



СГУ ИМ. Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО  
**14 – 19 ИЮНЯ 2024**  
САРАТОВ

# СБОРНИК ТЕЗИСОВ МЕЖДУНАРОДНОГО КОНГРЕССА

**Том 2**

**VIII СЪЕЗД ВАВИЛОВСКОГО ОБЩЕСТВА  
ГЕНЕТИКОВ И СЕЛЕКЦИОНЕРОВ,**  
ПОСВЯЩЕННЫЙ 300-ЛЕТИЮ  
РОССИЙСКОЙ НАУКИ И  
ВЫСШЕЙ ШКОЛЫ



congress.  
vogis.  
org



ВАВИЛОВСКОЕ  
ОБЩЕСТВО  
ГЕНЕТИКОВ  
И СЕЛЕКЦИОНЕРОВ  
(ВОГиС)

САРАТОВСКИЙ  
НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ  
им. Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО  
(СГУ)



# МЕЖДУНАРОДНЫЙ КОНГРЕСС

«VIII Съезд Вавиловского общества

генетиков и селекционеров, посвященный

300-летию российской науки и высшей школы»

Саратов

14-19 июня 2024 года

# INTERNATIONAL CONGRESS

“VIII CONGRESS OF THE VAVILOV SOCIETY OF GENETICISTS AND BREEDERS,

DEDICATED TO THE 300<sup>TH</sup> ANNIVERSARY

OF RUSSIAN SCIENCE AND HIGHER EDUCATION”

SARATOV

JUNE 14-19, 2024

## СБОРНИК ТЕЗИСОВ

## BOOK OF ABSTRACTS

### ТОМ 2

### VOLUME 2

ББК 28/04  
УДК 575.1/2

Международный Конгресс «VIII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 300-летию российской науки и высшей школы». Том 2. Саратов, 14–19 июня 2024 года | INTERNATIONAL CONGRESS “VIII Congress of the Vavilov Society of Geneticists and Breeders, dedicated to the 300th anniversary of Russian science and higher education” Saratov, June 14–19, 2024. Volume 2. Издательский дом «Петрополис», Санкт-Петербург, 2024. — 17 с.

В Томе 2 Сборника тезисов Международного Конгресса «VIII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 300-летию российской науки и высшей школы» (14-19 июня 2024 г., Саратов, Россия), представлены тезисы докладов участников Секции «Генетические технологии от биомедицины до технологичной еды» Симпозиума 13 «Направленное изменение генетической информации», одобренные программным комитетом Конгресса.

Тезисы опубликованы в авторской редакции.

Научное электронное издание

ISBN 978-5-9676-1630-3

© Межрегиональная общественная организация  
Вавиловское общество генетиков и селекционеров  
(ВОГиС), 2024  
© Коллектив авторов, 2024  
© ИД «Петрополис», 2024



## СОДЕРЖАНИЕ

### ТЕЗИСЫ СИМПОЗИАЛЬНЫХ ДОКЛАДОВ ABSTRACTS OF TALKS

#### Симпозиум 13. Направленное изменение генетической информации Symposium 13: Directed Change of Genetic Information

#### Секция «Генетические технологии от биомедицины до технологичной еды» Section “Genetic technologies from biomedicine to technological food”

Создание животных с редактированным геномом для биомедицины .....	6
<i>Н. Р. Баттулин</i>	
Теоретические и прикладные аспекты генетической модификации и изменения генома сельскохозяйственной птицы .....	7
<i>Н. А. Волкова</i>	
NGS и персонализированная онкология: текущее состояние и перспективы .....	8
<i>Е. В. Денисов, Т. С. Геращенко, А. А. Коробейникова, Е. С. Колезова, Р. С. Воробьев, К. А. Куанышева, Т. Д. Дампилова, А. И. Рябова, Е. О. Родионов, Е. Л. Чойнзонов</i>	
Перепрограммирование клеток жировой ткани .....	9
<i>А. Д. Егоров, С. С. Бойченко, М. А. Юнин</i>	
Биологический мутагенез растений: статус и перспективы использования .....	10
<i>И. В. Киров, П. Ю. Меркулов, А. В. Власова, А. В. Полховский, М. Ю. Казанцев, Е. Д. Камараули, Д. В. Перевозчиков, А. С. Ивахненко, К. Н. Тюрин, М. С. Серганова, Г. А. Петров</i>	
Результаты редактирования генома с использованием системы CRISPR/Cas9 и соматического клонирования у мелкого рогатого скота .....	11
<i>Г. Н. Сингина, П. В. Сергиев, А. В. Лопухов, Р. Ю. Чинаров, В. А. Луканина, Е. Н. Шедова, Е. А. Гладырь, М. П. Рубцова, Н. А. Зиновьева</i>	
Изучение модифицирующей роли гена <i>XIAP</i> в клеточной модели болезни Вильсона-Коновалова .	12
<i>Н. А. Скрыбин, Р. Р. Савченко, Т. Н. Киреева, Д. И. Жигалина, А. С. Доме, М. Е. Меняйло, А. А. Фролова, Г. А. Степанов</i>	
Направленное редактирование генома бактерий <i>Staphylococcus aureus</i> и <i>Klebsiella pneumoniae</i> ....	13
<i>Ю. В. Сопова, Д. А. Кандина, М. Е. Велижанина, В. В. Гостев, С. В. Сидоренко</i>	
Модификации нуклеотидов мРНК и мРНК-технологии для решения задач биомедицины .....	14
<i>Г. А. Степанов, Д. Н. Антропов, О. В. Марков, А. С. Доме, Д. В. Гладких, Е. С. Журавлев, В. М. Гольшев, П. А. Пучков, Д. М. Макарова, М. А. Маслов, В. В. Власов</i>	
Получение синтетического бактериофага против <i>Vibrio cholerae</i> .....	15
<i>Г. Ю. Фисунов, Т. А. Семашко, Д. В. Евсютина, Е. А. Цой, Д. Р. Харрасов, Д. А. Гарагуля, В. М. Говорун</i>	
Рациональный дизайн синтетических промоторов для тканеспецифической экспрессии генов .....	16
<i>Фишман В. С.</i>	

ТЕЗИСЫ СИМПОЗИАЛЬНЫХ ДОКЛАДОВ

---

ABSTRACTS OF TALKS



Симпозиум 13. Направленное изменение генетической информации  
Symposium 13: Directed Change of Genetic Information

Секция «Генетические технологии от биомедицины до технологичной еды»  
Section “Genetic technologies from biomedicine to technological food”



## Создание животных с редактированным геномом для биомедицины

Н.Р. Баттулин<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> ИЦиГ СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup> НГУ, Новосибирск [battulin@bionet.nsc.ru](mailto:battulin@bionet.nsc.ru)

Расшифровка механизмов реализации генетической информации открыла возможности для проектирования организмов с заданными свойствами. Появление инструментов геномного редактирования значительно расширило возможности внесения запланированных модификаций в геномы. Особенно сильно это почувствовалось в области создания генетических моделей лабораторных животных.

В докладе я расскажу об опыте создания летальной модели мышей восприимчивых к COVID-19. Данные мыши были созданы путем пронуклеарной микроинъекции конструкции обеспечивающей сильную повсеместную конститутивную экспрессию гена человека ACE2.

Будут рассмотрены примеры использования цитоплазматической инъекции CRISPR/Cas9 для воспроизведения у мышей генетических вариантов, обнаруженных у других организмов, людей и сельхоз животных. Такие модели позволяют тестировать патогенность вариантов, а также исследовать молекулярные механизмы кодирования различных признаков.

Будут рассмотрены проблемы создания генетически модифицированных животных пригодных для ксенотрансплантации органов человеку.



## Теоретические и прикладные аспекты генетической модификации и изменения генома сельскохозяйственной птицы

Н.А. Волкова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста

natavolkova@inbox.ru

В настоящее время значительный интерес вызывают исследования в области трансгенеза и геномного редактирования сельскохозяйственной птицы. При этом перспективным является изменение генома птиц в направлении повышения устойчивости к инфекционным заболеваниям, а также улучшения продуктивных качеств. Вместе с тем, особенности физиологии и воспроизводства сельскохозяйственной птицы значительно ограничивают возможности использования и результативность применения методов направленной модификации генома, широко используемых для других видов сельскохозяйственных животных. На базе ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста в течение продолжительного времени ведутся работы по разработке и оптимизации отдельных этапов технологии генетической модификации и изменения генома сельскохозяйственной птицы, в частности, кур и перепелов. Разработан и предложен ряд методических подходов по получению генетически модифицированных кур и перепелов с использованием в качестве клеток-мишеней для доставки генетических конструкций различных типов эмбриональных и соматических клеток, в частности, клеток бластодермы, примордиальных зародышевых клеток, сперматогоний, клеток яйцевода. При использовании различных методов (электропорация, липофекция, вирусные вектора) высокая эффективность введения генетических конструкций в данные клетки-мишени установлена при применении лентивирусных векторов. При введении лентивирусных векторов в эмбрионы кур *in vivo* результативность получения кур с измененным геномом в зависимости от используемых генетических конструкций достигала 25–37%.

Исследования проведены при финансовой поддержке РФФ, грант № 21-66-00007, а также Министерства науки и высшего образования РФ, тема № FGGN-2024-0014.



## NGS и персонализированная онкология: текущее состояние и перспективы

Е. В. Денисов<sup>1</sup>, Т. С. Геращенко<sup>1</sup>, А. А. Коробейникова<sup>1</sup>, Е. С. Колегова<sup>1</sup>, Р. С. Воробьев<sup>1</sup>,  
К. А. Куанышева<sup>1</sup>, Т. Д. Дампилова<sup>1</sup>, А. И. Рябова<sup>1</sup>, Е. О. Родионов<sup>1</sup>, Е. Л. Чойнзон<sup>1</sup>

<sup>1</sup> НИИ онкологии Томского НИМЦ РАН, Томск

d\_evgeniy@oncology.tomsk.ru

Использование генетических технологий проливает свет не только на механизмы появления, развития и прогрессирования заболеваний, но и предоставляет возможность для разработки новых диагностических, терапевтических и прогностических подходов. Одной из таких технологий является секвенирование нового поколения (NGS), включающее в себя группу методов для анализа нуклеотидных последовательностей с целью поиска различного рода генетических и эпигенетических нарушений и оценки экспрессии генов и некодирующих РНК. Наибольшее применение NGS нашёл в онкологии, предоставив не только важнейшую фундаментальную информацию, но и определив вектор персонализации лечения рака. Так, широкое распространение получила диагностика наследственных и соматических мутаций с целью оценки риска развития онкологических заболеваний, прогнозирования тяжести клинического течения, предсказания чувствительности к лекарственным препаратам и, таким образом, назначения высокоэффективных схем химио-, таргетной и иммунотерапии. В докладе представлен собственный опыт использования полноэкзомного секвенирования в поиске герминальных вариантов и соматических мутаций-драйверов развития и прогрессирования онкологических заболеваний, выявления диагностических, предиктивных и прогностических маркеров и терапевтических мишеней в конкретных клинических случаях и оценки метагенома опухолевой ткани. Также рассмотрен пример создания мультигенной панели на основе международных клинических рекомендаций и её использования в диагностической практике и разработки программного обеспечения с целью автоматизации хранения, анализа и интерпретации данных NGS. Кроме того, обсуждено возможное применение полногеномного секвенирования в онкологии в плане максимизации диагностических и терапевтических опций.

Исследования выполнены при финансовой поддержке грантов РФ № 20–75–10060 и 22–15–00308 и Гранта Президента РФ № МК-1940.2022.3.



## Перепрограммирование клеток жировой ткани

А.Д. Егоров<sup>1</sup>, С.С. Бойченко<sup>1</sup>, М.А. Юнин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Университет Сириус

egorov.alek@gmail.com

Ожирение является наиболее распространённым нарушением обмена веществ, ведущим к посту смертности от сердечно-сосудистых заболеваний. Морфологически и функционально различают белый и бурый типы жировой ткани, основную массу клеток которых составляют, соответственно, белые и бурые адипоциты. Для бурой жировой ткани характерна высокая метаболическая активность, поскольку бурые адипоциты способны к экспрессии гена *Ucp1*. Белок UCP1 (uncoupling protein 1, известный также как термогенин) разобщает дыхательную цепь в митохондриях, позволяя протонам входить в матрикс без синтеза АТФ, что приводит к диссипации энергии — высвобождению тепла. UCP1 также переносит свободные жирные кислоты, служащие субстратом для окисления в жировой ткани, что стимулирует катаболизм. Показано, что наличие бурой жировой ткани ассоциируется с меньшим риском развития диабета 2-го типа, дислипидемии, ишемической болезни сердца, гипертонии. Обнаружение «бежевых» адипоцитов, имеющих общее происхождение с клетками белой жировой ткани, но в которых, как и в бурых, происходит термогенез и интенсивный липолиз, открыло пути для разработки новых подходов к терапии ожирения. Ранее были описаны транскрипционные регуляторы дифференцировки бурых адипоцитов: к ним относятся PGC1 $\alpha$  (коактиватор основного фактора транскрипции адипогенеза PPAR $\gamma$ ), N-метилтрансфераза лизинон гистонов PRDM16 и фактор транскрипции FoxP4.

Нами получены данные, подтверждающие тропизм аденоассоциированных вирусных векторов (AAB) 6, 8 и 9 серотипов к преадипоцитам мыши 3T3-L1. Для сборки AAB созданы генетические конструкции, кодирующие PRDM16 и FoxP4. Была произведена продукция аденоассоциированных вирусных векторов 8 и 9 серотипов, кодирующих гены транскрипционных регуляторов PRDM16 и FoxP4. Нами была изучена способность вирусных векторов, кодирующих гены транскрипционных регуляторов дифференцировки бурых адипоцитов FOXF4 и PRDM16, влиять на экспрессию генов клеток линии 3T3-L1. Доставка трансгенов PRDM16 и FoxP4 при помощи AAB 8 и 9 серотипов приводит к увеличению экспрессии характерных для бурых адипоцитов генов в клетках 3T3-L1, в частности *Ucp1*. Кроме того, было показано, что после трансдукции AAV-PRDM16 и AAV-FOXP4 происходит значительное снижение экспрессии генов элонгаз жирных кислот *Elovl3* и *Elovl6*, а также гена *Srebf1*, кодирующего регулирующий обмен липидов транскрипционный фактор.

Масс-спектрометрическое исследование состава липидов показало, что трансдукция дифференцированных клеток 3T3-L1 аденоассоциированным вирусом 8-го серотипа, кодирующим ген PRDM16, приводит к значительному снижению содержания ненасыщенных жирных кислот (C14:1, C16:1, C18:1, C20:1, C20:4, C22:6) по сравнению с контролем. При трансдукции дифференцированных клеток 3T3-L1 аденоассоциированным вирусом 8-го серотипа, кодирующим ген FOXF4 выявлены статистически значимые изменения уровней для

15 липидов по сравнению с контролем. Изменения в составе липидов подтверждают обнаруженные ранее изменения в экспрессии генов. С использованием наработанных аденоассоциированных вирусных векторов проведено пилотное исследование, в котором AAB вводились локально в области жировых отложений мышечной линии C57/Bl6, что приводило к снижению массы тела экспериментальных животных. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда и Кубанского научного фонда (грант No 22-14-20046).



## Биологический мутагенез растений: статус и перспективы использования

И.В. Киров<sup>1, 2</sup>, П.Ю. Меркулов<sup>2, 1</sup>, А.В. Власова<sup>2, 1</sup>, А.В. Полховский<sup>2, 1</sup>, М.Ю. Казанцев<sup>2</sup>,  
Е.Д. Камараули<sup>2</sup>, Д.В. Перевозчиков<sup>1</sup>, А.С. Ивахненко<sup>2</sup>, К.Н. Тюрин<sup>2</sup>, М.С. Серганова<sup>2</sup>, Г.А. Петров<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ ВНИИСБ, Москва

<sup>2</sup> МФТИ (Физтех), Долгопрудный

kirovez@gmail.com

Функциональная геномика позволила идентифицировать биологические молекулы (например, Cas9), который способен вносить мутации в ДНК. Кроме этого, стали известны гены, напрямую вовлечённые в контроль мутационного процесса, происходящего в клетках в естественных условиях. К последним относятся, например, гены системы репарации и гены, сдерживающие активность мобильных элементов генома. С другой стороны, с развитием методов синтетической биологии и биоинформатики появилась возможность нарабатывать отдельные биомолекулы (РНК и белки), а также воспроизводить целые микроорганизмы (например, вирусы). Объединяя методы синтетической биологии и знания о контроле мутационных процессов в клетке, сегодня появилась возможность вносить мутации в геном, используя биологические агенты. Для описания этого процесса, нами введён термин «биологический мутагенез». Биологический мутагенез — это безтрансгенная технология внесения мутаций в геном с помощью синтетических или естественных биологических агентов (вирусы, белки, РНК и др.). В своей работе мы разрабатываем методы биологического мутагенеза растений на основе активации мобильных элементов и вирус-опосредованного геномного редактирования. В своём докладе я расскажу о наших последних результатах по разработке платформы для биологического мутагенеза, включающую методы активации мобильных элементов растений с помощью синтетических вирусов, поиска активных мобильных элементов в геномах растений (на примере арабидопсиса, рапса, сои, подсолнечника, томата), а также отслеживанию транспозиции и активности мобильных элементов с помощью нанопорового секвенирования. Будет представлена концепция биологического мутагенеза растений и рассказаны направления разработки и перспективы его использования для получения новых ценных генотипов растений.

Исследования выполняются при финансовой поддержке РФФ (гранты № 22–64–00076 и № 22–74–10055) и Министерства Науки и Высшего образования РФ.



## Результаты редактирования генома с использованием системы CRISPR/Cas9 и соматического клонирования у мелкого рогатого скота

Г.Н. Сингина<sup>1</sup>, П.В. Сергиев<sup>2</sup>, А.В. Лопухов<sup>1</sup>, Р.Ю. Чинаров<sup>1</sup>, В.А. Луканина<sup>1</sup>, Е.Н. Шедова<sup>1</sup>,  
Е.А. Гладырь<sup>1</sup>, М.П. Рубцова<sup>3</sup>, Н.А. Зиновьева<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, Подольск

<sup>2</sup> Институт функциональной геномики МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва

<sup>3</sup> Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва

g\_singina@mail.ru

Согласно современным тенденциям, технология геномного редактирования (gene editing, GE) в сочетании с методом клонирования ядер соматических клеток (somatic cell nuclear transfer, SCNT) является наиболее эффективным инструментом создания животных с измененными хозяйственно-полезными признаками. Цель работы заключалась в получение культуры фетальных фибробластов (ФФБ) гибрида овцы и архара, отредактированных в направлении нокаута гена миостатина (*MSTN*) и в оценке эффективности их использования в качестве доноров ядер в рамках SCNT. Для этого была проведена электропорация ФФБ плазмидой, кодирующей Cas9 и гРНК, направленной на инактивацию гена *MSTN* и индивидуальное культивирование трансфицированных клеток ( $n = 1152$ ) в 96-ти луночных планшетах до формирования ими клеточных колоний. Всего было получено 339 колоний, что составило 29,4% от общего числа использованных клеток. В 35 колониях был установлен нокаут гена *MSTN*, что соответствовало эффективности геномного редактирования 10.3%. В рамках процедуры SCNT созревшие *in vitro* ооциты, энуклеировали удаляя аспирацией первое полярное тельце (ППТ) и 10–20% прилежащей к нему цитоплазмы. Одиночные *MSTN*-ФФБ вводили в перивителлиновое пространство ооцита, через отверстие, сформированное в процессе энуклеации. Энуклеированный ооцит с перенесенной в их перивителлиновое пространство клеткой подвергали электрослиянию, после чего полученные цитогриды активировали и культивировали для эмбрионального развития. Было получено 299 клонированных эмбриона, что составило 22% от числа использованных ооцитов с ППТ. Полученные SCNT-эмбрионы были пересажены лапароскопически овцам-реципиентам. Доля суягных животных составила 11%. Таким образом, в результате проведенной работы получены GE-ФФБ гибрида овцы и архара с нокаутом гена *MSTN*, а также показана возможность их использования для получения клонированных эмбрионов, пригодных для трансплантации животным-реципиентам.

Работа выполнена при поддержке РФ (грант № 21-66-00007), а также Министерства науки и высшего образования РФ (тема № FGGN-2024-0014).



## Изучение модифицирующей роли гена *XIAP* в клеточной модели болезни Вильсона-Коновалова

Н.А. Скрябин<sup>1</sup>, Р.Р. Савченко<sup>1</sup>, Т.Н. Киреева<sup>1</sup>, Д.И. Жигалина<sup>1</sup>, А.С. Доме<sup>2</sup>, М.Е. Меняйло<sup>3</sup>,  
А.А. Фролова<sup>3</sup>, Г.А. Степанов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, Томск

<sup>2</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

<sup>3</sup> НИИ онкологии Томского НИМЦ, Томск

nikolay.skryabin@medgenetics.ru

Болезнь Вильсона-Коновалова (БВК) — наследственное орфанное заболевание, обусловленное мутациями в гене *ATP7B* и приводящее к нарушению экскреции меди с ее накоплением в висцеральных органах и центральной нервной системе. БВК характеризуется клиническим полиморфизмом, касающимся как спектра и тяжести симптомов, так и возраста манифестации заболевания. При этом не выявлены корреляции между патогенными генетическими вариантами и фенотипическими проявлениями. Все это указывает на наличие модифицирующих факторов, предположительно, одним из генов-модификаторов может выступать *XIAP*, кодирующий ингибитор апоптоза. Продукт данного гена участвует в метаболизме меди посредством ингибирования белка COMMD1 — одного из ключевых генов, участвующих в гомеостазе меди. Показано, что нокаут *Xiap* приводит к снижению содержания меди в тканях мыши.

Целью настоящего исследования являлось изучение роли гена *XIAP* в качестве потенциального модификатора при БВК. Для этого с использованием клеточной линии гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 с помощью технологии редактирования генома CRISPR/Cas9 были созданы модельные системы: линия с нокаутом гена *ATP7B* и линия с двойным нокаутом генов *ATP7B* и *XIAP*. Полученные клеточные линии были использованы для оценки цитотоксичности после обработки медью с помощью МТТ-теста. В клеточной линии HepG2 с нокаутом *ATP7B* после 24-часового воздействия  $\text{CuSO}_4$  в дозах 640 и 1280  $\mu\text{M}$  выживаемость статистически значимо снижалась до  $45,6 \pm 5,5\%$  и  $6,4 \pm 2,1\%$ , соответственно, по сравнению с контрольной клеточной линией HepG2 ( $69,6 \pm 8,8\%$  и  $27,8 \pm 4,7\%$ , соответственно). При этом дополнительный нокаут гена *XIAP* приводил к статистически значимому возрастанию выживаемости ( $57,5 \pm 5,9\%$  и  $37,8 \pm 4,1\%$ , соответственно) по сравнению с клеточной линией с нокаутом *ATP7B*. Более того, выживаемость клеточной линии с одновременным нокаутом *ATP7B* и *XIAP* при воздействии в дозе 1280  $\mu\text{M}$  ( $37,8 \pm 4,1\%$ ) превышала таковую в контрольной клеточной линии HepG2 ( $27,8 \pm 4,7\%$ ,  $p < 0,05$ ). Таким образом, согласно результатам данной работы, дополнительный нокаут гена *XIAP* в клеточной линии HepG2 с нокаутом *ATP7B* способствует лучшей выживаемости клеток после обработки медью, что указывает на возможную роль гена *XIAP* в качестве модификатора при БВК.



## Направленное редактирование генома бактерий *Staphylococcus aureus* и *Klebsiella pneumoniae*

Ю.В. Сопова<sup>1</sup>, Д.А. Кандина<sup>1</sup>, М.Е. Велижанина<sup>2</sup>, В.В. Гостев<sup>3</sup>, С.В. Сидоренко<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Центр трансгенеза и редактирования генома, СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Лаборатория биологии амилоидов, СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА, Санкт-Петербург, Россия

sopova@hotmail.com

Направленное редактирование бактериального генома с помощью технологии CRISPR/Cas в настоящее время активно применяется для изучения механизмов формирования антибиотикорезистентности и гипервирулентности у различных бактерий. Для направленного редактирования генома грамотрицательной бактерии *Klebsiella pneumoniae* мы используем индуцибельную систему, включающую в себя белок Cas9 и систему рекомбинации фага лямбда [1], позволяющую нокаутировать ген интереса. Для получения направленных делеций в геноме грамположительной бактерии *Staphylococcus aureus* мы использовали двухкомпонентную систему, основанную на гомологичной рекомбинации, совмещенной с Cas9-опосредованной контрselection [2]. В качестве мишеней для редактирования были выбраны гены *gdpP*, *pbp4* и *yfhP*, потенциально вовлеченные в формирование антибиотикорезистентности. Для делеций, приводящих к инактивации генов *gdpP* и *pbp4*, было показано влияние на формирование резистентного фенотипа, тогда как делеция, инактивирующая ген *yfhP*, и делеция в некаталитическом домене *gdpP* не влияли на этот фенотип [3, 4].

Исследование выполнено при поддержке гранта СПбГУ PURE ID95445540.

- [1] McConville T.H. et al. An efficient and versatile CRISPR-Cas9 system for genetic manipulation of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* // STAR Protoc. 2021. 2(1):100373.
- [2] Penewit K. et al. Efficient and scalable precision genome editing in *Staphylococcus aureus* through conditional recombineering and CRISPR/Cas9-mediated counterselection // mBio. 2018. 20. 9(1): e00067–18.
- [3] Сопова Ю. В. и др. Влияние делеции в некаталитическом домене *gdpP* на фенотип *Staphylococcus aureus* посредством направленного геномного редактирования с помощью системы CRISPR/Cas9. // Генетика. 2023. 59(9):1094–1098.
- [4] Gostev, V. et al. Adaptive laboratory evolution of *Staphylococcus aureus* resistance to vancomycin and daptomycin: mutation patterns and cross-resistance. // Antibiotics 2023. 12:928.



## Модификации нуклеотидов мРНК и мРНК-технологии для решения задач биомедицины

Г. А. Степанов<sup>1</sup>, Д. Н. Антропов<sup>1</sup>, О. В. Марков<sup>1</sup>, А. С. Доме<sup>1</sup>, Д. В. Гладких<sup>1</sup>, Е. С. Журавлев<sup>1</sup>,  
В. М. Голышев<sup>1</sup>, П. А. Пучков<sup>2</sup>, Д. М. Макарова<sup>2</sup>, М. А. Маслов<sup>2</sup>, В. В. Власов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup> Институт тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова, МИРЭА – Российский технологический университет,  
Москва

stepanovga@niboch.nsc.ru

В настоящее время происходит активное развитие направления по созданию терапевтических агентов и вакцин на основе мРНК. Главный вопрос звучит очень просто «Как РНК превратить в лекарство?». Еще в 2005 году Каталин Карико и Дрю Вайсманом показали, что модификации, включенные в состав искусственных РНК, позволяют практически полностью устранить нежелательные эффекты действия РНК на клетку. Во время пандемии новой коронавирусной инфекции именно мРНК-вакцины помогли остановить распространение инфекции. Сейчас начинается новая эра мРНК-вакцин против инфекционных заболеваний, персонализированных противораковых мРНК-вакцин и мРНК-терапии.

Одним из направлений исследования по преодолению барьеров перехода в практику в мРНК-технологиях является повышение эффективности доставки препаратов на основе РНК *in vivo* и *in vitro*. В своем исследовании мы разработали стратегию синтеза функциональных мРНК. В первую очередь, нами были получены мРНК репортерных генов, а именно, зеленого флуоресцентного белка (GFP), красного флуоресцентного белка mKate2 и люциферазы светлячка (FLuc). Полученные искусственные мРНК содержали модификации в виде псевдоуридина и 5'-кэпов, а также последовательности UTR, фланкирующие рамку считывания с 5'- и 3'-конца. Реализованная схема синтеза мРНК включала также стадии обработки фосфатазой и ферментативного полиаденилирования. Было показано, что при трансфекции мРНК GFP и mKate2 в концентрации 0,5–8,0 мкг/мл удается детектировать флуоресценцию в клетках человека. Функциональность мРНК FLuc была подтверждена при трансфекции с последующим лизисом клеток через 24 ч и проведением стандартной люциферин-люциферазной реакции. С использованием полученных репортерных мРНК мы проводили скрининг липосом на основе поликатионных амфифилов 2X3 и 2X7 и липида-хэлпера DOPC по эффективности доставки искусственных мРНК в клетки человека. Было показано, что изучаемые липосомы демонстрируют необычную кинетику доставки мРНК *in vivo* и *in vitro* с «отложенным стартом» и продолжительным сохранением сигнала репортерного гена.

мРНК-технологии становятся очень важным инструментом биомедицины, с помощью которого можно будет решать задачи по лечению вирусных, онкологических и генетических заболеваний человека. В настоящее время основной задачей является разработка устойчивой технологии получения самих молекул мРНК и компонентов липидных оболочек, которые будут востребованы при создании средств доставки мРНК-препаратов.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-75-10153.



## Получение синтетического бактериофага против *Vibrio cholerae*

Г. Ю. Фисунов<sup>1</sup>, Т. А. Семашко<sup>1</sup>, Д. В. Евсютина<sup>1</sup>, Е. А. Цой<sup>1</sup>, Д. Р. Харрасов<sup>1</sup>, Д. А. Гарагуля<sup>1</sup>,  
В. М. Говорун<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва

herr.romanoff@gmail.com

Бактериофаги рассматриваются в качестве альтернативы антибиотикам для лечения и профилактики инфекционных заболеваний, вызываемых бактериями. Для этого есть несколько причин. Во-первых, распространение лекарственной устойчивости среди бактерий делает антибиотики малоэффективными. Во-вторых, бактериофаги поражают бактерии крайне избирательно, в отличие от антибиотиков. В-третьих, в силу особенностей некоторых инфекционных заболеваний их лечение антибиотиками может угрожать самому пациенту. Например, к таким относится холера. Массовое высвобождение холерного токсина вследствие гибели клеток *Vibrio cholerae* в результате антибиотикотерапии может быть опасным для пациента.

В настоящей работе мы разработали комплекс технологий, позволяющий получать синтетические молекулы ДНК, соответствующие по размеру геному бактериофага (несколько десятков тысяч пар оснований) и применили этот комплекс для синтеза генома вибриофага N4. Комплекс включает в себя программное обеспечение (BAC-browser) для разбиения целевой последовательности на генные блоки размером 1000–2000 п. о. и разбиения генных блоков на олигонуклеотиды. Нами были получены ферменты высокоточная ДНК-полимераза для полимеразной цепной сборки генных блоков из олигонуклеотидов и 5'-3' экзонуклеаза для клонирования генных блоков в вектор методом гомологичной рекомбинации *in vitro*. Нами были разработаны методы получения протяжённых фрагментов ДНК с помощью гомологичной рекомбинации в клетках *Sacharomyces cerevisiae* и *in vitro* с помощью комбинации ДНК-полимеразы и 5'-3' экзонуклеазы.

Вибриофаг N4 является облигатно литическим T7-подобным бактериофагом. Последовательность генома вибриофага N4 (38,5 тысяч пар оснований) была взята из базы данных NCBI GenBank. Последовательность была разбита на 27 генных блоков размером 1500–2000 пар оснований. Генные блоки были собраны из синтетических олигонуклеотидов методом полимеразной цепной сборки и клонированы в вектор pTZ57 с помощью гомологичной рекомбинации *in vitro* по стандартным линкерам. Вставки были отсекужены по Сэнгеру. Правильно собранные генные блоки (27 шт.) были использованы для сборки пяти блоков второго порядка размером 7–10 тысяч п. о. методом гомологичной рекомбинации в клетках *S. cerevisiae*. Правильность сборки второго порядка проверялась методом нанопорового секвенирования. Блоки второго порядка были амплифицированы и использовались для сборки методами гомологичной рекомбинации в клетках *S. cerevisiae* или гомологичной рекомбинации *in vitro* для получения полной последовательности геномной ДНК вибриофага N4.

Препарат синтетической геномной ДНК вибриофага N4 был доставлен в клетки *V. cholerae* O1 El Tor, после чего наблюдалось образование литических бляшек. Содержимое бляшек было выборочно проверено методом высокопроизводительного секвенирования. В результате было подтверждено, что в бляшках действительно содержится синтезированная ДНК.

Работа финансировалась по заданию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в рамках темы «Создание искусственных клеточных систем» рег. № 1022040800170–3–1.6.23.



## Рациональный дизайн синтетических промоторов для тканеспецифической экспрессии генов

Фишман В. С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ИЦиГ, Новосибирск

minja-f@ya.ru

Множество современных биотехнологических решений основано на введении в клетку векторов для экзогенной продукции белков или РНК. Важнейшим элементом дизайна экспрессирующего вектора является выбор промотора. При создании трансгенных животных и растений, наработке белков в дрожжевых и бактериальных системах, создании генотерапевтических медицинских препаратов необходимо точно контролировать количество, место и время наработки экзогенного продукта.

В настоящей работе представлен экспериментальный и биоинформатический анализ промоторных последовательностей человека и животных. Мы показали, что использование эндогенных промоторов тканеспецифичных генов зачастую не позволяет обеспечить достаточный уровень продукции целевых белков и, кроме того, требует использования длинных нуклеотидных последовательностей, не всегда совместимых с системами доставки вектора в клетку. В качестве альтернативы, мы предложили набор методов на основе машинного обучения для рационального дизайна тканеспецифичных промоторов. Несмотря на перспективность этого подхода, мы показали, что специфика данных, используемых при обучении алгоритмов для классификации промоторов, может накладывать существенное ограничение на работу таких моделей.

Кроме того, используя созданные методы на основе машинного обучения мы проанализировали эволюционные изменения в «грамматике» промоторов. Хотя для близких видов мы наблюдали универсальность большинства промоторов, в то время как на больших эволюционных дистанциях последовательности промоторов существенно дивергируют. Так, согласно нашим данным, промоторы, универсально работающие в различных типах клеток и видах млекопитающих, не способны активировать транскрипцию в клетках беспозвоночных животных. В то же время, мы обнаружили что промотор цитомегаловируса человека является редким исключением и демонстрирует активность в клетках филогенетически далеких видов, таких как человек, мышь и комар-анофелес.

МЕЖДУНАРОДНЫЙ КОНГРЕСС  
«VIII Съезд Вавиловского общества  
генетиков и селекционеров, посвященный  
300-летию российской науки и высшей школы»  
Саратов  
14-19 июня 2024 года

INTERNATIONAL CONGRESS  
“VIII Congress of the Vavilov Society of Geneticists and Breeders,  
Dedicated to the 300<sup>th</sup> Anniversary  
of Russian Science and Higher Education”  
Saratov  
June 14-19, 2024

СБОРНИК ТЕЗИСОВ  
BOOK OF ABSTRACTS

ТОМ 2  
VOLUME 2

Электронное издание

Электрон. текстовые дан. (17 с., 5,8 МБ).  
Подписано к изданию 06.09.2024. Заказ № 63.  
Систем. требования: IBM PC;  
Acrobat Reader 5.0 и выше.

ООО ИД «Петрополис»  
197101, Санкт-Петербург, ул. Б. Монетная, д. 16,  
офис-центр 1, 5 эт., пом. 498, тел. 336 50 34  
e-mail: [info@petropolis-ph.ru](mailto:info@petropolis-ph.ru)  
<http://www.petropolis-ph.ru>

# МЕЖДУНАРОДНЫЙ КОНГРЕСС

**VIII СЪЕЗД ВАВИЛОВСКОГО ОБЩЕСТВА  
ГЕНЕТИКОВ И СЕЛЕКЦИОНЕРОВ,**  
ПОСВЯЩЕННЫЙ 300-ЛЕТИЮ РОССИЙСКОЙ НАУКИ  
И ВЫСШЕЙ ШКОЛЫ

**14 – 19 ИЮНЯ 2024**  
САРАТОВ



congress.  
vogis.  
org

ISBN 978-5-9676-1630-3



9 785967 616303