение и обогащение фракции митохондрий из мышечной ткани, выделение митохондриальной ДНК подготовка PCR-free библиотек, секвенирование на платформе Illumina MiSeq, NovaSeq и BGI, биоинформатический анализ данных секвенирования.

Результат: Мы собрали и аннотировали 350 образцов мышечной ткани людей, для 100 из них подготовлены PCR-free библиотеки, которые были отсеквенированы на платформе Illumina NovaSeq. Мы наблюдали положительную связь между мутационным бременем мтДНК и возрастом.

Выводы: спектр соматических мутаций и их количество в мтДНК положительно коррелирует с различными фенотипами старения.

Благодарность: Исследование поддержано грантом РНФ «Поиск и анализ детерминант соматической митохондриальной гетероплазмии пожилых людей», (21-75-20145).

Экспрессионные особенности макрофагов у больных тройным негативным раком молочной железы в зависимости от статуса PD-L1

Таширева Л.А.* , Ковалев О.И., Калинин А.Ю.

НИИ онкологии, Томский НИМЦ, Томск, Россия

* tashireva@oncology.tomsk.ru

Ключевые слова: рак молочной железы, PD-L1, макрофаги

Цель работы: изучение экспрессионных характеристик макрофагов, локализованных в микроокружении опухолевых клеток у больных раком молочной железы в зависимости от статуса экспрессии белка PD-L1.

Метод: В данной работе проведено пространственное транскриптомное профилирование двух образцов рака молочной железы с наличием и отсутствием экспрессии белка PD-L1 с помощью технологии Visium 10x Genomics. Изучалась локализация M1 и M2 макрофагов и дифференциальная экспрессия генов в спотах, содержащих макрофаги.

Результат: В опухолевом микроокружении PD-L1-позитивного рака молочной железы преобладают M2 макрофаги, причем количество PD-L1-позитивных M2 макрофагов не различается по сравнению с PD-L1-негативным образцом. Большая часть макрофагов локализовались в отдалении от опухолевых клеток. Споты, содержащие PD-L1-негативные макрофаги характеризовались экспрессией гена *Slit2*. Известно, что *Slit2* увеличивает рекрутирование M1 макрофагов в опухоль и повышает способность M1 макрофагов фагоцитировать опухолевые клетки *in vitro* и *in vivo* [1].

Выводы: *Slit2* может быть перспективным иммунотерапевтическим агентом для перепрограммирования опухоль-ассоциированных макрофагов в M1 подтип, обладающий противоопухолевыми свойствами.

Благодарность: Исследование поддержано грантом Российского научного фонда (номер 20-75-10033).

Ссылки

1. Ahirwar D.K. et al. Slit2 Inhibits Breast Cancer Metastasis by Activating M1-Like Phagocytic and Antifibrotic Macrophages. *Cancer Res.* 2021;81(20):5255-5267.

Отличительные особенности биохимического состава плодов облепихи алтайской селекции

Школьникова М.Н.¹, Рожнов Е.Д.¹, Чугунова О.В.²

¹Бийский технологический институт (филиал) Алтайского государственного технического университета им. И.И. Ползунова, ²Уральский государственный экономический университет
shkolnikova.m.n@mail.ru

Ключевые слова: облепиха, селекция, сортовые особенности, биохимический состав.

Введение. В современных условиях возрастает значимость локальных растительных ресурсов, в частности, облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.), плоды которой содержат существенное количество каротиноидов, полифенолов, витаминов С, Е и других необходимых микронутриентов [1, 2].

Кустарники облепихи, обладая высокой адаптивностью к почвенно-климатическим условиям окружающей среды, произрастают естественным образом в холодных и сухих регионах по всему земному шару. Ареал естественных зарослей облепихи в РФ существенный и прерывистый на разной высоте над уровнем моря (от 1500–1700 м на Алтае и в Восточной Сибири до 3000 м на Кавказе), западной границей служит Калининградская область, восточной – Читинская. Что обуславливает значительную сортовую вариабельность по уровню зимостойкости (до минус 40 °С), срокам созревания, урожайности, биохимическому составу плодов и т. д. [3].

Признанным мировым центром по селекции облепихи является «Научно-исследовательский институт садоводства Сибири имени М.А. Лисавенко» (далее НИИ), селекционерами которого создано более 60 сортов этой культуры. Коллекция НИИ является одной из наиболее многочисленных в мире и насчитывает порядка 50 тыс. гибридных семян и более 700 сортообразцов, в геноме которых присутствуют источники из различных эколого-географических провинций, в том числе с берегов алтайских рек Катунь, Чулышман, Чуя, из регионов Бурятии и Красноярского края, Киргизии, а также ряда европейских стран. С точки зрения хозяйственно-биологических особенностей и систематической принадлежности облепиха алтайской селекции отличается от китайского и европейского генофонда. Основной подвид, встречающийся в Сибири, – это *Hippophae rhamnoides ssp. mongolica*, однако известно множество экологических форм, типов, групп, что требует решения вопросов систематики на более узком уровне [4].

В связи с этим, комплексное изучение выделенных сортообразцов является важной составляющей идентификации сортов и частью масштабной работы для успешной селекции облепихи, что обусловило цель настоящего исследования – изучение биохимического состава гибридных сортов облепихи крушиновидной алтайской селекции.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования являлись плоды облепихи крушиновидной пяти сортов районированных и выращиваемых на территории Алтайского края, собранные в период с 2011 по 2020 гг в состоянии технической зрелости на садовых НИИ, АО «Алтайвитамины».

Экспериментальные исследования проводились с использованием общепринятых стандартных методов.

Обсуждение результатов.

В табл. 1 обобщены сведения по отличительным особенностям наиболее распространенных в селекции Алтайского края сортам облепихи.

Таблица 1. Характеристика сортов облепихи алтайской селекции (составлена авторами по [5–7])

Сорт облепихи / Назначение	Средняя урожайность, т/га	Средний вес 100 ягод, г	Масличность, %	Происхождение
Ажурная / Десертный	7,0	121,0	6,2	Свободное опыление отборной формы 87-72-ба (Щербинка-1×чулышманский экотип)

Алтайская / Универсальный	16,6	74,0	5,2	Свободное опыление отборной формы 30-61-1487 (Щербинка-1×чулышманский экотип)
Иня / Технический	14,9	74,5	4,3	Химический мутагенез семян сорта Пантелеевская нитрозодиметилом в конц. 0,012 %
Чечек / Технический	16,9	77,0	7,8	Свободное опыление отборной формы 7-66-321 (Щербинка-1×чулышманский экотип) катунским экотипом
Чуйская / Универсальный	15,5	82,0	6,2	Свободное опыление отборной формы чуйского экотипа

Биохимическим маркерами для идентификации генов растений, наряду с белками и ферментами, могут являться метаболиты растений (например, сахара), в том числе вторичные, например – аскорбиновая кислота (табл. 2).

Таблица 2. Биохимический состав плодов облепихи алтайской селекции (n=3, M±m)

Сорт облепихи	М.д. сухих веществ, %	М.к. сахаров, г/дм ³	М.к. титруемых кислот, в пересчете на яблочную, г/дм ³	М.к. аскорбиновой кислоты, мг/дм ³
Ажурная	14,15±0,35	54,8±0,4	12,9±0,4	644,8±32,5
Алтайская	13,93±0,34	75,9±0,6	10,4±0,3	950,1±36,2
Иня	13,73±0,32	56,6±0,7	18,2±0,3	1170,3±43,6
Чечек	13,32±0,32	47,3±0,4	15,6±0,4	924,5±35,6
Чуйская	13,57±0,35	72,9±0,2	13,7±0,3	1304,6±45,6

Из приведенных экспериментальных видны различия биохимического состава, обусловленные сортовыми особенностями. Несмотря на практически одинаковое содержание сухих веществ для исследуемых сортов отмечается широкая вариабельность изучаемых биохимических признаков, влияющих на вкусовые характеристики плодов облепихи и определяющие ее дальнейшее использования. В исследовании показано, что технические и универсальные сорта облепихи алтайской селекции содержат значительно больше аскорбиновой кислоты по сравнению с десертным сортом. Таким образом можно сделать вывод о перспективности проводимых исследований в области скрининга плодов облепихи с целью выявления биохимических маркеров, характерных как для отдельных сортов и отборных форм, так и для групповой идентификации сортов облепихи.

Список литературы

1. Yang B. Sugars, acids, ethyl b-D-glucopyranose and a methyl inositol in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) berries // Food Chemistry. 2009. Vol. 112, № 1. P. 89–97.
2. Zakynthinos G., Varzakas T., Petsios D. Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides*) Lipids and their Functionality on Health Aspects // Current Research in Nutrition and Food Science. 2016. Vol. 4, № 3. P. 182–194.
3. Богомолова Н.И., Лупин М.В. Уровень биологического потенциала продуктивности облепихи крушиновидной в естественных и промышленных насаждениях России // Вестник аграрной науки. 2021. Т. 93, № 6. С. 62–67.
4. Земцова А.Я., Зубарев Ю.А., Гунин А.В., Иванова М.С. Оценка генетического полиморфизма образцов рода облепихи (*Hippophae L.*) различного экологогеографического происхождения посредством ISSR-маркеров // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017, № 21(6). С. 623–629.
5. Помология. Сибирские сорта плодовых и ягодных культур XX столетия / под ред. И. П. Калининой. – Новосибирск: Юпитер, 2005. – 568 с.
6. Зубарев Ю.А., Гунин А.В., Пантелеева Е.И., Воробьева А.В. Новые крупноплодные сорта облепихи алтайской селекции // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2020. Т. 188. № 6. С. 42–49.

7. Земцова А.Я., Зубарев Ю.А., Гунин А.В. Оценка сортообразцов облепихи разного экологогеографического происхождения по биохимическому составу плодов // Достижения науки и техники АПК. 2016. Т. 30. №9. С. 48–52.

Невирусные носители как средства доставки нуклеиновых кислот в клетки миомы матки с целью генной терапии

Штыкалова С. В.^{1,2,*}, Егорова А. А.¹, Фрейнд С. А.^{1,2}, Маретина М. А.¹, Швед Н. Ю.¹, Баранов В. С.^{1,2}, Киселев А. В.¹

¹ Лаборатория молекулярной генетики и генной терапии, Отдел геномной медицины, Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д. О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

² Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

* sofia.shtykalova@gmail.com

Ключевые слова: пептидные носители, миома матки, генная терапия, магнитные наночастицы, невирусные средства доставки, суицидная генная терапия

Данная работа посвящена исследованию модульных носителей на основе пептидов, модифицированных циклическим лигандом интегринов $\alpha\beta_3$, как средств доставки плазмидной ДНК в клетки миомы матки с целью генной терапии. Миома матки (ММ) – наиболее распространенная доброкачественная опухоль мышечного слоя матки (миометрия). Несмотря на доброкачественность, ММ является причиной серьезных гинекологических патологий у женщин репродуктивного возраста вплоть до бесплодия и осложнений при беременности, а также является наиболее распространенной причиной гистерэктомии. Возможность точной ультразвуковой локализации делает данную опухоль идеальной мишенью для применения подходов генной терапии *in situ*. Серьезным барьером для доставки терапевтических генетических конструкций в клетки опухоли является сложно организованный внеклеточный матрикс (ВКМ). Покрытие полианионами способствует улучшению коллоидной стабильности катионных полиплексов и прохождению через ВКМ. Также перспективным подходом к доставке генетических конструкций в глубокие слои опухоли является использование магнитных наночастиц (МНЧ). В нашей лаборатории были разработаны невирусные носители на основе пептидов, модифицированные лигандом к интегрину $\alpha\beta_3$ [1], и анионное пептидное покрытие для доставки ДНК в первичные клетки ММ. Для повышения эффективности трансфекции полиплексы с пептидными носителями и ДНК были нековалентно связаны с МНЧ. В ходе выполнения данного исследования были синтезированы аргинин-богатые гистидин-содержащие пептидные носители, модифицированные циклическим лигандом RGD и серия анионных пептидов. Работа проводилась на клеточной культуре карциномы панкреатической железы человека PANC-1 и на первичных клетках ММ и миоматозных узлах (органотипическая модель ММ), полученных от пациенток после миомэктомии.

Исследованы физико-химические свойства полиплексов ДНК с пептидными носителями и анионным покрытием, а также полиплексов с МНЧ, в том числе следующие: тест на вытеснение бромистого этидия из полиплексов и определение степени высвобождения ДНК из полиплексов с анионным покрытием с использованием декстрансульфата. Была изучена эффективность трансфекции полиплексов с анионным покрытием при различных зарядовых соотношениях и полиплексов с МНЧ при различных количественных соотношениях ДНК:МНЧ в экспериментах на клетках PANC-1, на поверхности которых представлены интегрины $\alpha\beta_3$. Была проведена суицидная генная терапия (СГТ) первичных клеток ММ на ранних пассажах. Проведены инъекции полиплексов с анионным покрытием, несущих плазмиду с геном GFP, в миоматозные узлы, полученные после миомэктомии. После инъекций были приготовлены криотомные срезы миоматозных узлов толщиной 5 мкр и проанализированы на флуоресцентном микроскопе Leica.

Было установлено, что разработанное анионное покрытие повышает стабильность полиплексов и способствует успешной трансфекции клеток в присутствии сыворотки крови. Связывание полиплексов с МНЧ позволило значительно сократить время инкубации полиплексов с клетками, необходимое для успешной трансфекции. Оценка

метаболической активности с использованием реагента AlamarBlue и окрашивание трипановым синим показали снижение пролиферативной активности первичных клеток ММ после СГТ полиплексами с анионным покрытием и полиплексами с МНЧ. На срезах миоматозных узлов после введения полиплексов, несущих плазмиду с геном GFP, было зарегистрировано специфичное свечение, соответствующее накоплению белка GFP клетками, что свидетельствует об успешной трансфекции тканей ММ.

Разработанные пептидные носители, модифицированные лигандом к интегринам $\alpha\upsilon\beta3$, являются перспективными средствами доставки ДНК в клетки миомы матки с целью генной терапии. Исследованные в данной работе модификации полиплексов с пептидными носителями позволяют значительно увеличить стабильность конструкций и эффективность трансфекции, открывая перспективы для их клинического применения в будущем.

Исследование поддержано грантом РФ «Исследование подходов к лечению миомы матки с помощью доставки терапевтических нуклеиновых кислот в составе интерполиэлектролитных комплексов» № 21-15-00111.

Ссылки

1. Egorova, A., et al. Development of iRGD-Modified Peptide Carriers for Suicide Gene Therapy of Uterine Leiomyoma. *Pharmaceutics*. 2021. V.13. №2. P.202.

Пространственное полнотранскриптомное профилирование опухолей яичника с помощью технологии 10x Genomics Visium

Ямщиков П.С.^{1,2*}, Ракина М.А.¹, Безгодова Н.В.², Геращенко Т.С.², Ларионова И.В.^{1,2}

¹ Лаборатория трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины, НИ ТГУ, Томск, Россия

² Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

* mriamshchikovpavel@gmail.com

Ключевые слова: онкология, рак яичников, пространственная транскриптомика, 10x Genomics Visium

Цель работы: Рак яичников (РЯ) имеет наихудший прогноз из онкологических гинекологических заболеваний из-за частого развития рецидивов и резистентности к химиотерапии. РЯ в основном диагностируется на поздних стадиях заболевания и часто сопровождается приобретением множественной лекарственной устойчивости в течение короткого периода времени [1]. Выявление маркеров и механизмов развития рецидива остается актуальной задачей. Последние годы активно развиваются технологии пространственной транскриптомики, как например 10x Genomics Visium, основанная на использовании пространственных олигонуклеотидных баркодов [2]. Технология Visium позволяет изучать полный транскриптом в областях диаметром 55 мкм (споты) непосредственно на срезах тканей в контексте паренхиматозно-стромальных взаимоотношений и проводить корреляции с патоморфологическими характеристиками. Пространственное полнотранскриптомное профилирование тканей РЯ позволит выявить потенциальные маркеры и механизмы развития рецидивов.

Метод: Шесть FFPE образцов опухолей яичников были использованы в качестве материала исследования. Материалы были собраны на базе клиники НИИ онкологии Томского НИМЦ. Исследование было проведено в соответствии с местным комитетом по медицинской этике НИИ Онкологии ТНИМЦ. Пациентки не проходили курс неoadъювантной химиотерапии (НАХТ). Пространственные полнотранскриптомные библиотеки 10x Genomics Visium секвенировали на платформе Illumina NextSeq 2000. Первичная обработка данных и получение матрицы экспрессии проводилась в Space Ranger. Матрицы экспрессии анализировали с помощью программного пакета Seurat [3] и среды R. Деконволюцию клеточных типов проводили с помощью пакета STdeconvolve [4]. Анализ дифференциальной экспрессии проводили с помощью непараметрического теста Манна-Уитни. Функциональная аннотация генов проводилась с использованием метода GSEA [5]. TCGA-OV база данных пациентов с РЯ была использована для проверки клинической значимости полученных различий.

Результат: После процессинга матрицы экспрессии в пакете Seurat получили кластера спотов с помощью SNN (shared nearest neighbor) кластеризации. Полученные кластера визуализировали в двух измерениях с помощью нелинейного снижения размерности UMAP. Получили маркеры кластеров с помощью анализа дифференциальной экспрессии (ДЭ). Получили клеточные компоненты спотов с помощью деконволюции клеточных типов. С помощью результатов ДЭ и деконволюции определили принадлежность кластеров к клеточным компонентам опухоли и опухолевого микроокружения. Опухолевый компонент пациентов с рецидивом имеет статистически значимое повышение экспрессии гена TGFBI, являющийся неблагоприятным прогностическим фактором в РЯ. Тогда как, опухолевый компонент пациентов без рецидива имеют статистически значимое повышение экспрессии гена LPAR3, являющийся благоприятным прогностическим фактором в РЯ.

Выводы: Мы показали возможность применения пространственного полнотранскриптомного профилирования тканей РЯ с помощью технологии 10x Genomics Visium для выявления потенциальных маркеров развития рецидивов РЯ.

Благодарность: Исследование поддержано грантом РФФИ №21-75-10021.

Ссылки

1. Henderson JT, et al. Screening for Ovarian Cancer: Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *JAMA*. 2018;319(6):595-606.
2. Ståhl PL, et al. Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science*. 2016;353(6294):78-82.
3. Hao Y, et al. Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell*. 2021;184(13):3573-3587.e29.
4. Miller BF, et al. Reference-free cell type deconvolution of multi-cellular pixel-resolution spatially resolved transcriptomics data. *Nat Commun*. 2022;13(1):2339
5. Subramanian A, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(43):15545-15550.

Breed-specific patterns of early myogenesis, nitric oxide metabolism, and post-hatch growth in relation to genetic diversity and divergent selection in chickens

Породоспецифичные модели раннего миогенеза, метаболизма оксида азота и постнатального роста в связи с генетическим разнообразием и разнонаправленной селекцией у кур

Romanov, M.N.,^{1*} Kochish, I.I.,² Titov, V.Yu.,^{2,3} Nikonov, I.N.,² Brazhnik, E.A.,⁴ Vorobyov, N.I.,⁵ Korenyuga, M.V.,² Myasnikova, O.V.,² Dolgorukova, A.M.,³ Griffin, D.K.¹

¹ School of Biosciences, University of Kent, Canterbury, UK

² K. I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia

³ Federal Scientific Center "All-Russian Poultry Research and Technological Institute" of the Russian Academy of Sciences, Sergiev Posad, Moscow Oblast, Russia

⁴ BIOTROF+ Ltd, Pushkin, St. Petersburg, Russia

⁵ All-Russia Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia

* m.romanov@kent.ac.uk

Keywords: divergently selected chicken breeds, genetic diversity, early myogenesis, differential gene expression, nitric oxide oxidation, post-hatch growth

Aims: There is currently a significant genetic diversity across poultry breeds as a result of long-term domestication, breeding, and divergent selection, with each breed having its own distinctive phenotypic and genetic characteristics [1,2]. We presumed and set out to investigate whether differences between chicken breeds divergently selected for economically and culturally significant traits [3] manifest as early as possible in development and growth stages.

Methods: Breed-specific patterns and relationships of embryo myogenesis, nitric oxide (NO) metabolism, and post-hatch growth rate were studied and analyzed [4].

Results: Our research revealed that myogenesis genes were coordinately expressed in the thigh and breast muscles, demonstrating breed uniqueness. Indicators of NO oxidation and post-hatch growth were largely consistent with utility breed types, with meat breeds showing higher NO oxidation levels and better growth rate values in comparison to egg, dual purpose, game, and fancy breeds.

Conclusions: The findings of this study indicate that breed-specific variations in early myogenesis, NO metabolism, and post-hatch growth adequately represent genetic variety and reliably depict the evolutionary history of diversely chosen chicken breeds.

Acknowledgments: This study performed at the FSBEI HE "Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA named after K. I. Skryabin" was financially supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 22-16-00009).

References

1. Weigend, S. et al. Methodologies to identify, evaluate and conserve poultry genetic resources. In *XXII World's Poultry Congress & Exhibition: Participant List & Full Text CD + Book of Abstracts, Istanbul, Turkey, 8–13 June 2004*. WPSA — Turkish Branch: Istanbul, Turkey, 2004; p. 84.
2. Kudinov, A.A., et al. Genome-wide association studies targeting the yield of extraembryonic fluid and production traits in Russian White chickens. *BMC Genomics*. 2019;20:270. doi: 10.1186/s12864-019-5605-5.
3. Romanov, M.N., et al. First century of chicken gene study and mapping – a look back and forward. *World's Poultry Science Journal*. 2004;60(1):19–41. doi: 10.1079/WPS20032.
4. Kochish, I.I., et al. Unraveling signatures of chicken genetic diversity and selection in breed-specific patterns of early myogenesis and post-hatch growth. *Frontiers in Genetics*. 2022 (submitted).

From feed regulation to regulated feeding: intestinal microbiome and performance optimization in broiler chickens in response to antibiotic and probiotic treatment

От регулирования кормов к регулируемому кормлению: оптимизация микробиома кишечника и продуктивности цыплят-бройлеров в ответ на применение антибиотика и пробиотика

Romanov, M.N.,^{1,*} Grozina, A.A.,² Ilina, L.A.,^{3,4} Laptev, G.Yu.,^{3,4} Yildirim, E.A.,^{3,4} Filippova, V.A.,^{3,4} Tyurina, D.G.,³ Fisinin, V.I.,² Kochish, I.I.,⁵ Griffin, D.K.¹, Surai, P.F.^{6,7,8,*}

¹ School of Biosciences, University of Kent, Canterbury, Kent, UK

² Federal Scientific Center All-Russia Research and Technological Poultry Institute, Russian Academy of Sciences, Sergiev Posad, Moscow Oblast, Russia

³ BIOTROF LLC, Pushkin, St. Petersburg, Russia

⁴ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "St. Petersburg State Agrarian University", Pushkin, St. Petersburg, Russia

⁵ K. I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia

⁶ Vitagene and Health Research Centre, Bristol, UK

⁷ Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria

⁸ Szent Istvan University, Gödöllo, Hungary

* m.romanov@kent.ac.uk, psurai@feedfood.co.uk

Keywords: broiler chickens, in-feed antibiotic, probiotic, gastrointestinal tract, microbiome, T-RFLP

Aims: The nutrition and immune system of poultry are significantly influenced by gut bacteria. The physiological status, metabolism, and innate immunity of poultry are all impacted by changes in the gut microbiota [1,2]. The current study aimed to define age-related changes in the gastrointestinal tract (GIT) microbiota, with the addition of the in-feed antibiotic Stafac® 110 and a probiotic based on the *Bacillus subtilis* strain to the diet of broiler chickens.

Methods: Using a molecular genetic technique called the Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) analysis [3,4], a thorough investigation of the taxonomic structure of the microbial community in the GIT of broiler chickens was conducted in this regard, while considering age dynamics and feeding treatment. The latter involved administering the in-feed antibiotic Stafac® 110 as well as a probiotic based on the *Bacillus subtilis* strain 1-85.

Results: The findings provided insight into how the GIT microflora of broiler chickens develops during the developing stage and how it alters in response to antibiotic and probiotic treatment. Using the antibiotic and probiotic in compound feeds had a positive impact on the microbiological makeup and body weight of broilers. Due to the addition of the antibiotic and probiotic to the feed, different bacterial communities were found in the duodenum and cecum of broiler chickens, and their beneficial effects on broiler growth were demonstrated.

Conclusions: We propose that the use of the tested in-feed antibiotic and probiotic can be advantageous in regulating microbial activities in the GIT and improving broiler chicken productivity and feeding effectiveness. These feed additives can form the basis of a useful procedure for controlling the intestinal microbiota and enhancing broiler performance.

Acknowledgments: This research was funded by the Russian Science Foundation, grant number 14-16-00140.

References

1. Kochish, I.I., et al. [Determination of intestinal microbiocenoses in hens of egg-type crosses]. In [World and Russian trends in the development of poultry industry: the realities and challenges of the future: Proceedings of the 19th International Conference]. All-Russia Poultry Science and Technology Institute, Sergiyev Posad, Russia, 2018; pp. 240–243.

2. Narushin, V.G., et al. Modelling effects of phytobiotic administration on coherent responses to *Salmonella* infection in laying hens. *Italian Journal of Animal Science*. 2020;19:282–287. doi: 10.1080/1828051X.2020.1733445.
3. Nikonov, I.N., et al. Microbiota in the intestines of cross chick Lohmann Brown in ontogeny. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2017a;8(6):645–654.
4. Nikonov, I.N., et al. Changing the intestinal microbiota of chickens in ontogenesis. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2017;7(4):492–499. doi: 10.15421/2017_150.