

Сибирское отделение Российской академии наук
Институт химической биологии и фундаментальной медицины

II Всероссийская конференция
с международным участием
**«Высокопроизводительное секвенирование
в геномике»**

18-23 июня 2017 г.

Новосибирск

ПРОГРАММНЫЙ КОМИТЕТ КОНФЕРЕНЦИИ

чл.-корр. Пышный Дмитрий Владимирович
(Сопредседатель конференции)
Институт химической биологии и
фундаментальной медицины СО РАН

ак. Говорун Вадим Маркович
(Сопредседатель конференции)
НИИ физико-химической медицины ФМБА

к.б.н. Кабилов Марсель Расимович
(Ответственный секретарь)
Институт химической биологии и
фундаментальной медицины СО РАН,
ЦКП «Геномика» СО РАН

ак. Власов Валентин Викторович
Институт химической биологии и
фундаментальной медицины СО РАН

ак. Габибов Александр Габибович
Институт биоорганической химии РАН

ак. Лисица Андрей Валерьевич
Институт биомедицинской химии РАМН

чл.-корр. Степанов Вадим Анатольевич
НИИ медицинской генетики

чл.-корр. Кочетов Алексей Владимирович
ФИЦ «Институт Цитологии и Генетики СО
РАН»

д.х.н. Карпова Галина Гергиевна
Институт химической биологии и
фундаментальной медицины СО РАН

д.б.н. Фаворова Ольга Олеговна
Российский национальный исследовательский
медицинский университет имени Н.И. Пирогова,
Российский кардиологический научно-
производственный комплекс Минздрава РФ

д.б.н. Графодатский Александр Сергеевич
Институт молекулярной и клеточной биологии
СО РАН, Новосибирский государственный
университет

д.б.н. Равин Николай Викторович
ФИЦ «Фундаментальные основы
биотехнологии» РАН

д.б.н. Прохорчук Егор Борисович
ФИЦ «Фундаментальные основы
биотехнологии» РАН

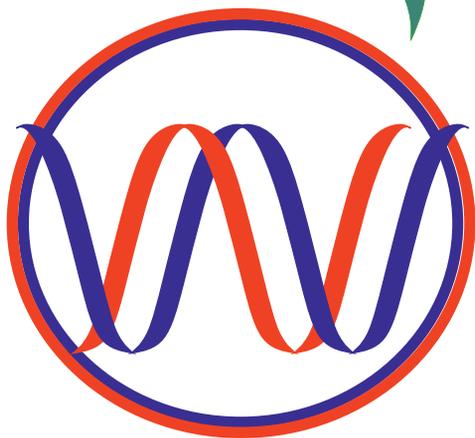
к.б.н. Трифонов Владимир Александрович
Институт молекулярной и клеточной биологии
СО РАН, Новосибирский государственный
университет

к.б.н. Лapidус Алла Львовна
Центр Алгоритмической биотехнологии, Санкт-
Петербургский государственный университет

к.б.н. Андронов Евгений Евгеньевич
Всероссийский НИИ сельскохозяйственной
микробиологии РАСХН

к.б.н. Максютлов Ринат Амирович
Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор»

ЦКП ГЕНОМИКА



ИХБФМ СО РАН



ИМКБ СО РАН

N * Новосибирский
государственный
университет
***НАСТОЯЩАЯ НАУКА**





При поддержке РФФИ
(проект № 17-04-20239)

Генеральный спонсор



Спонсоры



ХИМЭКСПЕРТ

Партнеры



Agilent Technologies



eppendorf



LEXOGEN
Enabling complete transcriptome sequencing



NovaSeq™

- **БЫСТРЫЙ И ПРОСТОЙ:** самая производительная NGS-система на сегодняшний день в мире.
- **АВТОМАТИЧЕСКАЯ КЛАСТЕРИЗАЦИЯ** происходит непосредственно в самом приборе.
- **СКОРОСТЬ РАБОТЫ:** 6 Тб данных за 2,5 дня.
- **ГИБКОСТЬ:** наборы разной производительности. 500 Gb – 6 Тб данных за один запуск прибора.
- **ЛЕГКИЙ В ЭКСПЛУАТАЦИИ:** реагенты в одноразовых картриджах.

- 8–48 геномов
- 66–132 экзона
- 66–132 транскриптома
- 8–48 эпигеномов



HiSeq™

Высокая производительность для масштабных исследований, задачи любой сложности.

- 12 геномов
- 96 экзона
- 100 транскриптомов

NextSeq™

Компактный и производительный. Универсальный. Широкий спектр задач. Секвенатор и сканер биочипов в одном приборе.

- 1 геном
- 9–12 экзона
- 100 транскриптомов
- Чипы для цитогенетики и PGD (до 12 образцов за сканирование)

MiniSeq™

Прибор, ориентированный на готовые решения (панели). Максимально простой в обращении и обслуживании. Таргетное секвенирование.

- 2–40 опухолевых образцов
- 2–8 раковых транскриптомов
- десятки малых геномов
- Онкологические панели (оценка риска развития заболеваний, 12-24 образца)

MiSeq™

Персональный секвенатор. Идеальное решение для таргетного секвенирования и небольших геномов.

- 4-24 образца целевых клинических панелей
- 384 ампликона
- 3 клинических экзона
- 16 геномов E. Coli
- 6–144 образца HLA
- 24 образца PGS
- 96 генотипов KPC

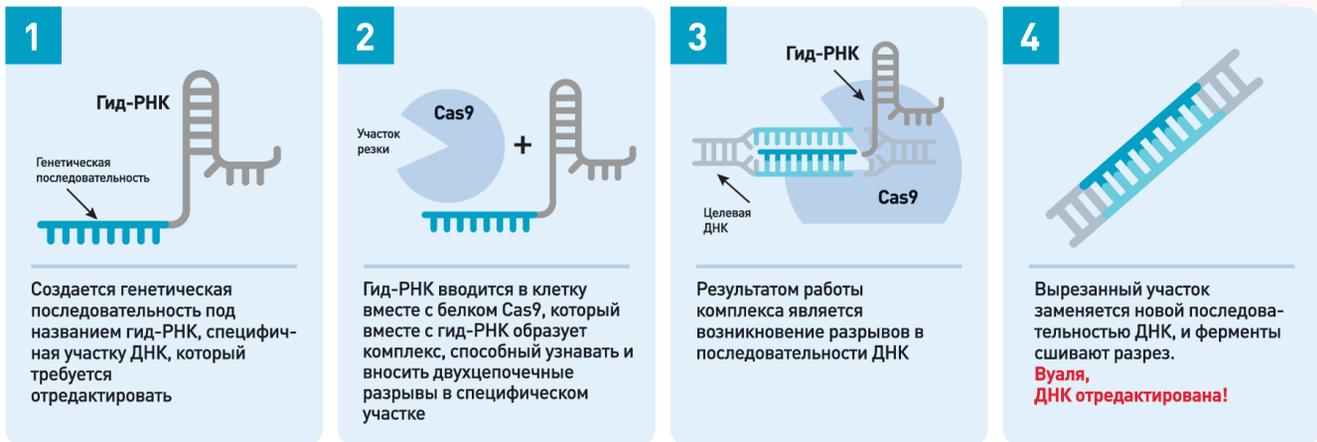
Секвенирование для любых задач

+7 (499) 550-15-25 | www.albiogen.ru



ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ С ПОМОЩЬЮ CRISPR-CAS9

В последние годы одной из самых обсуждаемых тем в мире молекулярной биологии стала технология CRISPR/Cas9, позволяющая добавлять, удалять и вносить изменения в геном высших организмов. Технология появилась благодаря исследованию адаптивной иммунной системы бактерий и основана на способности бактерии узнавать вирусную ДНК и ликвидировать ее. При этом в системе задействованы только два компонента: фермент Cas9 и короткие некодирующие последовательности CRISPR PHK (crPHK/tracrPHK). Результатом работы Cas9 является внесение двухцепочечного разрыва и репарация повреждения.



Система GeneArt CRISPR-Cas9 от Invitrogen by Thermo Fisher Scientific -

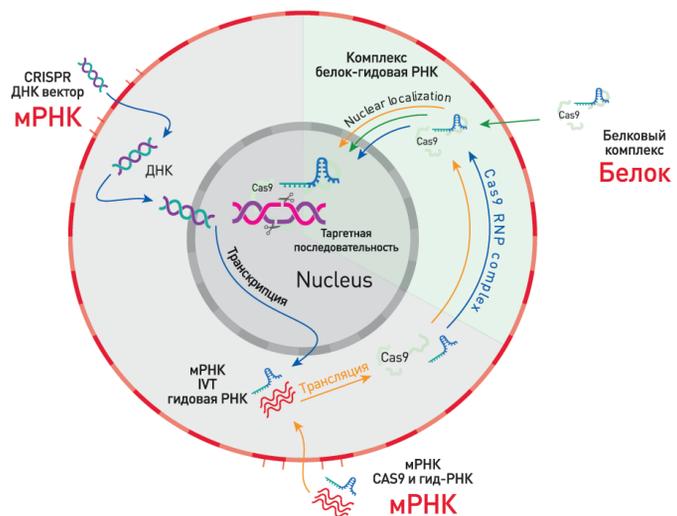
это полное решение для геномного редактирования, от дизайна и синтеза гидовой РНК до детектирования и анализа эффективности редактирования:

ШАГ 1

Дизайн гид-РНК (выбор таргетной последовательности и олигонуклеотида для синтеза гид-РНК).

ШАГ 2

В зависимости от поставленных задач можно выбрать формат проведения трансфекции: синтез гид-РНК (CRISPR белок или CRISPR мРНК) или CRISPR плазида.



QIAseq™ Targeted DNA Panels

For detecting of low-frequency variants with digital DNA sequencing

QIAseq Targeted DNA Panels deliver:

- Sample to Insight® solutions for unbiased, targeted DNA sequencing
- Digital sequencing that minimizes PCR bias and amplification errors to enhance NGS panel sensitivity
- Unique chemistry that overcomes the challenges of sequencing GC-rich genomic regions
- Compatibility with low yield and poor quality DNA samples
- A single-primer extension approach without the predefined amplicon size constraint

Sequence unique DNA molecules, not PCR duplicates

Targeted DNA sequencing with enrichment panels is a powerful approach to detect low-frequency variants. experiments with new levels of statistical accuracy.

Targeted DNA sequencing with enrichment panels is a powerful approach to detect low-frequency variants. The main challenge with many of today's targeted DNA sequencing approaches is the generation of errors during amplification steps. Because all DNA fragments look exactly the same, it is impossible to distinguish a unique DNA variant from a library construction error. Errors associated with amplification and sequencing limit the ability of a researcher to confidently call low-frequency DNA variants. The QIAseq Targeted DNA Panels have been developed to detect low-frequency variants with high confidence by overcoming the issues of PCR duplicates, false positives and library bias. This solution is based on the use of unique molecular indices (Figure 2) to deliver a digital sequencing approach. Since each unique DNA molecule is barcoded before any amplification takes place, unique DNA molecules can be distinguished from PCR duplicates or errors – opening the door for you to confidently detect low-frequency DNA variants in your experiments with new levels of statistical accuracy.

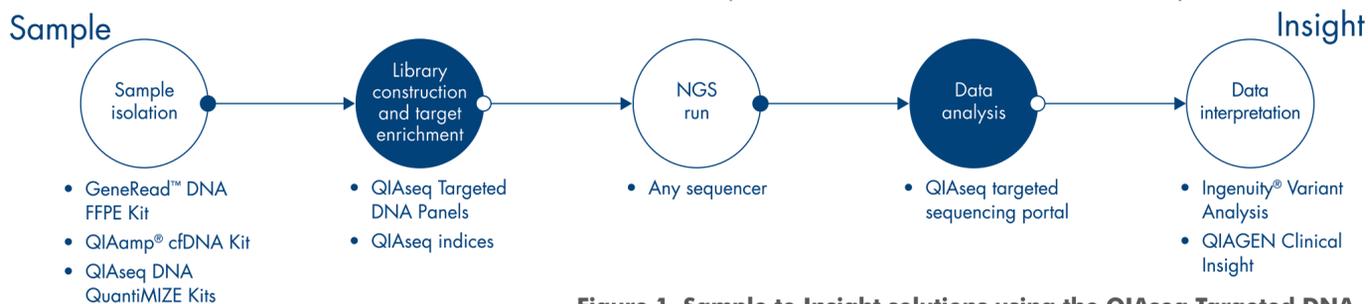
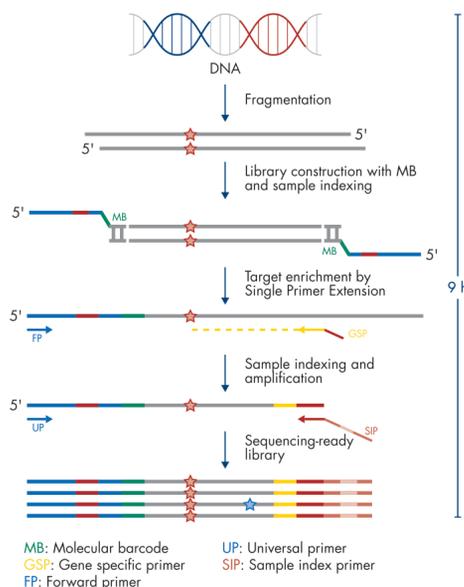


Figure 1. Sample to Insight solutions using the QIAseq Targeted DNA Panels.

The flexibility of these panels enables the construction of libraries from DNA isolated from a wide range of samples that are compatible with both Illumina® and Ion Torrent™ platforms. The complementary data analysis portal translates raw data to molecular barcode counts and variants.



After sequencing, molecular barcodes enable the differentiation of true variants (red star) from false positives (blue star) for sensitive variant detection.

Представительство QIAGEN в Москве: +7 499 703-15-56 | info@amnisure.ru

www.QIAGEN.com

Trademarks: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAseq™, GeneRead™, Ingenuity® (QIAGEN Group); Illumina® (Illumina, Inc.); Ion Torrent™ (Life Technologies Corporation). Registered names, trademarks, etc. used in this document, even when not specifically marked as such, are not to be considered unprotected by law. © 2016 QIAGEN, all rights reserved. PROM-9873-002

Sample to Insight



GenSeq™ DNA Library kit

КРОССПЛАТФОРМЕННОЕ
ТАРГЕТНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ



GenSeq™ DNA Library kit - кроссплатформенный набор для создания библиотек ампликонов на основе панелей AmpliSeq™ для последующего анализа методом высокопроизводительного секвенирования. Позволяет проводить секвенирование полученной библиотеки на двух платформах: Illumina и Ion Torrent.

Использование GenSeq™ DNA Library kit вместе с 52 готовыми и любыми custom панелями AmpliSeq™ - это оптимальный метод для массового скрининга большого количества мишеней



СОДЕРЖАНИЕ

ОРГКОМИТЕТ	2
ОРГАНИЗАТОРЫ	3
СПОНСОРЫ	4

Белок-НК, НК-НК взаимодействия и трансляция

РИБОСОМНЫЙ ПРОФАЙЛИНГ - УНИВЕРСАЛЬНЫЙ ИНСТРУМЕНТ ИЗУЧЕНИЯ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ	13
Андреев Д.Е., Шатский И.Н.	
РАЗРУШАТЬ, ЧТОБЫ ЖИТЬ: ОСОБЕННОСТИ КРУГОВОРОТА УБИКВИТИНА В ДИНАМИКЕ	13
Белогуров А.А., Кудряева А.А.	
КЛЕТОЧНЫЕ мЯРНК, УЧАСТВУЮЩИЕ В СПЛАЙСИНГЕ, – ПАРТНЕРЫ РИБОСОМНОГО БЕЛКА eS1 ЧЕЛОВЕКА, ВЫЯВЛЕННЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА PAR-CLIP	14
Гопаненко А.В., Малыгин А.А., Тупикин А.Е., Лактионов П.П., Кабилов М.Р., Карпова Г.Г.	
РЕГИОНЫ ХРОМАТИНА, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ЯДРЫШКОМ, – МИШЕНИ РИБОСОМНОГО БЕЛКА uS3, ВЫЯВЛЕННЫЕ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ChIP-seq	14
Грошева А.С., Жарков Д.О., Гопаненко А.В., Тупикин А.Е., Кабилов М.Р., Грайфер Д.М., Карпова Г.Г.	
СЕЛЕКЦИЯ IN VITRO 2'-F-МОДИФИЦИРОВАННЫХ РНК-АПТАМЕРОВ, СВЯЗЫВАЮЩИХ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ ФОТОПРОТЕИН ОБЕЛИН	15
Давыдова А.С., Воробьева М.А., Красицкая В.В., Тупикин А.Е., Воробьев П.Е., Кабилов М.Р., Франк Л.А., Веняминова А.Г.	
ИЗУЧЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА ПОЛИУБИКВИТИНОВЫХ ЦЕПЕЙ РАЗНОГО ТИПА ВЕТВЛЕНИЯ	15
Кудряева А.А., Тупикин А.Е., Кабилов М.Р., Белогуров А.А.	
ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИЙ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ ЧЕЛОВЕКА В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ НА УРОВНЕ ТРАНСЛЯЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РИБОСОМНОГО ПРОФАЙЛИНГА	16
Малыгин А.А., Гопаненко А.В., Антропов Д.Н., Мелентьев В.С., Бартули Ю.С., Тупикин А.Е., Кабилов М.Р., Карпова Г.Г.	
ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА FLOWSEQ ДЛЯ АНАЛИЗА ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРАНСЛЯЦИИ БИБЛИОТЕК БАКТЕРИАЛЬНЫХ мРНК	16
Сергиев П.В., Евфратов С.А., И.А. Остерман, Е.С. Комарова, А.М. Погорельская, М.П. Рубцова, Е.С. Кострюкова, М.Р. Кабилов, Е. Бураев, М.С. Гельфанд, В.М. Говорун, А.А. Богданов, О.А. Донцова	
SINGLE-NUCLEUS HI-C REVEALS UNIQUE CHROMATIN REORGANIZATION AT OOCYTE-TO-ZYGOTE TRANSITION	17
Flyamer IM, Gassler J, Imakaev M, Brandão HB, Ulianov SV, Abdennur N, Razin SV, Mirmir LM, Tachibana-Konwalski K	
A NOVEL CROSSLINKING AND IMMUNOPRECIPITATION METHOD REVEALS THE FUNCTION OF CSTF2TAU IN ALTERNATIVE PROCESSING OF SNRNAs	17
Kargapolova Y., Levin M., Danckwardt S.	
THE CHICKEN HI-C DATA REVEAL THE RELATIONS BETWEEN THE LOCAL GENOME PROPERTIES AND THE CHROMOSOME ARCHITECTURE	18
Nuriddinov M.A., Fishman V.S., Battulin N.R., Maslova A.V., Serov O.L., Krasikova A.V.	

NGS и анализ данных

ПРОЦЕДУРА ТРИММИНГА МЕТАГЕНОМНЫХ ДАННЫХ, ПОЛУЧЕННЫХ ПУТЕМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ АМПЛИКОНОВ	19
Букин Ю.С., Галачянц Ю.П.	
ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ И АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ГЛИОМ ПО ДАННЫМ RNA-SEQ	19
Губанова Н.В., Брагин А.О., Бабенко В.Н., Гайтан А.С., Кривошапкин А.Л., Ю.Л. Орлов	
МЕТОД ВСЕСТОРОННЕГО АНАЛИЗА РЕПЕРТУАРА Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ	20
Израельсон М., Наконечная Т.О., Шугай М., Британова О.В.	
«МУЛЬТИОМИКС» ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ПРОТЕОМА	20
Киселева О.И., Поверенная Е.В.	
МОЛЕКУЛЯРНОЕ БАРКОДИРОВАНИЕ КАК СРЕДСТВО БЕЗОШИБОЧНОГО АНАЛИЗА РЕПЕРТУАРА АНТИТЕЛ	21
Лебедин М.Ю., Турчанинова М.А., Давыдов А.Н., Чудаков Д.М.	
СТАТИСТИЧЕСКИЕ ОЦЕНКИ ОШИБОК КОРОТКИХ ПРОЧТЕНИЙ ДНК ПРИ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОМ СЕКВЕНИРОВАНИИ	21
Васильев Г.В., Орлова Н.Г., Абнизова И.И., те Боекхорст Р., Орлов Ю.Л.	
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ПРЕДСКАЗАНИЯ G-КВАДРУПЛЕКСНЫХ СТРУКТУР НА ОСНОВЕ ДАННЫХ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА	22
Пузанов М.А., Бениаминов А.Д., Щелкина А.К., Лившиц М.А., Каложный Д.Н.	
АНАЛИЗ ГЕНОМНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ В ПОПУЛЯЦИЯХ С ПОМОЩЬЮ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА ПРИМЕРЕ ВЫБОРКИ МОНГОЛОВ КИТАЯ	22
Табаханова Л.Э., Чен М., Бай Х., Осипова Л.П., Орлов Ю.Л.	

МЕТОД НОРМАЛИЗАЦИИ ГЕНОМНОЙ ДНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДУПЛЕКС-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ НУКЛЕАЗЫ КАМЧАТСКОГО КРАБА	23
Шагин Д.А., Шагина И.А.	
ГЕНОМ-ЦЕНТРИРОВАННАЯ ИНФОРМАЦИОННАЯ СИСТЕМА АНАЛИЗА И ИНТЕРПРЕТАЦИИ ОМИКНСКИХ ДАННЫХ ЧЕЛОВЕКА	23
Шлихт А.Г., Краморенко Н.В.	
ANALYSIS OF 3D CHROMOSOME CONTACTS USING SEQUENCING TECHNOLOGIES	24
Thierry O., Dergilev A.I., Orlov Y.L.	
BIODICA: AN ADVANCED METHODOLOGY FOR ANALYSIS OF CANCER TRANSCRIPTOME PROFILES FROM GENOMIC PLATFORMS	24
Kairov U.Ye., Molkenov A.B., Kalykbergenov Ye.M., Zinoviyev A.Yu.	
GTRD: A DATABASE OF TRANSCRIPTION FACTOR BINDING SITES IDENTIFIED BY CHIP-SEQ EXPERIMENTS	25
Yevshin I.S., Sharipov R.N., Valeev T.F., Kel A.E., Kolpakov F.A.	
START CODONS AND MRNA TRANSLATION EFFICIENCY PREDICTION USING RIBOSEQ-BASED WEIGHT MATRICES	25
Kondrakhin Yu. V., Sharipov R. N., Volkova O. A.	
TASK DRIVEN CONVERSION OF THE SPAdes GENOME ASSEMBLER INTO A FAMILY OF SPAdes TOOLS	26
Lapidus A., Korobeynikov A., Antipov D., Bankevich A., Bushmanova E., Gurevich A., Meleshko D., Mikheenko A., Nurk S., Pribelski A., Safonova Y., Saveliev V., Pevzner P.	
METHOD OF LIBRARY PREPARATION FOR HIGH SENSITIVE DNA SEQUENCING	26
Pisareva E.E., Gornostaeva E.V., Shamanin V.A., Kovalenko S.P.	
USING MACHINE LEARNING APPROACH TO IMPROVE BASE CALLING IN NEXT GENERATION SEQUENCING DATA	27
N.E. Russkikh, D.V. Antonets	
RIBO-SEQ DB – A REPOSITORY OF SELECTED HUMAN AND MOUSE RIBO-SEQ AND RNA-SEQ DATA	27
Sharipov R.N., Yevshin I.S., Kondrakhin Yu.V., Volkova O.A.	
ANALYSIS OF GENE EXPRESSION RELATED TO AGGRESSIVE BEHAVIOR ON ANIMAL MODELS	28
Tabanyuhov K.A., Mazurina E.P., Chadaeva I.V., Kozhemyakina R.V., Orlov Y.L.	
ASSESSMENT OF TRANSLATION EFFICIENCY FROM RIBO-SEQ AND MRNA-SEQ DATA	28
Yevshin I.S., Sharipov R.N., Volkova O.A.	

Метагеномика

ЭВОЛЮЦИОННЫЙ И АДАПТАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ПОЧВЕННОГО МИКРОБИОМА	29
Андронов Е.Е., Иголкина А.А., Проворов Н.А.	
ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПРОТЕОБАКТЕРИЙ В ХОЛОДНОМ ИСТОЧНИКЕ БУКСЫХЕН-СЕРДЕЧНЫЙ (БУРЯТИЯ)	29
Банзаракцаева Т.Г., Дамбинова Е.Ц.	
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ ОЗЕРА БАЙКАЛ В ПОДЛЕДНЫЙ ПЕРИОД И ПЕРИОД ОТКРЫТОЙ ВОДЫ	30
Башенхаева М.В., Захарова Ю.Р., Галачянц Ю.П., Ханаев И.В., Лихошвай Е.В.	
МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ БАЙКАЛЬСКИХ ГУБОК ВЫЯВИЛ НОВЫЕ СВОЙСТВА СООБЩЕСТВА, АССОЦИИРОВАННЫХ С ВАКАЛОСПОНГИА INTERMEDIA СЕВЕРНОГО БАЙКАЛА	30
Галачянц Ю.П., Бельи О.И., Кабилов М.Р., Тимошкин О.А., акад. Грачев М.А.	
ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ УСТОЙЧИВОСТИ ГРИБА РОДА <i>PENICILLIUM</i> К ВЫСОКИМ КОНЦЕНТРАЦИЯМ МЫШЬЯКА И МЕДИ	31
Глухова Л.Б., Груздев Е.В., Белецкий А.В., Стрелкова Е.В., Карначук О.В., Равин Н.В., Марданов А.В.	
СТРУКТУРА МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ПРИБРЕЖНОЙ ВОДЫ ОЗЕРА БАЙКАЛ	31
Дагурова О.П., Зайцева С.В., Гаранкина В.П., Батурина О.А., Кабилов М.Р.	
ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА ПРИ ФОРМИРОВАНИИ УСТОЙЧИВОСТИ НАСЕКОМЫХ К ЭНТОМОПАТОГЕННЫМ БАКТЕРИЯМ	32
Гризанова Е.В., Поленогова О.В., Аликина Т.Ю., Кабилов М.Р., Дубовский И.М.	
ИЗУЧЕНИЕ ЗАВИСИМОСТЕЙ МЕЖДУ СТРУКТУРОЙ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ КИШЕЧНИКА И АКТИВНОСТЬЮ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ ОРГАНИЗМА ПТИЦЫ	32
Егоров И.А., Ильина Л.А., Никонов И.Н., Лаптев Г.Ю., Ленцова Т.Н., Манукян В.А., Ильдирым Е.А., Новикова Н.И., Филиппова В.А., Грозина А.А., Вертипрахов В.Г., Егорова Т.А.	
МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЦИКЛА МЕТАНА В ОЗЕРЕ БАЙКАЛ	33
Земская Т.И., Ломакина А.В., Захаренко А.С., Хальзов И.А., Чернищина С.М., Шубенкова О.В., Павлова О.Н., Букин С.В., Галачянц Ю.П., Морозов И.В.	
ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОБИОЦЕНОЗОВ КИШЕЧНИКА КУР ПОРОДЫ «ХАЙСЕК» МЕТОДОМ T-RFLP В ОНТОГЕНЕЗЕ	33
Лаптев Г.Ю., Ильина Л.А., Никонов И.Н., Кочич И.И., Романов М.Н., Смоленский В.И., Панин А.Н., Ильдирым Е.А., Новикова Н.И., Филиппова В.А., Дубровин А.В.	

СОДЕРЖАНИЕ

ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ГЛУБОКОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ АМПЛИКОНОВ НА ПРИМЕРЕ 16S рРНК	34
Аликина Т.Ю., Батурина О.А., Тупикин А.Е., М. Р. Кабилов	
МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ХОЛОДНОГО СИПА МОРЯ ЛАПТВЕИХ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩЕГО ВОСЛЕЩЕНИЕ МЕТАНА В ТРОФИЧЕСКИЕ ЦЕПИ . 34	
Кадников В. В., Савичев А.С., Равин Н.В., Пименов Н.В.	
ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ В МИКРОБИОМЕ <i>LUBOMIRSKIA BAICALENSIS</i> ПРИ МАССОВОМ ЗАБОЛЕВАНИИ БАЙКАЛЬСКИХ ГУБОК	35
Кулакова Н.В., Феранчук С.И., Майкова О.О., Бутина Т.В., Адельшин Р.В., Ханаев И.В., Небесных И.А., Кравцова Л.С., Беликов С.И.	
БАКТЕРИАЛЬНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ГОРЯЧИХ ИСТОЧНИКОВ БАЙКАЛЬСКОЙ РИФТОВОЙ ЗОНЫ	35
Лаврентьева Е.В., Раднагуруева А.А., Бархутова Д.Д.	
ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ NGS ДЛЯ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ	36
Лихошвай Е.В.	
РЕКОНСТРУКЦИЯ ГЕНОМА НОВОГО НЕКУЛЬТИВИРУЕМОГО ВИДА АНАММОКС БАКТЕРИИ НА ОСНОВЕ МЕТАГЕНОМНЫХ ДАННЫХ	36
Марданов А.В., Белецкий А.В., Котляров Р.Ю., Каллистова А.Ю., Николаев А.Ю., Пименов Н.В., Равин Н.В.	
ОСОБЕННОСТИ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ХЕМОКЛИНА МЕРОМИКТИЧЕСКОГО ОЗЕРА ДОРНИНСКОЕ (ЗАБАЙКАЛЬЕ)	37
Матюгина Е.Б., Белькова Н.Л., Батурина О.А., Кабилов М.Р., Птицын А.Б.	
МЕТАГЕНОМНЫЙ ПОДХОД К ИССЛЕДОВАНИЮ ЦВЕТЕНИЯ НИТЧАТЫХ ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ В БАЙКАЛЕ: ПЕРВЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ	37
Минчева Е.В., Букин Ю.С., Кравцова Л.С., Щербаков Д.Ю., Тупикин А.Е., Кабилов М.Р.	
ИЗУЧЕНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ У КУР МЯСНЫХ ПОРОД В ЭМБРИОНАЛЬНЫЙ И ПОСТЭМБРИОНАЛЬНЫЙ ПЕРИОДЫ	38
Егоров И.А., Никонов И.Н., Лаптев Г.Ю., Ильина Л.А., Ленкова Т.Н., Манукян В.А., Иылдырым Е.А., Грозина А. А., Вертипрахов В.Г., Егорова Т.А., Новикова Н.И., Филиппова В.А.	
ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОМНОГО КОНТЕКСТА ГЕНОВ РЕЗИСТЕНТНОСТИ КИШЕЧНЫХ МИКРОБОВ ПРИ ПОМОЩИ МЕТАГЕНОМНЫХ ДАННЫХ	38
Олехнович Е.И., Васильев А.Т., Ульянов В.И., Тяхт А.В., Кострюкова Е.С.	
МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ЭКОСИСТЕМ ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫХ ЛИНИЙ МИКРООРГАНИЗМОВ	39
Кадников В.В., Марданов А.В., Белецкий А.В., Карначук О.В., Равин Н.В.	
РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ВОДЫ ИСТОЧНИКА КУЧИГЕР, РЕСПУБЛИКА БУРЯТИЯ	39
Раднагуруева А.А., Зайцева С.В., Бархутова Д.Д., Аликина Т.Ю., Кабилов М.Р., Лаврентьева Е.В.	
МЕТАБАРКОДИРОВАНИЕ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДИЕТЫ У ДАУРСКОЙ ПИЩУХИ	40
Борисова Н.Г., Руднева Л.В., Старков А.И., Галиева Г.Р., Шимов И.В.	
АНАЛИЗ ФАГОВЫХ ПУТЕЙ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ГЕНОВ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТАГЕНОМНЫХ ДАННЫХ 40	
Старикова Е.В., Rands Ch., Zdobnov E., Говорун В.М.	
ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ВАРИАбельНОСТИ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ ХЕРЕСНЫХ ДРОЖЖЕЙ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	41
Марданов А.В., Эльдаров М.А., Белецкий А.В., Думина М.В., Танащук Т.Н., Кишкowska С.А., Равин Н.В.	
ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ДВУХ СОЛЕННЫХ ОЗЕР ПУСТЫНИ БАДАЙН ЖАРАН (ВНУТРЕННЯЯ МОНГОЛИЯ, КИТАЙ)	41
Эрдынеева Е.Б., Раднагуруева А.А., Аликина Т.Ю., Лаврентьева Е.В.	
DIVERSITY OF VIRAL METABOLIC psb A GENE IN LAKE BALKHASH	42
Alexyuk M.S., Alexyuk P.G., Turmagambetova A.S., Vogoyavlenskiy A.P., Berezin V.E.	
BACTERIAL 16S DNA DIVERSITY IN SOIL UNDER THE KOREAN PINE.	42
Naumova N.B., Alikina T.Y., Kabilov M.R., Kuznetsova G.V.	
МЕТАГЕНОМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МАТРИЦЫ ПРОТЕИНА ГЕНА ОТ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ	43
Turmagambetova A.S., Alexyuk M.S., Alexyuk P.G., Vogoyavlenskiy A.P., Berezin V.E.	
Геномика прокариот и вирусов	
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМОВ ВАРИАНТОВ ВИЧ-1, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НА ПЕРВИЧНЫХ И ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА	44
Гашникова Н.М., Кабилов М.Р., Богачева Н.В., Тупикин А.Е., Ачиггечева П.Ю., Мирджамалова Н.А., Гашникова М.П., Тотменин А.В.	
ОСОБЕННОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ ВИЧ-1, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ	44
Гашникова Н.М., Кабилов М.Р., Богачева Н.В., Тупикин А.Е., Чернов А.С., Степанова С.А., Исмаилова Т.Н., Гашникова М.П., Тотменин А.В.	
РЕКОМБИНАНТНЫЕ ВАРИАНТЫ ВИЧ-1, ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ В НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ.	45
Гашникова Н.М., Кабилов М., Богачева Н.В., Тупикин А.Е., Соколов Ю.А., Мирджамалова Ф.О., Гашникова М.П., Тотменин А.В.	
СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ КЛАССИФИКАЦИИ НОВОГО СЕМЕЙСТВА PNEUMOVIRIDAE (2016) С ПОМОЩЬЮ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ	45
Курская О.Г., Соболев И.А., Кабилов М.Р., Шаршов К.А., Мурашкина Т.А., Алексеев А.Ю., Шестопапов А.М.	
РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНОМОВ ШТАММОВ ВИРУСА НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ, ВЫДЕЛЕННЫХ ВО ВРЕМЯ ВСПЫШКИ ОСПЫ 1959-1960 ГГ. В Г. МОСКВА	46
Максютов Р.А., Трегубчук Т.В., Швалов А.Н., Лемза А.Е., Гаврилова Е.В., Щелкунов С.Н.	
ПОИСК ГЕНОВ БАКТЕРИЙ ВИДА <i>ESCHERICHIA COLI</i> АССОЦИИРОВАННЫХ С БОЛЕЗНЬЮ КРОНА	46
Манолов А.И., Побегуц О.В., Кострюкова Е.С., Ларин А.К., Семашко Т.А., Бабенко В.В., Городничев Р.Б., Лисицина Е.С., Щербаков П.Л., Ильина Е.Н., Говорун В.М.	
ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПАТОГЕНОВ КАРТОФЕЛЯ	47
Мирошников К.А., Кабанова А.П., Во Тхи Нгок Ха, Баранник А.П., Мирошников К.К., Самаров Н.И., Шнейдер М.М., Тошаков С.В., Игнатов А.Н.	
ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОМОВ АКТУАЛЬНЫХ ШТАММОВ ПАТОГЕНОВ КАРТОФЕЛЯ РЕСТОВАСТЕРИИ И <i>DISKEYA</i>	47
Мирошников К.К., Кабанова А.П., Баранник А.П., Самаров Н.И., Корженков А.А., Шнейдер М.М., Тошаков С.В., Игнатов А.Н., Мирошников К.А.	
ВНУТРИВИДОВОЙ СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ХРОМОСОМ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ ЛЮЦЕРНЫ <i>SINORHIZOBIUM SPP.</i>	48
Мунтян В.С., Черкасова М.Е., Румянцева М.Л.	
АНАЛИЗ ГЕНА G23 T4-ПОДОБНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ В ОЗЕРЕ БАЙКАЛ МЕТОДОМ NGS	48
Потапов С.А., Краснопеов А.Ю., Гладких А.С., Тупикин А.Е., Кабилов М.Р., Бельх О.И., Бутина Т.В.	
СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНОМА БАКТЕРИАЛЬНОГО ШТАММА-СИМБИОНТА ЭВГЛЕНЫ ЗЕЛЁНОЙ <i>RAEIVIBACILLUS SP.</i>	49
Руденская Ю.А., Герасимов Е.С., Флегонтов П.Н., Логачёва М.Д., Щелкунов М.И., Штратникова В.Ю., Колесников А.А.	
НУКЛЕОТИДНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ ЛЮЦЕРНЫ	49
Саксаганская А.С., Мунтян В.С., Румянцева М.Л.	
ИДЕНТИФИКАЦИЯ МОДИФИКАЦИЙ ДНК <i>M. GALLISEPTICUM</i> МЕТОДОМ SMRT СЕКВЕНИРОВАНИЯ	50
Семашко Т.А., Арзамасов А.А., Гаранина И.А., Фисунов Г.Ю., Говорун В.М.	
ВИРУС ГРИППА ПТИЦ, ВЫДЕЛЕННЫЙ ОТ КАСПИЙСКИХ ТЮЛЕНЕЙ (PHOSA CASPICA).	50
Соболев И.А., Гуляева М.А., Шаршов К.А., Курская О.Г., Щелканов М.Ю., Алексеев А.Ю., Шестопапов А.М.	
ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ С РЕДКОЙ НА ТЕРРИТОРИИ РФ КОМБИНАЦИЕЙ ПОВЕРХНОСТНЫХ ГЛИКОПРОТЕИНОВ (СУБТИП N6N8).	51
Соболев И.А., Шаршов К.А., Курская О.Г., Фадеев А.В., Егорова А.А., Котенко А.В., Комиссаров А.В., Васин А.В., Юрлов А.К., Алексеев А.Ю., Шестопапов А.М.	
ВЫДЕЛЕНИЕ НОВОГО РЕАССОРТАНТНОГО ВАРИАНТА ВИРУСА ГРИППА А/Н1N1 ОТ СВИНЕЙ	51
Соболев И.А., Шаршов К.А., Кабилов М.Р., Аликина Т.Ю., Мурашкина Т.А., Курская О.Г., Толстых Н.А., Городов В.С., Леонов С.В. Алексеев А.Ю., Шестопапов А.М.	
АНАЛИЗ ГЕНОМНОГО ОСТРОВА SME19T <i>SINORHIZOBIUM MELILOTI RM1021</i> : GC-СОСТАВ И СТАБИЛЬНОСТЬ ВНУТРЕННЕЙ СТРУКТУРЫ.	52
Черкасова М.Е., Мунтян В.С., Румянцева М.Л., Андронов Е.Е.	
ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСА ГРИППА Н11-СУБТИПА В АЗИАТСКО-ТИХООКЕАНСКОМ РЕГИОНЕ	52
Шаршов К.А., Соболев И.А., Кабилов М.Р., Аликина Т.Ю., Мурашкина Т.А., Курская О.Г., Алексеев А.Ю., Saito Takehiko, Щелканов М.Ю., Шестопапов А.М.	
СЕКВЕНИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ПОЛНОГО ГЕНОМА НЕФТЕРАЗЛАГАЮЩЕГО ШТАММА <i>THALASSOSPIRILLUM OLEIVORANS</i> K-188	53
Штратникова В.Ю., Белопов И.Ш., Касьянов А.С., Щелкунов М.И., Логачёва М.Д., Новиков А.Д., Шаталов А.А., Герасимова Т.В., Яненко А.С., Макеев В.Ю.	
PECULIARITIES OF GRAM-NEGATIVE AND GRAM-POSITIVE BACTERIA ADAPTATION TO THE HOST ORGANISM	53
Voronina O.E., Aksenova E.I., Kunda M.S., Semenov A.N., Bondareva N.E., Sharapova N.E., Ryzhova N.N., Zigangirova N.A.	
WGS AS A SOURCE OF NEW EPIDEMIOLOGY AND PATHOGENICITY EVIDENCE FOR RUSSIAN EPIDEMIC STRAIN <i>ACHROMOBACTER RUHLANDII</i> ST36.	54
Voronina O.L., Kunda M.S., Sharapova N.E., Aksenova E.I., Semenov A.N., Ryzhova N.N., Gintsburg A.L.	
МЕТАГЕНОМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИРУСНЫХ СООБЩЕСТВ В ОЗЕРЕ БАЙКАЛ	54
Бутина Т.В., Букин Ю.С., Тупикин А.Е., Кабилов М.Р., Беликов С.И.	
EVOLUTION HISTORY OF PLANT PATHOGENIC XANTHOMONAS ARBORICOLA INFECTING WIDE-RANGE OF HOST PLANTS	55
E.I. Kyrova, E. V. Kalabashkina, A.N. Ignatov	

СОДЕРЖАНИЕ

GENOME OF CLAVIBACTER MICHIGANENSIS SUBSP. MICHIGANENSIS INFECTING POTATO PLANTS	55
E.I. Kyrova, K.P. Korne, E. V. Kalabashkina, A.N. Ignatov	
MOLECULAR DETERMINANTS OF GYPSY MOTH (<i>LYMANTRIA DISPAR</i>) NUCLEOPOLYHEDROVIRUS VIRULENCE	56
Ilyinykh A. V., Baturina O. A., Ilyinykh Ph. A., Polenogova O. V., Belousova I. A., Martemyanov V. V., Kabilov M. R.	
GENOMIC ANALYSIS OF TWO FUCOIDAN-DEGRADING SEA WEED-ASSOCIATED FLAVOBACTERIA <i>FORMOSA ALGAE</i> KMM 3553 ^T AND KMM 8021	56
Stenkova A. M., Chernysheva N. Yu., Kurilenko V. V., Mikhailov V. V., Silchenko A. S., Kusaykin M. I., Isaeva M. P.	
SEQUENCE ANALYSIS OF CLEAVAGE SITE REGION OF THE F-PROTEIN GENE OF NEWCASTLE DISEASE VIRUSES (NDV) ISOLATED FROM SIBERIA, RUSSIA	57
Yurchenko K. S., Kabilov M. R., Alikina T. Y., Glushchenko A. V., Shestopalov A. M.	

Геномика растений

УСТАНОВЛЕНИЕ ЭКЗОН-ИНТРОННОЙ СТРУКТУРЫ ГЕНА КОМПАКТНОСТИ КОЛОСА У ДИ-, ТЕТРА- И ГЕКСАПОЛИДНЫХ ПШЕНИЦ	58
Конопаткая И. Д., Вавилова В. Ю., Блинов А. Г., Гончаров Н. П.	
ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ У РАЗНОВОЗРАСТНЫХ РЕЦИПРОКНЫХ ПРИВИВКОВ СОСНЫ КЕДРОВОЙ СИБИРСКОЙ	58
Велисевич С. Н., Кabilov M. P., Жук Е. А., Васильева Г. В., Тупикин А. Е., Горошкевич С. Н.	
СБОРКА ГЕНОМА ЛЬНА ОБЫКНОВЕННОГО ЛИНИИ STORMONT CIRRU	59
Дмитриев А. А., Краснов Г. С., Большова Н. Л., Муравенко О. В., Снежкина А. В., Аюпова А. Ф., Федорова М. С., Кудрявцева А. В., Мельникова Н. В.	
РАННИЕ ЭТАПЫ РАЗВИТИЯ СОЦЕТИЯ ПШЕНИЦЫ: ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ И ФИЗИОЛОГИИ	59
Добровольская О. Б., Бадаева Е. Д., Попова К. И., Красников А. А., Мартинек П.	
ВОЗНИКНОВЕНИЕ АССИМЕТРИИ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ НА РАННИХ СТАДИЯХ ЭВОЛЮЦИИ ГЕНОМОВ ПОЛИПЛОИДОВ НА ПРИМЕРЕ ГЕНОМА АЛЛОТЕТРАПЛОИДА <i>CARPELLA BURSA-PASTORIS</i>	60
Касьянов А. С., Клепикова А. В., Кулаковский И. В., Герасимов Е. С., Федотова А. В., Беседина Е. Г., Кондрашов А. С., Логачева М. Д., Пенин А. А.	
МЕТАБАРКОДИНГ РАСТЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ NGS: ОБЗОР ВОЗМОЖНОСТЕЙ И ПРАКТИЧЕСКИЙ ОПЫТ	60
Логачева М. Д., Крилицына А. А., Айгинин А. А., Хафизов К. Ф., Шипулин Г. А., Сперанская А. С.	
ИССЛЕДОВАНИЕ ЭВОЛЮЦИИ РИБОСОМНЫХ ГЕНОВ У ВИДОВ ЛЬНА МЕТОДОМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ	61
Большова Н. Л., Мельникова Н. В., Дмитриев А. А., Беленикин М. С., Сперанская А. С., Крилицына А. А., Краснов Г. С., Лакунина В. А., Кудрявцева А. В., Муравенко О. В.	
ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОМА ТОПОЛЯ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ПОЛОМ	61
Борхерт Е. В., Дмитриев А. А., Краснов Г. С., Большова Н. Л., Кудрявцева А. В., Мельникова Н. В.	
СЕКВЕНИРОВАНИЕ ТРАНСКРИПТОМОВ РАСТЕНИЙ ЛЬНА, ЗАРАЖЕННЫХ <i>FUSARIUM OXYSPORIUM</i>	62
Зяблицин А. В., Дмитриев А. А., Рожмина Т. А., Краснов Г. С., Кудрявцева А. В., Мельникова Н. В.	
СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ГЕНА sRLK У КОНТРАСТНО РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО УСТОЙЧИВОСТИ К ЗАСОЛЕНИЮ ЛИНИЙ ЛЮЦЕРНЫ ГОЛУБОЙ	62
Мунтян А. Н., Мунтян В. С., Саксаганская А. С., Симаров Б. В., Румянцова М. Л.	
ОРТОЛОГИЗАЦИЯ ГЕНОВ РАСТЕНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДАННЫХ ДЕТАЛИЗИРОВАННЫХ КАРТ ЭКСПРЕССИИ	63
Пенин А. А., Касьянов А. С., Клепикова А. В., Герасимов Е. С., Логачева М. Д.	
СБОРКА И АННОТИРОВАНИЕ ГЕНОМА ЛИСТВЕННИЦЫ СИБИРСКОЙ	63
Щаров В. В., Путинцева Ю. А., Кузьмин Д. А., Орешкова Н. В., Феранчук С. И., Цыбин А. Н., Маколов С. В., Крутовский К. В.	
ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ОГУРЦА (<i>C. SATIVUS</i>) В ОТВЕТ НА ЗАРАЖЕНИЕ ВИРУСОМ ЗЕЛЕННОЙ КРАПЧАТОЙ МОЗАИКИ С ПОМОЩЬЮ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ВТОРОГО ПОКОЛЕНИЯ	64
Щеленков А. А., Славохотова А. А., Истомина Е. А., Коростылева Т. В., Одинцова Т. И.	
ГЕНЫ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ YABBY В ТРАНСКРИПТОМЕ МИКОГЕТЕРОТРОФА <i>MONOTROPA HYPORITUS</i>	64
Щеникова А. В., Белецкий А. В., Марданов А. В., Шульга О. А., Кочиева Е. З., Равин Н. В., Скрябин К. Г.	
РЕПРОДУКТИВНОЕ РАЗВИТИЕ ПАРАЗИТИЧЕСКОГО РАСТЕНИЯ <i>MONOTROPA HYPORITUS</i> : ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ MADS-BOX ГЕНОВ	65
Щеникова А. В., Белецкий А. В., Шульга О. А., Марданов А. В., Кочиева Е. З., Филошин М. А., Равин Н. В., Скрябин К. Г.	
RNAseq-BASED DECIPHERING OF MOLECULAR MECHANISMS UNDERLYING TRAIT FORMATION: NON-ALTERNATIVE WAY IN CASE OF IMPEDED METABOLITE IDENTIFICATION	65
Glagoleva A. Y., Shmakov N. A., Shoeva O. Y., Vasiliev G. V., Shatskaya N. V., Börner A., Afonnikov D. A., Khlestkina E. K.	

POST-EMBRYONIC HOURGLASS PATTERNS MARK ONTOGENETIC TRANSITIONS IN PLANT DEVELOPMENT	66
Ivo Grosse	
ALTERNATIVE ORFs WITHIN EUKARYOTIC mRNAs	66
Kochetov A. V.	
THE COMPUTATIONAL ANALYSIS OF WHOLE-GENOME DATA PREDICTS A ROLE OF CHROMATIN LANDSCAPE IN REGULATION OF PRIMARY ETHYLENE RESPONSE IN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	67
Zemlyanskaya E. V., Levitsky V. G., Oshchepkov D. Y.	
FUNCTIONAL ANNOTATION OF AUXIN RESPONSIVE CIS-REGULATORY ELEMENTS	67
Novikova D. D., Cherenkov P. A., Mironova V. V.	
VARIATION IN THE INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS) REGIONS OF NUCLEAR RIBOSOMAL DNA IN ENDEMIC HEDYSARUM SPECIES	68
Nuzhdina N. S., Dorogina O. V.	
Auxin induced expression changes differ among functional gene groups	68
Omelyanchuk NA, Wiebe DS, Mironova VV	
COMPARATIVE ANALYSIS OF 5B CHROMOSOME REARRANGEMENTS DURING WHEAT EVOLUTION BASED ON PHYSICAL MAPPING AND SEQUENCING DATA	69
Salina E. A., Sergeeva E. M., Nesterov M. A., Kiseleva A. A Frenkel Z, Korol A., Muterko A. F., IWGSC	
FINE ORGANIZATION OF GENOMIC REGIONS TAGGED TO 5S rDNA LOCUS OF THE BREAD WHEAT 5B CHROMOSOME	69
Sergeeva E. M., Shcherban A. B., Beletskiy A. V., Rakitin A. L., Mardanov A. V., Adonina I. G., Salina E. A.	
INVESTIGATING BARLEY GENES CONTROLLING CHLOROPHYLL SYNTHESIS WITH RNA-SEQ	70
Shmakov N. A., Vasiliev G. V., Shatskaya N. V., Doroshkov A. V., Afonnikov D. A., Khlestkina E. K.	

Палеогеномика

СБОРКА ПОЛНОГО МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА ЛОШАДИ ОВОДОВА (<i>Equus ovodovi</i>) ИЗ ДЕНИСОВОЙ ПЕЩЕРЫ	71
Дружкова А. С., Макунин А. И., Воробьева Н. В., Васильев С. К., Оводов Н. Д., Шуньков М. В., Трифонов В. А., Графодатский А. С.	
СЕКВЕНИРОВАНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОМОВ ДРЕВНИХ И СОВРЕМЕННЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА МЕДВЕЖЬИ (<i>URSIDAE</i>) ЗАПАДНОЙ СИБИРИ	71
Дружкова А. С., Воробьева Н. В., Макунин А. И., Васильев С. К., Оводов Н. Д., Тишкин А. А., Трифонов В. А., Графодатский А. С.	
ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ДРЕВНИХ ЛОШАДЕЙ АРХЕОЛОГИЧЕСКОГО ПАМЯТНИКА ЯЛОМАН-II	72
Куслий М. А., Дружкова А. С., Воробьева Н. В., Макунин А. И., Тишкин А. А., Попова К. О., Графодатский А. С., Трифонов В. А., Дымова М. А., Филипенко М. Л.	
ИЗУЧЕНИЕ ДРЕВНЕЙ ДНК: МИТОГЕНОМЫ И В-ХРОМОСОМЫ СИБИРСКОЙ КОСУЛИ	72
Попова К. О., Воробьева Н. В., Дружкова А. С., Макунин А. И., Васильев С. К., Оводов Н. Д., Трифонов В. А., Графодатский А. С.	
СИГНАЛЫ ОТБОРА В ГЕНОМЕ МАМОНТОВ	73
Прохорчук Е. Б., Недолужко А. В., Скрябин К. Г.	
СРАВНЕНИЕ СРАВНЕНИЙ: МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ СРАВНИТЕЛЬНОГО АНАЛИЗА СОВРЕМЕННЫХ И ДРЕВНИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ	73
Татарина Т. В.	
ГЕНЫ КАТАБОЛИЗМА ЛИПИДОВ ОБОГАЩЕНЫ НЕАНДЕРТАЛЬСКИМИ ВАРИАНТАМИ У СОВРЕМЕННЫХ ЕВРОПЕЙЦЕВ	74
Храмеева Е. Е.	
EXPERIMENTAL AND BIOINFORMATICS APPROACHES FOR ANCIENT DNA EXTRACTION AND SAMPLE PREPARATION FOR NEXT GENERATION SEQUENCING IN ULTRA-CLEAN CONDITIONS	74
Matsvay A. D., Alborova I. E., Pimkina E. V., Markelov M. L., Mustafin K. K., Khafizov K.	

Геномика животных

МОДУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ НЕЙРОПРОТЕКТОРА ЦЕФТРИАКСОНА НА УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, СВЯЗАННЫХ С СИСТЕМОЙ МЕТАБОЛИЗМА АМИЛОИДА-БЕТА, У КРЫС ЛИНИИ OXYS	75
Амстиславская Т. Г., Беличенко В. М., Федосеева Л. А., Тихонова М. А.	
АНАЛИЗ МИКРОДИССЕКЦИОННЫХ БИБЛИОТЕК ХРОМОСОМ СТЕРЛЯДИ (<i>ACIPENSER RUTHENUS</i>) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДАННЫХ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ	75
Андреевская Д. А., Макунин А. И., Беклемишева В. Р., Романенко С. А., Дружкова А. С., Билтуева Л. С., Сердюкова Н. А., Графодатский А. С., Трифонов В. А.	
РАЗНООБРАЗИЕ ГЕНОМОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ НА ХРОМОСОМНОМ УРОВНЕ	76
Графодатский А. С.	

СОДЕРЖАНИЕ

ИЗУЧЕНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ ПЕРЕСТРАИВАЕМЫХ ЦЕПЕЙ Т-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА У СТЕРЛЯДИ <i>ACIPENSER RUTHENUS</i> С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЛАТФОРМЫ ILLUMINA MISEQ	76
Гусельников С.В., Кулемзин С.В., Горчаков А.А., Чикаев Н.А., Макунин А.И., Трифонов В.А., Таранин А.В.	
ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ДЛЯ АНАЛИЗА ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ М5С/Ψ-МОДИФИЦИРОВАННЫХ АНАЛОГОВ МАЛЫХ ЯДЕРНЫХ И МАЛЫХ ЯДРЫШКОВЫХ РНК В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА	77
Степанов Г.А., Журавлев Е.С., Шендер В.О., Арапиди Г.П., Ануфриева К.С., Нуштаева А.А., Балахонова Е.А., Говорун В.М., Семенов Д.В., Рихтер В.А.	
ИЗУЧЕНИЕ ЭВОЛЮЦИИ ГЕНОМА СВОБОДНОЖИВУЩЕГО ПЛОСКОГО ЧЕРВЯ <i>MASROCOSTOMUM UGNANO</i> (PLATYHELMINTHES, TURBELLARIA) С ПОМОЩЬЮ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ МИКРОДИССЕКЦИОННЫХ ДНК-БИБЛИОТЕК	77
Задесенец К.С., Березиков Е.В., Тупикин А.Е., Кабилов М.Р., Рубцов Н.Б.	
ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ ХРОМОСОМ	78
Макунин А.И., Проколов Д.Ю., Кичигин И.Г., Дружкова А.С., Графодатский А.С., Трифонов В.А.	
МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЛОГЕНИЯ ГАПЛОГРУПП СТЕРЛЯДИ <i>ACIPENSER RUTHENUS</i> И СИБИРСКОГО ОСЕТРА <i>A. VAERII</i> , ОСНОВАННАЯ НА АНАЛИЗЕ ПОЛНЫХ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОМОВ	78
Побединцева М.А., Макунин А.И., Дружкова А.С., Сердюкова Н.А., Воробьева Н.В., Интересова Е.А., Графодатский А.С., Трифонов В.А.	
ИЗУЧЕНИЕ КАРИОТИПА КОПЫТНОГО ЛЕММИНГА (<i>DICROSTONYX TORQUATUS</i>) С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ОТДЕЛЬНЫХ ХРОМОСОМ	79
Проколов Д.Ю., Макунин А.И., Романенко С.А., Дружкова А.С., Графодатский А.С., Трифонов В.А.	
ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСКРИПТОМА ПЕРВИЧНЫХ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НА ПОВЕРХНОСТИ МИКРОВОЛОКНИСТЫХ МАТРИКСОВ РАЗНОГО СОСТАВА	79
Степанова А.О., Лактионов П.П., Лактионов П.П.	
ИЗМЕНЕНИЯ ТРАНСКРИПТОМА КОРЫ МОЗГА ПРИ РАЗВИТИИ ПРИЗНАКОВ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА У КРЫС <i>OXYS</i>	80
Стефанова Н.А.	
СЕКВЕНИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ГЕНОМА И ТРАНСКРИПТОМА СТЕРЛЯДИ (<i>ACIPENSER RUTHENUS</i>)	80
Трифонов В.А., Макунин А.И., Романенко С.А., Беклемишева В.Р., Билтуева Л.С., Проколов Д.Ю., Побединцева М.А., Дружкова А.С., Андреевская Д.А., Гусельников С.В., Сердюкова Н.А., Кудрявцева А.В., Комиссаров А.С., Кливер С.Ф., Шартл М., Графодатский А.С.	
INFLAMMATORY RESPONSE REGULATED A KINASE ACTIVITY OF RIP1 KINASE	81
Ilyukha V.V., Schworer S., Poltorak A.	
A NOVEL APPROACH FOR MAPPING OF ANIMAL GENOME ASSEMBLIES TO A CHROMOSOMAL LEVEL APPLIED TO AVIAN GENOMES	81
Damas J., O'Connor R.E., Farre M., Martell H., Slack E.A., Allanson E., Kiazim L., Jennings R., Mandawala A., Joseph S., Fowler K.E., Griffin D.K., Larkin D.M.	
Медицинская геномика	
ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ CRISPR/Cas9 ИНАКТИВАЦИИ ГЕНА VHL В КЛЕТКАХ РАКА ПОЧКИ	82
Артемов А.В., Жигалова Н.А., Женило С.В., Мазур А.М., Прохорчук Е.Б.	
РЕПЛИКАТИВНЫЙ АНАЛИЗ АССОЦИАЦИЙ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА, ШИЗОФРЕНИИ И КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО ГЕНОТИПИРОВАНИЯ МЕТОДОМ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ	82
Бочарова А.В., Вагайцева К.В., Марусин А.В., Макеева О.А., Степанов В.А.	
ПОЛНОГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ НАТИВНОЙ И ФИКСИРОВАННОЙ В ФОРМАЛИНЕ ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ В СРАВНИТЕЛЬНОМ АСПЕКТЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ СОБЫТИЙ	83
Гервас П.А., Денисов Е.В., Киселев А.М., Перельмутер В.М., Чердынцова Н.В.	
ОЦЕНКА УРОВНЯ ГЕТЕРОПЛАЗМИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ СОННЫХ АРТЕРИЙ	83
Голубенко М.В., Бабушкина Н.П., Зарубин А.А., Марков А.В., Слепцов А.А., Гончарова И.А., Назаренко М.С., Барбараш О.Л., Пузырев В.П.	
УСТАНОВЛЕНИЕ ГРАНИЦ ХРОМОСОМНЫХ ПЕРЕСТРОЕК У ПАЦИЕНТОВ С МИКРОДЕЛЕЦИЯМИ И МИКРОДУПЛИКАЦИЯМИ 3p26.3	84
Гридина М.М., Шнайдер Т.А., Ковригин И.И., Мензоров А.Г., Фишман В.С.	
ПОИСК ГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ИНВАЗИЕЙ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	84
Денисов Е.В., Киселев А.М., Гервас П.А., Таширева Л.А., Завьялова М.В., Перельмутер В.М.	
КОМПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ ДАННЫХ TCGA ПОЗВОЛИЛ ИДЕНТИФИЦИРОВАТЬ ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МАРКЕРЫ СИМР+ ФЕНОТИПА ОПУХОЛЕЙ ТОЛСТОЙ КИШКИ	85
Краснов Г.С., Кудрявцева А.В., Снежкина А.В., Пузанов Г.А., Бениаминов А.Д., Мельникова Н.В., Дмитриев А.А.	
ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СТРУКТУРЕ Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕПЕРТУАРОВ	85
Егоров Е.С., Израельсон М.А., Касацкая С.А., Наконечная Т.О., Британова О.В.	
СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДОВ NGS И ARRAY CGH ПРИ ДЕТЕКЦИИ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ У ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА НА СТАДИИ БЛАСТОЦИСТЫ	86
Жигалина Д.И., Скрыбин Н.А., Канбекова О.Р., Артюхова В.Г., Лебедев И.Н.	
РОЛЬ СЕКРЕТИРУЕМЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В КОММУНИКАЦИИ МЕЖДУ РАКОВЫМИ КЛЕТКАМИ	86
Шендер В.О., Степанов Г.А., Журавлев Е.С., Ануфриева К.С., Арапиди Г.П., Балахонова Е.А., Нуштаева А.А., Семенов Д.В., Рихтер В.А., Говорун В.М.	
КОМПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМНЫХ И МЕТАБОЛОМНЫХ ДАННЫХ КАРДИОМЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ В КАЗАХСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ	87
Кожамкулов У.А., Каиров У.Е., Молкенов А.Б., Абильмажинова А.Т., Ахметова А.Ж., Абилова Ж.М., Ережепов Д.А., Рахимова С.Е., Lee J., Акильжанова А.Р.	
ПРОФИЛИРОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ЛИМФОЦИТАХ ИНДИВИДОВ С РАЗЛИЧНОЙ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ	87
Васильев С.А., Агаб А.В., Скрыбин Н.А., Слепцов А.А., Климова В.С., Фишман В.С., Серов О.Л., Лебедев И.Н.	
СТРУКТУРА КОЛЬЦЕВЫХ РНК ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА	88
Савельева А.В., Литовка Н.П., Кулигина Е.В., Рихтер В.А., Семенов Д.В.	
НОВЫЕ НЕСИНОНИМИЧНЫЕ ЗАМЕНЫ И АДАПТАЦИЯ ЧЕЛОВЕКА НА СЕВЕРОВОСТОКЕ АЗИИ	88
Малярчук Б.А., Деренко М.В.	
ПОИСК ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ НЕСТАБИЛЬНЫХ АТЕРОМ	89
Новикова О.А., Назаркина Ж.К., Лактионов Петр.П., Покушалов Е.А., Карпенко А.А., Лактионов Павел.П.	
ПОВЫШЕННАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ <i>STDSPL1/2</i> ПРИВОДИТ К ПОДАВЛЕНИЮ РОСТА И ИЗМЕНЕНИЮ ФЕНОТИПА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЛЕГКОГО	89
Пузанов Г.А., Егоров Е.Е., Краснов Г.С., Вишнякова Х.С., Дмитриев А.А., Кондратьева Т.Т., Бениаминов А.Д., Сенченко В.Н.	
ВЛИЯНИЕ ЭКЗОСОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЗДОРОВОГО ЧЕЛОВЕКА НА КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА <i>IN VITRO</i>	90
Савельева А.В., Савиновская Ю.И., Кулигина Е.В., Рихтер В.А., Семенов Д.В.	
ТАРГЕТНАЯ ОЦЕНКА ИНДЕКСА МЕТИЛИРОВАНИЯ С ПОМОЩЬЮ БИСУЛЬФИТНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ АМПЛИКОНОВ	90
Скрыбин Н.А., Васильев С.А., Толмачева Е.Н., Лебедев И.Н.	
ДОКАЗАТЕЛЬСТВО ЭФФЕКТА ОСНОВАТЕЛЯ ПО МУТАЦИИ САЙТА СПЛАЙСИНГА c.-23+1G>A ГЕНА <i>GJB2</i> В НЕКОТОРЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ ЕВРАЗИИ ПО ДАННЫМ ПОЛНОГЕНОМНОГО АНАЛИЗА	91
Соловьев А.В., Барашков Н.А., Бады-Хоо М.С., Посух О.Л., Зыцарь М.В., Романов Г.П., Сазонов Н.Н., Алексеев А.Н., Джемилева Л.У., Метспалу Э., Метспалу М., Виллемс Р., Хуснутдинова Э.К., Федорова С.А.	
РЕКОНСТРУКЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ АБЕРРАНТНОЙ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ	91
Проскура А.Л., Сорокоумов Е.Д., Запара Т.А., Ратушняк А.С.	
BINDING SITES OF miR-1322 IN mRNA OF ORTHOLOGIC <i>ARID3B</i> GENES	92
Aisina D.E., Ivashchenko A.T.	
WHOLE-TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF MIRNA EXPRESSION IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS OF RELAPSING-REMITTING MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS	92
Baulina N.M., Kiselev I.S., Osmak G.J., Bashinskaya V.V., Popova E.V., Boyko A.N., Kulakova O.G., Favorova O.O.	
MUTATIONS SPECTRUM OF MAJOR ONCOGENES IN WOMEN WITH MULTIPLE PRIMARY CANCERS	93
Vasiliev GV, Savkova AV, Gerasimov AV, Krasnikov SE, Gulyaeva LF	
T-CELL RECEPTOR ANALYSIS OF THE NAIVE AND MEMORY $\gamma\delta$ T CELLS REVEALS CLONAL SELECTION AMONG $\gamma\delta 1$ SUBSET	93
Kasatskaya SA, Egorov ES, Nakonechnaya TO, Britanova OV	
WHOLE-GENOME DNA METHYLATION PROFILES IN CD4+ AND CD14+ CELLS DEPENDING ON MULTIPLE SCLEROSIS ACTIVITY	94
Kiselev I.S., Kabilov M.R., Kulakova O.G., Danilova L.V., Popova E.V., Baturina O.A., Baulina N.M., Boyko A.N., Favorov A.V., Favorova O.O., Vlassov V.V.	
TRANSCRIPTOME-BASED ANALYSIS OF ALLELE-SPECIFIC GENE EXPRESSION IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA	94
Krivtsova, O., Vinogradov, D., Nabieva, E., Logacheva, M., Penin, A., Lazarevich, N.	
APPLICATION OF NGS IN POPULATION STUDIES	95
Kudryavtsev A.A., Gornostaeva E.V., Anisimenko M.S., Berdyugina D.A., Garanin A.Yu., Slobodyanyuk S.Ya., Kovalenko S.P.	
<i>HK1</i> AND <i>HK2</i> GENE EXPRESSION IN TRIPLE NEGATIVE AND LUMINAL A BREAST CANCER	95
Pudova E.A., Snezhkina A.V., Ermoschenkova M.V., Sukhotko A.S., Fedorova M.S., Sadritdinova A.F., Guvatova Z.G., Savvateeva E.V., Melnikona N.V., Dmitriev A.A., Kaprin A.D., Alekseev B.Y., Zikiryakhodjaev A.D., Kudryavtseva A.V.	
IDENTIFICATION OF GERMLINE MUTATIONS IN SDHx GENES IN CAROTID BODY TUMOR USING NEXT GENERATION SEQUENCING	96
Kudryavtseva A.V., Kalinin D.V., Zaretsky A.R., Golovyuk A.L., Fedorova M.S., Nyushko K.M., Zheveluyk E.A., Stepanov O.A., Krasnov G.S., Snezhkina A.V.	

РИБОСОМНЫЙ ПРОФАЙЛИНГ - УНИВЕРСАЛЬНЫЙ ИНСТРУМЕНТ ИЗУЧЕНИЯ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

Андреев Д.Е.¹, Шатский И.Н.¹

¹ Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ

*e-mail: cycloheximide@yandex.ru

Развитие технологий секвенирования следующего поколения привело к разработке метода рибосомного профайлинга (РП), основанного на глубоком секвенировании фрагментов мРНК, защищаемых транслирующей рибосомой [1]. Данный метод оказался идеальным для изучения экспрессии генов одновременно на уровне транскрипции и трансляции. Важной особенностью РП является информация о местоположении рибосом на мРНК с однонуклеотидным разрешением, что позволяет изучать такие неканонические события в трансляции, как трансляцию в 5' и 3' НТО мРНК, трансляцию перекрывающихся рамок считывания, и смысловое декодирование стоп-кодонов. На данный момент основным применением РП является изучение изменения трансляции и транскрипции в ответ на различные воздействия. Использование РП для изучения трансляции при стрессовых воздействиях будет показано на примерах ответов клеток млекопитающих на окислительный стресс [2] и на удаление кислорода и глюкозы [3]. Несмотря на активное использование метода, существует ряд сложностей

и артефактов, связанных с экспериментальной методологией и обработкой результатов [4,5], некоторые аспекты будут рассмотрены в данном докладе.

Работа поддержана РНФ (грант № 16-14-10065)

1. Ingolia NT, Ghaemmaghami S, Newman JR, Weissman JS. (2009) Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science* 324(5924):218-23
2. Andreev DE, O'Connor PB, Fahey C, Kenny EM, Terenin IM, Dmitriev SE, Cormican P, Morris DW, Shatsky IN, Baranov PV. (2015) Translation of 5' leaders is pervasive in genes resistant to eIF2 repression. *Elife* 4:e03971
3. Andreev DE, O'Connor PB, Zhdanov AV, Dmitriev RI, Shatsky IN, Papkovsky DB, Baranov PV. (2015) Oxygen and glucose deprivation induces widespread alterations in mRNA translation within 20 minutes. *Genome Biology*. 16:90
4. O'Connor PB, Andreev DE, Baranov PV. (2016) Comparative survey of the relative impact of mRNA features on local ribosome profiling read density. *Nature Communications*. 7:12915
5. Andreev DE, O'Connor PB, Loughran G, Dmitriev SE, Baranov PV, Shatsky IN. (2017) Insights into the mechanisms of eukaryotic translation gained with ribosome profiling. *Nucleic Acids Research*. 45(2):513-526

РАЗРУШАТЬ, ЧТОБЫ ЖИТЬ: ОСОБЕННОСТИ КРУГОВОРОТА УБИКВИТИНА В ДИНАМИКЕ

Белогуров А.А.* , Кудряева А.А.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шелякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

*e-mail: belogurov@mx.ibch.ru

Протеасома – высокомолекулярный многосубъединичный белковый комплекс, обладающий протеолитической активностью с широкой субстратной специфичностью, и присутствующий практически в неизменном виде во всех без исключения клетках от археобактерий до высших эукариот. Основной функцией протеасомы является расщепление отслуживших и дефектных клеточных белков, при этом сигналом для разрушения белка является так называемая полиубиквитиновая цепь, состоящая из мономеров убиквитина (Ub), ковалентно связанная с субстратом. Несмотря на значительное количество исследований в этой области, из-за уникальной структуры убиквитина особенности его метаболизма до сих пор остаются проясненными лишь частично. Относительно недавно был предложен метод сайт-специфического внутриклеточного мечения белков, в основе которого лежит использование лигазы липоевой кислоты *E. coli* (LplA), содержащей ряд замен в активном центре. Данная лигаза путем двухстадийной реакции с участием АТФ способна присоединять резорурфин к первичной аминогруппе лизина в составе короткого 13-членного пептида. В настоящем исследовании

данный подход был использован для изучения внутриклеточного метаболизма Ub и поли-Ub конъюгатов. Показано, что среднее время жизни убиквитина составляет порядка 4 часов. Динамическое равновесие достигается при количестве 6 мономерных единиц Ub на молекулу субстрата, в то время как конъюгаты, содержащие более 12 мономеров убиквитина на молекулу белка, существенно теряют свои субстратные свойства в отношении протеасомы и подвергаются активному процессингу деубиквитидазами. Результаты работы свидетельствуют о том, что до четверти молекул убиквитина из состава поли-Ub цепи необратимо утрачивается при каждом акте гидролиза субстрата протеасомой. Полученные данные впервые демонстрируют особенности внутриклеточного метаболизма убиквитина в условиях реального динамического равновесия.

Работа была поддержана проектом РНФ № 14-14-00585

«Молекулярный механизм убиквитин-независимого протеолиза белков протеасомой и его роль в норме и патологии», а также центром коллективного пользования ИБХ РАН (аппаратное обеспечение флуоресцентно-активированного сортирования клеток).

КЛЕТОЧНЫЕ мЯРНК, УЧАСТВУЮЩИЕ В СПЛАЙСИНГЕ, – ПАРТНЕРЫ РИБОСОМНОГО БЕЛКА eS1 ЧЕЛОВЕКА, ВЫЯВЛЕННЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА PAR-CLIP

Гопаненко А.В.^{1,2*}, Малыгин А.А.^{1,2}, Тупикин А.Е.¹, Лактионов П.П.¹, Кабилов М.Р.¹, Карпова Г.Г.^{1,2}

1 Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

2 Новосибирский государственный университет, Новосибирск

*e-mail: alexandr.gopanenکو@yandex.ru

Многие рибосомные белки, находясь вне рибосомы, вовлечены в разнообразные клеточные процессы через взаимодействие со специфическими РНК. В настоящей работе для поиска клеточных РНК-партнёров рибосомного белка (рп) eS1 человека мы использовали метод PAR-CLIP (от англ. photoactivatable-ribonucleoside-enhanced cross-linking and immunoprecipitation). Этот метод основан на получении РНК-белковых сшивок в клетках, выращенных в присутствии фотоактивируемого аналога рибонуклеозида, с последующим глубоким секвенированием ДНК-библиотеки, получаемой на основе сшитых с целевым белком РНК-фрагментов. Применяя данный метод к культуре клеток, продуцирующих FLAG-меченый рп eS1, мы получили ДНК-библиотеку, содержащую информацию о контактах этого белка с клеточными РНК, и провели её секвенирование на платформе Illumina MiSeq. Анализ ридов, картированных на геном hg38, позволил выявить их кластеры, содержащие характеристические Т/С-транзиции, возникающие на месте сшитых с рп eS1 остатков 4-тио-

уридина при приготовлении ДНК-библиотеки. Основные кластеры ридов с наибольшим числом Т/С-транзиций соответствовали генам *RNU11* и *RNU5A-1*, кодирующим малые ядерные (мя) РНК U11 и U5, участвующие в сплайсинге минорных интронов. Большая часть Т/С-транзиций, обнаруженных в этих генах, соответствовала U-богатым участкам в кодируемых ими РНК, а именно: Sm-сайту в U11 мяРНК и петле I в U5 мяРНК. Это указывало, что рп eS1, будучи вне рибосомы, вовлекается в сплайсинг, контактируя с соответствующими районами этих РНК. Анализ транскриптома клеток с пониженным уровнем рп eS1 с помощью RNA-seq действительно выявил снижение эффективности сплайсинга минорных интронов, осуществляемого при участии U11 и U5 мяРНК, а также существенное увеличение доли U11 пре-мяРНК с непроцессированной 3'-концевой последовательностью.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 17-04-00528). Секвенирование проводилось в ЦКП “Геномика” СО РАН.

РЕГИОНЫ ХРОМАТИНА, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ЯДРЫШКОМ, – МИШЕНИ РИБОСОМНОГО БЕЛКА uS3, ВЫЯВЛЕННЫЕ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ChIP-seq

Грошева А.С.¹, Жарков Д.О.^{1,2}, Гопаненко А.В.^{1,2}, Тупикин А.Е.¹, Кабилов М.Р.¹, Грайфер Д.М.^{1,2*}, Карпова Г.Г.^{1,2}

1 Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

2 Новосибирский государственный университет, Новосибирск

*e-mail: graifer@niboch.nsc.ru

Рибосомный белок (рп) uS3 эукариот способен расщеплять ДНК по апурино-апиридиновым (AP) сайтам [1]. Недавно мы показали, что рекомбинантный рп uS3 человека расщепляет AP-сайты предпочтительно в одноцепочечной ДНК, а рп uS3 в составе рибосом сшивается с AP-сайтами ДНК без их расщепления. Для картирования участков связывания рп uS3 на ДНК *in vivo* нами был применён метод, основанный на иммунопреципитации хроматина и высокопроизводительном секвенировании ДНК (ChIP-seq) [2]. Суть метода состоит в фиксации комплексов ДНК с белками формальдегидом, последующем выделении и фрагментации хроматина, извлечении сшитых с исследуемым белком фрагментов ДНК с помощью специфических антител, конъюгированных с магнитными частицами, и получении библиотеки кДНК на основе этих фрагментов (образец ChIP-seq). В контрольных опытах обычно используют образец, приготовленный без конъюгированных антител, и образец, полученный из аликвоты фрагментированного хроматина. Библиотеки кДНК, созданные для трех независимых реплик на основе клеток HEK293, секвенированы с помощью платформы SOLiD 5500xl, длина рида составляла 50 bp, в каждом случае получено около 15 миллио-

нов ридов, картированных уникальным образом на геноме человека (версия hg38). Риды, присутствующие только в образцах ChIP-seq, образуют 229 пиков, расположенных в основном в межгенных районах, гиперчувствительных к ДНКазе I (где хроматин не конденсирован и ДНК более доступна для связывания с белками) в прицентромерных областях хромосом 1, 2, 4, 7, 10, 16, 17 и 20. В хромосомах 7, 10, 16 и 20 эти пики соответствуют районам NAD (nucleolus-associated chromatin domains). Сделан вывод об участии рп uS3 в репарации ДНК и ее регуляции в районе ядрышка.

Работа была поддержана грантом РФФИ 16-04-00241-а. Секвенирование было выполнено в ЦКП “Геномика” СО РАН.

- Graifer, D., Malygin, A., Zharkov, D.O. and Karpova, G. (2014) Eukaryotic ribosomal protein S3: A constituent of translational machinery and an extraribosomal player in various cellular processes, *Biochimie*, **99**: 8–18.
- Grosheva A.S., Zharkov D.O., Stahl J., Gopanenکو A.V., Kabilov M.R., Graifer D.M., Karpova G.G. Recognition but no repair of abasic site in single-stranded DNA by human ribosomal uS3 protein residing within intact 40S subunit // *Nucleic Acids Res.* 2017, doi: 10.1093/nar/gkx052.

СЕЛЕКЦИЯ IN VITRO 2'-F-МОДИФИЦИРОВАННЫХ РНК-АПТАМЕРОВ, СВЯЗЫВАЮЩИХ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ ФОТОПРОТЕИН ОБЕЛИН

Давыдова А.С.^{1*}, Воробьева М.А.¹, Красицкая В.В.^{1,2}, Тупикин А.Е.¹, Воробьев П.Е.¹, Кабилов М.Р.¹, Франк Л.А.², Веньямина А.Г.¹

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

2 Институт биофизики СО РАН, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН»

*e-mail: anna.davydova@niboch.nsc.ru

Создание новых специфичных и эффективных диагностических систем для детекции белковых биомаркеров различных заболеваний является актуальной задачей современной молекулярной биологии и фундаментальной медицины. Перспективным подходом к решению этой задачи представляется создание биоломинесцентных аптасенсоров на основе аптамеров и Ca²⁺-регулируемого фотопротеина обелина. В качестве универсального репортерного модуля для конструирования таких систем нами было предложено использовать аптамер к обелину. Целью данной работы являлось создание устойчивых в биологических средах 2'-F-модифицированных РНК-аптамеров, способных связывать обелин. В качестве мишени для отбора был использован иммобилизованный на Ni-NTA сефарозе рекомбинантный обелин, содержащий His₆-последовательность. Чтобы обеспечить селективность отбора, с первого раунда селекции вводили стадию контр-селекции на Ni-NTA сефарозу, не содержащую обелин, а также использовали замену носителя для иммобилиза-

ции белка. Оценку обогащения библиотеки в ходе селекции проводили методом DiStRO [1], сродство и степень связывания РНК-библиотеки с обелином оценивали методами задержки в геле и DRaCALA [2]. Было показано, что после 10 раундов селекции достигнута максимальная степень обогащения 2'-F-РНК-библиотеки. Было проведено секвенирование дцДНК-формы полученной библиотеки на платформе MiSeq (Illumina) в ЦКП «Геномика» СО РАН. На основании анализа полученных данных были выбраны последовательности индивидуальных аптамеров для скрининга их аффинности к обелину и оптимизации нуклеотидной последовательности.

Данная работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 16-14-10296).

1. T. Schutze et al. (2010) A calibrated diversity assay for nucleic acid libraries using DiStRO—a Diversity Standard of Random Oligonucleotides, *Nucleic Acids Res*, **38**: e23.
2. Roelofs et al. (2011) Differential radial capillary action of ligand assay for high-throughput detection of protein-metabolite interactions, *PNAS*, **37**: 15528-15533.

ИЗУЧЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА ПОЛИУБИКВИТИНОВЫХ ЦЕПЕЙ РАЗНОГО ТИПА ВЕТВЛЕНИЯ

Кудряева А.А.^{1*}, Тупикин А.Е.², Кабилов М.Р.², Белогуров А.А.¹

1 Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

2 Институт Химической Биологии и Фундаментальной Медицины СО РАН, Новосибирск

*e-mail: anna.kudriaeva@gmail.com

Убиквитинирование - одна из основных посттрансляционных модификаций белков в эукариотических клетках. Помимо хорошо известных функций, таких как ориентация субстратов для протеасомной деградации и репарации ДНК, полиубиквитиновые цепи также вовлечены в другие важнейшие клеточные процессы, например, участвуют в регуляции клеточного цикла, в работе иммунной системы, деградации белков в митохондриях и даже стабильности мРНК. Невероятное разнообразие функций убиквитинирования обусловлено способностью убиквитина образовывать цепи различного типа ветвления посредством изопептидных связей между ε-NH₂-группой любого из семи лизинов (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) убиквитина с C-концевой карбоксильной группой второго убиквитина. Что важно, эти связи имеют разную представленность в клетке. Есть предположения, что каждая из этих различных связей придает уникальные структурные и динамические свойства полиубиквитиновой цепи, позволяя разным цепям распознаваться своим белковым рецептором. Хорошо изучены функции полиубиквитинированных цепей при протеасомной деградации и репара-

ции ДНК, состоящих из связей K48 и K63 соответственно. Клеточные функции других, так называемых неканонических цепей убиквитина, являются существенно менее ясными и активно изучаются в настоящее время. В данном исследовании был изучен внутриклеточный метаболизм полиубиквитинированных конъюгатов с использованием ДНК-кодируемой резорфин-лигазы, которая способна присоединять молекулу низкомолекулярного флуорофора резорфина к аминокислоте лизина, входящего в состав 13-членного пептида. С помощью данного метода было исследовано время полужизни убиквитина дикого типа и его функциональных мутантов и проведена оценка субстратной специфичности протеасомы к убиквитиновым цепям с различными типами связи, в том числе разветвленным, с использованием комбинации методов проточной цитометрии и широкомасштабного секвенирования на платформе Illumina.

Работа была поддержана проектом РФФ № 14-14-00585, а также центром коллективного пользования ИБХ РАН (проточная цитометрия). Секвенирование проводилось на платформе MiSeq (Illumina) в ЦКП «Геномика» СО РАН.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИЙ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ ЧЕЛОВЕКА В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ НА УРОВНЕ ТРАНСЛЯЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РИБОСОМНОГО ПРОФАЙЛИНГА

Малыгин А.А.^{1,2*}, Гопаненко А.В.^{1,2}, Антропов Д.Н.^{1,2}, Мелентьев В.С.^{1,2}, Бартули Ю.С.¹, Тупикин А.Е.¹, Кабилов М.Р.¹, Карпова Г.Г.^{1,2}

1 Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

2 Новосибирский государственный университет, Новосибирск

*e-mail: malygin@niboch.nsc.ru

Метод рибосомного профайлинга (Ribo-seq) является мощным инструментом для изучения экспрессии генов на уровне трансляции, позволяющим определять моментальный уровень всех транслируемых мРНК в клетке [1]. Этот метод основан на высокопроизводительном секвенировании библиотек ДНК, получаемых на основе фрагментов мРНК, защищаемых рибосомами от нуклеазного гидролиза, и последующем анализе дифференциальной экспрессии генов на уровне трансляции.

Рибосомные белки eL29 и eL38 не являются обязательными компонентами рибосомы человека, но их отсутствие в 60S субчастице может приводить к изменению эффективности трансляции отдельных мРНК [2]. Мы понизили уровни данных белков в клетках НЕК293 в 2-3 раза с помощью РНК интерференции и показали, что такое снижение практически не сказывается ни на составе клеточного транскриптома, ни на общей трансляционной активности клеток. Вместе с тем с помощью Ribo-seq мы обнаружили, что при снижении уровней рибосомных белков eL29 и eL38 в этих клетках происходит значительное уменьшение эф-

фективности трансляции мРНК больших наборов генов, чьи продукты участвуют в совершенно разных процессах. Так, в наборе, специфичном для белка eL29, выявлены гены, кодирующие белки, связанные с метаболизмом различных видов РНК и регуляцией клеточного роста, а для белка eL38 – с клеточной подвижностью и гомеостазом. Таким образом, нами установлено, что через снижение уровня рибосомных белков eL29 и eL38 клетки способны осуществлять регуляцию трансляции мРНК целых групп генов, чьи продукты оказываются необходимыми на определенных этапах их жизнедеятельности.

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации (МК-7535.2016.4) и Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 17-04-00528). Секвенирование проводилось в ЦКП “Геномика” СО РАН.

1. N.Ingolia et al. (2009) Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling, *Science*, **324**: 218-223.

2. N.Kondrashov et al, (2011) Ribosome-mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning, *Cell*, **145**:383-397.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА FLOWSEQ ДЛЯ АНАЛИЗА ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРАНСЛЯЦИИ БИБЛИОТЕК БАКТЕРИАЛЬНЫХ мРНК

Сергиев П.В.^{1,2*}, Евфратов С.А.¹, И.А. Остерман^{1,2}, Е.С. Комарова^{1,2}, А.М. Погорельская¹, М.П. Рубцова^{1,2}, Е.С. Кострюкова³, М.Р. Кабилов⁴, Е. Бурнаев^{2,5}, М.С. Гельфанд^{1,2,5}, В.М. Говорун³, А.А. Богданов¹, О.А. Донцова^{1,2}

1 Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Москва

2 Сколковский Институт Науки и Технологии, Московская область

3 ФНКЦ Физико Химической Медицины, Москва

4 Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

5 Институт проблем передачи информации

*e-mail: petya@genebee.msu.ru

Понимание факторов, влияющих на эффективность экспрессии генов, в частности, на эффективность трансляции мРНК, важно как для фундаментальной науки, так и для биотехнологии. С развитием методов протеомики и рибосомного профайлинга стало возможным определять эффективность экспрессии всего разнообразия генов данного организма. Природные мРНК оптимизировались в ходе эволюции с тем, чтобы экспрессия происходила максимально эффективно и экономно, какой бы уровень экспрессии гена не требовался организму. Таким образом, из выборки для сравнительного анализа оказываются исключенными мРНК, трансляция которых малоэффективна. Также, при отборе мРНК в ходе эволюции мог иметь значение «объем» локального максимума эффективности трансляции, т.е. из анализа могут выпасть потенциально эффективные мРНК, последовательность которых попадает в область уникального максимума эффективности. Наконец, количество генов, в особенности генов бактерии, достаточно ограничено.

Для поиска свойств мРНК, влияющих на эффективность трансляции, мы создали несколько библиотек репортерных конструкций, по разнообразию нуклеотидных последовательностей значительно превышающих разнообразие природных мРНК. Использование флюоресцентных белков в качестве репортеров позволило нам с помощью клеточного сортера разделить клетки, трансформированные библиотекой репортерных конструкций по фракциям, различающимся эффективностью трансляции. Последующее секвенирование собранных фракций выявило последовательности мРНК, обеспечивающие различные уровни экспрессии. Анализ полученных данных позволил выявить особенности хорошо транслируемых мРНК.

Работа выполнена при поддержке РФФ, грант 14-14-00072.

1. S.A. Evfratov et al., (2017) Application of sorting and next generation sequencing to study 5'-UTR influence on translation efficiency in *Escherichia coli*, *Nucleic acids research*, **45**: 3487-3502.

SINGLE-NUCLEUS HI-C REVEALS UNIQUE CHROMATIN REORGANIZATION AT OOCYTE-TO-ZYGOTE TRANSITION

Flyamer IM, Gassler J, Imakaev M, Brandão HB, Ulianov SV, Abdennur N, Razin SV, Mirny LM, Tachibana-Konwalski K
IMBA, the Austrian Academy of Sciences, Vienna Biocenter (VBC), Vienna; Institute of Gene Biology RAS, Moscow; Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow
e-mail: Ilya.Flyamer@igmm.ed.ac.uk

Chromatin is reprogrammed after fertilization to produce a totipotent zygote with the potential to generate a new organism. The maternal genome inherited from the oocyte and the paternal genome provided by sperm coexist as separate haploid nuclei in the zygote. How these two epigenetically distinct genomes are spatially organized is poorly understood. Existing chromosome conformation capture-based methods are not applicable to oocytes and zygotes owing to a paucity of material. To study three-dimensional chromatin organization in rare cell types, we developed a single-nucleus Hi-C (high-resolution chromosome conformation capture) protocol that provides greater than tenfold more contacts per cell than the previous method. Here we show that chromatin architecture is uniquely reorganized during the oocyte-to-zygote transition in mice and is distinct in paternal and maternal

nuclei within single-cell zygotes. Features of genomic organization including compartments, topologically associating domains (TADs) and loops are present in individual oocytes when averaged over the genome, but the presence of each feature at a locus varies between cells. At the sub-megabase level, we observed stochastic clusters of contacts that can occur across TAD boundaries but average into TADs. Notably, we found that TADs and loops, but not compartments, are present in zygotic maternal chromatin, suggesting that these are generated by different mechanisms. Our results demonstrate that the global chromatin organization of zygote nuclei is fundamentally different from that of other interphase cells. An understanding of this zygotic chromatin 'ground state' could potentially provide insights into reprogramming cells to a state of totipotency.

A NOVEL CROSSLINKING AND IMMUNOPRECIPITATION METHOD REVEALS THE FUNCTION OF CSTF2TAU IN ALTERNATIVE PROCESSING OF SNRNAS

Kargapolova Y.^{1*}, Levin M.², Danckwardt S.²

¹ Center for Molecular Medicine, University of Cologne, Cologne, Germany

² Center for Thrombosis and Hemostasis, University Medical Center Mainz, Mainz, Germany

*e-mail: yulia.kargapolova@uk-koeln.de

RNA-binding proteins (RBPs) play a crucial role in the regulation of gene expression on various levels. RNA exists in a form of RNA-protein (RNP) particle throughout the life span. The composition and the structure of RNP vary between cell types, upon various stimuli and in time, and effect the fate of RNA. Mutations in RNA-binding proteins therefore can tremendously change the transcriptome profile of the cell and may be detrimental for the cell fate. Numerous mutations in RBPs are linked to inherited human diseases. The study of the mechanisms of recognition of target genes by RBPs and their role on the fate of targets is crucial for understanding disease mechanisms treating and diagnostics of the human diseases.

The existing approaches for illuminating the specificity of RNA-binding proteins (such CLIP and its variants) are capable of detecting the RNA-protein interactions in a living cell. Yet they are characterized by usage of radioactivity, which is banned in many laboratories, and complexity of library synthesis protocols. These limitations restrict the broad scientific community, especially non-expert laboratories from the usage of the protocols.

To overcome the above mentioned limitations, we modified the protocol. The modified protocol (sCLIP) is free of ra-

dioactivity, avoids using RNA-ligation on low input material, thus improving the complexity, robustness and reproducibility of the cDNA synthesis procedure. The protocol requires as little as 10 cycles of PCR amplification, thereby reducing non-desired amplification artefacts.

We confirmed the performance of the protocol by applying it to a known RNA-binding protein, CSTF2tau. The data, generated by conCLIP recapitulate previously described RNA recognition properties of this protein, it also revealed yet undescribed binding capacities such as specific recognition of some small non-coding RNAs. We also describe for the first time that small nuclear (sn)RNAs, involved in splicing, are significantly upregulated upon depletion of CSTF2tau. Interestingly, the same group of snRNAs is bound by the protein and the binding occurs at the 3' end of the molecules. We also reveal that a fraction of snRNAs is oligoadenylated and this fraction decreases after CSTF2tau depletion. Moreover, the depletion of the protein stabilizes snRNAs. We propose a new mechanism by which the level of the snRNAs can be regulated via the activation of internal cleavage and polyadenylation sites by CSTF2tau (presumably with other processing components).

THE CHICKEN HI-C DATA REVEAL THE RELATIONS BETWEEN THE LOCAL GENOME PROPERTIES AND THE CHROMOSOME ARCHITECTURE

Nuriddinov M.A.^{1*}, Fishman V.S.^{1,2}, Battulin N.R.^{1,2}, Maslova A.V.³, Serov O.L.^{1,2}, Krasikova A.V.³

¹ Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

*nuriddinov@bionet.nsc.ru

Recent success into understanding role of chromosomal structure was achieved by using Hi-C method combining massively parallel DNA sequencing technologies and chromosome conformation capture technics. The chromosome architecture is shown by Hi-C data to play important role in gene regulation, transcription and replication. These ideas are supported by investigation of the mammalian genome to reveal high conservation of chromosomal structure across both cell types within an organism and evolution lineages.

To compare properties of the spatial genome organization between mammals and birds, we profiled the chicken chromosomes topology. For this aim, we determined genome-wide chromatin interaction frequencies in chicken embryonic fibroblasts (CEF) and chicken mature erythrocytes (CME) using Hi-C technique.

We characterized the chromosomal structure patterns of investigated cell types through a distribution of genome elements, such as the high and low expressed genes, CTCF-binding sites, H3K4me3 and H3K27ac histone modifications,

salt-soluble chromatin domains, conservative non-coding and repetitive elements.

In contrast to the mammalian, the chromosome architecture was not conserved between examined chicken cell types. The genome element distribution in CEF shares the pattern obtained for the mammals, while this is not obtained for CME.

The evolution comparison of human, mouse and chicken fibroblast chromatin structures revealed the high similarity of chromosome architecture in spite of radically different chromosomal evolution within avian and mammalian lineages.

Ours results suggest that there are common mechanisms forming chromosome architecture across the avian and mammalian lineages. However, the chromatin structure of the avian mature erythrocytes is likely to be defined by yet unknown mechanisms.

This work was supported by state project No. 0324-2016-0002 of Russian Academy of Sciences.

ПРОЦЕДУРА ТРИММИНГА МЕТАГЕНОМНЫХ ДАННЫХ, ПОЛУЧЕННЫХ ПУТЕМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ АМПЛИКОНОВ

Букин Ю.С.^{1,2*} Галачянц Ю.П.¹

1 Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

2 Иркутский национальный исследовательский технический университет, Иркутск

*e-mail: bukinyura@mail.ru

Технология массового параллельного секвенирования широко применяется для анализа генетического разнообразия микроорганизмов в различных сообществах. При этом анализируют последовательности, полученные при секвенировании ампликонных библиотек различных маркерных генов, например, 18S и 16S рРНК, нейтрально эволюционирующие последовательности или фрагменты белок-кодирующих генов. При проведении подобных исследований для получения статистически достоверного результата необходимо увеличение как длины фрагментов, так и количества последовательностей. Для оптимизации исходных данных в двух указанных направлениях часто используется технология «Illumina» с парными концевыми прочтениями фрагментов исходной библиотеки. Однако при этом возникает проблема, связанная с триммированием прочтений при контроле качества секвенирования на стадии биоинформационного анализа. В случае, если длина ампликона превышает протяженность прочтений на 50–80%, в средней части контигов возникают области с низкими Phred-значениями. Тримминг таких наборов данных стан-

дартными средствами приводит к резкому сокращению числа последовательностей, пригодных для анализа.

Для того чтобы решить эту проблему нами был разработан алгоритм (Pipeline), позволяющий удалять не целые последовательности, а столбцы (сайты) из набора выровненных последовательностей содержащих нуклеотиды (буквы) с неудовлетворительным качеством прочтения. Удаление столбцов таким образом не вносит искажения в процессы анализа, основанные на расчете генетических дистанций между сопоставляемыми последовательностями. Для реализации алгоритма применяли пакет программ «Mothur», и пакеты R: «SeqInR» и «ShortRead». Применение разработанного алгоритма позволяет достичь компромисса между длиной прочтения и количеством анализируемых последовательностей.

Работа выполнена при финансовой поддержки интеграционного проекта 4.1.2 «Применение методов NGS-BD (Next Generation Sequencing – Big Data) – для решения вопросов экологии»

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ И АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ГЛИОМ ПО ДАННЫМ RNA-SEQ

Губанова Н.В.^{1,2*}, Брагин А.О.¹, Бабенко В.Н.^{1,2}, Гайтан А.С.³, Кривошапкин А.Л.³, Ю.Л. Орлов^{1,2}

1 Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

2 Новосибирский государственный университет, Новосибирск

3 Сибирский федеральный биомедицинский исследовательский центр им. академика Е.Н. Мешалкина, Новосибирск

*e-mail: nat@bionet.nsc.ru

Технологии секвенирования позволяют определять полный спектр изменений экспрессии генов. Проведён эксперимент по анализу транскриптом (RNA-Seq) в первичных культурах клеток глиом и нормального мозга. Рассмотрены по 3 библиотеки транскриптомов глиом и нормального мозга (более чем 20 млн. прочтений каждая). Использовались компьютерные конвейеры обработки транскриптомных данных (Cufflinks, rMATS), применявшиеся ранее для анализа транскриптомов лабораторных животных [1]. Анализ внутренних контролей ERCC Spike-In Mix показал отсутствие искажений представленности при приготовлении библиотек и секвенировании. При сравнении тканей глиомы со здоровой тканью были найдены более восьми тысяч случаев дифференциальной экспрессии [2]. Дифференциально экспрессирующиеся гены были сверхпредставлены в процессах, связанных с межклеточным взаимодействием, клеточной гибелью, метаболизмом в клетке, что подтверждает связь с раковыми заболеваниями. На основе анализа базы данных OMIM и литературы из данного списка выявлено 73 дифференциально экспрессирующихся гена, которые опосредуют развитие глиомы. Дифференциальную

экспрессию имели гены комплекса ядерной поры (NPC). Кроме того, в рассмотренных выявлено несколько тысяч случаев альтернативного сплайсинга, из них для 123 генов имеются подтверждения в литературе об их роли в развитии глиомы. Выявлены достоверные различия профилей сплайсинга между клетками нормального мозга и глиобластомы для трех генов, связанных с возможной пролиферацией: белок-прекурсор амилоида бета APP (amyloid beta precursor protein), ген предрасположенности к раку CASC4 (cancer susceptibility candidate 4) и известный онкоген – транскрипционный фактор TP53. В частности, в гене TP53 наблюдалась некодирующая изоформа NR_015381 с достоверно большей частотой в клетках глиобластомы.

Работа поддержана РНФ и бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН (0324-2016-0003).

1. V.N. Babenko et al. (2016) Analysis of differential gene expression by RNA-seq data in brain areas of laboratory animals, *Journal of Integrative bioinformatics*, **13**(4):292.
2. V.N. Babenko et al. (2017) Computer Analysis of Glioma Transcriptome Profiling: Alternative Splicing Events, *Journal of Integrative Bioinformatics*, (In Press).

МЕТОД ВСЕСТОРОННЕГО АНАЛИЗА РЕПЕРТУАРА Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ.**Израэльсон М.^{1,2,*}, Наконечная Т.О.¹, Шугай М.², Британова О.В.^{1,2}.**¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва*e-mail: mizraelson@gmail.com

Репертуар Т-клеточных рецепторов представляет собой сложную структуру, состоящую из сотен миллионов различных последовательностей белковых цепей Т-клеточных рецепторов. Нашей лабораторией был разработан метод для проведения всестороннего анализа структуры репертуара Т-клеточных рецепторов (ТКР). Это метод включает в себя создание молекулярно-баркодированных кДНК библиотек генов, кодирующих цепи ТКР, а также комплексное программное обеспечение, позволяющее получить детальную информацию о свойствах репертуара и провести сравнение репертуаров нескольких образцов между собой. На первом этапе анализа данных используется специализированное программное обеспечение MiGes, которое, основываясь на уникальном “молекулярном баркоде”, встроенном в каждую молекулу кДНК, позволяет устранить нуклеотидные замены, возникающие в ходе ПЦР и секвенирования.

На следующем этапе процессирования данных применяется программное обеспечение MiXCR, которое проводит разметку последовательностей, выделяя V,D,J сегменты и CDR3 регион в последовательностях альфа и бета цепей ТКР. Для проведения пост-анализа применяется программный пакет VDJ-tools, также разработанный и постоянно обновляемый нашим коллективом. Это мощный инструмент, который дает возможность провести статистический анализ и визуализировать свойства репертуара, исследовать физические свойства антиген-связывающего участка. Разработанный метод всестороннего анализа репертуара ТКР был с успехом применен нами для получения новых сведений о структуре и динамике репертуаров ТКР человека и мыши.

*Работа поддержана грантом РНФ №16-15-00149***«МУЛЬТИОМИКС» ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ПРОТЕОМА****Киселева О.И.* , Поверенная Е.В.**

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва

*e-mail: olly.kiseleva@gmail.com

Ключевым вопросом молекулярной биологии является то, каким образом геномная информация реализуется в фенотипических проявлениях, формируемых гетерогенным протеомом. Сопоставление геномных, транскриптомных и протеомных данных позволяет приступить к идентификации aberrantных форм белков.

Для оценки гетерогенности протеома, возникающей в результате реализации на белковом уровне однонуклеотидных замен (ОНЗ), альтернативного сплайсинга и посттрансляционных модификаций, были использованы результаты высокопроизводительного секвенирования транскриптома постмортальных образцов ткани печени и клеточной линии HepG2, полученные независимо на платформах Illumina и SOLiD. Высокая корреляция ($R^2=0,9$) между уровнями экспрессии генов, выполненных на различных платформах, позволила объединить результаты для идентификации протеоформ.

Суммарно на транскриптомном уровне было выявлено 138 тыс. событий (замен, делеций, вставок), при этом для хромосомы 18 человека (целевой хромосомы Российской части международного проекта «Протеом человека») идентифицировано 1869 событий, из которых 592 варианта были ранее зафиксированы в базе UniProtKB. Альтернативный сплайсинг зафиксирован в 72 и 89 белок-кодирующих генах целевой хромосомы в клетках печени и линии HepG2, соответственно, причем

57 обнаруженных сплайс-форм 42 генов ранее не были аннотированы.

Протеомное профилирование клеток гепатоцитов методом двумерного электрофореза (2DE) с использованием экзом-специфичной базы при последующем масс-спектрометрическом анализе геля позволило идентифицировать 116 протеоформ, образованных ОНЗ- и сплайс-формами, для 32 генов, локализованных на хромосоме 18. Для клеточной линии HepG2 были идентифицированы 228 протеоформ, кодируемых 50 генами исследуемой хромосомы. Всего выявлено примерно 15 тыс. протеоформ, кодируемых 3 тыс. генов в клетках печени, и 30 тыс. протеоформ, кодируемых 4 тыс. генов в клетках линии HepG2.

Предлагаемый “мультиомиксный” подход, использующий результаты транскриптомного и протеомного профилирования уникального образца, позволяют сфокусироваться на поиске конкретной подтвержденной на уровне транскрипта протеоформы. Сопровождаемая биоинформатическими подходами синергия больших транскриптомных и протеомных данных, а также мониторинг не одной протеоформы, а целого гетерогенного протеомного профиля позволит приблизиться к пониманию функционирования сложных биологических систем.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 15-15-30041

МОЛЕКУЛЯРНОЕ БАРКОДИРОВАНИЕ КАК СРЕДСТВО БЕЗОШИБОЧНОГО АНАЛИЗА РЕПЕРТУАРА АНТИТЕЛ

Лебедин М.Ю.^{1*}, Турчанинова М.А.¹, Давыдов А.Н.², Чудаков Д.М.^{1,3}

1 Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва

2 Central European Institute of Technology, Brno, Czech Republic

3 Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва

*e-mail: lebemih@gmail.com

Одним из механизмов защиты организма от инфекционных заболеваний является гуморальный иммунитет, опосредованный иммуноглобулинами, вырабатываемыми В-клетками. В-клетки наряду с Т-клетками обладают способностью генерировать большое разнообразие иммунных рецепторов благодаря рекомбинации кодирующих их геномных локусов. Их репертуар во многом определяет реакцию организма на различные заболевания. В-клетки сильно отличаются по уровню экспрессии иммуноглобулинов как между функциональными популяциями (наивными, клетками памяти, плазматическими клетками), так и между клетками в пределах одной популяции, что не позволяет количественно анализировать представленность клонов В-клеток по результатам секвенирования библиотек, полученных на основе РНК. Мы разработали метод создания молекулярно баркодированных библиотек перестроенных локусов иммуноглобулинов, использующий

в качестве начального материала геномную ДНК плазматических клеток. С помощью высокопроизводительного секвенирования и биоинформатического анализа мы изучили полученные новым методом библиотеки и продемонстрировали более высокую корреляцию численностей клонов между репликами одного пациента по сравнению с библиотеками, полученными на основе РНК плазматических клеток. Разработанный подход позволяет с достаточно высокой точностью определить соотношение клонов В-лимфоцитов в исследуемых образцах. Используя этот метод, исследователи смогут получать надежную информацию об изменениях в репертуарах иммуноглобулинов с возрастом, в ответ на вакцинацию или терапию, сравнивать клональные репертуары для различных субпопуляций В-лимфоцитов, различных тканей, различных доноров.

Работа поддержана грантом РФФИ 14-14-00533.

СТАТИСТИЧЕСКИЕ ОЦЕНКИ ОШИБОК КОРОТКИХ ПРОЧТЕНИЙ ДНК ПРИ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОМ СЕКВЕНИРОВАНИИ

Васильев Г.В.¹, Орлова Н.Г.^{2,3}, Абнизова И.И.⁴, те Боекхорст Р.⁵, Орлов Ю.Л.^{1,3*}

1 Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

2 Новосибирский государственный архитектурно-строительный университет (Сибстрин), Новосибирск

3 Новосибирский государственный университет, Новосибирск

4 Институт Сэнгера, Велком Траст, Кембридж, Великобритания

5 Университет Хартфордшира, Хатфилд, Великобритания

*e-mail: orlov@bionet.nsc.ru

Стремительно растущий объем данных высокопроизводительного секвенирования ДНК ставит ряд новых задач анализа данных, связанных с контролем качества прочтений. Рассмотрена модель анализа ошибок полногеномного секвенирования транскриптом по данным высокопроизводительного секвенирования, что необходимо как технической обработки данных секвенирования, так и для определения нуклеотидных полиморфизмов [1]. Конкуренция технологий секвенирования, таких как Illumina Solexa, SOLiD приводит к проблеме несовместимости форматов данных, и что более критично, потенциально к ошибочным выводам, основанным на некорректном отображении ДНК ридов [2]. Изучение геномной контекста однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), которые определяются, в том числе с накоплением данных секвенирования, представляет отдельный интерес. Выполнен анализ геномного контекста SNP-содержащих сайтов с использованием программного обеспечения для оценок сложности текста нуклеотидных последовательностей (по Лемпелю-Зиву, лингвистической сложности и энтропии). Показано, что фланкирующие районы вокруг сайтов полиморфизмов, имеют пониженную

контекстную сложность [3]. В то же время, участки последовательностей низкой сложности, политракты и простые повторы связаны с систематическими ошибками в определении последовательностей, интерпретации результатов секвенирования. В целом, предварительная обработка и фильтрация данных имеет большое значение для эффективного обнаружения одиночных нуклеотидных полиморфизмов, выявления сайтов связывания транскрипционных факторов и других функционально важных участков генома [1,2].

Работа поддержана РФФИ и бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН (0324-2016-0008).

1. R. Boekhorst et al. (2016) Computational problems of analysis of short next generation sequencing reads, Вавиловский журнал генетики и селекции, **20**(6):746-755.
2. I. Abnizova, R. te Boekhorst, Y. Orlov (2017) Computational Errors and Biases of Short Read Next Generation Sequencing, J Proteomics Bioinform, **10**:1-17.
3. Н.С. Сафронова и др. (2015) Фланкирующие повторы мономеров определяют пониженную контекстную сложность сайтов однонуклеотидных полиморфизмов в геноме человека, Вавиловский журнал генетики и селекции, **19**(6):668-674.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ПРЕДСКАЗАНИЯ G-КВАДРУПЛЕКСНЫХ СТРУКТУР НА ОСНОВЕ ДАННЫХ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА

Пузанов М.А.* , Бениаминов А.Д., Щелкина А.К., Лившиц М.А., Калюжный Д.Н.

Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва

*e-mail: m_puzanov@mail.ru

В настоящее время участие G-квадруплексных (G4) структур в регуляции экспрессии ряда генов находит экспериментальное подтверждение. Предсказание последовательностей, потенциально способных образовывать G4 структуры (potential quadruplex sequence – PQS), является актуальной задачей.

Мы провели сравнение двух алгоритмов предсказания PQS: (1) алгоритма G3L7, основанного на поиске по регулярному выражению $G\{3\}.\{1-7\}G\{3\}.\{1-7\}G\{3\}.\{1-7\}G\{3\}$; (2) алгоритма G4Hunter [1]. В качестве стандарта для анализа качества алгоритмов мы выбрали множество экспериментально подтвержденных PQS полученных при полногеномном анализе G4 последовательностей ДНК человека [2].

Оказалось, что алгоритм G3L7 имеет относительно низкую чувствительность (35%) при этом доля истинно положительных результатов равнялась 55%. Чувствительность алгоритма G4Hunter гораздо выше 83 % и 92 % в зависимости от параметра поиска (1.5 и 1.3 соответственно). Однако,

истинно положительных результатов было всего 36 % случаев и 12 % при параметре поиска 1.3 и 1.5 соответственно. Таким образом, мы установили, что G4Hunter дает наиболее полное предсказание PQS но обладает большим числом ложноположительных результатов. Поиск PQS по регулярному выражению с параметрами по 3 гуанина в блоке и до 7и нуклеотидов в петле обладает более точным предсказанием, хотя и находит лишь около 35% из экспериментальной выборки.

Выбор метода поиска потенциально квадруплексных последовательностей зависит от поставленной задачи: обеспечить селективность или чувствительность.

Работа была поддержана грантом РФФИ № 16-14-10396.

1. Bedrat et al. (2016) Re-evaluation of G-quadruplex propensity with G4Hunter, Nucl. Acids Res, 44 (4): 1746-1759.
2. Chambers et al. (2015) High-throughput sequencing of DNA G-quadruplex structures in the human genome, Nat Biotechnol, 33(8):877-81.

АНАЛИЗ ГЕНОМНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ В ПОПУЛЯЦИЯХ С ПОМОЩЬЮ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА ПРИМЕРЕ ВЫБОРКИ МОНГОЛОВ КИТАЯ

Табиханова Л.Э.^{1*}, Чен М.², Бай Х.², Осипова Л.П.¹, Орлов Ю.Л.^{1,3}

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

² Национальный Университет Внутренней Монголии, г.Тунляо, Китай

³ Новосибирский государственный университет, Новосибирск

*e-mail: tabikhan@bionet.nsc.ru

Анализ нуклеотидных полиморфизмов выявленных с помощью секвенирования в геноме человека представляет новый спектр задач для генетики популяций. Ишемический инсульт, вызванный прерыванием потока крови в мозг, представляет серьезную медицинскую проблему, являясь фактором риска смерти и потери трудоспособности. Опубликованные исследования геномных ассоциаций (GWAS) определили более 40 общих вариантов геномных последовательностей, связанных с ишемическим инсультом. Однако результаты не могут быть одинаково применимы для различных мировых популяций. Была рассмотрена гипотеза о том, что население Северной Азии, живущее в суровых условиях окружающей среды, может иметь уникальный спектр генов риска развития заболеваний сердечно-сосудистой системы. Мы исследовали гены-кандидаты предрасположенности к ишемическому инсульту в популяции монголов Китая, которая не была исследована ранее [1,2]. В исследование были включены в общей сложности 167 больных с инсультом и 176 здоровых лиц. Генотипирование было выполнено с помощью секвенирования ампликонов. Была обнаружена ассоциация раз-

вития ишемического инсульта с одиночными нуклеотидными полиморфизмами (ОНП) в генах NINJ2 (rs12425791) и ALDH2 (rs2238151), а также в экзоне rs9536591. Среди генов-кандидатов наибольший вклад в развитие инсульта вносит NINJ2 (rs12425791). Ген ALDH2 кодирует митохондриальный фермент альдегиддегидрогеназу, вовлеченную в окислительный путь метаболизма алкоголя. Пол, возраст, индекс массы тела и высокое кровяное давление также могут быть факторами риска. Работа показала существующую гетерогенность между китайской и другими популяционными выборками [2]. Данное исследование предлагает новый взгляд на взаимодействие генотипа и факторов окружающей среды при развитии ишемического инсульта в монгольском населении.

Работа поддержана бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН (0324-2016-0008).

1. H. Bai et al. (2015) Association analysis of genetic variants with type 2 diabetes in a Mongolian population in China, *Journal of Diabetes Research*, 2015:613236.
2. Q. Wu et al. (2017) Genetic polymorphisms and related risk factors of ischemic stroke in a Mongolian population in China, *Вавиловский журнал генетики и селекции*, (принято в печать).

МЕТОД НОРМАЛИЗАЦИИ ГЕНОМНОЙ ДНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДУПЛЕКС-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ НУКЛЕАЗЫ КАМЧАТСКОГО КРАБА

Шагин Д.А.^{1,2*}, Шагина И.А.²

1 ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

2 ГБОУ ВПО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва;

* e-mail: shagdim777@gmail.com

Анализ эукариотических геномов с использованием технологий высокопроизводительного секвенирования следующего поколения становится все более востребованным. Однако, присутствие внутри растительных и животных геномов большого количества повторов ДНК сильно удорожает эту процедуру. Для решения проблемы нами была разработана технология нормализации геномной ДНК с использованием дуплекс-специфической нуклеазы (ДСН) из камчатского краба. ДСН – термостабильная ДНКаза (КФ 3.1.21), которая специфически гидролизует двухцепочечную (дц) ДНК, оставляя в растворе молекулы одноцепочечной (оц) ДНК. Образец фрагментированной геномной ДНК человека подвергали кратковременной денатурации при 98°C (3 минуты) и длительной ренатурации при 68°C (5 часов). В процессе ренатурации фракция высокомолекулярных повторов ДНК формировала дц фрагменты, которые впоследствии гидролизировались ДСН при 65°C. Фракция уникальных последовательностей ДНК оставалась в виде оц молекул, не подвергаясь действию ДСН. После амплификации нормализованный и контрольный (ненормализованный) образцы геномной ДНК секвенировались на автоматизированной системе 454 GS FLX (Roche). Было обнаружено, что контрольный образец геномной ДНК содержит около 40% повторяющихся элементов, в то время как в нормализованном образце таких последовательностей было 25%. В образце нормализованной геномной ДНК отмечалось существенное снижение уровней Alu, LINE L1P, ERV-K и ERV1, а также сателлитных ДНК. Характерно, что представленность эволюционно более древних повторов изменялась незначительно. ПЦР в режиме реального времени уникальных фрагментов 11 различных генов человека не выявила изменений в их относительном количестве в нормализованном образце по сравнению с контрольным. Таким образом, ДСН-нормализация геномной ДНК является эффективным методом удаления высокомолекулярных повторяющихся элементов ДНК, при сохранении представленности уникальных последовательностей. Эта технология может быть полезна перед секвенированием эукариотических геномов, особенно тех, которые содержат большое количество эволюционно молодых повторов.

званный) образцы геномной ДНК секвенировались на автоматизированной системе 454 GS FLX (Roche). Было обнаружено, что контрольный образец геномной ДНК содержит около 40% повторяющихся элементов, в то время как в нормализованном образце таких последовательностей было 25%. В образце нормализованной геномной ДНК отмечалось существенное снижение уровней Alu, LINE L1P, ERV-K и ERV1, а также сателлитных ДНК. Характерно, что представленность эволюционно более древних повторов изменялась незначительно. ПЦР в режиме реального времени уникальных фрагментов 11 различных генов человека не выявила изменений в их относительном количестве в нормализованном образце по сравнению с контрольным. Таким образом, ДСН-нормализация геномной ДНК является эффективным методом удаления высокомолекулярных повторяющихся элементов ДНК, при сохранении представленности уникальных последовательностей. Эта технология может быть полезна перед секвенированием эукариотических геномов, особенно тех, которые содержат большое количество эволюционно молодых повторов.

ГЕНОМ-ЦЕНТРИРОВАННАЯ ИНФОРМАЦИОННАЯ СИСТЕМА АНАЛИЗА И ИНТЕРПРЕТАЦИИ ОМИКСНЫХ ДАННЫХ ЧЕЛОВЕКА

Шлихт А.Г., Краморенко Н.В.

Дальневосточный федеральный университет, Владивосток

*e-mail: schliht@mail.ru

В процессе секвенирования и последующего анализа омиксных данных о человеке возникают сложные задачи, связанные с интеграцией и интерпретацией этих данных. Как правило, аннотирование ведется на базе референсного генома, многочисленных мутаций, последующего транскриптомики, протеомики, метаболомики анализа.

Нами создана информационная система (ИС) по анализу и интерпретации омиксных данных: геномики, транскриптомики, протеомики, метаболомики, реактомики, интерактомики, мутациям, заболеваниям, мотивам, нутриомики, фудомики. Все эти омики связаны сквозными связями, что позволяет строить сложные логические ассоциации от мутаций до заболеваний, включая все промежуточные стадии: мутация, ген, транскрипт, протеин, фермент, реакция, метаболические пути, метаболиты, заболевания. Это позволяет, в свою очередь, промоделировать глубокие связи между генетическими, биохимическими и физиологическими процессами в живых организмах под действием мутаций в генотипе. Отличительной особенностью разработанной системы, от традиционного подхода на базе процедурных языков

R, Python функционирующих в интерактивном режиме, является автономизация, интеллектуальная структуризация слабоструктурированных и слабоинтегрированных данных всемирных порталов, обеспечивающая полноту и непротиворечивость данных, глубокие ассоциативные связи между омиксными данными. ИС позволяет автоматически проводить как прямую интерпретацию: от мутации в геноме – протеины-метаболические пути-реакции-метаболиты-заболевания, так и обратную: от заболевания к генотипу – симптомы-заболевание-биохимические процессы-реакции-ферменты-протеины, транскрипты-гены-мутации. Таким образом, на базе ИС можно строить самые разнообразные силлогизмы на основе реструктурированных омиксных данных. Интерпретация позволяет осуществлять целенаправленный эксперимент по анализу конкретных генов, экзонов, в поисках предсказанных мутаций на базе современных технологий секвенирования, ПЦР, масс-спектрометрии и др. Созданная ИС позволяет не только интерпретировать ситуации, но и создавать системы поддержки принятия решений, в зависимости от конкретной омиксной ситуации.

ANALYSIS OF 3D CHROMOSOME CONTACTS USING SEQUENCING TECHNOLOGIES

Thierry O.^{1*}, Dergilev A.I.², Orlov Y.L.^{2,3*}¹ University of Paris, Paris, France² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia³ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

*e-mail: ophelie.thierry@gmail.com, orlov@bionet.nsc.ru

Transcription regulation in eukaryotes is a complex process, in which chromatin interactions play a critical role for gene expression regulation. Series of post-genome technologies have been developed to study the binding of transcription factors (TF) for transcription regulation, such as chromatin immunoprecipitation arrays (ChIP-chip) and ChIP-Seq [1]. Another challenge is to define whether such binding sites distal from gene regions are functional, i.e. physically contact target gene promoters via chromosome loops or attracting RNA polymerase II complex for gene transcription. Identification of genome-wide distal chromatin interactions that lead the regulatory elements to their target genes may provide novel insights into the study of transcription regulation. Chromatin Interaction Analysis with Paired-End-Tag sequencing (ChIA-PET) method for such analysis requires development of specialized software [2]. The aim of the work was to review existing tools for 3D genome structure develop a computer program for statistical data analysis and test it on CTCF binding sites, genes and spatial topological domains [3]. These data have been obtained experimentally by using methods ChIP-seq, Hi-C, ChIA-PET. Gene annotation was obtained from UCSC Genome

Browser (<http://genome.ucsc.edu>). The result of the program is a distribution of CTCF transcription factor binding sites on domains on the human chromosomes. The distributions of human genes relative CTCF binding sites and a randomly generated list of such sites as the program output were used to estimate statistical significance of the associations found. With the rapidly increasing resolution of Hi-C datasets, the size of the chromatin contact map will soon exceed the memory capacity of general computers. The same problem related to ChIA-PET and subsequent data integration to be solved by our software development.

The research has been supported by RFBR and ICG SB RAS budget project (0324-2016-0008). Computing was done at Siberian Supercomputer center SB RAS (SSCC).

1. G. Li et al. (2014) Chromatin Interaction Analysis with Paired-End Tag (ChIA-PET) sequencing technology and application, *BMC Genomics*, **15**(Suppl 12):S11.
2. M.J. Fullwood et al. (2009) An oestrogen-receptor-alpha-bound human chromatin interactome, *Nature*, **462**(7269):58-64.
3. G. Li et al. (2012) Extensive promoter-centered chromatin interactions provide a topological basis for transcription regulation, *Cell*, **148**(1-2):84-98.

BIODICA: AN ADVANCED METHODOLOGY FOR ANALYSIS OF CANCER TRANSCRIPTOME PROFILES FROM GENOMIC PLATFORMS.

Kairov U.Ye.^{1*}, Molkenov A.B.¹, Kalykhbergenov Ye.M.¹, Zinovyev A.Yu.²¹ Center for Life Sciences, National Laboratory Astana, Nazarbayev University, Astana, Kazakhstan.² Institute Curie, Mines ParisTech, Paris, France.

*e-mail: ulykbek.kairov@nu.edu.kz

Background. Large-scale projects (e.g. Cancer Genome Project, The Cancer Genome Atlas (TCGA) and other), and the efforts of individual laboratories, are generating massive amounts of molecular data which are derived from high-throughput genomic platforms like next-generation sequencing and others. These data remain difficult to interpret because the molecular profiles are influenced by various overlapping biological factors linked to the tumor cells or to the tumor microenvironment and non-biological factors linked to sample processing or data generation. It has been already demonstrated that Independent Component Analysis (ICA) has advantages compared to the classical Principal Component Analysis (PCA) with respect to interpretability of the resulting components, where these components might reflect both biological factors (such as proliferation or presence of different cell types in the tumoral microenvironment) or technical factors (such as batch effects or GC-content) affecting gene expression. In our study we aimed to develop an advanced methodology and graphical interface with using ICA to do meta-analysis of cancer transcriptomes.

Materials and methods. We used TCGA-COAD, GSE13067, GSE13294, GSE17536, GSE20916, GSE2109, GSE37892 cancer datasets (Affymetrix, RNA-seq). Datasets were normalized using R Bioconductor and Matlab. Icasso package with fastICA algorithm was used to compute independent components. Construction and visualization of gene networks and graphs was performed using the OFTEN method, Cytoscape and HPRD database.

Results and conclusion. We developed an advanced methodology with respect to ability to produce one-dimensional factors (metagenes) affecting gene expression which would be reproducible in the analysis of independent cohorts of patients. The results of our comparison clearly demonstrates that developed approach of ICA applied in the gene space and accompanied by stabilization of the components outperforms NMF, PCA and the standard application of ICA in the sample space. This methodology called and implemented as BiODICA ("ICA of Big Omics Data") collects more reproducible factors in several independent datasets which forms communities represented detected biological functions or technical artefacts.

GTRD: A DATABASE OF TRANSCRIPTION FACTOR BINDING SITES IDENTIFIED BY CHIP-SEQ EXPERIMENTS

Yevshin I.S.¹, Sharipov R.N.¹, Valeev T.F., Kel A.E.^{1,2}, **Kolpakov F.A.**^{1,3*}

1 BIOSOFT.RU, LLC, Novosibirsk

2 Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

3 Institute of Computational Technologies SB RAS

*e-mail: fedor@biouml.org

GTRD—Gene Transcription Regulation Database (<http://gtrd.biouml.org>)—is a database of transcription factor binding sites (TFBSs) identified by ChIP-seq experiments for human and mouse. Raw ChIP-seq data were obtained from ENCODE and SRA and uniformly processed: (i) reads were aligned using Bowtie2; (ii) ChIP-seq peaks were called using peak callers MACS, SISRr, GEM and PICS; (iii) peaks for the same factor and peak callers, but different experiment conditions (cell line, treatment, etc.), were merged into clusters; (iv) such clusters for different peak callers were merged into metaclusters that were considered as non-redundant sets of TFBSs. In addition to information on location in genome, the sets contain structured information about cell lines and experimental conditions extracted from descriptions of corresponding ChIP-seq experiments. A web interface to access GTRD was developed using the BioUML platform. It provides: (i) browsing and displaying information; (ii) advanced search possibilities, e.g. search of TFBSs near the specified gene or search of all genes potentially regulated by a specified

transcription factor; (iii) integrated genome browser that provides visualization of the GTRD data: read alignments, peaks, clusters, metaclusters and information about gene structures from the Ensembl database and binding sites predicted using position weight matrices from the HOCOMOCO database. The main advantages of GTRD in comparison to other databases for ChIP-seq experiments are the following: it contains comprehensive collection of ChIP-seq data in regards to coverage of different TFs for human and mouse; ChIP-seq data were uniformly processed using the workflow described above; peaks from different experiments to the same TF were merged into clusters and metaclusters. On the one hand, this allows this information to be made more compact and convenient for a user: on the level of metacluster, the user can see merged results from many ChIP-seq experiments and structured metainformation about these experiments is also available. On the other hand, merging results from many ChIP-seq experiments facilitates more reliable identification of corresponding TFBSs.

START CODONS AND MRNA TRANSLATION EFFICIENCY PREDICTION USING RIBOSEQ-BASED WEIGHT MATRICES

Kondrakhin Yu. V.^{1,2}, Sharipov R. N.^{1,2}, Volkova O. A.^{3*}

1 Institute of Computational Technologies, SB RAS, Novosibirsk, Russia

2 BIOSOFT.RU, Ltd, Novosibirsk, Russia

3 Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

4 The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

*ov@bionet.nsc.ru

Keywords: weight matrices; mRNAs; translation efficiency; ribosome profiling; Ribo-Seq Motivation and Aim: A significant limitation of the mRNA analysis is that start codons in the databases, e. g. Ensembl, are mostly annotated with application of a canonical Kozak context. This work is devoted to assessing of heterogeneity of a start-codon consensus set of mammalian mRNA by RiboSeq-based weight matrices.

Material and methods: Assuming that ribosome landing sites are heterogeneous, we developed our own matrix-construction method of start sites recognition: Algorithm 1 – a sequential algorithm based on a two-component normal mixture; Algorithm 2 – an EM-like algorithm identifying several matrices at the same time. As a training sample of start sites, we used mouse mRNA sequences [-50, +50] around start codons that were annotated by Ensembl, on the one part, and a high score of harringtonin binding (Ingola et al., 2011), on the other part.

Results: 1) We applied algorithm 1 to this sample, and a well-known nnnCCRnnATGGnnn consensus was used as in-

itial approximation. As a result, we obtained four matrices in the way independent from each other. 2) Then we used algorithm 2 to obtain more accurate versions of these matrices. 3) Comparative analysis to evaluate the accuracy of the newly obtained three matrices by construction of ROC curves for each individual matrix and for the three matrices together is shown that simultaneous use of the three matrices is better than individual. 4) It is obvious that third matrix is consistent with the following hairpin: CCA xxxx TGG, where xxx is a loop. 5) We performed some additional analysis of this matrix and compared its scores on two mRNA subsets, viz. those with high and low values of translational efficiency (TE) (Volkova et al, 2016). We found that this matrix is more specific for start codons in mRNA with low TE values. The matrices obtained allow theoretical prediction of start codons in newly sequenced eukaryotic mRNA with subsequent prediction of TE using the Regression Analysis. Availability: <http://micro.biouml.org/bioumlweb/#anonymous=true&de=analyses/Methods/RiboSeq/PredictStartSites>

TASK DRIVEN CONVERSION OF THE SPAdes GENOME ASSEMBLER INTO A FAMILY OF SPAdes TOOLS

Lapidus A.^{1*}, Korobeynikov A.¹, Antipov D.¹, Bankevich A.¹, Bushmanova E.¹, Gurevich A.¹, Meleshko D.¹, Mikheenko A.¹, Nurk S.¹, Pribelski A.¹, Safonova Y.¹, Saveliev V.¹, Pevzner P.¹

¹ Center for Algorithmic Biotechnology, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg

*e-mail: a.lapidus@spbu.ru

We present several novel tools built using the SPAdes technologies that further extend the applicability of SPAdes to new types of data. Despite its central role in genomics, genome assembly continues to present a challenge. Moreover, the proliferation of new sequencing technologies and the new types of genomic libraries introduce additional levels of complications. Our Saint Petersburg Assembler (SPAdes) was originally developed for the purpose of overcoming the complications associated with single-cell MDA amplified microbial data (uneven coverage, increased level of errors and chimerical reads). The tool was able to successfully resolve these issues for Illumina reads and was recognized by the scientific community as one of the best assemblers working with both isolates and single-cell data. From very early on SPAdes was designed as a scalable platform, whose capacity could be increased by the addition of complimentary tools on top of its existing codebase. Following the increased demand for the high throughput analytical software and pipelines SPAdes assembler was gradually extended into a family of

SPAdes tools aimed at various sequencing technologies and applications. In addition to the constantly updated SPAdes assembler itself, it now includes: · metaSPAdes assembler for metagenomics data; · rnaSPAdes: de novo RNA-seq data assembler; · plasmidSPAdes: assembly of plasmids from the whole genome sequencing data; · dipSPAdes tool for assembly of highly polymorphic genomes; · exSPAdes module for repeat resolution (mate-pair libraries); · hybridSPAdes tool for hybrid assembly of accurate short reads with long error-prone reads, such as Pacific Biosciences and Oxford Nanopore reads; · truSPAdes tool for assembling Illumina's barcoded True Synthetic Long Reads · and more. We will provide an overview of the SPAdes family of tools as well as the QUAST family of assembly evaluation tools: · QUAST tool for the quality assessment of genomics assemblers; · metaQUAST tool for the quality assessment of metagenomics assemblers; · rnaQUAST tool for the quality assessment of RNA-Seq.

Работа была поддержана грантом РФФ № 14-50-00069

METHOD OF LIBRARY PREPARATION FOR HIGH SENSITIVE DNA SEQUENCING

Pisareva E.E.^{1,2*}, Gornostaeva E.V.², Shamanin V.A.^{1,2}, Kovalenko S.P.^{1,2}

¹ Institute of molecular biology and biophysics, Novosibirsk

² BioLink Ltd, Novosibirsk

*e-mail: katerina.pisareva@mail.ru

High sensitive DNA sequencing is required for analysis of “liquid biopsy” samples in cancer patients. Analysis of somatic mutations in blood of cancer patients have already become feasible through next generation sequencing (NGS) platforms, one of that is Ion Torrent. NGS with Ion Torrent allows to find only more than few percent of mutant allele in background of wild type allele due to the error rate of 1%. Sequences mistakes give rise to false positive results and reduce sequence accuracy. Detection mutations in “liquid biopsy” requires sensitivity up to 0,01% of mutant allele [1]. Reduction of error rate increases accuracy and sensitivity of the assay.

To overcome limitations in sequence accuracy we used the idea of “duplex sequencing”, but modified it to optimize the library preparation procedure and data analysis pipeline [2]. Developed method is based on attaching special “random tags” and adapters with barcodes by PCR. “Random tags” consist of 8 b.p. random sequence and used for single strand consensus sequence assembly (SSCA). Final library consists of

an amplicons targeted sequence, barcodes and “random tags” and then used for sequencing on Ion Torrent platform.

Two experiments for sequencing all exons of TP53 gene, 19-21 exons of EGFR gene and 2-4 exons of KRAS gene were performed to evaluate the error rate for developed method. DNA samples included wild type DNA and DNA with mutant-EGFR and KRAS genes from 5% to 0,01% allele. We found that the error rate was reduced from 0,12 to 0,05 in the first and from 0,04 to 0 in the second experiment when SSCA data analysis was used. Sensitivity of developed method depends on the amount of “families” of reads (reads with similar “random tag”) and was improved to 0,1%.

This project is supported by Russian Science Foundation grant №15-14-10004.

1. Diaz LA, Jr., Bardelli A. (2014) Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA, *J Clin Oncol.*, 32(6): 579-586.
2. M. W. Schmitt, S. R. Kennedy, J. J. Salk, et al. (2012) “Detection of ultra-rare mutations by next-generation sequencing”, *PLoS One*, 109: 36.

USING MACHINE LEARNING APPROACH TO IMPROVE BASE CALLING IN NEXT GENERATION SEQUENCING DATA

N.E. Russkikh^{1,2*}, **D.V. Antonets**^{2,3,4}

1 Novel Software Systems LLC, Novosibirsk, Russia;

2 A.P.Ershov Institute of informatics systems, Novosibirsk, Russia;

3 AcademGene LLC, Novosibirsk, Russia;

4 State Research Center of Virology and Biotechnology 'Vector', Novosibirsk, Russia;

e-mail: russkikh@nprog.ru

*Corresponding author

New generation sequencing is rapidly turning from expensive and dedicated tool of basic research into one of the most powerful techniques aimed to revolutionize the medicine. The single molecule sequencing strategy used by SeqLL (USA) simplifies the DNA sample preparation process, avoids PCR-induced bias and errors, simplifies data analysis and tolerates degraded samples. Here we developed a new machine learning approach to solve base calling task for SeqLL sequencing platform and improved the quality and performance of base calling.

On the training set of image patches corresponding to known signals obtained from synthetic oligonucleotides sequencing we created a predictive model using the extreme gradient boosting algorithm. The developed model was integrated in our custom base calling and oligonucleotides assembly pipeline developed for SeqLL sequencing technology. Our new algorithm works ten times faster, as compared to previous solution and it also demonstrated 10 % improvement in sensitivity at the same level of specificity.

All presented results are property of SeqLL company (USA).

RIBO-SEQ DB – A REPOSITORY OF SELECTED HUMAN AND MOUSE RIBO-SEQ AND RNA-SEQ DATA

Sharipov R.N.^{1,2,3}, **Yevshin I.S.**^{1,2}, **Kondrakhin Yu.V.**^{1,2}, **Volkova O.A.**^{4*}

1 Institute of Computational Technologies, SB RAS, Novosibirsk

2 BIOSOFT.RU, Ltd, Novosibirsk

3 Novosibirsk State University, Novosibirsk

4 The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk

*e-mail: ov@bionet.nsc.ru

Keywords: mammalian mRNAs; translation efficiency; ribosome profiling; Ribo-Seq

Motivation and Aim Ribosome profiling or a Ribo-Seq technology allows evaluating the distinct mRNA translation level. Over the last years, many studies involving this technology have been performed on different cell types and in various physiological conditions. So far, there are many datasets obtained for different organisms by ribosome profiling technique and deposited in public databases. The available Ribo-Seq data is dispersed in different sources and not unified, it makes difficult to create sets for analysis.

Results We created a collection of selected datasets for human, mouse and rat as a RiboSeqDB repository. To make collection, the databases Sequence Read Archive (SRA) and Gene Expression Omnibus (GEO) have been scanned and the

appropriate datasets satisfying several conditions were chosen: taxon (human, mouse, rat), data type (mRNA-seq or ribosome profiling), commonly used sequencing platform, and availability of description of experiment have been included in our repository. RiboSeqDB does not contain raw or processed data downloaded from SRA, GEO, or other sources of data, but contains structured summary, links to the sources of raw data for collected datasets. RiboSeqDB is tightly integrated with a BioUML platform that provides web access and wide spectrum of tools for modern comprehensive analysis in bioinformatics and systems biology. Currently, RiboSeqDB contains more than 600 samples of about 70 datasets.

Availability: <http://micro.biouml.org/bioumlweb/ribosomeqdb.html>

ANALYSIS OF GENE EXPRESSION RELATED TO AGGRESSIVE BEHAVIOR ON ANIMAL MODELS

Tabanyuhov K.A.^{1,2}, Mazurina E.P.², Chadaeva I.V.¹, Kozhemyakina R.V.¹, Orlov Y.L.^{1,3*}

1 Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

2 Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

3 Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

*e-mail: orlov@bionet.nsc.ru

The purpose of this study was to study the mechanisms of hereditary-mediated aggressive behavior on laboratory animal models based on transcriptome profiling. To establish mechanisms of aggression at the molecular level, we used unique experimental model of grey rats (*Rattus norvegicus*) developed at the Institute of Cytology and Genetics SB RAS. Rats have been subjected to selection in two directions – friendly, tolerant behavior towards human and other rats and aggressive behavior. We estimated the gene expression in rat brain areas based on RNA-seq data [1]. We focused on genes presumably associated with the manifestation of aggressive behavior: GAD2, DRD2, Cacna1b and Oxt. These genes were studied earlier in relation to human neurological diseases. GAD2 encodes one of several forms of glutamic acid decarboxylase – widespread inhibitory neurotransmitter. DRD2 encodes the dopamine receptor subtype 2. Dopaminergic transmission is associated with motivation, learning and cognition. Cacna1b encodes the protein which is the pore-forming subunit of an N-type voltage-dependent calcium channel that controls neurotransmitter release from neurons. Oxt encodes the precursor of oxytocin and neurophysin 1. Oxytocin is associated with complex social behavior and associated neuropsychic disorders. RNA-seq sequencing of rat brain areas samples was done using Illumina HiSeq. The set of com-

puter tools and data processing pipelines helped to find genes and gene regulation patterns applied to behavior models [1]. RNA-profiling experiments revealed the lists of differentially expressed genes in the brain samples and differentially spliced isoforms. Gene expression level of the genes under study was tested by RT-PCR. A set of synapse associated genes have statistically significant deviation in splicing depending on brain regions and behavioral models (aggressive/tame) of rats. Heredity has been found to significantly contribute to aggressiveness in studies of various animal species [2]. Consequently, the genetic factors exert a strong influence to the phenotypic variation of aggressive behavior in populations. This is confirmed by inter-strain differences in the manifestation of aggression in laboratory animals and by the fast progress of selection for aggressiveness traits.

The research has been supported by RSF and ICG SB RAS budget project.

1. V.N. Babenko et al. (2016) Analysis of differential gene expression by RNA-seq data in brain areas of laboratory animals, *Journal of Integrative bioinformatics*, 13(4):292.
2. D.A. Smagin et al. (2016) Dysfunction in ribosomal gene expression in the hypothalamus and hippocampus following chronic social defeat stress in male mice as revealed by RNA-Seq, *Neural Plasticity*, 2016:3289187.

ASSESSMENT OF TRANSLATION EFFICIENCY FROM RIBO-SEQ AND MRNA-SEQ DATA

Yevshin I.S.^{1,2}, Sharipov R.N.^{1,2}, Volkova O.A.^{3*}

1 Design Technological Institute of Digital Techniques, SB RAS, Novosibirsk

2 Institute of Systems Biology, Ltd, Novosibirsk

3 The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk

*e-mail: ov@bionet.nsc.ru

Keywords: mammalian mRNAs; translation efficiency; ribosome profiling; Ribo-Seq; mRNA-Seq

Motivation and Aim: Ribosome profiling or Ribo-Seq technology allows to estimate the level of translation of distinct mRNAs. For the last years many studies grounded on this technology have been performed on different cell types and in various physiological conditions. To undertake a wide-scale study of regulation of translation efficiency (TE) in cell, it is necessary to control of input Ribo-Seq data and adequate assessment of TE. The goal of this work was to assess the quality of raw Ribo-Seq data available in public databases and identify the optimal parameters of their processing and TE assessment.

Methods and Algorithms: Datasets containing both, Ribo-Seq and mRNA-Seq data, were selected from a RiboSeqDB database developed by the authors. Raw data were processed

using special workflows developed for a BioUML platform. To control the quality of TE assessment, calculated TE values were compared with respective TE values but obtained using mass-spectrometry and mRNA-Seq.

Results: 1) The TE assessment approach using ribo-seq data was developed. 2) The optimal parameters for adapter trimming and Ribo-Seq read alignment were adjusted. 3) The influence of out-of-frame Ribo-Seq reads was checked: they should be taken into account like other reads. 4) Reads mapped to the CDS start and end should be taken into account in the same way as reads from the inner part of CDS. 5) TE depends on the CDS length, but not on the UTR length. 6) High correlation of TE estimated from riboseq with mass spectrometry data was observed. Riboseq data can be used for reliable TE estimation.

Эволюционный и адаптационный потенциал почвенного микробиома.

Андронов Е.Е., Иголкина А.А., Проворов Н.А.

ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии.

Начало 21-го века в биологии ознаменовалось существенными технологическими прорывами, обеспечивающими недоступную ранее глубину анализа как отдельных организмов, так и целых сообществ. Прежде всего, это касается технологий высокопроизводительного секвенирования и сопряженных с ними методов биоинформатики. Рождаются совершенно новые научные направления, такие, как метагеномика. Основные закономерности эволюционных процессов, о которых ранее приходилось судить (или даже только догадываться) лишь по фрагментарным данным, сегодня становятся вполне очевидными. Сегодня к нам приходит понимание природных эффективных эволюционных механизмов, обеспечивающих высочайший адаптивный потенциал живых систем. В настоящем докладе будут представлены результаты исследований процессов коэволюции сигнальных систем бобово-ризобияльного

симбиоза по данным высокопроизводительного секвенирования библиотек генов бобовых растений и ризобий, контролирующей симбиотическую азотфиксацию. По данным, полученным с использованием эволюционной статистики и молекулярного моделирования будет продемонстрировано, что растение является одним из самых мощных факторов, формирующих «генетический пейзаж» почвенных микробиомов. Наиболее ярко эти закономерности проявляются в эволюции тесно интегрированных симбиотических систем, таких как бобово-ризобияльный симбиоз. Вполне возможно, что агроботехнологии, вооруженные пониманием естественных адаптационных механизмов, могли бы сделать существенный вклад в развитие эффективного и устойчивого сельскохозяйственного производства.

Работа поддержана грантом РНФ № 14-26-00094

ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПРОТЕОБАКТЕРИЙ В ХОЛОДНОМ ИСТОЧНИКЕ БУКСЫХЕН-СЕРДЕЧНЫЙ (БУРЯТИЯ)

Банзаракцаева Т.Г., Дамбинова Е.Ц.

Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ

e-mail: tuyana_banz@mail.ru

Протеобактерии являются весьма обширной и неоднородной группой, в эту группу включены как симбионты эукариот, так и большое число условно-патогенных микроорганизмов, фото- и хемотрофные виды бактерий, как автотрофы, так и гетеротрофы. Целью настоящей работы было изучение таксономического разнообразия протеобактерий в микробном сообществе донных осадков холодного источника Буксыхен-сердечный (Бурятия).

Таксономическое разнообразие прокариот изучали с помощью метода высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina HiSeq.

По результатам секвенирования было установлено, что наибольшая доля бактериального ДНК принадлежала филе Proteobacteria (68%), которая была представлена в исследуемом сообществе α -, β -, γ - и ϵ -протеобактериями. В исследуемом образце преобладали представители типа альфа-протеобактерий (70% от общего числа протеобактерий). Доминирующей группой данного типа были бактерии семейства *Rhodobacteraceae*, представленные в основном фототрофами рода *Rhodovulum* и бактери-

ями рода *Thioclava*, способными расти как автотрофно, используя тиосульфат, так и гетеротрофно на органических кислотах или сахарах. Содоминантами являлись фотосинтезирующие бактерии семейств *Erythrobacteraceae* и *Rhodospirillaceae*. К гамма-протеобактериям были отнесены 14 % исследованных последовательностей. В основном данный тип был представлен бактериями рода *Pseudomonas*. Как известно, представители этого рода являются аэробными грамотрицательными бактериями и демонстрируют широкое метаболическое разнообразие. Минорным компонентом γ -протеобактерий были факультативно-анаэробные хемоорганотрофные бактерии рода *Hafnia*. Группа ϵ -протеобактерий (8%) была представлена родом *Sulfurimonas*, включающего хемоавтотрофные бактерии с различными путями метаболизма. В группе бета-протеобактерий (7%) основным представителем является *Oxalobacteraceae*, род *Janthinobacterium* – это грамотрицательные бактерии, продуцирующие пурпурно-фиолетовый пигмент и проявляющие разнообразные способности энергетического метаболизма.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ ОЗЕРА БАЙКАЛ В ПОДЛЕДНЫЙ ПЕРИОД И ПЕРИОД ОТКРЫТОЙ ВОДЫ

Башенхаева М.В.^{*}, Захарова Ю.Р., Галачянц Ю.П., Ханаев И.В., Лихошвай Е.В.

Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

*e-mail: maria.bashenkhaeva@gmail.com

В подледный период в водных экосистемах образуется сложная среда, где происходит формирование сообществ микроорганизмов непосредственно на границе раздела фаз «вода-лед». Условия подо льдом значительно отличаются от условий периода открытой воды. Толщина льда и снежного покрова, концентрация питательных веществ и температура все эти факторы определяют уникальность данной экологической ниши. Целью работы было сравнить таксономическую структуру микробных сообществ озера Байкал в подледный период и в период открытой воды с помощью пиросеквенирования фрагментов гена 16S рРНК. В подледный период пробы были отобраны водолазами с нижней поверхности льда и с глубины 10 м, в период открытой воды отобрана интегральная проба (0 – 25 м). С помощью фильтрования пробы были разделены на две фракции: свободноживущие бактерии (СФ) и агрегированные (АФ). Пиросеквенирование осуществляли на платформе GS FLX 454 Roche, анализ данных при помощи программного пакета Mothur. В результате проанализировано 63353 последовательностей. На нижней границе льда в СФ доминировали *Betaproteobacteria* (род *Massilia* и *Albidiferax*), в АФ преобладал филум *Bacteroidetes* (род *Flavobacterium*).

В сообществе водной толщи (10 м) наиболее многочисленным был филум *Actinobacteria* (род *Plumatobacter*) в СФ, в АФ – класс *Betaproteobacteria* (род *Massilia*). В период открытой воды в сообществе доминировали *Actinobacteria* (род *Plumatobacter*) в СФ, в АФ – филум *Verrucomicrobia* (*Candidatus Methylococcoides*). Сравнительный анализ сообществ с помощью индекса Брей Кертис показал сходство СФ сообщества воды в подледный период и открытой воды, что может говорить о постоянстве таксономического состава бактерий в водной толще. Вместе группировались АФ сообщества нижней границы льда и водной толщи (10 м), в данный период подо льдом развивались зеленые водоросли рода *Chlorella* и *Monoraphidium*, что возможно определило схожий состав сообществ. Отдельную кладу образовывала АФ открытой воды, тогда в фитопланктоне развивались диатомовые водоросли *Synedra acus*, что могло повлиять на изменение состава АФ. Известно, что состав бактерий-ассоциантов зависит от вида микроводорослей [1].

Работа выполнена при финансовой поддержке интеграционного проекта 4.1.2.

1. Amin S.A. et al. (2012) Interactions between Diatoms and Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 76:667–684.

МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ БАЙКАЛЬСКИХ ГУБОК ВЫЯВИЛ НОВЫЕ СВОЙСТВА СООБЩЕСТВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С *BAIKALOSPONGIA INTERMEDIA* СЕВЕРНОГО БАЙКАЛА

Галачянц Ю.П.^{1*}, Белых О.И.¹, Кабилов М.Р.², Тимошкин О.А.¹, акад. Грачев М.А.¹

1 Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

2 Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

*e-mail: yuri.galachyants@lin.irk.ru

Для анализа были использованы 17 образцов губок, принадлежащих трем видам: *Lubomirskia baicalensis* (6), *Baikalospongia recta* (2) и *Baikalospongia intermedia* (9). На основе предварительного микроскопического и визуального анализа губки были разделены на здоровые особи без видимых признаков поражения и больные, которые характеризовались обесцвеченными участками, наличием красноватого налета, цианобактериальными обрастаниями и т.д.

Генетическое и таксономическое разнообразие микробных сообществ эндемичных губок оз. Байкал, отобранных в местах массового развития нитчатых зеленых водорослей *Spirogyra* sp. изучено с помощью методов массового параллельного секвенирования библиотек ампликонов фрагмента гена 16S рРНК на платформах GS FLX (ЛИИ СО РАН) и Illumina MiSeq (ЦКП «Геномика» СО РАН).

Статистический анализ результатов секвенирования показывает, что состав бактериальных сообществ может отличаться в зависимости от географической локализации исследуемых образцов. Группировка образцов и ОТЕ

имеет достаточно устойчивый характер и незначительно зависит от используемого метода ординации или метода подсчета сходства между сообществами. Показано, что в образцах бактериальных сообществ Северного Байкала, принадлежащих *B. intermedia*, наблюдается дифференциация численности четырнадцати бактериальных ОТЕ по сравнению с остальными образцами. Интересно отметить, что среди выявленных ОТЕ, флотипы, принадлежащие *Saccharibacteria*, разделяются на две группы, показывающие разнонаправленную встречаемость.

В рамках данной работы были впервые получены данные о составе бактериальных сообществ байкальских губок *B. intermedia* и проведено сравнительное исследование состава этих сообществ с сообществами других байкальских губок: *L. baicalensis* и *B. recta*.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта № 0345–2014–0006 «Экспериментальная геномика и протеомика».

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ УСТОЙЧИВОСТИ ГРИБА РОДА *PENICILLIUM* К ВЫСОКИМ КОНЦЕНТРАЦИЯМ МЫШЬЯКА И МЕДИ

Глухова Л.Б.^{1*}, Груздев Е.В.², Белецкий А.В.², Стрелкова Е.В.¹, Карначук О.В.¹, Равин Н.В.², Марданов А.В.²

¹ Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск

² Институт биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

*e-mail: glb122@yandex.ru

Поиск и описание новых микроорганизмов из экстремальных местообитаний позволяет изучить механизмы адаптации микроорганизмов к окружающей среде, понять биогеохимические процессы, протекающие в таких экосистемах, а также обнаружить новые организмы, перспективные для использования в биотехнологии. Кислые шахтные дренажи (КШД) являются экстремальным экологической нишей, которая характеризуется кислым значением pH и высоким содержанием металлов. Наряду и прокариотами в кислых дренажах обнаружены эукариотические организмы, представленные в основном одноклеточными водорослями и грибами. Данные о функциональной роли эукариот в микробных сообществах КШД весьма ограничены.

Объектом наших исследований является изолят гриба ShG4C ранее выделенный из отходов месторождения полиметаллических руд «Шерловая гора». Этот изолят является ацидотолерантным и устойчив к концентрациям меди до 10 г/л и мышьяка до 9 г/л. Мы расшифровали генома гриба с использованием двух платформ высокопроизво-

дительного секвенирования Illumina HiSeq2000 и PacBio-RSII. Размер генома составляет 30.86 млн. нт. и содержит 9849 потенциально белок-кодирующих генов, 199 генов тРНК и 4 кластера рибосомных РНК. Для выявления молекулярных механизмов устойчивости изолята ShG4C к высоким концентрациям мышьяка и меди мы исследовали профили транскрипции при выращивании гриба в присутствии и в отсутствии мышьяка и меди. Полученные данные показывают, что при высокой концентрации мышьяка значительно изменяется экспрессия всего 58 генов, среди которых арсенат редуктаза, транспортеры арсенита и АТФазы. Высокая концентрация меди существенно изменяла уровни экспрессии более 7% всех генов. Среди индуцированных были обнаружены компоненты различных систем устойчивости к тяжелым металлам.

Работа по секвенированию генома поддержана грантом Президента для молодых ученых № МД-7668.2016.4.

Выделение и изучение гриба проводится в рамках гранта РФФИ № 16-04-01619.

СТРУКТУРА МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ПРИБРЕЖНОЙ ВОДЫ ОЗЕРА БАЙКАЛ

Дагурова О.П.^{1*}, Зайцева С.В.¹, Гаранкина В.П.¹, Батурина О.А.², Кабилов М.Р.²

¹ Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

*e-mail: dagur-ol@mail.ru

В настоящее время междисциплинарный характер исследования природных сообществ, с применением комплекса современных методов, в том числе высокопроизводительного секвенирования, является актуальным и позволяет дать более полную экологическую характеристику природных объектов.

Цели исследования – выявить структуру микробного сообщества озера Байкал в прибрежной зоне, подвергающейся антропогенной нагрузке, с помощью высокопроизводительного секвенирования нового поколения; исследовать влияние температуры на структуру микробного сообщества в условиях эксперимента.

Были изучены микробные сообщества прибрежной воды в трех участках восточного побережья озера Байкал в различные сезоны. ДНК выделяли с помощью набора AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen, США). Глубокое секвенирование ампликонов V3-V4 16S рРНК проведено в ЦКП «Геномика» СО РАН (ИХБФМ СО РАН) на платформе MiSeq (Illumina).

Структура микробного сообщества прибрежной воды в трех участках была схожа. В микробном сообществе до-

минировали два филума – *Bacteroidetes* (в среднем 39%) и *Proteobacteria* (в среднем 43%). Микробное сообщество воды около п. Турка в апреле резко отличалось от других проб – возрастала доля филума *Firmicutes* (50%), доминировали бактерии рода *Prevotella*, имеющие санитарно-эпидемиологическое значение. Скорее всего, здесь имело место локальное антропогенное загрязнение, связанное со строительством рекреационных объектов. Структура микробного сообщества была постоянна, и ее резкое изменение, детектированное с помощью секвенирования, можно использовать как индикатор антропогенного загрязнения.

В условиях эксперимента изучено влияние изменения температуры и добавления органических веществ на структуру микробного сообщества прибрежной воды озера Байкал. Изменение температуры практически не влияло на состав микробного сообщества. Добавление органических легкоразлагаемых веществ стимулировало рост бактерий и изменяло структуру сообщества.

Работа выполнена при поддержке Комплексной программы ФНИ СО РАН № П-2 II.

ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА ПРИ ФОРМИРОВАНИИ УСТОЙЧИВОСТИ НАСЕКОМЫХ К ЭНТОМОПАТОГЕННЫМ БАКТЕРИЯМ

Гризанова Е.В.¹, Поленогова О.В.², Аликина Т.Ю.³, Кабилов М.Р.³, Дубовский И.М.^{2*}

1 Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск

2 Институт Систематики и Экологии Животных СО РАН, Новосибирск

3 Институт Химической Биологии и Фундаментальной Медицины СО РАН, Новосибирск

* e-mail: dubovskiy2000@yahoo.com

Бактерии *Bacillus thuringiensis* (БТ) являются широко распространенным возбудителем бактериальных болезней насекомых в природе, а также активно используются для создания биоинсектицидов, применяемых для контроля численности вредителей сельского и лесного хозяйств, насекомых-переносчиков болезней человека и животных. На данный момент известно, что кишечная микробиота может быть дополнительным фактором, усиливающим вирулентность БТ, однако ее роль в развитии инфекционного процесса БТ все еще обсуждается. Для изучения состава кишечных бактерий воцинной огневки *Galleria mellonella* мы использовали высокопроизводительное секвенирование V3-V4 регионов 16S рРНК для таксономической классификации, а также классические микробиологические методы. По результатам анализа 16S рРНК, в кишечнике личинок восприимчивой (нативной) и устойчивой (селектированной на резистентность к БТ, тридцать поколений отбора по принципу устойчивости) линий доминировали бактерии из нескольких филумов (*Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* и *Bacteroidetes*). Следует отметить, что в кишечнике насекомых устойчивой линии происходило до-

стоверное снижение биоразнообразия бактерий при заражении БТ (индекс Chao, индекс Shannona). Кроме того, у зараженных БТ личинок устойчивой линии был отмечен пониженный уровень количества возбудителей кишечных инфекций - бактерий рода *Pseudomonas* (анализ 16S рРНК, $p < 0.05$) и бактерий рода *Serratia* (анализ колониеобразующих единиц (КОЕ) на специализированных микробиологических средах, $p < 0.05$). Описанные различия в бактериальном сообществе насекомых могут быть связаны с тем, что у устойчивых насекомых отмечено накопление антибактериальных белков (АМБ), усиление активности антиоксидантной и детоксицирующих систем, а также процессов репарации в кишечнике в ответ на БТ инфекцию. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что некоторые представители бактериального сообщества кишечника могут участвовать в развитии бактериоза БТ, а эволюция резистентности насекомых к бактериям БТ направлена на снижение биоразнообразия и числа бактерий в кишечнике, в том числе патогенных.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ №16-14-10067.

ИЗУЧЕНИЕ ЗАВИСИМОСТЕЙ МЕЖДУ СТРУКТУРОЙ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ КИШЕЧНИКА И АКТИВНОСТЬЮ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ ОРГАНИЗМА ПТИЦЫ.

Егоров И.А.¹, Ильина Л.А.², Никонов И.Н.^{2*}, Лаптев Г.Ю.², Ленкова Т.Н.¹, Манукян В.А.¹, Йылдырым Е.А.², Новикова Н.И.², Филиппова В.А.², Грозина А.А.¹, Вертипрахов В.Г.¹, Егорова Т.А.¹,

1 ФНЦ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства РАН, Сергиев Посад, Московская область

2 Общество с ограниченной ответственностью «БИОТРОФ+», Санкт-Петербург

*e-mail: ilina@biotrof.ru

Цель работы: Определение зависимости структуры микробных сообществ кишечника от активности пищеварительных ферментов организма птицы.

Исследования состава бактериального сообщества слепых отростков кишечника птицы проводили молекулярно-генетическими методами (T-RFLP и ПЦР в реальном времени).

Были получены результаты кластерного анализа структуры микробного сообщества в зависимости от активности ферментной системы организма птицы.

Целлюлозолитические бактерии были положительно связаны с активностью ферментов: активностью амилазы в гомогенате ткани поджелудочной железы и в плазме крови. Так, у гибридов - с бактериями семейств *Lachnospiraceae* и *Clostridiaceae*, у птицы материнской линии (плимутрок) - с бактериями семейства *Clostridiaceae* и филума *Bacteroidetes*, у отцовской линии (корниш) - с бактериями семейства *Clostridiaceae*.

Активность липазы в гомогенате ткани поджелудочной железы и в плазме крови была положительно связана с

целлюлозолитиками: у гибридов - семейств *Eubacteriaceae*, *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, у птицы материнской линии (плимутрок) - семейства *Eubacteriaceae*, у отцовской линии (корниш) - семейства *Eubacteriaceae* и *Lachnospiraceae*.

Активность протеазы в гомогенате ткани поджелудочной железы и в плазме крови у всех птиц была связана отрицательно с целлюлозолитиками.

Содержание бацилл и лактат-ферментирующих видов было отрицательно связано с активностью ферментов в гомогенате ткани поджелудочной железы у всех птиц и положительно с активностью ферментов в плазме крови.

Таким образом, были установлены достоверные зависимости между присутствием в кишечнике птицы ряда бактериальных сообществ и активностью пищеварительных ферментов организма, а именно - амилазы, липазы, протеазы.

Исследования выполнены при поддержке Российского научного фонда, Соглашение №16-16-04089 от 01 августа 2016 года.

МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЦИКЛА МЕТАНА В ОЗЕРЕ БАЙКАЛ

Земская Т.И.^{1*}, Ломакина А.В.¹, Захаренко А.С.¹, Хальзов И.А.¹, Черницына С.М.¹, Шубенкова О.В.¹, Павлова О.Н.¹, Букин С.В.¹, Галачьянц Ю.П.¹, Морозов И.В.^{2,3}

1 Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

2 Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

3 Новосибирский государственный университет

*e-mail: tzema@lin.irk.ru

С помощью платформ высокопроизводительного секвенирования Roche 454 и Illumina (ЦКП «Геномика» СО РАН) исследовано разнообразие микробных сообществ донных осадков и водной толщи озера Байкал и их участие в цикле метана. На основе анализа последовательностей генов 16S рРНК в сообществах всех районов озера Байкал идентифицированы аэробные метанотрофные бактерии разного типа, относящиеся к классам гамма- и альфапротеобактериям, а также неклассифицированные представители филума *Verrucomicrobia*. Разнообразие микроорганизмов определялось составом поступающих углеводов, а в водной толще – поступающей со стоком рек автохтонной микрофлорой. Филогенетический анализ последовательностей генов 16S рРНК и функциональных генов *pmoA* и *mxaF* свидетельствует о наличии специфичных для оз. Байкал кластеров, образующих отдельные группы, включающие некультивируемых гомологов с неустановленным метаболизмом. Оценка разнообразия бактерий в сообществах по последовательностям генов 16S рРНК дает более широкий спектр потенциально метанотрофных бактерий, чем выявляется по последовательностям функциональных генов *pmoA* и *mxaF*. В

осадках озера Байкал установлено наличие широкого спектра архей, в том числе анаэробных метанотрофов группы ANME-2d. Представители этой группы могут осуществлять анаэробное окисление метана (АОМ) за счет обратного метаногенеза при участии нитрата в качестве акцептора электронов [1]. Археи «байкальских линий» [2] отмечены только в районах разгрузок газосодержащих флюидов. Наиболее представленные последовательности кластера Baikal-1 отнесены к Group C3 (*Thaumarchaeota*), кластера Baikal-2 к порядку *Desulfurococcales*, для которых показано участие в ферментации органического вещества до ацетата и водорода. Основные процессы окисления метана в аэробных и анаэробных условиях подтверждены экспериментами *in vitro*.

Работа выполнена при поддержке Интеграционного проекта 4.1.1 ИИЦ СО РАН и Гос. задания 0345-2016-0007.

1. M.F. Haroon, S. Hu, Y. Shi, M. Imelfort, J. Keller, P. Hugenholtz et al. (2013). Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage. *Nature*, **500**: 567–570.
2. V.V. Kadnikov, A.V. Mardanov, A.V. Beletsky, O.V. Shubenkova, T.V. Pogodaeva, T.I. Zemskaya et al. (2012). Microbial community structure in methane hydrate-bearing sediments of freshwater Lake Baikal, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **79**:348–358.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОБИОЦЕНОЗОВ КИШЕЧНИКА КУР ПОРОДЫ «ХАЙСЕК» МЕТОДОМ T-RFLP В ОНТОГЕНЕЗЕ.

Лаптев Г.Ю.^{1*}, Ильина Л.А.¹, Никонов И.Н.¹, Кочиш И.И.², Романов М.Н.², Смоленский В.И.², Панин А.Н.², Йылдырым Е.А.¹, Новикова Н.И.¹, Филиппова В.А.¹, Дубровин А.В.¹

1 Общество с ограниченной ответственностью «БИОТРОФ+», Санкт-Петербург 1

2 ФГБОУ ВО МГАВМиБ – Московская ветеринарная академия им. К.И. Скрябина, Москва

*e-mail: ilina@biotrof.ru

Цель работы: выявление структуры и таксономического состава микроорганизмов слепых отростков ЖКТ кур породы «Хайсек» в онтогенезе с применением комплекса молекулярно-генетических методов.

Исследования состава бактериального сообщества слепых отростков кишечника 40-, 155- и 315-суточных кур-несушек (по 3 из каждой группы) проводили молекулярно-генетическими методами (T-RFLP и ПЦР в реальном времени).

У исследуемой птицы в онтогенезе происходило развитие микробного сообщества ЖКТ, изменение содержания и появление новых микроорганизмов. Отмечено, что спектр выявляемых бактерий был выше у 40- и 155-суточной птицы (221±11 и 258±9 филотипов соответственно) по сравнению с 315-суточными курами-несушками (178±8 филотипов). Также у 315-суточной птицы выявлено наименьшее содержание неидентифицированных филотипов.

В слепых отростках ЖКТ взрослой птицы выявлено изменение доминирующих таксономических групп микроорганизмов – более высокая доля бактерий кислот-утилизи-

рующих бактерий класса *Negativicutes*, целлюлозолитиков класса *Clostridia*. Обратная тенденция наблюдалась в отношении бактерий классов *Bifidobacteriales*, *Bacillales*. Больше содержание лактобактерий порядка *Lactobacillales* наблюдалась у 315-суточных кур-несушек (33,15±1,05%) по сравнению с 40- (5,13±0,23%) и 155-суточной (24,58±0,86%) птицей.

Разнообразие и количество бактерий в слепых отростках ЖКТ, которых традиционно относят к возбудителям различных заболеваний птицы, из родов *Enterobacter*, *Pantoea*, *Listeria*, *Acinetobacter*, *Mycoplasma*, семейств *Campylobacteraceae*, *Pasteurellaceae*, филума *Fusobacteria* увеличивается с возрастом птицы.

Таким образом, в ходе молекулярно-генетических исследований был определен видовой состав микробиоценозов слепых отростков ЖКТ кур яичной породы «Хайсек» в онтогенезе.

Исследования выполнены при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, Договор №14.W03.31.0013 от 20.02.2017 г.

ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ГЛУБОКОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ АМПЛИКОНОВ НА ПРИМЕРЕ 16S рРНК

Аликина Т.Ю., Батурина О.А., Тупикин А.Е., М.Р. Кабилов*

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

*e-mail: kabilov@niboch.nsc.ru

Секвенирование определенных участков генома широко используемая альтернатива тотальному секвенированию. Специфическая амплификация интересующих районов с помощью ПЦР с последующим секвенированием на высокопроизводительных платформах применяется для анализа экзомов, панелей генов или отдельных локусов. В ряде задач для оценки имеющегося разнообразия необходимо глубокое секвенирование ампликонов. Примерами этого могут служить анализ репертуара антител, метабаркодирование (ITS, COI, RBC), метагеномные работы (ITS, 18S, 16S) и др.

Одним из самых широко используемых маркеров в метагеномике является ген 16S рРНК, который позволяет оценить таксономическое разнообразие прокариотических сообществ. Размер гена 16S рРНК составляет порядка 1,5 Кб и информация о его полной последовательности зачастую позволяет идентифицировать микроорганизм до вида. Однако размер анализируемого участка в первую очередь определяется используемой платформой. Самые распро-

странённые из них Illumina и Ion Torrent позволяют анализировать районы длиной порядка 200-550 нт.

Высокая гомология 16S ампликонов по константным участкам определяет потенциальную возможность появления химер в процессе проведения полимеразной цепной реакции. Существуют различные подходы к борьбе с химерами, которые условно можно поделить на два класса. Если первые снижают вероятность их появления, то вторые позволяют их только идентифицировать на конечном этапе среди прочих последовательностей. В нашей работе на примере анализа районов 16S V3-V4 на платформе MiSeq (ЦКП "Геномика" СО РАН) было рассмотрены различные варианты использования таких подходов и выявлены их характерные преимущества и недостатки. Было продемонстрировано формирование гетеродуплексных структур и рассмотрено их потенциальное влияние на конечный результат секвенирования. Также были рассмотрены новые подходы к секвенированию полноразмерного 16S гена.

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ХОЛОДНОГО СИПА МОРЯ ЛАПТЕВЫХ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩЕГО ВОВЛЕЧЕНИЕ МЕТАНА В ТРОФИЧЕСКИЕ ЦЕПИ

Кадников В.В.¹, Саввичев А.С.², Равин Н.В.¹, Пименов Н.В.²

¹ Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

² Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

* e-mail: vkadnikov@bk.ru

Холодные метановые сипы, как и грязевой вулканизм, являются важными источниками парникового газа метана, поступающего из донных отложений морей и океанов в водную толщу, а затем в атмосферу. Мы исследовали активности микробных процессов цикла метана, а также состав микробных сообществ поверхностных донных отложений поля метановых сипов в море Лаптевых. Молекулярный анализ состава микробных сообществ проводили с помощью пиросеквенирования переменных фрагментов генов 16S рРНК для четырех образцов, - микробный мат на поверхности дна в районе метановых сипов, верхний слой донных осадков глубиной до 1 см, более глубокий слой осадков (глубина 2-5 см) и поверхностный горизонт донных осадков (0-1 см) на контрольном участке морского дна. Проведенные исследования показали, что в пределах поля холодных метановых сипов в поверхностном слое донных осадков протекает интенсивный процесс микробного окис-

ления метана. Этот процесс осуществляется как аэробными метанотрофными бактериями, так и анаэробно, археями некультивируемых линий ANME-1 и ANME-2a/b. Процесс анаэробного окисления метана в осадках тесно связан с активным восстановлением сульфата. Окислительный микробный биофильтр поверхностного осадочного слоя не в полной мере потребляет метан, поступающий из ниже лежающих горизонтов осадочной толщи. Частично метан поступает в придонный водный слой, где активно окисляется аэробными метанотрофными бактериями, составляющими второй микробный биофильтр на пути миграции метана в атмосферу. Незначительное количество метана достигает поверхностного водного слоя. Этого количества оказывается достаточным для констатации эффекта эмиссии метана в атмосферу.

Работа поддержана грантом РФФИ 16-14-10201.

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ В МИКРОБИОМЕ LUBOMIRSKIA BAICALENSIS ПРИ МАССОВОМ ЗАБОЛЕВАНИИ БАЙКАЛЬСКИХ ГУБОК

Кулакова Н.В.^{1*}, Феранчук С.И.^{1,2,4}, Майкова О.О.¹, Бутина Т.В.¹, Адельшин Р.В.^{2,3}, Ханаев И.В.¹, Небесных И.А.¹, Кравцова Л.С.¹, Беликов С.И.¹

1 Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

2 Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Иркутск

3 Иркутский государственный университет, Иркутск

4 Иркутский национальный исследовательский технический университет, Иркутск

*e-mail: kulakova@lin.irk.ru

Массовая заболеваемость эндемичных губок ведет к значительному сокращению их численности в литоральной зоне озера Байкал. Изменения в бактериальных сообществах, ассоциированных с губками *Lubomirskia baicalensis*, были исследованы с помощью пиросеквенирования гена 16S рРНК с целью поиска причин заболевания. Образцы здоровых губок и губок с симптомами заболевания (n=22) были собраны в 2015 году в южной, средней и северной котловинах Байкала. Библиотеки ампликонов варибельного региона v4-v6 гена 16S рРНК были получены для каждого образца с использованием специфичных MID-адаптеров и секвенированы на приборе GS Junior System (Roche). Первичный анализ данных проводили с помощью программного пакета Mothur [1]. Для аннотации нуклеотидных последовательностей использовали референсную базу Silva [2]. Во всех исследованных губках было обнаружено 340 операционных таксономических единиц (ОТЕ), отнесенных к 24 филумам. Статистически достоверные различия относительной представленности ридов при сравнении группы здоровых губок

и губок с симптомами заболевания были обнаружены в 89 бактериальных ОТЕ. В больных губках значительно увеличилась представленность ОТЕ, принадлежащих семействам Oscillatoriaceae, Cytophagaceae, Flavobacteriaceae, Chitinophagaceae, Sphingobacteriaceae, Burkholderiaceae, Rhodobacteraceae, Comamonadaceae, Oxalobacteraceae и Xanthomonadaceae. Несмотря на существенные изменения в микробиоме больных губок, инфекционный патоген не выявлен. Обнаруженный широкий спектр потенциально патогенных организмов может служить основой для дальнейших исследований с целью выяснения их роли в заболевании байкальских губок.

Работа была поддержана грантом РФФИ 16-54-150007 и темой ФАНО России 0345-2016-0002.

- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T et al. (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities, *Appl Environ Microbiol*, 75 (23): 7537–7541.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P et al. (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools, *Nucl. Acids Res*, 41 (D1): D590–D596, DOI: 10.1093/nar/gks1219.

БАКТЕРИАЛЬНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ГОРЯЧИХ ИСТОЧНИКОВ БАЙКАЛЬСКОЙ РИФТОВОЙ ЗОНЫ

Лаврентьева Е.В.^{1,2}, Раднагуруева А.А.¹, Бархутова Д.Д.¹

1 Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, г.Улан-Удэ

2 Бурятский государственный университет, г.Улан-Удэ

*e-mail:lana_l@mail.ru

Впервые методом пиросеквенирования было исследовано разнообразие бактерий в микробных матах (39–65° С) трех щелочных горячих источников Байкальской рифтовой зоны (БРЗ) и проведен поиск факторов, определяющих спектр доминирующих таксономических групп в зависимости от экологических параметров среды обитания микроорганизмов. *Бактериальные сообщества горячих источников были исследованы с помощью* пиросеквенирования гена 16S на пиросеквенаторе 454 Genome Sequencer FLX-Titanium (Roche, Brandford, CT, USA) компанией ChunLab Inc. (Национальный университет Сеула, Республика Корея). Наибольшую долю в микробном сообществе составили представители фил Chloroflexi (Сея, 76.4%), Deinococcus-Thermus (Алла, 45.1%), Nitrospirae (Алла, 36.1%), Cyanobacteria (Цэнхэр, 33.1%), Proteobacteria (Цэнхэр, 22.6%), но их соотношение существенно варьировало в разных источниках. Определяющим фактором, влияющим на видовое разнообразие в изученных горячих источниках, является температура. Анализ функциональной активности полученных таксономических групп ми-

кроорганизмов показал, что в микробном мате источника Алла при 65° С функционирует термофильное хемоорганотрофное сообщество. При понижении температуры до 50° С микробный мат источника Сея представлен аноксигенным фототрофным микробным сообществом. Микробный мат источника Цэнхэр (39° С) характеризуется доминированием цианобактериального сообщества. Характерно, что большое количество последовательностей имело низкий уровень гомологии с культивируемыми представителями, не имеющих близких гомологов в мировой базе данных. Общей чертой всех 3 источников является присутствие существенной доли бактерий, участвующих на разных этапах в продукции и деструкции органического вещества в микробных матах. Большое количество филогенетически разнообразных, метаболически разнонаправленных групп свидетельствует о сбалансированном сложном сообществе, где каждая группа занимает свою экологическую нишу.

Работа была поддержана грантами МО РФ 6.9754.2017/БЧ, РФФИ 16-34-00254, 15-44-04335 и 15-04-01275.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ NGS ДЛЯ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ

Лихошвай Е.В.

Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

e-mail: likhoshway@mail.ru

Гидросфера занимает около 70 % площади земного шара [1], и основную роль в образовании первичной продукции и в круговороте органического вещества играют микроскопические организмы. В изучении водных экосистем в последние несколько лет сформировались новые направления, существенно расширяющие представление о структуре и функционировании метапопуляций микробных сообществ (микробиомов). Внедрение методов секвенирования нового поколения вскрыло огромное разнообразие водных микроскопических организмов – массу неизвестных ранее некультивируемых бактерий [2, 3] и вирусов, вместе с ними – новых генов и белков [4]. Создание новых баз данных и развитие биоинформатических методов анализа позволило выявить корреляционные связи между разными уровнями жизни гидросферы и определить степень развития микроскопических гидробионтов в зависимости от факторов окружающей среды. Например, было показано, что корреляции между отдельными бактериальными таксонами намного сильнее, чем между бактериями и эукариотами или бактериями и факторами окружающей среды [5], выявлены экологические связи морских бактерий, архей и протист [6]. На основе таких ко-ассоциативных сетей стало возможным построение динамических моделей метапопуляций, которые предсказывают изменение численности различных организмов в зависимости от изменений факторов окружающей

среды [7] и позволяет получить более глубокое понимание скрытых механизмов, обеспечивающих стабильность и динамику микробных сообществ [8]. Помимо фундаментальных знаний о природе моделирование сообществ имеет важный практический аспект в биотехнологии, биоэнергетике и биоремедиации, так как позволяет целенаправленно создавать многовидовые микробные сообщества с определенными функциями и предсказанным поведением [9].

Этим новым для водных экосистем направлениям мы следуем в рамках стартовавшего 3 апреля 2017 г. Интеграционного проекта ИНЦ № 4.1.2 «NGS+BD для решения вопросов экологии».

1. А.С. Степановских. (2001) *Экология. Учебник для вузов*, 703 с. (ЮНИТИ-ДАНА).
2. L.A. Hug et al. (2016) A new view of the tree of life, *Nature Microbiol.*, **1**: 16048.
3. A. Spang, T.J.G. Ettema. (2016) The tree of life comes of age, *Nature Microbiol.*, **1**: 16056.
4. D. Paez-Espino et al. (2016) Uncovering earth's virome, *Nature*, **536**: 425–430.
5. J.A. Gilber et al. (2012) Defining seasonal marine microbial community dynamics, *ISME J.* **6**: 298–308.
6. J.A. Steele et al. (2011) Marine bacterial, archaeal and protistan association networks reveal ecological linkages, *ISME J.*, **5**: 1414–1425.
7. P. Dam et al. (2016) Dynamic models of the complex microbial meta-population of lake Mendota, *Syst. Biol. Appl.*, **2**: 16007.
8. C. Cardona et al. (2016) Network-based metabolic analysis and microbial community modeling, *Curr. Opinion Microbiol.*, **31**: 124–131.
9. N.I. Johns (2016) Principles for designing synthetic microbial communities, *Curr. Opinion Microbiol.*, **31**: 146–153.

РЕКОНСТРУКЦИЯ ГЕНОМА НОВОГО НЕКУЛЬТИВИРУЕМОГО ВИДА АНАММОКС БАКТЕРИИ НА ОСНОВЕ МЕТАГЕНОМНЫХ ДАННЫХ

Марданов А.В.^{1*}, Белецкий А.В.¹, Котляров Р.Ю.¹, Каллистова А.Ю.², Николаев А.Ю.², Пименов Н.В.², Равин Н.В.¹

¹ Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва

² Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва

*e-mail: mardanov@biengi.ac.ru

Мы исследовали микробное сообщество пилотной установки по очистке сточных вод от аммония на основе процесса анаммокс (анаэробное окисление аммония нитритом с образованием газообразного азота) с помощью метагеномного подхода. Состав микробного сообщества активного ила определяли с помощью пиросеквенирования фрагментов генов 16S рРНК полученных с использованием двух пар праймеров – универсальных и специфически выявляющих планктомицеты, к которым относятся бактерии, осуществляющие анаммокс реакцию. Полученные данные показывают, что в процессе запуска пилотной установки и ее выхода на стационарный режим работы биоразнообразие микроорганизмов снижается, сообщество становится более специализированным. В нем значительно увеличивается доля анаммокс бактерий семейства *Brocadia*, в тоже

время доля бактерий порядка *Nitrosomonadales*, которые способны аэробно окислять аммоний, существенно не изменяется. В результате анализа метагеномных данных было показано, что в сформированном микробном сообществе доминируют бактерии «некультивируемого» рода *Brocadia*, доля которых составляет около 30%. На основе метагеномных данных собран геном этой бактерии, представленный двумя контигами суммарной длиной 3.5 млн. нт. В геноме было идентифицировано 3838 открытых рамок считывания. В результате анализа генома были выявлены пути анаммокс метаболизма, включающие транспортеры аммония и нитрита, гидразин синтазу, компоненты электрон-транспортной цепи, а также путь Вуда –Льюнгаля автотрофной фиксации углерода.

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-34-70018.

ОСОБЕННОСТИ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ХЕМОКЛИНА МЕРОМИКТИЧЕСКОГО ОЗЕРА ДОРОНИНСКОЕ (ЗАБАЙКАЛЬЕ)

Матюгина Е.Б.^{1*}, Белькова Н.Л.², Батурина О.А.³, Кабилов М.Р.³, Птицын А.Б.¹

1 Институт природных ресурсов, экологии и криологии СО РАН, Чита

2 Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

3 Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

*e-mail: evgenia48@mail.ru

Меромиктические содовые озера являются уникальными экосистемами, которые характеризуются устойчивой стратификацией многих физических, химических и биологических параметров, что делает эти водоемы превосходными модельными системами в лимнологических исследованиях. Озеро Доронинское является одним из трех известных меромиктических водоемов Сибири. Резко континентальный климат, многолетняя мерзлота, относительно высокая минерализация воды и осадков, низкая освещенность хемоклина и редкий тип содовых вод, сформированных в условиях испарительного концентрирования в зоне осадочных отложений, создают особые условия для функционирования микробных сообществ и отличают озеро от известных меромиктических водоемов мира.

Целью работы стало выявление микробного разнообразия в хемоклине озера в подледный и открытый периоды. Глубокое секвенирование ампликонов 16S рДНК проводили на платформе MiSeq в ЦКП “Геномика” СО РАН.

В микробном сообществе хемоклина идентифицированы представители 11 фил эубактерий, пяти кандидат-

ных фил *Candidatus Saccharibacteria* (TM7), *Candidatus Latescibacteria* (WS3), *Candidatus Parcubacteria* (OD1), SR1, BRC1 и одной филы архей – *Euryarchaeota*. Установлено, что доминирующими в подледный период являлись метаболически гибкие аноксигенные фотогетеротрофные несерные пурпурные бактерии сем. *Rhodobacteraceae*, класс *Alphaproteobacteria*, которые способны переключаться с аноксигенного фотосинтеза на аэробный хемотрофный метаболизм. В период открытой воды – хемоорганогетеротрофные факультативно анаэробные бактерии рода *Serratia* сем. *Enterobacteriaceae*, класс *Gammaproteobacteria* способные к восстановлению нитрата и обладающие и дыхательным и бродильным типами метаболизма. Сбалансированность микробного сообщества обеспечена наличием в минорной части (10–40%) фотогетеротрофов и хемогетеротрофов с альтернативными оксигенному и аноксигенному фотосинтезу стратегиями метаболизма и облигатных гетеротрофов, окисляющих серные соединения, используя в качестве акцепторов различные формы азота. Выявленные особенности определяют ключевые микробные процессы в озере.

МЕТАГЕНОМНЫЙ ПОДХОД К ИССЛЕДОВАНИЮ ЦВЕТЕНИЯ НИТЧАТЫХ ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ В БАЙКАЛЕ: ПЕРВЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Минчева Е.В.^{1*}, Букин Ю.С.^{1,3}, Кравцова Л.С.¹, Щербakov Д.Ю.^{1,4}, Тупикин А.Е.², Кабилов М.Р.²

1 Лимнологический институт СО РАН, г.Иркутск

2 Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

3 Иркутский национальный исследовательский технический университет, Иркутск

4 Иркутский государственный университет, Иркутск

*e-mail: elenakuznetsova01@gmail.com

Бурные цветения нитчатых зеленых водорослей в различных районах Байкала в последние годы стали одним из наиболее ярких проявлений масштабных изменений экосистемы озера. Для анализа разнообразия зеленых водорослей мы применили метагеномный анализ с использованием фрагмента гена, кодирующего 18S rRNA и фрагмента транскрибируемого межгенного спейсера (ITS1). Образцы были отобраны в заливе Лиственничный (сильно загрязненный участок Байкала), в районе о. Большой Ушканий (район, до сих пор избежавший заметного загрязнения) и из заболоченного участка пересекающей г. Иркутск р. Кая, в данном контексте – эталона загрязненного водоема. Из суммарных образцов выделяли ДНК, амплифицировали вышеупомянутые фрагменты и секвенировали ампликоны, используя набор 2x300 на платформе MiSeq (Illumina) в ЦКП “Геномика” СО РАН (ИХБФМ СО РАН). Сборку перекрывающихся последовательностей выполняли с помощью Usearch.

Для сравнения последовательностей ITS1, которые содержали большое количество инделей, использовалось реитеративное филогенетически-направленное выравнивание

с последующей сортировкой ридов по степени их генетического различия. Последовательности 18S выравнивали с помощью программы mothur с использованием базы данных Silva. Выделение ОТЕ проводили на уровне кластерного расстояния 0,01 долей замен. По 18S было выделено 48 доминирующих генотипов, идентификация которых с помощью базы данных показала, что они принадлежат по меньшей мере 24 различным родам организмов. При этом наиболее разнообразным оказался образец из р. Кая. Разнообразие доминирующих последовательностей ITS1 оказалось существенно выше. Были обнаружены последовательности нитчатых зеленых, представленные в разных пропорциях во всех трех образцах, также, как и специфические для Кайского и островного образцов. Как и в случае 18S rRNA, самым разнообразным оказался образец из р. Кая.

Показано, что примененный в настоящем исследовании подход может быть успешно использован для характеристики разнообразия генетического разнообразия сообществ зеленых водорослей, цветущих в различных районах Байкала.

ИЗУЧЕНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ У КУР МЯСНЫХ ПОРОД В ЭМБРИОНАЛЬНЫЙ И ПОСТЭМБРИОНАЛЬНЫЙ ПЕРИОДЫ

Егоров И.А.¹, Никонов И.Н.^{2*}, Лаптев Г.Ю.², Ильина Л.А.², Ленкова Т.Н.¹, Манукян В.А.¹, Йылдырым Е.А.², Грозина А.А.¹, Вертипрахов В.Г.¹, Егорова Т.А.¹, Новикова Н.И.², Филлипова В.А.²

1 ФНЦ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства РАН, Сергиев Посад, Московская область

2 Общество с ограниченной ответственностью «БИОТРОФ+», Санкт-Петербург

*e-mail: nikonov@biotrof.ru

Цель работы: Проведение исследований возрастной динамики развития микрофлоры пищеварительного тракта на этапе постэмбрионального развития цыплят 1, 7, 14, 21, 28 и 35-дневного возраста.

Исследования состава бактериального сообщества слепых отростков кишечника птицы проводили молекулярно-генетическими методами (T-RFLP и ПЦР в реальном времени). Отбор материала содержимого слепых отростков ЖКТ для молекулярно-генетических исследований проводили в 37-суточном возрасте у цыплят (по 3 из каждой группы) при убое со строгим соблюдением стерильности в соответствии с установленными требованиями.

Анализ данных показал, что микрофлора слепых отростков суточных цыплят существенно отличалась от микрофлоры цыплят других возрастов. Эти данные также подтверждаются кластерным анализом, в котором суточные цыплята оказываются собранными в отдельный кластер. Главное отличие микрофлоры слепых отростков суточных цыплят в очень низкой, по сравнению с остальными

образцами, доле целлюлозолитических бактерий: у цыплят отцовской линии (корниш) она составила 11,81 %, а у гибридов – 16,94 %. В то же время у цыплят материнской линии (плимутрок) была выявлена наибольшая доля среди других суточных цыплят бактерий-целлюлозолитиков – 28,71 %.

Необходимо отметить, что у птиц отсутствуют собственные ферменты, ответственные за расщепление клетчатки и других некрахмалистых полисахаридов. Вследствие этого, переваривание данных веществ происходит исключительно с участием микроорганизмов-целлюлозолитиков, содержащихся в слепых отростках ЖКТ.

Таким образом, данные о таксономическом составе и структуре микробных сообществ кишечника кур позволяют определить особенности пищеварения, в частности труднопереваримых некрахмалистых полисахаридов.

Исследования выполнены при поддержке Российского научного фонда, Соглашение №16-16-04089 от 01 августа 2016 года.

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОМНОГО КОНТЕКСТА ГЕНОВ РЕЗИСТЕНТНОСТИ КИШЕЧНЫХ МИКРОБОВ ПРИ ПОМОЩИ МЕТАГЕНОМНЫХ ДАННЫХ

Олехнович Е.И.^{1*}, Васильев А.Т.², Ульяновцев В.И.², Тяхт А.В.¹, Кострюкова Е.С.¹

1 ФНЦ Физико-химической медицины ФМБА России, Москва

2 Университет ИТМО, Санкт-Петербург

*e-mail: jeniaole13@mail.ru

Резистентность к антибиотикам — глобальная проблема современного здравоохранения. Кишечная микробиота человека может выступать в роли аккумулятора детерминант резистентности, также существует потенциальная возможность передачи данных генов от комменсальных бактерий патогенам. Таким образом возникает насущная необходимость разработки методов изучения распространения АР-генов в микробиоте посредством механизмов горизонтального переноса. Мы разработали MetaCherchant – алгоритм позволяющий извлекать информацию о геномном контексте целевого гена из метагеномных данных. Данный алгоритм был протестирован на искусственных данных и применен для анализа данных полногеномного секвенирования (WGS) – метагеномах пациентов прошедших эрадикацию *Helicobacter pylori* [1]. Мы реконструировали геномные контексты наиболее представленных генов, что, при проведении аннотации, позволяет определить таксономическую ассоциацию исследуемых детерминант резистентности.

Функционал алгоритма позволяет объединять окружения целевой последовательности, что, при наличии разнесенных во времени данных от одного пациента, позволяет визуализировать события горизонтального переноса. MetaCherchant дает расширенные возможности для изучения контекста генов резистентности и визуализации событий горизонтального переноса в сравнении с общепринятыми методиками. Таким образом, алгоритм разработанный позволяет получить представление об ассоциативных связях АР-генов (или каких-либо других последовательностей ДНК) с определенными таксонами, а также о событиях горизонтального переноса *in vivo* при использовании данных WGS.

Работа была поддержана грантом РФФ 15-14-00066.

1. O. E. Glushchenko et al. (2017) Data on gut metagenomes of the patients with *Helicobacter pylori* infection before and after the antibiotic therapy, Data in Brief, 11 : 68-71.

МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ЭКОСИСТЕМ ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫХ ЛИНИЙ МИКРООРГАНИЗМОВ

Кадников В.В.¹, Марданов А.В.¹, Белецкий А.В.¹, Карначук О.В.², Равин Н.В.^{1*}

¹ Институт Биотехнологии ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

² Лаборатория биохимии и молекулярной биологии, Томский государственный университет, Томск

* e-mail: nravin@biengi.ac.ru

Микроорганизмы являются наиболее многочисленной и разнообразной формой жизни, во многом определяющей основные биогеохимические процессы на Земле. Однако, как правило, не более 1% микроорганизмов из природных сообществ удается культивировать в лабораторных условиях и, следовательно, охарактеризовать традиционными методами. Некультивируемые микроорганизмы встречаются не только в известных группах, но и образуют отдельные эволюционные линии, о которых практически ничего не известно. Так, около половины известных таксонов высшего уровня, филумов, не имеют культивируемых представителей, причем значительная их часть была обнаружена в экосистемах с экстремальными физико-химическими условиями. Для изучения некультивируемых линий могут быть использованы методы метагеномного анализа, предполагающие секвенирование коллективного метагенома микробного сообщества и его «разбор» на геномы отдельных микроорганизмов, либо методы геномики еди-

ничных клеток. Объектом наших исследований являются микробные сообщества глубинной подземной биосферы, а именно термальных вод, залегающих на глубинах нескольких километров в условиях высокого давления и температуры. Мы просеквенировали метагеном микробного сообщества подземных вод, поступающих с глубины около 2.8 км через нефтепоисковую скважину 1Р в Томской области. Молекулярный анализ показал, что бактерии некультивируемых линий составляют около 70% сообщества. В результате анализа метагенома с полнотой более 90% определены композитные геномы 25 линий бактерий. Три генома представляли некультивируемые филумы, - BRC1, OP8 (Aminicenantes) и ранее не известную линию уровня филума. Для представителя филума BRC1 определен полный кольцевой геном. Анализ геномов позволил охарактеризовать эволюцию этих групп, возможности их метаболизма и вероятную роль в микробном сообществе.

Работа поддержана грантом РФФ 14-14-01016.

РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ВОДЫ ИСТОЧНИКА КУЧИГЕР, РЕСПУБЛИКА БУРЯТИЯ

Раднагуруева А.А.^{1*}, Зайцева С.В.¹, Бархутова Д.Д.¹, Аликина Т.Ю.², Кабилов М.Р.², Лаврентьева Е.В.¹

¹ Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

*e-mail: aryuна_rg@mail.ru

Микробная экология относится к одной из наиболее динамично развивающихся области биологических наук. Основным двигателем этого прогресса является активное использование различных молекулярно-генетических подходов. Метод высокопроизводительного секвенирования позволяет определить количественные характеристики микробных сообществ, их разнообразие и структуру, выявляя не только доминирующие микроорганизмы, но и минорные компоненты сообществ, которые могут играть важную экологическую роль.

Целью настоящего исследования была оценка состава и структуры микробного сообщества воды термального источника Кучигер. Пробы воды источника Кучигер-1 и Кучигер-2 и сразу фильтровались через нитро-целлюлозные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм. ДНК выделяли набором PowerSoil DNA Isolation Kit (Mo-Bio) и амплифицировали V3-V4 участок гена 16S рРНК. Секвенирование проводили на платформе MiSeq (Illumina) в ЦКП «Геномика» СО РАН (ИХБФМ СО РАН). Обработку ридов и поиск OTU выполняли Usearch [1].

По результатам секвенирования микробное сообщество воды источника Кучигер характеризовалось значительным видовым разнообразием бактерий, в составе которых выявлено до 718 филотипов (OTU), принадлежащих 21 филумам. Определено от 55417 до 70123 последовательностей, бактерии составляют до 98,8 % микроорганизмов в воде станции Кучигер-1 и 98,6 % микроорганизмов в воде станции Кучигер-2. В источнике Кучигер микробные сообщества воды двух станций сходны по наличию представителей основных фил бактерий, но таксономический состав этих двух сообществ различен. Более 80% всех последовательностей микробного сообщества воды двух станций составляют 4 филума *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* и в том числе не классифицируемые бактерии (от 12 до 15,3 % от всех последовательностей).

Работа поддержана грантами РФФИ №16-34-00254, №15-04-01275, №15-44-04335, №16-48-030881, МО РФ №6.9754.2017/БЧ

1. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. RC Edgar. Nature methods 10 (10), 996-998

МЕТАБАРКОДИРОВАНИЕ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДИЕТЫ У ДАУРСКОЙ ПИЩУХИ

Борисова Н.Г., Руднева Л.В.* , Старков А.И., Галиева Г.Р., Шимов И.В.

Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ

* e-mail: lvrudneva@rambler.ru

Моделирование распространения животных и растений остро необходимо для прогноза ответов биоты на глобальные изменения климата и ландшафтов. Для даурской пищухи, ключевого вида степей Забайкалья, нами разработана модель предпочтения биотопов на основе абиотических факторов. Тестирование показало нестабильную предсказательную способность модели. Мы предположили, что включение в качестве предиктора пищевых ресурсов позволит улучшить модель. Неинвазивное изучение питания проводили: (1) посредством визуальных наблюдений и (2) по фрагментам кутикулы растений в фекалиях зверьков. Оба метода требуют больших временных затрат, при этом (1) позволяет регистрировать только 10%-30% суточного рациона (вследствие временных ограничений и невозможности отслеживать кормление в закрытых участках биотопа); (2) более эффективен, но крайне трудоемок и неадекватно отражает доли разных компонентов из-за различий в устойчивости их кутикулы к перевариванию. Мы разработали дизайн исследования питания даурской пищухи с использованием метода метабаркодирования, успешно примененного на ряде видов животных [1]: для

потенциальных объектов питания необходимо найти короткие маркеры для их определения с допустимой точностью в фекалиях: нпр, для покрытосеменных маркер Р6 loop хлоропластного *trnL* интрона [2]; пометить фрагменты ДНК определенных проб, чтобы разделять сиквенсы после NGS [3]; проверить, можно ли установить количественные пропорции в диете по соотношению видовых последовательностей в результатах NGS, проанализировав пробы от зверьков с известными количественными характеристиками рациона (в условиях неволи).

1. F. Hibert, P. Taberlet, J. Chave, C. Scotti-Saintagne, D. Sabatier, C. Richard-Hansen. (2013) Unveiling the Diet of Elusive Rainforest Herbivores in Next Generation Sequencing Era? The Tapir as a Case Study, *PLoS ONE*, **8(4)**: e60799.
2. A. Pegard, C. Miquel, A. Valentini, E. Coissac, F. Bouvier, et al. (2009) Universal DNA based methods for assessing the diet of grazing livestock and wildlife from faeces, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **57**: 5700-5706.
3. A. Valentini, C. Miquel, M.A. Nawaz, E. Bellemain, E. Coissac, et al. (2009) New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the trnL approach, *Molecular Ecological Resources*, **9**: 51-60.

АНАЛИЗ ФАГОВЫХ ПУТЕЙ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ГЕНОВ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТАГЕНОМНЫХ ДАННЫХ

Старикова Е.В.^{1*}, Rands Ch.², Zdobnov E.², Говорун В.М.¹.¹ ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Москва² University of Geneva, Department of Genetic Medicine and Development, Geneva, Switzerland*e-mail: hed.robin@gmail.com

Широкое применение антибиотиков в медицине и промышленности приводит к изменению характера эволюционных процессов в микробных сообществах и распространению антибиотикорезистентности. Известно, что гены антибиотикорезистентности могут распространяться путем горизонтального переноса, осуществляемого мобильными генетическими элементами.

Целью работы являлось обнаружение свидетельств потенциального переноса свидетельств потенциального переноса генов антибиотикорезистентности (АР) бактериофагами в микробиоте кишечника человека.

Поиск свидетельств осуществлялся с использованием двух биоинформатических подходов: картирования вирусных метагеномов на базу данных генов антибиотикорезистентности и анализа колокализации генов АР и профагов в метагеномах кишечника человека с использованием тестовой версии пайплайна собственной разработки.

В результате картирования метавириомов было обнаружено 75 генов АР различных типов в 8% проанализированных метавириомов. Среди обнаруженных генов наиболее часто встречались гены из групп бета-лактамаз и метилтрансфераз, также часто встречались гены устойчивости к тетрациклину.

В результате анализа метагеномных сборок 6 образцов микробиоты кишечника человека гены антибиотикорезистентности были обнаружены в составе фаговой последовательности либо на близком расстоянии от профага в 1% проанализированных профагов.

Полученные данные могут свидетельствовать о переносе ряда генов антибиотикорезистентности в микробиоте при участии бактериофагов.

Работа была проведена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 16-54-21012).

ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ ХЕРЕСНЫХ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Марданов А.В.¹, Эльдаров М.А.^{1*}, Белецкий А.В.¹, Думина М.В.¹, Танащук Т.Н.², Кишковская С.А.², Равин Н.В.¹

¹ Институт Биотехнологии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва.

² ВНИИ виноградарства и виноделия «Магарач» РАН, Ялта.

*e-mail: eldarov1@yandex.ru

Хересные дрожжи представляют уникальную группу винодельческой микрофлоры и на протяжении столетий используются для получения биологически выдержанных вин. Физиологические и биохимические характеристики хересных и винных штаммов резко отличаются [1]. С использованием платформ PacBio и Illumina мы расшифровали геномные последовательности трех штаммов хересных дрожжей из коллекции ННИИВиВ «Магарач». Методами сравнительной геномики охарактеризована генетическая вариабельность хересных штаммов, потенциально связанная с адаптацией этих дрожжей к специфическим условиям виноделия. Так, выявлено 2407 SNP в 1343 локусах, отличающие хересные штаммы от винных. Анализ в терминах генной онтологии показал, что наиболее полиморфными у хересных штаммов являются гены, связанные с процессами ДНК-репарации, метаболизма углеводов, гомеостаза ионов, ответа на осмотический стресс, метаболизма липидов, биогенеза клеточной стенки и проч.

CNV анализ выявил существенное снижение у хересных штаммов копииности мобильных элементов, генов трансмембранных транспортеров, гидролаз, редукцию числа копий мтДНК и др. События потери и приобретения генов у хересных штаммов не столь выражены, как у известных коммерческих штаммов винных и пивных дрожжей, связаны с утратой нескольких генов гипотетических белков, Ту элементов, аспарагиназ, интрогрессией генов так называемого «винного кольца», некоторых других характерных генов винных штаммов.

Полученные данные будут способствовать разработке стратегий направленного отбора и создания новых штаммов, совершенствованию технологий виноделия.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского Научного Фонда 16-16-00109.

1. Эльдаров М.А., Кишковская С.А., Танащук Т.Н., Марданов А.В. Геномика и биохимия винных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Успехи биологической химии, т. 56, 2016, с. 155–196.

ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ДВУХ СОЛЕННЫХ ОЗЕР ПУСТЫНИ БАДАИН ЖАРАН (ВНУТРЕННЯЯ МОНГОЛИЯ, КИТАЙ)

Эрдынеева Е.Б.¹, Раднагуруева А.А.¹, Аликина Т.Ю.², Лаврентьева Е.В.^{1,3}

¹ Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, г. Улан-Удэ

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск

³ Бурятский государственный университет, г. Улан-Удэ

*e-mail: lenae7777@gmail.com

Соленые озера пустыни Бадаин Жаран расположены в северо-западной части Алашаньского нагорья Внутренней Монголии, Китай. Эти озера показывают широкий спектр солености, от субсоленых до гиперсоленых.

С помощью глубокого секвенирования ампликонов V3-V4 16S рРНК (ЦКП «Геномика» СО РАН) на платформе MiSeq (Illumina) была проведена характеристика таксономического состава 2 микробных сообществ соленых озер пустыни Бадаин Жаран, отличающиеся контрастными значениями солености: 1) микробный мат Вj-2 (соленость 495 г/л; рН 9,76) и 2) песчаный ил Вj-11 (соленость 6 г/л; рН 8,99).

В составе бактериального сообщества микробного мата Вj-2 практически 91 % принадлежали к следующим 3 доминирующим филумам: *Bacterioidetes* (37,8%), *Proteobacteria* (33,2%) и *Firmicutes* (19,7%). В образце песчаного ила Вj-11 филум *Proteobacteria* (57,6 %) является доминирующим,

где преобладают классы *Gamma*proteobacteria (27,9 %) и *Alpha*proteobacteria (18,7 %). Субдоминантом является филум *Cyanobacteria* (25,5%), включающий умеренно галофильные и галотолерантные трихомные цианобактерии.

Архейное сообщество соленого озера Вj-2 представлено филумом *Euryarchaeota* (10,3 %), где 9,9 % приходится на галофильное семейство *Halobacteriaceae*. Озеро Вj-11 практически полностью представлено бактериальным сообществом, архейные последовательности обнаружены лишь единично.

Установлено, что таксономический состав микробного мата и песчаного ила соленого озера Бадаин Жаран представлен различными филогенетическими группами галофильных и алкалофильных бактерий, выполняющих различные метаболические и экологические функции.

Работа выполнена при поддержке грантов МО РФ 6.9754.2017/БЧ, РФФИ 16-34-00254 и 15-04-01275.

DIVERSITY OF VIRAL METABOLIC PSB A GENE IN LAKE BALKHASH

Alexyuk M.S.*, Alexyuk P.G., Turmagambetova A.S., Bogoyavlenskiy A.P., Berezin V.E.

Institute of microbiology and virology CS MES RK, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: madina.a06@gmail.com

Bacteriophages of water ecosystems influence on biogeochemical circulation of nature substances via lysis of host cells and modulating of their metabolism during infection. These metabolic changes are encoded by genes that are carried by phages but expressed in bacterial cells. Such genes are referred to as auxiliary metabolic genes (AMGs). Cyanophages are the main carriers of such genes.

The discovery of genes (*psbA*, *psbD*) that encode key photosystem II proteins (D1, D2) in the genomes of phages that infect these cyanobacteria suggests new models for the regulation, function and evolution of photosynthesis in the immense aqueous ecosystems.

In our research, we carried out the NGS study of the genetic diversity of photosynthetic *psbA* gene of cyanophages of Balkhash Lake, one of the largest reservoirs of Ile-Balkhash region of Kazakhstan.

As a result of full-length sequencing of the virus containing DNA samples derived from Balkhash and analyzed by standalone version blastn NCBI, 2.2.30 database, we have collected several thousand sequences of *Synechococcus* and *Prochlorococcus* phages more than 150 nucleotides in length, of which 21 sequences of *psbA* gene were identified, forming

the basis of the photosynthetic system II of blue-green algae. These 21 sequences had the length from 200 to 850 nucleotides, and were used for a comparative study of phages *psbA* gene diversity of Balkhash Lake.

It was found that identified gene sequences were clearly divided into two clusters, each of which was subdivided into monophyletic group independent from each other.

It was shown that the analyzed clones of protein *psbA* clearly divided into two groups. First group contains the phages isolated mainly in waters with low temperature, the second phages from other water bodies (rice fields, the sea, etc.). 15 investigated clones of *psbA* gene belong to a group of phages isolated in high alpine lakes or the Arctic Ocean, which may be due to run off water from the mountain peaks of the Tien Shan into Balkhash Lake. The other clones correspond to the phages isolated in the sea or paddy fields.

Thereby, the study of the diversity of phages *psbA* gene isolated in large reservoirs in Kazakhstan showed that this waterbody absorbed water from different landscape zones and therefore is a unique place to study genetic diversity of cyanobacteria photosynthetic system II and other auxiliary metabolic genes.

BACTERIAL 16S DNA DIVERSITY IN SOIL UNDER THE KOREAN PINE

Naumova N.B.^{1*}, Alikina T.Y.², Kabilov M.R.², Kuznetsova G.V.³

1 Institute of Soil Science and Agrochemistry SB RAS, Novosibirsk

2 Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

3 Sukachev Forest Institute SBRAS, Krasnoyarsk

*e-mail: nnaumova@mail.ru

To study bacterial 16S DNA diversity soil was sampled under the Korean pine (*Pinus koraiensis* Siebold et Zucc.) grown in the long-term field provenance experiments in Krasnoyarsk and Khabarovsk regions. Both bulk and rhizosphere soil was sampled from individual plots as composed of 6 subsamples from each plot. Rhizosphere soil was collected as the soil remaining on 1-3 mm pine roots after their gentle shaking. After extraction total DNA from soil was used as a template for amplification of the 16S rDNA V3-V4 region and sequencing on MiSeq (Illumina) at the SB RAS Genomics Core Facility. RDP Classifier 2.10 was used for taxonomic analysis with prior chimera checking. Statistical analyses (PCA, ANOVA) were performed by using Statistica v.6.1.

Analysis of principal components, extracted from the data matrix with soil samples as objects and bacterial classes (number of reads in each) as variables, showed practically no difference in bacterial diversity between bulk and rhizosphere soil samples from the Khabarovsk region, i.e. from the habitat native for the Korean pine, while marked difference between experimental sites was found along the 1st PC (42% of the total variance) and between rhizosphere and bulk soil sampled in Krasnoyarsk region along the 2nd PC (25% of the total variance).

ANOVA showed that experimental site accounted for more than 99% of the variance in the number of *Alphaproteobacteria* and *Actinobacteria* class-specific reads, and more than 70% of the variance in *Acidobacteria* (groups 1, 2, 3), *Sphingobacteria*, *Beta-*, *Gamma-* and *Deltaproteobacteria*, *Ktedonobacteria*, *Bacilli*, *Planctomycetacia* and *Anaerolineae*. ANOVA also identified bacterial classes, on which pine roots exerted significant effect both statistically ($P \leq 0.05$) and ecologically (total variance share $\geq 10\%$), increasing (*Gammaproteobacteria*, *Acidobacteria* 3 and *Armatimonadia*) or decreasing (*Spartobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Acidobacteria* groups 4, 6, 7, 11, 16, 17, 22, 25, *Bacteroidetes-is* and *Anaerolineae*) the number of reads as compared to the bulk soil, with *Acidobacteria* (groups 4, 6, 7, 11, 16, 17 and 22) being affected rather strongly (the rhizosphere effect exceeding 40% of the total data variance).

Our data on bacterial 16S DNA diversity in soil under Korean pine in its native and non-native habitats confirm the idea about rhizosphere as the main interface between plant and soil, mediating plant adaptation to novel environment.

METAGENOMIC ANALYSIS OF NDV MATRIX PROTEIN GENE FROM ENVIRONMENTAL SAMPLES

Turmagambetova A.S.*, Alexyuk M.S., Alexyuk P.G., Bogoyavlenskiy A.P., Berezin V.E.

Institute of Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: aichyck@mail.ru

Massively parallel sequencing allows to rapid and low-cost deep sequencing of viral genomes and provides an opportunity to gain greater insight into viral evolution, emergence and transmission. The problem of environmental sample NGS is you do not know what exactly will get. Often you need among the tens of millions of reads to find those that belong to the virus the number of copies of which in the sample does not exceed several dozen. This task is practically impossible without the use of additional software as MetaVir, Virfind, ViroBLAST, etc.

In our studies, a metagenomic study of fragments of the Newcastle disease virus matrix protein gene was carried out. For the purity of experiment, we avoided selective amplification in order to increase the copyability of genomes. Environment samples were concentrated. RNA was isolated using the PureLink Viral DNA/RNA Mini kit. The first and second strands of DNA were obtained using a set of RiboClone. Library of genes was performed according to the Genoscope protocol (Illumina Genoscope protocol) for sequencing on HiSeq 2500. Reads were assembled using the standalone Edena software. Depth of coverage is average number of reads by which any position of assembly is inde-

pendently determined. As a source of benchmark sequences (viral genomes) we used a standalone version of the NCBI nucleotide database, comprising 6079 complete genomes of viruses.

Analysis of the results showed that only 0.01% of the sequencing reads corresponded to the Newcastle disease virus. 40 different M partial genes of NDV have been detected in environmental samples. The length of these contigs was from 200 to 300 base pairs. The contigs belongs to the several monophyletic groups.

Phylogenetic analysis revealed that contigs clustered with the class I and II viruses. 3 genotypes belong to the apathogenic branches of the virus evolution, and 2 to pathogenic.

This finding is essential for improving of strategies of diseases control. The study results emphasize the importance of continuous surveillance of this disease and of exchanging the information to the global scientific community, which would help to fill the epidemiological breaches in the regions and to confirm the validity of diagnostic screening.

This study was funded by the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan (grant number 0115RK01096).

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМОВ ВАРИАНТОВ ВИЧ-1, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НА ПЕРВИЧНЫХ И ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Гашникова Н.М.^{1*}, Кабилов² М.Р., Богачева¹ Н.В., Тупикин² А.Е., Ачигечева¹ П.Ю., Мирджамалова^{1,3} Н.А., Гашникова¹ М.П., Тотменин¹ А.В.

1 ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область

2 Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

3 ГБУЗ Новосибирской области «Центр СПИД», Новосибирск

*e-mail: ngash@vector.nsc.ru

В процессе развития ВИЧ-инфекции на уровне организма под давлением иммунной системы происходит адаптация ВИЧ-1, приводящая к изменению его генотипа и фенотипа. Целью работы являлось использование разных методов культивирования вируса для моделирования и изучения динамики развития ВИЧ-инфекции.

Изоляцию ВИЧ-1 из крови ВИЧ+ доноров осуществляли на мононуклеарных клетках здоровых доноров. С помощью онлайн ресурса Geno2pheno по последовательности env определяли вероятность использования вирусом корцепторов R5/X4, X4. ВИЧ-1, потенциально имеющие CXCR4-тропность, использовали для адаптации к лимфоидной культуре клеток человека MT-4. Из культуральной жидкости выделяли РНК, готовили ДНК-библиотеки. Секвенирование проводили на платформе MiSeq (Illumina) в ЦКП «Геномика» СО РАН.

В работе исследованы цитопатическое действие вируса, динамика и количественные характеристики репродукции

для 20 первичных изолятов (CCR5, CXCR4-тропных) и 3-х адаптированных к MT-4 ВИЧ-1 (CXCR4-тропных). Анализ гена env выявил прямую зависимость увеличения общего положительного заряда V3-петли и снижения количества сайтов гликозилирования с увеличением скорости репродукции и цитопатического действия ВИЧ. Максимальные изменения в геноме, особенно в области V3 петли, зарегистрированы при адаптации CRF63_02A1 ВИЧ-1, изолированных от пациентов на ранней стадии заболевания.

Полногеномный анализ ВИЧ-1, выполненный при исследовании одного варианта вируса на разных моделях ВИЧ-инфекции, позволяет осуществлять комплексное изучение структурно-функциональных особенностей возникающих новых геновариантов ВИЧ-1.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №16-15-10238).

ОСОБЕННОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ ВИЧ-1, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ

Гашникова Н.М.^{1*}, Кабилов² М.Р., Богачева¹ Н.В., Тупикин² А.Е., Чернов³ А.С., Степанова³ С.А., Исмаилова³ Т.Н., Гашникова¹ М.П., Тотменин¹ А.В.

1 ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область

2 Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

3 ОГБУЗ Томский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД, Томск

*e-mail: ngash@vector.nsc.ru

Целью данного исследования являлось изучение генетических особенностей вариантов циркулирующей рекомбинантной формы (CRF) 63_02A1 ВИЧ-1, вызвавшей вспышку распространения эпидемии ВИЧ-инфекции в Томской области (ТО) [1].

Работа включала культивирование ВИЧ-1 на периферических мононуклеарных клетках крови человека; выделение РНК из культуральной жидкости и из плазмы крови ВИЧ-инфицированных пациентов; обогащение РНК с помощью олигонуклеотидной гибридизации; приготовление библиотек и секвенирование на платформе MiSeq в ЦКП «Геномика» СО РАН.

В результате было собрано de novo 11 геномов CRF63_02A1 ВИЧ-1. Филогенетический анализ показал, что CRF63_02A1 ВИЧ-1, циркулирующие в ТО, объединяются с вариантами CRF63_02A1 ВИЧ-1, циркулирующими в Новосибирской области. При этом изученные вирусы из ТО формируют свою филогенетическую ветвь,

состоящую из двух отдельных подветвей. Обособленная кластеризация генетически однородных групп вариантов CRF63_02A1 ВИЧ-1, выделенных от ВИЧ+ жителей ТО, может являться дополнительным подтверждением независимых «заносов» с соседних территорий отдельных геновариантов CRF63_02A1 ВИЧ-1 и стремительного распространения этих вирусов среди лиц, практикующих рискованное поведение. Разработанная авторами методика обогащения РНК позволила проводить секвенирование ВИЧ-1 из клинических образцов крови, что расширяет возможность применения данного метода в изучении циркулирующих вирусов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №16-15-10238).

1. N.M. Gashnikova et. al. (2015) A rapid expansion of HIV-1 CRF63_02A1 among newly diagnosed HIV-infected individuals in the Tomsk region, Russia, *AIDS Res Human Retrovir*, **31(4)**: 456–460

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ВАРИАНТЫ ВИЧ-1, ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ В НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ

Гашникова Н.М.^{1*}, Кабилов² М., Богачева¹ Н.В., Тупикин² А.Е., Соколов³ Ю.А., Мирджамалова^{1,3} Ф.О., Гашникова¹ М.П., Тотменин¹ А.В.

1 ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область

2 Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

3 ГБУЗ Новосибирской области «Центр СПИД», Новосибирск

*e-mail: ngash@vector.nsc.ru

Рекомбинантные варианты ВИЧ-1 играют определяющую роль в развитии современной эпидемии ВИЧ-инфекции в Новосибирской области (НСО). С целью изучения геномов ВИЧ-1 при проведении регулярного мониторинга были отобраны вирусы, принадлежащие к основным циркулирующим рекомбинантным формам (CRF63_02A1, CRF02_AG) и некластеризующиеся геноварианты ВИЧ-1.

Для выделения РНК использовали наработанные на первичных клетках человека изоляты ВИЧ-1. Подготовка ДНК-библиотек, секвенирование на платформе MiSeq (Illumina) проводилась в ЦКП «Геномика» СО РАН. Рекомбинационный анализ геномов выполняли с помощью специализированных программных продуктов (SimPlot; RIP, www.hiv.lanl.gov; http://jphmm.gobics.de/submission_hiv.html).

Согласно филогенетическому анализу из 7 собранных геномов ВИЧ-1 три принадлежат к наиболее распространенной CRF63_02A1, один вариант кластеризуется со сред-

неазиатской группой CRF02_AG ВИЧ-1. Три оставшихся вируса являются уникальными рекомбинантными формами (URF) ВИЧ-1: один имеет мозаичный геном, частично идентичный субтипу А, частично CRF02_AG (URF02_A1), другой возник в результате рекомбинации между А и CRF63_02A1 (URF63_A1). Для третьей URF показана высокая идентичность с CRF63_02A1 ВИЧ-1, при этом остаются требующие дополнительного анализа неклассифицированные области вирусного генома.

Впервые выполнен анализ геномов вторичных рекомбинантных форм - URF63_A1, URF02_AG, выявленных в России. Продемонстрирована актуальность применения высокопроизводительного секвенирования для молекулярно-генетического контроля за эпидемией в условиях значительного роста генетической гетерогенности ВИЧ.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №16-15-10238).

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ КЛАССИФИКАЦИИ НОВОГО СЕМЕЙСТВА PNEUMOVIRIDAE (2016) С ПОМОЩЬЮ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Курская О.Г.^{1*}, Соболев И.А.¹, Кабилов М.Р.², Шаршов К.А.¹, Мурашкина Т.А.¹, Алексеев А.Ю.¹, Шестопалов А.М.¹

1 НИИ экспериментальной и клинической медицины, Новосибирск

2 Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

*e-mail: kurskaya_og@mail.ru

Пневмовирусы человека являются ведущими возбудителями острых респираторных вирусных заболеваний в мире, особенно в раннем детском возрасте. В настоящее время использование методов NGS (секвенирование нового поколения) обеспечивает широкие возможности для изучения вирусных патогенов. Так, совершенствование методов исследования и анализа привело к более полному пониманию разнообразия пневмовирусов, что обусловило пересмотр действующей таксономии и выделение этих вирусов в отдельное семейство в 2016 г. [1].

Ортопневмовирус человека – вирус семейства Pneumoviridae, имеющий несегментированный геном, представленный (-) РНК. Существует два антигенно и генетически различных субтипа ортопневмовируса человека – А и В, циркулирующих одновременно. Изначально ортопневмовирусы А подразделялись на 5 генетических подгрупп, а ортопневмовирусы В – на 4 подгруппы, однако к настоящему времени представление о разнообразии вариантов этих вирусов значительно расширилось: ортопневмавирусы А подразделяются на 16 генетических подгрупп, а В – на 22 [2]. Однако, несмотря на то, что в мире активно изучается генетическое разнообразие респираторных вирусов, на территории России

подобные исследования практически не проводятся.

В течение нескольких эпидемических сезонов нами определена этиологическая структура острых респираторных вирусных инфекций (8 видов вирусов) и показана эпидемиологическая значимость ортопневмовируса человека в структуре заболеваемости: у детей на долю данного вируса приходится до 40% случаев в структуре ОРВИ [3]. Из положительных проб были выделены изоляты ортопневмовируса и выполнена попытка секвенирования полного генома с использованием секвенатора MiSeq (Illumina) в ЦКП «Геномика» (ИХБФМ СО РАН). Показано недостаточное количество целевой РНК в образцах, что указывает на сложности в выделении пневмовирусов из клинического материала и показывает необходимость оптимизации модели выделения и культивирования пневмовирусов человека для изучения их генетического разнообразия в России.

1. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/

2. Schobel SA, et al. // Sci Rep. – 2016. – Vol. 6. 26311

3. Курская О.Г. и др. Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов молекулярно-клеточные и медико-экологические проблемы компенсации и приспособления. НИИЭЖМ. Ответственный редактор: академик РАН, д.м.н., проф. В.А. Шкурпий. 2015. С. 139-140.

РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНОМОВ ШТАММОВ ВИРУСА НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ, ВЫДЕЛЕННЫХ ВО ВРЕМЯ ВСПЫШКИ ОСПЫ 1959-1960 ГГ. В Г. МОСКВА

Максютов Р.А., Трегубчак Т.В., Швалов А.Н., Лемза А.Е.*, Гаврилова Е.В., Щелкунов С.Н.

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Россия.

*e-mail: lemza.ae@yandex.ru

В связи с отменой противооспенной вакцинации все большее количество людей не обладает специфическим иммунитетом против вируса натуральной оспы (ВНО), возбудителя одного из опаснейших вирусных инфекционных заболеваний человека. Исследования штаммов ВНО позволяют изучить естественную историю развития и распространения ВНО и оценить риски возникновения новых высокопатогенных штаммов ортопоксвирусов в условиях угрозы их возможного возникновения [1].

В данной работе на приборе MiSeq (Illumina, США) были определены полные последовательности геномов 24 штаммов ВНО, хранящихся в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, проведена их сборка (покрытие от 30x до 3116x) и филогенетический анализ с использованием программы MEGA7 [2] и метода максимального правдоподобия PhyML [3], показавший, что исследованные штаммы группируются в зависимости от их географического происхождения и года вспышки в соответствии с ранее секвенированными геномами. Сравнительный анализ последовательностей ге-

номов 4 штаммов, выделенных во время вспышки 1959-1960 гг. в г. Москва, показал, что указанные штаммы внутри всех трех генераций пациентов практически не различаются и группируются с азиатскими штаммами, что подтверждает эпидемиологические данные об источнике вспышки (Индия).

Полученные данные пополняют базу данных последовательностей геномов ВНО для проведения дальнейших сравнительных анализов геномов существующих и вновь выделяемых штаммов с целью оценки риска возникновения новых высокопатогенных штаммов и демонстрируют генетическую стабильность вируса внутри ограниченной вспышки натуральной оспы, произошедшей в г. Москва в 1959-1960 гг.

1. Shchelkunov S.N. (2013) An increasing danger of zoonotic orthopoxvirus infections, PLoS Pathog, 9:e1003756.
2. Kumar S. et al. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets, Molecular Biology and Evolution, 33: 1870-1874.
3. Guindon S. et al. (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0, Syst Biol, 59: 307-321.

ПОИСК ГЕНОВ БАКТЕРИЙ ВИДА *ESCHERICHIA COLI* АССОЦИИРОВАННЫХ С БОЛЕЗНЬЮ КРОНА

Манолев А.И.*, Побегуц О.В., Кострюкова Е.С., Ларин А.К., Семашко Т.А., Бабенко В.В., Городничев Р.Б., Лисицина Е.С., Щербаков П.Л., Ильина Е.Н., Говорун В.М.

ФНКЦ Физико-химической медицины ФМБА России, Москва

*e-mail: paraslonic@gmail.com

Болезнь Крона (БК) – хроническое воспалительное заболевание желудочно-кишечного тракта – зачастую сопровождается повышенным содержанием в кишечном микробиоме бактерий вида *Escherichia coli*. Целью нашего исследования явилось выявление генов и оперонов, которые встречаются статистически значимо чаще в геномах бактерий *E. coli*, выделенных из людей с болезнью Крона, по сравнению с геномами бактерий выделенными из здоровых людей. Также мы исследовали их предположительную эволюционную историю.

Мы провели сравнительный генетический анализ бактерий вида *E. coli* изолированных из биопсийного материала и образцов кала 10 пациентов с БК (в среднем 3 образца на пациента) с привлечением информации об уже известных геномах данного вида.

Для девяти из десяти пациентов мы наблюдали крайне высокое сходство геномов отдельных изолятов *E. coli* изолированных из одного пациента (менее чем 200 однонуклеотидных замен на геном). Это свидетельствует в пользу предположения, что в микрофлоре людей, как правило, есть один доминирующий штамм *E. coli*.

Филогенетический анализ не выявил кластеризации геномов штаммов, ассоциированных с болезнью Крона. На основе построенных групп гомологий было проведено сравне-

ние представленности генов в штаммах, изолированных из людей с БК, и здоровых людей. Было определено 167 генов с повышенной представленностью в группе штаммов, ассоциированных с БК. Было выявлено статистически значимое различие в представленности ряда оперонов: утилизации пропандиола, галактитола, захвата железа, генов инвазии.

Система утилизации пропандиола в виде *rdu* оперона, а не отдельных ферментов, редко встречается в геномах *E. coli*. Так, из 83 исследованных геномов данный оперон был обнаружен лишь в 11 из них. При этом, он присутствует у филогенетически очень отдаленных штаммов *E. coli*, включая один штамм, имеющий лишь 95% нуклеотидное сходство с другими штаммами (что сопоставимо со сходством к другим видам). Ранее, данный оперон был описан в геномах бактерий *Klebsiella pneumoniae* и высказывалось предположение, что наличие оперона у *E. coli* есть следствие горизонтального переноса. В то же время анализ генного окружения данного оперона при помощи разработанного нами метода и анализ расстояний между нуклеотидными последовательностями позволяет предположить вероятное вертикальное наследования и частую потерю генов данного оперона у *E. coli*.

Работа поддержана грантом РНФ 16-15-00258 «*E. coli* как мишень терапии при болезни Крона».

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПАТОГЕНОВ КАРТОФЕЛЯ

Мирошников К.А.^{1,2*}, Кабанова А.П.^{1,2}, Во Тхи Нгок Ха², Баранник А.П.¹, Мирошников К.К.^{2,3}, Самаров Н.И.⁴, Шнейдер М.М.¹, Тошаков С.В.⁴, Игнатов А.Н.²

1 Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

2 ООО Исследовательский центр «ФитоИнженерия» Московская обл. с. Рогачёво

3 Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Москва

4 Балтийский Федеральный Университет им. И. Канта, Калининград

*e-mail: kmi@ibch.ru

Пектолитические фитопатогенные энтеробактерии (*Pectobacterium* spp. и *Dickeya* spp.) – причина значительных потерь при выращивании и хранении картофеля. В ходе представляемого исследования коллекция из 165 изолятов пектолитических бактерий была генетически систематизирована (RAPD и AFLP-профилирование. MLST-анализ, 16S рРНК и полногеномное секвенирование). По результатам физиологических, биохимических и генетических характеристик выделены 17 штаммовых групп. 10 групп представлены штаммами *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, 2 группы *Pectobacterium atrosepticum*, 1 группа *Pectobacterium wasabiae*, 1 группа – *Pectobacterium carotovorum* sbsp. (без точного определения подвида), 1 группа – *Dickeya solani*, 2 группы – *Dickeya dianthicola* и *Dickeya* spp. В целом, такое распределение патогенов коррелирует с фитопатологической картиной, наблюдаемой для бактериозов картофеля в странах с умеренным климатом [1–3], с некоторыми флуктуациями по встречаемости *Pectobacterium atrosep-*

ticum и достаточно высокой долей *Dickeya* spp. в качестве возбудителей мягкой гнили и черной ножки. Интересным наблюдением является специфическая активность известных бактериофагов *Pectobacterium* и *Dickeya* по отношению к конкретной штаммовой группе микроорганизмов, что предполагает первичное рецепторное взаимодействие фага с поверхностным полисахаридом бактериальной клетки. Обнаруженные закономерности позволяют мониторинг распространения патогенов картофеля, оценку методов молекулярной диагностики, и рациональный подбор бактериофагов для профилактики развития бактериозов

Исследование поддержано грантом РНФ №16-16-00073

1. S.H. De Boer et al. *Pectobacterium* spp. associated with bacterial stem rot syndrome of potato in Canada (2012) *Phytopathology*, **102**: 937–947.
2. M.Pasanen et al. Characterisation of *Pectobacterium wasabiae* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* isolates from diseased potato plants in Finland (2013) *Ann. Appl. Biol.*, **163**: 403–419.
3. А.Н. Игнатов et al. Распространение возбудителей бактериозов картофеля в РФ (2014) *Картофель и овощи*, **6**: 28–30

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОМОВ АКТУАЛЬНЫХ ШТАММОВ ПАТОГЕНОВ КАРТОФЕЛЯ ПЕСТОВАСТЕРИУМ И ДИКЕЮА

Мирошников К.К.^{1,2*}, Кабанова А.П.^{1,3}, Баранник А.П.³, Самаров Н.И.⁴, Корженков А.А.⁴, Шнейдер М.М.³, Тошаков С.В.⁴, Игнатов А.Н.¹, Мирошников К.А.^{1,3}

1 ООО Исследовательский центр «ФитоИнженерия» Московская обл. с. Рогачёво

2 Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Москва

3 Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

4 Балтийский Федеральный Университет им. И. Канта, Калининград

*e-mail: infon18@gmail.com

Исследование коллекции изолятов пектолитических фитопатогенных энтеробактерий (*Pectobacterium* spp. и *Dickeya* spp.), патогенных картофеля биохимическими методами и генотипированием позволило выделить 17 штаммовых групп. Для типовых наиболее вирулентных представителей девяти групп, относящихся к видам *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium wasabiae* и *Dickeya solani*, были подготовлены геномные библиотеки и проведено полногеномное секвенирование с помощью Illumina MiSeq. Сборки геномов, полученные с помощью SeqPrep, CLC Genomics Workbench и SPAdes 3.8.0, аннотировали с помощью сервера RAST и ПО PROKKA.

Известно, что фитопатогенные пектобактерии, особенно подвид *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* отличаются высокой генетической изменчивостью, для оценки различий, определяющих вирулентность, при-

способляемость к климатическим условиям и растениям-хозяевам, был проведен направленный биоинформатический анализ генов, ассоциированных с патогенезом. Особое внимание уделяли системам секреции, регуляции подвижности, формирования биопленок; геномам предсказанных профагов, каскадам синтеза аэробактина, сидерофоров и поверхностных полисахаридов, детерминант вирулентности, ферментов, ответственных за деградацию растительной ткани. Полученные данные представляются важными для оценки генетического разнообразия бактерий родов *Pectobacterium* и *Dickeya*, циркуляции определенных штаммовых групп на территории России, а также систематизации различий, определяющих вирулентность, приспособляемость к климатическим условиям, растениям-хозяевам и бактериальным вирусам.

Исследование поддержано грантом РНФ №16-16-00073

ВНУТРИВИДОВОЙ СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ХРОМОСОМ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ ЛЮЦЕРНЫ *SINORHIZOBIUM SPP.*

Мунтян В.С.*, Черкасова М.Е., Румянцева М.Л.

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, г. Санкт-Петербург, гор. Пушкин 8

*e-mail: vucovar@yandex.ru

Геномные характеристики прокариот могут претерпевать существенные изменения в ряду поколений в зависимости от условий окружающей среды. С целью выявления причин изменчивости размера геномов был проведен поиск нуклеотидных последовательностей, которые могут являться потенциальными сайтами гомологической рекомбинации у штаммов 5 штаммов клубеньковых бактерий люцерны видов *Sinorhizobium meliloti* и *S. medicae*, выделенных из клубеньков растений, собранных в географически различных регионах (Германия, Италия, Франция, Казахстан, Австралия). В работе были применены следующие методы: сравнительная геномная гибридизация (CGH) общей ДНК с биочипами SM6kOligo, сконструированными на основе полногеномных данных референсного штамма *S. meliloti* Rm1021, полногеномное секвенирование и сравнение нуклеотидных последовательностей, а также биоинформатические методы и on-line ресурсы (Islander, Rhizogate, Emma, Rast, Artemis).

Установлено, что размеры хромосом указанных штаммов

варьировали от 3.65 до 3.91 млн.п.н., при том, что гибридное сходство хромосом штаммов с хромосомой референсного штамма достигало 96.0-99.3% (по данным CGH). Показано, что рибосомальные опероны клубеньковых бактерий люцерны локализованы в консервативных областях хромосом штаммов. Выявлено, что не детектируемые гены достоверно чаще локализованы в геномных островах ризобий, на которые также приходится основная разница в размере и структуре хромосом штаммов. Всего выявлено не менее 12 типов структурных точек возможного встраивания островов. Таким образом, в хромосомах клубеньковых бактерий люцерны локализованы горячие точки рекомбинации и маркеры консервативных областей, что можно использовать для мониторинга изменений внутривидовой структурной организации геномов хозяйственно-значимых бактерий.

Работа поддержана грантами РФФИ 17-04-02011, 15-04-09295, РФФИ 17-16-01095

АНАЛИЗ ГЕНА G23 T4-ПОДОБНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ В ОЗЕРЕ БАЙКАЛ МЕТОДОМ NGS

Потапов С.А.^{1*}, Краснопеов А.Ю.¹, Гладких А.С.², Тупикин А.Е.³, Кабилов М.Р.³, Белых О.И.¹, Бутина Т.В.¹

¹ Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск

² ФКУЗ Иркутский НИПЧИ, Иркутск

³ Институт Химической Биологии и Фундаментальной Медицины СО РАН, Новосибирск

*e-mail: poet1988@list.ru

Бактериофаги (вирусы бактерий) влияют на генетическое разнообразие и контролируют численность бактерий и цианобактерий, в значительной мере определяя биоразнообразие, структуру, продуктивность и функционирование водных экосистем.

Цель работы – выявить разнообразие T4-бактериофагов в пелагиали оз. Байкал на основе анализа фрагмента гена основного капсидного белка gp23, используя метод NGS.

Пробы воды отобраны в августе 2013 года в озере Байкал. Обработку материала и амплификацию фрагментов гена *g23* проводили, как описано ранее [1]. Секвенирование осуществляли на платформе MiSeq (Illumina) в ЦКП “Геномика” СО РАН (ИХБФМ СО РАН). Для анализа полученных нуклеотидных последовательностей применяли программы QIIME, CD-HIT, BLAST, MrBayes и UniFrac.

В результате работы получена 33701 последовательность фрагмента *g23*, определена 141 ОТЕ. Наибольшее сходство репрезентативных последовательностей выявлено с генами *g23* из оз. Бурже и Анси (Франция) [2]. В ре-

зультате филогенетического анализа выявлено большое разнообразие T4-подобных бактериофагов, анализ бета-разнообразия показал их отличие от сообществ бактериофагов других экосистем.

Таким образом, впервые проведено исследование структуры сообщества T4-подобных бактериофагов в планктоне оз. Байкал на основе NGS-секвенирования гена основного капсидного белка gp23. Проведенный анализ показал эффективность данного подхода. В дальнейшем планируется продолжить исследование T4-бактериофагов в разных котловинах и в литоральной зоне оз. Байкал для оценки наиболее полного разнообразия этой группы вирусов и их роли в экосистеме озера.

Работа поддержана грантом РФФИ 16-54-44035 Монг_а.

1. Butina TV. et al. (2010) Phylogenetic diversity of T4-like bacteriophages in Lake Baikal, East Siberia, FEMS Microbiol. Lett. V. 309. № 2. P. 122–129.
2. Zhong X., Jacquet S. (2014) Differing assemblage composition and dynamics in T4-like myophages of two neighbouring sub-alpine lakes, Freshw. Biol. V. 59. № 8. P. 1577–1595.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНОМА БАКТЕРИАЛЬНОГО ШТАММА-СИМБИОНТА ЭВГЛЕНЫ ЗЕЛЁНОЙ *PAENIBACILLUS* SP.

Руденская Ю.А.¹, Герасимов Е.С.¹, Флегонтов П.Н.², Логачёва М.Д.³, Щелкунов М.И.^{3,4}, Штратникова В.Ю.³, Колесников А.А.¹

¹ МГУ имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Российская Федерация

² *Biologické centrum AV ČR, Parazitologický ústav, České Budějovice, Чехия*

³ МГУ имени М.В. Ломоносова, Институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Москва, Российская Федерация

⁴ Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, Москва, Российская Федерация
*e-mail: vtosha@yandex.ru

В результате электронно-микроскопического исследования *Euglena gracilis* были выявлены бактерии неизвестного вида, предположительно симбиотические. С целью исследования их роли в жизненном цикле *Euglena gracilis* был выделен в чистую культуру бактериальный штамм и проведено черновое секвенирование его генома. Для этого была проведена пробоподготовка стандартных библиотек по протоколам для платформы Illumina: парноконцевые чтения с длиной вставки 300–400 п.н., а также две библиотеки «mate-pair» со вставкой 3–4 тыс. п.н. и 6–8 тыс. п.н. Секвенирование проводилось на приборе HiSeq2000 (Illumina). Для сборки использовали все три типа библиотек. Сборка контигов осуществлялась с помощью ряда сборщиков: SPAdes, Velvet, CLC, Newbler.

Филогенетические данные по рибосомальной РНК позволили отнести бактерию к роду *Paenibacillus*.

Несмотря на данные высокого качества и очень большое покрытие (несколько сот тысяч), самый длинный контиг из всех вариантов сборок не превышал 972 тыс. п.н. при общей длине генома 5,6 млн. п.н. Ручной анализ показал, что сложность сборки вызвана присутствием 1) нескольких копий 23S RNA, организованных в тандемные повторы, общая длина которых превышает длину вставки имеющихся библиотек ДНК, 2) ряда участков с очень высоким содержанием ГЦ-пар, которые плохо секвенируются технологией Illumina. В настоящее время проводится финализация генома с применением дополнительных методик.

Работа поддержана грантом РФФ №14-50-00029.

НУКЛЕОТИДНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ ЛЮЦЕРНЫ

Саксаганская А.С.*¹, Мунтян В.С.¹, Румянцова М.Л.¹

¹ ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург

*e-mail: allasaksaganskaya@mail.ru

В данной работе проведен анализ уровня внутривидового нуклеотидного разнообразия генов вирулентности *nodA*, *nodB*, *nodC* и *nodH*, детерминирующих синтез видоспецифичной сигнальной молекулы Nod-фактора у клубеньковых бактерий люцерны *Sinorhizobium meliloti*.

Секвенирование генов было выполнено с помощью автоматического секвенатора SEQTM8000 фирмы Beckman Coulter (USA). Нуклеотидное разнообразие оценивали с помощью программы DnaSP. Значения dN/dS (соотношение несинонимичных замен к синонимичным) вычисляли в программе MEGA 5.04.

В результате *in silico* анализа 112 нуклеотидных последовательностей *nod* генов наибольший уровень нуклеотидного разнообразия показан для генов *nodC* и *nodB*, детерминирующих, соответственно, синтез Nod-фактора определенной длины и деацетилирование нередуцирующего конца молекулы ($P_i=0.02680$ и 0.02770). Более низкий уровень разнообразия выявлен для генов *nodA* и *nodH*, от-

ветственных за видоспецифичное декорирование сигнальной молекулы (значения P_i составили 0.01672 и 0.01066, соответственно). Согласно вычисленным значениям dN/dS, ген *nodC* вероятно находится под влиянием положительного эволюционного давления (dN/dS=1.93), что может быть обусловлено влиянием растения-хозяина.

Таким образом, в результате анализа внутривидового нуклеотидного разнообразия генов вирулентности выявлен высокий уровень полиморфизма генов, ответственных за синтез сигнальной молекулы клубеньковых бактерий люцерны *S. meliloti*. Можно предположить, что в случае гена *nodC*, детерминирующего синтез олигосахаридного остова сигнальной молекулы, происходит отбор определенных аллелей, обуславливающих наиболее успешное симбиотическое взаимодействие с растениями-хозяевами.

Работа была поддержана грантами РФФИ 15-04-09295а и 17-04-02011а.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МОДИФИКАЦИЙ ДНК *M. GALLISEPTICUM* МЕТОДОМ SMRT СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Семашко Т.А.*, Арзамасов А.А., Гаранина И.А., Фисунов Г.Ю., Говорун В.М.

ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

*e-mail: t.semashko@gmail.com

Mycoplasma gallisepticum – бактерия, принадлежащая к классу Mollicutes, не имеющая клеточной стенки и характеризующаяся малым размером генома. Поэтому она является удобным модельным объектом для системного исследования минимальной клетки. Из аннотированных систем для модификации ДНК в исследуемом нами штамме S6 присутствуют 2 системы рестрикции-модификации (СРМ), которые обе метилируют N6-атом азота аденина (m6A).

Ранее для высокопроизводительной детекции модификаций ДНК широко использовался метод бисульфитного секвенирования, способный детектировать метилирование цитозина по 5 положению (m5C). В настоящее время для высокопроизводительной детекции ряда модификаций ДНК, включающих и m6A, и m5C, набирает популярность SMRT (single-molecule real-time) секвенирование.

С помощью SMRT секвенирования геномной ДНК *M. gallisepticum* дикого типа и ее нокаутного мутанта по субъединице (*hsdS*), узнающей последовательность сайта модификации одной из СРМ было определено, что у

M. gallisepticum S6 активна только одна СРМ I типа, кодируемая генами метилтрансферазы GCW_02355, *hsdS* GCW_02360 и рестриктазы GCW_02365. Эта СРМ не имеет близких гомологов ни всего оперона, ни *hsdS* среди известных СРМ. Был определен её мотив метилирования ANCNNNNCCT (метилирование происходит по обоим аденинам по краям двуцепочечного мотива в прямой и комплементарной цепях), также являющийся уникальным.

Максимальная плотность сайтов метилирования встречается в геноме *M. gallisepticum* в генах некоторых адгезинов и белков ухода от иммунного ответа, в то время как транспозазы и мобильные элементы обычно расположены в неметилированных регионах. Также, сайты метилирования практически не встречаются в промоторах генов. Почти все сайты метилирования модифицированы практически полностью. 3% сайтов полуметилированы, причем метилирование отсутствует в цепи AGGNNNGNT.

Работа поддержана грантом РФФ 14-24-00159
«Системное исследование минимальной клетки на модели *Mycoplasma gallisepticum*».

ВИРУС ГРИППА ПТИЦ, ВЫДЕЛЕННЫЙ ОТ КАСПИЙСКИХ ТЮЛЕНЕЙ (PHOSA CASPICA).

Соболев И.А.^{1*}, Гуляева М.А.¹, Шаршов К.А.¹, Курская О.Г.¹, Щелканов М.Ю.², Алексеев А.Ю.¹, Шестопалов А.М.¹¹ НИИ экспериментальной и клинической медицины, Новосибирск² Дальневосточный федеральный университет, Владивосток.*e-mail: sobolev_i@hotmail.com

Каспийское море расположено в районе пересечения нескольких путей миграции птиц, что обуславливает возможность их контакта с эндемичными млекопитающими и может способствовать межвидовой передаче различных патогенов, в том числе и вируса гриппа. В международных базах данных для большинства штаммов вируса гриппа А, выделенных от тюленей (всего 81 штамм), доступны только частичные последовательности гена НА, а не всех 8 сегментов генома. Кроме того, отсутствует информация о геномах вирусов гриппа А, выделенных от тюленей на территории РФ в целом и в акватории Каспийского моря в частности. Целью этого исследования была оценка возможности межвидовой трансмиссии вируса гриппа от перелетных птиц к водным млекопитающим Каспийского моря, а также изучение генетического разнообразия и филогенетических связей обнаруженных штаммов вируса гриппа на основе сиквенсов всех сегментов генома.

С интервалом в 10 лет (2002 г., 2012 г.) в двух образцах биологического материала от тюленей на побережье Каспийского моря был обнаружен вирус гриппа А [1]. Выделение штаммов *A/Caspian seal/Russia/1884/2002* и

A/Caspian seal/Russia/T1/2012 было выполнено на развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ). Полногеномное секвенирование было выполнено на геномном секвенаторе MiSeq (Illumina) в НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского. Филогенетический анализ был осуществлен с использованием последовательностей из баз данных GISAID, GenBank и IRD.

В результате выполненной работы впервые показано присутствие в популяции тюленей вируса гриппа А/Н4N6. При этом выделенные с интервалом в 10 лет штаммы характеризуются значительным сходством геномов (99-100% в зависимости от сегмента) и филогенетически близкородственны штаммам вируса гриппа птиц, циркулирующим в популяциях диких перелетных птиц на территории Евразии.

Работа выполнена при поддержке гранта
РФФИ 17-04-01919 А

1) Алексеев А.Ю. и др. (2015). Выделение гриппа типа А субтипа Н4N6 у каспийских тюленей (*Phoca caspica*). Материалы VIII международной конференции «Морские млекопитающие Голарктики».

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ С РЕДКОЙ НА ТЕРРИТОРИИ РФ КОМБИНАЦИЕЙ ПОВЕРХНОСТНЫХ ГЛИКОПРОТЕИНОВ (СУБТИП H6N8).

Соболев И.А.¹, Шаршов К.А.¹, Курская О.Г.¹, Фадеев А.В.², Егорова А.А.², Котенко А.В.², Комиссаров А.В.², Васин А.В.², Юрлов А.К.³, Алексеев А.Ю.¹, Шестопалов А.М.¹

1 НИИ экспериментальной и клинической медицины, Новосибирск

2 ФГБУ НИИ гриппа Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург

3 Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск.

*e-mail: sobolev_i@hotmail.com

Изучение вируса гриппа А (ВГА) в популяциях диких птиц в местах пересечения миграционных путей позволяет получить представление о современном генетическом разнообразии вирусов, оценить вероятные эволюционные тенденции, а также изучить биологические свойства вновь возникающих вариантов и их опасность.

В рамках многолетнего изучения циркуляции ВГА среди диких перелетных птиц водно-болотной группы на территории озерной системы Чаны [1-2] от серой утки (*Anas strepera*) был выделен штамм *A/gadwall/Chany/97/2016* субтипа H6N8. Изоляция вируса была осуществлена на развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ). Полногеномное секвенирование выполнено на геномном секвенаторе Illumina MiSeq на базе ФГБУ НИИ гриппа (Санкт-Петербург).

Ранее ВГА субтипа H6N8 на территории РФ не обнаруживался (всего в мире от птиц выделен 261 штамм с такой комбинацией поверхностных гликопротеинов). По 7 сегментам генома (PB2, PB1, PA, NP, NA, M и NS) штамм

A/gadwall/Chany/97/2016 филогенетически близок к штаммам различных субтипов (H1N1, H5N3, H3N8), изолированным на озере Чаны (что указывает на реассортацию ВГА в популяциях птиц диких биоценозов). По сегменту НА (кодирует гемагглютинин) этот штамм схож со штаммами субтипа H6N2, выделенными в 2015 г. Китае. Аминокислотная последовательность сайта расщепления гемагглютинина (PQIETR/GLF) характерна для типичных низкопатогенных вариантов ВГА. Вероятно, миграция птиц с территории Китая, обусловила занос ВГА с НА субтипа H6 на территорию РФ, который в результате реассортации привел к появлению редкого для РФ варианта вируса.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №16-34-00306\16_мол.

1) M.A. De Marco et al. (2014) Virological Evaluation of Avian Influenza Virus Persistence in Natural and Anthropogenic Ecosystems of Western Siberia (Novosibirsk Region, Summer 2012). PLoS One. 9(6).

2) К.А. Шаршов и др. (2016). Экологическое разнообразие диких птиц - естественного резервуара вируса гриппа А на юге западной Сибири. Юг России: экология, развитие. №4(41): 56-65.

ВЫДЕЛЕНИЕ НОВОГО РЕАССОРТАНТНОГО ВАРИАНТА ВИРУСА ГРИППА А/H1N1 ОТ СВИНЕЙ

Соболев И.А.^{1*}, Шаршов К.А.¹, Кабилов М.Р.², Аликина Т.Ю., Мурашкина Т.А.¹, Курская О.Г.¹, Толстых Н.А.³, Городов В.С.³, Леонов С.В.³, Алексеев А.Ю.¹, Шестопалов А.М.¹

1 НИИ экспериментальной и клинической медицины, Новосибирск

2 Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

3 Сибирский федеральный научный центр Агробиотехнологий РАН. Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока, Краснообск.

*e-mail: sobolev_i@hotmail.com

Целью работы является изучение генетического разнообразия и изменчивости вирусов гриппа, циркулирующих в локальных популяциях свиней на территории РФ.

В 2016 г. при исследовании секционного материала от свиней с частного свиноводческого хозяйства в пробах легочной ткани методом ПЦР в реальном времени был обнаружен вирус гриппа типа А. Выделение штамма было осуществлено в культуре клеток MDCK. Полногеномное секвенирование было выполнено на геномном секвенаторе MiSeq (Illumina) в ЦКП «Геномика» (ИХБФМ СО РАН). Филогенетический анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей сегментов генома штамма *A/swine/Siberia/1sw/2016* был осуществлен с использованием последовательностей геномов штаммов вируса гриппа, представленных в базах данных GISAID, GenBank и IRD.

В результате было показано, что исследованный штамм по структуре генов, кодирующих поверхностные глико-

протеины (НА и NA) значительно отличается от всех штаммов, последовательности геномов которых представлены в базах данных. Наиболее схожие (90%) последовательности НА и NA принадлежат штаммам вируса гриппа А/H1N1, выделенным от людей в США в 80-е годы. Таким образом, филогенетически штамм *A/swine/Siberia/1sw/2016* относится к субтипу H1N1, но не является пандемическим вариантом H1N1pdm09. При этом, нуклеотидные последовательности генов, кодирующих внутренние белки вируса (PB2, PB1, PA, NP, MP, NS), схожи с представленными в базах данных последовательностями генов штаммов вируса гриппа А/H1N1pdm09, изолированных от людей.

Таким образом, штамм вируса гриппа *A/swine/Siberia/1sw/2016* представляет собой ранее не обнаруженный локально циркулирующий в свиней популяции реассортантный вариант субтипа H1N1.

АНАЛИЗ ГЕНОМНОГО ОСТРОВА *SME19T SINORHIZOBIUM MELILOTI RM1021*: GC-СОСТАВ И СТАБИЛЬНОСТЬ ВНУТРЕННЕЙ СТРУКТУРЫ

Черкасова М. Е.^{*}, Мунтян В. С., Румянцева М. Л., Андронов Е. Е.

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, г. Санкт-Петербург, гор. Пушкин 8

*e-mail: mariacherkasova@mail.ru

Проведен *in silico* анализ нуклеотидной последовательности геномного острова *Sme19T*, имеющего протяженность 18,6 т.п.н. и среднее содержание ГЦ-пар – 59.1% [1]. Показано, что в острове встречаются участки с содержанием ГЦ-пар от 45% до 67.5%, а также выявлена последовательность в 6 т.п.н. с повышенным содержанием ГЦ, относительно фланкирующих участков. Установлено, что в этой области локализованы *hsdRSM*-гены, относящиеся к системе рестрикции-модификации I типа [2]. Область *hsd*-генов окружена генами транспозаз и интегразой, что позволяет отнести её к потенциальным подвижным генетическим элементам. Анализ нуклеотидных последовательностей *hsd*-генов и их межгенных последовательностей показал, что ГЦ-состав гена *hsdS* (56.8%) был существенно ниже такого у *hsdR* и *hsdM*, и сопоставим с таковым в межгенных последовательностях.

Проведён анализ распространения геномного острова *Sme19T* и *hsd*-генов, у 184 природных штаммов *S. meliloti* из Приаральского и Северо-Кавказского центров разнообразия люцерны с использованием метода ПЦР с парами оригинальных праймеров [3]. Показано, что встречаемость острова *Sme19T* не зависела от географического происхождения

штаммов, однако его структура была вариабельна. Выявлены штаммы, содержащие единичные *hsd*-гены или лишённые их, а также штаммы без острова, но с искомыми генами. В обоих генцентрах преобладали штаммы, содержавшие ген *hsdR* (эндонуклеаза), но утратившие гены *hsdS* и *hsdM*, отвечающие за защиту бактериальных сайтов рестрикции.

Полученные результаты показали, что в структуре острова *Sme19T* активно идут процессы рекомбинации, затрагивающие группы генов или отдельные гены. Выявлены «горячие точки» рекомбинации (*hsdS-hsdM* и *hsdR-hsdM*), специфичные для Приаралья и Северного-Кавказа, соответственно.

Работа поддержана грантом РФФИ 15-04-09295а.

Анализ межгенных нуклеотидных последовательностей («горячих точек» рекомбинации) выполнен при поддержке РФФИ 17-16-01095.

1. С.М. Hudson et al. (2015) Islander: a database of precisely mapped genomic islands in tRNA and tmRNA genes. *Nucleic Acids Res.* 43: D48-53.
2. L. Ferri et al. (2010) Plasmid electroporation of *Sinorhizobium* strains: The role of the restriction gene *hsdR* in type strain *Rm1021*. *Plasmid.* 63(3): 128-35.
3. В.С. Мунтян и др. (2016) Встречаемость островов в геномах природных штаммов *Sinorhizobium meliloti*. *Генетика.* 52(8): 1-8.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСА ГРИППА Н11-СУБТИПА В АЗИАТСКО-ТИХООКЕАНСКОМ РЕГИОНЕ

Шаршов К.А.¹, Соболев И.А.¹, Кабилов М.Р.², Аликина Т.Ю.², Мурашкина Т.А.¹, Курская О.Г.¹, Алексеев А.Ю.¹, Saito Takehiko³, Щелканов М.Ю.⁴, Шестопапов А.М.¹

1 НИИ экспериментальной и клинической медицины, Новосибирск

2 Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

3 National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba, Japan

4 Дальневосточный Федеральный университет, Владивосток

*e-mail: sharshov@yandex.ru

В настоящее время продолжается оценка опасности новых вариантов вируса гриппа А (ВГА), в том числе редкого Н11-субтипа. Обнаружено, что вирусы Н11 субтипа распространены очень широко и встречаются даже у пингвинов Адели (*Pygoscelis adeliae*) в Антарктиде [1]. В настоящее время успешно применяется метод секвенирования нового поколения для получения полногеномных последовательностей вируса гриппа и детального молекулярно-биологического и филогенетического анализа. Целью исследования явилось исследование генетического разнообразия и поиск реассортантных вирусов Н11-субтипа в Азиатско-Тихоокеанском регионе. Секвенирование полных геномов собственных штаммов вируса гриппа Н11Nx проводили с использованием MiSeq (Illumina) в ЦКП «Геномика» (ИХБФМ СО РАН). Для анализа использовали последовательности, доступные в базах GeneBank и GISAID.

В результате исследования обнаружено большое разнообразие вирусов гриппа Н11N9 и Н11N8 субтипов у диких птиц на территории Азиатско-Тихоокеанского региона в течение последних 10 лет [2]. Выделены оригинальные Североамериканские и Евразийские клады и субклады для сегментов генома ВГА Н11-субтипа, циркулирующих среди диких птиц Азиатско-Тихоокеанского региона. Показана циркуляция вариантов ВГА с множественной реассортацией геномов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №16-34-00306\16_мол.

1. A.C. Hurt et al. (2016). Evidence for the Introduction, Reassortment, and Persistence of Diverse Influenza A Viruses in Antarctica, *J Virol.* 90(21): 9674-9682.
2. С.Г. Сайфутдинова с соавт. (2012). Экология вируса гриппа у чаек Дальнего Востока России, *Бюллетень Восточно-Сибирского Научного Центра СО РАН*, 5(87), часть 1: 316-318.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ПОЛНОГО ГЕНОМА НЕФТЕРАЗЛАГАЮЩЕГО ШТАММА *THALASSOLITUUS OLEIVORANS* K-188

Штратникова В.Ю.¹, Белалов И.Ш.², Касьянов А.С.³, Щелкунов М.И.^{1,4}, Логачёва М.Д.¹, Новиков А.Д.⁵, Шаталов А.А.⁵, Герасимова Т.В.⁵, Яненко А.С.⁵, Макеев В.Ю.^{3,5,6}

1 Институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, МГУ, Москва

2 Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва

3 Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва

4 Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, Москва

5 ФГБУ Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

6 Московский физико-технический институт (государственный университет), Московская область, г. Долгопрудный

*e-mail: vtosha@yandex.ru

Гаммапротеобактерия *Thalassolituus oleivorans* способна при низких температурах в полярных водах производить биосурфактанты, которые эмульсифицируют нефть и алканы. Мы отсеквенировали и собрали полный геном штамма K-188 (ВКПМ В-9394), отобранного в водах Баренцева моря. Секвенирование было проведено с помощью HiSeq2000 (Illumina) на основе стандартных геномных библиотек и библиотек с увеличенной длиной вставки (mate-pair). Геномные контиги собраны с помощью сборщика SPAdes. Завершение генома проводилось вручную в программе BioEdit, на основании итеративного картирования mate-pair чтений в программном комплексе CLC. Затем проводилась проверка на отсутствие статистически значимых отклонений по размеру вставки. Штамм срав-

нили с уже известными геномами штаммов *Thalassolituus oleivorans* R6-15, отобранного в водах Чукотского моря, и *Thalassolituus oleivorans* MIL-1, отобранного в водах Средиземного моря. Штаммы MIL-1 и K-188 филогенетически ближе друг к другу, чем к R6-15. Гены деградации алканов во всех штаммах полностью совпадают. Различается состав генов хемотаксиса. Анализ аминокислотного состава показал несколько повышенное содержание аланина, изолейцина, аспартата и цистеина в штамме Средиземного моря. Штаммы холодных вод содержали больше метионина, пролина, фенилаланина, триптофана, аспарагина, гистидина и лизина.

Работа поддержана грантом РФФ №14-50-00029.

PECULIARITIES OF GRAM-NEGATIVE AND GRAM-POSITIVE BACTERIA ADAPTATION TO THE HOST ORGANISM

Voronina O.L., **Aksenova E.I.***, Kunda M.S., Semenov A.N., Bondareva N.E., Sharapova N.E., Ryzhova N.N., Zigangirova N.A. N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health, Russia, Moscow

*e-mail: eaksenova@list.ru

Gram-positive bacteria *Listeria monocytogenes* and gram-negative *Chlamydia psittaci* are wide spread in the nature. *L. monocytogenes* is general associated with foodborne infection and *C. psittaci* – with psittacosis. Sometimes both bacteria are the reason of other infections: *L. monocytogenes* – stillbirth and *C. psittaci* – reactive arthritis. Analysis of the bacteria adaptation to the new ecological niche and new host was the goal of our investigation.

Far East Region *L. monocytogenes* (L.mon) isolates VIMVR081 (*Myodes rufocanus*, ST (sequence type) 145) and VIMHA007 (stillborn, ST2) were sequenced by 454 Roche technology. Human synovial *C. psittaci* (C.psi) isolates 25SM (1964, USA), AP-23 and CP-1 (1971, RSFSR) – all ST24 – were sequenced by Illumina platform. Data were assembled and analyzed by specialize programs.

The strains of the both taxa were very conservative. We compared analyzed strains with the most similar GenBank genomes. L.mon ATCC 19117 (FR733643, sheep, ST2) and J1-220 (NC_021830, human, ST2) had the same internalin profile

as the Far Eastern isolates. All strains had common phage, but the clinical isolates differed by especial phages. C.psi strains lacking the phages have two main zones for modification: plasticity zone (PZ) and polymorphic membrane proteins (Pmp). Synovial strains had equal PZ and Pmp and differed only by late-stage protein LtuB. The most similar GenBank C.psi genomes were 6BC (parrot, NC_015470), 02DC15 (cattle, CP002806.1), 01DC11 (pig, CP002805.1) – all ST24. Synovial, cattle', pig's strains had equal PZ and Pmp profiles, identified by PubMLST server. Parrot's and synovial strains differed by OmpA, some position in Pmp profile and adhesin in PZ. Comparison of additional Pmp demonstrated 2 changes in pig's and 5 in cattle' strains vs synovial one. Proteins with radical substitution vs synovial strain belonged to distinct metabolic pathways in pig's and cattle strains.

So bacterial pathogenic strains pass step by step evolution starting from birds then through mammalian to human. Gram-positive and gram-negative small genomes used different adaptation pathways for fine tuning to the host.

WGS AS A SOURCE OF NEW EPIDEMIOLOGY AND PATHOGENICITY EVIDENCE FOR RUSSIAN EPIDEMIC STRAIN *ACHROMOBACTER RUHLANDII* ST36.

Voronina O.L., Kunda M.S., Sharapova N.E., Aksenova E.I.*¹, Semenov A.N., Ryzhova N.N., Gintsburg A.L.

N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health, Russia, Moscow

*e-mail: eaksenova@list.ru

Achromobacter spp. has been known as nosocomial infection since 1980s, but still is considered as emerging pathogen because of the complexity of taxonomy history and the problems of microbiological identification. However analyzing Burkholderiales bacteria in respiratory tract specimens of cystic fibrosis (CF) patients we detected *Achromobacter spp.* in about 21% of often hospitalized patients. *A. ruhlandii* was the most abundant in this group, especially sequence type (ST) 36. Transmissibility of this genotype strain, dangerous for lung function, impossibility of chronic infection eradication was the reason to name *A. ruhlandii* ST36 “Russian epidemic strain”. Whole genome sequence of this strain and analyzing the pathogenicity determinant was the goal of our investigation.

A. ruhlandii SCCH3:Ach33-1365 (Aruh_ST36) genome was sequenced by 454 Roche technology, assembled and analyzed by specialize programs. GenBank NCBI and PubMLST data were used for comparative and epidemiological analysis.

Aruh_ST36 genome was deposited in GenBank (CP017433) and now among 103 *Achromobacter* genomes

there are 5 *A. ruhlandii* in this database. One Brazilian CF patient’s strain (LVKN01) is ST36. All *Achromobacter* genomes comparison demonstrated Aruh_ST36 and *A. xylosoxidans* MN001 (CP012046.1) similarity. Analysis by PubMLST site program suggested identification MN001 strain isolated from CF patient in USA as *A. ruhlandii* ST36. So we can consider *A. ruhlandii* ST36 as intercontinental strain. Genome organization and prophage profile suggested Aruh_ST36 genome peculiarity. 10 beta-lactamases and components of all known efflux system families characterized natural Aruh_ST36 antibiotic resistance. Flagella, pili, biofilm formation and secretion systems were studied as pathogenicity factors. Detailed analysis of RND pumps revealed specificity in some RND transporters structure. Database of pathogenicity factors formation was the first step of new target drug elaboration.

So WGS data were useful in epidemiological analysis of Russian epidemic strain and robust study of its pathogenic potential.

METAGENOMIC ANALYSIS OF VIRAL COMMUNITIES IN LAKE BAIKAL

Butina T.V.¹, Bukin Y.S.¹, Tupikin A.E.², Kabilov M.R.², Belikov S.I.¹

¹ Limnological Institute SB RAS, Irkutsk

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

*e-mail: tvbutina@mail.ru

Viruses have a significant impact on numerous biogeochemical processes in aquatic environments and effectively regulate the abundance and diversity of bacteria and phytoplankton. Our study was aimed at elucidating diversity of viral communities in Lake Baikal through metagenomics. Metagenomic studies of freshwater environments are not numerous, viral communities of the largest and oldest freshwater lakes remain poorly studied.

Water samples were collected from littoral zone and the main pelagic sites in the southern and central basins of Lake Baikal. Samples were filtered, whereupon the virus particles were concentrated by tangential flow filtration. Isolated DNA of viral concentrates was sequenced on the platform of Illumina MiSeq in the SB RAS Genomics Core Facility (ICBFM SB RAS).

Bioinformatic analysis of resulting data set using chosen relaxed BLAST options revealed viral sequences belonged to 78 families. Considerable shares of viral reads were found

to be similar to unclassified viruses. Viral genotypes of six families (Myoviridae, Siphoviridae, Poxviridae, Mimiviridae, Podoviridae, Phycodnaviridae) dominated in water samples, amounting to more than 90% of sequences. The viral community compositions in littoral and pelagic zones and in two basins of Lake Baikal were similar; however, the percentage ratio of the families differed. In general, we identified the variety of virotypes affected a wide range of organisms, including bacteria and cyanobacteria, archaea, algae, amoebae, flagellates, fishes, amphibians, insects, and mammals.

In conclusion, our study revealed a high diversity of viral communities in Lake Baikal and demonstrated appropriateness of the chosen approach for future investigations of viruses in the lake ecosystem.

This research was performed as a part of the state program No. 0345-2014-0002 with financial support of Russian Foundation for Basic Research, projects Nos. 14-44-04158, 16-54-150007.

EVOLUTION HISTORY OF PLANT PATHOGENIC XANTHOMONAS ARBORICOLA INFECTING WIDE-RANGE OF HOST PLANTS

E.I. Kyrova¹, E. V. Kalabashkina², A.N. Ignatov^{3,4}People's Friendship University of Russia, Miklukho-Maklaya 6, Moscow,
Moscow Research Institute of Agriculture «Nemchinovka», Moscow region,
"PhytoEngineering" R&D Center, LLC, Moscow region;

Branch of M.M. Shemyakin–Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia,

*e-mail:an.ignatov@gmail.com

Plant pathogenic bacteria of genus *Xanthomonas* are known for their genetic diversity and significant harm caused for almost 400 plant species. In 2001–2008, a new group of strains of *Xanthomonas arboricola* has been found as pathogens on new host-plants such as wheat, rye, barley, tomato, sunflower, and brassicas in Russia [1]. In this study, 32 strains isolated from diseased plants in Russia, were studied by MLST analysis with 16 housekeeping gene fragments following methods described elsewhere [2]. All the studied strains had at least one MLST loci with alleles more similar to strains of other *Xanthomonas* species: *X. campestris*, *X. euvesicatoria*, and *X. oryzae*. To test the hypothesis about influence of the lateral gene transfer (LGT) on virulence of *X. arboricola* strains, we obtained the draft genome sequence of *Xanthomonas arboricola* strain 3004 isolated from barley plants, but virulent also for sunflower, brassicas, and chestnut plants [4]. Some evidence of LGT for virulence genes was found. The non-phage

sequences, detected within the prophage sequences region were identical to the virulence-associated protein E-coding genes (VirE, COG5545) from *Xylella fastidiosa* 9a5c. Diversity analysis suggested at least two independent LGT events in *X. arboricola*. Thus, we can speculate that the *virE* and other genes, obtained as a result of the LGT, may contribute to wider range of hosts-plants.

This work was supported by research grant No 14.W03.31.0003 of Russian Government.

1. A.N. Ignatov et al. (2010) *Xanthomonas arboricola* - bacterial pathogen of crops in Russia, *Plant Protection & Quarantine*, **4**:41–43;
2. A. Ignatov, et al. (2007) Genetic diversity in populations of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in cruciferous weeds in central coastal California, *Phytopathology*, **97**(7): 803–812;
4. A.N. Ignatov, et al. (2015) Draft genome sequence of *Xanthomonas arboricola* strain 3004, a causal agent of bacterial disease on barley, *Genome announcements*, **3**(1):e01572-14.

GENOME OF CLAVIBACTER MICHIGANENSIS SUBSP. MICHIGANENSIS INFECTING POTATO PLANTS

E.I. Kyrova¹, K.P. Korne², E. V. Kalabashkina³, A.N. Ignatov⁴

1 People's Friendship University of Russia, Miklukho-Maklaya 6, Moscow;

2 All-Russian Research Institute of Plant Quarantine, Moscow region;

3 Moscow Research Institute of Agriculture «Nemchinovka», Moscow region;

4 Branch of M.M. Shemyakin–Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Puschino, Russia

*e-mail:an.ignatov@gmail.com

Members of the species *Clavibacter michiganensis* (Smith 1910) are gram-positive bacteria belonging to the family Microbacteriaceae, and consist of five core subspecies. They cause specific diseases of tomato (*C. michiganensis* subsp. *michiganensis*), potato (*C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*), alfalfa (*C. michiganensis* subsp. *insidiosus*), corn (*C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*), and pepper (*C. michiganensis* subsp. *capsici*). The virulence mechanisms of subspecies of *Clavibacter michiganensis* are poorly understood. A collection of 32 strains identified as *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* by virulence, specific biochemical and molecular tests, was obtained from diseased plants of potato in the Russian Federation. The strains were still virulent to tomato plants. To investigate the determinants of pathogen virulence to novel host plant, we determined the draft genome sequence of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* strain 1272, isolated from potato. The genome of strain 1272 was sequenced using the Roche GS FLX pyrosequencing platform. Sequencing was performed using a whole-genome

strategy employing shotgun and paired-end genome libraries. Shotgun and paired-end reads were assembled into 227 contigs from 710 to 118,449 bp by GS *de novo* assembler version 2.3 (454 Life Sciences, Branford, CT, USA). The N_{50} is 26,032 bp. The total size of the assembled genome is 3,316,405 bp (GC content, 72.38%), which is a close to average of other sequenced strains of *C. michiganensis*. The annotation for the strain 1272 genome sequence was conducted using the RAST server and detected 3008 coding sequences and 48 RNAs, representing 347 subsystems, which is similar to the 2909 – 3386 coding sequences for other *C. michiganensis* strains. 113 genes were absent comparing to *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. Unique genes coded chromosome partitioning protein ParB, stage 0 sporulation protein J, three genetic mobile elements, and 25 secreted proteins. The genome information presented here will allow comparative studies with other *C. michiganensis* strains to help in understanding the molecular mechanisms behind plant-pathogen interactions.

MOLECULAR DETERMINANTS OF GYPSY MOTH (*LYMANTRIA DISPAR*) NUCLEOPOLYHEDROVIRUS VIRULENCE

Ilyinykh A.V.^{1*}, Baturina O.A.², Ilyinykh Ph.A.³, Polenogova O.V.¹, Belousova I.A.¹, Martemyanov V.V.¹, Kabilov M.R.²

¹ Institute of Systematics and Ecology of Animals SB RAS, Novosibirsk

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk

³ University of Texas Medical Branch, Department of Pathology, Galveston TX, USA

*e-mail: avilyinykh@mail.ru

This work aimed at unraveling the molecular determinants of virulence of *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus (LdMNPV) during the passaging of two different strains. Asian (LdMNPV-27/0) and North American (LdMNPV-45/0) strains were used from Institute of Systematics and Ecology of Animals SB RAS collection. Viruses were passaged at the laboratory culture of *L. dispar* free from the latent baculovirus infection. The full genomes of original strains, as well as descendent viruses obtained during four consecutive passages, were assembled *de novo* and annotated using the high-throughput MiSeq sequencing platform (Illumina) in the SB RAS Genomics Core Facility (ICBFM SB RAS). After each passage, biological activity of the viruses were evaluated by comparison of their LC₅₀ values with that of the initial viruses by probit analysis (Probit Analyze StatPlus v5 b). The biological activ-

ity of original North American strain was 2 logs higher than that of the Asian strain. Moreover, most of the virions of Asian, but not North American strain, were found to contain deletions of *vef-1* gene related to virulence (91%), and *bro-p* gene (82%). Enhancin gene *vef-2* also responsible for virulence was present in the genomes of both original strains. During the passaging, LC₅₀ value of North American strain didn't change dramatically, while reducing at more than 2 logs for the Asian strain. The LT₅₀ value of Asian strain was also declining with passages. After the second passage, the difference in biological activity of the strains became statistically insignificant. Presumably, low virulence of the original Asian strain was mediated by several other factors in addition to *vef-1* deletion. Other genome changes which could potentially affect virulence of original and passaged viruses were also identified.

GENOMIC ANALYSIS OF TWO FUCOIDAN-DEGRADING SEAWEED-ASSOCIATED FLAVOBACTERIA *FORMOSA* ALGAE KMM 3553^T AND KMM 8021

Stenkova A.M.^{1,2*}, Chernysheva N.Yu.^{1,2}, Kurilenko V.V.¹, Mikhailov V.V.¹, Silchenko A.S.¹, Kusaykin M.I.¹, Isaeva M.P.^{1,2}

¹ G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok

² Far Eastern Federal University, School of biomedicine, Vladivostok

*e-mail: stenkova@gmail.com

Many members of the *Flavobacteria* have a rich polysaccharide-degrading potential. As a rule, they have been isolated from seaweeds which are the source of a wide variety of carbohydrates such as agars, carrageenans, alginates, fucoidans, laminarins and others. Highly sulfated polysaccharides of brown algae demonstrate diverse biological activities as therapeutic agents. The most interesting ones are fucoidans with antitumor, anticoagulant, and antiviral activities [1]. Investigation of algal polysaccharides is tightly associated with the polysaccharide degrading/modifying enzymes. Genomes of some seaweed-associated *Flavobacteriaceae* encode an enormous number of carbohydrate active enzymes [2].

We sequenced and analyzed draft genomes of two fucoidan degrading strains *Formosa algae* KMM 3553^T and KMM 8021 isolated from brown algae *Fucus evanescens* collected in Kraternaya Bay, Kuril Islands. Sequencing was performed on GS Junior instrument with Roche 454 pyrosequencing shotgun technology. The reads were assembled with Newbler v3.0. Annotation was performed using NCBI PGAP on NCBI server. For precise definition of genes we used BLAST search against NCBI, dbCAN, COG and KEGG protein databases. The whole-genome comparison revealed a high level of similarity

(about 90%) between the strains KMM 3553^T and KMM 8021. We studied the common genome features and polysaccharide degrading potential in comparison with closely related *F. agariphila* KMM 3901^T and *F. haliotis* MA1. It has been found that proportion of CAZymes among the studied strains was about 5.7%. Moreover, we predicted and described a Fucoidan utilization locus (FUL) that contains genes encoding rare fucoidanases from a GH107 family. The FUL comprised genes of surface-exposed transporters, glycan-specific TonB-dependent receptors, SusD-like substrate-binding proteins, carbohydrate-active enzymes from GH29, GH95, GH107, GH43, GH117 families and sulfatases from S1-17, S1-22, S1-25, S1-15 families. Thus, the gene cluster possesses a full range of genes needed for complete degradation of sulfated fucoidans from brown algae *Fucus evanescens*.

The work was supported by the Program for Basic Research FEB RAS "Far East", project №15-I-5-014.

1. A.Cumashi et al. (2007) A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds, *Glycobiology*, **17**: 541–552.
2. T.Barbeyron et al. (2016) Habitat and taxon as driving forces of carbohydrate catabolism in marine heterotrophic bacteria: example of the model algae-associated bacterium *Zobellia galactanivorans* Dsij(T), *Environ. Microbiol.*, **18**(12): 4610–4627.

SEQUENCE ANALYSIS OF CLEAVAGE SITE REGION OF THE F-PROTEIN GENE OF NEWCASTLE DISEASE VIRUSES (NDV) ISOLATED FROM SIBERIA, RUSSIA

Yurchenko K.S.^{1*}, Kabilov M.R.², Alikina T.Y.², Glushchenko A.V.¹, Shestopalov A.M.¹¹ Research institute of experimental and clinical medicine, Novosibirsk² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*e-mail: xenia7yurchenko@gmail.com

NDV (APMV-1) has a (-)ssRNA genome of ~15 kb encoding 6 major proteins, along with F fusion protein, encoded by the F gene. It is synthesized as a F0-precursor, which is activated after cleavage by host cell proteases. The F protein takes part in fusion of virus and cell membranes. In this study, 2 wild strains of NDV isolated in 2014, including one from a gull, Tyva Republic, and one from a garganey, Novosibirsk region, have been characterized by sequence analysis in the region encoding the F gene cleavage site in positions 157-459 nt and amino acid sequences (position 53-153). Based on the amino acids and standard pathogenicity tests, NDV isolates were classified as avirulent that has the sequence 112GKQGR-L117 at the cleavage site. We describe the characterization of avirulent NDVs by sequence analysis of part of F-gene in compare with vaccine strains (LaSota, F, V4, Clone-30). This paper is useful in study of viral transfer prediction and in molecular epidemiology.

The viruses were propagated in 9-day-old embryonated chicken eggs. Viral RNAs were isolated from allantoic fluid using a GeneJET viral DNA /RNA purification kit and were treated with TURBO DNase (Thermo Fisher Scientific). DNA libraries were made by TruSeqDNASample Prep Kits version 2 (Illumina). The DNA libraries were sequenced using

the MiSeq platform in the SB RAS Genomics Core Facility. The full-length genomes were assembled de novo with CLC Genomics Workbench version 8.5 (Qiagen).

The complete genomes of NDV/Tyva/gull/14/2014 (KX352834) and NDV/Novosibirsk/garganey/27/2014 (KU662357) were sequenced and found to be 15,162 nt and 15,169 nt in length, respectively.

The total number of nucleotide differences among the wild and vaccine strains is from 8 (V4) to 21 (F) and 24 (LaSota, Clone-30). Although there were a total of 20 changes at the nucleotide level in wild isolates, only seven changes resulted in change of 5 amino acids. The divergence among wild isolates was 10.6% at nucleotide level, and 5% at amino acid level. During analysis we described a 100% aa homology of studied length of F-gene NDV/Tyva/gull/14/2014 with isolates gull/Japan/9KS-0098/2009 and red knot/US(NJ)/A101-1383/2001 that can be result of strain's transfer with migratory birds in East Asia and North America. The same homology of NDV/Novosibirsk/garganey/27/2014 with strains from Russian Far East, Eastern China, South Korea, Japan and others – also with isolates from domestic birds in 2010 that could be result of virus spread between wild and poultry birds.

УСТАНОВЛЕНИЕ ЭКЗОН-ИНТРОННОЙ СТРУКТУРЫ ГЕНА КОМПАКТНОСТИ КОЛОСА У ДИ-, ТЕТРА- И ГЕКСАПОЛИДНЫХ ПШЕНИЦ.

Конопацкая И. Д.¹, Вавилова В. Ю.^{1*}, Блинов А. Г.¹, Гончаров Н. П.¹

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

*e-mail: valeriya-vavilova@bionet.nsc.ru

За признак «компактность колоса» у различных видов пшениц отвечают гены *C*, *sc1*, *Sog*, *Sog2* [1]. Однако, нуклеотидные последовательности данных генов до сих пор не были установлены. Гены, регулирующие форму колоса других злаковых растений, были рассмотрены в качестве возможных гомологов генов компактности колоса у пшениц. Среди всех рассмотренных генов-кандидатов по фенотипическому проявлению был выбран ген *Dep1* (*DENSE AND ERECT PANICLE1*), установленный у риса и ячменя [2, 3]. Для исследования было выбрано 8 образцов видов *T. monococcum*, *T. durum*, *T. compactum*, *T. spelta* с компактной и нормальной формой колоса. Для ПЦР амплификации гена *wDep1* было подобрано несколько комбинаций пар праймеров (с перекрытием). Полученные продукты ПЦР были клонированы в плазмидный вектор p-GEM-T Easy (Promega), наработаны с универсальных плазмидных праймеров и секвенированы методом Сэнгера. Полноразмерные последовательности исследуемого гена

были собраны из фрагментов с использованием программы UGENE v 1.25.0. В настоящем исследовании, таким образом, была проанализирована экзон-интронная структура гена-кандидата *wDep1* у 8 образцов ди-, тетра- и гексаплоидных пшениц видов с компактной и нормальной формой колоса. Была установлена аллельная вариабельность последовательностей гена-кандидата *wDep1*, которая, по видимому, связана с формированием компактного колоса у изученных образцов пшениц.

Работа была поддержана грантом РФФ 16-16-10021.

1. Гончарова Н. П. Сравнительная генетика пшениц и их сородичей // 2012.
2. Huang X., Aian Q., Liu Z., Sun H., He S., Luo D., Xia G., Chu C., Li J., Fu X. Natural variation at the *DEP1* locus enhances grain yield in rice // Nature Genetics. 2009.- V. 41.- P. 494 - 497.
3. Wendt T., Holme I., Christoph Dockter C., Preuß A., William Thomas W., Druka A., Waugh R., Hansson M., Braumann I. *HvDep1* is a positive regulator of culm elongation and grain size in barley and impacts yield in an environment-dependent manner // PLOS One. 2016.- V. 11.- P. e0168924.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ У РАЗНОВОЗРАСТНЫХ РЕЦИПРОКНЫХ ПРИВИВК СОСНЫ КЕДРОВОЙ СИБИРСКОЙ

Велисевич С.Н.^{1*}, Кабилов М.Р.², Жук Е.А.¹, Васильева Г.В.¹, Тупикин А.Е.², Горошкевич С.Н.¹

¹ Институт мониторинга климатических и экологических систем СО РАН, Томск

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

*e-mail: velisevich@imces.ru

Анализ транскриптомов растений успешно используется для изучения молекулярных механизмов формирования эпигенетической реакции как одного из путей адаптации к стрессу. Возраст-специфические изменения в экспрессии генов, передающиеся из поколения в поколение (эпигенетическая память) позволяют деревьям с длинным жизненным циклом быстро адаптироваться к меняющейся среде. Цель нашего исследования - показать роль эпигенетических факторов в явлении циклофизиса - продолжительного сохранения возрастных особенностей у отделенных частей растений, и представить онтогенез дерева как сопряженную трансформацию морфологических, физиологических и эпигенетических изменений.

Для выполнения поставленной задачи в 2014 г. было создано 4 типа привоев сосны кедровой сибирской: зрелый привой на зрелом подвое, молодой привой на зрелом подвое, зрелый привой на молодом подвое, молодой привой на молодом подвое. В 2016 г. было отобрано по 3 образца хвои с каждого из этих вариантов. Из 12 образцов была выделена РНК, проведено обогащение мРНК и приготовлены ДНК-библиотеки, которые были просеквенированы со средним

покрытием 5 млн. ридов на платформе SOLID 5500xl в ЦКП «Геномика» СО РАН (ИХБФМ СО РАН). В качестве референса были использованы контиги, полученные ранее при de novo сборке транскриптома. После картирования прочтений на контиги с помощью биоинформатических подходов были выявлены дифференциально экспрессирующиеся гены для всех типов сравнения.

Первичный биоинформатический анализ выявил принципиальные различия профилей экспрессии генов между ними. Несмотря на важную роль циклофизиса, которая была выявлена в результате анализа, более значимые изменения в характере экспрессии генов привоев были вызваны изменениями физиологического статуса подвоя. Выявлены кластеры генов, отличающихся друг от друга повышенным или пониженным уровнем экспрессии. Общий анализ геномной онтологии для найденных ДЭГ по биологическим процессам и молекулярным функциям показал преобладание углеводного и аминокислотного обмена.

Работа была поддержана грантом

РФФИ № 15-04-03483-а.

СБОРКА ГЕНОМА ЛЬНА ОБЫКНОВЕННОГО ЛИНИИ STORMONT CIRRUS

Дмитриев А.А., Краснов Г.С., Большева Н.Л., Муравенко О.В., Снежкина А.В., Аюпова А.Ф., Федорова М.С., Кудрявцева А.В., Мельникова Н.В.*

ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва

*e-mail: mnv-4529264@yandex.ru

У растений льна некоторых линий и сортов, названных пластичными, при выращивании в стрессовых условиях происходят наследуемые генетические изменения [1]. Одной из наиболее исследуемых подобных линий является Stormont cirrus, геном которой был впервые секвенирован и собран нами в представленной работе.

Растения льна посевного (*Linum usitatissimum* L) линии Stormont cirrus выращивали в климатической камере в течение 6 недель. Для выделения высокомолекулярной ДНК из листьев льна использовали модифицированный СТАВ-протокол. Для подготовки библиотек из ДНК длиной более 50 тыс. нуклеотидов применяли наборы TruSeq DNA Sample Preparation и Nextera Mate Pair (Illumina, США). Длина вставки для Mate Pair библиотек составила около 7 тыс. нуклеотидов. Секвенирование библиотек выполнено на высокопроизводительном секвенаторе NextSeq500 (Illumina). Длина прочтения составила по 150 нуклеотидов с каждой стороны. В результате получено 93 млн. прочтений для TruSeq и 16 млн. прочтений для Mate Pair ДНК-библиотек. *De novo* сборка генома проводилась пакетами программ Hapsembler, SOAPdeno и MaSuRCA.

Наилучшие результаты получили при сборке с помощью MaSuRCA [2]. Совместное использование данных секвенирования стандартных и Mate Pair библиотек позволило значительно улучшить сборку генома: параметр N50 составил 118260 (скаффолды) и 57279 (контиги). При сборке геномов по данным секвенирования только TruSeq ДНК-библиотек, без использования Mate Pair библиотек, значение N50 составило лишь 7270 (контиги). Таким образом, подготовка и секвенирование Mate Pair библиотек и сборка генома различными пакетами программ позволили существенно повысить качество сборки генома льна линии Stormont cirrus. Секвенирование генома пластичной линии льна вносит вклад в понимание генетических особенностей льна обыкновенного и открывает новые возможности для разработки ДНК-маркеров.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ, грант 15-04-06198.

1. Y.Chen et al. (2005) A site-specific insertion sequence in flax genotrophs induced by environment, *The New phytologist*, **167**(1): 171-180.
2. A.V.Zimin et al. (2013) The MaSuRCA genome assembler, *Bioinformatics*, **29**(21): 2669-2677.

РАННИЕ ЭТАПЫ РАЗВИТИЯ СОЦВЕТИЯ ПШЕНИЦЫ: ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ И ФИЗИОЛОГИИ

Добровольская О.Б.^{1*}, Бадаева Е.Д.², Попова К.И.¹, Красников А.А.³, Мартинек П.⁴

1 Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

2 Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва

3 Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск

4 Агротест фито Лтд., Кромержжиз, Чешская Республика

*e-mail: oxanad@bionet.nsc.ru

Изучение генетической регуляции развития соцветия – одна из фундаментальных проблем генетики развития растений, связанная с выявлением новых генов, контролирующих развитие соцветия, их молекулярно-генетическим картированием, определением структурно-функциональной организации. Объектом исследований является мягкая пшеница *T. aestivum* L., важная сельскохозяйственная культура. Цель настоящего исследования – изучение особенностей развития соцветия и генетического контроля формирования меристем у линий пшеницы с измененной морфологией колоса: многоцветковых линий пшеницы морфотипа “flabellum”, характеризующихся развитием шести и более цветков на укороченной оси колоска. Особенности развития соцветий у линий пшеницы морфотипа «flabellum» были изучены с использованием световой и электронной сканирующей микроскопии. Обнаружено, что формирование многоцветкового колоска “flabellum” связано с полным развитием цветков, расположенных в дистальных частях оси колоска, что приводит к формированию колоска с увеличенным числом зерновок. Проведено молекулярно-генетическое картирование с

использованием высокопроизводительного генотипирования (SNP-микрочип, содержащий 15000 SNP-маркеров пшеницы) признака “flabellum”, ряда количественных признаков, непосредственно связанных с продуктивностью колоса и урожайностью, а также морфологических признаков колоса, таких, как тетраостость и булавовидная форма колоса. В результате идентифицированы QTL, контролирующие признак “flabellum”, на картах хромосом 2AS и 5AL, 4D. Впервые детально изучены особенности развития и наследования признака “тетраостость” у мягкой пшеницы, ген, контролирующий развитие четырех остей, картирован в длинном плече хромосомы 5A. Полученные на настоящем этапе результаты служат необходимой основой для дальнейших исследований по изучению структуры и функций генов, контролирующих развитие и архитектуру соцветия пшеницы, в том числе формирование колоса пшеницы с высокой озаренностью колосков.

Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта ИЦиГ СО РАН № 0324-2016-0001 и гранта РФФИ № 15-04-05371a

ВОЗНИКНОВЕНИЕ АССИМЕТРИИ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ НА РАННИХ СТАДИЯХ ЭВОЛЮЦИИ ГЕНОМОВ ПОЛИПЛОИДОВ НА ПРИМЕРЕ ГЕНОМА АЛЛОТЕТРАПЛОИДА *CAPSELLA BURSA-PASTORIS*

Касьянов А.С.^{1,2,3*}, Клепикова А.В.^{1,3}, Кулаковский И.В.², Герасимов Е.С.^{1,3}, Федотова А.В.¹, Беседина Е.Г.¹, Кондрашов А.С.¹, Логачева М.Д.^{1,3}, Пенин А.А.^{1,3}

1 МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

2 Институт общей генетики РАН им. Вавилова, Москва

3 Институт проблем передачи информации РАН им. Харкевича, Москва

*e-mail: artem.kasianov@gmail.com

Полиплоидизация с последующей суб- и неофункционализацией являются основными механизмами эволюции геномов растений. Пастушья сумка (*Capsella bursa-pastoris*) является недавним аллотетраплоидом и входит в пятерку наиболее распространенных видов цветковых растений, в отличие от родительских видов, имеющих небольшие ареалы. Близость этого вида к центральному объекту генетики растений – *Arabidopsis thaliana* – делает ее идеальным кандидатом на роль модельного организма для изучения большинства аспектов, связанных с полиплоидией. Однако такие исследования были существенно затруднены из-за отсутствия референсного генома. Нами была получена сборка генома на основе данных высокопроизводительного секвенирования и верифицирована с использованием генетической карты. Высокая плотность маркеров генетической карты (1 маркер/ 4 кб) позволила избежать возможных слияний участков субгеномов. Финальный N50 составил около 650 КБ. Такое качество сборки позволяет проводить корректное сопоставление паралогичных

участков генома. Наряду с последовательностью генома была создана карта экспрессии генов (<http://travadb.org/browse/Species=Cbp>). Анализ этих данных позволил идентифицировать набор гомеологичных пар с дискордантной экспрессией. Сравнение промоторов таких пар генов показало, что они отличаются по набору сайтов связывания транскрипционных факторов (ТФ), в отличие от тех генов, экспрессия которых симметрична, причем эти отличия не обнаружены у предковых видов. Среди ТФ, регуляторные элементы которых несимметрично представлены, обнаружены участвующие в контроле развития с помощью света (PIF3, HY5) и ответа на холодостресс (CBF). Мы предполагаем, что одним из последствий полиплоидии у *C. bursa-pastoris* стало увеличение пластичности за счет частичного дублирования путей ответа на свет и холодостресс, что позволило этому виду сильно увеличить свою область распространения.

Создание генетической карты поддержано грантом РФФИ 14-50-00029.

МЕТАБАРКОДИНГ РАСТЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ NGS: ОБЗОР ВОЗМОЖНОСТЕЙ И ПРАКТИЧЕСКИЙ ОПЫТ

Логачева М.Д.^{1,2*}, Криницына А.А.¹, Айгинин А.А.^{3,4}, Хафизов К.Ф.^{3,4}, Шипулин Г.А.³, Сперанская А.С.^{1,3}

1 МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

2 Институт проблем передачи информации РАН им. А.А. Харкевича, Москва

3 ФГБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

4 Московский физико-технический институт, Долгопрудный

e-mail maria.log@gmail.com

Идентификация видов важна для многих научных и практических задач, таких как изучение биоразнообразия, экологический мониторинг, анализ состава продуктов питания. Развитие современных технологий высокопроизводительного секвенирования привело к появлению нового подхода для решения этой задачи – метабаркодинга. Он сочетает методы непосредственно самого ДНК-штрихкодирования, т.е. применения последовательностей маркерных участков генома для идентификации видов, и метагеномики – анализа совокупного генетического материала микроорганизмов тех или иных сообществ. Этот подход позволяет анализировать образцы, представляющие собой смеси многих видов, физическое разделение которых невозможно. Это могут быть как природные образцы (почва, вода, совокупность паразитических или симбионтных организмов и т.д.), так и искусственно созданные (продукты питания, корма сельскохозяйственных животных, лекарственные сборы). Однако применение метабаркодинга для анализа растительных

смесей осложняется отсутствием универсальных маркеров и несовершенством референсных баз данных, и нуждается в адаптации к конкретным образцам. Мы представляем данные по анализу состава многокомпонентных растительных смесей (травяной чай, мёд) с помощью двух технологий секвенирования – Illumina и полупроводниковой. Как маркерные были выбраны два участка, представляющие пластидный (trnH-psbA) и ядерный (ITS1-2) геномы. Также было изучено влияние методик выделения ДНК и способа приготовления геномных библиотек. Показано, что наиболее перспективен для метабаркодинга участок ITS1-2, хотя и он не обеспечивает разрешения до уровня вида в некоторых группах растений, в частности, семействе Compositae, что впрочем, разрешается использованием других маркеров. Результаты, полученные разными методами, в целом схожи, однако существуют и отличия, связанные, прежде всего, с отличиями в эффективности выделения ДНК из разных видов и различных частей растения.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭВОЛЮЦИИ РИБОСОМНЫХ ГЕНОВ У ВИДОВ ЛЬНА МЕТОДОМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Большева Н.Л.^{1*}, Мельникова Н.В.¹, Дмитриев А.А.¹, Беленикин М.С.², Сперанская А.С.², Криницына А.А.², Краснов Г.С.¹, Лакунина В.А.¹, Кудрявцева А.В.¹, Муравенко О.В.¹

¹ ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва

*e-mail: nlbolsheva@mail.ru

С помощью высокопроизводительного секвенирования проведено исследование последовательностей наружных нетранскибируемых спейсеров генов 5S рРНК и двух внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS1 и ITS2) генов 45S рРНК в 43 образцах, представляющих 23 вида льна. По результатам секвенирования последовательностей 5S и ITS проведен филогенетический анализ. Обнаружено, что *Linum stelleroides* из монотипной секции *Stellerolinum* формирует базальную ветвь голубоцветковой клады. Затем от общего ствола древа отходит ветвь, формируемая представителями секции *Dasylinum*. Внутри клады *Dasylinum* тетраплоиды *L. pseudoanatolicum* и *L. anatolicum* сходны между собой и несколько отличаются от диплоида *L. hirsutum*. Последними разделяются ветви, сформированные представителями секций *Adenolinum* и *Linum*. В секции *Adenolinum* образцы, представляющие один вид, не кластеризуются совместно, а перемежаются с образцами других видов. Представители секции *Linum* разделяются

на 4 ветви, первую из них формируют образцы диплоидов *L. decumbens* и *L. grandiflorum* ($2n=2x=16$), вторую – тетраплоидов *L. narbonense* ($2n=4x=28$), третью – аллотетраплоидов *L. usitatissimum* (культивируемый вид) и его дикорастущего предка *L. angustifolium* ($2n=4x=30$), а четвертую – высокополиплоидного австралийского вида *L. marginale*. Таким образом, культивируемый аллотетраплоидный вид *L. usitatissimum* и его дикий предок *L. angustifolium* ($2n=30$) могли произойти либо в результате гибридизации двух диплоидных видов ($2n=16$) родственных современным *L. grandiflorum* и *L. decumbens*, либо в результате гибридизации диплоидного вида ($2n=16$) и диплоидного предка современного *L. narbonense* ($2n=14$).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант 16-04-01239, и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Биоразнообразие природных систем», подпрограмма «Генофонды живой природы и их сохранение».

ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОМА ТОПОЛЯ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ПОЛОМ

Борхерт Е.В., Дмитриев А.А., Краснов Г.С., Большева Н.Л., Кудрявцева А.В., Мельникова Н.В.*

ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва

*e-mail: mnv-4529264@yandex.ru

Тополь (*Populus*) – это модельный объект для генетических исследований деревьев. Кроме того, тополь представляет особый интерес, так как является двудомным растением. Ранее высокопроизводительное секвенирование геномов мужских и женских растений *P. trichocarpa* и *P. balsamifera* позволило идентифицировать около 650 однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs), потенциально ассоциированных с полом, а также установить, что гетерозиготными по таким SNPs являются мужские растения [1]. Нами проведена оценка наличия SNPs, ассоциированных с полом, у мужских и женских растений популяции *P. balsamifera*, растущей на территории г. Москвы, с использованием высокопроизводительного секвенирования. Выделена ДНК из 48 образцов тополя. Для амплификации участков генома тополя, потенциально ассоциированных с полом, было подобрано 12 пар праймеров, с использованием которых получены ДНК-библиотеки. Секвенирование провели на приборе MiSeq (Illumina, США) с длиной прочтения по 300 нуклеотидов с каждой стороны. В среднем для каждого ампликона каждого образца получено око-

ло 5000 прочтений. Биоинформатический анализ проведен с использованием пакета программ CLC Genomics Workbench. Различия между мужскими и женскими растениями показаны для 25% SNPs, ассоциированных с полом у тополя по данным Geraldes и соавторов [1]. Эти SNPs позволяют отличать мужские растения от женских даже в географически отдаленных популяциях тополей и являются перспективными для разработки системы ДНК-маркеров для определения пола. Такая система позволит выбирать растения тополя с нужным генотипом даже среди однолетних саженцев, что сделает возможным использование для озеленения города только не образующих пух мужских растений. Кроме того, работа вносит вклад в понимание процессов детерминации пола у тополя.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Москвы в рамках научного проекта № 15-34-70054 «мол_а_мос».

1. A.Geraldes et al. (2015) Recent Y chromosome divergence despite ancient origin of dioecy in poplars (*Populus*), *Molecular ecology*, **24**: 3243–3256.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ ТРАНСКРИПТОМОВ РАСТЕНИЙ ЛЬНА, ЗАРАЖЕННЫХ *FUSARIUM OXYSPORUM*

Зяблицин А.В.¹, Дмитриев А.А.¹, Рожмина Т.А.^{1,2}, Краснов Г.С.¹, Кудрявцева А.В.¹, Мельникова Н.В.^{1*}

¹ ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва

² ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт льна, Торжок

*e-mail: mnv-4529264@yandex.ru

Фузариозное увядание, вызываемое *Fusarium oxysporum* sp. *lini*, значительно снижает урожайность льна (*Linum usitatissimum* L.). Нами выращены два восприимчивых (AP5 и ТОСТ) и два устойчивых (Dakota и № 3896) к фузариозному увяданию сорта, а также гибридные популяции от скрещиваний AP5 x Dakota и AP5 x № 3896, как в контрольных условиях, так и при заражении *F. oxysporum*. Выделено 24 образца РНК (из 10-12 растений каждый) – по 2 образца для каждого сорта и гибридной популяции в контрольных условиях и после заражения. С использованием набора TruSeq Stranded Total RNA Sample Prep Kit (Illumina, США) получили 24 библиотеки кДНК для секвенирования, оценка качества которых проводилась как описано ранее [1]. Высокопроизводительное секвенирование провели на секвенаторе NextSeq500 (Illumina) с длиной прочтения по 80 нуклеотидов с каждой стороны. В результате получено от 45 до 55 млн. прочтений для каждого варианта опыта и контроля.

Обработку данных секвенирования проводили как описано ранее [2]. Показали, что после заражения *F. oxysporum* изменялась экспрессия генов, кодирующих транскрипционные факторы, UDP-гликозилтрансферазы, глутатион-S-трансферазы и белки, связанные с ответом на действие патогенов. Выявили различия в изменении экспрессии ряда генов между устойчивыми и восприимчивыми к *F. oxysporum* генотипами. Гены, уровень экспрессии которых изменялся в ответ на действие патогена, вероятно, участвуют в ответе растений льна на заражение *F. oxysporum*, а также могут определять устойчивость растений льна к фузариозному увяданию.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 16-16-00114).

1. A.A.Dmitriev et al. (2016) Glutathione S-transferases and UDP-glycosyltransferases Are Involved in Response to Aluminum Stress in Flax, *Frontiers in Plant Science*, **7**: 1920.
2. A.A.Dmitriev et al. (2016) Gene expression profiling of flax (*Linum usitatissimum* L.) under edaphic stress, *BMC Plant Biology*, **16**(Suppl 3): 237.

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ГЕНА sRLK У КОНТРАСТНО РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО УСТОЙЧИВОСТИ К ЗАСОЛЕНИЮ ЛИНИЙ ЛЮЦЕРНЫ ГОЛУБОЙ

Мунтян А.Н.* , Мунтян В.С., Саксаганская А.С., Симаров Б.В., Румянцева М.Л.

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, г. Санкт-Петербург, гор. Пушкин 8

*e-mail: vucovar@yandex.ru

Ген Srlk кодирует рецепторную киназу, обладающую повышенной активностью в корнях растений *Medicago truncatula* в условиях засоления [1]. Целью работы было эмпирическое подтверждение теории Вавилова Н.И. о существовании генотипически различных форм растений, адаптированных к различным эколого-географическим факторам в предполагаемых центрах разнообразия. Объектом исследования были растения люцерны голубой – диплоидного вида люцерн, не введенного в культуру, характеризующегося высокой соле-, жаро- и засухоустойчивостью [2]. В работе использовали семена люцерны голубой (*Medicago caerulea* Less. ex. Ledeb. (2n)), полученные из Мировой коллекции ВИР (родительские растения), а также две линии поколения S1 с солеустойчивым и с солечувствительным фенотипами, полученные в результате принудительного самоопыления родительских растений в лабораторных условиях. Нуклеотидные последовательности sRLK были определены методом секвенирования по Сэнгеру.

В результате показано, что у родительского генотипа солечувствительного и солеустойчивого генотипа не

различались. Тогда как у солеустойчивых генотипов S1 наблюдаются множественные замены, а солечувствительные генотипы S1 были более консервативны. Таким образом, показано, что повышение устойчивости к стресс-фактору ведет к значительным структурным перестройкам в рецепторной части трансмембранной киназы. Полученные результаты впервые показывают, что под воздействием стресс-факторов могут происходить существенные генетические изменения в структуре сигнальных белков, что также может указывать на то, что и симбиотические взаимоотношения могут также иметь значительные изменения.

Работа поддержана грантами РФФИ 17-04-02011, 15-04-09295.

1. L. de Lorenzo et al. (2009) A novel plant leucine-rich repeat receptor kinase regulates the response of *Medicago truncatula* roots to salt stress. *Plant Cell*, **21**: 668-680.
2. А.И. Иванов и др. (1986) Ресурсы многолетних кормовых растений Казахстана. Алма-Ата: Кайнар. 219 с.

ОРТОЛОГИЗАЦИЯ ГЕНОМОВ РАСТЕНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДАННЫХ ДЕТАЛИЗИРОВАННЫХ КАРТ ЭКСПРЕССИИ.

Пенин А.А.^{1,2}, Касьянов А.С.^{2,3}, Клепикова А.В.^{1,2}, Герасимов Е.С.^{1,2}, Логачёва М.Д.^{1,2}

1 Институт проблем передачи информации РАН им. А.А. Харкевича, Москва

2 МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

3 Институт общей генетики РАН им. Н.В. Вавилова, Москва

Основной особенностью эволюции геномов растений является наличие многократных раундов полногеномной дупликации с последующей субфункционализацией, неофункционализацией, а также потерей части генов. В результате этих процессов на больших эволюционных расстояниях можно однозначно сопоставить (ортологизовать) только небольшую их часть. Так, между наиболее хорошо изученными растениями – *Arabidopsis thaliana* (модельный объект генетики растений) и *Oryza sativa* (рис) получается ортологизовать около 6 тысяч генов. Остальные ~ 20 тысяч объединяются в группы гомологичных генов (ортогруппы), в пределах которых однозначное сопоставление затруднено или невозможно. Это делает крайне затруднительным перенос известных функций генов с модельных объектов на не модельные, что существенно усложняет изучение функциональной эволюции отдельных генов и классов генов, а также снижает практическую ценность исследований, проводимых на модельных объектах. Одним из способов решения этой проблемы явля-

ется учет данных по паттернам экспрессии генов, которые позволяют классифицировать гены не только по последовательности, но и по предполагаемой функции. В нашей работе мы провели сопоставление детализированных атласов экспрессии двух видов *Arabidopsis thaliana* и *Fagopyrum esculentum* (гречихи посевной). Было показано, что гены, для которых на основании последовательности находятся однозначные (one-to-one) ортологи имеют гораздо более схожие профили экспрессии, чем случайно выбранные гены. Дальнейший анализ проводили с использованием методов машинного обучения. Для этого данные по экспрессии однозначных ортологов были использованы в качестве обучающей выборки. Было показано, что эффективность одного из использованных алгоритмов при распознавании ортологичных пар превышает 95%. Использование предложенного алгоритма позволяет существенно увеличить число генов с однозначным сопоставлением.

Работа поддержана грантом РФФИ 17-14-01315.

СБОРКА И АННОТИРОВАНИЕ ГЕНОМА ЛИСТВЕННИЦЫ СИБИРСКОЙ

Шаров В.В.^{1,2}, Путинцева Ю.А.¹, Кузьмин Д.А.^{1,2}, Орешкова Н.В.^{1,3}, Феранчук С.И.^{1,4}, Цыбин А.Н.^{1,2}, Маколов С.В.^{1,2}, Крутовский К.В.^{1,5,6,7*}

1 Научно-образовательный центр геномных исследований СФУ, Красноярск

2 Институт космических и информационных технологий СФУ, Красноярск

3 Институт леса им. В.Н. Сукачева ФИЦ КНЦ СО РАН

4 Иркутский национальный исследовательский технический университет, Иркутск

5 Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва

6 Гёттингенский университет, Гёттинген, Германия

7 Техасский АМ университет, Колледж Стейшн, США

*e-mail: konstantin.krutovsky@forst.uni-goettingen.de

Сборка генома лиственницы сибирской (*Larix sibirica*, Ledeb.) *de novo* представляет собой сложную биоинформатическую задачу. Это связано с тем, что размер генома данного вида превышает человеческий почти в 4 раза (более 12 млрд н.о.), а также содержит большое число повторяющихся последовательностей (более 70 %).

Для сборки генома использовались короткие последовательности ДНК (риды), полученные с секвенатора Illumina HiSeq 2000. Поскольку объем данных достигает 3 ТБ, то при их обработке использовался высокопроизводительный аппаратный комплекс IBM x3950 x6 с 192 ядрами и объемом оперативной памяти в 3 ТБ.

Риды проходили этапы предобработки (очистки и фильтрации), которые реализованы в виде последовательности выполнения ряда программ (англ. pipeline). В результате предобработки получено 2,4 ТБ данных в виде ридов длиной до 100 н.о., что равнялось 82-х кратному покрытию генома лиственницы ридами в среднем.

Для сборки генома *de novo* использовалась серверная версия программы CLC Assembly Cell. В свя-

зи с тем, что ассемблер CLC не способен обработать объем входных данных превышающий определенный порог, был предложен и математически обоснован метод «сборки генома по частям». Сборка заняла около 20 дней вычислений. Результатом являются контиги и скаффолды с минимальной длиной 200 н.о. Число контигов 11,3 млн, их суммарная длина 8,31 млрд н.о., максимальная длина контига 266 тыс. н.о., показатель N50 равен 1253. Скаффолдов собрано 10,4 млн, их суммарная длина 12,11 млрд н.о., максимальная длина скаффолда 266 тыс. н.о., N50 равен 5362.

Аннотирование генома осуществлялось с помощью программы MAKER, использовались также предсказания моделей генов с помощью пакета AUGUSTUS, а также подтверждения на основе данных по секвенированию транскриптома лиственницы и моделей генов некоторых других видов хвойных деревьев. В результате структурной аннотации получено 43659 моделей генов. Функциональная аннотация моделей генов, а также результаты аннотации повторов, согласуются с результатами для других хвойных.

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ОГУРЦА (*C. SATIVUS*) В ОТВЕТ НА ЗАРАЖЕНИЕ ВИРУСОМ ЗЕЛЕННОЙ КРАПЧАТОЙ МОЗАИКИ С ПОМОЩЬЮ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ВТОРОГО ПОКОЛЕНИЯ

Шеленков А. А., Славохотова А. А., Истомина Е. А., Коростылева Т. В., Одинцова Т. И.

1 ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва

*e-mail: odintsova2005@rambler.ru

Вирус зеленой крапчатой мозаики огурца (ВЗКМО) – это РНК-содержащий вирус, который поражает растения семейства Тыквенные, вызывая потерю урожая до 40%. Гены устойчивости к ВЗКМО не описаны, поэтому для защиты от патогенных штаммов применяют аттенуированные штаммы вируса, которые, не вызывая симптомов заболевания, обеспечивают защиту от патогенных штаммов.

Для исследования механизмов индуцированной устойчивости и роли в них антимикробных пептидов (АМП) – важнейших компонентов иммунной системы растений – проводили NGS секвенирование транскриптомов здоровых, зараженных и вакцинированных растений огурца на приборе Illumina HiSeq 2500. Для каждого образца в среднем было получено около 48 млн. прочтений длиной 150 п.о. Сборка транскриптомов выполнялась с помощью программы Trinity [1]. Количество собранных транскриптов составило 55–65 тыс. при медианной длине транскрипта в диапазоне 840–961. Полученные транскрипты были проаннотированы с помощью программы Blast2Go [2], версия 4.1.

При этом значимые подобию в базе данных Uniprot были найдены приблизительно для 40% транскриптов каждого из образцов. Данные GO-аннотации показывают, что в зараженных и вакцинированных растениях более чем на 30% повышается число транскриптов, отвечающих за ответ на внешние воздействия, в том числе, заражение патогенами и другие виды стресса. Кроме того, в зараженных и вакцинированных растениях было найдено больше АМП по сравнению со здоровыми растениями. Анализ дифференциальной экспрессии генов позволил выявить транскрипты, вовлеченные в генетическую регуляцию ответа растения на заражение различными штаммами ВЗКМО.

*Работа выполнена при поддержке гранта
РНФ № 16-16-00032.*

1. B.J. Haas et al. (2013) *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-Seq: reference generation and analysis with Trinity, *Nat. Protoc.*, **8**(8):1494–1512.
2. A. Conesa et al. (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research, *Bioinformatics*, **21**:3674–3676.

ГЕНЫ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ YABBY В ТРАНСКРИПТОМЕ МИКОГЕТЕРОТРОФА *MONOTROPA HYROPITYS*

Щенникова А. В.*, Белецкий А. В., Марданов А. В., Шульга О. А., Кочиева Е. З., Равин Н. В., Скрябин К. Г.

Институт Биоинженерии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

*e-mail: shchennikova@yandex.ru

Подъельник *Monotropa hypopitys* – микогетеротрофное, нефотосинтезирующее растение, получающее питательные вещества от корней деревьев посредством микоризы [1]. Подобно другим современным растениям, подъельник формирует латеральные органы, асимметрию которых определяют, в частности, факторы транскрипции YABBY. Считается, что гены YABBY возникли в предшественнике семенных растений и ассоциированы с происхождением плоского листа и увеличением его поверхности, перерабатывающей солнечную энергию в процессе фотосинтеза [2]. Эволюционная диверсификация гена YABBY сформировала целое семейство генов со специфичными консервативными функциями в разрастании пластинки, поддержании полярности и определении границ листа и подобных ему органов [3]. В данной работе впервые охарактеризованы гены YABBY микогетеротрофного растения, не имеющего вегетативных органов. В транскриптомах прицветников, цветков и корней подъельника обнаружены транскрипты восьми генов YABBY (клады YABBY1/YABBY3, YABBY5, INO и CRC), являющихся ближайшими гомологами генов YABBY фотосинтезирующих представителей Ericales (Asterids). В кодируемых белках определены домен C2C2-цинкового пальца,

HMG-подобный YABBY-домен, известные кладо-специфичные мотивы, а также предсказаны новые мотивы с возможной функциональной нагрузкой. Паттерн экспрессии генов *MhyYABBY*, определенный путем подсчета транскриптов в транскриптомах с последующей их нормализацией на миллион и между образцами, оказался сходным с экспрессией ортологичных генов из других покрытосеменных. Транскрипция всех анализируемых генов была обнаружена в цветках. За исключением генов-гомологов *INO* и *CRC*, экспрессия «вегетативных» *MhyYABBY* присутствовала в прицветниках, близких по природе вегетативным органам. Транскрипты *MhyYAB5-2* и *MhyFIL2* были найдены в корнях, что объяснимо присутствием почек. Данные направлены на выявление возможного полиморфизма консервативного механизма асимметричного развития семенных растений.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта
Российского Научного Фонда № 14-24-00175.*

1. J.R. Leake. (1994) The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytol.*, **127**: 171–216.
2. T. Yamada et al. (2011) Ancestral expression patterns and evolutionary diversification of YABBY genes in angiosperms. *The Plant J.*, **67**: 26–36.
3. C. Finet et al. (2016) Evolution of the YABBY gene family in seed plants. *Evol Dev.*, **18**: 116–126.

РЕПРОДУКТИВНОЕ РАЗВИТИЕ ПАРАЗИТИЧЕСКОГО РАСТЕНИЯ *MONOTROPA HYPOPITYS*: ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ MADS-BOX ГЕНОВЩенникова А.В.^{*}, Белецкий А.В., Шульга О.А., Марданов А.В., Кочиева Е.З., Филюшин М.А., Равин Н.В., Скрябин К.Г.

Институт Биотехнологии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

^{*}e-mail: shchennikova@yandex.ru

Полный микогетеротроф, подъяльник *Monotropia hypopitys* начинает развитие с пробуждения адвентивных корневых репродуктивных почек под воздействием весенних температур и отдаленного сигнала длины дня (получаемого от корней деревьев через микоризу). Почка дает репродуктивный побег с прицветниками, соцветием и цветками обычного для покрытосеменных строения [1]. Идентичность меристемы и органов цветка определяются различными комбинациями гомеозисных генов пяти (ABCDE) активностей [2], преимущественно кодирующих MADS-факторы транскрипции и считающихся одним из ключевых эволюционных факторов возникновения цветка [3]. В данной работе анализ транскриптомов прицветников, цветков и корней подъяльника позволил впервые охарактеризовать семейство генов MADS-box микогетеротрофа. Были обнаружены 27 генов MIKC^c-белков (клады SOC1, FLC, SVP, AG, SEP, AGL6, AP1/FUL, AP3/PI и AGL15), состоящие из доменов MADS (MEF2-like), I, K и C, и 3 – MIKC^c-белков (клады AGL67 и AGL94) с MADS-доменом SRF-типа. Филогения белков соответствовала общей топологии покрытосеменных растений. Шесть групп генов состояли из вероятных аллельных вариантов или паралогов, возникших в результате недавней дубликации в подъяльнике. Четыре группы объединяли от-

даленные паралоги, которые могли возникнуть в результате дубликации внутри растительного семейства. Были найдены известные и предсказаны новые консервативные кладо-специфичные мотивы с потенциальной функциональной значимостью. Паттерн экспрессии *MhyYABBY*, определенный посредством анализа транскриптомов, в разной степени соответствовал известным функциям ортологичных генов из других покрытосеменных. Данные структуры, филогении и экспрессии генов *MhyMADS* в сочетании с литературными данными позволили предположить роли для каждого из идентифицированных генов в онтогенезе подъяльника. Исследование является вкладом в понимание деятельности MADS-генов в микогетеротрофных видах растений, в частности, и в физиологии и эволюции растений в целом.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российской Научного Фонда № 14-24-00175.

1. J.R. Leake. (1994) The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytol*, **127**: 171–216.
2. E.S. Coen, E.M. Meyerowitz. (1991) The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*, **353**: 31–37.
3. L. Parenicová L et al. (2003) Molecular and Phylogenetic Analyses of the Complete MADS-Box Transcription factor Family in Arabidopsis: New Openings to the MADS World. *The Plant Cell*, **15**: 1538–1551.

RNAseq-BASED DECIPHERING OF MOLECULAR MECHANISMS UNDERLYING TRAIT FORMATION: NON-ALTERNATIVE WAY IN CASE OF IMPEDED METABOLITE IDENTIFICATION

Glagoleva A.Y.^{1,2*}, Shmakov N.A.^{1,2}, Shoeva O. Y.¹, Vasiliev G.V.¹, Shatskaya N.V.¹, Börner A.³, Afonnikov D.A.^{1,2}, Khlestkina E.K.^{1,2}

1 Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk

2 Novosibirsk State University, Novosibirsk

3 Leibniz-Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Gatersleben, Germany

^{*}e-mail: glagoleva@bionet.nsc.ru

Traditionally, the study of plant traits begins from analysis at the phenotypic, physiological and biochemical levels, thus elucidating metabolic pathways involved and facilitating identification of candidate genes responsible for trait formation. An exception to this rule is the enigmatic 'melanin-like' black pigmentation of seed in some plant species, including barley (*Hordeum vulgare* L.). Chemical nature of this 'melanin-like' black pigment has not been determined yet, due to its complex structure and withstanding to almost all solvents. Analysis of differentially expressed genes (DEGs) in colored and uncolored seeds is a suitable way to identify genetic networks (and hence metabolic pathways) participating in formation of this 'melanin-like' black pigment.

First of all, we excluded involvement of metabolic pathways, known for other types of pigments (i.e. widespread flavonoid pigments). Our data demonstrated that none of the key flavonoid biosynthesis genes is expressed significantly in black-grained barley during the pigment formation. Then,

we used RNAseq approach to reveal DEGs in black-colored and uncolored-grained barley.

We used FastQC to estimate sequencing quality, cutadapt to remove adapter sequences and prinseq to filter sequences by quality and length. Resulting filtered libraries were mapped to *H. vulgare* reference genome assembly from Ensembl Plants database. Identification of differentially expressed genes was carried out by ErgeR algorithm based on mapping results of TopHat2 and STAR aligners. Pathway analysis was performed using PlantCyc database (<http://www.plantcyc.org/>). After that selected DEGs were verified using qRT-PCR. Genes with high level of differential expression in colored (for example, suberin monomer biosynthesis, wax esters biosynthesis, etc.) and uncolored (pyrimidine nucleotide interconversion, cellulose biosynthesis) seeds were identified. Putative mechanisms of black pigment formation are discussed.

This study is supported by the Russian Science Foundation (No 16-14-00086).

POST-EMBRYONIC HOURGLASS PATTERNS MARK ONTOGENETIC TRANSITIONS IN PLANT DEVELOPMENT

Ivo Grosse

Martin Luther University Halle-Wittenberg, Germany

Novosibirsk State University, Russia

* grosse@informatik.uni-halle.de

The developmental hourglass model has been used to describe the morphological transitions of related species throughout embryogenesis. Recently, quantifiable approaches combining transcriptomic and evolutionary information provided novel evidence for the presence of a phylotranscriptomic hourglass pattern across kingdoms. Although plants do not exhibit a morphological hourglass during embryogenesis, a transcriptomic hourglass has nevertheless been identified in the model plant *Arabidopsis thaliana*.

Here, we investigated whether plant hourglass patterns are also found postembryonically [1]. We found

that the two main phase changes during the life cycle of *Arabidopsis*, from embryonic to vegetative and from vegetative to reproductive development, are associated with transcriptomic hourglass patterns. In contrast, flower development, a process dominated by organ formation, is not. This suggests that plant hourglass patterns are decoupled from organogenesis and body plan establishment. Instead, they may reflect general transitions through organizational checkpoints.

1. Drost et al., Mol Biol Evol (2016) 33 (5): 1158-1163.

ALTERNATIVE ORFs WITHIN EUKARYOTIC mRNAs

Kochetov A.V.

Institute of Cytology & Genetics, Novosibirsk, Russia

Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

*e-mail: ak@bionet.nsc.ru

Recent developments of Ribo-Seq high-throughput techniques revealed a considerable underestimation of mRNA coding potential complexity. It was detected that a vast majority of plant and animal mRNAs contain several sites of initiation of translation corresponding to the alternative open reading frames (altORFs). These altORFs could encode either N-end truncated/extended versions of the annotated protein (the product of the main ORF) or unrelated polypeptides (if start sites are located in other reading frames) (e.g., [1,2]). However, in the most cases the presence of the altORF-encoded peptides was not verified at the proteomics level. For this purpose, a proteogenomics approach (combining prediction based on the nucleotide sequence analysis with MALDI-TOF verification) was efficiently exploited (e.g., [3]). Prediction of small altORF-encoded proteins was found to be a very promising data source since most ORF prediction methods developed earlier were limited by size thresholds (commonly only ORFs larger than 50 or even 100 codons were taken into account). This artificial restriction resulted in under-representation of annotated small proteins. Recent investigations demonstrated that a large variety of small proteins are involved in many processes including control of metabolism, antiviral and antibacterial defense, growth regulation, stress response, etc. [3]. Another important function of al-

tORFs relates to the control of mRNA translational efficiency under the stress conditions [4]. Prediction of altORFs within plant and animal mRNAs is a quite actual task since available experimental approaches still need improvement [5]. altORFev is an example of bioinformatics tools targeted to *ab initio* prediction of translatable ORFs within eukaryotic mRNAs [6]. It can also be used to predict the stress-related shift in proteome associated with different unfavorable conditions (e.g., phytopathogen attack, heat shock, drought or hypoxia in the case of higher plants)

This work was supported by RSF grant №16-16-04073

1. N.T. Ingolia (2016) Ribosome footprint profiling of translation throughout the genome, *Cell*, **24**: 22–33.
2. H.Mouilleron. et al. (2016) Death of a dogma: eukaryotic mRNAs can code for more than one protein. *Nucleic Acids Res.*, **44**: 14–22.
3. S.J. Andrews, J.A.Rothnagel, (2014) Emerging evidence for functional peptides encoded by short open reading frames. *Nat. Rev. Genet.*, **15**: 193–204.
4. I. Ventoso et al., (2012) Extensive translome remodeling during ER stress response in mammalian cells. *PLoS One*, **7**: e35915
5. O.A. Volkova, A.V. Kochetov (2010) Interrelations between the nucleotide context of human start AUG codon, N-end amino acids of the encoded protein and initiation of translation. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **27**: 611–8.
6. A.V. Kochetov et al. AltORFev facilitates the prediction of alternative open reading frames in eukaryotic mRNAs. *Bioinformatics*, 2017. **33**: 923–925.

THE COMPUTATIONAL ANALYSIS OF WHOLE-GENOME DATA PREDICTS A ROLE OF CHROMATIN LANDSCAPE IN REGULATION OF PRIMARY ETHYLENE RESPONSE IN *ARABIDOPSIS THALIANA*

Zemlyanskaya E.V.^{1,2*}, Levitsky V.G.^{1,2}, Oshchepkov D.Y.¹

1 Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

2 Novosibirsk State University, Novosibirsk

*e-mail: ezemlyanskaya@bionet.nsc.ru

The plant hormone ethylene regulates numerous physiological processes in plants including significant characteristics of agricultural crops such as fruit ripening rates and plant tolerance to stress conditions [1]. It activates EIN3 transcription factor – a primary transcriptional regulator of ethylene response [2]. EIN3 controls gene expression upon binding to a specific sequence in gene promoters, however, its regulatory function might be considerably affected by additional factors. In this work, we investigate the possible role of epigenetic factors in EIN3 functioning by means of bioinformatics analysis of publicly available whole-genome data in *Arabidopsis thaliana*. The analysis of EIN3 binding sites deduced from ChIP-seq data (peaks) [3] showed that their distribution in gene promoters was bimodal with the broad and narrow maxima in distal and proximal promoter regions. We classified all peaks according to the epigenetic status using genome-wide map of nine chromatin states [4]. The peaks

related to distal maximum were found associated with a specific chromatin state. Exactly the peaks corresponding to this chromatin state were significantly associated with ethylene response, as well as they were enriched in specific EIN3 binding sequences compared to the peaks of other types. Thus, the interplay of chromatin landscape and DNA-binding context might cause the distinct modes of EIN3 mediated regulation of gene expression.

1. F.B. Abeles et al. (1992) Ethylene in plant biology. San Diego: Acad. Press.
2. C. Merchante et al. (2013) Ethylene signaling: simple ligand, complex regulation, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **16**: 554-560.
3. K.N. Chang et al. (2013) Temporal transcriptional response to ethylene gas drives growth hormone cross-regulation in *Arabidopsis*, *Elife*, **2**: e00675.
4. J. Sequeira-Mendes et al. (2014) The functional topography of the *Arabidopsis* genome is organized in a reduced number of linear motifs of chromatin states, *Plant Cell*, **26**: 2351–2366.

FUNCTIONAL ANNOTATION OF AUXIN RESPONSIVE CIS-REGULATORY ELEMENTS

Novikova D.D.^{1,2,3}, Cherenkov P.A.¹, Mironova V.V.^{1,2*}

1 Novosibirsk State University, 2 Pirogova Street, Novosibirsk, 630090, Russian Federation

2 Institute of Cytology and Genetics, Prospekt Lavrentyeva 10, Novosibirsk, 630090, Russian Federation

3 Department of Agrotechnology and Food Sciences, Subdivision Biochemistry, Wageningen University and Research Center, Stippeneng 4, Wageningen, 6708WE, Netherlands

e-mail: * victoria.v.mironova@gmail.com

Phytohormone auxin regulates virtually every developmental process. Control of auxin responses is implemented via activation/inhibition of ARF transcription factors. ARFs known to bind TGTC-containing auxin-responsive cis-regulatory elements [1]. Nonetheless, the signalling beyond ARF-dependent response is largely unknown with only a few known transcription factors involved in auxin response [2].

We performed computational analysis of hexamer motifs enriched in promoters of auxin-responsive genes. All available microarray and RNA-Seq datasets on exogenous auxin treatment from GEO database were collected. Meta-analysis of dozens of auxin responsive transcriptomes revealed a comprehensive set of cis-regulatory elements associated with auxin up- and down-regulation in either early or late response. Intriguingly, TGTC-containing elements were not the most highly overrepresented in auxin responsive regulatory regions. Instead, bHLH- and bZIP- binding motives and

a family of AT-rich motifs was the most strongly associated with auxin response. TATA-like hexamers, NAC-related core, bHLH-binding E-box and unknown A/T-rich motifs were associated with early auxin-responsive transcriptional activation of gene expression. The lists of motives associated with up- and down-regulation in late response significantly overlap, though the list of motifs associated with auxin down-regulation is almost twice longer. After the classification and annotation of the enriched motifs we propose the auxin signalling network reconstruction on their basis.

1. Ulmasov, T., Liu, Z., Hagen, G. and Guilfoyle, T. (1995). Composite Structure of Auxin Response Elements. *The Plant Cell*, **7**(10), p.1611.
2. Berendzen, K., Weiste, C., Wanke, D., Kilian, J., Harter, K. and Dröge-Laser, W. (2012). Bioinformatic cis-element analyses performed in *Arabidopsis* and rice disclose bZIP- and MYB-related binding sites as potential AuxRE-coupling elements in auxin-mediated transcription. *BMC Plant Biology*, **12**(1), 125.

VARIATION IN THE INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS) REGIONS OF NUCLEAR RIBOSOMAL DNA IN ENDEMIC HEDYSARUM SPECIES

Nuzhdina N.S.,* Dorogina O.V.

Central Siberian Botanical Garden SB RAS, Novosibirsk

*e-mail: nszvyagina@mail.ru

The genus *Hedysarum* L. in its current definition is one of the biggest in the tribe *Hedysarea* (*Fabaceae* L.) and includes ca. 160 species [1], among which about 20 are distributed in Siberia. The genus comprised a number of valuable ornamental and medicine plants and strict endemic species. Till that day, the most molecular studies were conducted on European and North African *Hedysarum* species, whereas few studies were focused on the genetic variability in Siberian species.

The internal transcribed spacer (ITS) loci contain the signals needed to process the rDNA transcript analysis. It has become one of the most widely used nuclear marker for hierarchical phylogenetic reconstruction among different plant taxa. The aim of the study was to access the polymorphism of ITS region of rDNA in *H. chaiyrakanicum* and *H. theinum*, the endemic species from Southern Siberia, Russia, and to recovery its phylogenetic relationship with Mediterranean *Hedysarum* species.

The rDNA ITS region was newly sequenced for *H. chaiyrakanicum* and *H. theinum* in our study. DNA sequencing was performed at SB RAS Genomics Core Facility. The

length of the ITS regions were 707 (for *H. chaiyrakanicum*) and 705 bp (for *H. theinum*). After alignment, the both sequences were 625 bp length.

In the present study, *H. theinum*, *H. chaiyrakanicum* and *H. gmelinii* formed a single clade which reveals their close phylogenetic relationship and, probably, could reflects Asian origin of highly variable morphologically *H. gmelinii*, widely distributed throughout Northern Eurasia. The two taxa (*H. chaiyrakanicum* and *H. gmelinii*) were sister taxa which confirms the proposition to consider the former sect. *Subacaulia* [2] as a subsection of *Multicaulia* [3].

This work was supported by the grant of RAS:

«Ex situ conservation of rare and disappearing plant species of Siberia», belonging to the Program of RAS: «Wildlife: current status and problems of development».

1. G.P. Yakovlev et al. (1996) Legumes of Northern Eurasia: a check-list, 379-407 (Royal Botanical Gardens, Kew).
2. B.A. Fedtschenko. (1972) *Hedysarum* L., In: *Flora of the USSR*, V.L. Komarov (Ed.), 13: 199-243 (Translated from Russian, by Scientific Translations, Jerusalem).
3. S. Amirahmadi et al. (2014) Molecular systematics of the tribe *Hedysareae* (*Fabaceae*) based on nrDNA ITS and plastid *trnL-F* and *matK* sequences, *Plant Syst. Evol.*, 300: 729-747.

AUXIN INDUCED EXPRESSION CHANGES DIFFER AMONG FUNCTIONAL GENE GROUPS

Omelyanchuk NA^{1,2}, Wiebe DS^{1,2}, Mironova VV^{1,2,*}

1 Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

2 LCT&EB, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

*corresponding authors: victoria.v.mironova@gmail.com

ABSTRACT

Auxin plays a key role in almost every aspect of plant morphogenesis. We studied the transcriptional background for physiological auxin response in RNA-seq experiment (SOLiD5500 technology, Applied Biosystems, USA with a 60-bp read length) on *Arabidopsis thaliana* roots treated with auxin for 6 h [1]. Functional annotation of the data showed that at the transcriptional level auxin simultaneously regulates a vast range of diverse processes such as cell wall biogenesis, transition through the cell cycle, or metabolism of multiple chemical substances. We noted that for some functional groups auxin induced changes were more or less similar, but fold changes differed among the processes. To assess this in detail, we developed a bioinformatics approach allowing identification of GO terms specifically enriched for the genes responding to auxin coordinatively, within a certain interval of fold changes, comparing the whole list of differentially up- or down- regulated genes. Using this approach we have proven the initial hypothesis showing that (i) there are functional gene groups within which genes respond to auxin with a surprisingly similar fold changes and that (ii) these fold changes vary from one group to another [1]. These

results were confirmed by independent data from microarray experiments. To obtain some initial insight about possible mechanism of coherency at the specific level of expression changes within different functional gene groups, we performed a motif enrichment analysis and found cis-regulatory elements TBX1-3, SBX, REG, TCP/site2 and some others as the candidates conferring fold-change-specific responses to auxin in *Arabidopsis thaliana*. The approach developed here may be applied to study action of any other factor on gene expression in various species.

ACKNOWLEDGMENTS

The high-throughput transcriptome sequencing was done in the Center of Genomic Investigations in ICG by V. Gorelova, N. Klimova and G.V. Vasiliev. We thank C. Weinholdt, V.G. Levitsky and I. Grosse for assistance in the data processing and meta-analysis.

1. Omelyanchuk NA, Wiebe DS, Novikova DD, Levitsky VG, Klimova N, Gorelova V, Weinholdt C, Vasiliev GV, Zemlyanskaya EV, Kolchanov NA, Kochetov AV, Grosse I, Mironova VV. Auxin regulates functional gene groups in a fold-change-specific manner in *Arabidopsis thaliana* roots. *Sci Rep.*, 2017. In print.

COMPARATIVE ANALYSIS OF 5B CHROMOSOME REARRANGEMENTS DURING WHEAT EVOLUTION BASED ON PHYSICAL MAPPING AND SEQUENCING DATA.

Salina E.A.¹, Sergeeva E.M.¹, Nesterov M.A.¹, Kiseleva A.A.¹, Frenkel Z.², Korol A.², Muterko A.F.¹, IWGSC³

1 Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

2 University of Haifa, Haifa, Israel

3 International Wheat Genomic Sequencing Consortium

*salina@bionef.nsc.ru

Chromosome 5B of common wheat is famous for the fact that its reorganization during the course of evolution led to appearance of the *Ph* locus, which contributed to the stabilization of the genome of wild emmer wheat *Triticum dicoccoides* and *T. aestivum* as well as other widespread allopolyploid *Triticum* species. The release of the IWGSC RefSeq v1.0 reference genome sequence has provided for new approaches to a more detailed analysis of the chromosomal rearrangements that took place during allopolyploidization and subsequent concerted evolution of the three A, B and D genomes found in wheat.

The work includes a comprehensive study of the evolution of chromosome 5B of wheat according to the genetic, physical mapping and analysis of the primary structure of the chromosome regions which affect the ability of chromosome 5B to moderate recombination in interspecific *T. aestivum* x *T. dicoccoides* crosses.

Physical mapping of 5B chromosome of common wheat was conducted according the IWGSC strategy for sequencing the bread wheat. Three approaches have been used for anchoring BAC contigs on 5BS chromosome.

Comparative genetic analysis of chromosome 5B was performed by genotyping of a population of 116 Recombinant Inbred Chromosome Lines (RICLs) produced from a cross of CS and CS-5Bdic using the Illumina Infinium 15k Wheat SNP array (TraitGenetics GmbH). The results obtained were compared with 5B chromosomal maps of tetraploid and hexaploid wheats. Regions of considerable recombination suppression on 5B chromosome maps of durum/dicoccoides and aestivum/aestivum were identified compared to CS/CS-5Bdic. The region of recombination suppression BS0009810 / BS00022336 of 5BS is located in the position from 8880 to 16833 Kb from the telomere of 5BS and is represented by three contigs - ctg78, ctg179, ctg60. The analysis of the primary structure of these contigs was performed and revealed a number of sequence changes and presence of specific family of tandem repeats in this area. The mechanisms of their contribution to suppression of 5BS region recombination are discussed.

Acknowledgements. This study was supported by the RSF (No. 14-14-00161).

FINE ORGANIZATION OF GENOMIC REGIONS TAGGED TO 5S rDNA LOCUS OF THE BREAD WHEAT 5B CHROMOSOME

Sergeeva E.M.^{1*}, Shcherban A.B.¹, Beletskiy A.V.², Rakitin A.L.², Mardanov A.V.², Adonina I.G.¹, Salina E.A.¹

1 Research Center of Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk

2 Research Center of Biotechnology RAS, Moscow

*e-mail: sergeeva@bionef.nsc.ru

The 5S ribosomal RNA genes (5S rDNA) encode the component of large ribosomal subunit. The unit of 5S rDNA consists of 120 bp conserved region and variable non-transcribed spacer. Generally, the 5S rRNA genes in plants are organized in clusters of tandem repeats. In bread wheat *Triticum aestivum* (2n = 6x = 42, BBAADD) 5S rDNA loci are localized in the short arms of group 1 and 5 chromosomes. Despite the progress in wheat genome sequencing, the detailed structural organization of 5S rDNA - containing genomic regions remains unclear which is hampered by their repetitive nature. Availability of BAC-libraries (Bacterial Artificial Chromosome) allows studying the target 5S rDNA regions of approximately 100 kbp long.

Using the PCR-screening of the bread wheat 5BS BAC-library with primers to 5S rDNA coding sequence we identified three BAC-clones. The BAC DNA was 454-sequenced, and the assembled contigs were annotated by BLAST with NCBI and Triticeae repeats databases. We found two types of 5S rDNA unit: (1) the short of 418 bp, assessed as 84 copies, with highly variable nucleotide sequence, and (2) the low

variable long one of 486 bp (75 copies). By adding the data of BAC end-sequencing and PCR with 32 specific primers developed to contigs, the structure of the two 5S rDNA-tagged regions was established. The first region consists of 5 ordered fragments with the total length of 130562 bp, the second - 63985 bp. The 130562 bp region is characterized by the presence of short 418 bp 5S rDNA units interrupted by multiple insertions of transposable elements (TE). The 63985 bp region contains the tandem cluster of long 486 bp units which adjoins to the block of TE. Mapping both probes containing variable spacer parts from different unit types by FISH (fluorescence *in situ* hybridization) showed specificity of their distribution on wheat chromosome - the 486 bp sequences hybridized on 4 chromosome pairs but more intensively on 5BS chromosome. The 418 bp sequences hybridized on 2 chromosome pairs but predominantly on 1BS chromosome. Reorganization of 5S rRNA genes over the course of wheat genome evolution is discussed.

Acknowledgements. This study was supported by the RSF (No. 14-14-00161).

INVESTIGATING BARLEY GENES CONTROLLING CHLOROPHYLL SYNTHESIS WITH RNA-SEQ

Shmakov N. A.^{1*}, Vasiliev G. V.¹, Shatskaya N. V.¹, Doroshkov A. V.¹, Afonnikov D. A.^{1,2}, Khlestkina E. K.^{1,2}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk

² Novosibirsk State University, Novosibirsk

*e-mail: shmakov@bionet.nsc.ru

Albinism in plants is characterized by lack of chlorophyll, results in photosynthesis impairment and can lead to abnormal plant development and premature death. Analysis of albino mutant phenotypes with full or partial chlorophyll deficiency can shed light on genetic determinants and molecular mechanisms of albinism. One such mutant phenotype is barley i:BwAlm line with tissue-specific albinism.

Poly-A RNA was extracted from spikelets of barley of Bowman line and i:BwAlm line and sequenced using IonTorrent platform. Resulting short read libraries were mapped to *Hordeum vulgare* reference genome using TopHat and STAR aligners. Differential expression search was conducted with Cufflinks pipeline and EdgeR package. Lists of genes with higher and lower expression levels in line i:BwAlm were examined separately for GO analysis with AgriGO database and significantly represented pathways from PlantCyc database. For a selected list of genes differential expression was checked with real-time PCR. Phenotypic characterization and chlorophyll distribution patterns were examined using chlorophyll fluorescence microscopy. *De novo* transcriptome assembly was performed using Trinity tool.

Microscopic analysis revealed segregation of cells in spikelets to chloroplast-containing and chloroplast-deficient. Plants of i:BwAlm line have decreased expression levels of plastid genes. We identified nuclear genes with differential expression. Functional differentiation between genes with higher and lower levels of expression in i:BwAlm line was detected. Genes down-regulated in i:BwAlm line are mostly associated with photosynthesis and chlorophyll synthesis, while up-regulated genes are functionally associated with vesicle transport. Differentially expressed genes are involved in a number of metabolic pathways, namely being Calvin-Benson cycle. Finally, *de novo* assembly of transcriptome contains several transcripts, not annotated in current *H. vulgare* genome version.

Our results provide new insight on genetic control and coordination of chlorophyll synthesis and formation of albino lemma and pericarp phenotype and demonstrate interaction between nuclear and chloroplast genomes in this physiological process.

This work was supported by the RFBR (№ 16-34-00924), RSF (№ 14-14-00734) and Russian Government Budget project 0324-2016-0008.

СБОРКА ПОЛНОГО МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА ЛОШАДИ ООВОДОВА (*Equus ovodovi*) ИЗ ДЕНИСОВОЙ ПЕЩЕРЫ

Дружкова А.С.¹, Макунин А.И.¹, **Воробьева Н.В.**^{1,2}, Васильев С.К.³, Оводов Н.Д.³, Шуньков М.В.³, Трифонов В.А.^{1,2}, Графодатский А.С.^{1,2}

1 Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск

2 Новосибирский государственный университет, Новосибирск

3 Институт археологии и этнографии СО РАН, Новосибирск.

*e-mail: vorn@mcb.nsc.ru

Понимание таксономических отношений внутри семейства *Equus* остается ограниченным, несмотря на то, что в палеолетописи представлены десятки вымерших родов лошадиных. В настоящее время активно изучается древняя ДНК подгруппы кабаллин (домашняя лошадь, дикая лошадь и лошадь Пржевальского). В подгруппе не-кабаллин (ослы и зебры) полный митогеном описан только для двух видов: для квагги и лошади Оводова (подрод *Sussemionus*) – нового вида, впервые обнаруженного в Хакасии с датировкой 46 тыс лет. [1].

В ходе исследования митогеномов древних лошадей Денисовой Пещеры (республика Алтай) мы обнаружили и секвенировали второго представителя этого вида. Используя для выравнивания митохондриальные геномы не-кабаллиных эквид, мы получили полный (100%) митогеном лошади Оводова. Проведенная радиоуглеродная датировка – 32000 лет сдвигает границу существования вида еще на 8 тыс лет. Древняя ДНК была выделена по [2]. Перед секвенированием проводили процедуру обогаще-

ния библиотек по методу [3]. Полученный нами митогеном не имеет кластера тандемных повторов в контрольном районе (*такой кластер присутствует в E. caballus* и многих других видах млекопитающих). Предыдущая сборка митогенома лошади Оводова [1] была неполной из-за того, что авторы предполагали наличие этого кластера. Филогенетический анализ показал, что лошадь Оводова ближе к зебрам, чем к ослам, онаграм и киангам, хотя предыдущее исследование показало ее базальное положение ко всем не-кабаллиным эквидам [1].

Работа поддержана грантами РФФИ 14-50-00036, 16-14-10009, 15-29-02384, 14-04-00723

1. Vilstrup, Julia T., Andaine Seguin-Orlando, Mathias Stiller, et al. 2013. Mitochondrial Phylogenomics of Modern and Ancient Equids. PLOS ONE 8(2): e55950
2. Druzhkova, Anna S., Olaf Thalmann, Vladimir A. Trifonov, et al. 2013. Ancient DNA Analysis Affirms the Canid from Altai as a Primitive Dog. PLoS One 8(3): e57754.
3. Maricic, Tomislav, Mark Whitten, and Svante Pääbo. 2010. Multiplexed DNA Sequence Capture of Mitochondrial Genomes Using PCR Products. PLoS ONE 5(11): e14004.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОМОВ ДРЕВНИХ И СОВРЕМЕННЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА МЕДВЕЖЬИ (*URSIDAE*) ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

Дружкова А.С.^{1,2*}, Воробьева Н.В.^{1,2}, Макунин А.И.¹, Васильев С.К.³, Оводов Н.Д.³, Тишкин А.А.⁴, Трифонов В.А.^{1,2}, Графодатский А.С.^{1,2}

1 Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

2 Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

3 Институт археологии и этнографии СО РАН, г. Новосибирск

4 Алтайский государственный университет, г. Барнаул

*e-mail: rada@mcb.nsc.ru

Семейство медвежьих (*Ursidae*) широко представлено в литологической летописи. Восстановление геномов древних представителей способно существенно повлиять на сложившиеся представления об исторической динамике структуры популяций современных бурых медведей (*U. arctos*) и всего семейства в целом. Известно, что современная популяция бурых медведей сформировалась в результате нескольких миграционных волн, связанных с климатическими изменениями. На территории современной континентальной Евразии после последнего ледникового максимума произошло резкое расселение небольшой группы бурых медведей северной Евразии. Пещерные медведи, когда-то занимавший обширный ареал в Евразии, исчезли к концу плейстоцена, а точное число видов и их филогенетические взаимоотношения остаются спорными. В нашем распоряжении были образцы костные образцы древних и современных представителей семейства медвежьих. Древние образцы представлены ископаемыми костными останками бурого медведя (*Ursus arctos*) и малого пещерно-

го медведя (*U. savini*) с юга Западной Сибири, датированные приблизительно от 3,5 тыс. лет до 42 тыс. лет.

Мы провели выделители ДНК из образцов древних и современных бурых медведей, а также вымерших малых пещерных медведей, приготовили библиотеки для секвенирования и провели двойное обогащение фрагментами мтДНК, секвенировали на платформе MiSeq Illumina, провели отбор ридов по качеству, восстановили полные или частичные последовательности мт геномов (от 54 до 100%), сравнили со всеми представленными последовательностями мт геномов бурых и пещерных медведей, построили филогенетическое древо. Среди бурых медведей обнаружены гаплотипы, характерные для разных волн миграций. Данные по малым пещерным медведям с рек Чик и Чумыш дают возможность предполагать, что они относятся к ранее неизвестной группе пещерных медведей.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-14-10009 и программой фундаментальных научных исследований по теме 0310-2016-0004.

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ДРЕВНИХ ЛОШАДЕЙ АРХЕОЛОГИЧЕСКОГО ПАМЯТНИКА ЯЛОМАН-II

Куслий М.А.^{1,2*}, Дружкова А.С.¹, Воробьева Н.В.¹, Макунин А.И.¹, Тишкин А.А.², Попова К.О.¹, Графодатский А.С.¹, Трифонов В.А.¹, Дымова М.А.³, Филипенко М.Л.³

¹ Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

² Алтайский государственный университет, г. Барнаул

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск

*e-mail: kusliy.maria@mcb.nsc.ru

Археологический памятник Яломан-II (Онгудайский район, Республика Алтай) был открыт экспедицией Алтайского государственного университета в 2003 г. и содержал группу курганных захоронений, которые относятся к усть-эдиганскому (II в. до н.э. – I в. н.э.) этапу булан-кобинской культуры. В преобладающем большинстве исследованных могил нашли костные останки лошадей. Изучение генетической структуры этой древней популяции лошадей представляет большой интерес, поскольку оно может пролить свет на представление о тех признаках, которые отбирались народом булан-кобинской культуры во время одомашнивания. Целью данной работы было исследование генетического состава упомянутой выше популяции лошадей. Для изучения были выбраны фенотипические ДНК-маркеры: гены окраски и маркеры определения пола. Из костных образцов, принадлежавших древним

лошадям из могильника Яломан-II, была выделена ДНК. С выделенной древней ДНК и праймерами для всех исследуемых ДНК-маркёров была проведена мультиплексная ПЦР. Из продуктов мультиплексной ПЦР были приготовлены библиотеки для секвенирования, затем была проведена их квантификация и секвенирование на платформе MiSeq (Illumina). Анализ данных секвенирования показал, что в популяции древних лошадей Яломана-II встречались генотипы гнедой и мышастой мастей, отличных от дикого типа, следовательно, люди булан-кобинской культуры проводили селекцию этих окрасок. Все исследуемые лошади оказались жеребцами, значит, кобыл вместе с людьми хоронили достаточно редко.

Работа была поддержана грантами РФФ 16-18-10033 и 16-14-10009.

ИЗУЧЕНИЕ ДРЕВНЕЙ ДНК: МИТОГЕНОМЫ И В-ХРОМОСОМЫ СИБИРСКОЙ КОСУЛИ

Попова К.О.^{1,2*}, Воробьева Н.В.^{1,2}, Дружкова А.С.^{1,2}, Макунин А.И.¹, Васильев С.К.³, Оводов Н.Д.³, Трифонов В.А.^{1,2}, Графодатский А.С.^{1,2}

¹ Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

² Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

³ Институт археологии и этнографии СО РАН, г. Новосибирск

*e-mail: popkseniya@gmail.com

В настоящее время современная биология вышла на новый уровень исследований благодаря возможности изучать геномы не только современных, но и древних организмов. Анализ древней ДНК с помощью секвенирования нового поколения дает возможность сравнить компоненты их геномов и митохондриальную ДНК с аналогичными данными по современным представителям этих же или родственных видов, что имеет большое значение для понимания механизмов эволюции. Объектом данного исследования является представитель рода *Capreolus* – сибирская косуля. В отличие от европейской косули *Capreolus capreolus*, косуля сибирская *Capreolus pygargus* исследована с молекулярно-генетической точки зрения очень слабо. Изучение полиморфизма популяций и межвидовых отличий обычно

проводится путем анализа контрольного района мтДНК, так как он является удобным генетическим маркером [1]. В ходе данного исследования мы секвенировали полные митохондриальные геномы древних сибирских косуль, а также провели анализ вариабельных элементов генома сибирской косули – В-хромосом. Это расширит имеющиеся представления как о популяционной истории рода *Capreolus*, так и об особенностях их добавочных хромосом.

Работа поддержана грантом РФФ № 16-14-10009 и программой фундаментальных научных исследований по теме 0310-2016-0004.

1. Vorobieva N.V., Sherbakov D.Y., Druzhkova A.S., Stanyon R., Tsybankov A.A., et al. (2011) Genotyping of *Capreolus pygargus* Fossil DNA from Denisova Cave Reveals Phylogenetic Relationships between Ancient and Modern Populations, PLoS ONE 6(8): e24045.

СИГНАЛЫ ОТБОРА В ГЕНОМЕ МАМОНТОВ

Прохорчук Е.Б.^{1,2*}, Недолужко А.В.³, Скрыбин К.Г.^{1,2,3}

1 ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

2 Биологический факультет МГУ им М.В. Ломоносова

3 НИЦ «Курчатовский институт»

e-mail: prokhortchouk@biengi.ac.ru

Первое исследование древней ДНК, выделенной из биологического материала шерстистого мамонта, было проведено более двадцати лет назад. После этого успеха было опубликовано несколько исследований, позволивший пролить свет на эволюцию представителей отряда Хоботные (Proboscidea) в Евразии и Северной Америке. Недавно две международные исследовательские группы опубликовали четыре генома *M. primigenius* и несколько геномов современных слонов – азиатского слона (*Elephas maximus*) и саванного слона (*Loxodonta africana*). В результате этих работ были идентифицированы специфичные для мамонта аминокислотные замены, приводившие к физиологическим, метаболическим и морфологическим адаптациям *M. primigenius* к климатическим условиям Палеарктики в плейстоценовую эпоху. Кроме того, было обнаружено 20% падение уровня гетерозиготности в популяции острова Врангеля.

В данной работе мы представляем полный ядерный геном мамонта обнаруженного на берегу Хрома (Якутия) в

2008 году, известный также как мамонтенок Хрома. Геном Хромы, а также ранее опубликованные геномы шерстистых мамонтов и современных слонов были использованы в сравнительном палеогеномном исследовании. Несколько значимых ранее неописанных несинонимичных замен в быстро эволюционирующих генах обонятельных рецепторов, в глобиновых и МНС генах были обнаружены в геноме шерстистого мамонта. Неожиданно, мы обнаружили идентичные мутации в нескольких генах, кодирующих моторные белки из семейства динеинов (*DNAH10*, *DNAH1*, *DNAH6*, *DNAH8* and *DYNC1H1*), которые могли иметь важное значение в энергетическом обмене у мамонтов. Сравнительное моделирование этих сложных белков и симуляция их молекулярной динамики позволяют предположить, что обнаруженные аминокислотные замены в субъединицах могли стать причиной потери эффективности динеина.

Работа была поддержана грантом РФФ 14-24-00175

СРАВНЕНИЕ СРАВНЕНИЙ: МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ СРАВНИТЕЛЬНОГО АНАЛИЗА СОВРЕМЕННЫХ И ДРЕВНИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Татарина Т.В.^{1,2}

1 Институт проблем передачи информации РАН, Москва

2 Университет Южной Калифорнии, Лос Анжелес, США

*e-mail: tatarino@usc.edu

ДНК последовательности полученные из древних и исторических образцов, как правило, отличаются от ДНК современных образцов в худшую сторону по качеству, проценту ошибок и по глубине покрытия. Так же маловероятно получение множественных качественных образцов из одного региона и временного периода. Низкое качество образцов препятствует проведению сравнения между индивидуумами принадлежащим разным эпохам, хотя такое сравнение является, в частности, необходимым для проверки исторических гипотез.

В этой работе мы приводим сравнительный анализ алгоритмов разработанных для анализа древних и исторических последовательностей, и определяем границы применимости каждого метода по глубине и проценту покрытия, расстояния между сравниваемыми видами, и типу приложения. Наибольшей надежностью и “исторической глубиной” отличаются агрегативные подходы, однако не позволяющие проводить сравнение на уровне отдельных локусов. Мы проиллюстрируем сравнение на примере анализа регуляторных последовательностей.

ГЕНЫ КАТАБОЛИЗМА ЛИПИДОВ ОБОГАЩЕНЫ НЕАНДЕРТАЛЬСКИМИ ВАРИАНТАМИ У СОВРЕМЕННЫХ ЕВРОПЕЙЦЕВ

Храмеева Е.Е.^{1,2*}

¹ Сколковский институт науки и технологий, Москва

² Институт проблем передачи информации РАН, Москва

*e-mail: e.khrameeva@skoltech.ru

Несмотря на то, что неандертальцы вымерли, фрагменты их геномов всё ещё можно найти в геномах современных людей, живущих вне Африки. Хотя доля таких фрагментов примерно одинакова у всех современных людей (кроме тех, которые имеют африканское происхождение), эти фрагменты распределены неравномерно между популяциями. Современные люди европейского происхождения содержат больше последовательностей, похожих на неандертальские, в отдельных функциональных категориях. Так, содержание последовательностей, похожих на неандертальские, сильно повышено в генах, участвующих в катаболизме липидов, у европейцев (24.3%), но не у азиатов (12.4%), в то время как оба значения превышают усредненное по всему геному значение (6%). Предсказанные изменения в липидном катаболизме удалось подтвердить с помощью измерения уровня гидрофобных метаболитов

(липидов) в мозге человека и шимпанзе, и связать их с дивергенцией в экспрессии генов. Также мы показали, что липиды с человеко-специфическими концентрациями в префронтальной коре связаны с ферментами, которые характеризуются человеко-специфическими изменениями экспрессии и обогащены неандертальскими вариантами, что говорит о возможной роли этих липидов в эволюции функционирования мозга у человека. Мы предполагаем, что генетические замены, которые возникли на неандертальской эволюционной линии, дали предкам современных европейцев определенные селективные преимущества, возможно, обеспечивающие адаптацию к холодному климату.

Работа выполнена при поддержке Программы по системной биологии Сколковского института науки и технологий.

EXPERIMENTAL AND BIOINFORMATICS APPROACHES FOR ANCIENT DNA EXTRACTION AND SAMPLE PREPARATION FOR NEXT GENERATION SEQUENCING IN ULTRA-CLEAN CONDITIONS

Matsvay A.D.^{1,2}, **Alborova I.E.**¹, **Pimkina E.V.**², **Markelov M.L.**², **Mustafin K.K.**¹, **Khafizov K.**^{1,2*}

¹ Moscow Institute of Physics and Technology, 141701 Institutsky pereulok 9, Dolgoprudny, Moscow region, Russian Federation

² Central Research Institute of Epidemiology, 111123, Novogirevskaya Str. 3A, Moscow, Russian Federation

*kkhafizov@gmail.com

In this work we aimed to develop an approach for genetic material extraction and sample preparation of ancient DNA for the next generation sequencing, which allows to minimize intra-laboratory contamination, as well as a software pipeline for the analysis and interpretation of the data. We designed a special module system consisted of four sterile gloveboxes, connected by five antechambers, which maintains a high-purity nitrogen atmosphere and allows to conduct all stages of sample preparation, starting with the processing of archaeological material, in a detached clean environment. Furthermore, we developed a library preparation protocol for massive parallel sequencing using non-standard modified sequencing adaptors, which enabled us to obtain a library of fragments from extremely low amounts of starting

degraded material. Finally, we also created a pipeline to perform a processing of raw sequencing data, identification of organisms, mapping reads to the reference sequence, and collection of the necessary statistics. Although we found out that only about 1.5% of all the sequencing reads could be mapped to the human reference genome, the distribution of the substitution frequencies in this part of the dataset showed complete agreement with the pattern of the postmortem modifications for the double-stranded library preparation method that was employed, which is a likely evidence for the authenticity of the sequenced human genome fragments. Thus, all the obtained data, coupled with sequencing results for negative control sample, indicated the absence of contamination during sample preparation procedure.

МОДУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ НЕЙРОПРОТЕКТОРА ЦЕФТРИАКСОНА НА УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, СВЯЗАННЫХ С СИСТЕМОЙ МЕТАБОЛИЗМА АМИЛОИДА-БЕТА, У КРЫС ЛИНИИ OXYS

Амстиславская Т.Г.^{1,2*}, Беличенко В.М.¹, Федосеева Л.А.^{3,1}, Тихонова М.А.^{1,2}

1 НИИ физиологии и фундаментальной медицины, Новосибирск

2 Новосибирский государственный университет, Новосибирск

3 Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

*e-mail: amstislavskayatg@physiol.ru

Доминирующей на сегодняшний день гипотезой о патогенезе болезни Альцгеймера (БА) является гипотеза «амилоидного каскада», в которой ключевую роль отводят накоплению амилоида-бета (Аβ), запускающего цепь патологических нейродегенеративных процессов. Предполагают, что модуляция экспрессии белков, участвующих в метаболизме Аβ, может быть эффективной стратегией для профилактики и терапии БА [1]. Недавно мы показали, что антибиотик цефтриаксон, обладающий нейропротекторной активностью, уменьшает выраженность когнитивных дефицитов и нейродегенеративных изменений у крыс линии OXYS, модели спорадической БА [2]. Молекулярные механизмы данного эффекта не до конца ясны, мы предположили, что препарат может воздействовать через изменение экспрессии генов, вовлеченных в метаболизм Аβ и патогенез БА. Целью работы было определение влияния цефтриаксона на уровень экспрессии генов *Ace*, *Vace*, *Bdnf*, *Ero*, *Ece*, *Ide* и *Mme* во фронтальной коре и гиппокампе крыс линий Вистар и OXYS. С возраста 14 недель самцы крыс

Вистар и OXYS получали инъекции цефтриаксона (100 мг/кг/день, в/б, 36 дней) или физиологического раствора. Определение уровня экспрессии генов осуществляли методом ОТ-ПЦР-РВ. Во фронтальной коре и гиппокампе выявлено некоторое снижение уровня экспрессии *Mme* в группе «OXYS+цефтриаксон», а также ослабление экспрессии *Ece*. Также показано достоверное влияние препарата на уровень экспрессии *Bdnf* в гиппокампе и межлинейные различия в экспрессии *Ace* во фронтальной коре. Таким образом, обнаружено модулирующее влияние цефтриаксона на уровень экспрессии *Ece* и *Bdnf*, что может играть важную роль для нейропротекции при БА-подобных нарушениях.

Работа частично поддержана грантом

РФФИ № 15-04-05593-а.

1. N.N. Nalivaeva et al. (2016) New Insights into Epigenetic and Pharmacological Regulation of Amyloid-Degrading Enzymes, *Neurochem. Res.*, **41**: 620-630.
2. M.A. Tikhonova et al. (2017) Neuroprotective Effects of Ceftriaxone Treatment on Cognitive and Neuronal Deficits in a Rat Model of Accelerated Senescence, *Behav. Brain. Res.*, **in press**.

АНАЛИЗ МИКРОДИССЕКЦИОННЫХ БИБЛИОТЕК ХРОМОСОМ СТЕРЛЯДИ (*ACIPENSER RUTHENUS*) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДАННЫХ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Андреюшкова Д.А.^{1*}, Макунин А.И.¹, Беклемишева В.Р.¹, Романенко С.А.^{1,2}, Дружкова А.С.^{1,2}, Билтуева Л.С.¹, Сердюкова Н.А.¹, Графодатский А.С.^{1,2}, Трифонов В.А.^{1,2}

1 Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

2 Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

*e-mail: ada@mcb.nsc.ru

Одной из характерных особенностей осетровых рыб (сем. Acipenseridae) является большое число хромосом в кариотипе, что является результатом одной или более полногеномных дупликаций в эволюции данного таксона. Стерлядь (*Acipenser ruthenus*) обладает минимальным для осетровых числом хромосом (2n=120) и находится на стадии перехода от тетраплоидного состояния генома к диплоидному [1]. В связи с этим исследование кариотипа стерляди представляется важным для изучения эволюции геномов позвоночных в целом.

Микродиссекционные библиотеки хромосом стерляди и соответствующие им флуоресцентно меченые зонды были получены согласно описанной ранее методике [1]. Зонды были проанализированы с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) на метафазных хромосомах стерляди. Таким образом были выявлены, в частности, библиотеки паралогичных хромосом (образовавшихся в результате дупликации предковой хромосомы).

Библиотеки были секвенированы на платформе MiSEQ Illumina. Для анализа полученных данных использовался метод выравнивания коротких прочтений на референсный геном, ранее предложенный для работы с хромосомспецифичными DOP- и WGA-библиотеками [2]. В качестве рефе-

ренсного генома был взят геном панцирной щуки (*Lepisosteus oculatus*), принадлежащей к костным ганоидам (Holostei), в эволюции которых после расхождения с другими лучепёрыми рыбами не было стадий полиплоидизации [3].

В результате выравнивания удалось выявить районы хромосом панцирной щуки, гомологичные исследуемым хромосомам стерляди, несмотря на значительное время дивергенции между двумя видами (около 360 млн лет). Анализ библиотек паралогичных хромосом показывает сходные картины выравнивания на референсный геном. Таким образом, данный биоинформатический метод может применяться для поиска гомологичных хромосомных районов разных видов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-14-00275 и программой фундаментальных научных исследований по теме 0310-2016-0010.

1. S.A. Romanenko et al. (2015) Segmental paleotetraploidy revealed in sterlet (*Acipenser ruthenus*) genome by chromosome painting, *Mol. Cytogenet.*, **8**: 90.
2. A.I. Makunin et al. (2017) Contrasting origin of B chromosomes in two cervids (Siberian roe deer and grey brocket deer) unravelled by chromosome-specific DNA sequencing, *BMC Genomics*, **17**: 618.
3. I. Braash et al. (2016) The spotted gar genome illuminates vertebrate evolution and facilitates human-teleost comparisons, *Nature genetics*, **48**: 427-437.

РАЗНООБРАЗИЕ ГЕНОМОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ НА ХРОМОСОМНОМ УРОВНЕ

Графодатский А.С.^{1,2*}

1 Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск

2 Новосибирский Государственный Университет, Новосибирск

*e-mail: graf@mcb.nsc.ru

Только методы цитогенетики позволяют видеть геномы эукариот «целиком». Многие из важных макрогеномных характеристик остаются вне поля зрения секвенирования и последующих сборок, но относительно легко обнаруживаются при микроскопических исследованиях. Определенное совмещение данных о разнообразии хромосомной организации геномов и данных полногеномного секвенирования предполагалось при обсуждении программы по секвенированию геномов 10 тысяч видов позвоночных (Genome 10K) и предполагается сейчас при обсуждении программы (Earth BioGenome Project) по тотальному секвенированию геномов ВСЕХ видов эукариот (около двух миллионов видов, предполагаемая стоимость проекта около 20 миллиардов долларов).

Среди 5,5 тысяч видов млекопитающих секвенирование геномов очень разной степени успешности проведено для пары сотен видов, примерно для 3-х тысяч видов мы имеем сведения о структуре их хромосомных наборов, также очень разного уровня разрешения.

В докладе будут представлены данные об особенностях организации геномов видов млекопитающих всех основных отрядов, представляющие интерес как на начальных этапах, так и в завершающей фазе проектов по секвенированию геномов.

Работа была поддержана грантом Российского Научного Фонда (РНФ) 16-14-10009

ИЗУЧЕНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ ПЕРЕСТРАИВАЕМЫХ ЦЕПЕЙ Т-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА У СТЕРЛЯДИ ACIPENSER RUTHENUS С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЛАТФОРМЫ ILLUMINA MISEQ

Гусельников С.В.^{1,2*}, Кулемзин С.В.¹, Горчаков А.А.^{1,2}, Чикаев Н.А.¹, Макунин А.И.¹, Трифонов В.А.^{1,2}, Таранин А.В.^{1,2}

1 Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск

2 Новосибирский государственный университет, Новосибирск

*e-mail: sguselnikov@mcb.nsc.ru

Антиген-распознающий Т-клеточный рецептор (TcR) представляет собой димер (alpha-beta или gamma-delta), в котором каждая мономерная цепь содержит по два ИГ-подобных домена: варибельный V и константный C. В ходе созревания Т-лимфоцита V гены TcR перестраиваются, что дает каждой Т-клетке уникальный рецептор, распознающий только «свой» антиген. Целью данной работы было изучение репертуара перестраиваемых генов alpha, beta, gamma и delta цепей TcR стерляди на уровне кДНК.

Мы провели биоинформационный анализ транскриптома селезенки и генома стерляди, полученных ранее в ИМКБ СО РАН, и идентифицировали по два C сегмента для каждой TcR цепи. Затем мы амплифицировали 5'RACE кДНК из селезенки стерляди с использованием универсального и восьми C-специфичных праймеров. Из пулов 5'-концов TcR кДНК была получена библиотека для секвенирования, которая была проанализирована на приборе Illumina Miseq (частичная загрузка, прочтение с двух концов по 300 циклов). Всего было получено около 30 тыс. полных состыкованных алгоритмом FLASH последовательностей, по 2-5 тыс. для каждой цепи.

Анализ последовательности TcR транскриптов стерляди показал, что локусы TcR у данного вида, как и у других позвоночных, имеют транслоконный тип строения и содержат ~10-100 V генных сегментов, ~10 D (для TcRbeta и delta), ~10 J и 1 C сегмент. В месте сшивки V-J и V-D-J генных сегментов могут удаляться или добавляться до 10 нуклеотидов и, таким образом, длина CDR3 может сильно варьировать.

Полученные данные свидетельствуют о том, что репертуар перестраиваемых alpha, beta, gamma и delta цепей Т-клеточного рецептора у представителя хрящекостных рыб стерляди не уступает по разнообразию TcR млекопитающих. Эволюция TcR стерляди шла путем дубликации и контракции разных генных сегментов независимо в разных дублицированных локусах.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ №14-14-00275 (анализ транскриптома и генома, miseq), а также гранта РФФИ №17-04-01519 (клонирование и анализ кДНК TcR стерляди).

ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ДЛЯ АНАЛИЗА ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ M5C/Ψ-МОДИФИЦИРОВАННЫХ АНАЛОГОВ МАЛЫХ ЯДЕРНЫХ И МАЛЫХ ЯДРЫШКОВЫХ РНК В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Степанов Г.А.^{1*}, Журавлев Е.С.^{1,2}, Шендер В.О.³, Арапиди Г.П.³, Ануфриева К.С.³, Нуштаева А.А.¹, Балахонова Е.А.¹, Говорун В.М.³, Семенов Д.В.¹, Рихтер В.А.¹

1 Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

2 Новосибирский государственный университет, Новосибирск

3 Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

*e-mail: stepanovga@niboch.nsc.ru

Благодаря развитию высокопроизводительных методов секвенирования непрерывно увеличивается объем данных, описывающих наличие природных неканонических нуклеотидов в структуре представителей большинства классов некодирующих РНК (нкРНК). В данной работе в качестве модели для исследования были выбраны малые ядерные РНК (мяРНК) и малые ядрышковые РНК (мяоРНК). С помощью транскрипции *in vitro* были получены 5'-кэпированные РНК-конструкции с последовательностями природных U25, U35a и U74 C/D-бок-мяоРНК, а также Ubatac и U12 мяРНК человека, содержащие 5-метилцитидин (m₅C) и псевдоуридин (Ψ). В ходе трансфекции полученных РНК в клетки человека было установлено, что введение в структуру коротких нкРНК Ψ и m₅C существенно снижает как иммуностимулирующее, так и цитотоксическое действие РНК-конструкций. Для оценки неспецифичных эффектов аналогов нкРНК была выбрана культура клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7; для выявления процессов, уникальных для каждой РНК, – линия клеток аденокарциномы яичников SK-OV-3. Изменения в экспрессии генов на обеих моделях были про-

анализированы с помощью метода высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina. На первой модели было выявлено, что Ψ и m₅C обеспечивают схожий эффект в подавлении иммуностимулирующей активности синтетических РНК, предположительно, за счет нарушения взаимодействия аналогов нкРНК с внутриклеточными рецепторами, в частности, RIG-I. Отсутствие активации системы врожденного иммунного ответа в клетках SK-OV-3 позволило выявить специфические пути функционирования аналогов коротких нкРНК. В частности, было установлено, что под действием аналога Ubatac мяРНК происходит подавление синтеза РНК, осуществляемого с промотора РНК-полимеразы III; под действием аналога U74 мяоРНК наблюдалось снижение уровня мРНК гена *NOP56*. Выявленные особенности указывают на специфичное узнавание каждого класса нкРНК и проявление механизма направленной репрессии, так как обнаруженные пути могут приводить к нарушению биогенеза Lsm-класса мяРНК и C/D-бок-мяоРНК, соответственно.

Работа поддержана Грантами РФФИ 16-04-01414, 16-34-60136, РНФ 16-14-10284.

ИЗУЧЕНИЕ ЭВОЛЮЦИИ ГЕНОМА СВОБОДНОЖИВУЩЕГО ПЛОСКОГО ЧЕРВЯ MACROSTOMUM LIGNANO (PLATYHELMINTHES, TURBELLARIA) С ПОМОЩЬЮ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ МИКРОДИССЕКЦИОННЫХ ДНК-БИБЛИОТЕК

Задесенец К.С.^{1*}, Березиков Е.В.^{1,2}, Тупикин А.Е.³, Кабилов М.Р.³, Рубцов Н.Б.¹

1 ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

2 ERIBA, University of Groningen, Groningen, The Netherlands

3 Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

* e-mail: kira_z@bionet.nsc.ru

Свободноживущий плоский червь *Macrostomum lignano* является модельным организмом для изучения регенерации и старения. Изучение высокой частоты анеуплоидии по самой крупной хромосомы в кариотипе *M. lignano*, выявленной в лабораторных линиях и природных популяциях, а также кариотипирование близкородственных видов и эксперименты по скрещиванию предварительно кариотипированных особей (Zadesenets et al. 2016) стимулировали изучение молекулярного состава хромосом этого вида. Получение и CISS-гибридизация микродиссекционных ДНК-проб индивидуальных хромосом и районов самой крупной хромосомы в кариотипе *M. lignano* (Mli1) выявили в его геноме скрытую тетраплоидию (Zadesenets et al. 2017). Было обнаружено, что хромосома MLI1 содержит крупные районы, гомологичные всем остальным хромосомам *M. lignano*. Показано, что хромосома MLI1 в своем составе, возможно, содержит практически целую копию всего гаплоидного генома *M. lignano*. В настоящее время проведено секвенирование микродиссекционных ДНК-

библиотек хромосомы Mli1 и второй по размеру хромосомы *M. lignano* (Mli2). На базе результатов полногеномного секвенирования генома *M. lignano* проводится биоинформатический анализ результатов секвенирования микродиссекционных ДНК библиотек для выявления и сравнения контигов хромосомы Mli2 и гомологичной ей части хромосомы Mli1, который позволит оценить уровень дивергенции паралогичных районов хромосом *M. lignano*. Рассмотрены возможные сценарии формирования современного генома *M. lignano*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 16-34-60027. Секвенирование проводилось на платформе MiSeq (Illumina) в ЦКП «Геномика» СО РАН.

1. K.S. Zadesenets et al. (2016) Evidence for karyotype polymorphism in the free-living flatworm, *Macrostomum lignano*, a model organism for evolutionary and developmental biology, PLoS One, **11**: e0164915.
2. K.S. Zadesenets, L. Schärer, N.B. Rubtsov. (2017) New insights into the karyotype evolution of the free-living flatworm *Macrostomum lignano* (Platyhelminthes, Turbellaria). Sci Rep. (in press).

ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ ХРОМОСОМ

Макунин А.И.^{1*}, Прокопов Д.Ю.^{1,2}, Кичигин И.Г.¹, Дружкова А.С.^{1,2}, Графодатский А.С.^{1,2}, Трифонов В.А.^{1,2}

1 Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск

2 Новосибирский государственный университет, Новосибирск

*e-mail: alex@mcb.nsc.ru

Повсеместное распространение методов высокопроизводительного секвенирования произвело революцию в генетике, приведя к появлению таких направлений, как геномика и транскриптомика. Спектр решаемых задач чрезвычайно широк и охватывает все уровни организации генома. В частности, для исследования хромосом применяется несколько довольно дорогостоящих и трудоемких методов картирования. При этом, получаемые данные зачастую не имеют привязки к реальному кариотипу и, как следствие, к данным цитогенетики. Это ограничение можно обойти секвенированием библиотек ДНК хромосом, выделенных микродиссекцией или сортированием: они давно и успешно используются как зонды для *in situ* гибридизации.

Мы разработали конвейер DOPseq_analyzer, включающий очистку прочтений, выравнивание на референсный геном и его разделение по плотности картирования прочтений. Применение конвейера к реальным данным показало, что нескольких сотен тысяч коротких прочтений достаточно для определения границ районов, представленных на хромосомах, с точностью <10 тыс. п.н. Помимо

этого, с применением существующих инструментов можно идентифицировать отдельные хромосом-специфичные мутации, а также оценить спектры повторенных последовательностей ДНК. Ограничения связаны с малым количеством исходной ДНК и особенностями последующей амплификации. В результате библиотеки содержат лишь 10-20% последовательностей ДНК исходной хромосомы, что сильно затрудняет функциональный и структурный анализ. Кроме того, чувствительность метода ожидаемо снижается с увеличением эволюционной дистанции между исследуемым и референсным видами.

Области применения разработанного подхода включают описание межхромосомных перестроек для видов, геномы которых еще не были отсеквенированы; приписывание крупных скэффолдов к хромосомам для видов с недособранными геномами; выяснение состава сверхчисленных, добавочных и половых хромосом.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 16-14-10009 и программы фундаментальных научных исследований 0310-2016-0010.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЛОГЕНИЯ ГАПЛОГРУПП СТЕРЛЯДИ ACIPENSER RUTHENUS И СИБИРСКОГО ОСЕТРА A. BAERII, ОСНОВАННАЯ НА АНАЛИЗЕ ПОЛНЫХ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОМОВ

Побединцева М.А.^{1,2*}, Макунин А.И.¹, Дружкова А.С.^{1,2}, Сердюкова Н.А.¹, Воробьева Н.В.¹, Интересова Е.А.³, Графодатский А.С.^{1,2}, Трифонов В.А.^{1,2}

1 Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

2 Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

3 Новосибирский филиал ФГБНУ Госрыбцентр, г.Новосибирск

*e-mail: mapob@mcb.nsc.ru

Осетрообразные (Acipenseriformes) – древнейший отряд класса Лучеперых рыб, в реках Сибири представлен стерлядью (*Acipenser ruthenus*) и сибирским осетром (*A. baerii*). Представителей отряда в литературе часто называют «живыми ископаемыми», поскольку незначительно отличающиеся от современных видов ископаемые формы осетрообразных обнаруживаются уже в позднем меловом периоде (100 млн лет назад).

В настоящее время филогения осетровых остается противоречивой, существуют проблемы с идентификацией отдельных видов, а также поднимаются вопросы о выделении подвидов внутри вида.

Ранее нами была собрана большая коллекция стерляди и сибирского осетра из некоторых европейских рек и рек Сибири, и на основании секвенирования контрольного района митохондриальной ДНК выявлены основные гаплотипы и гаплогруппы а также показана изоляция между популяциями бассейнов Оби и Енисея. Однако анализ короткого участка мтДНК не может дать точных данных о молекулярной датировке расхождения основных гаплогрупп.

Поэтому для уточнения оценки времени базальной дивергенции внутри обоих видов, мы перешли к рассмотре-

нию полных митохондриальных геномов основных гаплогрупп обоих видов.

Для представителей основных гаплогрупп стерляди и сибирского осетра, а также шипа (*A. nudiventris*) (родственного стерляди вида) было проведено обогащение митохондриальной ДНК, секвенирование на платформе Illumina MiSeq и сборка полных митохондриальных геномов. На основании этих данных с привлечением ранее опубликованных митохондриальных геномов мы построили филогенетическое древо и рассчитали времена дивергенции основных гаплогрупп. Общая топология древа не противоречит ранее опубликованным данным и уточняет положение шипа как ближайшего к стерляди вида. По впервые полученным для полных митохондрий популяционным данным, гаплогруппы стерляди сформировались гораздо раньше, чем произошла дивергенция некоторых других видов осетровых, что диктует необходимость пересмотра видовых статусов некоторых представителей семейства осетровых.

Работа поддержана грантом РНФ № 14-14-0027500275 и программой фундаментальных научных исследований по теме 0310-2016-0010.

ИЗУЧЕНИЕ КАРИОТИПА КОПЫТНОГО ЛЕММИНГА (*DICROSTONYX TORQUATUS*) С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ОТДЕЛЬНЫХ ХРОМОСОМ

Прокопов Д.Ю.^{1,2*}, Макунин А.И.¹, Романенко С.А.^{1,2}, Дружкова А.С.^{1,2}, Графодатский А.С.^{1,2}, Трифонов В.А.^{1,2}

1 Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск

2 Новосибирский государственный университет

*e-mail: dprokopov@mcb.nsc.ru

Копытный лемминг (*Dicrostonyx torquatus*) представляет значительный интерес с точки зрения сравнительной геномики благодаря необычной и не до конца изученной системе половых хромосом, а также наличию большого числа добавочных хромосом. Применение технологий секвенирования нового поколения для анализа кариотипа *D. torquatus* позволит изучить происхождение, состав и эволюцию кариотипа на более высоком уровне, который недостижим при использовании методов классической и молекулярной цитогенетики.

Ранее методом проточной цитометрии кариотип лемминга был разделен на отдельные пики [1]. С помощью метода микродиссекции с одной метафазной пластинки были изолированы 14 добавочных хромосом. Прочтения, полученные в результате секвенирования на платформе Illumina MiSeq сортированных пиков и микродиссекционных библиотек, были очищены от адаптеров и выровнены на геном домового мыши (*Mus musculus*). Был проведен поиск

районов, представленных на хромосомах.

Проведен кластерный анализ состава повторенной ДНК с помощью программы Transposome с аннотацией по библиотеке RepBase для млекопитающих.

Были идентифицированы координаты хромосомных перестроек относительно генома *M. musculus*, полученные данные не только подтверждают, но и дополняют данные цитогенетических исследований.

Были обнаружены 7 уникальных районов общим размером 1,4 миллиона пар нуклетидов с 10 генами на добавочных хромосомах *D. torquatus*.

Анализ повторённых последовательностей показал различия в составе аутосом и добавочных хромосом.

Работа поддержана грантом РФФИ 16-14-10009.

1. SA Romanenko et al. (2016) Genome-wide comparative chromosome maps of *Arvicola amphibius*, *Dicrostonyx torquatus*, and *Myodes rutilus*. *Chromosome Res* 24: 145-159

ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСКРИПТОМА ПЕРВИЧНЫХ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НА ПОВЕРХНОСТИ МИКРОВОЛОКНИСТЫХ МАТРИКСОВ РАЗНОГО СОСТАВА

Степанова Алёна О.^{1,2*}, Лактионов Пётр П.³, Лактионов Павел П.^{1,2}

1 Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,

2 Институт патологии кровообращения им. ак. Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия,

3 Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН,

*e-mail: lebedeva@niboch.nsc.ru

Известно, что состав и структура матрикса, на поверхности которого культивируют клетки, влияют на их адгезию и пролиферацию [1, 2]. Для того, чтобы подобрать матриксы для тканевой инженерии сосудов мы исследовали влияние состава матриксов на профиль экспрессии генов первичных эндотелиоцитов (HUVES). HUVES получали из пупочной вены человека и культивировали на микроволоконистых матриксах, изготовленных методом электро-спиннинга, из растворов чистого поликапролактона (ПКЛ) в гексафторизопропанол и растворов ПКЛ с желатином. Для профилирования экспрессии генов HUVES двух биологических доноров культивировали на поверхности культурального пластика и 6 типов матриксов, в том числе и в условиях пульсирующего потока среды. РНК выделяли по протоколу Trizol (Life Technologies), мРНК библиотеки и секвенировали в центре биотехнологии г. Турку (Финляндия). Данные выравнивали на референсный геном (human hg38) и нормализовали между образцами с использованием платформы Galaxy project, для поиска диффе-

ренциально экспрессируемых генов использовали систему DEseq. Для функционального анализа дифференциально-экспрессированных генов и выбранного набора генов, определяющих функциональный статус эндотелия использовали данные базы Gene Ontology. На основании данных по экспрессии основных функционально-значимых генов эндотелия наилучшим для культивирования является матрикс из поликапролактона, содержащий в составе волокна 10% желатина и фиксированный глутаровым альдегидом (ПКЛ10ЖФ). Поток среды принципиально влияет на экспрессию генов HUVES, при этом функциональный статус клеток, культивируемых в потоке среды на поверхности ПКЛ10ЖФ наиболее близок к таковому у клеток, формирующих нормальный эндотелий.

Работа поддержана из средств проекта ФНИ по теме 62, № 0309-2016-0006

1. Chung TW, et al, *Biomaterials*. 2003. Vol. 24. № 25. P. 4655-4661.
2. Lamichhane S et al, *J Biomed Mater Res Part A*. 2016. Vol. 104A. P. 2291-2304.

ИЗМЕНЕНИЯ ТРАСКРИПТОМА КОРЫ МОЗГА ПРИ РАЗВИТИИ ПРИЗНАКОВ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА У КРЫС OXYS

Стефанова Н.А.

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

e-mail: stefanovan@mail.ru

Болезнь Альцгеймера (БА) – самое распространенное нейродегенеративное заболевание, развитие которого контролирует множество взаимодействующих генетических и средовых факторов. Обнаружение мутаций генов *APP*, *PSEN1* и *PSEN2* определило значительный успех в изучении патогенеза наследственной формы БА (~5% всех случаев заболевания). Несмотря на выявленные ассоциации с полиморфизмами в ряде генов, конкретные молекулярно-генетические механизмы развития спорадической формы БА (~95% всех случаев заболевания) остаются не ясными. Молекулярно-генетические предпосылки развития признаков БА у крыс OXYS были исследованы методом RNA-seq. Транскриптом префронтальной коры мозга крыс OXYS и Вистар (контроль) сравнивали на доклинической стадии (возраст 20 дней), в период активной манифестации (3–5 мес.) и прогрессии (18 мес.) признаков БА у крыс OXYS. Показано, что в возрасте 20 дней у крыс OXYS количество дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) было больше и с возрастом увеличивалось. Определены функциональные группы, представленные в основном разными наборами ДЭГ, основная часть продуктов которых участвует в процессах развития ЦНС, синаптической передаче и нейрональной пластичности. Признаки БА у крыс OXYS: нарушение когнитивных

функций, деструктивными изменениями нейронов, синапсов и гиперфосфорилирование тау-белка – развиваются к возрасту 3–5 мес. на фоне изменения уровня мРНК > 900 генов. Прогрессия этих признаков с 5 до 18 мес., а также гибель нейронов, накопление Аβ-42 и образование амилоидных бляшек в мозге крыс OXYS происходят на фоне изменения экспрессии >5500 генов, в том числе генов, связанных с процессингом APP, агрегацией и деградацией Аβ, регуляцией тау-белка, функциями митохондрий, синапсов. Изменения транскриптома коры мозга крыс OXYS с выраженными признаками БА согласуются с результатами транскриптома коры больных БА: общими для человека и крыс были изменения экспрессии >100 генов, связанных, прежде всего с функциями митохондрий. Более того, выявлено 70%-е перекрытие по сигнальным путям, в том числе пути БА, изменения экспрессии генов в котором связано с митохондриальной дисфункцией, синаптической пластичностью и Ca²⁺ сигнальным путем. В целом, результаты позволяют предполагать, что отклонения в процессе развития мозга могут быть предикторами развития признаков БА у крыс OXYS и, возможно, БА у людей.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект 16-15-10005).

СЕКВЕНИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ГЕНОМА И ТРАСКРИПТОМА СТЕРЛЯДИ (*ACIPENSER RUTHENUS*)

Трифонов В.А.^{1,2*}, Макунин А.И.¹, Романенко С.А.^{1,2}, Беклемишева В.Р.¹, Билтуева Л.С.¹, Прокопов Д.Ю.^{1,2}, Побединцева М.А.^{1,2}, Дружкова А.С.^{1,2}, Андреюшкова Д.А.¹, Гусельников С.В.¹, Сердюкова Н.А.¹, Кудрявцева А.В.³, Комиссаров А.С.⁴, Кливер С.Ф.⁴, Шартл М.⁵, Графодатский А.С.^{1,2}

1 Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

2 Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

3 ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, г. Москва

4 Центр геномной биоинформатики им.Добрянского, СПбГУ, г. Санкт-Петербург

5 Биоцентр, г. Вюрцбург, ФРГ

*e-mail: vlad@mcb.nsc.ru

Стерлядь (*Acipenser ruthenus*) относится к хрящевым ганоидам – подклассу лучеперых рыб, занимающему уникальное филогенетическое положение на древе позвоночных – сестринское по отношению к костистым рыбам. Как и другие представители осетровых, стерлядь отличается консервативной морфологией, медленной молекулярной эволюцией, поздним созреванием, длинным жизненным циклом, большим числом хромосом, неясной системой определения пола и склонностью к межвидовой гибридизации. Мы провели секвенирование геномов и транскриптомов самца и самки стерляди из Обь-Иртышского бассейна на платформах Illumina и RASBio, провели их сборку, охарактеризовали наиболее распространенные повторенные элементы генома этого вида и выявили наличие паралогов у ряда генов. Объединение с данными по стерляди из Дуная позволило значительно улучшить качество сборки генома. Исследование отдельных хромосом методами микродиссекции, пэинтинга и секвенирования позволило выявить наличие протяженных сегментов генома как в диплоидном так и в тетраплоидном состоянии,

указывающим на незавершенность процесса диплоидизации после древнего (более 100 млн лет назад) полного удвоения генома. Тетраплоидное состояние генома сильно усложняет процесс сборки и ставит дополнительные вопросы, связанные с субфункционализацией и псевдогенизацией отдельных генов и геномных сегментов. Исследование транскриптомов позволило выявить новые локусы легких цепей иммуноглобулинов (IgL) у стерляди и уточнить филогенетические взаимоотношения легких цепей у позвоночных в целом. Выявленные в процессе секвенирования и сборки повторенные элементы генома оказались очень удобными для идентификации хромосом в кариотипе и показали неравномерность эволюции разных групп хромосом. В результате сравнения транскриптомов стерляди и сибирского осетра (*A. baerii*) разработаны ПЦР-маркеры, необходимые для правильной идентификации вида и выявления гибридов.

Работа поддержана грантом РФФ № 14-14-00275 и программой фундаментальных научных исследований по теме 0310-2016-0010.

INFLAMMATORY RESPONSE REGULATED A KINASE ACTIVITY OF RIP1 KINASE

Ilyukha V.V.^{1*}, Schworer S.², Poltorak A.^{1,2}¹ Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russia² Department of Pathology, Program in Immunology, Tufts University, Boston, MA

* e-mail: karax911@mail.ru

Receptor interacting protein (RIP) kinase 1 is a member of the family of serine/threonine kinases that is best characterized as mediator of stress responses to activate NF- κ B, MAPK, apoptosis, and necrosis [1]. The kinase activity of RIP1 is required predominantly for the receptor-mediated necroptosis whereas pro-inflammatory signaling is dependent on the scaffolding function of RIP1 [2,3]. Multiple recent reports have identified that, in addition to its role in executing necroptosis, RIP1 kinase activity contributes to *in vivo* cytokines production [4] suggesting that the molecular components of this signaling pathway warrant elucidation. In this study, we have established an *in vitro* system in which inhibition of Caspases using pan-caspase inhibitor ZVAD in bone marrow-derived macrophages led to an increase in pro-inflammatory cytokine production that was inhibited by Necrostatin-1, a specific inhibitor of the kinase activity of RIP1 thus confirming that the effect of RIP1 on the cytokines levels is RIP1-specific. The effect of RIP1 kinase was compared in two genetically diverse mouse lines such as C57BL6 and MOLF. While ZVAD treatment led to an increase in TNF, CCL3, CXCL2, and IFN β but not IL-6 in B6 and MOLF macrophages, though the MOLF response was more robust. Biochemical analysis using chemical inhibitors revealed that p38 and TAK1 kinases were important for RIP1 kinase dependent high responses

of MOLF. Additionally, IRAK2 may be an important contributor to the hyper-production of pro-inflammatory cytokines by MOLF in a RIP1 kinase dependent fashion, however whether this occurs through inducing p38 activation is not entirely clear. Using next generation sequencing (NGS) in expression analysis of up-regulated genes, we compared RIP1-mediated expression in C57BL6 and MOLF macrophages at the genome-wide level. Overall, the data establish a model in which TLR signaling in the presence of ZVAD introduced a RIP1 kinase-dependent arm to the production of pro-inflammatory cytokines.

The study was carried out with the support of the state task of the Ministry of Education and Science of Russia, project 6.5111.2017/BCH

1. Zhang, D., J. Lin, and J. Han. 2010. Receptor-interacting protein (RIP) kinase family. *Cell Mol Immunol* 7: 243–249.
2. Meylan, E., K. Burns, K. Hofmann, V. Blancheteau, F. Martinon, M. A. Kelliher, and J. Tschopp. 2004. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF- κ B activation. *Nat Immunol* 5: 503–507.
3. Lee, T. H., J. Shank, N. Cusson, and M. A. Kelliher. 2004. The Kinase Activity of Rip1 Is Not Required for Tumor Necrosis Factor- α -induced I κ B Kinase or p38 MAP Kinase Activation or for the Ubiquitination of Rip1 by Traf2. *J. Biol. Chem.* 279: 33185–33191.
4. Christofferson, D. E., Y. Li, J. Hitomi, W. Zhou, C. Upperman, H. Zhu, S. A. Gerber, S. Gygi, and J. Yuan. 2012. A novel role for RIP1 kinase in mediating TNF- α production. *Cell Death Dis* 3: e320.

A NOVEL APPROACH FOR MAPPING OF ANIMAL GENOME ASSEMBLIES TO A CHROMOSOMAL LEVEL APPLIED TO AVIAN GENOMES

Damas J.¹, O'Connor R.E.², Farre M.¹, Martell H.², Slack E.A.¹, Allanson E.¹, Kiazim L.², Jennings R.², Mandawala A.³, Joseph S.², Fowler K.E.³, Griffin D.K.², Larkin D.M.*¹¹ Royal Veterinary College, University of London, London, UK² University of Kent, Canterbury, Kent, UK³ Canterbury Christchurch University, Canterbury, Kent, UK

*dmlarkin@gmail.com

The ultimate aim of a genome assembly is to create a contiguous length of sequence from p- to q- terminus of each chromosome. Most assemblies are however, highly fragmented, limiting their use in studies of trait linkage, phylogenomics and genomic organisation. To overcome these limitations, we developed a novel scaffold-to-chromosome anchoring method combining Reference-Assisted Chromosome Assembly (RACA) and fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) to position scaffolds on chromosomes. Scaffolds generated from *de novo* sequenced genomes were ordered and orientated using RACA against a reference and outgroup genome into 'predicted chromosome fragments' (PCFs) for 18 previously published avian genomes. PCFs were verified using PCR for 6 genomes and the second round of RACA was run for all genomes using settings derived from the PCR results. A universal set of FISH probes developed through the selection of conserved regions in 21 avian genomes were then used to map PCFs of the peregrine falcon (*Falco pere-*

grinus) and rock pigeon (*Columba livia*) genomes. We were able to physically map 87% of the peregrine and 84% of the pigeon genome, improving the N50 of both seven-fold, as well as identify a series of intra and interchromosomal rearrangements. Additional genomes mapped using this method include the ostrich (*Struthio camelus*), the saker falcon (*Falco cherrug*) and the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*). Comparative analysis of evolutionary breakpoint regions identified in the upgraded genome assemblies demonstrated that positions of interchromosomal breaks in avian genomes are limited to the genome intervals with unusually low level of sequence conservation. This likely to shed light on why most avian species have very stable karyotypes. Our combined FISH and bioinformatics approach represents a step-change in the mapping of genome assemblies. This makes verification and upgrade of any avian genome assembly with long scaffolds to chromosomes an easy task allowing comparative genomic research at a higher resolution than previously possible.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ CRISPR/Cas9 ИНАКТИВАЦИИ ГЕНА VHL В КЛЕТКАХ РАКА ПОЧКИ

Артемов А.В.^{1*}, Жигалова Н.А.¹, Женило С.В.¹, Мазур А.М.¹, Прохорчук Е.Б.¹

¹ Институт Биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

* email: artem.v.artemov@gmail.com

Инактивация гена VHL – ключевое событие, приводящее к раку почки. При нормальной концентрации кислорода VHL подавляет ответ на гипоксию, обусловленный транскрипционным фактором HIF1a. Ранее было показано, что условия гипоксии ингибируют TET-зависимое гидроксиметилирование цитозинов и вызывают гиперметилирование ДНК в промоторах генов [1].

В данной работе мы инактивировали ген VHL при помощи CRISPR/Cas9-редактирования и изучили эффекты инактивации на экспрессию генов и метилирование ДНК. Мы профилировали метилирование ДНК и экспрессию генов в клетках Saki-1 до и после инактивации VHL. Было проведено секвенирование РНК (RNA-seq) и секвенирование RRBS для определения метилирования для трех биологических повторностей линии Saki-1 с отредактированным VHL и для трех контрольных повторностей линии Saki-1.

Мы показали, что инактивация VHL, как и гипоксия, приводит к увеличению экспрессии генов ответа на гипоксию, таргетов транскрипционного фактора Hif1a и генов, участвующих в гликолизе.

Так как условия гипоксии могут вызывать гиперметилирование в определенных локусах генома [1], мы изучили, приводит ли инактивация VHL, которая похожа на гипоксию в плане активации генов и сигнальных путей, но

отличается биохимически по редокс потенциалу и активности оксидоредуктаз, к похожим эффектам. Мы сравнили метилирование ДНК между клеточными линиями с диким типом VHL и клоном клеток данной линии, в котором данный ген инактивирован сдвигом рамки при помощи CRISPR/Cas9. Мы показали, что даже без гипоксии при инактивации VHL происходит гиперметилирование генома. Таким образом, нами был предложен механизм гиперметилирования генома, альтернативный предложенному в [1].

Мы нашли дифференциально метилированные районы (DMR), связанные с инактивацией VHL, и показали, что они расположены около сайтов начала транскрипции и ассоциированы с генами, регулирующими транскрипцию, и модификаторами хроматина. Экспрессия таких генов, как мы показали, антикоррелирует с метилированием промоторных DMR.

В попытке отнести изменения в метилировании к определенным эпигенетическим особенностям генома мы обнаружили один из самых высоких среди всех факторов транскрипции уровень гиперметилирования в сайтах связывания AP-1 (Jun/Fos) и TRIM28, тогда как в сайтах деацетилазы гистонов HDAC6 происходит гипометилирование.

Работа поддержана грантом РФФИ #14-14-01202.

1. B. Thienpont, J. Steinbacher, H. Zhao, et al. (2016) Tumour Hypoxia Causes DNA Hypermethylation by Reducing TET Activity, Nature, 537 (7618): 63–68.

РЕПЛИКАТИВНЫЙ АНАЛИЗ АССОЦИАЦИЙ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА, ШИЗОФРЕНИИ И КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО ГЕНОТИПИРОВАНИЯ МЕТОДОМ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ.

Бочарова А.В.^{1*}, Вагайцева К.В.¹, Марусин А.В.¹, Макеева О.А.¹, Степанов В.А.¹

¹ НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, Томск

*e-mail: anna.bocharova@medgenetics.ru

Несмотря на то, что темп развития технологий секвенирования и постгеномных технологий увеличивается с каждым днем, точечное генотипирование SNP остается самым востребованным подходом в генетике человека и медицинской генетике. На сегодняшний день доступно большое количество высокопроизводительных методов генотипирования SNP. Применение мультиплексного генотипирования методом MALDI-TOF масс-спектрометрии имеет ряд преимуществ: точность, быстрота и эффективность анализа. В данной работе представлен опыт применения мультиплексного генотипирования SNP с помощью масс-спектрометрии на примере анализа 62 маркеров ассоциированных по данным GWAS с болезнью Альцгеймера (БА), шизофренией (ШЗ) и когнитивными функциями (КФ). На основании анализа базы данных GWAS выбраны маркеры, ассоциированные с БА, ШЗ и КФ. С помощью программы Sequenom Assay Design (www.sequenom.com) были сгенерированы две мультиплексные панели: 30-плекс и 32-плекс. В работу был включен 1870 человек

русской национальности, проживающих в Сибирском регионе (г. Томск, г. Кемерово, г. Чита): группа больных ШЗ (389), группа больных БА (108), контрольная группа для ШЗ (674) и для БА (712). Для оценки ассоциаций полиморфных вариантов генов с патологическим фенотипом рассчитывали показатель “отношение шансов” – OR. Отличия считали статистически значимыми для $p < 0,05$. Для 5 SNPs при сравнении исследованных выборок выявлена статистически значимая ассоциация с ШЗ (rs11064768 гена *CCDC60*, rs16887244 гена *LSM1*, rs17594526 гена *TCF4*, rs7004633 межгенового региона *LOC105375629/LOC105375631*, rs7561528 гена *LOC105373605*), а для БА – 10 SNPs показали значимые ассоциации с фенотипом (rs10273775 гена *CNTNAP2*, rs12922317 гена *SNX29*, rs2075650 гена *ТОММ40*, rs2616984 гена *CSMD1*, rs3818361 гена *CR1*, rs429358 гена *АРОЕ*, rs4765905 гена *CACNA1C*, rs6656401 гена *CR1*, rs6857 гена *PVRL2*, rs769449 гена *АРОЕ*).

Работа была поддержана грантом РФФИ № 16-15-00020.

ПОЛНОГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ НАТИВНОЙ И ФИКСИРОВАННОЙ В ФОРМАЛИНЕ ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ В СРАВНИТЕЛЬНОМ АСПЕКТЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ СОБЫТИЙ

Гервас П.А.^{1*}, Денисов Е.В.^{1,2}, Киселев А.М.³, Перельмутер В.М.¹, Чердынцева Н.В.¹

1 НИИ онкологии, Томский НИМЦ, Томск

2 Томский государственный университет, Томск

3 Институт молекулярной биологии и генетики, ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург

*e-mail: pgervas@yandex.ru

Формалин-фиксированные парафин-залитые образцы (FFPE) опухолевой ткани широко используются при секвенировании как в фундаментальных (например, для исследования мутационного ландшафта опухоли), так и в клинических (для выбора оптимальных схем лечения в зависимости от молекулярного профиля опухоли) целях. Однако корректность полученных результатов остается под вопросом. В данной работе мы провели полноэкзомное секвенирование свежего и формалин-фиксированного образцов одной и той же опухоли молочной железы с целью сравнения их генетического профиля. Библиотеки для секвенирования готовили с использованием набора для экзомного обогащения SureSelect^{XT} (Agilent, США) из тотальной ДНК, полученной с помощью набора DNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen, США). Секвенирование проводили на платформе Illumina NextSeq 500. Бионформатический анализ данных был вы-

полнен при помощи программного обеспечения Agilent SureCall и ANNOVAR. В свежем замороженном и формалин-фиксированном образцах опухолевой ткани было выявлено 161349 и 161350 молекулярно-генетических событий, соответственно, включая по 9999 однонуклеотидных замен (SNPs) для каждого образца. Общих SNPs для свежего и формалин-фиксированного образцов было обнаружено 7265, тогда как процент расхождений составил 27.4 (2734 SNPs), что может объясняться как формальдегид-обусловленной модификацией молекул ДНК, так и внутриопухолевой гетерогенностью. Таким образом, мы показали расхождение почти в трети SNPs между свежим и формалин-фиксированными образцами одной и той же опухоли молочной железы, причина которого должна быть установлена в будущих исследованиях.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (№ 14-15-00318).

ОЦЕНКА УРОВНЯ ГЕТЕРОПЛАЗМИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ СОННЫХ АРТЕРИЙ

Голубенко М.В.^{1,2*}, Бабушкина Н.П.¹, Зарубин А.А.³, Марков А.В.¹, Слепцов А.А.¹, Гончарова И.А.^{1,2}, Назаренко М.С.^{1,3}, Барбараш О.Л.², Пузырев В.П.^{1,3}

1 НИИ медицинской генетики ТНИМЦ РАН, Томск

2 НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово

3 Сибирский государственный медицинский университет, Томск

*e-mail: maria.golubenko@medgenetics.ru

Окислительный стресс является одним из важных факторов в патогенезе атеросклероза. Дыхательная цепь митохондрий – источник активных форм кислорода, и митохондриальная ДНК наиболее подвержена их воздействию, которое может приводить к возникновению соматических мутаций, существующих в клетке в состоянии гетероплазии. Уровень гетероплазмичных мутаций в мтДНК может, таким образом, служить индикатором повреждающего действия окислительного стресса.

Целью исследования была сравнительная оценка частоты и уровня гетероплазии мтДНК в образцах ДНК, полученных из лейкоцитов крови и материала атеросклеротических бляшек сонных артерий пациентов с атеросклерозом (n=19) и лейкоцитов крови здоровых лиц (n=14). Образцы бляшек были получены при проведении каротидной эндартерэктомии. Секвенирование митохондриального генома осуществляли с помощью технологии NGS Illumina (MiSeq). Полученные fastq файлы подвергали дополнительной фильтрации по качеству (в среде R). Минимальным пороговым уровнем для регистрации гетероплазии считали 1,5%.

Средняя частота гетероплазии в мтДНК (доля гетероплазмичных нуклеотидов от суммарного количества

нуклеотидов с более чем 1000х покрытием) являлась наиболее высокой в некодирующих регионах (1,5-2%) и была значимо выше (p<0,05), чем в генах белков, тРНК и рРНК, как в крови, так и в бляшке (средний уровень менее 0,5%). Среднее значение уровня гетероплазии (средняя доля мутантного аллеля в гетероплазмичных позициях) составило около 6% у пациентов и 5% у здоровых лиц. При сравнении частоты и среднего уровня гетероплазии не было выявлено статистически значимых различий между пациентами с атеросклерозом и здоровыми индивидами, а также между образцами ДНК из бляшек и из крови пациентов.

Таким образом, впервые получена характеристика гетероплазии мтДНК в атеросклеротической бляшке в сравнении с ДНК лейкоцитов. Результаты исследования указывают на относительную стабильность митохондриального генома в условиях повышенного окислительного стресса в процессе развития атеросклероза.

Исследование выполнено при поддержке РФФИ №16-04-01481-А (формирование выборок и подготовка образцов ДНК) и РНФ №14-15-00305 (проведение эксперимента, анализ данных) При проведении работ использовано оборудование ЦКП «Медицинская геномика» ТНИМЦ.

УСТАНОВЛЕНИЕ ГРАНИЦ ХРОМОСОМНЫХ ПЕРЕСТРОЕК У ПАЦИЕНТОВ С МИКРОДЕЛЕЦИЯМИ И МИКРОДУПЛИКАЦИЯМИ 3p26.3

Гридина М.М.^{1,2*}, Шнайдер Т.А.¹, Ковригин И.И.³, Мензоров А. Г.^{1,3}, Фишман В.С.^{1,3}

1 Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск

2 Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского НИМЦ, Томск

3 Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск

*gridinam@gmail.com

Хромосомные перестройки занимают существенное место в структуре наследственной нейропатологии человека. В НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ описаны два пациента с недифференцированной умственной отсталостью. Методом array-CGH для пациента F была показана микроделеция в районе 3p26.3, а для пациента К – микродупликация того же района. Установление точных границ описанных мутаций является важной задачей для изучения механизма развития заболевания.

Нами было проведено полногеномное секвенирование геномной ДНК обоих пациентов. Данные секвенирования были проанализированы тремя алгоритмами: MANTA, CANVAS и SVDetect. Все алгоритмы продемонстрировали сходные результаты. У пациента F обнаружена делеция фрагмента около 400 kb. Начало делеции находится в первом интроне гена *CNTN6*, конец – на расстоянии 120 kb после стоп-кодона *CNTN6*, то есть отсутствуют 22 из 23 экзонов.

В случае пациента К всеми используемыми алгоритмами показана дупликация фрагмента около 1 Mb. Методом прямого секвенирования по Сэнгеру была установлена точная граница тандемной дупликации: с 560 685 bp по 1,504 682 bp (GRCh37/hg19 human genome reference). Этот участок захватывает 600 kb до начала гена *CNTN6* и 50 kb после стоп-кодона гена. Более того, не было обнаружено каких либо дополнительных структурных нарушений внутри копий гена *CNTN6*.

Таким образом, несмотря на сходную клиническую картину заболевания обоих пациентов, для пациента F мы показали полное отсутствие одной из копий гена *CNTN6*, а для пациента К – присутствие в геноме дополнительной полноценной копии *CNTN6*.

Исследование поддержано грантом Российского научного фонда №14-15-00772-П

ПОИСК ГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ИНВАЗИЕЙ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Денисов Е.В.^{1,2*}, Киселёв А.М.³, Гервас П.А.¹, Таширева Л.А.¹, Завьялова М.В.¹, Перельмутер В.М.¹

1 НИИ онкологии, Томский НИМЦ, Томск

2 Томский государственный университет, Томск

3 Институт молекулярной биологии и генетики, ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург

*e-mail: dnsv.ev@gmail.com

Опухолевая инвазия может осуществляться коллективно в виде многоклеточных структур или индивидуально посредством миграции одиночных опухолевых клеток. Если механизмы инвазии охарактеризованы в достаточной мере, вклад генетических нарушений в данный процесс остается неизученным. В данном исследовании мы провели полноэкзомное секвенирование двух опухолей молочной железы, демонстрирующих разные варианты инвазии: коллективная (опухоль III, IC NST, люминальный B Her-2- подтип, T2N0M0, grade 2) и индивидуальная (опухоль M, IC NST, люминальный A, T3N1M0, grade 2) инвазии. Тотальная ДНК, полученная из образцов опухолевой ткани с помощью набора DNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen, США), использовалась для подготовки экзомных библиотек (SureSelect XT, Agilent, США). Секвенирование проводили на платформе NextSeq 500 (Illumina, США), биоинформатическую обработку данных – с использованием SureCall (Agilent,

США) и ANNOVAR, функциональное аннотирование – с помощью GO Enrichment Analysis. Количество генетических нарушений (исключая известные SNPs) для опухолей III и M составило 4539 и 4585, соответственно, из них 318 и 273 изменения имели фенотипическое выражение (несинонимичные замены и т.п.). Среди генов, подверженных изменениям, мы выявили гены, вовлеченные в регуляцию клеточной подвижности, главным образом в организацию актинового цитоскелета клетки и образование клеточных филоподий: *COBL*, *LIMA1*, *BAIAP2L2*, *SYNPO*, *DNM2*, *JMY*, *PKN1*, *KIF14*, *BCR*, *PLXNB* (опухоль III) и *ARHGAP32* (опухоль M). Таким образом, в ходе исследования были выявлены генетические нарушения и соответствующие гены, которые могут являться потенциальными триггерами опухолевой инвазии.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (№ 14-15-00318).

КОМПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ ДАННЫХ TCGA ПОЗВОЛИЛ ИДЕНТИФИЦИРОВАТЬ ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МАРКЕРЫ CIMP+ ФЕНОТИПА ОПУХОЛЕЙ ТОЛСТОЙ КИШКИ

Краснов Г.С., Кудрявцева А.В., Снежкина А.В., Пузанов Г.А., Бениаминов А.Д., Мельникова Н.В., Дмитриев А.А.*

ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва

*e-mail: Alex_245@mail.ru

CIMP+ фенотип (CpG-Island Methylator Phenotype) представляет собой отдельную группу опухолей толстой кишки, характеризующуюся плотным метилированием промоторных CpG-островком одновременно многих генов. Диагностика CIMP+ фенотипа имеет значительную прогностическую ценность, однако до сих пор нет эффективного набора маркеров для его выявления.

Для идентификации CpG-сайтов, уровень метилирования которых может быть использован для выявления CIMP+ фенотипа, проведен анализ профилей экспрессии (HiSeq, Illumina) и метилирования (Infinium HumanMethylation450, Illumina) 297 образцов первичных опухолей и 38 парных к ним «условных норм» толстой кишки, представленных в TCGA (The Cancer Genome Atlas), с помощью разработанного ранее приложения CrossHub. Создан скоринг, учитывающий уровень метилирования CpG-сайтов, их расположение и уровень экспрессии соответствующих генов. В результате анализа статус метилирования CpG-сайтов, относящихся к 4 генам (*AMOTL1*, *ZNF43*, *ZNF134* и *CHFR*), определен как один

из наиболее перспективных маркеров. Для проверки полученных данных на независимой выборке оценили относительный уровень мРНК выбранных генов в 30 парных (опухоль/«условная норма») образцах толстой кишки методом количественной ПЦР. Для всех четырех генов выявлено значительное (2-30 раз) снижение экспрессии в 50-60% случаев. Методом бисульфитной конверсии ДНК с последующим клонированием и секвенированием показан высокий уровень метилирования (0,3-0,9) интересующих CpG-сайтов в образцах с одновременно сниженным уровнем мРНК всех 4-х генов, и низкий уровень метилирования (0,0-0,2) в образцах с неизменным уровнем мРНК 4-х генов и в «условных нормах». Таким образом, статус метилирования CpG-сайтов генов *AMOTL1*, *ZNF43*, *ZNF134* и *CHFR* является перспективным потенциальным маркером CIMP+ опухолей толстой кишки.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Москвы (грант 15-34-70055 мол_а_мос), а также Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СТРУКТУРЕ Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕПЕРТУАРОВ

Егоров Е.С.^{1,2}, Израельсон М.А.^{1,2}, Касацкая С.А.^{1,2}, Наконечная Т.О.¹, Британова О.В.^{1,2*}

1 Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва

2 Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва

*e-mail: olbritan@gmail.com

Способность нашего организма эффективно противостоять различным инфекционным, опухолевым и аутоиммунным заболеваниям в значительной степени определяется функциональным и рецепторным разнообразием Т-клеток. Каждый клон Т-лимфоцита несет на своей поверхности уникальный Т-клеточный рецептор, потенциально способный распознать антиген, представляемый молекулами главного комплекса гистосовместимости на поверхности антигенпрезентирующих клеток. Используя высокопроизводительное секвенирование молекулярно баркодированных библиотек Т-клеточных рецепторов, мы проследили за изменениями репертуара Т-клеток у доноров разных возрастных групп. Была показана общая стабильность репертуара: приблизительно половина всех Т-клеток периферической крови представлена клонами, которые ста-

бильно детектируются на одном и том же уровне как минимум в течение трех лет. Мы продемонстрировали, что Т-клеточные репертуары функционально между собой более похожи у новорожденных, но потом в течение жизни расходятся. Отдельно мы рассмотрели возрастные изменения в репертуарах наивных Т-клеток и Т-клеток памяти. Наивные репертуары молодых и пожилых доноров между собой более схожи, чем репертуары Т-клеток памяти. При этом наивные репертуары молодых доноров более близки друг другу, нежели наивные репертуары пожилых доноров. Основываясь на наших новых и ранее опубликованных данных, мы предлагаем ряд объяснений взаимосвязи между долголетием и иммунитетом.

Работа поддержана грантом РФФИ №16-15-00149

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДОВ NGS И ARRAY CGH ПРИ ДЕТЕКЦИИ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ У ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА НА СТАДИИ БЛАСТОЦИСТЫ

Жигалина Д.И.^{1*}, Скрябин Н.А.^{1,2}, Канбекова О.Р.³, Артюхова В.Г.⁴, Лебедев И.Н.^{1,2}

1 Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск

2 Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский НИМЦ, Томск

3 ОГАУЗ «Областной перинатальный центр», Томск

4 Красноярский центр репродуктивной медицины, Красноярск

* e-mail: darya.zhigalina@medgenetics.ru

При проведении полнохромосомного скрининга в рамках преимплантационной генетической диагностики (ПГД) наряду с array CGH, все чаще отдается предпочтение секвенированию нового поколения (NGS). Однако до сих пор нет единой точки зрения на то, какая платформа наиболее успешно позволяет детектировать анеуплоидии у эмбрионов [1]. Целью настоящей работы стала оценка эффективности методов aCGH и NGS при выявлении числовых и структурных хромосомных aberrаций у эмбрионов человека на преимплантационном этапе развития.

Было проанализировано 5 бластоцист человека на 5 день развития. Для каждой бластоцисты производилась биопсия внутриполостной жидкости, разделение и забор эмбриобласта (ЭБ) и трофэктодермы (ТЭ). Образцы анализировались с использованием наборов VeriSeq™ PGSKit - MiSeq® System (Illumina) и SurePrint G3 Human CGH Microarrays (8x60K, Agilent Technologies). Биоинформационная обработка результатов проводилась с помощью программного обеспечения Blue Fuse Multi Software (Illumina) и Agilent Cyto Genomics Software (v3) для NGS и aCGH, соответственно.

Поскольку в данной работе производился бластоцентез и разделение тканей бластоцист, всего было проанализировано 15 образцов. Молекулярные кариотипы, полученные по результатам aCGH и NGS, полностью совпали в 46% (7/15) образцов. В качестве стандарта в данном исследовании был использован метод aCGH. Чувствительность и специфичность NGS при детекции хромосомных aberrаций в бластоцисте в целом составили 89% (95% ДИ: 81-97%) и 96% (95% ДИ: 93-98%), соответственно. Данные показатели для внутриполостной жидкости были равны 86 и 93%, соответственно; для ЭБ – 93 и 97%, соответственно; для ТЭ – 94 и 97%, соответственно.

Таким образом, метод NGS может быть успешно использован для диагностики анеуплоидий во внутриполостной жидкости и тканях бластоцисты.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 15-04-08265.

1. Hsing-Hua Lai et al. (2017) Identification of mosaic and segmental aneuploidies by next-generation sequencing in preimplantation genetic screening can improve clinical outcomes compared to array-comparative genomic hybridization, *Molecular Cytogenetics*, 10:14: 2-11. DOI 10.1186/s13039-017-0315-7

РОЛЬ СЕКРЕТИРУЕМЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В КОММУНИКАЦИИ МЕЖДУ РАКОВЫМИ КЛЕТКАМИ

Шендер В.О.^{1*}, Степанов Г.А.², Журавлев Е.С.^{2,3}, Ануфриева К.С.¹, Арапиди Г.П.¹, Балахонova Е.А.², Нуштаева А.А.², Семенов Д.В.², Рихтер В.А.², Говорун В.М.^{1,4}

1 ФБГУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

2 Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

3 Новосибирский государственный университет, Новосибирск

4 ФБГУ ФНКЦ Физико-химической медицины ФМБА

*e-mail: shender_vika@mail.ru

Известно, что экзогенные сигналы от клеток, находящихся в состоянии стресса, могут играть важную роль в прогрессии и формировании агрессивного фенотипа соседних раковых клеток. К настоящему времени накоплены независимые данные о наличии в физиологических жидкостях онкологических пациентов циркулирующих как в свободной форме, так и в составе мембранных везикул некодирующих РНК (нкРНК), среди которых встречались малые ядрышковые (мяРНК) и малые ядерные (мяРНК) РНК. С применением высокопроизводительных протеомных подходов и количественной ОТ-ПЦР мы обнаружили, что раковые клетки, обработанные ДНК-повреждающими химиопрепаратами, секретируют во внеклеточное пространство белковые компоненты сплайсосома и ряд мяРНК. Это явление наблюдалось, как в системе *in vitro* (культуральные среды раковых клеточных линий), так и *in vivo* (раковые асциты после химиотерапии). Наряду с мяРНК, в проанализированных секретах были обнаружены полноразмерные формы мяРНК, при этом нкРНК детектировались во всех фракциях секретомов: микровезикулах, экзосомах и супернатантах. Интересно, что в секретах

нормальных нераковых клеток после обработки химиопрепаратом аналогичные формы нкРНК детектированы не были. Для выявления биологических процессов, в которых могут быть задействованы выбранные нами нкРНК (U6atac и U12) был выбран подход синтеза их искусственных аналогов с последующей трансфекцией в клетки человека. Метод массового параллельного секвенирования (на платформе Nextseq Illumina) поли-А фракции РНК раковых клеток, трансфицированных аналогами мяРНК (U6atac или U12) показал, что экзогенные мяРНК активируют экспрессию генов, участвующих в переходе из G2 в M фазу клеточного цикла, а также повышают экспрессию генов, вовлеченных в формирование микротрубочек цитоскелета. Таким образом, малые регуляторные нкРНК, секретируемые раковыми клетками под действием химиотерапии, играют важную роль в межклеточной коммуникации, и могут быть потенциальными прогностическими маркерами успешности лечения или мишенями для разработки химиопрепаратов.

Работа поддержана Грантами РФФИ 14-50-00131 и РФФИ 16-04-01414.

КОМПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМНЫХ И МЕТАБОЛОМНЫХ ДАННЫХ КАРДИОМЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ В КАЗАХСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Кожамкулов У.А.^{1*}, Каиров У.Е.¹, Молкенов А.Б.¹, Абилямажинова А.Т.¹, Ахметова А.Ж.¹, Абилова Ж.М.¹, Ережепов Д.А.¹, Рахимова С.Е.¹, Lee J.², Акильжанова А.Р.¹

1 Центр Наук о жизни, National Laboratory Astana, Назарбаев Университет, Казахстан

2 Columbia University, New York, USA

*e-mail: ulan.kozhamkulov@nu.edu.kz

Цель исследований - оценка метаболических различий среди взрослого населения, проживающего на территории Казахстана, выявление и характеристика метаболических профилей и определение генетических вариантов, ассоциированных с метаболическими профилями высокого риска развития диабета и прогрессирования кардиометаболических заболеваний. Проведено секвенирование семи полных геномов и 53 - полных экзона 60 человек казахской национальности с использованием технологии секвенирования нового поколения (NGS) HiSeq2000, Illumina. А также проведены метаболомные исследования плазмы крови для этих же участников исследования в компании Метаболом, США.

С помощью сравнения геномных данных 60 образцов с базой данных T-HOD (The Text-mined Hypertension, Obesity and Diabetes candidate gene database (T-HOD <http://bws.iis.sinica.edu.tw/THOD>) получена характеристика генетических вариантов, ассоциированных с гипертонией, ожирением и диабетом. По результатам определены генетические варианты, показавшие ассоциацию с

развитием данных состояний по двум предикторам патогенности мутаций (PP2 и SIFT) - 7 SNP в генах rs4684677 GHRL, rs1801133 MTHFR, rs1799971 OPRM1, rs1058808 ERBB2, rs6265 BDNF, rs738409 PNPLA3, rs1801394 MTRR. Обнаружены изменения показателей метаболитов при сравнении двух групп: старше 45 лет по сравнению с группой молодых лиц, где наиболее значимые изменения метаболитов включали изменения метаболитов, связанных с вторичным метаболизмом карнитина, с процессами воспаления и оксидативного стресса, обменом жирных кислот, стероидогенезом (биосинтез стероидных гормонов) и микробиомом кишечника.

Для более глубокого понимания потенциальной патофизиологии кардиометаболических нарушений в казахской популяции необходим комплексный анализ метаболомных и геномных данных. Следующим этапом будет определение генетических вариантов, изменяющих уровень метаболитов в клеточной системе, для чего будут использованы метаболомные и геномные данные для анализа.

ПРОФИЛИРОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ЛИМФОЦИТАХ ИНДИВИДОВ С РАЗЛИЧНОЙ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ

Васильев С.А.^{1,2*}, Агаб А.В.¹, Скрябин Н.А.^{1,2}, Слепцов А.А.^{1,2}, Климова В.С.², Фишман В.С.³, Серов О.Л.³, Лебедев И.Н.^{1,2}

1 НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН, Томск

2 Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск

3 Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

*e-mail: stanislav.vasilyev@medgenetics.ru

Выявление путей формирования индивидуальной радиочувствительности человека и разработка методов ее прогноза позволят перейти к персонализированным подходам в лучевой терапии злокачественных новообразований. С этой целью с помощью экспрессионных чипов (Agilent Technologies) проведен полнотранскриптомный анализ экспрессии генов в лимфоцитах радиочувствительных и радиорезистентных индивидов, отобранных среди 54 человек с различным уровнем фокусов γ H2AX и центромеро-негативных микроядер после воздействия гамма-излучения в дозе 2 Гр *in vitro*. Фокусы гистона γ H2AX являются признанным маркером двуниевых разрывов ДНК, отсутствие репарации которых приводит к формированию ацентрических хромосомных фрагментов, включающихся в митозе в центромеро-негативные микроядра. Среди 600 и 614 дифференциально экспрессирующихся генов в необлученных и облученных лимфоцитах соответственно анализ в базе STRING позволил выявить кластер генов, участвующих в репарации двуниевых разрывов ДНК. Однако большинство дифференциально-экспрессирующихся генов не было

связано с репарацией ДНК и радиационно-индуцированным ответом. Корреляция экспрессии некоторых из таких генов (*ADAMTS1*, *WHSC1* и *RBF2*) с уровнем фокусов γ H2AX и частотой радиационно-индуцированных микроядер подтвердилась и в другом типе клеток - 14 первичных линиях фибробластов экстраэмбриональной мезодермы человека. Кроме того, нокаут генов *ADAMTS1*, *WHSC1* и *RBF2* в опухолевой линии HeLa с помощью системы редактирования генома CRISPR-Cas9 приводил к повышению радиочувствительности (в 1,8-2,9 раза) и снижению эффективности репарации двуниевых разрывов ДНК (на 5-23%) ($p < 0,05$). Полученные результаты указывают на то, что выявленные гены участвуют в репарации радиационно-индуцированных двуниевых разрывов ДНК и вносят вклад в формирование индивидуальной радиочувствительности человека. При этом, влияние экспрессии генов *ADAMTS1* и *RBF2* на радиочувствительность обнаружено впервые.

Работы проведены при поддержке гранта РФФИ 14-04-31867 и стипендии Президента РФ СП-3647.2015.4.

СТРУКТУРА КОЛЬЦЕВЫХ РНК ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Савельева А.В.^{1,*}, Литовка Н.П.¹, Кулигина Е.В.¹, Рихтер В.А.¹ Семенов Д.В.¹¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

*e-mail: savelyevaav@niboch.nsc.ru

Кольцевые РНК (кцРНК) это длинные некодирующие продукты обратного сплайсинга пре-мРНК, участвующие в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов по механизму конкурентного взаимодействия. Известно, что кцРНК представлены многообразием форм альтернативного сплайсинга, паттерн экспрессии которых отличается у клеток различного тканевого происхождения и на различных стадиях развития организма.

В данной работе проведен анализ многообразия кцРНК, циркулирующих в крови человека. Для выявления кцРНК мы использовали результаты высокопроизводительного секвенирования РНК форменных элементов, плазмы и фракций плазмы крови здоровых доноров и пациентов с немелкоклеточным раком легкого. Идентифицированы 1134 характеристические последовательности кцРНК, из которых 88 не содержали простых геномных повторов и встречались в данных секвенирования более 3-х раз. При этом 8 характеристических последовательностей являются фрагментами “новых” кцРНК, неаннотированных ранее в базе данных circbase.org. Среди 88 индивидуальных форм

кцРНК ~ 43 % кольцевых транскриптов являются продуктами обратного сплайсинга двух последовательно расположенных экзонов, ~38 % продуктами обратного сплайсинга 3-5 экзонов, и ~ 11 % состояли из одного экзона.

Методом ОТ-ПЦР для 12 индивидуальных форм кцРНК было показано, что их негидролизованые формы циркулируют в плазме крови в составе экзосом. Кроме того, для 3 форм кцРНК, образованных из трех и более экзонов, не было выявлено транскриптов с пропуском внутренних экзонов. Анализ препаратов РНК клеток линий A549, MCF-7, MDA-MB-231 показал, что идентифицированные нами кцРНК крови экспрессируются в культивируемых клетках легкого и молочной железы человека.

Полученные данные о структуре кцРНК крови могут быть использованы для поиска новых маркеров патологических процессов и разработки новых систем малоинвазивной диагностики заболеваний человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 16-14-10284.

НОВЫЕ НЕСИНОНИМИЧНЫЕ ЗАМЕНЫ И АДАПТАЦИЯ ЧЕЛОВЕКА НА СЕВЕРО-ВОСТОКЕ АЗИИ

Маларчук Б.А.*¹, Деренко М.В.¹ Институт биологических проблем Севера ДВО РАН, г. Магадан

*e-mail: malyarchuk@ibpn.ru

Основная цель данного исследования – поиск вариантов полиморфизма, появившихся в результате адаптации коренного населения Северо-Востока Азии к экстремальным условиям среды. Секвенирование экзонов и прилегающих нетранслируемых участков генов проводили на платформе HiSeq 1500 для шести образцов ДНК от представителей коренного населения Северо-Восточной Азии (3 коряка, 2 эвена и 1 эвенк). Для сравнительного анализа использованы литературные данные о полноэкзомном полиморфизме у 108 представителей коренного населения Сибири. Учитывались несинонимичные замены (nsSNP) с высокими (≥ 0.99) индексами PolyPhen-2, указывающими на существенные изменения физико-химических свойств белков. Учитывались только новые nsSNP, отсутствующие в базах данных dbSNP, 1000 геномов и ExAC. В итоге, обнаружено, что большую распространенность среди коренного на-

селения Северо-Востока Азии получили новые варианты nsSNP в генах энергетического метаболизма и липидного обмена (гены *GK2*, *ABHD6*, *CRAT*, *NCOA2*, *OSPL3*, *LRP10*, *TTN*, *PTTG2*), а также в генах структурных белков, входящих в состав цитоскелета (гены *EVPL*, *PIK3C2A*, *MOCOS*, *ANKRD53*, *TNXB*). Предполагается, что новые варианты несинонимичного полиморфизма появились в результате адаптации коренного населения к экстремальным условиям природной среды и специфической «арктической» диете аборигенов Крайнего Севера.

Исследование поддержано программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Поисковые фундаментальные научные исследования в интересах развития Арктической зоны Российской Федерации».

ПОИСК ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ НЕСТАБИЛЬНЫХ АТЕРОМ

Новикова О.А.^{1*}, Назаркина Ж.К.^{1,2}, **Лактионов Петр.П.**³, Покушалов Е.А.¹, Карпенко А.А.¹, Лактионов Павел.П.^{1,2}

1 ФГБУ «СФБМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России

2 Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

3 Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН

*e-mail: Olya_19@bk.ru

Существующие методы диагностики не позволяют заблаговременно выявлять атеросклеротические бляшки (АБ) нестабильного строения (НАБ) и своевременно предотвращать развитие ишемических инсультов. Вариантом решения задачи ранней диагностики НАБ может быть выявление генетических маркеров НАБ.

Цель исследования: Поиск генетических маркеров нестабильных АБ при помощи сравнительного исследования профилей экспрессии генов клетками стромы бляшек сонных артерий различной эмбологенности.

Материалы и методы исследования: АБ получали в результате каротидной эндартерэктомии, лизировали поверхностные клетки крови, бляшки фрагментировали, инкубировали с коллагеназой, и культивировали на поверхности культурального пластика в IM DMEM с 10% ЭТС. Клетки типировали при помощи ИГХ с использованием антител против 21 антигена. Для профилирования экс-

прессии генов из клеток 2-х стабильных и 2-х нестабильных атером выделяли РНК, которые характеризовали при помощи BioAnalyzer 2100, и секвенировали на платформе HiSeq 2500 стандартным образом. Данные анализировали с использованием программ пакета Galaxy, выравнивание на геном GRCh38 (NCBI/Illumina iGenomes) проводили с использованием TopHat2, поиск дифференциально экспрессирующихся генов в образцах проводили программой Cuffdiff (v.2.2.1). Для каждого из образцов было получено не менее 10 млн. картируемых на геном последовательностей.

Результаты исследования: клетки, формирующие строму АБ экспрессируют гладкомышечные, эндотелиальные, хондральные, гемопозитические антигены. Первичный анализ данных секвенирования транскриптомов показал, что клетки, выделенные из стабильных бляшек, отличаются от клеток нестабильных атером по экспрессии 20 основных генов.

ПОВЫШЕННАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *CTDSPL/1/2* ПРИВОДИТ К ПОДАВЛЕНИЮ РОСТА И ИЗМЕНЕНИЮ ФЕНОТИПА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЛЕГКОГОПузанов Г.А.^{1*}, Егоров Е.Е.¹, Краснов Г.С.¹, Вишнякова Х.С.¹, Дмитриев А.А.¹, Кондратьева Т.Т.², Бениаминов А.Д.¹, Сенченко В.Н.¹

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

2 Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина МЗ РФ, Москва

*e-mail: ga.puzanov@physics.msu.ru

Рак легкого является одним из наиболее распространенных и смертоносных заболеваний в мире. Сложность диагностирования этого заболевания на ранних стадиях и подбора эффективного лечения во многом связана с недостаточным пониманием механизмов канцерогенеза легкого. На данный момент известно, что фермент *CTDSPL* способен дефосфорилировать белок Rb, являющийся контрольно-пропускным пунктом клеточного цикла, подавляющим пролиферацию клетки при переходе из фазы G1 в S. Фосфатаза *CTDSPL* является членом семейства малых сериновых фосфатаз SCP, к которому также относятся *CTDSP1* и *CTDSP2*, гомологичные первой как по аминокислотной последовательности (~83%), так и по вторичной структуре.

Ранее с помощью оригинальной программы CrossHub, позволяющей анализировать данные высокопроизводительного секвенирования проекта The Cancer Genome Atlas (TCGA), обнаружено одновременное снижение экспрессии генов всех трех фосфатаз *CTDSPL/1/2* при немелкоклеточном раке легкого (НМРЛ), что затем было подтверждено на 28 парных первичных образцах НМРЛ методом количественной ПЦР. Для выявления опухоле-

подавляющей активности фосфатаз семейства SCP клетки рака легкого A549 трансфицировали с использованием системы транспозонов Sleeping Beauty плазмидными векторами, содержащими вставки последовательностей генов *CTDSPL*, *CTDSP1* и *CTDSP2*. У клонов-трансфектантов наблюдалось заметное снижение скорости роста (в несколько раз) по сравнению с исходными клетками. Кроме того, в трансфицированных клетках выявлены изменения, не свойственные исходной клеточной линии, такие как активация апоптоза, выход из клеточного цикла, приобретение клетками способности стареть. В ряде клонов также наблюдалась дифференцировка клеток в костную ткань, что вероятно связано со способностью фосфатаз семейства SCP дефосфорилировать белки Smad2/3.

Полученные данные свидетельствуют о способности фосфатаз *CTDSPL/1/2* подавлять рост опухолевых клеток легкого, а также об их вероятной вовлеченности в инактивацию белка Rb при НМРЛ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант 14-50-00060.

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОСОМ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЗДОРОВОГО ЧЕЛОВЕКА НА КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*Савельева А.В.^{1*}, Савиновская Ю.И.¹, Кулигина Е.В.¹, Рихтер В.А.¹, Семенов Д.В.¹¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

*e-mail: saveljevaav@niboch.nsc.ru

Экзосомы – секретлируемые клетками мембранные пузырьки, которые образуются в эндосомах и функционируют во внеклеточном пространстве как медиаторы процессов локального и дистантного межклеточного взаимодействия. Экзосомы выявлены во всех физиологических жидкостях и представляют собой перспективный объект для разработки новых средств диагностики и терапии заболеваний человека.

В данной работе нами проведен анализ влияния экзосом крови здоровых доноров на экспрессию генов, жизнеспособность и пролиферацию эпителиоцитов легких человека А549. Установлено, что препараты экзосом крови здоровых доноров повышают метаболическую активность и жизнеспособность клеток А549 через 48 ($p < 0.05$) и 72 ($p < 0.001$) часа инкубации. Методом проточной цитофлуориметрии показано, что экзосомы крови не оказывают существенного влияния на пролиферацию и не вызывают апоптотических изменений клеток А549.

С использованием метода высокоэффективного секвенирования РНК на платформе Illumina HiSeq 1500 проведен детальный анализ изменений транскриптома клеток

аденокарциномы легкого А549 под действием мембранных частиц крови человека. Установлено, что инкубация клеток А549 с препаратами мембранных частиц крови здоровых доноров приводит к активации транскрипции генов врожденного иммунного ответа. Через 12 часов инкубации клеток с препаратами экзосом происходит активация Toll-подобных рецепторов (TLR) и р53-сигнального пути, что сопровождается индукцией процессов сборки хроматина, сегрегации хромосом, репликации ДНК и митоза. Активация Toll-подобных рецепторов в клетках, а также интерферон-индуцируемых белков и ряда других факторов, указывает на непосредственное влияние набора экзогенной РНК, доставленной в клетки в составе мембранных частиц крови человека.

Полученные данные могут быть использованы для разработки новых терапевтических средств на основе мембранных структур – экзосом и микровезикул крови человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РНФ № 16-14-10284 и РФФИ 16-04-01457.

ТАРГЕТНАЯ ОЦЕНКА ИНДЕКСА МЕТИЛИРОВАНИЯ С ПОМОЩЬЮ БИСУЛЬФИТНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ АМПЛИКОНОВ

Скрябин Н.А.^{1,2*}, Васильев С.А.^{1,2}, Толмачева Е.Н.^{1,2}, Лебедев И.Н.^{1,2}¹ НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ РАН, Томск² Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск

*e-mail: nikolay.skryabin@medgenetics.ru

Бисульфитное секвенирование ампликонов (Bisulfite Amplicon Sequencing, BSAS) является недорогим и удобным методом для анализа индекса метилирования CpG-сайтов в интересующей области [1]. Метод основан на ПЦР амплификации бисульфит-конвертированной ДНК, с последующим секвенированием с помощью NGS.

Нами был проведен анализ статуса метилирования CpG-островков в промоторных участках генов *IMMP2L*, *METTL4*, *ACAD10*, *GEMIN4*, *SMCHD1*, *KDM5A* и *GRPEL2* в 8 семьях с умственной отсталостью. Выбранные гены были локализованы в участках с вероятно патогенными унаследованными CNV (Copy Number Variation). Дифференциальное метилирование CpG-сайтов в регионах с унаследованных CNV без клинического проявления у родителей может объяснять механизм неполной пенетрантности.

После бисульфитной конвертации ДНК была проведена амплификация участков 300-800 п.н. в составе CpG-

островков в промоторных регионах выбранных генов с помощью ПЦР. Присоединение адаптеров и индексов осуществлялось с помощью набора Nextera XT (Illumina, США). Секвенирование проводилось на секвенаторе MiSeq с помощью набора MiSeq Reagent Nano Kit v2 (Illumina, США). Для цитозина в составе CpG-пар оценивался индекс метилирования (отношение числа ридов с С/Т).

В результате проведенной работы дифференциально метилированные регионы не были обнаружены, однако было показано что таргетная оценка индекса метилирования промоторов отдельных генов с помощью бисульфитного секвенирования ампликонов является удобным методом оценки статуса метилирования небольших участков ДНК.

Работа была поддержана грантом РНФ №16-15-10229.

1. Masser, D. R., Stanford, D. R., Freeman, W. M. (2015) Targeted DNA Methylation Analysis by Next-generation Sequencing. J. Vis. Exp. (96), e52488, doi:10.3791/52488.

ДОКАЗАТЕЛЬСТВА ЭФФЕКТА ОСНОВАТЕЛЯ ПО МУТАЦИИ САЙТА СПЛАЙСИНГА с.-23+1G>А ГЕНА *GJB2* В НЕКОТОРЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ ЕВРАЗИИ ПО ДАННЫМ ПОЛНОГЕНОМНОГО АНАЛИЗА

Соловьев А.В.,^{1,2*} Барашков Н.А.,^{1,2} Бады-Хоо М.С.,³ Посух О.Л.,^{4,5} Зыцарь М.В.,^{4,5} Романов Г.П.,^{1,2} Сазонов Н.Н.,¹ Алексеев А.Н.,⁶ Джемилева Л.У.,⁷ Метспалу Э.,⁸ Метспалу М.,⁸ Виллемс Р.,⁸ Хуснутдинова Э.К.,⁷ Федорова С.А.^{1,2}

1 Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, г. Якутск, Россия

2 Якутский научный центр комплексных медицинских проблем, г. Якутск, Россия

3 Республиканская больница №3, г. Кызыл, Россия

4 Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, Россия

5 Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, г. Новосибирск, Россия

6 Институт гуманитарных исследований и проблем малочисленных народов Севера СО РАН, г. Якутск, Россия

7 Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, г. Уфа, Россия

8 Эстонский Биоцентр, г. Тарту, Эстония

*e-mail: nelloann@mail.ru

Мутация сайта сплайсинга с.-23+1G>А является одной из частых мутаций в гене *GJB2* (13q12.11) у пациентов с врожденной глухотой в ряде популяций Восточной Европы, Кавказа, Ближнего Востока, Центральной Азии, Южной и Восточной Сибири. Ранее, с применением 8 STR-маркеров, фланкирующих участок гена *GJB2*, было показано, что на территории Якутии данная мутация распространилась в результате эффекта основателя. Целью данного исследования является реконструкция предкового гаплотипа с данной мутацией у представителей некоторых популяций Евразии с применением полногеномного анализа. В исследовании были использованы образцы ДНК четырех глухих пациентов (якут, русский, тувинец и эвенк) с мутацией с.-23+1G>А в гомозиготном состоянии. Анализ был выполнен в Эстонском Биоцентре (Тарту) на платформе Illumina 730K в соответ-

ствии со спецификацией производителя. В результате исследования во всех четырех образцах были найдены блоки гомозиготности различной протяженности (от 1,4 Мб у русского и до 7,6 Мб у тувинца), которые перекрывались в одном хромосомном районе, фланкирующем область мутации. Протяженность общего для всех обследованных индивидов блока гомозиготности составила ~325 kb (147 SNPs). Таким образом, результаты полногеномного анализа свидетельствуют в пользу единого происхождения мутации сайта сплайсинга с.-23+1G>А гена *GJB2* в изученных популяциях Евразии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№16-34-00234 мол_а, 16-34-00564 мол_а) и проекта ПНИ ФАНО России №556.

РЕКОНСТРУКЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ АБЕРРАНТНОЙ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ

Проскура А.Л., Сорокоумов Е.Д.* , Запара Т.А., Ратушняк А.С.

ФГБУН Институт вычислительных технологий

*eg.sorokoumov@gmail.com

Методы NGS активно применяются в фундаментальных и прикладных исследованиях, а также в диагностике генетически наследуемых заболеваний. Когнитивные нарушения, проблемы с обучением, психические расстройства, такие как шизофрения, аутизм, нейродегенеративные заболевания, вызываются гетерогенными причинами, включая генетические и средовые факторы. Некоторые формы таких нарушений сцеплены с X хромосомой (X-linked mental retardation – XLMR) [1]. Ранняя диагностика при этом усложняется ввиду не полного понимания молекулярных механизмов нарушений. В связи с развитием и усовершенствованием технологий NGS появляется возможность более тщательного и комплексного анализа данных, полученных путем секвенирования. Построение карт молекулярных взаимодействий с использованием данных геномики является перспективным для исследования механизмов развития различных заболеваний. С помощью технологии GeneNet был реконструирован интерактом дендритного шипика, обеспечивающий синаптическую пластичность в гиппокампе [2]. Осуществлен поиск белков (по данным литературы и баз данных), мутации в которых связаны с нейропатологиями. Установлено, что ключевые регуляторы синаптической пластичности в

гиппокампе относятся к данной группе. Главным образом это белки-регуляторы работы синаптических малых ГТФаз, которые отвечают за регулирование перестроек цитоскелета. Скаффолд-белки семейства Shank связаны с когнитивными проблемами, а также обуславливают не синдромную форму XLMR [1]. Описаны белок-белковые взаимодействия не патогенного Хантингтина (мутации в данном гене – причина серьезного нейродегенеративного нарушения – болезни Хантингтона), регулирующие эндоцитоз и рециклирование рецепторов, доставку эндосом в дендриты [3]. Таким образом, изменение структуры таких белков будет нарушать их нормальное функционирование, и приводить к развитию аберрантной синаптической пластичности в мозге.

В работе использованы материалы, полученные при выполнении базового проекта фундаментальных исследований РАН IV.35.1.5, грантов РФФИ № 15-29-04875-офи_м и № 17-04-01440-а.

1. Ropers H.H., Hamel B.C. (2005) X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet.* 6, 46-57.
2. <http://www.mgs.bionet.nsc.ru/mgs/gnw/genenet/viewer/AMPA.html>
3. Проскура А.Л. и др. (2017) Межбелковые взаимодействия хантингтина в гиппокампе. *Мол.Биол.* (in press)

BINDING SITES OF miR-1322 IN mRNA OF ORTHOLOGIC ARID3B GENES

Aisina D.E.*, Ivashchenko A.T.

Al-Farabi Kazakh National University, Al-Farabi, 71, Almaty, 050038, Kazakhstan

*e-mail: dana.aisina02@gmail.com

It is established that mir-1322 can regulate the expression of genes that participate in oncogenesis [1]. It is important to determine whether mir-1322 has binding sites in the mRNA of ARID3B gene, which is involved in the control of the cell cycle and its expression is associated with the development of breast cancer [2]. We determined the binding sites of miR-1322 in the mRNA of ARID3B gene of eleven primate species. The miR-1322 binding sites in the mRNA of ARID3B genes were predicted using the MirTarget program [3]. In the CDS of mRNA of the *Homo sapiens* gene, there are five consecutive miR-1322 binding sites. The beginnings of these binding sites are located through three nucleotides and encode a polyglutamine containing 11 residues of Q. Polyglutamine begins with the fifth amino acid of ARID3B protein, and the MEPL tetrapeptide is located at the N-end of the polyglutamine, and from the C-end is the oligopeptide KQPHL. ARID3B protein of *Coturnix japonica* contains the amino acid segment: MEPLQQQQQQQQQQQQKQPHL. In *Saimiri boliviensis* mRNA, there are 13 Q residues also located between the oligopeptides MEPL and KQPHL. The mRNA of ARID3B gene of *Gorilla gorilla*, *Chlorocebus sabaues*, *Pongo abelii*, *Rhinopithecus roxellana* and *Pan paniscus* contains a greater number of miR-1322 binding sites that encode a poly-

glutamine, that containing 14, 15, 17, 19 and 20 Q residues, respectively. In the mRNA of ARID3B gene of *Macaca fascicularis* and *Macaca mulatta*, there were 17 binding sites that encoded the oligopeptide from 23 residues of Q. The mRNA of ARID3B gene of *Pan troglodytes* contained 21 miR-1322 binding sites and the protein contained 27 Q residues. In all cases, the polyglutamine was located between MEPL and KQPHL. The results indicate the presence of miR-1322 binding sites in the mRNA of ARID3B gene of the studied primates. The difference in the number of multiple binding sites of miR-1322 with the mRNA of ARID3B gene indicates a different degree of regulation of its expression of orthologous genes. Regulation of gene expression by miR-1322 arose millions of years ago and persists in the species studied, which indicates the functional importance of the interaction of miR-1322 with the mRNA of ARID3B gene.

1. R.Niyazova et al. (2015) miR-1322 binding sites in paralogous and orthologous genes, *BioMed Research International*, Vol. 2015, Article ID 962637, 1-7.
2. A.S.Oguz Erdogan et al. (2014) ARID3B expression in primary breast cancers and breast cancer-derived cell lines, *Cell Oncol*, 37: 289-296.
3. A.Ivashchenko et al. (2014) MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes, *Bioinformatics*, 10:423-427.

WHOLE-TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF MIRNA EXPRESSION IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS OF RELAPSING-REMITTING MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS

Baulina N.M., Kiselev I.S., Osmak G.J., Bashinskaya V.V., Popova E.V., Boyko A.N., Kulakova O.G., Favorova O.O.

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

*e-mail: tati.90@mail.ru

Multiple sclerosis (MS) is a severe autoimmune disease of central nervous system. The most prevalent MS course is relapsing-remitting MS (RRMS), which is characterized by recurrent acute exacerbation followed by partial or complete recovery. Recently an increasing role of miRNAs – short non-coding RNA molecules – in the regulation of development of autoimmune inflammatory process in MS was demonstrated.

We used next-generation sequencing (MiSeq, Illumina) to establish miRNA expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from the groups of RRMS patients in relapse and remission and of healthy controls (every group consisted of 4 men). A miRNA is considered to be differentially expressed (DE) if the difference between the miRNA expression levels in two groups was greater than 2 and FDR adjusted p-value was less than 0.05.

When compared with the control group, 16 DE miRNAs (10 upregulated and 6 downregulated) were observed in RRMS patients in remission, and 9 DE miRNAs (8 upregulated and 1 downregulated) – in RRMS patients in relapse. A

direct comparison between RRMS patients in remission and relapse identified 4 DE miRNAs.

RT-qPCR was employed to validate 9 DE miRNAs in the extended groups. Of these miRNAs we confirmed significant upregulation of miR-451a, miR-431, miR-127-3p, miR-376c and miR-656 in RRMS patients in remission compared to healthy controls ($p < 0.05$). These results also showed gender specificity, as they were not significant in women and substantially reinforced in men.

Thus, the whole-transcriptome analysis of miRNA expression in peripheral blood mononuclear cells revealed gender-specific differences in miRNA expression in healthy controls, RRMS patients in remission and RRMS patients in relapse. Our results suggest that MS development and activity of pathological process are under miRNAs regulation.

This study was supported with Russian Foundation for Basic Research (grant 15-04-04866-a) and the Government Contract with Pirogov Russian National Research Medical University (2015-2017).

MUTATIONS SPECTRUM OF MAJOR ONCOGENES IN WOMEN WITH MULTIPLE PRIMARY CANCERS

Vasiliev GV^{1*}, Savkova AV^{2,4}, Gerasimov AV³, Krasilnikov SE³, Gulyaeva LF⁴

1 Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

2 Centre for postgraduate medical education, NGU, Novosibirsk, Russia

3 Novosibirsk regional clinical oncological hospital, Novosibirsk, Russia

4 Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk, Russia

*e-mail: genn@bionet.nsc.ru

In recent decades multiple primary tumors (patients with two or more histologically distinct malignant tumours not due to metastasis) have been increasing in incidence over the world including Russia. In most cases such patients have a genetic predisposition to the development of cancer in different organs. The aim of this study was to determine the mutations in 50 cancer-related oncogenes in women with various combinations of hormone related cancers.

8 female patients from Novosibirsk regional clinical oncology hospital with multiple primary cancers were included in this study. Patient information, including sex, age, tumor type and family history were recorded. DNA was extracted from 5 ml of whole human blood. The next generation sequencing Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2 for Ion Torrent PGM was used to investigate generative mutations spectrum in the samples from patients. The panel used targeted 207 amplicons encompassing 2800 known cancer-relevant variants across 50 cancer-related genes. Each sample was individually barcoded, all 8 samples was pooled prior E-PCR, loaded on a 316v2 Chip and sequenced according to the Ion PGM 200 Sequencing protocol. The average depth

of total coverage was >200, each nucleotide coverage was >50. Sequencing reads were analyzed using Torrent Suite software program with the ‘variant caller v4.0.2’ plugin and aligned to the human reference genome, hg19, which was uploaded on the Ion Reporter software v4.2 to perform variant calling and mapping.

For all patients a total of 94 polymorphic variants in 207 regions covering “mutation hotspots” in 50 tumor-related susceptibility genes were found. Number of mutations per patient varied from 9 to 17 homo- or heterozygous SNP. Among the 50 genes included in panel, 17 genes were found mutated. All studied patients had mutated alleles of *FGFR3* gene. Most of patients had mutations in *TP53*, *EGFR*, *PDGFRA* genes. Six patients in our cohort had at least two hotspot mutations associated with cancer according with COSMIC database.

Patients with multiple primary tumors possessed a number of polymorphic variants in the major oncogenes. These data confirmed the assumption of strong genetic predisposition to the development of the second cancer for patients with primary neoplasia.

T-CELL RECEPTOR ANALYSIS OF THE NAIVE AND MEMORY $\gamma\delta$ T CELLS REVEALS CLONAL SELECTION AMONG V δ 1 SUBSET

Kasatskaya SA^{1,2*}, Egorov ES^{1,2}, Nakonechnaya TO^{1,2}, Britanova OV^{1,2}

1 Genomics of Adaptive Immunity lab, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian academy of Science, Moscow, Russia

2 Molecular oncology lab, Translational Medicine institute, Pirogov Russian State Medical University, Moscow, Russia

*sofya.kasatskaya@gmail.com

$\gamma\delta$ T cells represent a minor subset of T cells in human peripheral blood but in tissues $\gamma\delta$ T cells can be the major lymphocyte subset. Mouse studies suggested innate-like functions of $\gamma\delta$ T cells as well as human V δ 2+ $\gamma\delta$ T cells. Which recognize soluble non-peptidic antigens. Overall, studies of the $\gamma\delta$ T-cell receptors have been done using V δ 2+ cells predominant in human while the V δ 1 human T-cell receptors remained understudied.

We analyzed the next-generation sequencing data from the RNA samples of healthy adult and neonatal $\gamma\delta$ T cell subsets: naïve and memory V δ 1+ and V δ 2+ cells. The mean sequencing depth was 346,371±27,993 reads with an average of 2,742±432 unique CDR3 sequences for TCRdelta and 384,182±31,547 reads with an average of 1,261±170 unique CDR3 sequences for TCRgamma. The data was produced with multiplex PCR protocol (iRepertoire, Illumina, USA) and provided by our collaborators.

Comparison of the umbilical cord blood and healthy adult V δ 1 through TCR sequencing data analysis revealed the mat-

uration of the V δ 1 subset and differentiation from naïve to memory pool. The naïve adult or the neonatal V δ 1 repertoire resembles the naïve beta TCR repertoire and contains clones represented by single cells. Shannon-Wiener diversity index for V δ 1 TCR delta highlighted a trend towards decreased diversity in samples of CMV+ versus CMVneg donors. The memory V δ 1 repertoire in blood consists of larger clones than usually observed among the alpha/beta T cells.

On the contrary to the $\gamma\delta$ innate-like paradigm the V δ 1 repertoire is not shared between the individuals, but it consists of unique TCR sequences and therefore it is highly private. In parallel to the TCR delta we analyzed gamma TCR repertoires in the same set of samples. Gamma TCR chains turned out to be more public among individuals and the V γ 9V δ 1 repertoire was oligoclonal.

This project was supported with RBRF grant № 17-04-01994.

WHOLE-GENOME DNA METHYLATION PROFILES IN CD4+ AND CD14+ CELLS DEPENDING ON MULTIPLE SCLEROSIS ACTIVITY

Kiselev I.S.^{1*}, Kabilov M.R.², Kulakova O.G.¹, Danilova L.V.³, Popova E.V.¹, Baturina O.A.², Baulina N.M.¹, Boyko A.N.¹, Favorov A.V.³, Favorova O.O.¹, Vlassov V.V.²

1 Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

2 Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

3 Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, USA

*e-mail: kiselev.ivan.1991@gmail.com

The major courses of multiple sclerosis (MS) – a chronic neurodegenerative disease of polygenic nature – are primary-progressive MS (PPMS) and relapsing-remitting MS (RRMS), which vary with activity of pathological process. DNA methylation as a key epigenetic mechanism, which regulates gene expression, may play an important role in MS activity.

We carried out a whole-genome DNA methylation profiling in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and its subpopulations CD4+ and CD14+ cell from representative groups of PPMS patients, RRMS patients in remission and relapse and healthy controls (HC). The following pairwise comparisons: PPMS *vs* RRMS relapse, RRMS relapse *vs* RRMS remission and RRMS remission *vs* HC were performed. The level of DNA methylation was analyzed using a iScan scanner (Illumina) and Infinium HumanMethylation450 BeadChip [19] at the SB RAS Genomics Core Facility (ICBFM SB RAS).

All comparisons showed significant differences in DNA methylation profiles in PBMC, CD4+ and CD14+ cells. The

total number of identified differentially methylated CpG-sites (DMSs) varied from 136 to 367. The highest number of DMSs was found in CD4+ cells when RRMS relapse was compared to RRMS remission. In all compared MS groups a clearly defined clusterization of DNA samples was demonstrated in PBMC, CD4+ and CD14+ cells. RRMS patients in remission were characterized by DNA hypomethylation in PBMC and CD4+ T-cells, and by DNA hypermethylation in CD14+ monocytes when comparing with HC. The DNA hypermethylation in PBMC, CD4+ and CD14+ cells was identified during the activation of pathological process in RRMS patients in relapse and PPMS patients.

Our study demonstrated that the differential DNA methylation in PBMC and its main subpopulations, CD4+ and CD14+ cells, contributes to the modulation of MS activity.

This study was supported with Russian Foundation for Basic Research (grants № 13-04-40279-H, 13-04-40280-H and 13-04-40281-H) and the Government Contract with Pirogov Russian National Research Medical University (2015-2017).

TRANSCRIPTOME-BASED ANALYSIS OF ALLELE-SPECIFIC GENE EXPRESSION IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA

Krivtsova, O.^{1,2*}, Vinogradov, D.^{3,4}, Nabieva, E.², Logacheva, M.², Penin, A.², Lazarevich, N.^{1,2}

1 N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center,

2 M.V. Lomonosov Moscow State University,

3 A.A. Kharkevich Institute for Information Transmission Problems,

4 Personal Biomedicine, Moscow

* o.m.krivtsova@gmail.com

Allele-specific expression (ASE), a possible source of phenotypic variation, has been reported to be associated with some hereditary disorders including colon neoplasms.

Hepatocellular carcinoma (HCC) that ranks as 2nd leading cause of cancer-related mortality is characterized by prominent somatic mutations heterogeneity and a lack of frequently mutated potent drivers and druggable targets. Thus identification of recurrent ASE genes and associated germline single nucleotide polymorphisms (SNPs) that are tumor-specific might provide additional insights into hepatocarcinogenesis mechanisms and possible approaches for HCC therapy.

Whole transcriptome sequencing data analysis of 45 paired liver and non-viral HCC samples revealed tumor-specific allelic expression of 839 genes (including genes that are known to be imprinted in non-tumor cells) harboring 1031 unique SNPs ($p < 0.05$, Fisher's exact test) listed in dbSNP database that encompassed rare, reported and putatively deleterious variants. Correlation analysis of clinical data and

occurrence of recurrent allelic variants that shared similar ASE patterns across different samples demonstrated that a subset of SNPs was associated with pathological features of malignant tumors, the most common being distant, lymph node and intrahepatic metastases.

Overrepresentation analysis indicated that ASE genes were enriched with transcriptional targets of HIF1A, ESR1 and STAT1 factors that are differentially expressed in examined tumors and comprised components of PDGF, TGF-beta, Ras, PI3 kinase, IGF signaling pathways crucial for HCC development.

We also identified a set of recurrent tumor-specific ASE genes that comprised RCBTB1 (cell cycle control), ETAA1 (DNA damage response), CFLAR (apoptosis regulation), PEAK1 and FAM195B (cell migration), FADS1 and several pseudogenes.

Our results imply that ASE of germline SNPs may be an additional mechanism to confer susceptibility to HCC and favor tumor progression.

APPLICATION OF NGS IN POPULATION STUDIES

Kudryavtsev A.A.^{1,2*}, Gornostaeva E.V.², Anisimenko M.S.^{1,2,3}, Berdyugina D.A.³, Garanin A.Yu.^{2,3}, Slobodyanyuk S.Ya.², Kovalenko S.P.^{1,2,3}

1 Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk, 2BioLink Ltd, Novosibirsk, 3Institute of Physiology and Fundamental Medicine, Novosibirsk

*e-mail: a_kudryavtsev@mail.ru

Next-generation sequencing (NGS) provides possibility of high throughput genomic analysis at relatively low costs. Meanwhile, application of NGS for population studies is hindered by laborious and costly procedures due to requirements for bar-coding of multiple samples. To reduce the labor time and cost of sequencing in large-scale population studies we developed a simple and economic procedure. The procedure is based on (1) pooling of the samples; (2) usage of the special simplified technique for the addition of bar-codes and adaptors.

New technique for bar-codes and addition of adaptors starts from the introduction of special five-nucleotides sequences to the 5'-end of all primers used for library preparation. Amplicons with universal 5'-end sequences are treated by Pfu-DNA polymerase in the presence of relevant dNTP. This simple reaction allows creating specific sticky ends suitable for accurate ligation of bar-codes sequences and adaptors for the subsequent regular NGS procedure.

To evaluate the technique we used Ion Torrent platform for the analysis of SNV frequencies in *ATP7B* gene and in *SIRT1* gene in population sample of Novosibirsk citizens. DNA samples were pooled by two and processed as described above.

962 random samples of Novosibirsk citizens were used for the analysis of SNV frequencies in *ATP7B* gene. Sixteen SNVs were found in the coding region of *ATP7B* gene and 11 variants in introns. Eleven variants in the coding region appeared to be non-synonymous and 5 appeared to be synonymous. Two SNV variants were listed in data bases as pathogenic and connected with Wilson disease if found in homozygote or as compound. A frequency of disease-related alleles in general population was estimated as 0.47%.

804 random samples of Novosibirsk citizens were used for the analysis of SNV in the complete coding sequence of *SIRT1* gene with the adjacent introns regions. 16 SNVs were found, 2 SNV were synonymous, 12 SNV were found in intron regions, 1 SNV in 5'-region of the gene and 1 SNV in 3' region of the gene. 7 SNV were not described previously in SNP data base. Analysis of non-coding SNV in *SIRT1* gene can be of value since a lot of non-coding SNV were shown to be associated with metabolic, neurodegenerative and cardiovascular diseases.

So, the technique of sample pooling with simplified procedure of bar-codes and adaptor addition provides simple and inexpensive option for NGS-based population studies.

The study was supported by RSF grant 15-14-10004

HK1 AND HK2 GENE EXPRESSION IN TRIPLE NEGATIVE AND LUMINAL A BREAST CANCER

Pudova E.A.¹, Snezhkina A.V.¹, Ermoschenkova M.V.², Sukhotko A.S.², Fedorova M.S.¹, Sadritdinova A.F.^{1,2}, Guvatova Z.G.¹, Savvateeva E.V.¹, Melnikova N.V.¹, Dmitriev A.A.¹, Kaprin A.D.², Alekseev B.Y.², Zikiryakhodjaev A.D.², Kudryavtseva A.V.^{1*}

1 Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow

2 National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

*e-mail: rhizamoeba@mail.ru

Breast cancer (BC) is the most common cancer worldwide and a leading form of malignancy in the female population in Russia. The disease is usually diagnosed at late stage with distant metastasis. Current therapies of breast cancer include surgery, chemo- and radiotherapy, and targeted treatment. However, in spite of significant financial supporting of the development of novel chemotherapeutic and targeted drugs, metastatic breast cancer remains an incurable malignancy. Metabolic reprogramming is the primary and basic factor during cell transformation. Cancer cells have distinct metabolic properties, including increased aerobic glycolysis. Hexokinases (HKs) are the main enzymes which catalyze the first step of glycolysis. It was reported that activation of HKs could be a marker of poor prognosis of breast cancer, but their expression have not been studied in different histological types of BC.

Using CrossHub software (<https://sourceforge.net/projects/crosshub/>) we have analyzed The Cancer Genome Atlas (TCGA) project RNA-seq data for different histological types

of breast cancer. It was found that expression of *HK1* and *HK2* genes was different and a particularly increased in more aggressive types of BC. We performed the analysis of mRNA level of *HK1* and *HK2* genes in 15 paired samples of luminal A BC and 15 basal-like triple negative BC using quantitative PCR. It was revealed a significant increase (from 2 to 42) in the expression of *HK2* gene in 73% of basal-like triple negative breast cancer samples. Up to 7 up-regulation of *HK2* gene expression was observed in 26% of luminal A breast cancer cases. mRNA level of *HK1* gene was unchanged in most of examined samples. Thus, obtained results first demonstrate the difference in *HK2* expression in luminal A and basal-like triple negative breast cancer.

The reported study was funded by RFBR and Moscow city Government according to the research project № 15-34-70035 «mol_a_mos». The work was performed using the equipment of EIMB RAS «Genome» center (http://www.eimb.ru/rus/ckp/ccu_genome_c.php).

IDENTIFICATION OF GERMLINE MUTATIONS IN SDHx GENES IN CAROTID BODY TUMOR USING NEXT GENERATION SEQUENCING

Kudryavtseva A.V.^{1,2,*}, Kalinin D.V.³, Zaretsky A.R.⁴, Golovyuk A.L.³, Fedorova M.S.¹, Nyushko K.M.², Zhevelyuk E.A.¹, Stepanov O.A.^{1,2}, Krasnov G.S.¹, Snezhkina A.V.¹

1 Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow

2 National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

3 A.V. Vishnevsky Institute of Surgery, Moscow

4 Evrogen Lab LLC, Moscow

*e-mail: rhizamoeba@mail.ru

Head and neck paragangliomas are rare tumors that arise from paraganglion cells of neuroectodermal origin. These tumors most commonly occur in the carotid body. Approximately 40% of cases are due to genetic mutations in at least one out of more than 30 causative genes. Germline mutations in genes, encoding subunits of succinate dehydrogenase (SDHx), are most frequent in paragangliomas and may predict more aggressive tumor behavior. In the study, we have performed whole-exome sequencing of 32 carotid body tumor samples using NextSeq 500 System (Illumina, USA). Mutations in *SDHx* genes were shown in 9 from 32 cases. In four paraganglioma samples we detected mutations in *SDHD* gene, three samples were characterized by mutations in *SDHB* gene, and mutations in *SDHC* gene were found in two cases. It is known that mutations in *SDHC* gene are always somatic. Using Sanger sequencing, germline mutations in *SDHx* genes were confirmed in six samples. One sample was characterized by somatic mutation in *SDHB* gene. Thus, whole-exome sequencing of carotid body tumor

samples allows us to identify germline mutations in *SDHx* genes with probability of 89%. At present, incidence of malignant carotid body tumor is increasing. It is important to study the molecular genetic characteristics of tumors for searching of potential agents for effective target therapy, as well as to evaluate tumor aggressiveness. Whole-exome sequencing of tumors is recommended for these purposes. The most effective algorithm of genetic test of carotid body tumors it seems to be whole-exome sequencing of the tumors and further validation of the detected mutations in *SDHx* and other genes in blood DNA by Sanger sequencing. This algorithm allows also to estimate the molecular subclass of particular sample.

This work was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant 16-04-01521a) and ICGEB project CRP/RUS15-01. The work was performed using the equipment of EIMB RAS «Genome» center (http://www.eimb.ru/rus/ckp/ccu_genome_c.php).

АВТОРСКИЙ АЛФАВИТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

Абилова Ж.М.	87	Велисевич С.Н.	58	Зарубин А.А.	83
Абильмажинова А.Т	87	Веньяминова А.Г.	15	Захаренко А.С.	33
Абнизова И.И.	21	Вертипрахов В.Г.	32, 38	Захарова Ю.Р.	30
Агаб А.В.	87	Виллемс Р.	91	Земская Т.И.	33
Адельшин Р.В.	35	Вишнякова Х.С.	89	Зыцарь М.В.	91
Айгинин А.А.	60	Воробьева М.А.	15	Зяблицин А.В.	62
Акильжанова А.Р.	87	Воробьева Н.В.	71–72, 78	Игнатов А.Н.	47
Алексеев А.Н.	91	Воробьев П.Е.	15	Иголкина А.А.	29
Алексеев А.Ю.	50–51	Гаврилова Е.В.	46	Израельсон М.	20, 85
Аликина Т.Ю.	32, 39, 41, 52	Гайтан А.С.	19	Ильина Е.Н.	46
Амстиславская Т.Г.	75	Галачянц Ю.П.	19, 30, 33	Ильина Л.А.	32–33, 38
Андреев Д.Е.	13	Галиева Г.Р.	40	Интересова Е.А.	78
Андреюшкова Д.А.	75, 80	Гаранина И.А.	50	Исмаилова Т.Н.	44
Андронов Е. Е.	29, 52	Гаранкина В.П.	31	Истомина Е.А.	64
Антропов Д.Н.	16	Гашникова М.П.	44–44	Йылдырым Е.А.	32–33, 38
Ануфриева К.С.	77, 86	Гашникова Н.М.	44–45	Кабанова А.П.	47
Арапиди Г.П.	77, 86	Гельфанд М.С.	16	Кабилов М.Р.	14–16, 30–32, 34, 37, 39,
Арзамасов А.А.	50	Герасимова Т.В.	53	44–45, 48, 51–52, 58, 77	
Артемов А.В.	82	Герасимов Е.С.	49, 60, 63	Кадников В. В.	34, 39
Артюхова В.Г.	86	Гервас П.А.	83–84	Каиров У.Е.	87
Ахметова А.Ж.	87	Гладких А.С.	48	Каллистова А.Ю.	36
Ачигечева П.Ю.	44	Глухова Л.Б.	31	Калюжный Д.Н.	22
Аюпова А.Ф.	59	Говорун В.М.	16, 40, 46, 50, 77, 86	Канбекова О.Р.	86
Бабенко В.В.	46	Голубенко М.В.	83	Карначук О.В.	31, 39
Бабенко В.Н.	19	Гончарова И.А.	83	Карпенко А.А.	89
Бабушкина Н.П.	83	Гончаров Н. П.	58	Карпова Г.Г.	14, 16
Бадаева Е.Д.	59	Гопаненко А.В.	14, 16	Касацкая С.А.	85
Бады-Хоо М.С.	91	Городничев Р.Б.	46	Касьянов А.С.	53, 60, 63
Бай Х.	22	Городов В.С.	51	Киселев А.М.	83, 84
Балахонова Е.А.	77, 86	Горошкевич С.Н.	58	Киселева О.И.	20
Банзаракцаева Т.Г.	29	Горчаков А.А.	76	Кичигин И.Г.	78
Баранник А.П.	47	Грайфер Д.М.	14	Кишкковская С.А.	41
Барашков Н.А.	91	Графодатский А.С.	71–72, 75–76, 78–80	Клепикова А.В.	60, 63
Барбараш О.Л.	83	Грачев М.А.	30	Кливер С.Ф.	80
Бартули Ю.С.	16	Гридина М.М.	84	Климова В.С.	87
Бархутова Д.Д.	39	Гризанова Е.В.	32	Ковригин И.И.	84
Батурина О.А.	31, 37	Грозина А. А.	38	Кожамкулов У.А.	87
Башенхаева М.В.	30	Грошева А.С.	14	Колесников А.А.	49
Беклемишева В.Р.	75, 80	Груздев Е.В.		Комарова Е.С.	16
Белалов И.Ш.	53	Губанова Н.В.	19	Комиссаров А.В.	51
Беленикин М.С.	61	Гуляева М.А.	50	Комиссаров А.С.	80
Белецкий О.В.	31, 36, 39, 41, 64, 65	Гусельников С. В.	76, 80	Кондратьева Т.Т.	89
Беликов С.И.	35	Давыдов А.Н.	21	Кондрашов А.С.	60
Беличенко В.М.	75	Давыдова А.С.	15	Конопатская И. Д.	58
Белогуров А.А.	13, 15	Дагурова О.П.	31	Корженков А.А.	47
Бельх О.И.	30, 48	Дамбинова Е.Ц.		Коростылева Т.В.	64
Белькова Н.Л.	37	Денисов Е.В.	83–84	Кострюкова Е.С.	16, 38, 46
Бениаминов А.Д.	22, 85, 89	Деренко М.В.	88	Котенко А.В.	51
Березиков Е.В.	77	Джемилева Л.У.	91	Котляров Р.Ю.	36
Беседина Е.Г.	60	Дмитриев А.А.	59, 61–62, 85, 89	Кочиева Е.З.	64, 65
Билтуева Л.С.	75, 80	Добровольская О.Б.	59	Кочиш И.И.	33
Билтуева Л.С.	75, 80	Донцова О.А.	16	Кравцова Л.С.	35, 37
Блинов А. Г.	58	Дружкова А.С.	71–72, 75, 78–80	Краморенко Н.В.	23
Богачева Н.В.	44–45	Дубовский И.М.	32	Красицкая В.В.	15
Богданов А.А.	16	Дубровин А.В.	33	Красников А.А.	59
те Боекхорст Р.	21	Думина М.В.	41	Краснов Г.С.	59, 61–62, 85, 89
Большева Н.Л.	59, 61	Дымова М.А.	72	Краснопеев А.Ю.	48
Борисова Н.Г.	40	Евфратов С.А.	16	Кривошапкин А.Л.	19
Борхерт Е.В.	61	Егорова А.А.	51	Криницына А.А.	60–61
Бочарова А.В.	82	Егорова Т.А.	32, 38	Крутовский К.В.	63
Брагин А.О.	19	Егоров Е.Е.	89	Кудрявцева А.В.	59, 61–62, 80, 85
Британова О.В.	20, 85	Егоров Е.С.	85	Кудряева А.А.	13, 15
Букин С.В.	33	Егоров И.А.	32, 38	Кузьмин Д.А.	63
Букин Ю.С.	19, 37	Ережепов Д.А.	87	Кулакова Н.В.	35
Бурнаев Е.	16	Жарков Д.О.	14	Кулаковский И.В.	60
Бутина Т.В.	35, 48	Женило С.В.	82	Кулемзин С.В.	76
Вавилова В. Ю.	58	Жигалина Д.И.	86	Кулигина Е.В.	88, 90
Вагайцева К.В.	82	Жигалова Н.А.	82	Курская О.Г.	45, 50–52
Васильев А.Т.	38	Жук Е.А.	58	Куслий М.А.	72
Васильева Г.В.	58	Журавлев Е.С.	77, 86	Лаврентьева Е.В.	35, 39, 41
Васильев Г.В.	21	Завьялова М.В.	84	Лактионов П.П.	14
Васильев С.А.	87, 90	Задесенец К.С.	77	Лактионов Павел П.	79, 89
Васильев С.К.	71–72	Зайцева С.В.	31, 39	Лактионов Пётр П.	79, 89
Васин А.В.	51	Запара Т.А.	91	Лакунина В.А.	61

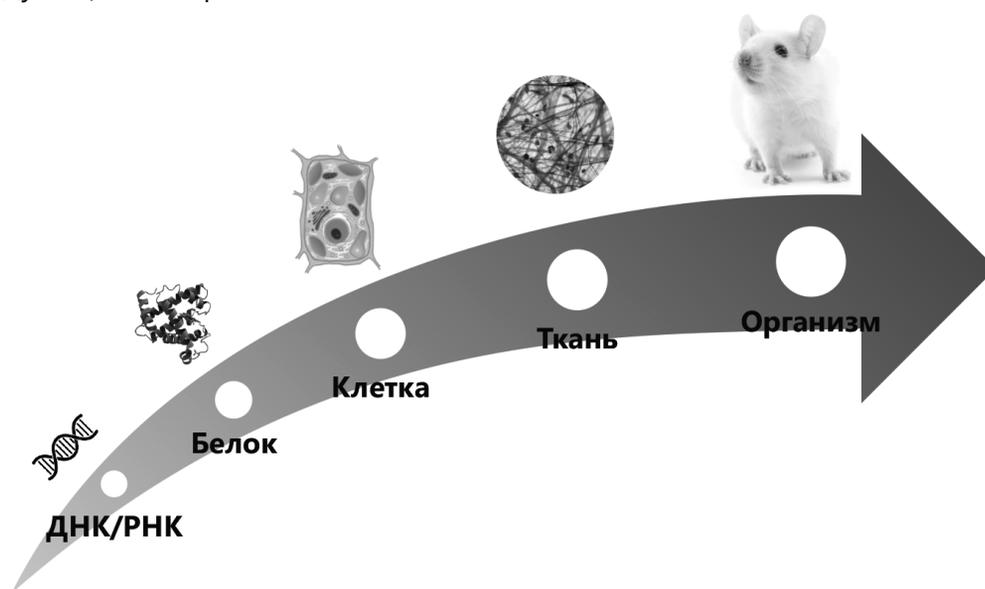
АВТОРСКИЙ АЛФАВИТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

Лаптев Г.Ю.	32, 33, 38	Попова К.И.	59	Ульянцев В.И.	38
Ларин А.К.	46	Попова К.О.	72	Фадеев А.В.	51
Лебедев И.Н.	86–87, 90	Посух О.Л.	91	Федорова М.С.	59
Лебедин М.Ю.	21	Потапов С.А.	48	Федорова С.А.	91
Лемза А.Е.	46	Проворов Н.А.	29	Федосеева Л.А.	75
Ленкова Т.Н.	32, 38	Прокопов Д.Ю.	78, 79, 80	Федотова А.В.	60
Леонов С.В.	51	Проскура А.Л.	91	Феранчук С.И.	35, 63
Лившиц М.А.	22	Прохорчук Е.Б.	73, 82	Филипенко М.Л.	72
Лисицина Е.С.	46	Птицын А.Б.	37	Филиппова В.А.	32–33, 38
Литовка Н.П.	88	Пузанов Г.А.	85, 89	Филошин М.А.	65
Лихошвай Е.В.	30, 36	Пузанов М.А.	22	Фисунов Г.Ю.	50
Логачева М.Д.	49, 53, 60, 63	Пузырев В.П.	83	Фишман В.С.	84, 87
Ломакина А.В.	33	Путинцева Ю.А.	63	Флегонтов П.Н.	49
Мазур А.М.	82	Равин Н.В.	31, 34, 36, 39, 41, 64–65	Франк Л.А.	15
Майкова О.О.	35	Раднагуруева А.А.	35, 39, 41	Хальзов И.А.	33
Макеева О.А.	82	Ратушняк А.С.	91	Ханаев И.В.	30, 35
Макеев В.Ю.	53	Рахимова С.Е.	87	Хафизов К.Ф.	60
Маколов С.В.	63	Рихтер В.А.	77, 86, 88, 90	Храмсева Е.Е.	74
Максютов Р.А.	46	Рожмина Т.А.	62	Хуснутдинова Э.К.	91
Макунин А.И.	71–72, 75–76, 78–80	Романенко С.А.	75, 79–80	Цыбин А.Н.	63
Мальгин А.А.	14, 16	Романов Г.П.	91	Чен М.	22
Малярчук Б.А.	88	Романов М.Н.	33	Чердынцева Н.В.	83
Манолов А.И.	46	Рубцова М.П.	16	Черкасова М.Е.	48, 52
Манукян В.А.	32, 38	Рубцов Н.Б.	77	Черницына С.М.	33
Марданов А.В.	31, 36, 39, 41, 64–65	Руденская Ю.А.	49	Чернов А.С.	44
Марков А.В.	83	Руднева Л.В.	40	Чикаев Н.А.	76
Мартинек П.	59	Румянцева М.Л.	48, 49, 52, 62	Чудаков Д.М.	21
Марусин А.В.	82	Савельева А.В.	88, 90	Шагина И.А.	23
Матюгина Е.Б.	37	Савиновская Ю.И.	90	Шагин Д.А.	23
Мелентьев В.С.	16	Сазонов Н.Н.	91	Шаров В.В.	63
Мельникова Н.В.	59, 61–62, 85	Саксаганская А.С.	49, 62	Шартл М.	80
Мензоров А. Г.	84	Самаров Н.И.	47	Шаршов К.А.	45, 50–52
Метспалу М.	91	Семашко Т.А.	46, 50	Шаталов А.А.	53
Метспалу Э.	91	Семенов Д.В.	77, 86, 88, 90	Шатский И.Н.	13
Минчева Е.В.	37	Сенченко В.Н.	89	Швалов А.Н.	46
Мирджамалова Н.А.	44	Сергиев П.В.	16	Шеленков А.А.	64
Мирошников К.А.	47	Сердюкова Н.А.	75, 78, 80	Шендер В.О.	77, 86
Мирошников К.К.	47	Серов О.Л.	87	Шестопапов А.М.	45, 50–52
Молкенов А.Б.	87	Симаров Б.В.	62	Шимов И.В.	40
Морозов И.В.	33	Скрябин К.Г.	64–65, 73	Шипулин Г.А.	60
Мунтян А.Н.	62	Скрябин Н.А.	86–87, 90	Шлихт А.Г.	23
Мунтян В.С.	48–49, 52, 62	Славохотова А.А.	64	Шнайдер Т.А.	84
Муравенко О.В.	59, 61	Слепцов А.А.	83, 87	Шнейдер М.М.	47
Мурашкина Т.А.	45, 51–52	Смоленский В.И.	33	Штратникова В.Ю.	49, 53
Назаренко М.С.	83	Снежкина А.В.	59, 85	Шубенкова О.В.	33
Назаркина Ж.К.	89	Соболев И.А.	45, 50–52	Шугай М.	20
Наконечная Т.О.	20, 85	Соловьев А.В.	91	Шульга О.А.	64–65
Небесных И.А.	35	Сорокоумов Е.Д.	91	Шуныков М.В.	71
Недолужко А.В.	73	Сперанская А.С.	60, 61	Щелканов М.Ю.	50, 52
Николаев А.Ю.	36	Старикова Е.В.	40	Щелкина А.К.	22
Никонов И.Н.	32, 33, 38	Старков А.И.	40	Щелкунов М.И.	49, 53
Новиков А.Д.	53	Степанова Алёна О.	79	Щелкунов С.Н.	46
Новикова Н.И.	32–33, 38	Степанова С.А.	44	Щенникова А.В.	64–65
Новикова О.А.	89	Степанов В.А.	82	Щербаков Д.Ю.	37
Нуштаева А.А.	77, 86	Степанов Г.А.	77, 86	Щербаков П.Л.	46
Оводов Н.Д.	71–72	Стефанова Н.А.	80	Эльдаров М.А.	41
Одинцова Т.И.	64	Стрелкова Е.В.	31	Эрдынеева Е.Б.	41
Олехнович Е.И.	38	Табиханова Л.Э.	22	Юрлов А.К.	51
Орешкова Н.В.	63	Танащук Т.Н.	41	Яненко А.С.	53
Орлова Н.Г.	21	Таранин А.В.	76	Abdennur N	17
Орлов Ю.Л.	19, 21–22	Татарнинова Т.В.	73	Adonina I.G.	69
Осипова Л.П.	22	Таширева Л.А.	84	Afonnikov D.A.	65, 70
Остерман И.А.	16	Тимошкин О.А.	30	Aisina D.E.	92
Павлова О.Н.	33	Тихонова М.А.	75	Aksenova E.I.	53–54
Панин А.Н.	33	Тишкин А.А.	71–72	Alborova I.E.	74
Пенин А.А.	60, 63	Толмачева Е.Н.	90	Alekseev B.Y.	95
Перельмутер В.М.	83–84	Толстых Н.А.	51	Alexyuk M.S.	42–43
Пименов Н.В.	34, 36	Тотменин А.В.	44–45	Alexyuk P.G.	42–43
Побегуц О.В.	46	Тоцаков С.В.	47	Alikina T.Y.	42, 57
Побединцева М.А.	78, 80	Трегубчак Т.В.	46	Allanson E.	81
Поверенная Е.В.	20	Трифонов В.А.	71–72, 75–76, 78–80	Anisimenko M.S.	95
Погорельская А.М.	16	Тушикин А.Е.14–16, 34, 37, 44–45, 48, 58, 77		Antipov D.	26
Покушалов Е.А.	89	Турчанинова М.А.	21	Antonets D.V.	27
Поленогова О.В.	32	Тяхт А.В.	38	Bankevich A.	26

АВТОРСКИЙ АЛФАВИТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

Bashinskaya V.V.	92	Kiselev I.S.	94	Safonova Y.	26
Battulin N.R.	18	Kochetov A.V.	66	Saito Takehiko	52
Baturina O.A.	56, 94	Kolpakov F.A.	25	Salina E.A.	69
Baulina N.M.	92, 94	Kondrakhin Yu.V.	25, 27	Saveliev V.	26
Beletskiy A.V.	69	Korne K.P.	55	Savkova AV	93
Belikov S.I.	54	Korobeynikov A.	26	Savvateeva E.V.	95
Belousova I.A.	56	Korol A.	69	Schworer S.	81
Berdyugina D.A.	95	Kovalenko S.P.	26	Semenov A.N.	53-54
Berezin V.E.	42-43	Kozhemyakina R.V.	28	Sergeeva E.M.	69
Bogoyavlenskiy A.P.	42-43	Krasikova A.V.	18	Serov O.L.	18
Bondareva N.E.	53	Krasilnikov SE	93	Shamanin V.A.	26
Boyko A.N.	94	Krasnov G.S.	96	Sharapova N.E.	53-54
Brandão HB	17	Krivtsova O.	94	Sharipov R.N.	25, 27-28
Britanova OV	93	Kudryavtsev A.A.	95	Shatskaya N.V.	65-70
Bukin Y.S.	54	Kudryavtseva A.V.	96	Shcherban A.B.	69
Bushmanova E.	26	Kulakova O.G.	94	Shestopalov A.M.	57
Butina T.V.	54	Kunda M.S.	53-54	Shmakov N.A.	65, 70
Börner A.	65	Kurilenko V.V.	56	Shoeva O. Y.	65
Chadaeva I.V.	28	Kusaykin M.I.	56	Silchenko A.S.	56
Cherenkov P.A.	67	Kuznetsova G.V.	42	Slack E.A.	81
Chernysheva N.Yu.	56	Kyrova E.I.	55	Slobodyanyuk S.Ya.	95
Damas J.	81	Lapidus A	26	Snezhkina A.V.	95-96
Danckwardt S.	17	Larkin D.M.	81	Stenkova A.M.	56
Daniilova L.V.	94	Lazarevich N.	94	Stepanov O.A.	96
Dergilev A.I.	24	Lee J.	87	Sukhotko A.S.	95
Dmitriev A.A.	95	Levin M.	17	Tabanyuhov K.A.	28
Dorogina O.V.	68	Levitsky V.G.	67	Tachibana-Konwalski K	17
Doroshkov A. V.	70	Logacheva M.	94	Thierry O.	24
Egorov ES	93	Mandawala A.	91	Tupikin A.E.	54
Ermoschenkova M.V.	95	Mardanov A.V.	86	Turmagambetova A.S.	42-43
Farre M.	81	Markelov M.L.	74	Ulianov SV	17
Favorov A.V.	94	Martell H.	81	Valeev T.F.	25
Favorova O.O.	94	Martemyanov V.V.	56	Vasiliev G. V.	65, 70, 93
Fedorova M.S.	95-96	Maslova A.V.	18	Vinogradov D.	94
Fishman V.S.	18	Matsvay A.D.	74	Vlassov V.V.	94
Flyamer IM	17	Mazurina E.P.	28	Volkova O.A.	25, 27-28
Fowler K.E.	81	Meleshko D.	26	Voronina O.L.	53-54
Frenkel Z	69	Melnikona N.V.	95	Wiebe DS	68
Garanin A.Yu.	95	Mikhailov V.V.	56	Yevshin I.S.	25, 27-28
Gassler J	17	Mikheenko A.	26	Yurchenko K.S.	57
Gerasimov AV	93	Mirny LM	17	Zaretsky A.R.	96
Gintzburg A.L.	54	Mironova V.V.	67-68	Zdobnov E.	40
Glagoleva A.Y.	65	Molkenov A.B.	24	Zemlyanskaya E.V.	67
Glushchenko A.V.	57	Mustafin K.K.	74	Zhevelyuk E.A.	96
Golovyuk A.L.	96	Muterko A.F.	69	Zigangirova N.A.	53
Gornostaeva E.V.	26, 95	Nabieva E.	94	Zikiryakhodjaev A.D.	95
Griffin D.K.	81	Nakonechnaya TO	93	Zinovyyev A.Yu.	24
Grosse, Ivo	66	Naumova N.B.	42		
Gulyaeva LF	93	Nesterov M.A.	69		
Gurevich A.	26	Novikova D.D.	67		
Guvatova Z.G.	95	Nuriddinov M.A.	18		
Ignatov A.N.	55	Nurk S.	26		
Ilyinykh A.V.	56	Nuzhdina N.S.	68		
Ilyinykh Ph.A.	56	Nyushko K.M.	96		
Ilyukha V.V.	81	Omelyanchuk NA	68		
Imakaev M	17	Orlov Y.L.	24, 28		
Isaeva M.P.	56	Oshchepkov D.Y.	67		
Ivashchenko A.T.	92	Osmak G.J.	92		
IWGSC	69	O'Connor R.E.	81		
Jennings R.	81	Penin A.	94		
Joseph S.	81	Pevzner P.	26		
Kabilov M.R.	42, 54, 56-57, 94	Pimkina E.V.	74		
Kairov U.Ye.	24	Pisareva E.E.	26		
Kalabashkina E. V.	55	Polenogova O.V.	56		
Kalinin D.V.	96	Poltorak A.	81		
Kalykhbergenov Ye.M.	24	Popova E.V.	94		
Kaprin A.D.	95	Prjibelski A.	26		
Kargapolova Y.	17	Pudova E.A.	95		
Kasatskaya SA	93	Rakitin A.L.	69		
Kel A.E.	25	Rands Ch.	40		
Khafizov K	74	Razin SV	17		
Khlestkina E.K.	65, 70	Russkikh N.E.	27		
Kiazim L.	81	Ryzhova N.N.	53-54		
Kiseleva A.A	69	Sadritdinova A.F.	95		

Компания "БиоВитрум" предлагает современные технологии и продукцию для исследования широкого спектра объектов - от нуклеиновых кислот до лабораторных животных. Портфель компании Life Science включает оборудование и расходные материалы от ведущих мировых производителей по следующим направлениям:



- **Молекулярная генетика** - выделение, очистка и концентрирование нуклеиновых кислот, контроль качества нк (в том числе NGS библиотек), ПЦР, цифровая ПЦР, фрагментный анализ, секвенирование по Сенгеру, микроаррей, NGS, уникальная технология прямой цифровой детекции - NanoString
- **Протеомика** - выделение белков, электрофорез, вестерн-блоттинг, капиллярный электрофорез, спектрофотометрия и др.
- **Клеточные технологии** - культивирование и анализ клеток, скрининг и отбор клеточных клонов, чистые комнаты и изоляторы, цитофлуорометрические исследования и др.
- **Микроскопия** - современные системы визуализации и комплектующие от простой микроскопии до конфокальной и систем сверхвысокого разрешения.
- **Доклинические исследования** - томография, оборудование для содержания животных, системы исследования поведения, хирургические инструменты.



**THE LIFE SCIENCE
TRADE & SERVICES COMPANY**

SKYGEN

Мы поставляем оборудование, реагенты и расходные материалы для исследовательских и биотехнологических лабораторий и производств.

Мы находим, разрабатываем и внедряем высокотехнологичные решения в генетике и геномике.

Наша цель – успех исследований наших покупателей.



НАША СТРАТЕГИЯ - МОЛЕКУЛЯРНЫЕ РЕШЕНИЯ «ПОД КЛЮЧ» ОТ ПОСТАНОВКИ ЗАДАЧИ ДО ИНТЕРПРЕТАЦИИ ДАННЫХ

БЛИЖЕ К КАЖДОМУ!

Более 3000 лабораторий работают с нами.

Доверяют и рекомендуют.

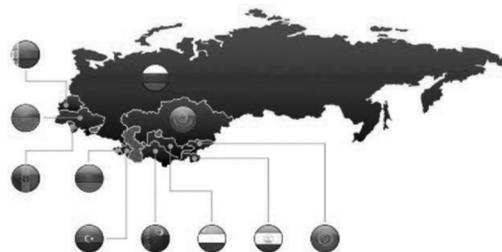
Территория Россия и страны СНГ

Исследовательские лаборатории

- Академии Наук
- Министерства Здравоохранения
- Криминалистики & судебной медицины
- Фарм производств & Биотеха

Ветеринарные лаборатории

Лаборатории пищевой безопасности



5 ПРИЧИН ВЫБРАТЬ SKYGEN

- Доступ к высококачественной продукции
- Быстрая логистика и складская программа
- Удобное и взаимовыгодное сотрудничество
- Высококвалифицированная поддержка
- Мы устанавливаем адекватные цены

ПОЛНОЕ ОСНАЩЕНИЕ ЛАБОРАТОРИЙ



ПРОДУКЦИЯ:

- химические реактивы со склада и на заказ по каталогам;
- лабораторное оборудование;
- аналитические приборы, хроматография;
- биохимия;
- собственное производство органических растворителей различной степени очистки для использования в химическом производстве, в лабораторной практике, растворителей высокой степени очистки для хроматографии.

НАШИ ПОСТАВЩИКИ:



Компания «Химмед» успешно работает более 25 лет. Собственная сеть логистики компании позволяет без временных затрат осуществлять регулярные поставки грузов между складом в Германии и складами в Москве и Подмосковье.

Инновации и новейшие технологии в области биохимии и биотехнологии – предмет особого внимания для наших специалистов. Именно поэтому мы сможем обеспечить научные исследования любого уровня материалами, использование которых обеспечит максимально эффективный результат.

Сотрудники компании с готовностью ответят на все интересующие вас вопросы и помогут сориентироваться во всем многообразии биохимической продукции от российских и зарубежных производителей.

Давние и взаимовыгодные отношения, сложившиеся с нашими партнерами, делают возможным формирование конкурентоспособных цен для клиентов компании «Химмед».

Среди наших поставщиков: R&D, Merck, Neogen, Cayman, DUCHEFA BIOCHEMIE, BioWest и многие другие.

Москва, 115230, Каширское шоссе, д. 9, корп. 3. Тел.: +7 (495) 728 4192, факс: 742 8341, e-mail: mail@chimmed.ru
Новосибирск, 630090, просп. Академика Лаврентьева, 6/1. Тел./факс: +7 (383) 335 6108, e-mail: sibir@chimmed.ru

www.chimmed.ru



Оборудование и расходные материалы для молекулярно-генетических и клеточных исследований

Автоматизированные станции для работы с нуклеиновыми кислотами: Janus G3, Sciclone G3, Zephyr G3

- Выделение ДНК
- Нормализация концентрации ДНК
- Разведение образцов
- Подготовка для ПЦР
- Подготовка NGS библиотек



Специализированные решения для подготовки NGS библиотек Janus G3 NGS Express, Sciclone G3 NGS, Zephyr NGS

- Подготовка библиотек для различных платформ секвенирования
- Готовые протоколы для работы с реагентами различных производителей
- Поддержка пользовательских протоколов



Система для автоматизированного капиллярного электрофореза LabChip GX/GX II Touch

- Определение длины фрагментов нуклеиновых кислот, концентрации и количества
- Время исследования образца 30 – 60 секунд
- Многократное использование чипа: 400 – 2000 образцов
- Представление результатов в цифровом формате



Официальный дистрибьютор PerkinElmer (США) в России — компания «БиоЛайн»



группа компаний

ООО «БиоЛайн»

Россия, 197101, Санкт-Петербург

Пинский пер., д. 3, Лит. А

тел.: +7 (812) 320 49 49

факс: +7 (812) 320 49 40

e-mail: main@bioline.ru

www.bioline.ru

Москва, тел.: +7 (800) 555 49 40

Новосибирск, тел.: +7 (383) 227 09 63

Екатеринбург, тел.: +7 (343) 287 32 49

Владивосток, тел.: +7 (423) 201 18 08

Нижний Новгород, тел.: +7 (831) 278 61 47

Ростов-на-Дону, тел.: +7 (863) 268 99 32

Казань, тел.: +7 (843) 570 66 88

Самара: +7 (846) 246-06-54

Сочи, тел.: +7 (862) 296-59-82

Единый бесплатный номер сервисной службы для всех регионов России: 8 800 333 00 49

ВАША ЭКОНОМИЯ ДО 20%!



Специальные предложения на расходные материалы и оборудование Eppendorf

- > Высокоскоростные центрифуги
5418/5418 R, 5427 R, 5424/5424 R,
5430/5430 R
- > Диспенсеры Multipette® E3/E3x
- > Дозатор для серологических
пипеток Easypet® 3
- > Серологические пипетки
- > Наконечники Combitips advanced®
- > Наконечники eрT.I.P.S.® Dualfilter
- > Наконечники eрT.I.P.S.® Bulk (в пакетах)
- > Пробирки Eppendorf Quality™
объемом от 0,5 до 50 мл

Акция действует с 01.02.2017 по 31.08.2017. Подробности у наших дилеров!

ООО «Эппендорф Раша» +7 495 743 51 23 info@eppendorf.ru www.eppendorf.ru

Все для Вашей успешной работы в лаборатории!



Наборы для выделения нуклеиновых кислот и белков
Реагенты для биохимических исследований

Питательные среды для клеточных культур
Тест-системы микробиологического контроля

Проточные цитометры и аналитическое оборудование
Большой выбор расходных материалов

Лабораторный пластик и стекло



РОШ ДИАГНОСТИКА РУС

Инновации во имя жизни



ООО «Рош Диагностика Рус» – официальный импортер продукции Roche в России и лицензиат компании F.Hoffmann-La Roche Ltd. Отдел молекулярной диагностики (Roche Molecular Diagnostics) разрабатывает, создает и выводит на рынок диагностические решения, базирующиеся на патентованной технологии Roche – полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Каждое из этих решений включает в себя оборудование, реагенты, протокол выполнения и автоматизированные аналитические алгоритмы.



В практической медицине молекулярно-диагностические платформы Roche активно используются для скрининга донорской крови, выявления и мониторинга вирусов ВИЧ, гепатитов, папилломы, бактериальных инфекций, а также для диагностики наличия известных мутаций в генах ассоциированных с онкологическими заболеваниями.

Для научных лабораторий Roche предлагает:

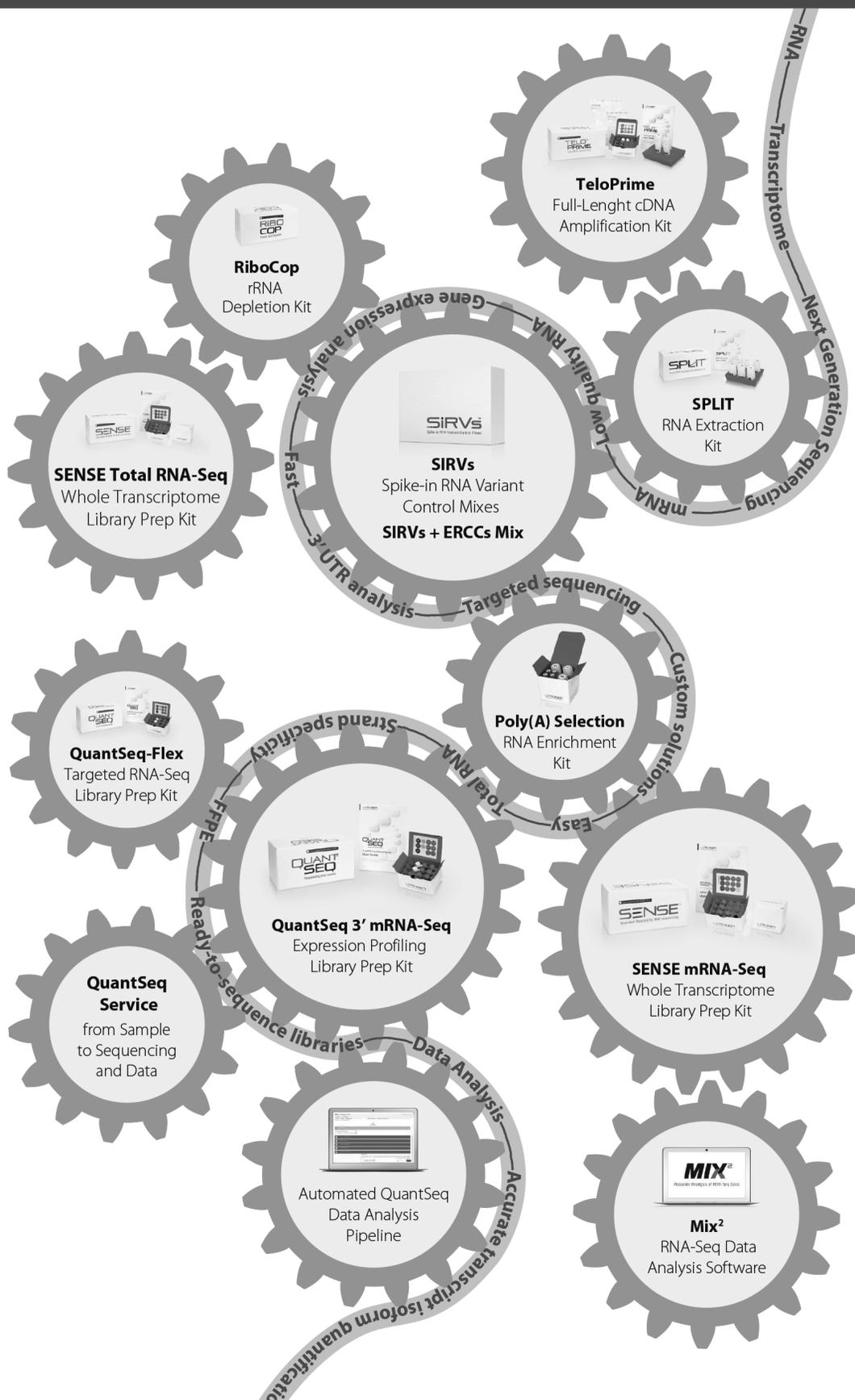
- Инновационные открытые ПЦР-анализаторы в реальном времени LightCycler 96 и LightCycler 480 II
- Высококачественные наборы для выделения нуклеиновых кислот и реагенты для ПЦР
- Решения для направленного отбора генов с последующим секвенированием NGS: NimbleGen – технология гибридизации с ДНК зондами, HEAT-seq технология амплификация с использованием молекулярных баркодов.
- Комплексное решение AVENIO для исследования мутаций в генах, ассоциированных с онкологией методом NGS

Компания Roche предлагает комплексные решения, включающие в себя не только оборудование и реагенты, но и технический сервис, обучение персонала и постоянную методическую поддержку.

ras.russia@roche.com
www.dialog.roche.com
Тел.: +7 (495) 229-69-99

115114, Россия, Москва, ул. Летниковская, д. 2, стр. 2, Бизнес-центр «Вивальди Плаза»

All you need for your RNA-Seq experiment



Издатель ООО «Парк-медиа»
119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1 стр. 75Г
Тел. +7 (495) 930 88 50
www.strf.ru
email: info@strf.ru
Тираж 200 экз
Типография «Печатных Дел Мастер»
Подписано в печать 05.06.2017

ISBN 978-5-9902238-5-1



9 785990 22385 1