

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ТЮМЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
БИОМЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ ИМЕНИ В. Н. ОРЕХОВИЧА

III ЕЖЕГОДНАЯ ШКОЛА  
МОЛОДЫХ ИССЛЕДОВАТЕЛЕЙ  
ПО ГЕНЕТИЧЕСКИМ ТЕХНОЛОГИЯМ

Тезисы докладов

г. Тюмень, 10 октября 2024 г.

Тюмень  
ТюмГУ-Press  
2024

УДК 575(043)  
ББК Е44я431  
Т666

*Ответственный редактор:*

А. С. Прохорин — доцент, заместитель директора Института экологической и сельскохозяйственной биологии (Х-БИО) Тюменского государственного университета

*Составитель:*

А. А. Загряжская — лаборант международной комплексной научно-исследовательской лаборатории по изучению изменения климата, землепользования и биоразнообразия Института экологической и сельскохозяйственной биологии (Х-БИО) Тюменского государственного университета

T666 **III ежегодная Школа молодых исследователей по генетическим технологиям : тезисы докладов, г. Тюмень, 10 октября 2024 г. / отв. ред. А. С. Прохорин ; сост. А. А. Загряжская ; Министерство науки и высшего образования, Тюменский государственный университет ; Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича. — Тюмень : ТюмГУ-Press, 2024. — 28 с. — Текст : электронный.**

ISBN 978-5-400-01807-7

В сборнике тезисов докладов представлены работы III ежегодной Школы молодых исследователей по генетическим технологиям, посвященные изучению биобезопасности, развитию сельского хозяйства и методов регенеративного земледелия, перспективам омиксных технологий и биоинформатической обработки данных, а также применению генетических технологий в медицине.

Адресуется студентам, интересующимся научно-исследовательской деятельностью, и аспирантам.

*Научно-практическая конференция проведена в рамках проекта «Микробиомы агроценозов: масштабный скрининг, мониторинг и методы управления консорциумами микроорганизмов для регенеративного земледелия», грант в форме субсидии из федерального бюджета научным организациям и образовательным организациям высшего образования на реализацию отдельных мероприятий Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2030 гг. (Соглашение № 075-015-2021-1345)*

УДК 575(043)  
ББК Е44я431

ISBN 978-5-400-01807-7

© Тюменский государственный университет, 2024  
© Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича, 2024

## **СОДЕРЖАНИЕ**

<b>Сучко П. А., Некрасова Д. А., Данилов Л. Г.</b>	
Модификация метода NGS и разработка алгоритма биоинформационического анализа данных для профилирования метилирования ДНК.....	4
<b>Пономарев К. О., Дрягина А. А., Елина Е. И.</b>	
Агротехнологический прием мониторинга состояния растений.....	8
<b>Радько С. П., Курбатов Л. К., Хмелёва С. А., Птицын К. Г., Лисица А. В.</b>	
Биосенсорные платформы для ДНК-диагностики фитопатогенов на основе CRISPR/Cas-нуклеаз.....	12
<b>Хмелёва С. А., Курбатов Л. К., Птицын К. Г., Радько С. П., Лисица А. В.</b>	
Комбинирование методов изотермической амплификации NASBA и RPA с CRISPR/Cas-нуклеазами Cas13a и Cas12a для детекции фитопатогенов <i>Clavibacter sepedonicus</i> и <i>Dickeya solani</i> , вызывающих бактериозы картофеля.....	15
<b>Ромашин Д. Д., Русанов А. Л., Лузгина Н. Г.</b>	
CRISPR-интерференция в анеуплоидных кератиноцитах HaCaT .....	18
<b>Линская П. М., Котельников Д. Д., Деменчук Я. В.</b>	
РНК-интерференция <i>in silico</i> : конструирование миРНК и молекулярная динамика комплекса типа белок-РНК на примере прионной болезни .....	20
<b>Козлова А. С., Радько С. П., Пономаренко Е. А., Лисица А. В., Ильгисонис Е. В.</b>	
Сопоставление эпигранскриптома и эпигранслятома эмбриональных стволовых клеток (hESC).....	24
<b>Такташов Р. Р., Дмитриев А. В., Филимонов Д. А.</b>	
Компьютерный прогноз межлекарственных взаимодействий.....	25

# **МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА NGS И РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА БИОИНФОРМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДАННЫХ ДЛЯ ПРОФИЛИРОВАНИЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК**

**Сучко П. А.<sup>1,2</sup>, Некрасова Д. А.<sup>3</sup>, Данилов Л. Г.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Санкт-Петербургский государственный университет,  
Университетская наб., д. 7-9, г. Санкт-Петербург, Россия, 199034*

<sup>2</sup>*Сургутский государственный университет, пр. Ленина, д. 1, г. Сургут,  
Ханты-Мансийский автономный округ-Югра, Россия*

<sup>3</sup>*Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический  
университет, ул. Профессора Попова, д. 14, г. Санкт-Петербург, Россия,  
197022*

**Введение.** 5-метилцитозин является наиболее изученной и распространенной модификацией в организмах эукариот и участвует в регуляции транскрипции, репликации, подавлении чужеродных генетических элементов и др. генетических процессах. Повторяющиеся паттерны метилирования ДНК рассматриваются как высокочувствительные биомаркеры различных патологических процессов [1]. Из-за принципиальных ограничений существующих методов профилирования метилирования ДНК поиск новых подходов для конкретных практических приложений остается актуальной научной проблемой [2]. В данной работе выполнялась модификация метода NGS, основанного на фрагментации метилированных сайтов эндонуклеазой GlaI, ранее предложенная Абдурашитовым и др. [3]. Основным недостатком этого подхода является потеря информации о множестве сайтов метилирования из-за образования фрагментов, не пригодных для секвенирования с короткими прочтениями.

**Цель работы.** Расширение охвата метилированных сайтов RCGY и разработка собственного алгоритма биоинформационического анализа данных NGS для профилирования метилирования ДНК.

**Материалы и методы.** С помощью программного пакета ddRADseqTools предварительно был оценен охват генома человека (сборка hg38) при фрагментации дополнительными рестриктазами HaeIII, Bst2UI и RsaI в целевом диапазоне длин 100-600 п.н. ДНК выделялась из венозной крови с использованием набора Nucleic Acid Extraction Kit (BGI, Китай), а затем тестировался последовательный двойной гидролиз метилспецифической эндонуклеазой GlaI и одной из трех вышеперечисленных эндонуклеаз (SibEnzyme, Россия). Промежуточная очистка гидролизата и конечный отбор фрагментов целевого размера осуществлялся на магнитных частицах Hieff NGS DNA Selection Beads; (Yeasen, Китай). Анализ фрагментного состава ДНК выполнялся на станции автоматизированного электрофореза TapeStation 4150 (Agilent Technologies, США). Дальнейшая подготовка NGS-библиотек осуществлялась с использованием набора MGIEasy Universal DNA Library Prep Set (MGI, Китай) в соответствии с рекомендациями производителя. Полученные библиотеки секвенировали на платформе DNSEQ-G400 с применением набора DNBSEQ-G400RS High-throughput Sequencing Set FCL PE150 (MGI, Китай). В пилотном запуске было задействовано 7 образцов от разных пациентов, среди которых шестеро происходили из одной семьи и по материнской линии имели ряд схожих симптомов (аномалии сетчатки глаза, гипотиреоз, ожирение, у probanda также наблюдалась задержка в развитии).

Анализ качества прочтений выполнялся с использованием утилиты FastQC, выравнивание на эталонный геном hg38 (GRCh38) осуществлялось в программе bowtie2. Для фильтрации прочтений, несущих на концах продукты расщепления сайтов RCGY, был написан скрипт на языке Python. По результатам обработки были сформированы сводные таблицы, содержащие информацию о покрытии предполагаемых сайтов метилирования в сравнении со средним покрытием по хромосоме.

**Результаты и обсуждение.** По результатам моделирования расщепления эталонного генома рестриктаза *Bst*2UI потенциально образует наибольшее количество фрагментов целевого размера. В ходе тестирования трех схем двойного последовательного гидролиза вариант *Gla*I+*Bst*2UI позволил получить наибольшее количество фрагментов в диапазоне длин 100-600 п.н., что потенциально может способствовать более широкому охвату сайтов метилирования, чем при гидролизе геномной ДНК только *Gla*I. Преимуществом предлагаемого подхода является относительная простота, дешевизна рабочего процесса подготовки NGS-библиотек и возможность одновременного анализа генетических вариаций и профилей метилирования в рамках одного тестирования, в отличие от бисульфитного секвенирования. Для выполнения пробоподготовки требуется 500-1000 нг геномной ДНК, что по затратам биоматериала сопоставимо с такими методами профилирования метилирования, как MRE-seq и MeDIP-seq. В ходе пилотного запуска было получено в среднем 75,7 млн прочтений на образец, соответствующих оценке качества  $Q \geq 30$ .

При картировании последовательностей, соответствующих паттерну расщепления метил-специфической эндонуклеазы *Gla*I, было обнаружено, что выравнивание происходит одновременно на все хромосомы с высоким покрытием, что может быть связано с присутствием в прочтениях большого количества повторяющихся последовательностей. Данная проблема может быть решена при повторном секвенировании с увеличенной длиной прочтений либо путем поиска пересечений с картированными смоделированными фрагментами, потенциально образуемых при расщеплении эталонного генома *Gla*I, что и было реализовано в ходе исследования. По результатам анализа участков метилирования с покрытием не менее 10x было установлено, что большая часть подобных сайтов расположена на 1 и 7 хромосомах. Выявленная особенность может указывать

на наличие патогенного паттерна гиперметилирования, который должен быть подтвержден альтернативным методом анализа. В дальнейшем также планируется осуществить секвенирование образцов пациентов с подтвержденными однородительскими дисомиями хромосом при увеличенной расчетной глубине покрытия для тестирования разработанного метода в качестве средства первичного скрининга данных аномалий.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда научно-технологического развития Югры в рамках научного проекта № 2023-569-05.

#### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Van der Laan L., Rooney K., Trooster T. M. [et al.] (2022). DNA methylation episignatures: insight into copy number variation. *Epigenomics*, 14(21), 1373–1388. <https://doi.org/10.2217/epi-2022-0287>
2. Li S., Tollefsbol T. O. (2021). DNA methylation methods: Global DNA methylation and methylomic analyses. *Methods (San Diego, Calif.)*, 187, 28–43. [https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.10.002](https://doi.org/10.1016/jymeth.2020.10.002)
3. Abdurashitov M. A., Tomilov V. N., Gonchar D. A. [et al.] (2015) Mapping of R(5mC)GY Sites in the Genome of Human Malignant Cell Line Raji. *Biol Med (Aligarh)* 7(4): BM-135-15, 6 pages.

# АГРОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПРИЕМ МОНИТОРИНГА СОСТОЯНИЯ РАСТЕНИЙ<sup>1</sup>

Пономарев К. О., Дрягина А. А., Елина Е. И.

Тюменский государственный университет,  
ул. Володарского, д. 6, г. Тюмень, Россия;  
*k.o.ponomarev@utmn.ru*

Современные агротехнологии требуют разработки новых методов улучшения качества урожая и мониторинга состояния микрозелени, овощной низкорослой продукции, ягодных и зерновых культур. Одним из таких методов является использование биоугля, который, оставаясь в стабильной форме, улучшает структуру почвы, увеличивает урожайность и не оказывает значительного влияния на ферментативную активность почв [1]. Положительный эффект внесения такого органогенного мелиоранта неоднократно наблюдался исследователями по всему миру [2]. Помимо этого, цифровая трансформация АПК, позволяющая использовать мультиспектральные камеры для диагностики изменений показателей растительности на основе данных видимого и ближнего инфракрасного спектра, является неотъемлемой частью современного мониторинга агрофитоценозов [3]. Как по внесению биоугольных мелиорантов, так и по цифровой трансформации Россия отстает от Китая, США и Европы как минимум на 10 лет. Поэтому необходимо не только развитие таких национальных проектов как «Экономика данных и цифровая трансформация государства», но и разработка

---

<sup>1</sup> Исследования проводились при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках проекта № 23-76-01011 «Разработка высокопродуктивного субстрата с использованием биоугольных мелиорантов из термически переработанного органического сырья для выращивания микрозелени и овощной низкорослой продукции» (<https://rscf.ru/project/23-76-01011/>).

новых агротехнологических приемов повышения качества растений, скорости их роста и мониторинга их состояния. Выдвинута гипотеза, что цифровой мониторинг показателей агроэкосистем с использованием мультиспектральных снимков и расчетом вегетационных индексов (например, нормализованного индекса биомассы – NDVI), способен зарегистрировать изменения в растениях, выращиваемых в почвах с внесенными высокоуглеродистыми пористыми мелиорантами, задолго до того, как они появятся в видимом спектре.

В данном исследовании были проведены эксперименты по изучению влияния биоугля из скорлупы кедрового ореха на состояние растений. На первом этапе проведены эксперименты по выращиванию микрозелени в почве с добавлением биоугля из скорлупы кедрового ореха в различных концентрациях (рис. 1). На втором этапе биоуголь как почвенная добавка был использован для выращивания зерновой культуры. С использованием мультиспектральной съемки проводилась оценка состояния растений (рис. 2).

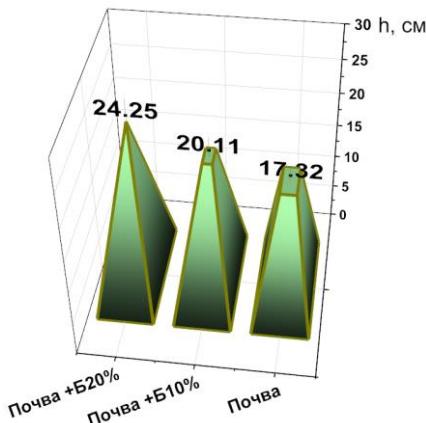


Рис. 1. Влияние биоугля на суммированную по вегетационному сосуду высоту микрозелени

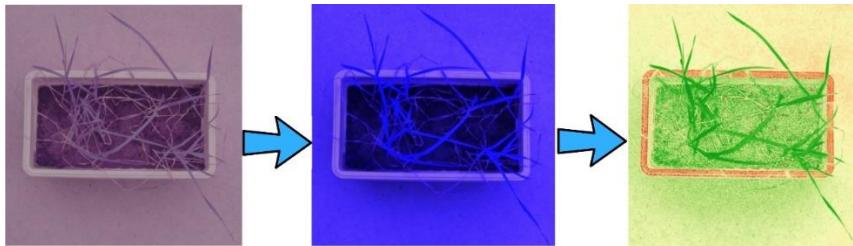


Рис. 2. Процесс обработки мультиспектрального снимка

На первом этапе исследований результаты показали, что всхожесть растений при внесении биоугля из скорлупы кедровых орехов увеличивается. Суммированная по всему вегетационному сосуду высота растений, выращенных в субстратах на основе почвы, увеличивается в 1,1-1,4 раза (прирост до 40% при внесении двадцати процентов биоугля). Суммарное количество листьев также увеличилось в 1,5 раза при внесении 10% биоугля и в 2,2 раза при внесении 20% биоугля. Показано, что внесение большей концентрации биоугольного мелиоранта в почву приводит к лучшему урожаю растений. Данный вывод согласуется с результатами других исследователей, проводивших эксперименты по выращиванию овощной сельскохозяйственной продукции [4].

На втором этапе экспериментов использовалась мультиспектральная камера для оценки состояния растений. Снимки обрабатывались в специальном программном обеспечении. На основании полученных фотоснимков установлено, что зерновая культура, выращиваемая на почве без биоугля, отставала по стадиям роста и развития от варианта с биоуглем.

Таким образом, применение нового агротехнологического приема мониторинга состояния растений, включающего использование углеродистого продукта, полученного методом термической деструкции отходов без доступа кислорода, и мультиспектральной съемки имеет высокие перспективы,

в том числе с точки зрения биобезопасности, сокращая риски интродукции организмов, вредных для растений. Дальнейшее развитие данного приема возможно благодаря разработке и внедрению новых программных обеспечений на основе нейросетей.

## **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Рижия Е. Я., Бойцова Л. В., Вертебный В. Е., Horak J., Москвин М. А., Дубовицкая В. И., Хомяков Ю. В. Изменчивость полифенолоксидазной и пероксидазной активности агродерново-подзолистой почвы разной окультуренности с биоуглем // Сельскохозяйственная биология. — 2022. — Т. 57, № 3. — С. 476-485.
2. Lu Y., Gu K., Shen Z., Tang C. S., Shi B., Zhou Q. Biochar implications for the engineering properties of soils: A review // Science of The Total Environment. — 2023. — Vol. 888. — P. 164185.
3. Оленин О. А., Зудилин С. Н., Шевченко С. Н., Осоргин Ю. В., Чернов А. С. Цифровой мониторинг показателей агрофитоценозов на основе беспилотных технологий // Плодородие. — 2019. — № 5 (110). — С. 56-59.
4. Бовсун М. А., Нестерова О. В., Семаль В. А., Сакара Н. А., Брикман А. В., Карпенко Т. Ю., Тарасова Т. С. Влияние внесения биоугля на урожайность сельскохозяйственных культур // Вестник Томского государственного университета. Биология. — 2023. — № 61. — С. 6-26.

# БИОСЕНСОРНЫЕ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ДНК-ДИАГНОСТИКИ ФИТОПАТОГЕНОВ НА ОСНОВЕ CRISPR/CAS-НУКЛЕАЗ<sup>1</sup>

Радько С. П.<sup>1</sup>, Курбатов Л. К.<sup>1</sup>, Хмелёва С. А.<sup>1</sup>,  
Птицын К. Г.<sup>1</sup>, Лисица А. В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт биомедицинской химии  
имени В. Н. Ореховича, ул. Погодинская, д. 10, г. Москва, Россия, 119121;  
*radkos@yandex.ru*

<sup>2</sup>Тюменский государственный университет, ул. Володарского, д. 6,  
г. Тюмень, Россия, 625003

CRISPR/Cas-нуклеазы стали активно использоваться для разработки систем ДНК-диагностики, в первую очередь нацеленных на проведение диагностики во внелабораторных условиях (англ. point-of-need testing, PONT), начиная с 2017-2018 гг., после появления первых диагностических платформ — DETECTR и SHERLOCK. Направление получило известность как CRISPR/Cas-диагностика. В его основе лежит способность CRISPR/Cas-нуклеаз приобретать так называемую коллатеральную активность (или *trans*-активность) после узнавания комплексом нуклеазы и нРНК (направляющая РНК; англ. guide RNA) ДНК- или РНК-мишени. Узнавание происходит путём формирования дуплекса между участком нРНК («спейсер») длиной 20-30 нуклеотидов с комплементарным ему участком («прото-спейсер») ДНК- или РНК-мишени. Появление коллатеральной активности, указывающие на присутствие мишени, детектируется чаще всего по измерению интенсивности флуоресценции, которое вызывается расщеплением активированной Cas-нуклеазой коротких ДНК- или РНК-олигонуклеотидов —

---

<sup>1</sup> Работа поддержана в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2030 гг. (Соглашение № 075-15-2021-1345, уникальный идентификатор RF-193021X0012).

«репортёров». «Репортёры» несут на 5'- и 3'-концах флуорофор (как правило, флуоресцеин) и молекулу, способную поглощать испускаемые флуорофором фотоны («гаситель»). При их расхождении в пространстве при деградации «репортёра» Cas-нуклеазой, «гаситель» теряет способность эффективно поглощать испускаемые фотоны, что приводит к значительному (в десятки и сотни раз) возрастанию интенсивности флуоресценции. Возрастание флуоресценции может быть определено как инструментальными методами с использованием флуориметра, так и визуально, невооружённым глазом (неинструментальная детекция), при освещении тест-пробы синим (длина волны 400-500 нм) светом по изменению её окраски (колориметрический метод). Также возможна детекция иммунохимическим методом с помощью коммерческих тест-полосок — для этого «репортёры» должны нести на концах молекулы флуоресцеина и биотина. Сегодня в CRISPR/Cas-диагностике оформились два основных подхода: прямая детекция ДНК- и РНК-мишеней CRISPR/Cas-нуклеазами и сочетание методов изотермической амплификации нуклеиновых кислот с селективной CRISPR/Cas-детекцией целевых ампликонов.

К настоящему времени предложены биосенсорные платформы на основе CRISPR/Cas-нуклеаз для детекции таких фитопатогенов, как *Phytophthora ramorum* (фитопатогенный оомицет, вызывающий фитофтороз древесных и кустарниковых культур), *Magnaporthe oryzae* и *Puccinia striiformis* (патогенные грибы, вызывающие опасные заболевания зерновых культур — ожог колоса пшеницы и желтую (полосатую) ржавчину пшеницы, соответственно), *Pseudomonas syringae* и *Rhizobium radiobacter* (бактериальные патогены, поражающие широкий круг растений и вызывающие, в том числе, стеблевой и корневой рак), а также разнообразных фитопатогенных вирусов (вирусов картофеля X и Y, вируса табачной мозаики, вируса желтой курчавости листьев томата, и ряда вирусов, поражающих яблони)

и вироида морщинистости плодов яблони. Во всех случаях использовалось CRISPR/Cas-нуклеаза Cas12a, которая в комплексе с нРНК способна узнавать последовательность в двухнитевой ДНК и, после активации, неспецифически расщеплять ДНК-олигонуклеотиды. Для детекции фитопатогенов, Cas12a использовалась в сопряжении с методами изотермической амплификации ДНК, такими как полимеразная рекомбиназная амплификация и петлевая амплификация. В случае РНК-вирусов, амплификации предшествовал этап получения кДНК обратной транскрипцией. В предложенных биосенсорных платформ для детекции фитопатогенов использовалась как инструментальная детекция, так и неинструментальная (либо колориметрическим методом по изменению цвета пробы, либо с использованием иммунохимических тест-полосок). Разработанные платформы продемонстрировали высокую чувствительность и селективность детекции и полное совпадение результатов определения фитопатогенов с результатами, полученными методом полимеразной цепной реакции, которая является «золотым стандартом» современной ДНК-диагностики. Однако до настоящего времени эффективность таких платформ была продемонстрирована исключительно в лабораторных условиях. Очевидно, что перспективы внедрения в сельскохозяйственную практику биосенсорных платформ для ДНК-диагностики фитопатогенов на основе CRISPR/Cas-нуклеаз, как предложенных к настоящему времени, так и разработанных в будущем, будут зависеть от результатов верификации их эффективности в условиях использования на агропредприятиях.

# **КОМБИНИРОВАНИЕ МЕТОДОВ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ NASBA И RPA С CRISPR/Cas-НУКЛЕАЗАМИ Cas13а И Cas12а ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ФИТОПАТОГЕНОВ CLAVIBACTER SEPEDONICUS И DICKEYA SOLANI, ВЫЗЫВАЮЩИХ БАКТЕРИОЗЫ КАРТОФЕЛЯ<sup>1</sup>**

**Хмелёва С. А.<sup>1</sup>, Курбатов Л. К.<sup>1</sup>, Птицын К. Г.<sup>1</sup>,  
Радько С. П.<sup>1</sup>, Лисица А. В.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Научно-исследовательский институт биомедицинской химии  
имени В. Н. Ореховича, ул. Погодинская, д. 10, г. Москва, Россия, 119121;  
radkos@yandex.ru*

<sup>2</sup>*Тюменский государственный университет, ул. Володарского, д. 6,  
г. Тюмень, Россия, 625003*

Бактерии *Dickeya solani* и *Clavibacter sepedonicus* являются крайне вредоносными возбудителем заболеваний картофеля, известных как «черная ножка» (или «мокрая гниль») и «кольцевая гниль», соответственно, которые могут приводить к потере до 75% корнеплодов. В настоящее время их выявление основано преимущественно на ПЦР-диагностике, которая проводится в специализированных лабораториях. Разработка подходов к внелабораторной ДНК-диагностике (англ. “point-of-need testing”, PONT) данных фитопатогенов может расширить возможности их раннего выявления, способствовать усилению контроля за их распространением и своевременному проведению мероприятий, нацеленных на борьбу с развитием заболевания.

Комбинирование CRISPR/Cas-нуклеаз и методов изотермической амплификации нуклеиновых кислот рассматривается

---

<sup>1</sup> Работа поддержана в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2030 гг. (Соглашение № 075-15-2021-1345, уникальный идентификатор RF-193021X0012).

сегодня как наиболее перспективный подход к созданию высокочувствительных и селективных методов молекулярной диагностики патогенных микроорганизмов и вирусов, которые могут использоваться как в практике специализированных диагностических лабораторий, так и в формате РОНТ. Две технологии детекции, известные как SHERLOCK (Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter un-LOCKing) и DETECTR (DNA endonuclease-targeted CRISPR *trans* reporter), впервые предложенные в 2017-2018 гг., получили наибольшее распространение для практической реализации данного подхода.

Для определения патогена *D. solani* нами была адаптирована технология DETECTR, которая основана на комбинировании рекомбиназной полимеразной амплификации (recombinase polymerase amplification, RPA) ДНК с селективной детекцией целевых RPA-ампликонов CRISPR-нуклеазой Cas12a. Разработанный тест позволил детектировать *D. solani* с высокой селективностью и чувствительностью (до 1 копии бактериального генома в RPA-пробе) в присутствии избытка ДНК картофеля. Детекция может быть выполнена как с использованием инструментальных методов (измеряя усиление интенсивности флуоресценции в тест-пробе на флуориметре), так и неинструментальных — по изменению окраски пробы при её освещении синим светом.

Также нами был разработан тест для определения бактерии *C. sepedonicus* в клубнях картофеля комбинированием метода прямой изотермической амплификации РНК, известного как NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification; рус. амплификацией на основе последовательности нуклеиновой кислоты) с селективной детекцией целевых РНК-ампликонов с помощью CRISPR-нуклеазы Cas13a. Тест позволяет детектировать рРНК 16S *C. sepedonicus* с пределом обнаружения  $10^3$  копий в присутствии избытка РНК картофеля (одна бактериальная клетка в среднем содержит около  $10^4$  копий рРНК 16S). Предел обнаружения жизнеспособных бактерий данным методом составил

24 колониеобразующих единиц в 1 г картофеля. Была показана возможность проведения тестирования в одной реакционной пробирке (англ. “one-pot testing”) с использованием как инструментальной, так и неинструментальной (по изменению окраски пробы) детекции. Разработанные тесты создают основу для расширения возможностей диагностики заболеваний картофели, вызываемых бактериальными патогенами *D. solani* и *C. sepedonicus*, путём её проведения в формате PONT на территориях агропредприятий.

# **CRISPR-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ В АНЕУПЛОЙДНЫХ КЕРАТИНОЦИТАХ HaCaT<sup>1</sup>**

**Ромашин Д. Д., Русанов А. Л., Лузгина Н. Г.**

*Научно-исследовательский институт биомедицинской химии  
имени В. Н. Ореховича, ул. Погодинская, д. 10, г. Москва, Россия, 119121*

Инактивация гена является эффективным инструментом для исследования функций кодируемого белка. Малые РНК, образующие шпильки, используются для подавления экспрессии генов путем РНК-интерференции, однако, подавляющее большинство подобных РНК обеспечивает лишь частичное подавление экспрессии гена. CRISPR-интерференция позволяет выполнить полный нокаут целевых генов, поэтому технологии на основе систем CRISPR/Cas активно развиваются. Нуклеаза Cas9 эффективно индуцирует мутагенез в сайтах узнавания, однако наличие неспецифических эффектов является существенным ограничением системы CRISPR/Cas9. Стратегия двойного разрезания с использованием парных направляющих РНК и мутантной нуклеазы Cas9<sup>D10A</sup> позволяет выполнять нокаут генов с высокой эффективностью и минимальными побочными эффектами.

Линия кератиноцитов HaCaT достаточно точно воспроизводит свойства первичных кератиноцитов человека и широко используется в качестве модели эпидермиса. Наиболее значимой особенностью данной линии является наличие двух мутаций в гене TP53 (R282Q и H179Y), оказывающих существенное влияние на функциональный статус p53. Исследование особенностей мутантной формы p53<sup>R282Q/H179Y</sup> представляет большой интерес, так как аналогичные мутации часто встречаются при

---

<sup>1</sup> Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021-2030 гг.) (№ 122022800481-0).

различных типах рака, включая плоскоклеточную карциному кожи. Клетки НaCaT несут анеуплоидный хромосомный набор, а также плохо поддаются трансфекции и трансдукции, что снижает эффективность большинства методов инактивации генов в клетках данной линии.

С помощью конструкции pLKO-p53-shRNA-941 был выполнен нокдаун *TP53*, однако, эффективность подавления гена составила около 50%, что недостаточно для функциональной характеристики клеток в условии репрессии *TP53*. С использованием системы CRISPR/Cas9<sup>D10A</sup> впервые был выполнен полный нокаут *TP53*, что свидетельствует об эффективности выбранного подхода применительно к анеуплоидным клеточным линиям. Для исследования особенностей данной формы p53 было выполнено молекулярное профилирование клеток новой линии и дикого типа. Результаты транскриптомного и протеомного анализа выявили увеличение в клетках с нокаутом белков, связанных с клеточной адгезией, миграцией, трансляцией и биосинтезом. В то же время в клетках с нокаутом *TP53* наблюдалось снижение экспрессии ключевых маркеров дифференцировки (*KRT10*, *IVL*). Было зарегистрировано смещение транскриптомного профиля клеток с нокаутом *TP53* в сторону мезенхимального фенотипа. Ключевые результаты биоинформационического анализа были верифицированы экспериментально. Таким образом было установлено, что p53<sup>R282Q/H179Y</sup> сохраняет онкосуппрессорные функции и регулирующую роль в процессе эпидермальной дифференцировки, однако, полная инактивация *TP53* приводит к реализации проонкогенных программ.

# **РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ IN SILICO: КОНСТРУИРОВАНИЕ миРНК И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА КОМПЛЕКСА ТИПА БЕЛОК-РНК НА ПРИМЕРЕ ПРИОННОЙ БОЛЕЗНИ**

**Линская П. М.<sup>1</sup>, Котельников Д. Д.<sup>2</sup>, Деменчук Я. В.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Амурская государственная медицинская академия, ул. Горького, д. 95,  
г. Благовещенск, Амурская область, Россия, 95675006

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт биомедицинской химии  
имени В. Н. Ореховича, ул. Погодинская, д. 10, г. Москва, Россия, 119121

РНК-интерференция (РНКи) — это специфический клеточный механизм посттранскрипционной регуляции экспрессии генов, который использует собственную последовательность ДНК в качестве мишени [1]. Специфическое подавление экспрессии генов происходит при участии продуктов расщепления длинных некодирующих двухцепочечных РНК - миРНК (малых интерферирующих РНК). В клетку может быть введена экзогенная двуцепочечная РНК или ДНК [2], чтобы запустить процесс РНКи.

Целью данной статьи является *in silico* дизайн малых интерферирующих РНК, направленных на прекращение экспрессии эндогенного прионного белка, и их валидация методами биоинформатики.

В этом исследовании мы предлагаем собственный протокол проектирования миРНК и изучения структуры комплекса Ago2-миРНК в формате *in silico*, который включает подготовку данных, проектирование оценки качества миРНК, молекулярный докинг между белком и подобранными миРНК, молекулярно-динамическое моделирование комплексов и визуализацию со структурным анализом комплексов, полученных на этапах.

Последовательность гена *PRNP* (NC\_000020.11) была скачана из базы данных NCBI в fasta-формате. В качестве белка была использована структура человеческого белка-аргонавта-2

(Ago2) из базы данных RCSB-PDB (PDB ID: 4OLA). Для конструирования и поиска целевых участков в гене PRNP, которые должны были стать мишениями для миРНК, использовалась программа siRNA Selection Program. Для проведения межмолекулярного докинга между миРНК и Ago2 был выбран веб-сервис HDOCK [3]. В качестве рецептора использовалась подготовленная ранее 3D-структура белка. Последовательность миРНК использовалась как лиганд. Все молекулярно-динамические симуляции проводились в программном пакете GROMACS 2023 (CUDA, single precision). Перед началом симуляций были подготовлены боксы с помощью веб-сервиса CHARMM-GUI. Основной ход работ был выполнен с использованием собственных параметров, оптимальных для силовых полей AMBER и OPLS-AA/M.

В данной работе были созданы следующие последовательности миРНК:

миРНК-1 5'-UAAUAGGCCUGAGAUUCCUU-3',

миРНК-2 5'-AGAACACUAUGAACUUGACCUU-3',

миРНК-3 5'-AUUUCUGUCAUCUCCAACCUU-3',

миРНК-4 5'-ACAAAGUUGUUCUGGUUGCUU-3'

и миРНК-5 5'-ACAAAGAGAACCAAGCAUCCUU-3', действующие на второй экзон гена PRNP. На основании проведенного анализа термодинамической стабильности отдельных миРНК и пар миРНК-мРНК, а также нецелевого эффекта для дальнейшего тестирования методом молекулярного докинга были выбраны миРНК-2-4.

Анализ тепловых карт, построенных по данным докинга комплексов миРНК-2-4 с Ago2, подтвердил закономерности, описанные в работе Bhandare и Ramaswamy [4]. Были обнаружены похожие модели взаимодействия для следующих аминокислотных остатков: Val177, Gly178, Arg351, Ile353, Lys355, Arg710 в комплексах Ago2-миРНК-2 и -4; Arg635 — во всех моделях. Также было выявлено взаимодействие нуклеиновых кислот в позициях N7, N8, N9 для комплексов Ago2-миРНК-2 и -4,

в позиции N10 для Ago2-миРНК-3 и -4 и в позиции N11 для всех моделей. Наиболее часто образовывали связи между собой следующие пары: Ile353–N8, Arg635–N10–11, Arg710–N8. По итогам молекулярного докинга комплекс Ago2-миРНК-2 продемонстрировал наименьшее значение RMSD от референсных структур при относительно большом количестве перекрывающихся атомов миРНК, поэтому он был выбран в качестве кандидатной структуры для проведения молекулярно-динамической симуляции.

Топологии комплексов на момент 50 нс, полученные в ходе молекулярно-динамических симуляций, хорошо коррелируют как друг с другом, так и с кристаллическими структурами, что говорит, во-первых, о сбалансированном подходе к дизайну как самих миРНК, а во-вторых, свидетельствует о корректном использовании параметров симуляции. Интересно, что после молекулярно-динамической симуляции в силовом поле AMBER комплекс Ago2-миРНК-2 был наиболее близок к референсным кристаллическим структурам (наименьшая RMSD = 4,196).

Структурная организация взаимодействующих аминокислотных остатков и нуклеотидов соотносится как между собой, так и с результатами молекулярного докинга. Причём наибольшее соответствие наблюдается с комплексом, полученным в силовом поле OPLS-AA/M. Так, реагирующие аминокислоты, предсказанные в HDOCK, совпадают с 3 из 9, рассчитанных в комплексе с силовым полем AMBER, и с 5 из 9 — в комплексе с OPLS-AA/M. Это свидетельствует о хорошей воспроизводимости результатов на разных этапах пайплайна дизайна миРНК. А также о том, что инструменты хорошо дополняют друг друга, поскольку их результаты не противоречат, а дополняют выводы друг друга.

По результатам протокола наиболее успешной оказалась миРНК-2. Поэтому она может быть протестирована в исследованиях *in vitro* для подавления экспрессии гена. МиРНК-3

и миРНК-4 также успешно прошли валидацию *in silico*, но для оценки их применимости нужны дополнительные лабораторные эксперименты. Предложенный протокол дизайна и оценки эффективности миРНК показал хорошую воспроизводимость, синергию между отдельными программными инструментами, а также строгую систему отбора проектируемых последовательностей. Его можно использовать как основной.

### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Saurabh S., Vidyarthi A .S., Prasad D. (2014) 'RNA interference: Concept to reality in Crop Improvement', *Planta*, 239(3), pp. 543–564. doi: 10.1007/s00425-013-2019-5;
2. Kupferschmidt, K. (2013) 'A lethal dose of RNA', *Science*, 341(6147), pp. 732–733. doi: 10.1126/science.341.6147.732;
3. Yan, Y. et al. (2020) 'The HDOCK server for integrated protein–protein docking', *Nature Protocols*, 15(5), pp. 1829–1852. doi: 10.1038/s41596-020-0312-x.
4. Bhandare V, Ramaswamy A. Structural Dynamics of Human argonaute2 and its interaction with siRNAs designed to target mutant TDP43. *Advances in Bioinformatics*. 2016;2016:1–13. doi: 10.1155/2016/8792814.

# **СОПОСТАВЛЕНИЕ ЭПИТРАНСКРИПТОМА И ЭПИТРАНСЛЯТОМА ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК (hESC)<sup>1</sup>**

**Козлова А. С., Радько С. П., Пономаренко Е. А., Лисица А. В.,  
Ильгисонис Е. В.**

*Научно-исследовательский институт биомедицинской химии  
имени В. Н. Ореховича, ул. Погодинская, д. 10, г. Москва, Россия, 119121;  
ministreliya13113@gmail.com*

Метилирование мРНК участвует в важных регуляторных функциях, таких как правильный сплайсинг, инициация трансляции и остановка трансляции. В последнее время накопилось довольно много информации о метилировании транскриптома, но мало кто упоминал метилирование в контексте транслятома. Для изучения влияния метилирования на трансляцию мы получили профили транслятома и транскриптома для образцов эмбриональных стволовых клеток человека (hESC) на платформе секвенирования Oxford Nanopore. Около 42% экспрессированных сплайс-форм были обнаружены на уровне транслятома. Было обнаружено, что модификации не сохраняются при переходе от транскриптомного к транслятомному уровню. В частности, модификация m6A была обнаружена примерно в 50% транскриптов на уровне транскриптома, но только в 3% (476 транскриптов) на уровне транслятома. В транслятоме было обнаружено 106 транскриптов с модификацией m6A, которые не были найдены в транскриптоме. Сравнение данных эпитранслятома с сайтами рибосомной паузы, полученными из данных Ribo-seq, показало, что метилирование играет важную роль в регуляции скорости трансляции.

---

<sup>1</sup> Работа поддержана РНФ № 24-14-0006.

# **КОМПЬЮТЕРНЫЙ ПРОГНОЗ МЕЖЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ**

**Такташов Р. Р., Дмитриев А. В., Филимонов Д. А.**

*Научно-исследовательский институт биомедицинской химии  
имени В. Н. Ореховича, ул. Погодинская, д. 10, г. Москва, Россия, 119121*

Сочетанное применение лекарственных средств способно оказывать разностороннее воздействие на организм человека: оно может вызывать благоприятные эффекты (такие как модуляция фармакокинетических или фармакодинамических параметров для достижения необходимого результата в контексте лечения или профилактики конкретных заболеваний) или привести к нежелательным, потенциально опасным для жизни реакциям (НЛР). В области исследования феномена межлекарственного взаимодействия (МЛВ), или феномена изменения фармакологической активности одного лекарства при сочетанном употреблении нескольких лекарств, компьютерный (*in silico*) прогноз может служить важным дополнением к методам *in vitro* и *in vivo*, а иногда, с учетом разнообразия комбинаций лекарств и механизмов возникновения и развития МЛВ, и вовсе может являться единственным доступным исследователю методом. Клинически значимым результатом прогноза является не просто наличие факта развития МЛВ, но и указание механизмов МЛВ с учетом степени тяжести.

Нами были созданы классификационные модели для прогноза спектра механизмов фармакокинетических и фармакодинамических МЛВ для пары веществ с указанием уровней тяжести МЛВ с использованием алгоритмов программы PASS [1] и молекулярных дескрипторов PoSMNA, описывающих пары соединений. Присваиваемые уровни тяжести указываются в соответствии с системой классификации МЛВ ORCA. Источником

данных об МЛВ является веб-ресурс MecDDI [2], в основе которой лежит иерархическая классификация механизмов МЛВ, а необходимые химические структуры были получены из базы данных Drugbank. Критерием точности прогноза классификационной модели является значение инвариантной точности прогноза (IAP), рассчитываемое в ходе процедуры кросс-валидации с исключением всех пар. Близкие к единице значения IAP соответствуют высокой точности прогноза.

В результате процедур обучения и валидации получены модели прогноза для 96 механизмов, классов и уровней тяжести МЛВ, со средним по всем моделям значением IAP 0,8. Разработанная нами модель реализована в открытом доступе на веб-портале Way2Drug (<https://www.way2drug.com/ddi/>) [3], где пользователю предоставляется возможность указать интересующие пары химических структур в виде файлов расширения .mol, строк SMILES или международных непатентованных наименований лекарств. Химические структуры также могут быть изображены пользователем при помощи конструктора в веб-утилите MarvinJS. Спектр механизмов фармакокинетических и фармакодинамических МЛВ с указанием уровней тяжести может быть получен и для еще не синтезированных веществ, что является важным на ранних стадиях разработки лекарств.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lagunin A, Stepanchikova A, Filimonov D, Poroikov V. PASS: prediction of activity spectra for biologically active substances. Bioinformatics. 2000 Aug;16(8):747-8. doi: 10.1093/bioinformatics/16.8.747. PMID: 11099264.
2. MecDDI: Clarified Drug–Drug Interaction Mechanism Facilitating Rational Drug Use and Potential Drug–Drug Interaction Prediction. Wei Hu, Wei Zhang, Ying Zhou, Yongchao Luo, Xiuna Sun, Huimin Xu, Shuiyang Shi, Teng Li, Yichao Xu, Qianqian Yang, Yunqing Qiu, Feng Zhu, and

- Haibin Dai. Journal of Chemical Information and Modeling 2023 63 (5), 1626-1636. DOI: 10.1021/acs.jcim.2c01656.
3. Dmitriev A. V., Filimonov D. A., Rudik A. V., Pogodin P. V., Karasev D. A., Lagunin A. A., Poroikov V. V. (2019) Drug-drug interaction prediction using PASS, SAR and QSAR in Environmental Research, 30:9, 655-664, DOI: 10.1080/1062936X.2019.1653966.

Научное электронное издание

III ЕЖЕГОДНАЯ ШКОЛА  
МОЛОДЫХ ИССЛЕДОВАТЕЛЕЙ  
ПО ГЕНЕТИЧЕСКИМ ТЕХНОЛОГИЯМ

Тезисы докладов

г. Тюмень, 10 октября 2024 г.

В авторской редакции  
Верстка *C. Ф. Обрядова*



Подготовлено к электронному изданию 14.11.2024.  
Формат 60×84/16. Усл. печ. л. 1,63. Заказ 265.

---

ТюмГУ-Press  
625003, г. Тюмень, ул. Володарского, 6  
Тел.: (3452) 59-75-34, 59-74-81  
E-mail: izdatelstvo@utmn.ru