



СБМ



НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
СИСТЕМНОЙ БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ
РОСПОТРЕБНАДЗОРА

Федеральное бюджетное учреждение науки
**НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
СИСТЕМНОЙ БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ**
Федеральной службы по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия человека

ИТОГОВАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

МОСКВА

21–22 декабря 2023

СОДЕРЖАНИЕ

	<i>стр.</i>
Отдел системной и синтетической биологии	3
Отдел молекулярной биологии и биоинформатики	14
Отдел биофизики	23
Доклады гостей	28

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Алехина О.М. 3	Калиш С.В. 5	Рог И.С. 9
Ануфриева К.С. 29	Карнаухов А.В. 28	Рыбина О.Ю. 33
Арапиди Г.П. 7, 29	Карпулевич Е.А. 31	Рябов С.В. 18
Арзуманян Л.К. 29	Киселева Е.В. 7	Самойлов А.Е. 4, 9, 20
Аристов В.В. 28	Ключникова Е.О. 4	Сапега Т.С. 26
Артюшин И.В. 4	Ковальчук С.Н. 14	Сбарцалья В.А. 4
Архипова А.Л. 14	Кожемякин Г.Л. 8	Селезов С.Ю. 23
Басманов Д.В. 25	Конанов Д.Н. 15	Семашко Т.А. 11
Башкиров П.В. 24, 26, 27	Корнеев Е.В. 4, 9, 15	Семенова А.Б. 31
Буздин А.А. 31	Кривонос Д.В. 9	Сизова С.В. 25
Бутенко И.О. 4, 7	Кррижо Р. 18	Сонец И.В. 4, 17
Василенко Е.О. 27	Кудрявцев А.В. 10, 12	Сорокин М.И. 31
Васильева Е.А. 7	Куканов В.Ю. 23	Сперанская А.С. 4, 9, 15
Введенский А.В. 9, 15	Курилова О.В. 23	Столбова Е.А. 10
Гарипов М.Р. 31	Лазарева А.А. 7, 26	Сумарокова М.В. 27
Гладких А.С. 4	Лукина М.М. 29	Сунцова М.В. 31
Говорун В.М. 3, 7, 9, 11	Лукина-Гронская А.В. 9, 15	Таллерова А.В. 22
Горбунов К.С. 18, 23	Лядов В.К. 31	Тюлягин П.Е. 25
Гугучкин Е.П. 31	Лямина С.В. 5	Фёдоров О.В. 8
Гурулева Ю.И. 3	Манолов А.И. 17	Федорова Л.С. 14
Дедков В.Г. 4	Матвеев Е.В. 32	Фисунов Г.Ю. 3, 11
Доронин С.А. 10, 12	Матюшкина Д.С. 7, 26	Харрасов Д.Р. 11
Дудик С.П. 25	Мелихова А.В. 18	Цой Е.А. 11
Евдокимова А.О. 17	Миков А.Н. 3	Чудинов И.К. 4, 9
Евсютина Д.В. 11	Моргачева С.И. 25	Шакуров Р.И. 3
Зайнуллин К.Ф. 8	Мохирев Д.Ю. 18	Шарапова Е.Е. 3
Золотовская М.А. 31	Мусатов И.М. 31	Шендер В.О. 7, 29
Зырин В.С. 7	Нечипуренко Ю.Д. 28	Шнайдер П.В. 7, 29
Иванова К.А. 24	Никитеев И.А. 8	Шокина В.А. 10, 12
Иванова К.А. 27	Павленко А.В. 9	Шунаев А.В. 23
Иванова О.М. 7, 29	Пасюкова Е.Г. 33	Энгин Д.С. 23
Ильина Е.Н. 14, 15, 17	Пенкин Л.Н. 17	Юзефович А.П. 4
Казакова А.Н. 29	Попов Н.С. 17	
Казанов М.Д. 32	Попова Н.Г. 31	

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ДИЗАЙНУ И *IN VITRO* РЕКОНСТРУКЦИИ МУЛЬТИФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ, НЕОБХОДИМЫХ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ И ВОСПРОИЗВОДСТВА ИСКУССТВЕННОГО ГЕНОМА

О.М. Алехина¹, А.Н. Миков¹, Е.Е. Шарапова¹, Г.Ю. Фисунов², Ю.И. Гурулева³, Р.И. Шакуров³,
В.М. Говорун¹

¹Лаборатория простых систем, ²Лаборатория системного анализа микроорганизмов,

³Лаборатория микро-и нанофлюидики, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

Возможность получения клетки, проявляющей те или иные свойства живых систем и имеющей при этом содержимое, созданное человеком, является одной из самых важных и нетривиальных задач, которую предстоит решать ученым в самое ближайшее время. Синтез и сборка отдельных генов и даже целых больших геномов превратились в хорошо отработанную технологию, однако до сих пор нет даже приблизительного понимания того, какой молекулярный состав внутриклеточной среды необходимо создать, чтобы искусственный геном не только экспрессировался, но и стал основой зарождения новой синтетической жизни. Предполагается, что в основе функционирования любой живой клетки лежит определенный набор «коровых» метаболических реакций, которые регулируются синхронно, что обеспечивает слаженное выполнение всех жизненно необходимых функций данной системы. Выявление этих реакций и их реконструкция сначала в пробирке, а затем в замкнутых искусственных компартментах – это перспективный bottom-up подход синтетической биологии, который способен значительно продвинуть наше понимание фундаментальных законов жизни. Такой процесс, как гликолиз, вне всякого сомнения, является метаболическим «ядром» любой живой клетки, поскольку ферменты, метаболиты и продукты этого пути принимают участие в регуляции самых разнообразных клеточных процессов, поэтому нашей первоочередной задачей было получение очищенных ферментов гликолиза и запуск реакций в пробирке в разных кинетических режимах. С этой целью были созданы генетические конструкции, несущие гены гликолитических ферментов из *Mycoplasma gallisepticum* и *Escherichia coli* под контролем определенных элементов, позволяющих производить наработку целевых белков в препаративных количествах в экспрессирующих штаммах *E. coli*. Дальнейшая оверэкспрессия, индивидуальный подбор условий выделения и очистка ферментов гликолиза хроматографическими методами позволила получить препараты высокого качества, обладающие стабильной энзиматической активностью. Сборка гликолиза из очищенных ферментов и низкомолекулярных субстратов *in vitro* позволила нам изучить особенности протекания реакций в цепочках, а также кинетические параметры индивидуальных реакций. В дальнейшем полученные данные будут использованы для подбора параметров реакций путем математического моделирования для того, чтобы воспроизвести этот метаболический путь в наиболее эффективном и самоподдерживающемся осциллирующем режиме. Кроме того, были получены первые данные о взаимодействии ферментов гликолиза друг с другом, что может послужить предпосылкой для искусственного формирования больших ферментативных комплексов, функционирующих как макромолекулярные машины.

АЛЬФАКОРОНАВИРУСЫ, ОБНАРУЖЕННЫЕ В ФЕКАЛИЯХ РУКОКРЫЛЫХ РОДА *PIPISTRELLUS*, ОБИТАЮЩИХ В ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ В 2015 И 2021 ГОДАХ

Е.В. Корнеев¹, А.Е. Самойлов¹, И.К. Чудинов¹, И.О. Бутенко¹, И.В. Сонец¹, И.В. Артюшин², А.П. Юзефович², Е.О. Ключникова³, В.А. Сбарцалья³, А.С. Гладких³, В.Г. Дедков³, А.С. Сперанская¹

¹Лаборатория мультиомиксных исследований, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора;

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова;

³Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера

Рукокрылые являются признанным природным резервуаром различных вирусов, включая коронавирусы (CoVs), два рода из которых, альфа- и бетакоронавирусы, инфицируют человека. Несмотря на увеличение интенсивности скрининга образцов летучих мышей на наличие новых вирусов, информация о разнообразии коронавирусов у летучих мышей, обитающих на территории России, пока остается неполной. В данной работе представлены результаты анализа численности и разнообразия альфакокоронавирусов (Alpha-CoVs) у рукокрылых из европейской части России. В анализ было взято 43 образца фекалий от рукокрылых 8 видов: *P. nathusii*, *P. kuhlii*, *M. brandtii*, *M. daubentonii*, *N. noctula*, *V. murinus*, *M. dasycneme* и *P. auritus*. Были обнаружены фрагменты гена *RdRp* Alpha-CoV в 25% (11/43) исследованных образцов в 6 из 8 (75%) видов. Филогенетический анализ гена *RdRp* показал, что большинство выявленных последовательностей Alpha-CoV кластеризуются с вирусами подрода *Pedacovirus*, а также *Nyctacovirus* или *Myotacovirus*. Мы утверждаем, что близкородственные педаковирусы циркулируют в течение длительного времени (с 2015 по 2021 гг.) в обширном регионе — от европейской части России до Северной Европы. Мы предполагаем, что близкородственные педаковирусы, собранные на общих территориях, представляют собой отдельный вид, названный нами NE-Alpha coronavirus, хозяевами которого являются рукокрылые рода *Pipistrellus*, обитающие в регионе от европейской части России до Северной Европы. Среди отловленных животных 4,6% (2/43) одновременно являются носителями двух Alpha-CoVs, относящихся к разным под родам (*pedacovirus/myotacovirus* или *pedacovirus/nyctacovirus*).

Мы подтвердили наличие двух различных под родов Alpha-CoV, относящихся к педаковирусам и никтаковирусам, у *P. kuhlii*, пойманных в 2021 году, которые содержались в многовидовой группе в течение нескольких недель, с помощью секвенирования полных геномов этих вирусов. Мы также получили два полных генома Alpha-CoVs от двух особей *P. nathusii*, отловленных в 2015 году. Геномная организация BatCoV/MOW15-21 и BatCoV/MOW15-23 была схожа с другими Alpha-CoV, но собранные геномы содержали длинную вставку в гене ORF1ab, которая ранее не была описана у других Alpha-CoV, за исключением одной последовательности из *P. nathusii*, пойманных в Нидерландах. Мы предполагаем, что эта вставка кодирует ранее не описанный домен с неизвестной функцией, вероятно, относящийся к суперсемейству SEA-доменов.

УПРАВЛЯЕМАЯ ГИПОКСИ-ГИПЕРОКСИТЕРАПИЯ КАК КОМПОНЕНТ ТАРГЕТНОГО ПОДХОДА В РЕАБИЛИТАЦИИ ПАЦИЕНТОВ С МУЛЬТИМОРБИДНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ И ПОСТКОВИДНЫМ СИНДРОМОМ

С.В. Лямина^{1,2}, С.В. Калиш^{1,2}

¹Лаборатория инфекционной иммунологии, НИИ системной биологии и медицины
Роспотребнадзора

²ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России

Введение. Мультиморбидность — одна из значимых проблем здравоохранения, приводящих не только к ухудшению функциональных способностей человека, но и увеличению инвалидизации населения, что определяет необходимость использования эффективных мер в лечении и дальнейшей реабилитации пациентов этой категории. В большинстве случаев хронические заболевания сопровождаются развитием ключевого компонента патогенеза - неспецифического воспаления с прогрессирующей локальной и системной гипоксией, во многом определяющих наблюдаемые клинические симптомы у пациентов. Учитывая, что одними из основных регуляторных факторов, опосредующих клеточный ответ на гипоксию, являются представители группы транскрипционных гипоксией индуцируемых факторов (HIF), оценка данных показателей может рассматриваться как дополнительный параметр эффективности проводимых мероприятий.

Цель исследования — изучение влияния двухнедельной программы медицинской реабилитации, включающей курс гипоксии-гиперокситерапии, на динамику индуцируемого гипоксией фактора-1 (HIF-1) и рутинного неспецифического маркера воспаления — С-реактивного белка.

Материалы и методы. В исследование (NCT05053672, ClinicalTrials.gov) включено 42 пациента (43–68 лет), имеющих мультиморбидную патологию — генерализованный остеоартрит (61,9%), остеоартрит коленных суставов (21,4%), остеоартрит тазобедренных суставов (16,7%), контролируемую артериальную гипертензию I–II стадии (90,5%), постковидный синдром (100%). У всех включенных в исследование пациентов наблюдалось 4 и более симптомов постковидного синдрома. Пациенты были рандомизированы в 2 группы методом пронумерованных идентичных контейнеров. По клинико-демографическим характеристикам, сопутствующей патологии, уровню С-реактивного белка и HIF-1 пациенты исследуемых групп были сопоставимы. Основная группа (n=27) получила курс (8–10 процедур) индивидуально дозированной гипоксии-гиперокситерапии на основе биологической обратной связи (реокси-терапии, ReOxy) на фоне стандартного комплекса медицинской реабилитации. Группа сравнения (n=15) вместе со стандартной реабилитацией получала плацебо-реокситерапию. До и после окончания курса гипоксии-гиперокситерапии / плацебо у пациентов проводился забор крови для определения HIF-1, уровня СРБ в соответствии со стандартным протоколом пробоподготовки. Определение концентрации HIF-1α проводилось методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) (SEA798Hu, Cloud-Clone Corp, КНП) в соответствии с инструкциями производителей и последующей оценкой результатов на анализаторе Tecan Austria Infinite F50 (Австрия).

Результаты. Исходные показатели уровня HIF-1α по среднему значению в основной группе и группе сравнения были сопоставимы и составили $52,62 \pm 36,43$ пг/мл и $58,92 \pm 29,17$ пг/мл, соответственно. После курса гипоксии-гиперокситерапии и гипоксии-гиперокситерапии / плацебо уровень HIF-1α возрастал в основной группе до $61,38 \pm 40,85$ пг/мл, но значимо не изменялся в группе сравнения - значения HIF-1α составили $58,31 \pm 28,91$ пг/мл. Анализ показателей HIF-1α и СРБ показал наличие корреляционной связи средней силы между показателями HIF-1α исходно и уровнем СРБ исходно ($r=0,53$),

после сеанса процедур зависимость между указанными величинами в основной группе также сохранялась ($r=0,45$). Кроме того, в группе сравнения была выявлена корреляционная связь между показателями HIF-1 α и уровнем СРБ как до начала курса процедур, так и после их завершения. Коэффициенты корреляции составили $r=0,43$ и $r=0,41$, соответственно. У пациентов с использованием реокси-терапии чётко продемонстрировано уменьшение клинической симптоматики, улучшение общего самочувствия по визуальной аналоговой шкале и снижение С-реактивного белка как классического маркера воспаления на фоне стабилизации динамики HIF-1.

Заключение. Использование методики гипокси-гипероксического воздействия на основе биологической обратной связи (реокси-терапия) у пациентов с различными исходными характеристиками состояния клинического здоровья (мультиморбидная патология) является обоснованным с учётом современных персонализированных подходов медицинской реабилитации.

**ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВ ВИРУСА SARS-CoV-2 НА ПРОТЕАСОМАЛЬНЫЙ АППАРАТ
КЛЕТКИ ХОЗЯИНА**

Д.С. Матюшкина¹, А.А. Лазарева¹, И.О. Бутенко², Е.В. Киселева³, Е.А. Васильева¹,
В.С. Зырин¹, В.О. Шендер⁴, П.В. Шнайдер⁴, О.М. Иванова⁴, Г.П. Арапиди⁵, В.М. Говорун¹

¹Лаборатория простых систем, ²Лаборатория мультиомиксных исследований,

³Лаборатория биоэлектрoхимии НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора;

⁴Лаборатория молекулярной онкологии, ⁵Лаборатория системной биологии

ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

Несмотря на то, что прошло уже почти четыре года с начала пандемии COVID-19 и за это время было разработано много схем лечения, новые препараты и вакцины, человечеству пока не удается окончательно победить вирус SARS-CoV-2. Он продолжает адаптироваться и циркулировать в популяции, появляются все новые геноварианты, и ученые пока не могут спрогнозировать, какое сосуществование с вирусом нас ждем в будущем. В связи с этим, чрезвычайно важной задачей является подробно изучить поведение вируса и его влияние на макроорганизм.

Для оценки влияния белков вируса на клетки хозяина, S (Spike), N (nucleoprotein), M (membrane protein) и nsр5 (3СLpro) белки вируса SARS-CoV-2 (Уханьский штамм) были сверхэкспрессированы в клетках HEK-293 с последующей оценкой протеомного профиля клеточных линий с помощью количественного (SILAC) и полуколичественного (DDA) масс-спектрометрического подхода на приборе Orbitrap Exploris 480 (ThermoFisher). Данные вирусные белки были выбраны исходя из мажорности вырабатываемых на них антител. Для оценки влияния вирусных белков в условиях активации иммунной системы клеточные линии были обработаны интерфероном гамма (в конечной концентрации 300 U/ml) за 72 часа до анализа. В результате нашего исследования мы наблюдали наиболее значимые изменения, которые оказывают спайковый и нуклеокапсидный белки вируса SARS-CoV-2, на структуру и функции митохондрий (нарушения в защитных окислительно-восстановительных реакциях, уменьшение представленности белков дыхательного комплекса I). Кроме того, нуклеокапсидный белок приводит к повышению уровня IDE (фермента, деградирующего инсулин) в клетке. В свою очередь, дефектная функция I комплекса оказывает существенное влияние на сборку 26S протеосомы, а IDE снижает активность протеосом, что в совокупности является критичным в борьбе с вирусной инфекцией. Подтверждением этих выводов послужило количественное измерение протеосомальных белков, N и M белки приводят практически к тотальному падению представленности белков протеосомы. Также было проведено непосредственное измерение протеосомальной активности в исследуемых клеточных линиях, которое показало снижение хемотрипсиновой и трипсиновой активности.

Полученные результаты являются чрезвычайно важными для понимания, на какие метаболические звенья в первую очередь оказывает воздействие новая коронавирусная инфекция и с какими нарушениями может быть связан длительный постковидный восстановительный период. Кроме того, данный подход является существенным этапом при разработке вакцин, чтобы можно было оценить влияние вакцинных белков на макроорганизм.

**ОТРАБОТКА ПОЛУЧЕНИЯ ТЕРМИНАЛЬНОЙ ДЕОКСИНУКЛЕОТИДИЛ
ТРАНСФЕРАЗЫ И ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИК СКРИНИНГА АКТИВНОСТИ
И ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ**

И.А. Никитеев, О.В. Фёдоров, К.Ф. Зайнуллин, Г.Л. Кожемякин

*Лаборатория мультиомиксных исследований, НИИ системной биологии и медицины
Роспотребнадзора*

Терминальная деоксинуклеотидил трансфераза – фермент, катализирующий реакцию присоединения нуклеотидтрифосфатов к одноцепочечной ДНК. Данный фермент нашёл широкое применение при получении аптамеров, биосенсоров, для скрининга и ферментативного синтеза ДНК *de novo* [1]. В данной работе было показано, что терминальная деоксинуклеотидил трансфераза при экспрессии в отсутствие связанного партнёра, во всех проанализированных условиях агрегирует в тельца включения. Экспрессия в составе SUMO-фьюжена улучшает растворимость фермента и позволяет получить активный белок в супернатанте из клеточного лизата. Подобраны оптимальные параметры экспрессии и концентрация индуктора. Для полученного фермента были измерены константа скорости реакции, константа связывания и удельная активность. Так же была показана способность фермента создавать библиотеки одноцепочечной ДНК в магниевом и кобальтовом буфере.

Был также предложен новый подход к измерению термостабильности фермента на основе разгорания красителя Eva Green при связывании с одноцепочечной ДНК. На основе данного метода было показано, что трансфераза имеет низкую термостабильность. Для получения более стабильного варианта TdT был применён *in silico* подход создания консенсусной последовательности, а полученная «хи-мерная» последовательность синтезирована, собрана и по результатам секвенирования найдены 2 клона без ошибок. Также, различные pdb структуры TdT и других полимераз семейства X были проанализированы с помощью программы V-Fitter, для поиска наиболее подвижных аминокислот. Определены наиболее перспективные места для насыщающего мутагена, подобраны праймеры и отработана методика получения мутантных библиотек. Предложенный подход с разгоранием EvaGreen, позволит проводить высокопроизводительный скрининг мутантов TdT на предмет термостабильности.

1. Ashley J, Potts IG, Olorunniji FJ. Applications of terminal deoxynucleotidyl transferase enzyme in biotechnology. *Chembiochem* 2023 **24(5)**: e202200510. doi: 10.1002/cbic.202200510.

**ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ SARS-CoV-2 НА ТЕРРИТОРИИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

И.С. Рог¹, А.С. Сперанская¹, А.В. Лукина-Гронская¹, И.К. Чудинов¹, Е.В. Корнеенко¹, Д.В. Кривонос²,
А.Е. Самойлов², А.В. Павленко², А.В. Введенский³, В.М. Говорун⁴

¹Лаборатория мультиомиксных исследований, ²Лаборатория математической биологии и биоинформатики, ³Лаборатория преодоления микробной резистентности, ⁴Лаборатория простых систем, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

Эпидемия Covid-19 началась в конце 2019 года в Китае и к марту 2020 года распространилась по всему миру. По данным Гущина с соавторами, опубликованным в августе 2023 года, в России было зарегистрировано шесть подъемов заболеваемости («волн»). Каждая волна была обусловлена распространением нового преобладающего генетического варианта (в период декабрь 2021 - февраль 2022 нескольких новых вариантов, ВА.1 и ВА.2), отличающегося от циркулировавших ранее набором мутаций, позволяющих вирусу «уходить» от иммунного ответа. Очевидно, что мониторинг за появлением и распространением в популяции новых генетических вариантов SARS-CoV-2 является хорошим прогностическим инструментом, позволяющим оценивать риски роста заболеваемости. Наиболее распространённым способом определения структуры генетических вариантов вируса является высокопроизводительное секвенирование. При этом, наибольшее количество информации о геномах SARS-CoV-2 накоплено с помощью платформы Illumina (США), которая обладает наивысшим качеством получаемой информации при доступной стоимости эксперимента. Второй по популярности является платформа Oxford Nanopore Technologies (Великобритания), которая несколько уступает Illumina по точности прочтения нуклеотидов, но обладает важными достоинствами: скорость и простота реализации экспериментальных работ, необходимых для подготовки материала к секвенированию.

На протяжении 2022-2023 годов мы проводили мониторинг генетических вариантов SARS-CoV-2, циркулировавших на территории ряда регионов Российской Федерации, отслеживая появление новых мутаций, изучая структуру генетических вариантов на территории страны и отдельных регионов. В частности, проводилось исследование циклической закономерности распространения вируса по времени в разных регионах страны. Исследование проводилось методом высокопроизводительного секвенирования с использованием протокола Midnight, разработанного для платформы Oxford Nanopore, на секвенаторах GridION и PromethION.

В ходе исследования с 01.01.2023 по 07.12.2023 были получены сиквенсы 6955 образцов SARS-CoV-2, из Белгородской (1479), Брянской (133), Владимирской (509), Воронежской (1398), Ивановской (39), Калужской (413), Костромской (184), Курской (582), Орловской (901), Рязанской (484), Тверской (195) и Ярославской (638) областей. Мы получили информацию о представленности структуры генетических вариантов в исследованных регионах в разные временные периоды в 2023.

СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ РЕКОМБИНАНТНОГО КОКЛЮШНОГО ТОКСИНА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ЭФФЕКТИВНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ КОКЛЮША

Е.А. Столбова^{1,2}, В.А. Шокина¹, С.А. Доронин¹, А.В. Кудрявцев¹

¹Лаборатория инфекционной иммунологии, НИИ системной биологии и медицины
Роспотребнадзора

²НИУ «Высшая школа экономики»

Вакцины АКДС эффективны в предотвращении коклюша, но часто плохо переносятся и имеют побочные эффекты ввиду токсичности коклюшного компонента вакцины. Переход на бесклеточные вакцины связан с более низкой эффективностью и проблемой "иммунного ускользания". В связи с этим, на сегодняшний день актуальна проблема разработки безопасной эффективной вакцины с возможностью ее модификации в сжатые сроки.

Предложена вакцина на основе субъединичного антигена, где используется каталитическая субъединица коклюшного токсина (PtxA), которая доставляется в составе фьюжн-конструкта с субъединицей RTX аденилатциклазного токсина *Bordetella pertussis* и запускает иммунные ответы CD4 и CD8 клеток. С целью дополнительного снижения токсичности антигена были произведены генетические замены в последовательности PtxA [1]. Аминокислотная конструкция, соответствующая PtxA, была транслирована в генетическую, синтезирована по методу Гибсона и клонирована в вектор pET28a с помощью безлигазного клонирования. После трансформации компетентных клеток *E. coli* и отбора плазмид со вставкой гена была осуществлена индукция экспрессии гена под T7 промотором с помощью ИПТГ, наработанный белок был выделен методом металл-аффинной хроматографии.

В результате нашего исследования были разработаны три варианта генетических конструкций рекомбинантного антигена. Первая конструкция представлена каталитической субъединицей коклюшного токсина (PtxA), в то время как две другие помимо PtxA имеют в своем составе разные варианты вектора переноса антигена, вызывая активацию CD4⁺ Т-хелперов посредством МНС II и CD8⁺ Т-лимфоцитов посредством МНС I соответственно [2]. Наши результаты показывают, что рекомбинантный антиген PtxA воспроизводим в бактериях *E. coli* и может быть адаптирован под различные штаммы и линии в случае "иммунного ускользания". Эффективность терапевтических молекул будет оценена на этапе доклинических исследований.

Работа выполнена в рамках госзадания № 1022040800241-0-1.6.3;1.6.5;3.5.2.

1. Ausar SF et al. Genetically detoxified pertussis toxin displays near identical structure to its wild-type and exhibits robust immunogenicity. *Commun Biol.* 2020, **3(1)**: 427.
2. Chenal A, Ladant D. Bioengineering of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin for antigen-delivery and immunotherapy. *Toxins.* 2018, **10(7)**: 302.

**ПОЛУЧЕНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ БАКТЕРИОФАГОВ
ПРОТИВ *VIBRIO CHOLERAЕ***

Г.Ю. Фисунов, Д.Р. Харрасов, Т.А. Семашко, Д.В. Евсютина, Е.А. Цой, В.М. Говорун

Лаборатория системного анализа микроорганизмов, НИИ системной биологии и медицины
Роспотребнадзора

В настоящее время основным средством лечения и профилактики инфекционных заболеваний являются антибиотики. Альтернативным (и дополняющим) подходом является использование бактериофагов. По сравнению с антибиотиками бактериофаги имеют ряд преимуществ, а именно: они обладают более узкой специфичностью и не оказывают системное токсическое воздействие ни на микробиоту ни на самого пациента; в связи с вышеозначенным фактом могут эффективно использоваться как средство профилактики; являются единственной эффективной альтернативой в случае, когда применение антибиотиков неэффективно или опасно для самого пациента. В случае инфекции *Vibrio cholerae* применение антибиотиков может усилить токсический эффект и быть не менее опасным, чем отсутствие лечения. При этом поддерживающая терапия эффективна, но требует специальных условий, которые может оказаться затруднительным обеспечить для массы заболевших в условиях эпидемии. В этом случае профилактика инфекции *V. cholerae* на ранних этапах инфекции может быть более эффективной стратегией, чем лечение. Для этого идеально подходят бактериофаги.

В настоящей работе была создана инфраструктура для синтетической биологии, включая набор рекомбинантных белков, штаммов для получения генных сборок методом гомологичной рекомбинации и программ для дизайна и пулирования олигонуклеотидных сборок. Геном вибриофага N4 скачан из базы данных NCBI, разбит на генные блоки (27 шт) размером 1500 п.о. и олигонуклеотиды размером 60 нт с помощью созданной нами программы VAC-browser. Олигонуклеотиды были синтезированы и собраны в генные блоки по разработанной нами технологии с использованием полученной нами высокоточной ДНК-полимеразы. Генные блоки были собраны в сборки размером 7-10 тысяч п.о. с помощью гомологичной рекомбинации в *Saccharomyces cerevisiae*. Полученные сборки были объединены с помощью гомологичной рекомбинации in vitro и доставлены в штамм *V. cholerae* O1 M818 биовар Эль Тор с помощью электропорации. В результате наблюдался литический эффект на клетки *V. cholerae*. Содержимое одной из полученных бляшек было отсеквенировано, и подтверждено наличие ДНК синтетического вибриофага N4.

РАЗРАБОТКА НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ РЕКОМБИНАНТНЫХ НАНОТЕЛ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ COVID-19

В.А. Шокина, С.А. Доронин, А.В. Кудрявцев

Лаборатория инфекционной иммунологии, НИИ системной биологии и медицины
Роспотребнадзора

Быстрая изменчивость коронавируса вынуждает использовать альтернативные стратегии защиты человека от COVID-19, в связи с чем нами было получено нанотело, которое блокирует связывание RBD-домена S-белка вируса SARS-CoV-2 с рецептором ангиотензин-превращающего фермента 2-го типа (ACE2).

Стремительная изменчивость коронавируса SARS-CoV-2 наделяет его способностью уклоняться от специфичных для вируса терапевтических или собственных антител [1]. Например, сейчас субвариант омикрона «кракен» имеет мутацию в S-белке, увеличивающую аффинность связывания с рецептором ангиотензин-превращающего фермента 2-го типа (ACE2).

Было показано, что сайт связывания ACE2 с RBD не перекрывается с его каталитическим сайтом для взаимодействия с ангиотензинпревращающим ферментом-2, поэтому антитела, взаимодействующие с сайтом связывания рецептора ACE2 и RBD могут блокировать проникновение всех ACE2-зависимых коронавирусов (SARS-CoV-2, SARS-CoV, HCoV-NL63 и др.) при сохранении физиологической активности ACE2 [2]. Такие антитела теоретически могут быть использованы для борьбы с текущими и будущими вспышками коронавируса, а также быть устойчивыми к вирусным мутациям, так как направлены не на постоянно изменяющийся на S-белок.

Нами было получено рекомбинантное акулье нанотело к рецептору ACE-2. Нанотела были выбраны нами в связи с их высокой стабильностью, увеличенной степенью проникновения в ткани по сравнению с классическими антителами и возможностью наработки антител в клетках *Escherichia coli*. Эффективность нейтрализующей способности антител к вирусу SARS-CoV-2 оценивалась с помощью иммуноферментного анализа. Для этого наши рекомбинантные нанотела предварительно инкубировали с антигеном в двух вариантах. В первом варианте мы предварительно подвергли совместной инкубации нанотела с RBD-доменом S-белка вируса SARS-CoV-2, а затем с рецептором ACE2. Во втором варианте мы предварительно инкубировали нанотела с ACE2, а затем с вирусным спайк-белком.

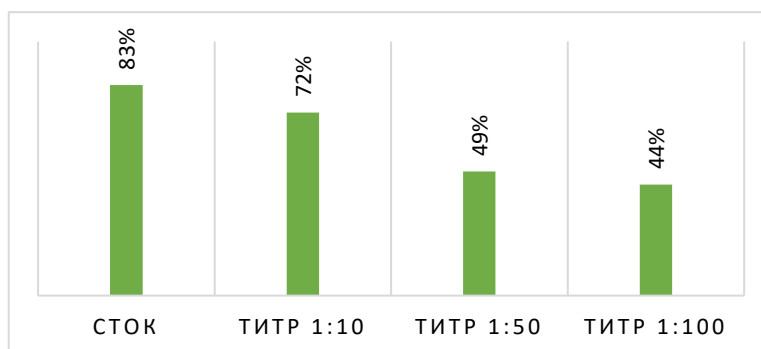


Рис. 1. Процентный индекс нейтрализации нанотел после предварительной совместной инкубации с RBD-доменом S-белка вируса SARS-CoV-2. Сток – стоковая концентрация антител (300 мкг/мл).

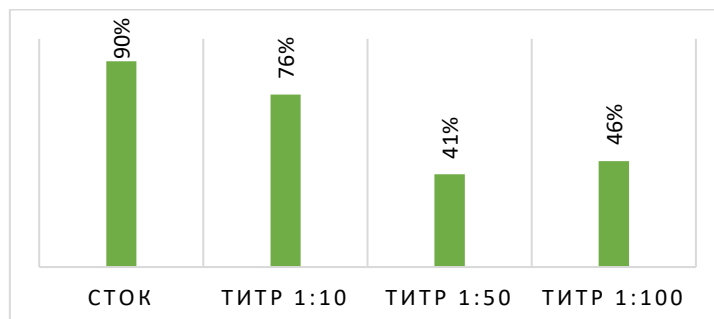


Рис. 2. Процентный индекс нейтрализации нанотел после предварительной совместной инкубации с рецептором ACE2. Сток – стоковая концентрация антител (300 мкг/мл).

По результатам ИФА процентный индекс нейтрализации нанотел в концентрации 3 мкг (титр 1:10) составил 72% в случае с прединкубацией нанотел с RBD-доменом S-белка вируса SARS-CoV-2 (рис. 1) и 76% в случае предварительной совместной инкубацией с рецептором ACE2 (рис. 2). Стоковая концентрация нанотела равная 300 мкг/мл показала высокую нейтрализующую способность в обоих вариантах предварительной совместной инкубации.

Полученные результаты открывают перспективу использования данных нанотел на животных моделях для оценки эффективности *in vivo*.

Работа выполнена в рамках государственного задания №1022040800241-0-1.6.3

1. Chaouat AE, Brizic I, Brlic PK et al. Anti-human ACE2 antibody neutralizes and inhibits virus production of SARS-CoV-2 variants of concern. *iScience*. 2022, **25**.
2. Zhang F, Jenkins J, Carvalho VH, Nakandakari-Higa S, Chen T et al. Pan-sarbecovirus prophylaxis with human anti-ACE2 monoclonal antibodies. *Nature Microbiology*. 2023, **8**: 1051–1063.

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ГЕНОВ ГРУППЫ *qac*

А.Л. Архипова¹, С.Н. Ковальчук¹, Л.С. Федорова¹, Е.Н. Ильина²

¹Лаборатория преодоления микробной резистентности, ²Лаборатория математической биологии и биоинформатики, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

Распространение микробной устойчивости к биоцидам, в том числе дезинфицирующим веществам, является одной из острых проблем современности, несущей биологические и экономические угрозы для всех стран. Известно, что устойчивость к биоцидам приобретает как за счет мутационного процесса, так и за счет горизонтального переноса генов устойчивости с помощью различных векторов - мобильных генетических элементов. На сегодняшний день выявлены гены эффлюксных насосов семейства *Qac*, способствующих формированию у бактерий устойчивости к четвертичным аммониевым соединениям (ЧАС). К ним относятся гены *qacA*, *qacB*, *smr (qacC)*, *qacH*, *qacG* и *qacJ* грамположительных и *qacE*, *qacED1*, *qacF*, *qacL*, *qacN* и *qacG* грамотрицательных бактерий группы ESKAPE. Приобретение путем горизонтального переноса этих генов посредством плазмид является одним из основных генетических механизмов формирования микробной устойчивости к ЧАС, и представляет риск ее широкого распространения.

В связи с этим была поставлена задача разработки тест-систем на основе ПЦР в режиме реального времени с флуоресцентно-мечеными зондами типа TaqMan для детекции генов группы *qac*. Для этого был проведен анализ нуклеотидных последовательностей генов эффлюксных насосов *qacE*, *qacED1*, *qacF*, *qacL*, *qacN* и *qacG* грамотрицательных бактерий и генов *qacA*, *qacB*, *qacH*, *qacG* и *qacJ* грамположительных бактерий. Нуклеотидные последовательности генов были взяты из базы данных Генбанк, их анализ проводили с помощью программы BLASTN (параметр Max target sequences 5000). В результате анализа были идентифицированы консервативные участки генов, которые были использованы для дизайна праймеров и зондов с использованием программ GeneRunner v.62.2.55 Beta и Multiple Primer Analyzer. Были определены параметры программы амплификации генов *qac*. Эффективность амплификации для всех тест-систем составляла более 90%, аналитическая чувствительность – от 100 до 1000 копий гена. В качестве внутреннего контроля амплификации во всех разработанных тест-системах был использован фрагмент гена 16S RNA. С помощью разработанных нами тест-систем были исследованы 126 клинических изолятов бактерий группы ESKAPE – (*Klebsiella pneumoniae* (n=65), *Acinetobacter baumannii* (n=23), *Pseudomonas aeruginosa* (n=19), *Escherichia coli* (n=7), *Staphylococcus haemolyticus* (n=2) и *Staphylococcus aureus* (n=10). Гены *qacE/ED1* содержали 87% изолятов *A. baumannii*, 80% изолятов *K. pneumoniae*, 57% *E. coli* и 21% *P. aeruginosa*. Распространенность генов *qacF/L/H* была значительно меньше – от 14,3% среди изолятов *Escherichia coli* до 36,8% среди изолятов *P. aeruginosa*. Ген *smr* был выявлен у 1 изолята *S. haemolyticus*, гены *qacA/B* – у 1 изолята *S. haemolyticus* и 1 изолята *S. aureus*.

Разработанные нами тест-системы совместно с микробиологическими методами могут быть использованы в составе комплексной методики мониторинга чувствительности клинически значимых видов микроорганизмов к ЧАС.

ТЕХНОЛОГИЯ СЕКВЕНИРОВАНИЯ MGI: О ЧЕМ МОЛЧАТ КИТАЙЦЫ?

Д.Н. Конанов¹, А.С. Сперанская², Е.В. Корнеенко², А.В. Введенский³,
А.В. Лукина-Гронская², Е.Н. Ильина¹

¹Лаборатория математической биологии и биоинформатики, ²Лаборатория мультиомиксных исследований, ³Лаборатория преодоления микробной резистентности, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

Сегодня секвенаторы MGI рассматриваются как альтернатива приборам Illumina. Известным преимуществом MGI является способ амплификации библиотек, основанный на полимеризации по типу катящегося кольца с формированием ДНК-наноболлов (DNB). В отличие от процесса кластеризации в приборах платформы Illumina, такой подход не подвержен накоплению ошибок амплификации.

Как и Illumina, MGI предлагает pair-end секвенирование. Основная особенность все та же – матрица для полимеразы общая как для прямых, так и для обратных прочтений, что иногда может создавать некоторые стерические сложности в синтезе обратных прочтений. В данной работе мы детально проанализировали тестовый запуск PE300, чтобы оценить возможные источники ошибок, а также проверить применимость MGI для секвенирования смешанных библиотек с разной длиной вставки. Тестовый запуск PE300 включал пять типов библиотек: первый тип – 8 метагеномных образцов, второй тип – 21 тотальный РНКом, третий тип – 120 образцов 16S-метагеномов, четвертый тип – 4 бактериальные полногеномные библиотеки, и пятый тип – 3 библиотеки с индивидуальными плазмидами.

Первый обнаруженный артефакт – присутствие в сборках плазмид фрагментов нецелевых геномов с низким покрытием. Анализ прямых прочтений, породивших эти фрагменты, показал, что эти риды преимущественно содержат баркоды из других образцов. Вначале мы предположили, что имеет место ошибка демультимплексирования, но неожиданно оказалось, что в обратных ридах проблемы несоответствия баркодов нет и нецелевые объекты содержатся только в прямых ридах. Таким образом мы выяснили, что часть пар “forward+reverse” неверно соотнесена друг с другом.

На наших данных оценка доли некорректно соотнесенных пар варьировалась от 2 до 8%, вне зависимости от типа запуска (PE100, PE150, PE300). Чтобы убедиться в системности проблемы, мы проанализировали данные коллег из Новосибирска и Оболенска, а также демо-датасеты MGI. Во всех случаях проблема неверного соотношения имела место. Информация была передана китайским инженерам, которые предположили, что неверное соотношение было вызвано слишком короткими вставками в наших библиотеках. Хотя наши тесты показали, что видимой корреляции между длиной вставки и неверным соотношением нет.

Для сравнения с данными, полученными с приборов платформы Illumina, мы оценивали долю пар ридов, в которых прямой и обратный рид однозначно картировались на позиции, удаленные в референсном геноме более чем на 100кб (предполагая, что такие вставки невозможны). Доля таких пар ридов для MGI составила 0,88%, в то время как на Illumina 0,02% на одном и том же биологическом объекте.

Еще одна обнаруженная особенность, которую необходимо учитывать при использовании MGI, – смещение распределения длин вставок в финальных прочтениях в меньшую сторону в сравнении с исходной библиотекой. Искажение, вероятнее всего, вызвано более эффективной циркуляризацией коротких фрагментов, чем длинных. По нашим данным, сдвиг среднего значения длины вставки составляет 60-80 оснований, что в теории может сказаться на результатах ампликонного секвенирования.

Последний момент, который стоит упомянуть, – присутствие в данных химерных ридов, несущих вставки сразу от двух разных объектов, а в некоторых случаях сразу две различных последовательности баркодов. Пока не ясно, является ли причиной таких ридов химерная структура ДНК-наноболлов, или это проблема приборного детектора. К счастью, количество таких ридов крайне мало и не оказывает видимого влияния на результаты анализа.

В целом, на наш взгляд, использование технологии MGI требует как аккуратного выбора образцов для объединения в запуск, так и не менее аккуратного подхода к обработке данных секвенирования.

АВТОМАТИЗАЦИЯ ПОИСКА ВИРУСНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ДАННЫХ МЕТАГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Н.С. Попов¹, А.И. Манолов¹, И.В. Сонец², Л.Н. Пенкин, А.О. Евдокимова, Е.Н. Ильина²

¹Лаборатория цифрового мониторинга здоровья человека, ²Лаборатория математической биологии и биоинформатики, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

Выявление и определение вирусов, циркулирующих в человеческой популяции, имеет большое значение для здоровья и безопасности человека, особенно в условиях возникающих вспышек инфекционных заболеваний.

Геномные последовательности вирусов чрезвычайно изменчивы и для многих вирусов - остаются не прочитанными. Это затрудняет поиск вирусов в метагеномных образцах. Было создано несколько утилит для поиска вирусных последовательностей в WGS данных, каждая из которых имеет свои преимущества и недостатки. В связи с этим, необходим инструмент, который объединяет несколько методов для максимизации эффективности поиска вирусных последовательностей. РНК-вирусы наиболее интересны с точки зрения вероятности возникновения новых зоонозных инфекций, поэтому в этой работе мы уделили им особое внимание.

Целью настоящей работы является разработка пайплайна для поиска вирусных последовательностей в данных метагеномного секвенирования.

Пайплайн имеет модульную структуру.

Модуль на основе картирования сравнивает прочтения с базами вирусных последовательностей (ICTV, NCBI Virus), возвращает результаты картирования и выводит визуализацию картирования. Однако, чувствительность картирования может падать при работе с последовательностями, сильно отдаленными от референсных.

Второй модуль работает на основе скрытых марковских моделей (НММ) с применением базы Minion DB. НММ — вероятностные модели, потенциально способные выявлять паттерны, характерные для гомологичных последовательностей и таким образом находить сходство для более отдаленных от референсов последовательностей.

Результаты работы всех двух модулей суммируются в итоговом html-отчёте.

Третий разрабатываемый модуль предназначен для распознавания консервативных участков вирусных РНК-зависимых РНК-полимераз (palм-доменов) за счет сравнения их с базой palм-доменов palмDB. Нами были проверены два подхода к решению этой задачи: локальное выравнивание при помощи blastp против базы palм-доменов определенных семейств или применение скрытых марковских моделей (НММ), составленных на основе palм-доменов этого семейства. Проведя тесты, мы получили сопоставимые значения площади под кривой ошибок, при этом анализ с помощью НММ проходит в десятки раз быстрее.

Работа выполнена на базе НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора в рамках госзадания “Разработка алгоритмов для выявления новых, уникальных последовательностей ДНК или РНК в метагеномах и их фенотипическая характеристика in vitro”, номер 12203090069-4.

К ВОПРОСУ ИЗУЧЕНИЯ НОРМЫ ПОСТНАТАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗА СЕРОЙ КРЫСЫ

С.В. Рябов¹, К.С. Горбунов², Р. Кррижо³, А.В. Мелихова¹, Д.Ю. Мохирев¹

¹Лаборатория экспериментальных моделей, ²Лаборатория эпидемиологии человека, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора;

³Российский университет дружбы народов

Постнатальный онтогенез серой крысы – один из центральных вопросов в её биологии. Изменения в организме крысы после рождения и в течение всего периода ее дальнейшего развития – масштабная тема, которая включает в себя множество взглядов, интересов, подходов. В 2022–2023 гг. была проведена работа по нормированию постнатального онтогенеза серой крысы, то есть процесса её развития и роста после рождения и до старости.

Исследование нормы онтогенеза серой крысы проводили на лабораторной популяции грызунов, полученной от диких крыс 30 лет назад, что делает их полезной моделью для изучения различных аспектов нормального физиологического, морфологического и психологического развития и роста серой крысы. В экспериментах участвовало 111 крысят от 14 самок. Всего использовано 125 грызунов. Экспериментальный период составил 258 дней или 8,6 месяцев. Проведено более 22000 измерений. Полученные данные занесены в 28 таблиц Excel. Измерение размеров крыс проводили ежедневно поверенной металлической линейкой. Вес грызунов определяли ежедневно с помощью поверенных электронных весов. Постнатальное индивидуальное развитие это совокупность последовательных морфологических, физиологических и биохимических преобразований, которые претерпевает организм от момента его рождения до конца жизни. Цель исследования была установить норму изменения морфологических и метрические показатели, в динамике роста и развития грызунов и определить критические возрастные периоды в структуре постэмбрионального онтогенеза серой крысы. Первый наиболее критичный возрастной период в структуре постэмбрионального онтогенеза серой крысы это семь первых дней её жизни после рождения. Новорожденные крысы абсолютно лишены волосяного покрова, остаются глухими, слепыми и беспомощными. Однако обоняние и инстинкты у них уже развиты. По запаху детеныши находят сосок матери. Тем не менее новорожденные крысы полностью зависят от матери в питании, так как начинают питаться ее молоком и в выживании, так как мать их не выпускает за пределы гнезда. К концу периода масса крыс увеличивается в 2,5 раза, длина тела и головы в 1,5 раза, хвоста в 6 раз. У крыс открываются уши и они слышат звуки, кожный покров пигментирован, есть небольшой шерстный покров. Крысы активными, и начинают исследовать окружающую среду. Происходят значительные изменения в их внешнем виде и поведении. Они активно осваивают навыки передвижения, в чем им помогает выросший хвост. Вторая и третья неделя жизни крыс — это фаза развития. Крысы быстро растут. У них формируются костная и мышечная структуры, развиваются основные органы и системы организма. На 14–15 день у крыс открываются глаза. Последующие этапы развития включают формирование и созревание нервной системы, позволяющее крысе освоить сложные навыки поведения. Они становятся более социальными и общительными, формируются индивидуальные предпочтения и привычки. Каждая крыса имеет свое индивидуальное развитие и особенности. Это связано с генетическими факторами, условиями выращивания и другими внешними воздействиями. Наблюдение и изучение аналогичных изменений позволяет лучше определить критические периоды важные для развития организма в целом и его адаптацию к окружающей среде. С развитием зубов постепенно, крыса начинает самостоятельно потреблять твердую пищу, и её

пищеварительная система адаптируется к различным типам питания. Для более глубокого понимания нормы постнатального онтогенеза серой крысы в рассматриваемый период планируется провести дополнительные исследования и эксперименты используя протеомику органов и плазмы крови для изучения изменений в составе белков, происходящих на разных стадиях развития после рождения. Одним из вопросов, исследуемых в области постнатального онтогенеза серой крысы, является выявление и анализ нормы процессов, которые могут быть обнаружены, посредством определения белковых профилей в организме крысы в наиболее критический период после ее рождения. Этот период постнатального онтогенеза включает в себя значительные изменения в клетках и органах крысы, анализ которых позволяет лучше понять причины и механизмы развития возможных патологий. Для анализа нормы процессов, происходящих с белками в организме крысы, сначала необходимо определить специфические временные точки исследования, которые наиболее важны для понимания процессов развития крысы. Затем провести сбор образцов плазмы крови, а также тканей или органов серой крысы в этих временных точках. После этого провести извлечение белков из собранных образцов с использованием специальных методов. Это позволит увеличить чувствительность анализа и сократить сложность образца. Для получения более полной картины процессов постнатального онтогенеза серой крысы, необходимо провести сравнительный анализ белковых профилей разных временных точек. Это позволяет выявить динамику изменений белковых составов на разных этапах развития крысы и определить те белки, которые являются ключевыми в этих процессах. Результаты такого анализа могут иметь большое значение для биомедицинских исследований, способствуя развитию новых подходов к диагностике и лечению различных заболеваний.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СЕТЕЙ ГАПЛОТИПОВ ДЛЯ АНАЛИЗА ГЕНОМНЫХ ДАННЫХ SARS-CoV-2

А.Е. Самойлов

Лаборатория математической биологии и биоинформатики, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

Введение. С начала пандемии COVID-19 перед мировым научным сообществом встала проблема анализа геномных последовательностей SARS-CoV-2 (на данный момент накоплено более 16 млн. в GISAID, более 8 млн. в GenBank). Одним из методов отображения и анализа генетической информации является построение сетей гаплотипов, который позволяет преодолеть ограничения классических методов филогенетики.

Материалы и методы. Для отработки метода построения сетей гаплотипов была выбрана линия BA.2 варианта SARS-CoV-2 варианта Omicron (по классификации ВОЗ). В качестве первичных критериев качества последовательности были установлены длина не менее 29 тыс. п. н. и доля N не более 1%. После фильтрации доступных данных, из международной базы данных GISAID был скачан 1343697 геномов, а из национальной российской базы данных VGARus — 3012 геномов, удовлетворяющих заданным критериям. Названия всех последовательностей были приведены к единому формату. За основу фильтрации по качеству была использована биоинформатическая программа Nextclade, которая позволяет получать информацию о последовательностях SARS-CoV-2 (принадлежность к филогенетической кладе, оценка качества, список мутаций и др.) в виде табличных данных. Для более детального анализа качества последовательностей в полученную таблицу помимо уже имеющихся метрик качества были введены дополнительные. В конечном итоге фильтрация осуществлялась по таким параметрам, как дата забора, линия pangolin, критерии качества Nextclade (все равны “good”), полнота генома, наличие псевдореверсий (т.е. отсутствие мутаций, характерных для линии BA.2), за исключением подтверждённых реверсий, а также наличие делеций родительской линии BA.2. Последовательности прошедших фильтрацию неполных геномов из России были восстановлены с помощью выравнивания их на ближайшие к ним полные геномы SARS-CoV-2 и заполнения пропусков консенсусной последовательностью (если она была однозначна; при отсутствии полного консенсуса неполный геном отбрасывался). Для построения сетей гаплотипов из всех полученных геномов были отфильтрованы дубли, из всех дублей для каждой страны была оставлена только первая последовательность. Построение сетей гаплотипов проводилось на основе поиска предков и потомков для каждой последовательности (предком последовательности A считалась другая последовательность, единичные замены в которой являются подмножеством замен последовательности A).

Результаты. После фильтрации низкокачественных и дублирующихся геномов, в анализируемой выборке последовательностей BA.2 осталось 987 геномов, обнаруженных только на территории России. Анализ передачи геномов внутри России в построенных сетях гаплотипов позволил выявить по меньшей мере 203 случая передачи SARS-CoV-2 внутри границ Российской Федерации. Из них 173 (85.2%) приходится на передачу внутри одного субъекта РФ, и 30 (14.8%) приходится на передачу вируса между субъектами РФ (т.е. наблюдение в одном из субъектов РФ определённой вирусной последовательности, а в другом — потомка этой последовательности.)

Выводы. 1. Метод построения сетей гаплотипов является перспективным подходом для изучения распространения патогена между странами и выявлять источники завозных случаев. 2. Метод



НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
СИСТЕМНОЙ БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ
РОСПОТРЕБНАДЗОРА

ИТОГОВАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

Москва

21–22 декабря 2023

построения сетей гаплотипов позволяет выявить направления распространения патогена внутри страны и установить связи между отдельными субъектами Российской Федерации.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ТРАНСФЕКЦИИ МИКРОБИОМА У МЫШЕЙ

А.В. Таллерова

*Лаборатория экспериментальных моделей, НИИ системной биологии и медицины
Роспотребнадзора*

Молекулярными основами влияния микробиоты кишечника на кишечно-мозговую ось (КМО) является продукция микробиомом эффекторных молекул, мишени для которых представлены во всей коммуникационной сети энтеральной и центральной нервных систем. Эта сеть включает эндокринные, гуморальные, метаболические и иммунные пути. Неврологическую модуляцию и влияние на ГГН-ось (гипофиз-гипоталамус-надпочечниковая ось) напрямую осуществляют продуцируемые нейротрансмиттеры: ГАМК (γ -аминомасляная кислота), серотонин, мелатонин, гистамин и ацетилхолин. Микробиота микроглии кишечника регулирует проницаемость эндотелия, тем самым влияет на высвобождение биологически активных пептидов из энтероэндокринных клеток, в частности, на секрецию нейропептида галанина локализованного в головном мозге и желудочном тракте, регулирующего нейробиологические процессы ноцицепции, аппетита, сна, настроения и нейрофической поддержки. Короткоцепочечные жирные кислоты (SCFAs), образующиеся в результате бактериальной ферментации углеводов, регулируют питание энтероцитов, проявляют гормоноподобную активность, обладают иммуномодулирующими свойствами и взаимодействуют с нервными клетками. Микробиом-ассоциированная выработка цитокинового профиля в кишечнике, в частности IL-4 и IL-10, определяет восприимчивость организма к заболеванию, а также дальнейшее направление развитие иммунной реакции. Таким образом, можно заключить, что микробиом-ассоциированные нарушения в кишечно-мозговой оси вовлечены в патогенез различных заболеваний ЖКТ, иммунной системы, метаболического синдрома и психических расстройств. В настоящее время эффективным и перспективным способом лечения рассматривают коррекцию микрофлоры заболевания с помощью микрофлоры здоровых доноров (трансплантация микробиома). Использование экспериментального моделирования трансплантации микробиома предоставляет широкий спектр для анализа различных терапевтических мишеней. На мышах представлено несколько методов экспериментального моделирования трансфекции микробиома, различающиеся местом отбора пробы. По принципу сбора культуры с поперечных срезов тканей кишечника мышей, с последующей отмывкой, выращиванием и заморозкой образцов, был получен устойчивый синком (синтетические микробные сообщества) олиго-мышинной микробиота 12 (ОММ12) широко используемый на моделях гнотобиотных мышей. Процедура трансплантации фекальной микробиоты (ТФМ) заключается во введении в организм пациента микробиоты, полученной от здорового донора. Несмотря на потенциальные положительные результаты ТФМ в различных моделях заболеваний, среди исследовательских групп существуют различия и сложность процедурных соглашений по проведению ТФМ. Моделью для оценки взаимосвязи заболеваний печени и кишечной микробиоты явились мыши с трансплантированной человеческой микробиотой. В очищенный полиэтиленгликолем кишечник грызунов трансфецировали ФМ от человека-донора. Таким образом, можно заключить, что разработка и усовершенствование экспериментальных моделей трансфекции микробиома позволит получить многофункциональную платформу для решения задач молекулярной биологии и биомедицины.

ПРОТЕОМИКА КАК ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

К.С. Горбунов, В.Ю. Куканов, С.Ю. Селезов, О.В. Курилова, А.В. Шунаев, Д.С. Энгин

Лаборатория эпидемиологии человека, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

Традиционная протеомика считается частью широкой биохимии и направлена либо на структурный анализ белков (включая их секвенирование), либо на дифференциальный анализ различных биологических образцов, таких как трансформированные *vs* нормальные клетки. Ещё одним направлением является определение белок-белковых взаимодействий, а также различных пост-трансляционных и иных модификаций белков определение их локализации в клетках органах и тканях. В равной степени, протеомика выступает общим методом системной биологии, позволяющим наблюдать живой организм не как простой набор веществ, но и как динамическую сумму взаимодействующих молекул.

Однако такой подход предполагает редукцию функций организма к масштабной горизонтальной сити взаимодействующих молекул.

Вместе с тем, классическая биология, в том числе классическая физиология основана на иерархии функционально взаимодействующих систем.

Классики отечественной физиологии, такие как А.А. Ухтомский, Н.А. Бернштейн и П.К. Анохин многое сделали для выстраивания простых отправлений организма в сложнейшую функциональную иерархию.

При выполнении государственного задания “Разработка методов молекулярно-генетической диагностики для квантификации саногенеза у здоровых людей” (шифр “НОРМА”, перед коллективом лаборатории эпидемиологии НИИ СБМ Роспотребнадзора встала задача общей характеристики и квалификации интегральных проявлений жизни человека в масштабах его онтогенеза и иных “координатах”, предполагающих оценку его общих свойств. В частности, для этого нами был избран метод анализа протеома плазмы человека и животных (*Rattus norvegicus*).

Но может ли протеомика быть адекватным инструментом для решения, по-существу, физиологических задач? Большинство физиологов настроены скептически, считая её структурным методом, в широком смысле этого понятия.

П.К. Анохину приписывают хлесткое сравнение – изучать ЭЭГ всё равно, что пытаться слушать шум от паровоза. И тем не менее, изучение шумов играет некоторую роль в технике, как и ЭЭГ в физиологии.

В нашем случае мы исходим из того, что протеомика может дать сигнал, отвечающим критериям полезного для физиолога источника информации, а потому предприняли попытку её извлечения из простых протеомных данных и намерены совершенствовать этот подход.

В частности, динамические количественные изменения протеома плазмы мы рассматриваем как проявления процессов синхронизации активности клеточных ансамблей, отражающих взаимодействие различных частей функциональных систем организма.

Мы можем поставить и общий вопрос о соотношении физиологических и системно-биологических методов исследования. Границы между ними весьма условны.

БЕЛКИ И БЕЛКОВЫЕ МАШИНЫ В МЯГКИХ НАНОПОРАХК.А. Иванова, П.В. Башкиров*Лаборатория биоэлектрохимии, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора*

Считывание информации о молекулярных свойствах белков с помощью нанопор является одним из основных инструментов протеомики. Однако данный подход ограничен водорастворимыми белками и часто изолированными от их естественной среды. Мы хотим показать, что биомиметические мембранные нанотрубки, созданные из липидов и специально синтезированных фолдамерных болаамфифильных молекул (ФБА) могут быть использованы как мягкие нанопоры (мНП) с регулируемым радиусом просвета и переносом аналита. Текучесть мембранной стенки обеспечивает управляемую электрическим полем миграцию закрепленных на или в мембране белков и ФБА через мНП. При этом трансислойно ориентированный ФБА контролирует связывание белков снаружи поры. мНП надежно детектирует как одиночные белки внутри просвета, так и динамические деформации мембранной стенки мНП, производимые одиночными белками и белковыми машинами снаружи мНП, которые остаются в контакте со своими физиологическими партнерами. Используя структурное моделирование и флуоресцентную микроскопию одиночных молекул, мы подтвердили, что мНП различает размер и состояние олигомеризации белковых молекул, а также разрешает ГТФазный цикл единичных активной единицы динамина1 мотора. Таким образом, различные режимы чувствительности мНП позволяют комплексно исследовать мембранные процессы, расширяя технологию нанопор до совершенно нового класса белков и интерактонов.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-15-00265.

**РАЗРАБОТКА ЭФФЕКТИВНЫХ ПОКРЫТИЙ НА ОСНОВЕ ПОЛИАНИЛИНА
ДЛЯ СОЗДАНИЯ МИКРОФЛЮИДНОГО КЛАПАНА**

С.И. Моргачева, С.П. Дудик, П.Е. Тюлягин, С.В. Сизова, Д.В. Басманов

Лаборатория микро- и нанофлюидики, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

Тенденция к миниатюризации диагностических медицинских устройств привела к активному применению микрофлюидных технологий, которые позволяют оперировать нанолитровыми объемами жидкости и сократить объемы используемых реагентов. Микрофлюидный чип представляет собой конструкцию из двух герметично соединенных пластин: на одной формируются каналы, клапаны и другие функциональные элементы, а другая служит защитной подложкой. Микрофлюидный клапан в чипе позволяет минимизировать «мертвые» объемы, снизить инертность системы, а также дает возможность оперировать единичными клетками и нанообъектами.

Один из подходов к созданию микрофлюидного клапана основывается на применении электроактивных полимеров, которые изменяют свою форму и размеры при стимуляции электрическим полем. Полианилин (ПАНИ) является представителем этого класса полимеров и обладает выдающимися химическими и физическими свойствами. Структура макромолекулы ПАНИ обратимо изменяется при изменении pH среды. В кислой среде ПАНИ принимает форму эмеральдиновой соли, которая является электроактивной. В форме эмеральдинового основания ПАНИ обладает избирательными сорбционными свойствами в отношении нуклеиновых кислот и белковых молекул и может быть использован для специфической сорбции биомолекул. Указанные свойства, а также подтвержденная биосовместимость делает ПАНИ перспективным материалом для использования в биомедицине. Однако сложность синтеза ПАНИ и получения покрытий ПАНИ с воспроизводимыми свойствами, а также низкая адгезия ПАНИ к подложкам являются основными факторами, сдерживающими практическое применение полимера.

В настоящей работе были исследованы варианты получения равномерных покрытий на основе композитов ПАНИ, синтезированных в присутствии декстрана, полиэтиленimina и сополимеров Kollicoat (MAE 100P и IR, BASF). Морфология синтезированных покрытий была изучена методом АСМ, определялась толщина и шероховатость покрытий. Электроактивные свойства покрытий (увеличение толщины) исследовались методом АСМ при подаче напряжения.

Полученные результаты показывают, что композитные покрытия на основе ПАНИ демонстрируют уширение не менее 40% от изначальной толщины. Текущее уширение уже достаточно для формирования простейших управляемых микрофлюидных клапанов.

ОЦЕНКА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ РАЗМЕРОВ КОЛОНИИ *Mycoplasma gallisepticum* МЕТОДОМ РЕГИСТРАЦИИ ИМПУЛЬСОВ ПРОВОДИМОСТИТ.С. Сапега¹, А.А. Лазарева², Д.С. Матюшкина², П.В. Башкиров¹¹Лаборатория биоэлектрохимии, ²Лаборатория простых систем, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

Бактерии класса микоплазм – модельный организм в области системной биологии, распространённый благодаря отсутствию клеточной стенки и малому размеру генома. Однако помимо омиксных исследований, для которых микоплазмы удобны, возникают задачи, требующие оценки геометрических размеров и/или объёма клеток. Для *M. gallisepticum* линейные размеры лежат в диапазоне 700 нм – 1 мкм, что вносит ограничения на применение методов измерения. Нами собрана установка, позволяющая регистрировать и количественно оценивать размер одиночных клеток, проходящих через устье стеклянной пипетки. В основе предлагаемого метода лежит измерение силы тока с применением усилителя EPC10 USB (HEKA Elektronik, Штутгарт, Германия) через электрическую цепь, содержащую пору с диаметром в микрометровом диапазоне, где при прохождении объекта исследования падение проводимости регистрируется с высокой точностью. Пипетки для анализа образцов получали с использованием пуллера P-2000 (Sutter Instruments, Новато, США) и микрокузницы MF2 Microforge (The NARISHIGE Group, Токио, Япония). На первом этапе работы был произведён подбор параметров вытягивания капилляров для получения воспроизводимых геометрических форм, удовлетворяющих качественным критериям для проведения анализа. На втором этапе мы анализировали стандартные образцы водных растворов, сред и культур клеток *E. coli* и *M. gallisepticum* для оценки времён установления равновесия и подбора электрических условий. В основной части эксперимента мы исследовали образцы *M. gallisepticum*, выращенные в условиях с варьируемой ионной силой культуральной среды и оценивали по записям скачков проводимости распределение размеров клеток в колонии. Сравнение результатов проводили с данными о размерном распределении, полученными методом динамического светорассеяния. Таким образом, была продемонстрирована возможность регистрировать сигнал при прохождении биологических объектов через микропору, который пропорционален объёму объектов, что даёт возможность с высокой точностью оценивать геометрические характеристики как единичных клеток, так и характеризовать целые популяции клеток и описывать их размерные распределения.

ВЫЯВЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ПЕПТИДА СЛИЯНИЯ S БЕЛКА КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2

М.В. Сумарокова, К.А. Иванова, Е.О. Василенко, П.В. Башкиров

Лаборатория биоэлектрохимии, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

Слияние мембран играет важную роль во многих биологических процессах, в том числе определяет эффективность инфицирования клетки оболочечными вирусами. Для слияния клеточного и вирусного липидного бислоя необходимо преодоление значительного энергетического барьера и требуется работа специализированных белков слияния, таких как S белок коронавируса SARS-CoV-2. Функциональная активность этих белков связана с заякориванием в мембрану клетки хозяина и искривлением ее проксимального к вирусу участка в сторону вирусной мембраны. В этом деформируемой области, происходит дестабилизация бислоевой структуры мембраны, запускающая процесс дальнейшей топологической реорганизации – объединение двух бислоев в один. Однако, что именно является катализатором потери структурной устойчивости клеточной мембраны и какую роль при этом играют белки слияния остается мало изученным. В этой работе мы исследовали влияние двух сопряженных участков пептида слияния S белка SARS-CoV-2: FP1 и FP2 на упругие и геометрические характеристики липидного бислоя. Установлено, что FP2 индуцирует кривизну мембраны и не оказывал на изгибную прочность мембраны никакого влияния. Одновременно с этим FP1 дестабилизирует липидный бислой, провоцируя формирование в нем проводящих дефектов, причем активность FP1 растет с кривизной мембраны. Мы заключаем о наличии синергизма в действии этих двух участков пептида слияния, находящихся в непосредственной близости друг от друга. В то время как FP2 способствует искривлению мембраны, FP1 провоцирует ее дестабилизацию. Оба эффекта направлены на уменьшение энергетического барьера на слияния клеточной и вирусной мембраны.

ПРИМЕНЕНИЕ СТАТИСТИЧЕСКОЙ ЭНТРОПИИ ДЛЯ ОПИСАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

В.В. Аристов¹, А.В. Карнаухов², Ю.Д. Нечипуренко³

¹Федеральный исследовательский центр «Информатика и управление» РАН,

²Институт биофизики клетки РАН,

³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

Понятие энтропии (и негэнтропии) используются для характеристики биологической структуры как открытой неравновесной системы. Применяются подходы статистической физики и кинетической теории для развития представлений Шрёдингера [1] о поддержании биоструктуры за счет постоянного притока негэнтропии. Концепция статистической энтропии, применённая к биоорганизмам [2, 3], дополняется и уточняется. Статистические и кинетические методы позволяют построить ряд моделей биологических систем и изучить их общие свойства, включая аспекты деградации (старения), см. [4-5]. Развитие данных моделей видится по нескольким направлениям. Одна из возможностей – изучение старения генома [6] и его восстановление. Для описания этих процессов можно привлекать метод и формализм нашего статистического и кинетического подхода. Представляет смысл проведение оценки изменения статистической энтропии артериальной и венозной крови для отдельного органа, здесь могут помочь эксперименты по изучению компонентов крови, а также некоторые химико-кинетические методы, основанные на подходах работы [7]. Группа Н. Белломо использует методы кинетики активных частиц [8], с помощью такого подхода можно попытаться описать взаимодействия, происходящие в биологической системе. Для анализа экспериментов по программированию и репрограммированию старения, обсуждаемых в [9], можно применить наши подходы, развитые в [3-5].

1. Шрёдингер Э. Что такое жизнь с точки зрения физики. М.: РИМИС. 2009.
2. Блюменфельд Л. Проблемы биофизики. М.: Наука. 1984.
3. Аристов В.В., Карнаухов А.В., Левченко В.Ф., Нечипуренко Ю.Д. Энтропия и информация в описании биосистем. *Биофизика*. 2022, **67(4)**: 1–8.
4. Aristov VV. Biological systems as nonequilibrium structures described by kinetic methods. *Results in Physics*. 2019, **13**: 102232.
5. Aristov VV, Karnaukhov AV, Buchelnikov AS, Levchenko VF, Nechipurenko YD. The degradation and aging of biological systems as a process of information loss and entropy increase. *Entropy*. 2023, **25**: 1067.
6. Карнаухов А.В. и др. Информационная теория старения: основные факторы, определяющие продолжительность жизни. *Биофизика*. 2017, **62(5)**: 1008–1015.
7. Морозова Г.И. и др. Исследование и моделирование реакций лейкоцитов в крови на γ – облучение с использованием энергетических показателей клеток иммунной сети. БФФХ. Материалы XVIII международной научной конференции. Севастополь, 2023, С. 68.
8. Bellomo N et al. Waiting for a mathematical theory of living systems from a critical review to research perspectives. *Symmetry*. 2023, **15**: 351.
9. Yang J-H et al. Chemically induced reprogramming to reverse cellular aging. *Aging*. 2023, **15**: 5966-5989.

РОЛЬ СПЛАЙСИНГОВОГО ФАКТОРА SYNCRIP В МОДУЛЯЦИИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ПЕРСИСТИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К ДНК-ПОВРЕЖДАЮЩИМ АГЕНТАМ

О.М. Иванова, К.С. Ануфриева, А.Н. Казакова, Л.К. Арзуманян, П.В. Шнайдер, М.М. Лукина,
Г.П. Арапиди, В.О. Шендер

*Лаборатория молекулярной онкологии, ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина
ФМБА России*

Опухолевые клетки находятся в постоянном динамичном контакте друг с другом и со своим микроокружением. Ранее нами и другими исследователями было показано, что погибающие под действием радио- или химиотерапии опухолевые клетки секретируют различные сигнальные молекулы во внеклеточное пространство, тем самым способствуя выживанию соседних опухолевых клеток и формированию у них более агрессивного и устойчивого к терапии фенотипа. В частности, в секретах от погибающих под действием химиотерапии опухолевых клеток повышена представленность различных белков сплайсосомы¹⁻³. Экзогенные сплайсосомные белки в составе внеклеточных везикул способны проникать в окружающие опухолевые клетки, однако последующий ход событий такого типа межклеточной коммуникации не ясен. Анализируя наши собственные протеомные данные, данные проекта The Cancer Genome Atlas и различных siRNA скринингов, мы обратили особое внимание на белок SYNCRIP, участвующий помимо сплайсинга пре-мРНК во множестве других процессов биогенеза РНК.

В связи с многообразием функций данного белка был проведен комплексный анализ ответа клеток аденокарциномы яичника с нокадауном или сверхэкспрессией белка SYNCRIP на цисплатин (протеомный анализ, RNA-seq), а также изучены изменения, происходящие в белок-белковом (IP-MS) и РНК-белковом интерактоме (LACE-seq, poly(A)-tail-seq) белка SYNCRIP в тех же экспериментальных условиях.

В ответ на цисплатин усиливалась связь SYNCRIP с белками (RFC5, TRIM25, USP10), обеспечивающими транслезионный синтез ДНК и возможность деления клеток. Кроме того, прогрессированию клеточного цикла способствовало повышение экспрессии ряда циклин-зависимых киназ (*CDK14*, *CDK15*). Также оказалось, что нокадаун SYNCRIP приводит к значительному изменению паттерна полиаденилирования молекул мРНК в клетках SKOV3, в частности, укорочению длины поли(А)-хвостов мРНК генов, необходимых для репарации ДНК (*FANCI*, *XPA*, *ERCC3*, etc.). На белковом уровне в опухолевых клетках со сверхэкспрессией SYNCRIP также повышалась представленность белков репарации, в частности, эксцизионной репарации, что, как мы предполагаем, связано со стабилизацией или повышением эффективности трансляции соответствующих мРНК.

Всё это может являться важными механизмами выживания опухолевых клеток под действием химиопрепаратов, в том числе, в клетках-акцепторах внеклеточных везикул, содержащих среди прочих молекул сплайсосомальный белок SYNCRIP.

Работа поддержана грантом 075-15-2019-1669 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

1. Shender VO, Pavlyukov MS, Ziganshin RH, et al. Proteome-metabolome profiling of ovarian cancer ascites reveals novel components involved in intercellular communication. Mol Cell Proteomics. 2014;13(12):3558-3571.

2. Anufrieva KS, Shender VO, Arapidi GP, et al. Therapy-induced stress response is associated with downregulation of pre-mRNA splicing in cancer cells. *Genome Med.* 2018;10(1):49.
3. Pavlyukov MS, Yu H, Bastola S, et al. Apoptotic Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Malignancy of Glioblastoma Via Intercellular Transfer of Splicing Factors. *Cancer Cell.* 2018;34(1):119-135.e10.

ДЕТЕКЦИЯ ХИМЕРНЫХ ТРАНСКРИПТОВ: НОВЫЙ БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ МЕТОД И СРАВНЕНИЕ СВЕЖЕЗАМОРОЖЕННЫХ И ПАРАФИНИЗИРОВАННЫХ ОПУХОЛЕВЫХ ОБРАЗЦОВ

М.И. Сорокин^{1,2}, И.М. Мусатов^{1,2}, В.К. Лядов^{3,4,5}, М.В. Сунцова¹, М.Р. Гарипов³, А.Б. Семенова³,
Н.Г. Попова³, Е.П. Гугучкин⁷, Е.А. Карпулевич⁷, М.А. Золотовская^{2,6}, А.А. Буздин^{2,6,8}

¹Первый МГМУ им. И.М. Сеченова; ²МФТИ (ГУ); ³ГБУЗ "ГКОБ № 1 ДЗМ"; ⁴ФГБОУ ДПО РМАНПО МЗ РФ;
⁵НГИУВ – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО МЗ РФ, Новокузнецк; ⁶ГНЦ РФ ФГБУ НМИЦ эндокринологии
МЗ РФ; ⁷ИСП РАН; ⁸ИБХ РАН

События слияния генов и появления химерных транскриптов могут быть обнаружены посредством полноэкзомного, полногеномного, таргетного секвенирования ДНК, методом FISH, а также поиском считываний, подтверждающих химерные транскрипты, в данных секвенирования РНК. Образцы опухолей обычно хранятся в парафиновых блоках, что приводит к деградации РНК, в итоге снижая эффективность обнаружения слияния. Также детекция химерных транскриптов может зависеть от биоинформатической обработки. В настоящем исследовании мы впервые сравнили детекцию химерных транскриптов в свежемороженой и парафинизированной опухолевой ткани. Нами разработан метод поиска химерных транскриптов посредством картирования считываний на полную совокупность пересечений экзонов, для улучшения детекции по сравнению с существующими методами STAR-Fusion и Arriba.

Для сравнительного анализа детекции химерных транскриптов в свежемороженой и парафинизированной опухолевой ткани было проанализировано 29 образцов колоректального рака, взятых с согласия пациентов после оперативного вмешательства.

Мы обнаружили меньше случаев слияния в данных секвенирования парафинизированных образцов, несмотря на почти в два раза большую глубину секвенирования, в сравнении со свежей тканью. Наблюдалась значительная положительная корреляция между количеством обнаруженных химерных транскриптов и глубиной секвенирования, как для данных парафинизированных образцов, так и для свежих тканей. Однако при объединении наборов данных – корреляции не было. В одном образце свежей ткани мы обнаружили новое, потенциально клинически эффективное, необратимое слияние *LRRFIP2-ALK*. Это слияние сохраняет полный киназный домен гена *ALK*, что позволит прицельно применять ингибиторы *ALK*. Данные РНК секвенирования образца, после процедуры парафинизирования, для данного пациента не содержали необходимого количества считываний, подтверждающих это слияние. Кроме того, как в свежей РНК, так и в полученной из парафинизированных образцов, мы обнаружили асимметрию покрытия экзонов *ALK*, подтверждающую событие слияния генов. Таким образом, анализ покрытия экзонов может стать полезным подходом для идентификации химерных транскриптов, особенно в образцах ткани парафинизированных образцов.

Также разработан биоинформатический метод детекции химерных транскриптов в образцах парафинизированных тканей, посредством картирования считываний из образцов пациентов на полную совокупность пересечений экзонов. Для 380 пациентов из клинического испытания NCT03724097 показано, что разработанный метод позволяет находить новые химерные транскрипты, которые не детектируются классическими методами STAR-Fusion и Arriba.

Исследование финансировано грантом РНФ №22-24-00682.

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПРОТЕАЗ ЧЕЛОВЕКА, СПОСОБНЫХ АКТИВИРОВАТЬ
S-БЕЛОК КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2, С ПОМОЩЬЮ
БИОИНФОРМАТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ
ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ СОБЫТИЙ**Е.В. Матвеев¹, М.Д. Казанов¹¹*Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН*

Проникновение коронавируса SARS-CoV-2 в клетку начинается с взаимодействия белка-шипа (S-белка) вирусной оболочки с клеточным рецептором ACE2. При этом известно, что данный механизм проникновения связан с активностью трансмембранной протеазы TMPRSS2, которая обеспечивает специфическое расщепление S-белка перед тем, как произойдет слияние вирусной оболочки с клеточной мембраной. Однако это не единственный способ вируса проникнуть в клетку организма-хозяина. Существует и альтернативный путь, в котором привлекаются протеазы лизосом, а именно катепсин L. При этом предполагается, что оба механизма проникновения коронавируса в клетку не ограничиваются включением только вышеупомянутых протеаз. Основная проблема заключается в том, что до конца не ясно, какие протеазы человека могли бы способствовать проникновению вирусной частицы в клетку. Также до сих пор не удалось идентифицировать позиции протеолитических расщеплений в S-белке от некоторых протеаз, включая катепсин L. Мы разработали модели предсказания протеолитических событий, основываясь на информации о субстратной специфичности 169 протеаз человека, в виде позиционно-весовых матриц (PWM), собрали дополнительную информацию о клеточной локализации ферментов и их локализации экспрессии в тканях, а затем применили полученные модели к белку-шипу коронавируса, чтобы оценить подверженность протеолизу данного белка в зависимости от различных протеолитических ферментов. При этом валидацию полученных моделей мы осуществляли на уже известных протеолитических сайтах в S-белке: R815 от TMPRSS2 и R685 от фуриновой протеазы. Также для достижения наших целей мы применили и другой метод, разработанный нами ранее, который при прогнозировании протеолитических событий отталкивается от информации о структуре белкового субстрата. В результате нам удалось выдвинуть предположения о том, какие протеазы могли бы быть задействованы в протеолитической активации S-белка, а, следовательно, и в проникновении коронавируса в клетку, а также, что позиция K790 является наиболее предпочтительным вариантом для расщепления катепсином L.

**ТРАНСКРИПЦИОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ В КОНТРОЛЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ
ЖИЗНИ И ЛЕКАРСТВЕННОЙ ТЕРАПИИ СТАРЕНИЯ**Е.Г. Пасюкова, О.Ю. Рыбина*Лаборатория геномной изменчивости, НИЦ «Курчатовский институт»*

В многоклеточном организме транскрипционная регуляция играет ключевую роль в его развитии, функционировании и старении. Показано, что около 70% генов изменяют свою транскрипцию с возрастом. Однако о том, как происходит регуляция экспрессии генов в процессе жизненного цикла и как она связана с контролем продолжительности жизни, известно мало. Используя *Drosophila melanogaster* в качестве модельного организма, мы показали, что изменение экспрессии транскрипционного фактора РНК-полимеразы II Lim3, необходимого для развития нервной системы и обеспечения правильной мышечной иннервации дрозофилы, влияет на ее продолжительность жизни. Снижение экспрессии этого гена в нервной системе и мышцах приводило к увеличению продолжительности жизни мух и изменению различных структурно-функциональных признаков. Чтобы определить механизмы, лежащие в основе влияния Lim3 на продолжительность жизни дрозофилы, мы изучили естественную изменчивость регуляторной области Lim3 и обнаружили, что встречающийся в природе полиморфизм промотора Lim3, который связан с различным уровнем экспрессии гена и контролем продолжительности жизни дрозофилы, локализован исключительно в регуляторном элементе PRE. Мы выявили, что эта область функционально обогащена белками групп Polycomb (Pc) и Trithorax (Ash1). Таким образом, белки PcG и TrxG, которые являются ключевыми регуляторами транскрипции, непосредственно участвуют в регуляции экспрессии нейронального гена Lim3 и контроле продолжительности жизни дрозофилы. Принимая во внимание полученные результаты, мы провели поиск новых герпротекторов на основании анализа использования известных комбинаций соединений для наиболее эффективного увеличения продолжительности жизни различных организмов, а также на основе анализа транскрипционных профилей, полученных в результате воздействия различных веществ, что позволило выявить ряд соединений, которые, влияя на ключевые регуляторы транскрипции, способны восстанавливать транскрипцию генов, меняющих свою экспрессию с возрастом, до уровня транскрипции этих генов в более молодом состоянии и, таким образом, эффективно влиять на продолжительность жизни организма.