



NGS в медицинской генетике

Всероссийская научно-практическая конференция

Школа для молодых учёных

Тезисы конференции

Суздаль, 22-24 апреля 2016

Спонсоры конференции



ThermoFisher
SCIENTIFIC

helicon



eppendorf

BiVitrum
www.biovitrum.ru



Информационные партнеры



Оглавление

ВЫЯВЛЕНИЕ МУТАЦИЙ В ОБРАЗЦАХ МЕЛАНОМЫ МЕТОДОМ NGS.....	5
ОПЫТ РАЗРАБОТКИ И ПРИМЕНЕНИЯ ТАРГЕТНОЙ ПАНЕЛИ НА ОСНОВЕ NGS ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ.....	5
ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ИММУННОГО ОТВЕТА У ДЕТЕЙ С ИНФЕКЦИОННЫМИ ОСЛОЖНЕНИЯМИ ХИМИОТЕРАПИИ ЛЕЙКОЗОВ.....	6
СРАВНИТЕЛЬНО-ЭВОЛЮЦИОННЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКА NPC1 ПРИ БОЛЕЗНИ НИМАНА-ПИКА.....	7
РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ ПОДГОТОВКИ ТАРГЕТНЫХ ДНК-БИБЛИОТЕК ДЛЯ АНАЛИЗА МЕТОДОМ МАССОВОГО ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ.....	7
ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НАБОРА MID-ION AMPLISEQ™ IDENTITY PANEL ДЛЯ ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	8
НОВАЯ НОНСЕНС-МУТАЦИЯ ГЕНА FUSO1 – ОСНОВНАЯ ПРИЧИНА АУТОСОМНО-РЕЦЕССИВНОЙ ФОРМЫ КАТАРАКТЫ (STRCT18) В ЯКУТИИ: РЕЗУЛЬТАТЫ ПОЛНОЭКЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ..	9
КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА БИБЛИОТЕК ДЛЯ ПОЛНОЭКЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ.....	10
КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ ПРИМЕНЕНИЯ NGS В ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ.....	10
ОПЫТ РАЗРАБОТКИ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПАНЕЛЕЙ AMPLISEQ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ПЕРВИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ СЕРДЦА В РОССИЙСКОЙ ВЫБОРКЕ.....	11
ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРА МУТАЦИЙ В ОСНОВНЫХ ОНКОГЕНАХ У ПАЦИЕНТОВ С МНОЖЕСТВЕННЫМИ ПЕРВИЧНЫМИ НЕОПЛАЗИЯМИ.....	12
АНАЛИЗ ГЕНОМНОГО ПРОФИЛЯ В ОПУХОЛЯХ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ЭКЗОМА.....	12
ПЕРСПЕКТИВЫ ТАРГЕТНОГО, ЭКЗОМНОГО И ГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЭНДОКРИННОЙ ПАТОЛОГИИ У ДЕТЕЙ.....	13
РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА ПОВЫШЕНИЯ СПЕЦИФИЧНОСТИ ПОИСКА ИНДЕЛОВ ПО ДАННЫМ ЭКЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ С ПЛАТФОРМЫ ION PROTON.....	14
ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРАНСЛЯЦИИ НА ОСНОВАНИИ ДАННЫХ РИБОСОМНОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ И MRNA-SEQ.....	15
ТАРГЕТНОЕ ЭКЗОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ В ДИАГНОСТИКЕ РАННИХ ЭПИЛЕПТИЧЕСКИХ ЭНЦЕФАЛОПАТИЙ (НА ПРИМЕРЕ СИНДРОМА АЙКАРДИ-ГУТЬЕРЕС).....	15
ИДЕНТИФИКАЦИЯ НОВЫХ БИОМАРКЕРОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С КЛЕТОЧНЫМ СТРЕССОМ, ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ПРОГНОЗА ТЕЧЕНИЯ Т-ЛИМФОБЛАСТНОЙ ЛЕЙКЕМИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ МАЛЫХ РНК И ПОЛНОТРАНСКРИПТОМНОГО АНАЛИЗА.....	16
ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ СЕКВЕНИРОВАНИЯ СЛЕДУЮЩЕГО ПОКОЛЕНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ МУКОВИСЦИДОЗА.....	17
ТАРГЕТНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПРИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ.....	17
МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ОРФАННОГО СИНДРОМА АССОЦИИРОВАННОГО С РЕДКИМИ И МНОЖЕСТВЕННЫМИ НЕОПЛАЗИЯМИ У ДЕТЕЙ.....	18
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА СИНДРОМА ЛИ-ФРАУМЕНИ МЕТОДОМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ.....	19
АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ ATR7B В СИБИРСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ МЕТОДОМ МАССОВОГО ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ.....	19

АДАПТАЦИЯ АЛГОРИТМОВ ПОИСКА ПОЛИМОРФИЗМОВ К РЕЗУЛЬТАТАМ ИОННОГО ПОЛУПРОВОДНИКОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ.....	20
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ NGS МЕТОДОВ ВЫЯВЛЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНО АКТИВНЫХ РАЙОНОВ ГЕНОМА ДЛЯ ПОИСКА ПОЛИМОРФИЗМОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ РАЗВИТИЕ ПАТОЛОГИЙ, НА ПРИМЕРЕ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА.....	21
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТАРГЕТНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ФОРМ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ЖКТ.....	21
НОВЫЙ АЛЛЕЛЬНЫЙ ВАРИАНТ ПРОМЕЖУТОЧНОГО ТИПА НАСЛЕДСТВЕННОЙ МОТОРНО-СЕНСОРНОЙ НЕЙРОПАТИИ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ МУТАЦИЕЙ В ГЕНЕ NEFL.....	22
ОЦЕНКА «КЛИНИЧЕСКОГО КАЧЕСТВА» ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ: СТАНДАРТИЗАЦИЯ НА ПУТИ ИНТЕГРАЦИИ NGS В МЕДИЦИНСКУЮ ГЕНЕТИКУ.....	23
ПРИМЕНЕНИЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ «НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ» (NGS) ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО- ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ НАСЛЕДСТВЕННОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.....	23
ПОИСК НОВЫХ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ РАКА ЖЕЛУДКА С ПОМОЩЬЮ ПОЛНОГО ЭКЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ.....	24
РОЛЬ МИКРОРНК В СПЕРМАТОГЕНЕЗЕ.....	25
ВОЗМОЖНОСТИ NGS В ДИАГНОСТИКЕ РЕДКИХ НАСЛЕДСТВЕННЫХ СИНДРОМОВ.....	25
ТАРГЕТНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ – МЕДИЦИНСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ VS. КЛИНИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА.....	26
РЕКОНСТРУКЦИЯ ПРЕДКОВОГО ГАПЛОТИПА С МУТАЦИЕЙ САЙТА СПЛАЙСИНГА C.-23+1G>A ГЕНА GJB2 В НЕКОТОРЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ ЕВРАЗИИ ПО ДАННЫМ ПОЛНОГЕНОМНОГО АНАЛИЗА ..	27
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СЕМЕЙНЫХ АДЕНОМ ГИПОФИЗА.....	28
ОБНАРУЖЕНИЕ ВАРИАЦИЙ ЧИСЛА КОПИЙ НА ОСНОВЕ ДАННЫХ ЭКЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ.....	28
ПРИМЕНЕНИЕ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ФОРМ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА.....	29
РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ NGS СЕКВЕНИРОВАНИЯ В РАННЕЙ ДИАГНОСТИКЕ МУКОВИЦИДОЗА, ФЕНИЛКЕТОНУРИИ И ГАЛАКТОЗЕМИИ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ.....	30
ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ПОЛУПРОВОДНИКОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОДТВЕРЖДЕНИЯ СИНДРОМА АЛЬПОРТА У ДЕТЕЙ.....	30
ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРИЧИН РАЗВИТИЯ МЯГКОЙ ФОРМЫ СПИННО-МОЗЖЕЧКОВОЙ АТАКСИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ NGS-СЕКВЕНИРОВАНИЯ.....	31
ПРИМЕНЕНИЕ МАССОВОГО ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ ТОЧКОВОЙ ГЕТЕРОПЛАЗМИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ.....	32

ВЫЯВЛЕНИЕ МУТАЦИЙ В ОБРАЗЦАХ МЕЛАНОМЫ МЕТОДОМ NGS

**И.С. Абрамов^{1,2}, М.А. Емельянова^{1,2}, Л.Г. Гукасян¹, Е.В. Степанова², О.О. Рябая², Т.С. Бельшева²,
А.С. Заседателев^{1,2}, Т.В. Наседкина^{1,2}**

¹Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН

²Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина РАН
abriv@bk.ru

Мотивация и цели: Меланома является наиболее агрессивной формой опухолей кожи. Для неё характерны различные генетические нарушения, которые приводят к прогрессии опухоли, а также имеют значение для выбора терапии, обеспечивая персонализированный подход к лечению меланомы. Также представляет интерес поиск новых мутаций, определяющих чувствительность к препаратам направленного действия.

Методы: Для анализа мутаций в 6 меланоцитарных невисах и 29 клинических образцах меланомы использовали метод таргетного массового параллельного секвенирования (NGS). Геномную ДНК выделяли из свежемороженой ткани опухоли или парафиновых срезов. Секвенирование проводили на платформе GS Junior (454/Roche). Для отбора целевых последовательностей генов NRAS, PDGFRA, KIT, RASA1, RAC1, MET, BRAF, PTEN, AKT1, MAP2K1, MAP2K2, TP53 и TERT использовали жидкий чип Nimblegen (Roche). Подтверждения герминальных мутаций проводили секвенированием по Сэнгеру.

Результаты: В меланоцитарных невисах были обнаружены соматические мутации в гене BRAF (p.Val600Glu) (16%), так же были найдены герминальные мутации в CDKN2A (p.Ala148Thr, p.Gly63Arg) (33%), PDGFRA (p.Ser478Pro) (33%). В образцах меланомы были найдены соматические мутации в генах NRAS (p.Gly13Arg, Gln61His) (10%), BRAF (p.Val600Glu, p.Val600Lys) (45%), MAP2K1 (p. Pro124Ser) (3%), TP53 (p. Gln331Ter, p. Glu224Lys) (7%), PDGFRA (p. Glu571Lys) (3%), и герминальные мутации в генах PDGFRA (p.Leu221Phe) (3%), KIT (p.Met541Leu, p.Val50Leu) (20%), RASA1 (p.Ala99Val) (14%).

Заключение: Дальнейшие исследования с использованием NGS могут помочь в поиске новых патогенных мутаций на разных стадиях развития опухоли и новых мишеней для терапии. Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (Грант № 14-35-00107).

ОПЫТ РАЗРАБОТКИ И ПРИМЕНЕНИЯ ТАРГЕТНОЙ ПАНЕЛИ НА ОСНОВЕ NGS ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

**Н.Ю.Абрамычева^{1*}, Е.Ю.Федотова¹, С.А.Клюшников¹, В.Е.Кунецкий¹, В.В.Устинова², Ю.А.Монахова²,
С.Н.Иллариошкин¹**

¹ФГБНУ «Научный центр неврологии» (125367 Москва, Волоколамское ш., 80)

²ЗАО «Синтол» (127550, Москва, Тимирязевская, 42)

³ФГБНУ ВНИИ СБ (127550, Москва, Тимирязевская, 42)

*nataabr@rambler.ru

Мотивация и цели: Диагностика и профилактика дегенеративных заболеваний мозга представляют собой чрезвычайно актуальную проблему современной неврологии в связи с их неоспоримой социальной значимостью, высоким удельным весом в общей структуре неврологической патологии, неуклонно прогрессирующим течением, тяжестью клинических проявлений, выраженной физической, психической и социальной дезадаптацией пациентов. При чрезвычайно высокой гетерогенности основных групп неврологических синдромов и значительном перекрытии клинических проявлений десятков генетических форм в рамках одной группы удачным решением проблемы является параллельное секвенирование всех известных генов, имеющих отношение именно к исследуемому фенотипу, а именно, применение таргетных панелей генов на основе NGS. Разработанная нами генетическая панель (300 генов) предназначена для диагностики социально значимых нейродегенеративных синдромов: паркинсонизма, тремора, дистонии, паралича, хореи, лейкоэнцефалопатии, дегенеративной деменции и болезни мотонейрона.

Методы: Таргетное секвенирование на основе NGS проводили на базе ЦКП «Биотехнология» ФГБНУ ВНИИ СБ, на секвенаторе MiSeq (Illumina). Все положительные находки подтверждались методом капиллярного секвенирования на генетическом анализаторе НАНОФОР 05 (ИАП РАН, Санкт-Петербург).

Результаты: Наш первый опыт применения генетической панели позволил выявить редкие формы патологии, с идентифицированными (с помощью NGS) и подтвержденными (с помощью прямого секвенирования) мутациями в следующих генах: SPAST (наследственная спастическая параличия типа 4), DDHD1 (наследственная спастическая параличия типа 28), NPC1 (Болезнь Ниманна-Пика типа С), Notch3 (лейкоэнцефалопатия), GCH1 (дистония) и др.

Заключение: Таргетные панели на основе NGS являются незаменимыми и экономически оправданными при диагностике наследственных заболеваний нервной системы, которые характеризуются генетической гетерогенностью и фенотипическим полиморфизмом.

Работа проведена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (уникальный идентификатор соглашения RFMEFI60714X0094)

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ИММУННОГО ОТВЕТА У ДЕТЕЙ С ИНФЕКЦИОННЫМИ ОСЛОЖНЕНИЯМИ ХИМИОТЕРАПИИ ЛЕЙКОЗОВ

М.А. Авдонина*¹, И.С. Абрамов¹, А.Ю. Иконникова², Т. В. Наседкина¹

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

²Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии

им. Дмитрия Рогачева, 119117, Москва, Россия;

*marysheilaus@gmail.com

Мотивация и цели. Применение интенсивной полихимиотерапии в процессе лечения детей с лейкозами связано с выраженным подавлением иммунитета. Это является фактором риска развития серьезных инфекционных осложнений, которые существенно ухудшают прогноз основного заболевания и могут приводить к летальному исходу. Важную роль в развитии инфекционных заболеваний и сепсиса может играть полиморфизм генов иммунного ответа.

Методы. Для поиска генетических маркеров, ассоциированных с предрасположенностью к развитию инфекций, были выбраны 12 детей с острым лейкозом, имевших тяжелые инфекционные осложнения в ходе терапии. Образцы ДНК пациентов исследовали методом массового параллельного секвенирования на приборе GS Junior / 454 (Roche), что позволило провести одновременный анализ последовательности кодирующих участков 17 генов, участвующих в регуляции иммунного ответа: NOD2, NLRP3, STAT1, STAT3, CARD9, IL10, IL17RA, IL12RB1, IL1A, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, PTPN22, IL7R, IL7, MYD88.

Результаты. Биоинформационный анализ данных секвенирования выявил 39 однонуклеотидных замен (SNP), приводящих к замене аминокислоты, в том числе, информативные генетические маркеры PTPN22 с.1858C>T [rs2476601], TLR4 с.896 A>G [rs4986790] и TLR4 с.1196 C>T [rs4986791], IL7R с.197T>C [rs1494555] и IL7R с.412G>A [rs1494558]. Результаты массового параллельного секвенирования подтверждены секвенированием по Сэнгеру.

Заключение. Выявление генетических маркеров, определяющих предрасположенность к инфекционным осложнениям, позволит оценивать индивидуальный генетический риск развития тяжелых инфекций у детей с лейкозами при лечении химиопрепаратами и разрабатывать новые подходы к сопроводительной терапии.

Работа выполняется при поддержке Федеральной целевой программы Министерства образования и науки России [Грант №14.604.21.0117, RFMEFI60414X0117].

СРАВНИТЕЛЬНО-ЭВОЛЮЦИОННЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКА NPC1 ПРИ БОЛЕЗНИ НИМАНА-ПИКА

О. Адебали^{1,3}, А.О. Резник², И.Б. Жулин^{1,3}

¹Отдел информатики и математики, Национальная лаборатория Ок-Ридж, Ок-Ридж, Теннесси, США

²Научно-исследовательский центр биоинформатики, Первый Санкт-Петербургский государственный университет имени акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

³Отдел Микробиологии, Университет штата Теннесси, Ноксвилл, Теннесси, США
aoreznik@gmail.com

Мотивация. Технологии секвенирования позволяют создавать инструменты диагностики генетических заболеваний на основе геномных данных. Одна из основных проблем такой диагностики состоит в необходимости различать патогенные и доброкачественные мутации. Тщательный эволюционный анализ структуры белка позволяет выявлять эволюционные связи типа паралога/ортолога и точнее предсказывать возможные эффекты различных мутаций.

Цель. Разработать алгоритм сравнительно-эволюционного анализа структуры белка NPC1 для предикции эффекта мутаций при болезни Нимана-Пика тип С (НП-С).

Методы. В качестве модельного использовали белок NPC1, продукт гена npc1, мутации в котором являются основной причиной (~95%) НП-С, редкой, зачастую летальной, лизосомной болезни накопления, развивающейся в результате нарушения регуляции внутриклеточного транспорта липидов. Филогенетический анализ и изучение аминокислотной последовательности позволили определить истинные ортологи и паралоги белка NPC1, отличить их от похожих белков с другими функциями. Были определены консервативные позиции в белке NPC1, стало возможным предсказывать эффекты мутаций. Такой подход позволил исключить ошибки, возникающие при работе автоматизированных диагностических программ, вследствие их неспособности разделять белки по функции на основе анализа структуры.

Результаты. Разработан и апробирован алгоритм диагностики НП-С на основе эволюционного анализа структуры белка NPC1.

Заключение. Разработанный алгоритм повышает точность предсказания эффекта мутаций и может быть использован при диагностике других генетических болезней.

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ ПОДГОТОВКИ ТАРГЕТНЫХ ДНК-БИБЛИОТЕК ДЛЯ АНАЛИЗА МЕТОДОМ МАССОВОГО ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

М.С. Анисименко*^{1,2,3}, Д.А. Костякова⁴, Е.В. Горностаева^{3,5}, Н.Ю. Маценко¹, Н.И. Гуткина^{1,3},

С.Я. Слободянюк², С.П. Коваленко^{1,2,3,5}

¹ФГБНУ «НИИ молекулярной биологии и биофизики», г. Новосибирск

²ФГБНУ «НИИ физиологии и фундаментальной медицины», г. Новосибирск

³ООО «БиоЛинк», г. Новосибирск

⁴Новосибирский государственный педагогический университет, г. Новосибирск

⁵Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, г. Новосибирск
e-mail: jocus@bk.ru

Мотивация и цели: Появление технологий массового параллельного секвенирования (секвенирования нового поколения, NGS) позволило существенно увеличить производительность процесса секвенирования, и, конечно же, снизить его стоимость в расчёте на нуклеотид. Однако в целом процесс подготовки библиотеки и проведение цикла на приборе остаются довольно дорогостоящими. Целью настоящей работы явилось создание альтернативной технологии подготовки таргетной ДНК-библиотеки для анализа методом NGS. В качестве целевого фрагмента для анализа была выбрана кодирующая часть гена BRCA1.

Методы: На начальном этапе осуществляли амплификацию кодирующих участков гена BRCA1. Полученные ПЦР-продукты обрабатывали rfu-полимеразой, обладающей 3'→5'-экзонуклеазной активностью, для придания ампликонам «липких» концов. Далее проводили лигирование бар-кодов и адаптерных последовательностей по «липким» концам ампликонов. Полученную в результате смесь обогащали с помощью ПЦР продуктами лигирования, содержащими на концах различающиеся адаптеры. Клональную амплификацию проводили на приборе Ion OneTouch II, секвенирование – на приборе Ion PGM с использованием наборов компании Life Technologies.

Результаты: С помощью разработанной технологии подготовлено и затем проанализировано 280 образцов геномной ДНК пациентов с диагнозом «рак молочной железы» (поставлен в возрасте 19 – 40 лет) на наличие мутаций в гене BRCA1. В результате выявлено 3 клинически значимых мутации: 427G>T (rs80356991), IVS18+1 (rs80358094) и 4153delA (rs80357711). Кроме того, обнаружено несколько образцов, содержащих мутации с невыясненным эффектом. Образцы ДНК были выбраны для исследования при условии отсутствия в них мутации с «эффектом основателя» - BRCA1 5382insC, что контролировали с помощью аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени.

Заключение: Разработанная технология может быть использована для подготовки таргетных ДНК-библиотек к секвенированию с помощью прибора Ion PGM (Ion Torrent).

Работа поддержана грантом Президента (МК-5561.2015.7).

ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НАБОРА HID-ION AMPLISEQ™ IDENTITY PANEL ДЛЯ ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

О.А. Балаганская^{1*}, А.В. Лавров^{2,3}, Э.П. Адильгереева², Е.В. Балановская², С.В. Некрасов⁴, О.П. Балановский^{1,2}

¹ФГБНУ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

²ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»

³ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» МЗ РФ

⁴Life Sciences Solutions Thermo Fisher Scientific, Москва, Россия
Balanovsky@inbox.ru

Быстрое развитие популяционной генетики выявило значительную географическую и этническую структурированность генофонда человечества по Y-хромосомным и в меньшей мере - по митохондриальным и широкогеномным аутосомным маркерам. Это сделало в принципе возможным различение не только популяционных генофондов (популяционный уровень), но и определение этногеографического генофонда происхождения индивидуального генотипа (индивидуальный уровень). Эта задача важна для практического использования в криминалистике. Одним из коммерчески доступных наборов, разработанных для этой цели, является HID-Ion AmpliSeq™ Identity Panel, включающий 165 аутосомных маркеров. Цель работы - оценить информативность этого набора для российских популяций. С помощью этого набора на платформе Ion Torrent™ секвенировано 200 образцов ДНК девяти популяций Северной Евразии: буряты, казахи, караимы, крымские татары, русские, таджики, татары, черкесы и чеченцы. Были рассчитаны частоты аллелей и построены графики главных компонент.

При сравнении генофондов популяций выявилось их четкое разделение на два кластера. В первый вошли популяции, в которых преобладает восточно-евразийский (монголоидный) компонент (буряты и казахи), второй кластер образован остальными популяциями, у которых преобладает западно-евразийский (европеоидный) генетический компонент. Анализ тех же популяций по данным Y-хромосомы выявил те же два кластера с небольшими отличиями во внутренней структуре западно-евразийского кластера.

При сравнении индивидуальных аутосомных генотипов выделились те же два кластера – индивидов западно-евразийского и восточно-евразийского происхождения.

Итак, набор HID-Ion AmpliSeq™ Identity Panel позволяет эффективно отличать индивидов, происходящих от коренного населения Сибири и Центральной Азии, от уроженцев остальных регионов России и сопредельных стран, и при этом достаточно надежно выявляет и генетические взаимоотношения популяций.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ 16-14-10354.

НОВАЯ НОНСЕНС-МУТАЦИЯ ГЕНА FYCO1 – ОСНОВНАЯ ПРИЧИНА АУТОСОМНО-РЕЦЕССИВНОЙ ФОРМЫ КАТАРАКТЫ (STRCT18) В ЯКУТИИ: РЕЗУЛЬТАТЫ ПОЛНОЭКЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Барашков Н.А.,^{1,2*} Коновалов Ф.А.,^{3,4} Терютин Ф.М.,^{1,2} Соловьев А.В.,^{1,2} Пшеничкова В.Г.,^{1,2} Вытужкина Л.С.,² Сапожникова Н.В.,⁵ Романов Г.П.,^{1,2} Готовцев Н.Н.,^{1,2} Морозов И.В.,^{4,7} Бондарь А.В.,⁴ Джемилева Л.У.,⁸ Хуснутдинова Э.К.,^{8,9} Алексеев А.Н.,¹⁰ Томский М.И.,¹ Посух О.Л.,^{7,11} Федорова С.А.^{1,2}

¹ФГБНУ «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем», г. Якутск, Россия;

²ФГАУ ВПО «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова», г. Якутск, Россия;

³ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», г. Москва, Россия;

⁴ООО «Геномед», г. Москва, Россия;

⁵Республиканская школа-интернат для слепых и слабовидящих детей, г. Якутск, Россия;

⁶ФГБНУ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия;

⁷Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск, Россия;

⁸ФГБНУ Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, г. Уфа, Россия;

⁹ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет», г. Уфа, Россия

¹⁰ФГБНУ Институт гуманитарных исследований и проблем малочисленных народов Севера СО РАН, г. Якутск, Россия

¹¹ФГБНУ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, Россия

*e-mail: barashkov2004@mail.ru

Врожденная катаракта – основная причина детской слепоты во многих популяциях мира [Robinson et al., 1987]. В Якутии врожденная аутосомно-рецессивная катаракта является одним из наиболее частых орфанных заболеваний (частота 1 на 8257 человек) [Тарская и др., 2004]. Однако генетические причины этой формы потери зрения, распространенной в Якутии, ранее не были известны. Для поиска молекулярно-генетических причин данной формы катаракты нами было проведено полноэкзомное секвенирование (Illumina NextSeq 500) в одной якутской семье с тремя пораженными разнополыми сибсами, у которых родители имели сохранное зрение. Полноэкзомный анализ выявил гомозиготную транзицию с.1621C>T (chr3:46009205G>A) в 8-ом экзоне гена FYCO1 (FYVE and coiled-coil domain containing 1) [3p21.31]. У всех трех пораженных сибсов мутация обнаружена в гомозиготном, а у здоровых родителей – в гетерозиготном состоянии. Мутации в гене FYCO1 ранее были известны в ассоциации с аутосомно-рецессивной формой катаракты (STRCT18, OMIM:610019), встречающейся в популяциях Ближнего Востока [Chen et al., 2011]. Выявленная в нашем исследовании нуклеотидная замена с.1621C>T приводит к образованию преждевременного стоп-кодона p.Gln541Ter (NM_024513.3), терминирующего трансляцию белка FYCO1. В настоящее время сведения о данной мутации отсутствуют в базах данных 1000 Genomes, ESP6500 и ExAC. Прямое секвенирование по Сэнгеру фрагмента 8-го экзона гена FYCO1 подтвердило полученные результаты. Последующий молекулярно-генетический скрининг на наличие данной мутации в 18 семьях с врожденной катарактой показал, что вклад STRCT18 в Якутии составил 88.8% [16 из 18 семей]. В популяционной выборке якутов без жалоб на остроту зрения частота гетерозиготного носительства мутации p.Gln541Ter гена FYCO1 составила 8.1% (10/123). Полученные результаты позволяют предположить, что новая нонсенс-мутация p.Gln541Ter гена FYCO1 является основной причиной врожденной аутосомно-рецессивной катаракты в Якутии.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА БИБЛИОТЕК ДЛЯ ПОЛНОЭКЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Ю. А. Барбитов^{1,2*}, Е. А. Жукова², А. С. Глозов² и А. В. Предеус²

¹Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия,

²РЦ «Центр Биобанк» Научного Парка СПбГУ, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия,

³Институт биоинформатики, Санкт-Петербург, Россия.

e-mail: barbitoff@bk.ru

Мотивация и цели. Полноэкзомное секвенирование (WES) – важная альтернатива полногеномному секвенированию. Существует несколько производителей наборов реагентов для изготовления WES-библиотек, такие как Illumina, Roche и Agilent. Нашей основной целью являлось сравнение качества библиотек, полученных разными наборами.

Методы. Работа выполнена на образцах, полученных от пациентов с различными эндокринологическими заболеваниями. Библиотеки, полученные наборами Illumina Nextera RapidCapture и Roche MedExome, секвенировались на платформе Illumina HiSeq 2500. Биоинформатический анализ осуществлялся пакетами bwa, FastQC, GATK, Picard, samtools, SnpEff, SnpSift, QC3. Статистический анализ производился в R.

Результаты. Мы произвели контроль качества экзомных библиотек на всех этапах биоинформатического анализа данных от сырых прочтений до итогового набора вариантов. В качестве параметров для сравнения были выбраны такие характеристики, как адаптерный контент, эффективность обогащения, равномерность покрытия экзона, количество и качество полученных вариантов на экзоне и др. Библиотеки, полученные набором от Illumina, характеризовались высоким процентом адаптерных последовательностей в прочтениях из-за малой длины фрагмента. Помимо адаптерного контента, библиотеки Illumina продемонстрировали существенно более неравномерное покрытие по экзому и более низкое качество вариантов, нежели набор от Roche, который показал высокую степень равномерности как по глубине библиотеки, так и по итоговому покрытию экзона. При этом библиотеки Illumina содержали стабильно больший процент оснований со сверхвысоким покрытием.

Заключение. В проведенном нами анализе библиотеки, приготовленные набором Roche, показали в целом лучшую эффективность и равномерность экзомного обогащения, однако выбор конкретного набора сильно зависит от задач и дизайна исследования.

Работа выполнена на результатах исследования, проведенного на базе РЦ «Центр Биобанк» НП СПбГУ при поддержке благотворительного фонда КАФ.

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ ПРИМЕНЕНИЯ NGS В ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ

Л.А. Бессонова^{1,2*}, Е.В. Юдина², Ф.А. Коновалов^{1,3}, В.А. Гнетецкая²

¹ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва

²Медико-генетический центр группы компаний «Мать и дитя», Москва

³Медико-генетический центр ООО «Геномед», Москва

e-mail: bessonova_la@mail.ru

В медико-генетический центр ГК «Мать и дитя» на консультацию обратилась семья, в связи с двусторонним укорочением бедренных костей плода. Предыдущая беременность прервана в сроке 24 нед. в связи с УЗ-маркерами скелетной дисплазии у плода – укорочение и искривление бедренных костей. Брак имеет дальнейшее кровное родство.

При проведении УЗИ в сроке 21-22 нед. нами обнаружена диссоциация фетометрических показателей:

окружность головы соответствовала 22-23 нед., окружность живота - 22 нед., длина бедра - 21-22 нед., длина плеча - 21-22 нед., искривление бедренных костей. Дифференциальная диагностика проводилась между гипофосфатазией, несовершенным остеогенезом, кампомелической дисплазией. Семье было рекомендовано проведение амниоцентеза для исключения хромосомной патологии и кордоцентеза, для проведения NGS на материале выделенного ДНК плода из пуповинной крови. Клиническое секвенирование экзона проводилось на секвенаторе Illumina NextSeq 500 методом парно-концевого чтения (2x151 п.о.) со средним покрытием 70-100х.

Кариотип плода - 46,XX. В результате проведения NGS, обнаружена мутация с.1348C>T (p.Arg450Cys) в гомозиготном состоянии в 12 экзоне гена ALPL, приводящая к замене аминокислоты аргинина на цистеин в 450 положении, описанная у двух пациентов с врожденной формой гипофосфатазии. Результат был подтвержден референсным методом – секвенированием по Сэнгеру. У пробанда выявлено гомозиготное состояние мутации, у родителей - гетерозиготное.

Скелетные дисплазии в пренатальной диагностике представляют большие трудности для медико-генетического консультирования из-за многообразия моногенной патологии, скрывающейся за ультразвуковыми маркерами, и отсутствием молекулярно-генетических методов, позволяющих быстро и точно установить диагноз. Применение метода NGS позволило установить диагноз у плода и определить дальнейший прогноз потомства в семье, а также предложить семье с высоким генетическим риском рецессивного заболевания проведение преимплантационной генетической диагностики.

ОПЫТ РАЗРАБОТКИ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПАНЕЛЕЙ AMPLISEQ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ПЕРВИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ СЕРДЦА В РОССИЙСКОЙ ВЫБОРКЕ

А.А. Букаева^{1*}, О.В. Глазова², Е.В. Заклязьминская¹

¹ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. Академика Б.В. Петровского»

²Московский физико-технический институт

Мотивация и цели. ДНК-диагностика - необходимый этап подтверждения диагноза сердечных каналопатий и кардиомиопатий. Их генетическое разнообразие обуславливает необходимость одновременного исследования ряда генов. Цель работы - внедрение целевых панелей генов для диагностики данных групп заболеваний и оценка эффективности такого подхода.

Методы. Смоделированы панели праймеров AmpliSeq для секвенирования на платформе Ion Torrent: панель «Кардиомиопатии», включающая гены MYBPC3, TAZ, TPM1, LDB3, MYL2, ACTC1, MYL3, MYH7, TNNT2, и панель «Каналопатии», включающая гены KCNQ1, KCNE2, KCNE3, KCNE1, SNTA1, SCN3B, SCN4B, SCN1B, SCN1B, KCNH2, KCNJ2. С октября 2013 г. с помощью панели «Кардиомиопатии» провели диагностику 86 пациентам, с помощью панели «Каналопатии» - 63 пациентам. При анализе результатов учитывали участки с покрытием не менее 7. Непокрытые праймерами AmpliSeq фрагменты секвенировали методом Сенгера, им же подтверждали клинически значимые находки.

Результаты. Гены панели «Каналопатии» покрывались в среднем на 87,3%, у одного больного выявлялось в среднем 18 генетических вариантов. Покрытие генов панели «Кардиомиопатии» в среднем 85%, среднее число вариантов у пациента - 35. У больных с каналопатиями найдено 17 мутаций в 16 семьях, в т.ч. 7 мутаций в гене SCN5A, 4 в гене KCNQ1, 4 в гене KCNH2 и 1 в гене SCN3B. У больных с кардиомиопатиями найдено 12 мутаций в 12 семьях, в т.ч. 4 мутации в гене MYH7, 6 в гене MYBPC3, 1 в гене TPM1 и 1 в гене MYL3. Срок работы, включая верификацию вариантов по Сенгеру - 4 недели. Стоимость в 8-10 раз ниже расчетной при скрининге аналогичного набора генов только прямым методом, при аналогичной средней выявляемости мутаций.

Заключение. Секвенирование целевой панели генов – оптимальный подход к ДНК-диагностике полилокусных заболеваний сердца. «Золотым стандартом» верификации результатов остаётся секвенирование по Сенгеру. Каскадный скрининг для семей пробандов с найденной мутацией целесообразно выполнять только методом Сенгера.

ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРА МУТАЦИЙ В ОСНОВНЫХ ОНКОГЕНАХ У ПАЦИЕНТОВ С МНОЖЕСТВЕННЫМИ ПЕРВИЧНЫМИ НЕОПЛАЗИЯМИ

Г.В. Васильев^{1*}, А.В. Ботвиновская², А.В. Герасимов³

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

²Центр постдипломного медицинского образования, НГУ, Новосибирск, Россия

³Новосибирский Областной клинический диспансер, Новосибирск, Россия

e-mail: gennib@bionet.nsc.ru

Мотивация и цели. Изучение генетической предрасположенности к возникновению онкологических заболеваний имеет высокую прогностическую ценность для их раннего обнаружения и правильного лечения. Возникновение множественных не родственных первичных неоплазий у одного пациента с высокой вероятностью отражает наследственную предрасположенность к развитию онкологических заболеваний.

Методы. Сформирована выборка из 8 пациентов Новосибирского Областного клинического диспансера, имевших от 2 до 3 случаев возникновения неродственных злокачественных новообразований в различные годы. Из образцов крови пациентов выделена ДНК. Для изучения спектра генеративных мутаций в основных онкогенах использована панель для целевого ресеквенирования Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2, покрывающая зоны наиболее частых мутаций в экзонах 50 основных онкогенов. Для каждого пациента получена баркодированная библиотека ампликонов, все 8 баркодированных библиотек были секвенированы на приборе Ion Torrent PGM с использованием чипа 316v2.

Результаты. У всех 8 пациентов обнаружено 94 полиморфных варианта, у одного человека - от 9 до 17 мутаций в гомо- и гетерозиготном состоянии. Из 50 исследованных генов мутации найдены в 17 генах, наиболее часто - в генах FGFR3 (у всех 8), TP53, EGFR. Для 6 пациентов обнаружены по 2 мутации из базы данных COSMIC, ассоциированные с различными видами рака, для одного - 1. Из оставшихся обнаруженных мутаций более чем для 60% имеются литературные данные об ассоциации с той или иной достоверностью данных мутаций с различными видами рака.

Заключение. У пациентов с множественными первичными неоплазиями обнаруживается большое количество полиморфных вариантов в основных онкогенах, что подтверждает предположение о их генетической предрасположенности к развитию различных онкологических заболеваний.

АНАЛИЗ ГЕНОМНОГО ПРОФИЛЯ В ОПУХОЛЯХ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ЭКЗОМА

И.Р. Гилязова^{1,2*}, М.А. Янкина¹, Г.Б. Кунсбаева², Е.А. Климентова¹, А.А. Измайлов³, А.Т. Мустафин³, В.Н. Павлов³, Э.К. Хуснутдинова^{1,2}

¹Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа, 450054:021gen@mail.ru

²Башкирский государственный университет, Уфа, 450074

³Башкирский государственный медицинский университет, Уфа 450000

e-mail: gilyasova_irina@mail.ru

Рак предстательной железы (РПЖ) является одним из наиболее часто встречающихся злокачественных новообразований мужского населения во всем мире. Исключительно быстрый рост заболеваемости РПЖ, тяжелое течение, высокая распространенность заболевания в мире свидетельствуют о необходимости изучения механизмов, лежащих в основе развития РПЖ.

Открывшиеся возможности проведения молекулярно-генетических исследований на новом технологическом уровне, с использованием технологии NGS позволяют расширить возможности изучения опухолевой гетерогенности, что особенно важно для генетически неоднородных патологий с большим числом генов-кандидатов. С целью поиска новых генов, вовлеченных в патогенез РПЖ, нами проведено полное секвенирование экзона образцов нормальной и опухолевой ткани 8 пациентов с РПЖ. Фрагментация ДНК, подготовка библиотек и захват экзона были выполнены в соответствии с инструкциями фирмы-из-

готовителя. Секвенирование библиотек проводили по технологии Illumina на приборе HiSeq 2000. Обнаруженные варианты аннотировались с помощью программы ANNOVAR. Для идентификации событий, связанных с опухолью, исключены варианты из баз данных dbSNP и 1000Genomes с частотой более 1%. Функциональную значимость выявленных изменений проводили с использованием 8 программ.

В результате анализа у пациентов с РПЖ обнаружено в среднем 41542 изменений на образец в нормальной ткани, 45948 - в опухолевой ткани. Все образцы содержали мутации в генах TP53 и ATM. В каждом образце опухоли выявлено в среднем 9418 соматических мутаций. После всех этапов биоинформатического анализа выбрано 35 генов-кандидатов, участвующих в контроле клеточного цикла и апоптозе, сигналинге андрогенов, процессах клеточного роста и дифференцировки, репарации и контроле транскрипции. Кроме того, исследование позволило выявить ряд генов, роль которых при РПЖ не была описана ранее.

В дальнейшем будет проведен углубленный анализ полученных результатов для определения вовлеченности обнаруженных генов в патогенез РПЖ.

ПЕРСПЕКТИВЫ ТАРГЕТНОГО, ЭКЗОМНОГО И ГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЭНДОКРИННОЙ ПАТОЛОГИИ У ДЕТЕЙ

О.С. Глотов^{1,2,4}, А.С. Глотов^{1,2,4}, Е.А. Жукова^{1,2,4}, Е.Б. Башнина³, О.С. Берсенева³, М.Е. Туркунова³, И.В. Полякова^{2,4}, Т.Э. Иващенко¹, С.В., Апалько⁴, М.А. Федяков⁴, М.В. Асеев^{1,4}, Н.Ю. Швед^{1,2,4}, Ю.А. Насыхова¹, Е.С. Шабанова¹, Т.А. Дубинина³, Л.В. Тыртова³, Е.Р. Досовицкая³, Н.С. Осинская¹, А.М. Сарана⁴, С.Г. Щербак⁴, В.С. Баранов^{1,2}

¹ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург; olgaglotov@mail.ru

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург;

³Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург;

⁴СПб ГБУЗ «Городская больница №40», Санкт-Петербург, г. Сестрорецк.

⁵Детская городская больница №19 им. К.А.Раухфуса

Одной из важнейших задач здравоохранения в России является совершенствование оказания медицинской помощи, используя современные высокотехнологические методы и подходы. Во многом они необходимы для обследования детей, а также членов их семей (уточнение выявленной мутации) на моногенные эндокринные заболевания. Наиболее важными для подтверждающей диагностики являются следующие заболевания: врожденный гипотиреоз, аденогенитальный синдром, гипопитуитаризм, сахарный диабет и врожденный гиперинсулинизм, гипогонадотропный гипогонадизм, надпочечниковая недостаточность, нарушения формирования пола, эндокринные опухоли, и др.

Учитывая размеры генов, связь с патогенезом, нами разработаны NGS диагностические панели для исследования кодирующих регионов генов следующих нозологий: гипопитуитаризм - GH1, GHRH, GHRHR, BTK, GHSR, PROP1, POU1F1, HESX1, LHX3, LHX4, SOX3, SOX2, OTX2, GLI2, ARNT2, ARPC5L, DLK1, DRD2, PAX6, RNP3, SHH, SPCS2, SPCS3; гипотиреоз - OXE1 (TTF-2), NKX2-1 (TTF1), NKX2-5, PAX8, TSHR, SLC5A5 (NIS), TPO, DUOX2, DUOX1, DUOX2A, TG (AITD3), IYD (DEHAL1), SLC26A4 (PDS), POU1F1, PROP1, HESX1, LHX3, LHX4, TRH, TRHR, TSHB, THR, THRA, SLC16A2, UBR1, GLIS3, SECISBP2, GNAS; гипогонадизм - KISS1, KISS1R (GPR54), GNRH1, GNRHR, TAC3, TACR3, DUSP6, LHB, KAL1 (ANOS1), FGFR1 (KAL2), PROKR2, PROK2 (KAL4), CHD7, FGF8, NSMF (NELF), WDR11, HS6ST1, SEMA3A, IL17RD, SPRY4, RXFP2 (GREAT), DAX1 (NR0B1), INSL3, FGF17, FLRT3, DNMT3L, POLR3A, POLR3B, RBM28, MKRN3, PITX2, POU1F1, PROP-1, HESX-1, LHX3, HSD3B1, HSD3B2, CYP17A1, CYP11A1, STAR, POR, CYP11B1; гиперинсулинизм и MODY - HNF1A, GCK, HNF4A, HNF1B, PDX1, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, EIF2AK3, RFX6, WFS1, ZFP57, FOXP3, KCNJ11, ABCC8, GLUD1, HADH (SCHAD), SLC16A1, UCP2, INSR, AKT2, GCG, GCGR, PPARG, PTF1A.

Методом секвенирования нового поколения (NGS) с помощью технологии «Ампликс» на аппарате «IonTorrent» («Life technologies», США) проведено исследование 76 больных гипопитуитаризмом, гипотиреозом и гипогонадизмом; и на аппарате «HiSeq 2500» («Illumina», США) проведено исследование

дование всех кодирующих регионов генов (экзома) у 21 больного гиперинсулинизмом и MODY. Биоинформационный фальтеринг результатов секвенирования образцов ДНК проводился с помощью программ: «GeneTalk» (<https://www.gene-talk.de/>), «UGENE» (<http://ugene.unipro.ru/>), «Ion Reporter» (<https://ionreporter.lifetechnologies.com/ir/>), «SIFT» (<http://sift.jcvi.org/>), «PolyPhen2» (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), «PAPi» (<http://papi.unipr.it/>). Верификация полученных данных проводилась методом прямого секвенирования на приборе «Genetic Analyzer 3130» («Applied Biosystems», США).

В 5-ти семьях удалось выявить патогенные мутации и подтвердить диагноз. Таким образом применение технологии секвенирования нового поколения (NGS) для диагностики моногенных эндокринных заболеваний является актуальным и необходимым.

Выявленные мутации будут способствовать уточнению молекулярной основы заболевания, и иметь большое значение для понимания механизма развития патологии и перспектив ее лечения, в том числе и у детей.

«Обследования детей на моногенные эндокринные заболевания» поддержано договорами № 65/315 от 14.04.2015 и 133/315 от 17.06.15 целевого поступления – пожертвования от Фонда поддержки и развития филантропии «КАФ».

РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА ПОВЫШЕНИЯ СПЕЦИФИЧНОСТИ ПОИСКА ИНДЕЛОВ ПО ДАННЫМ ЭКЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ С ПЛАТФОРМЫ ION PROTON

А.Ю. Гришин^{1,2,3}, К.А. Бабалян^{1,2,3}, Г.П. Арапиди^{1,2,3}, Э.В. Генерозов^{2,3}, В.М. Говорун^{1,2,3}

¹Институт Биоорганической Химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

²Научно-исследовательский институт физико-химической медицины

³Московский физико-технический институт

email: grishin@phystech.edu

Мотивация и цели. Вставки и делеции (инделы) — самые распространенные структурные вариации, связанные с патогенезом болезней. Переход к персонализированной медицине с целью обнаружения и лечения патологий невозможен без технологий, позволяющих быстро и недорого предоставить информацию о геноме. Это спровоцировало развитие технологий секвенирования нового поколения (NGS). В 2012 году Life Technologies представила секвенатор Ion Proton. Несмотря на преимущества в скорости и цене, точность поиска инделов по данным с платформы Ion Proton не удовлетворяет современным требованиям медицинской диагностики. Причина этого — значительное количество ложно позитивных инделов из-за склонности секвенатора к ошибкам в гомополимерных областях. Целью работы была разработка алгоритма повышения специфичности определения вставок и делеций по данным экзомного секвенирования с платформы Ion Proton.

Методы. Для определения правильности детекции в работе использовался подход машинного обучения. В качестве тренировочных данных, на которой обучалась модель, были использованы образцы, проанализированные GIAB, семьи Ashkenazim и NA12878, для которых доступна информация о достоверно присутствующих в экзомах инделах. Были проанализированы распределения различных параметров инделов, для выявления паттернов характерных для ложнопозитивных инделов. После подготовки и нормализации данных было проведено обучение различных моделей машинного обучения и перекрестная проверка на тренировочных данных с целью определения наиболее эффективного алгоритма и оптимизации гиперпараметров.

Результаты. На основе предложенных в работе характеристик инделов была построена модель классификации. Результаты её применения к образцам, для которых были валидированы 14 инделов на чипах Atlas, показали высокую точность модели, правильно предсказавшую все инделы и отфильтровавшую неподтвержденные чипированием инделы.

Выводы. Основываясь на параметрах инделов, с помощью методов машинного обучения возможно значительно увеличить специфичность поиска инделов по данным экзомного секвенирования с платформы Ion Proton.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРАНСЛЯЦИИ НА ОСНОВАНИИ ДАННЫХ РИБОСОМНОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ И MRNA-SEQ

ИС Евшин^{1,2}, ОА Волкова^{3,*}, ФА Колпаков^{1,2}

¹КТИ ВТ СО РАН

²Институт системной биологии, 000

³ИЦиГ СО РАН

*ov@bionet.nsc.ru

Мотивация и цели. Технология рибосомного профилирования (RiboSeq) позволяет оценивать уровень трансляции отдельных мРНК. В последние годы проводится множество исследований с использованием данной технологии на разных типах клеток и в разных физиологических условиях. Для проведения широкомасштабных исследований регуляции эффективности трансляции (ТЕ) необходим контроль входящих данных RiboSeq и адекватная оценка эффективности трансляции. Целью данной работы было оценить качество исходных данных RiboSeq и подобрать оптимальные параметры их обработки и оценки ТЕ.

Методы. Для этой цели из база данных RiboSeqDB были отобраны данные пар экспериментов RiboSeq и mRNAseq. Выполнены предварительная обработка данных с использованием специально разработанных сценариев на базе платформы BioUML. Для контроля качества ридов RiboSeq, вычисленные значения ТЕ сравнивались с аналогичными значениями, полученными с использованием методов масс-спектрометрии и mRNAseq. В ходе этого анализа мы подбирали параметры и наиболее подходящие методы обработки входящих данных RiboSeq и оценки ТЕ.

Результаты

1. Были разработаны несколько методов оценки ТЕ и проверена их точность. Разработаны методы определения доверительного интервала и относительной погрешности ТЕ.
2. Были подобраны оптимальные параметры удаления адаптеров и последующего выравнивания ридов RiboSeq.
3. Проверено влияние наличия ПЦР дубликатов: они не ухудшают точность оценки ТЕ и должны быть оставлены.
4. Было проанализировано влияние RiboSeq ридов, соответствующих положению рибосомы вне рамки считывания, на оценку ТЕ и показано, что они должны учитываться наравне с остальными ридами.

Заключение

Был проведен анализ исходных данных RiboSeq и подобраны оптимальные параметры их предварительной обработки и параметры оценки ТЕ.

ТАРГЕТНОЕ ЭКЗОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ В ДИАГНОСТИКЕ РАННИХ ЭПИЛЕПТИЧЕСКИХ ЭНЦЕФАЛОПАТИЙ (НА ПРИМЕРЕ СИНДРОМА АЙКАРДИ-ГУТЬЕРЕС)

Н.О. Брюханова¹, *С.С. Жилина^{1,2}, С.О. Айвазян², Т.В. Ананьева², М.С. Беленикин², Т.В. Кожанова^{1,2}, Т.И. Мещерякова², Р.А. Зинченко^{1,3}, Н.Н. Заваденко¹

¹ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия;

²ГБУЗ НПЦ Медицинской помощи детям ДЗМ, Москва, Россия;

³ФГБНУ «Медико-генетический научный центр».

e-mail: szhylyna@mail.ru

Мотивация и цель: В практике врача особое место занимают пациенты первых лет жизни с клиническими симптомами поражения центральной нервной системы (ЦНС). Труден путь к постановке правильного диагноза, когда патология ЦНС сочетается с признаками системного воспаления, тогда в отсутствии подтверждающих данных за внутриутробную инфекцию, следует искать генетические синдромы. Целью настоящей работы явился поиск генетических причин ранних эпилептических энцефалопатий (РЭЭ) с использованием таргетного экзомного секвенирования.

Материалы и методы: обследовано 88 детей с различными формами эпилептической энцефалопатией, задержкой психомоторного и речевого развития. Проведено таргетное экзомное секвенирование 34 генов, мутации в которых наиболее часто связаны с развитием РЭЭ.

Результаты: на основании данных клинического осмотра (эпилепсия, отставание в психомоторном развитии, регресс ранее приобретенных навыков) и проведенного дифференциального диагноза у 9 пациентов выставлен предварительный диагноз синдрома Айкарди-Гутерес (АГС). При проведении таргетного экзомного секвенирования у 8 пациентов обнаружены мутации в генах RNASEH2A и RNASEH2B, ответственных за развитие АГС. У 5 пациентов в гене RNASEH2A была обнаружена замена с.605T>C; р. Leu202Ser [rs7247284] и у 1 больного – с.615T>A; р. Asp205Glu [rs62619782]. В гене RNASEH2B у 2 пациентов была определена нуклеотидная замена [с.859G>T, р. Ala287Ser, rs144408326], у 1 ребенка - с.412C>T, р. Leu138The, rs78705382. У 1 больного мутаций в 34 генах обнаружено не было. Учитывая клиническую картину заболевания, родителям девочки рекомендовано проведение хромосомного микроматричного анализа для исключения хромосомных aberrаций, а также секвенирование гена ADAR, так как он не входил в группу исследуемых генов.

Заключение: Всем пациентам с лейкоэнцефалопатией целесообразно рекомендовать генетическое тестирование с целью выявления наследственных форм заболевания. Современные методы молекулярно-генетического анализа (панели генов, полноэкзомное секвенирование) должны полноценно интегрироваться в диагностические алгоритмы обследования детей с РЭЭ.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ НОВЫХ БИОМАРКЕРОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С КЛЕТОЧНЫМ СТРЕССОМ, ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ПРОГНОЗА ТЕЧЕНИЯ Т-ЛИМФОБЛАСТНОЙ ЛЕЙКЕМИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ МАЛЫХ РНК И ПОЛНОТРАНСКРИПТОМНОГО АНАЛИЗА

Д.М.Зайченко¹, М.В.Меситов¹, Р.А. Солдатов², С.Г. Малахо³, А.А.Соколовская¹, А.А.Московцев^{1,2,*}, А.А.Кубатиев^{1,2}

¹ Институт общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия

² ГБОУ ДПО РМАПО МЗ РФ, Москва, Россия

³ МГУ им. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: bioinf@mail.ru

Мотивация и цели. Стрессовый ответ клетки на белки с ненативными конформациями (UPR) является ключевым ранним адаптивным механизмом, активируемым при широком спектре заболеваний, в частности, онкологических, сердечно-сосудистых, нейродегенеративных, эндокринных, аутоиммунных. При неэффективности UPR в клетках индуцируется апоптоз. Активация/блокирование UPR с помощью фармакологических препаратов является новым подходом в терапии ряда онкологических заболеваний, в частности, Т- и В- лимфобластных лейкомий (бортезомиб). UPR-специфичные биомаркеры могут быть использованы для ранней диагностики и прогноза течения ряда заболеваний. Целью нашей работы была идентификация и функциональный анализ малых РНК как потенциальных биомаркеров, ассоциированных с адаптивными изменениями клеток линии Т-лимфобластной лейкемии Jurkat при индукции UPR.

Методы. Для исследования транскриптома было проведено глубокое секвенирование малых РНК длиной до 35 нт. Для детектирования мРНК был использован Affymetrix и метод RT-qPCR. Для индукции UPR использовался дитиотрейтол.

Результаты. При индукции UPR в клетках Т-лимфобластной лейкемии обнаружено увеличение в 2,6 раз количества tiRNA фрагментов тРНК длиной 32 нт с паттернами характеристическими для действия РНКазы ангиогенина (ANG), расщепляющего молекулы тРНК в антикодонной петле.

Среди 451 идентифицированной микроРНК в клетках Jurkat наиболее высокопредставленными были Т-лимфоласт-специфичные микроРНК. Экспрессия 105 микроРНК была дифференциальной (FDR<0.05), из которых 69 микроРНК повысили экспрессию, а 36 понизили в ответ на индукцию UPR.

Среди группы UPR-специфичных микроРНК, увеличивших свою экспрессию, большинство было ассоциировано с гибелью клетки и только miR-17-5p и miR-25-3p имели адаптивные функции. Нами обнаружено глобальное снижение нормализованного количества ридов микроРНК с 41% до 25% в клетках при индукции UPR. Зарегистрированы изменения экспрессии мРНК компонентов биогенеза, что может указывать на возможность снижения биогенеза микроРНК при UPR.

Заключение. Идентифицированы новые UPR-специфичные биомаркеры - tiRNA, а также ряд микроРНК. Данные биомаркеры могут рассматриваться как перспективные для оценки адаптивного потенциала клеток, а также диагностики и прогноза течения Т-лимфобластной лейкемии.

ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ СЕКВЕНИРОВАНИЯ СЛЕДУЮЩЕГО ПОКОЛЕНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ МУКОВИСЦИДОЗА

М.В. Иванов^{1,2,*}, О.В. Глазова¹, А.Д. Мацвай¹, С.А. Красовский², Е.Л. Амелина³, К.Ф. Хафизов^{1,4}

¹ Московский Физико-Технический Институт

² Биомедицинский холдинг АТЛАС

³ ФГБУ НИИ пульмонологии

⁴ ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

e-mail: maksim.v.ivanov@phystech.edu

Мотивация и цели. Муковисцидоз (МВ) – наследственное заболевание, характеризующееся нарушением функции желез внешней секреции, органов дыхания и ЖКТ. На сегодняшний день известно более 1500 мутаций в гене CFTR ассоциированных с развитием муковисцидоза, что затрудняет генетическое тестирование методами ПЦР и прямым секвенированием.

Методы. Проведено секвенирование следующего поколения (NGS) гена CFTR для 89 пациентов. Крупные перестройки детектировались методом MLPA. Клиническая информация была доступна для 82 пациентов.

Результаты. Среди 89 пациентов с подтвержденным диагнозом МВ обнаружено 48 различных мутаций из них 25 обнаружены в единичных случаях. Все обнаруженные патогенные мутации были успешно подтверждены прямым секвенированием. Пациенты с мягким генотипом (n=36) чаще проявляли легочную форму МВ, в то время как с тяжелым (n=46) – смешанную (частота легочной формы 92% vs 4%; p-value < 0.01). Сахарный диабет наблюдался только среди пациентов с тяжелым генотипом (22% vs 0%; p < 0.01). Для каждого пациента удалось обнаружить как-минимум две известные патогенные мутации в гетерозиготе или одну в гомозиготе. У девяти пациентов обнаружено 3 потенциально патогенные мутации. У троих пациентов обнаружен генотип [3849+10kbC>T, R668C; Phe508del], который был ассоциирован с пониженным весом пациентов (p=0.004). Обнаружить делеции 2,3 экзонов и дупликации 6,10 экзонов с помощью NGS не удалось.

Заключение. Широкий спектр обнаруженных мутаций в гене CFTR подтверждает экономическую и техническую эффективность применения NGS для подтверждения диагноза МВ, однако для применения в рутинной практике требуется валидация метода. Обнаруженные корреляции генотипа и фенотипа демонстрируют возможность использования результатов генетического тестирования для прогноза клинического проявления заболевания. Однако вопрос о важности модифицирующих мутаций в гене CFTR и прочих генах-модификаторах остается открытым. Работа выполнена при поддержке РФФИ (№15-04-04730 А)

ТАРГЕТНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПРИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ

*Ю.С. Иткис¹, Т.Д. Крылова¹, С.В. Михайлова², Н.Л. Печатникова³, Е.Ю. Захарова¹

¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»

² ФГБУ «РДКБ» МЗ РФ

³ Морозовская ДГКБ

yulya.itkis@gmail.com

Митохондриальные заболевания – гетерогенная группа редких наследственных заболеваний, вызванная нарушениями в дыхательной цепи митохондрий, что обусловлено мутациями в ядерном и митохондриальном геномах. Это объясняет трудность молекулярной диагностики митохондриальных патологий. Появление современных методов высокопроизводительного секвенирования позволило в некоторой степени упростить диагностику данной группы заболеваний. Так, в лаборатории НБО ФГБНУ «МГНЦ» была разработана панель для таргетного секвенирования 62 ядерных митохондриальных генов, которые ассоциированы с митохондриальными заболеваниями. Это гены, кодирующие структурные белки и белки-сборщики комплексов дыхательной цепи митохондрий, а также ряд других важных митохондриальных белков. Для составления выборки пациентов для данного исследования мы использовали несколько критериев: типичные изменения на МРТ головного мозга; высокий уровень FGF21; клинические проявления PEO/PEO+. К настоящему моменту проанализировано 64 пациента, у 12 из них найдены патогенные замены в следующих генах: NDUFS2, NDUFV1, SCO2, C10orf2, SUCLG1, DNA2, COX10 и др. Интересно, что у троих пациентов со схожими клиническими проявлениями (полинейропатия, офтальмоплегия, миоклонусы, задержка психоречевого развития) в гене C10orf2 найдена компунд-гетерозиготная замена с.G1199T, которая не описана в базах данных по мутациям и полиморфизмам, но является с высокой вероятностью патогенной, согласно программам по предсказанию патогенности замен. Еще у троих пациентов с тяжелой миопатической формой митохондриального заболевания обнаружена описанная гомозиготная замена с.G418A в гене SCO2. Мы предполагаем, что данные мутации являются частыми для российской популяции и их стоит внести в скрининг-панели для поиска частых митохондриальных мутаций. Наши результаты демонстрируют эффективность применения секвенирования следующего поколения как для диагностики гетерогенных заболеваний, так и для исследования распространенности мутаций в популяции.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ОРФАННОГО СИНДРОМА АССОЦИИРОВАННОГО С РЕДКИМИ И МНОЖЕСТВЕННЫМИ НЕОПЛАЗИЯМИ У ДЕТЕЙ.

Т.П.Казубская¹, В.М.Козлова¹, В.В.Стрельников², Н.И.Поспехова², Е.Н.Лукьянова⁴, Я.В. Ковалева⁴, Т.Т. Кондратьева¹, И.Н. Соколова¹, Е.И.Трофимов³, В.Г. Поляков¹

¹ФГБУ РОНЦ «имени Н.Н. Блохина», Москва

²ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва

³ФГБУ НКЦО ФМБА, Москва

⁴ЦГ и РМ Института Стволовых Клеток Человека, Москва

E-mail: kazubskaya@yahoo.com или oncogen5@ronc.ru

Неоплазии являются второй причиной смерти детей в возрасте от 0 до 14 лет и 5% из них, ассоциирует с наследственными синдромами. Использование современных молекулярных технологий в изучении детей с неоплазиями расширяет возможности диагностики, выбора тактики ведения. Цель работы показать роль новых молекулярных методов в диагностике наследственных синдромов у детей с редкими и множественными неоплазиями. В обследовании пробандов 3-х, 11-ти и 15 лет с неоплазиями использованы методы Сэнгера, NGS, MLPA. Результаты. У ребенка 2,5 лет от клинически здоровых родителей обнаружена атипичная тератоидно-рабдоидная опухоль ЦНС. ДНК-диагностика мутаций в гене TP53 выявила у него двойную мутацию в экзоне 6 (p.D207N,S215I). Его мать оказалась носителем этой мутации. Второй ребенок наблюдался с 3х лет, когда была выявлена первая паравертебральная эмбриональная опухоль PNET, вторая (ПЕКома печени) в 10 лет, остеосаркома правой орбиты спустя полгода. Интересным является то, что только NGS экзема выявило у ребенка две герминальные мутации в генах TP53 экзон 7с.C742T (p.R248W) и PPARG (последняя ассоциирует с риском ожирения и малигнизацией). У третьего ребенка первой манифестацией заболевания была рабдомиосаркома в 4 года, в 9 лет В-клеточная лимфома, в 12 - остеосаркома ключицы и эмбриональная рабдомиосаркома в 16 лет. Исследование ДНК гена TP53 методом Сэнгера и расширенной панели NGS мутаций не выявило. Учитывая особенность проявления заболевания, проведено исследование количества копий

всех экзонов гена TP53 методом MLPA. Выявлена внутригенная делеция экзона 10 с.[1195+1_1196-1]_ [1302+1_1303-1]del, p.(Ile332Profs Ter14), которая явилась причиной агрессивного течения заболевания. Использованные молекулярные методы позволили установить у всех детей синдром Ли-Фраумени. **Заключение.** Показанием для ДНК диагностики гена TP53 являются редкие и множественные неоплазии. Раннее выявление мутаций у таких детей позволило бы своевременно диагностировать синдром и планировать тактику ведения больного.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА СИНДРОМА ЛИ-ФРАУМЕНИ МЕТОДОМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

*Т.В. Кожанова^{1,2}, С.С. Жилина^{1,2}, Т.И. Мещерякова¹, С.И. Маркова¹, А.А. Абрамов¹, Н.М. Иванова¹, Т.А. Шароев¹

¹ГБУЗ НПЦ Медицинской помощи детям ДЗМ, Москва, Россия;

²ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия

e-mail: TatyanaVK84@gmail.com

Мотивация и цель: Ведущая роль в индукции и промоции канцерогенеза принадлежит генетическим нарушениям. Мутации в генах-супрессорах опухолевого роста, главным образом в TP53, CHEK1 и CHEK2, являются причиной развития наследственных опухолевых синдромов. Цель – показать возможности использования экзомного секвенирования в диагностике первично-множественных злокачественных новообразований из спектра синдрома Ли-Фраумени (СЛФ).

Материалы и методы: клинико-диагностическое обследование пациента с первично-множественными злокачественными новообразованиями. Проведены молекулярно-генетические исследования (поиск частых мутаций в гене TP53, экзомное секвенирование).

Результаты: Учитывая наличие в анамнезе ранее развитие опухолей у ребенка (с 2 до 17 лет) (нефрактомиа по поводу нефробластомы, развитие острого лимфобластного лейкоза и опухоли левой почки) ребенок был консультирован врачом-генетиком. Поиск частых мутаций в гене TP53 никаких изменений в кодирующей части гена не обнаружил. Принимая во внимание развитие у пациента трех опухолей в детском возрасте и отсутствие мутаций в гене TP53, рекомендовано продолжить дальнейший поиск мутаций в генах, участвующих в канцерогенезе. В результате секвенирования экзема была выявлена ранее не описанная мутация (p.R95fs) в гене CHEK2, приводящая к сдвигу рамки считывания при транскрипции мРНК и нарушению соответствия между кодонами в ДНК и аминокислотами в конечном продукте – белке. По данным литературы ранее мутации в гене CHEK2 были описаны у пациентов с синдромом Ли-Фраумени. Алгоритмы предсказания патогенности SIFT и PolyPhen2 расценили выявленную мутацию как вероятно патогенную.

Заключение: Вовлеченность в патогенез СЛФ генов, контролирующих клеточный рост, репарацию ДНК и апоптоз, объясняет не только формирование первично - множественных злокачественных новообразований, характерных для данного синдрома, но и повышенный риск развития неоплазий других локализаций, что обосновывает необходимость комплексного подхода к диагностике, лечению и профилактике у пациентов с СЛФ.

АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ ATR7B В СИБИРСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ МЕТОДОМ МАССОВОГО ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

А.А.Кудрявцев^{1*}, С.П. Коваленко¹, С.Я. Слободянок¹

¹ФГБУ НИИМББ СО РАМН

* e-mail: a_kudryavtsev@mail.ru

Болезнь Вильсона – Коновалова (БВК) – тяжелое прогрессирующее аутосомно-рецессивное наследственное заболевание, приводящее к избыточному накоплению меди в тканях и поражению печени и головного мозга. Причина возникновения БВК – мутация гена *ATP7B*, кодирующего медь-транспортную АТФ-азу Р-типа. Идентифицировано более 600 различных мутаций, из них для 380 доказана роль в патогенезе заболевания. Наиболее частой мутацией в европейских популяциях, является р.Н1069Q (rs76151636) в экзоне 14 (у 31% пациентов с БВК). Так же значимы для анализа экзоны 2, 3, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 и 18.

Распространенность по данным Orphanet составляет 1-9 случаев на 100000 населения (в среднем 1 на 25000). Информация о встречаемости БВК в РФ в настоящее время отсутствует. Для оценки заболеваемости необходимо выявить частоты мутаций гена *ATP7B* в России.

Цель: Анализ частоты герминальных мутаций гена *ATP7B* в сибирской популяции.

Методы: Анализ мутаций *ATP7B* проводился методом массового параллельного секвенирования (NGS) на приборе Ion Torrent PGM. Материалом для исследования служила геномная ДНК, жителей Новосибирской области, выбранных случайным образом.

Результаты: Разработана методика анализа мутаций *ATP7B* с помощью NGS. Для этого были разработаны 15 пар праймеров для покрытия 14 из 20 экзонов, а так же методика подготовки библиотеки для секвенирования.

В результате анализа образцов с помощью разработанной методики обнаружилось 18 полиморфизмов, из которых 2 (rs7334118 и rs76151636) являются мутациями, вызывающими заболевание согласно базе данных ClinVar. Эти мутации оказались у 2,5%, что согласуется с частотами, обнаруженными в зарубежных исследованиях.

Заключение: По полученным данным можно предположить, что носителем БВК является один из 40 человек. Разработанный метод позволяет секвенировать большее количество образцов за один эксперимент, что снижает стоимость одного анализа. Таким образом это позволит сделать диагностику БВК в клинических условиях более доступной.

АДАПТАЦИЯ АЛГОРИТМОВ ПОИСКА ПОЛИМОРФИЗМОВ К РЕЗУЛЬТАТАМ ИОННОГО ПОЛУПРОВОДНИКОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Н.А.Кулемин^{1,2}, К.А.Бабаян^{1,2}, Э.В.Генерозов¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства»

²Московский Физико-Технический Институт (Государственный Университет)

В связи с широким распространением технологии ионного полупроводникового секвенирования одной из актуальных задач является оптимизация алгоритмов интерпретации данных, получаемых с помощью приборов указанного типа. Проприетарное программное обеспечение секвенатора формирует существенно меньшее количество детектированных генотипов при меньшей точности, тогда как альтернативное свободное программное обеспечение (SAMtools, GATK, FreeBayes) предоставляет большее число возможностей для предварительной подготовки геномных данных. В настоящем исследовании было проведено сравнение эффективности различных алгоритмов определения полиморфизмов и мутаций на основе данных секвенирования тестового образца GCat59 (проект Genome In The Bottle), валидированного на различных технологических платформах. Был произведен подбор оптимальных параметров запуска каждой из указанных программ. В результате были разработаны оптимальные протоколы для определения максимального возможного количества генотипов при допустимой ошибке в 99,5%, а также меньшего количества генотипов при гарантированной точности 99,98%. Независимая валидация протоколов была протестирована на 7 экспериментальных образцах, которые были отсекуены в ФКНЦ ФХМ с использованием набора для целевого обогащения экзона Ampliseq. В качестве контроля для результатов секвенирования использовалось чип-генотипирование по технологии Illumina BeadChips (OmniExpress24) с дополнительной обработкой.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ NGS МЕТОДОВ ВЫЯВЛЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНО АКТИВНЫХ РАЙОНОВ ГЕНОМА ДЛЯ ПОИСКА ПОЛИМОРФИЗМОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ РАЗВИТИЕ ПАТОЛОГИЙ, НА ПРИМЕРЕ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

Е.Ю. Леберфарб^{1*}, Л.О. Брызгалов^{1,2}, И.И. Брусенцов¹, Ю.Л. Орлов¹, Т.И. Меркулова¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

²ЗАО Вектор-Бест

e-mail: Leberfarb@mail.ru

Мотивация и цели. В настоящее время основным методом выявления связи между генетическими вариациями и фенотипом является полногеномный поиск ассоциаций (GWAS). Однако, по результатам GWAS невозможно отличить полиморфизм, связанный с возникновением фенотипического признака от множества маркерных, выявленных за счет неравновесия по сцеплению. Альтернативным подходом является целенаправленное исследование функциональных районов генома. Цель нашей работы - разработка подхода к выявлению полиморфизмов, приводящих к развитию патологий с привлечением различных данных NGS на примере рака толстого кишечника (CRC).

Методы. В работе были использованы данные ChIP-seq, ChIA-PET и RNA-seq экспериментов, выполненных на 23 клеточных линиях CRC и более 200 образцах CRC из базы данных ICGC и ENCODE. Проверка адекватности выбранных порогов при поиске SNPs проводилась с помощью секвенирования по Сенгеру фрагментов содержащих найденные SNPs на линии HCT 116. В качестве основного критерия оценки функциональности регуляторных SNPs использовали данные об асимметрии представленности аллелей в анализируемых данных ChIP-seq. Привязку регуляторных SNPs к определенным генам осуществляли с помощью данных ChIA-PET. Для оценки влияния SNPs на экспрессию генов использовали данные об асимметричной экспрессии аллелей, содержащих маркерные SNPs в RNA-seq.

Результаты. С помощью разработанного подхода удалось выявить 816 регуляторных SNPs, связанных с развитием CRC, в том числе 101, частота встречаемости которых достоверно отличается в выборке больных и здоровых людей. SNPs которые оказывают влияние на экспрессию связанных с онкопатологией генов.

Среди генов содержащих найденные нами SNPs были обнаружены в том числе и описанные ранее гены связанные с возникновением CRC (BAIAP2L1, BUB3 и др.).

Заключение. Таким образом, нами был разработан новый функциональный подход к поиску функционально значимых SNPs, приводящих к развитию патологий.

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-04-05780, грантом РФФИ № 15-54-53091, комплексной программой Сибирского отделения РАН, проект № 0324-2015-0003.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТАРГЕТНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ФОРМ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ЖКТ

Л.Н. Любченко^{1*}, А.В. Семьянихина¹, И.С. Абрамов^{1,2}, Т.С. Дубровина¹, М.Г. Филиппова¹, Т.В. Наседкина², Ю.И. Патютко¹, А.О. Расулов¹, М.М. Давыдов¹

¹ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина» Минздрава России. 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24

²Институт Молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН. 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32. e-mail: clingen@mail.ru

Риск развития злокачественных новообразований (ЗНО) желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) в составе наследственных онкологических синдромов значительно превышает общепопуляционный. Герми-

нальные мутации в генах MLH1, MSH2, PMS1, PMS2, CDH1, TP53, APC и др. являются этиологическими факторами развития наследственных вариантов рака толстой кишки, рака желудка, рака поджелудочной железы и первично-множественных злокачественных новообразований (ПМЗН). Применение таргетных панелей в диагностике генетически гетерогенных заболеваний повышает эффективность молекулярно-генетической диагностики и медико-генетического консультирования. С целью верификации генетического диагноза было проведено молекулярно-генетическое исследование геномной ДНК 36 пациентов, проходивших лечение в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, с диагнозом злокачественного новообразования ЖКТ, в т.ч. ПМЗН, с использованием разработанной панели, включающей 15 генов: APC, MLH1, PMS2, PMS1, MSH2, TP53, MSH6, CDH1, BMPR1A, CHEK2, ERCC1, MUTYH, PTEN, SMAD4, STK11. Отбор целевой последовательности проводили с помощью технологии жидких чипов NimbleGen Sequence Capture. Библиотека зондов включала 2,1 миллиона олигонуклеотидов длиной 50-105 нуклеотидов, комплементарных кодирующим участкам исследуемых генов. Секвенирование проводили на платформе GS Junior (454/Roche).

В результате исследования был выявлен 51 вариант, включая однонуклеотидные полиморфизмы, миссенс-мутации, нонсенс-мутации и indel в 12 генах. В 28% случаев были выявлены патогенные мутации, в т.ч. ранее не зарегистрированные в международных базах данных. Данные NGS подтверждены с использованием метода секвенирования по Сэнгеру. Высокопроизводительное секвенирование является эффективным методом выявления герминальных мутаций и может быть использовано в рутинной диагностической практике в рамках медико-генетического консультирования.

НОВЫЙ АЛЛЕЛЬНЫЙ ВАРИАНТ ПРОМЕЖУТОЧНОГО ТИПА НАСЛЕДСТВЕННОЙ МОТОРНО-СЕНСОРНОЙ НЕЙРОПАТИИ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ МУТАЦИЕЙ В ГЕНЕ NEFL

А.Х.-М. Макаев¹, Р.А. Зинченко^{2*}, Е.Л. Дадали^{2,3}, А.В. Поляков², М.В. Булах², Е.К. Гинтер²

¹Муниципальное бюджетное лечебно-профилактическое учреждение «Хабезская центральная районная больница», Хабез Карачаево-Черкесской Республики,

[e-mail: renazinchenko@mail.ru](mailto:renazinchenko@mail.ru)

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», Москва,

³Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Мотивация и цели: Наследственные моторно-сенсорные нейропатии (НМСН)- группа генетически гетерогенных заболеваний (~ 50 генетических вариантов). Аллельные варианты одного гена также могут приводить к клинически различным проявлениям НМСН. В процессе экспедиций в Карачаево-Черкессию выявлены 10 пациентов из одной семьи с АД НМСН. ДНК-анализ большинства генов кандидатов оказался отрицательным.

Методы: Использована панель (400 генов) для таргетного секвенирования при нейрогенетических заболеваниях. Анализ проведен на Illumina NextSeq 500 методом парно-концевого чтения (2x151 п.о.) со средним покрытием не менее 70-100x.

Результаты: Клинически: дебют заболевания от 13 до 18 лет с появления слабости перонеальной группы мышц. Поражение дистальных мышц рук присоединилось спустя 4-6 лет. У всех больных отмечалась выраженная деформация по типу стоп Фридрейха, слабость и гипотрофия дистальных мышц стоп, нижней трети голени и мелких мышц кистей, сенситивно-мозжечковая атаксия, отсутствие или резкое снижение сухожильных рефлексов с рук и ног и постуральный тремор пальцев кистей. Особенность данного клинического варианта – отсутствие значимых расстройств чувствительности в зоне пораженных мышц, отмечалась не резко выраженная поверхностная гиперестезия в стопах. Скорость проведения импульса по срединному нерву у больных - от 33,5 - 42,3 м/сек. Используя секвенирование NGS определена ранее не описанная миссенс мутация с.65С>А (p.Pro22His) в экзоне 1 гена NEFL (8p21.2) в

гетерозиготном состоянии. Проведенный поиск мутации у других членов семьи (методом прямого автоматического секвенирования) выявил мутацию с.65С>А у всех больных в гетерозиготном состоянии. **Заключение:** Это первое сообщение о миссенс мутации с.65С>А (p.Pro22His) в гене NEFL, ассоциированной с промежуточной формой НМСН. Заболевание выявлено в карачаевской семье. Распространенность заболевания в районе составила 1:3300 карачаевцев. Работа частично финансирована грантами РФФИ 14-04-00525, 15-04-01859.

ОЦЕНКА «КЛИНИЧЕСКОГО КАЧЕСТВА» ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ: СТАНДАРТИЗАЦИЯ НА ПУТИ ИНТЕГРАЦИИ NGS В МЕДИЦИНСКУЮ ГЕНЕТИКУ

М.В.Иванов¹, С.В. Мусиенко¹, В. Милейко^{1*}

¹Биомедицинский холдинг АТЛАС

E-mail:milevko@atlas.ru

Мотивация и цели. Технология NGS дает возможность создавать гибкие диагностические решения, варьируя состав панелей, способы таргетного обогащения, методы и глубину секвенирования. Однако это серьезно ограничивает возможности кросс-валидации результатов и сравнения данных. Таким образом, универсальная система оценки надежности результатов NGS-исследования является важным инструментом для широкого внедрения NGS в клиническую практику.

Несмотря на то, что зачастую биоинформатические пайплайны позволяют оценить «надежность» выявленных мутаций эти результаты рассчитываются и представляются по-разному различными алгоритмами, и к т ому же сложно интерпретируемы с клинической точки зрения.

Результаты. Авторами разработано программное обеспечение, позволяющее оценивать «клиническое качество» данных NGS независимо от использованного метода секвенирования и особенностей таргетной панели. Для каждого образца вычисляется предсказанная чувствительность (вероятность того, что клинически значимые мутации не упущены) и специфичность (вероятность того, что обнаруженные мутации не являются ложно-положительными). Помимо технических параметров секвенирования алгоритм может учитывать популяционные частоты клинически значимых мутаций, таким образом, он корректно переводит биоинформатические параметры на «язык» клинической диагностики. С помощью разработанного ПО было обнаружено, что в наборе данных полно-экзомного анализа генов BRCA1 и BRCA2, предсказанная диагностическая чувствительность в некоторых случаях составляла менее 98%. Это указывает на необходимость для отдельных пациентов дополнительно исследовать определенные участки, потенциально содержащие клинически значимые мутации.

Заключение. С помощью предложенного подхода можно оценивать качество данных NGS в клиническом приложении. Помимо этого, метод может применяться также для сравнения как различных платформ и конкретных протоколов секвенирования, так и алгоритмов анализа данных.

ПРИМЕНЕНИЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ «НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ» (NGS) ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ НАСЛЕДСТВЕННОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Е.И. Новикова*, Г.П. Снигирева, В.А. Солодкий

ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России

e.novikova.rncrr@mail.ru

Мотивация и цели. Выявление наследственного характера заболевания и поиск новых молекулярно-биологических маркеров у пациентов с диагнозом рак молочной железы имеет огромное значение для выбора индивидуальной схемы лечения пациентов, а также для оценки риска возникновения данной онкопатологии в течение жизни и профилактики заболевания у здоровых людей.

Целью работы является поиск клинически значимых герминальных мутаций в генах предрасположенности в группе пациентов с диагнозом рак молочной железы.

Методы. 174 пациента с клиническими признаками наследственного заболевания были предварительно отобраны по признаку отсутствия часто встречающихся мутаций в генах BRCA1/2 и протестированы с помощью NGS с использованием панели, включающей 94 гена, ассоциированные с высоким риском развития онкопатологии.

Результаты. Клинически значимые варианты были идентифицированы в 19 генах. У 14% пациентов выявлены патогенные редкие мутации в генах BRCA1/2, у 18% - мутации в генах, ассоциированных с повышенным риском развития рака молочной железы [ATM, CHEK2, NBN, PALB2], у 12% - в других генах, связь повреждений в которых с риском развития рака молочной железы на данный момент не подтверждена.

Заключение. Таким образом, 37% пациентов являются носителями клинически значимых герминальных мутаций в генах предрасположенности, что является основанием для коррекции схемы лечения, а также генетического тестирования их родственников для оценки риска развития онкологического заболевания и его своевременного предупреждения.

ПОИСК НОВЫХ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ РАКА ЖЕЛУДКА С ПОМОЩЬЮ ПОЛНОГО ЭКЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

А.Х. Нурғалиева^{1*}, Л.Ф. Галлямова¹, М.А. Янкина², Ф.Р. Мунасыпов³, Д.Д. Сакаева³, Э.Х. Шаймарданова¹, Э.К. Хуснутдинова^{1,2}

¹Башкирский государственный университет, Уфа, 450074

²Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа, 450054

³Республиканский клинический онкологический диспансер Министерства здравоохранения Республики Башкортостан, Уфа, 450054

e-mail: Alfiyakh83@gmail.com

Одним из наиболее распространенных онкологических заболеваний во всем мире является рак желудка (РЖ). Молекулярной причиной предрасположенности к заболеванию с высоким риском [70-83%] являются наследуемые мутации в ряде генов.

Нами проведен поиск новых генов-кандидатов, ассоциированных с риском развития РЖ, с помощью секвенирования экзома. Материалом для исследования послужили образцы ДНК, выделенные из опухолевой и прилегающей к ней нормальной ткани желудка больных РЖ с установленным гистологическим типом – аденокарцинома желудка, стадия 3, группа 2. Подготовку библиотек ДНК и секвенирование проводили по технологии Illumina на приборе HiSeq 2000. В качестве референсной использовалась последовательность генома человека GRCh37-hg19. Обнаруженные варианты аннотировались с помощью программы ANNOVAR с использованием шести insilico программ из dbNSFPv.1.3. Кроме того, дополнительно использовали программы Mutation Assessor, CLINVAR и CADD.

В результате секвенирования экзома в одном образце ДНК в среднем выявлено 33134 изменений нуклеотидной последовательности в нормальной ткани и 38960 – в опухолевой ткани [среди которых, соответственно, 3,3% и 3,4% составили мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания, 40,0% и 37,1% - несинонимичные замены, 0,3% и 0,4% - мутации, приводящие к образованию стоп-кодонов]. В каждом образце выявлено в среднем 7516 соматических мутаций.

На данном этапе нами отобраны 40 генов-кандидатов, которые играют важную роль в процессах клеточной инвазии, адгезии, ремоделировании хроматина, контроле клеточного цикла, репарации ДНК, апоптозе, пролиферации и роста, транскрипции генов, и могут быть вовлечены в патогенез РЖ. С наибольшей частотой мутации выявлены в генах TP53AIP1, ARID1A, PDGFRA, SEPT9, CACNA1G, PCDH17, NDRG2, MLLT10. Также обнаружены патогенные изменения в генах, роль которых при РЖ не была описана ранее. Для определения роли отобранных вариантов в патогенезе заболевания требуется дальнейший углубленный анализ полученных результатов.

РОЛЬ МИКРОРНК В СПЕРМАТОГЕНЕЗЕ

Руднева. С. А^{*1}, Хаченкова А.А¹

¹ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва

С появлением высокопроизводительного секвенирования исследование сложных смесей молекул РНК вышло на новый уровень. По ряду показателей NGS отличается от разработанных ранее методов-ПЦР и гибридизации на чипах и объединяет в себе плюсы обоих методов. На основе метода NGS разрабатывается все больше диагностических панелей, так как результаты получаются точнее и гораздо подробнее, чем с диагностических панелей единичных генов.

Ход сперматогенеза сопровождается высоко организованными транскрипционными волнами, которые генерируют специфические профили транскриптомов для каждого типа дифференцирующихся клеток. Поскольку совершенно разные группы генов экспрессируются в митотических сперматогониях, в мейотических сперматоцитах, и в гаплоидных сперматидях.

Помимо кодирующих белки матричных РНК в мужских половых клетках определено много некодирующих РНК, включая микроРНК. Эти микроРНК экспрессируются в мужских половых клетках и во время сперматогенеза участвуют в контроле каждого этапа дифференцировки. Систематизируя литературные данные мы охарактеризовали все известные к настоящему моменту микроРНК, участвующие в сперматогенезе, оценили их функциональную значимость на разных этапах дифференцировки половых клеток и наметили ряд наиболее перспективных микроРНК, которые возможно использовать в качестве маркеров для создания диагностических панелей мужского бесплодия.

Предполагаемые функции микроРНК в половых клетках.

В сперматогониях: miR-21 (устойчивость к апоптозу), miRNA-20,-106a,miRNA-221/222, miRNA-146 (подавление дальнейшей дифференцировки). Делеция в районе miR-17-92 приводит к синдрому яичек малого размера и нарушению сперматогенеза у мышей.

В сперматоцитах и сперматидях на разных стадиях развития: miR-34c (индукция апоптоза), miR-449 (регуляция мейоза), miR-18 (регуляция (деградация) мРНК гистонов Hsf2), miR-469 (регуляция (деградация) мРНК транзиторных белков TP2 и протаминов Prm2), miR-122a (регуляция (деградация) мРНК транзиторных белков TP2)

Потенциальные биомаркеры мужского бесплодия:

Микро РНК в сперме человека при олигоастенозооспермии:

Повышенный уровень : miR-141, -200a

Пониженный уровень: miR-34b, -15b, -34c-5p, -34b*, -449a, -1973, -122, -16, -19a

При астенозооспермии:

Повышенный уровень: miR-200a, -141 Пониженный уровень : miR-1973, -34b, -122

Микро РНК в семенной плазме:

Пониженный уровень при необструктивной азооспермии, повышенный уровень при астенозооспермии: miR-34c-5p, -122, -146b-5p, -181a, -374b, -509-5p, -513a-5p

Пониженный уровень при необструктивной азооспермии: miR-141, -429, -7-1-3p

Выводы. Существующие на сегодня экспериментальные данные свидетельствуют о контроле разных этапов сперматогенеза различными микроРНК. На основании этих данных возможно создать диагностические NGS панели, которые в дальнейшем могут быть внедрены в медицинскую практику в качестве востребованных минимально инвазивных или вовсе неинвазивных клинических тестов.

ВОЗМОЖНОСТИ NGS В ДИАГНОСТИКЕ РЕДКИХ НАСЛЕДСТВЕННЫХ СИНДРОМОВ

А.В. Семьянихина^{1*}, М.Г. Филиппова¹, И.С. Абрамов^{1,2}, А.С. Тюляндина¹, О.В. Крохина¹, Т.В. Наседкина², Л.Н. Любченко¹

¹ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина» Минздрава России. 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24

²Институт Молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН. 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32.
e-mail: alexandra_silina@mail.ru

Синдром Ли-Фраумени (СЛФ) относится к группе редких наследственных высокопенетрантных ауто-сомно-доминантных заболеваний, фенотипически и генетически гетерогенный и ассоциированный с высокими рисками развития остеогенных и мягкотканых сарком, одно- и двустороннего рака молочной железы (РМЖ, ДРМЖ) у женщин, аденокарциномы рака, опухолей головного мозга, гемобластозов и др. С целью оценки вклада герминальных мутаций и полиморфных вариантов в гене TP53 в развитие ДРМЖ и первично-множественных злокачественных новообразований (ПМЗН) в составе СЛФ, а также возможностей современных методов ДНК-диагностики нами представлен клинический случай наблюдения молодой 33-летней пациентки с ПМЗН в составе СЛФ: рак правой молочной железы, состояние после ПХТ. Прогрессирование в 2010 году. Метастатический рак левой молочной железы, состояние после комплексного лечения в 2011-2013 гг. Прогрессирование рака молочной железы на фоне беременности в 2013 г. Кесарево сечение на сроке 25 недель беременности. Анапластическая олигоастроцитома правой лобной доли головного мозга, состояние после комплексного лечения в 2011-2013 гг. Прогрессирование заболевания в 2014 году. Для проведения молекулярно-генетического исследования была получена геномная ДНК пациентки, предварительно генотипированная на предмет отсутствия мутаций в генах BRCA1/2. С помощью коммерческого набора SeqPlate TP53 были амплифицированы с 4 по 11 экзоны гена TP53. Таргетное секвенирование выполнено на платформе GS Junior (454/Roche). В 7 экзоне гена TP53 выявлена герминальная миссенс-мутация с.722C>A (p.S241Y), в последующем валидированная автоматическим секвенированием по Сэнгеру, подтвержден клинический диагноз: TP53-ассоциированные ПМЗН в составе СЛФ. Представленные результаты демонстрируют высокую диагностическую эффективность современных методов молекулярно-генетической диагностики в онкологической практике, в т.ч. технологий массового параллельного секвенирования.

ТАРГЕТНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ – МЕДИЦИНСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ VS. КЛИНИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА

Т.С. Симакова, А.Г. Брагин, М.А. Глушкова, Ю.А. Внучкова, А.Е. Павлов*

Parseq Lab (Компания «Парсек Лаб»), Санкт-Петербург
aravlov@parseq.pro

Мотивация и цели: Высокопроизводительный анализ генома (MPS) позволяет получить информацию о значительном количестве генетических вариантов в пределах исследуемых регионов. Нами был реализован практический подход к классификации вариантов по их клинической значимости и созданию алгоритма интерпретации результатов, который позволяет провести валидационные исследования, установить диагностическую эффективность тест-системы для её внедрения в рутинную практику системы здравоохранения.

Методы: Тестирование клинических образцов с подозрением на муковисцидоз, фенилкетонурию и галактоземию, с помощью тест-системы VariFind™ Neoscreen assay (Parseq Lab) с детекцией вариаций копийности с помощью программы CONVector 2.1 (Parseq Lab).

Результаты: В трех лабораториях протестировано 605 клинических образцов российских и европейских пациентов с использованием тест-системы VariFind™ Neoscreen assay. Идентифицировано 699 клинически-значимых вариантов, из них - 17 ранее не описанных мутаций, 17 вариаций копийности и 38 комплексных аллелей.

Заключение: Внедрение методов MPS в клиническую практику формирует новые требования к аннотированию и интерпретации обнаруженных вариантов для постановки генетического диагноза. Анализ не может быть выполнен полностью в автоматическом режиме и требует привлечения экспертной оценки. Специалисты, формирующие заключения о проведенном исследовании, непременно должны обладать знаниями генетических основ развития тестируемых заболеваний, понимать преимущества и ограничения различных методов молекулярной диагностики, знать многообразие номенклатуры генетических

вариантов, уметь пользоваться внешними источниками аннотации и инструментами предиктивного анализа. Аннотирование и интерпретация результатов MPS является междисциплинарной задачей, требующей участия специалистов по анализу геномных данных и врачей-генетиков, специализирующихся на исследуемых заболеваниях. Формирование методических рекомендаций и принятие консенсусов по каждому конкретному заболеванию, с разработкой алгоритма тестирования и интерпретации результатов, позволит использовать геномные данные не только в научных, но и медицинских целях.

РЕКОНСТРУКЦИЯ ПРЕДКОВОГО ГАПЛОТИПА С МУТАЦИЕЙ САЙТА СПЛАЙСИНГА С.-23+1G>A ГЕНА GJB2 В НЕКОТОРЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ ЕВРАЗИИ ПО ДАННЫМ ПОЛНОГЕНОМНОГО АНАЛИЗА

А.В. Соловьев,^{1,2*} Н.А. Барашков,^{1,2} Ф.М. Терютин,^{1,3} М.С. Бады-Хоо,^{4,5} О.Л. Посух,^{5,6} В.Г. Пшенникова,^{1,2} Г.П. Романов,^{1,2} Л.М. Васильева,⁷ Э.Е. Федотова,⁷ И.В. Морозов,^{8,9} А.А. Бондарь,⁸ Н.А. Соловьева,^{1,2} А.М. Рафаилов,¹ Н.Н. Сазонов,¹ А.Н. Алексеев,⁷ Л.У. Джемилева,¹⁰ Э. Метспалу,¹¹ М. Местпалу,¹¹ Р. Р. Вильямс,¹¹ Э.К. Хуснутдинова,^{10,12} С.А. Федорова^{1,2}

¹ФГАУ ВПО «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова», г. Якутск, Россия

²ФГБНУ «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем», г. Якутск, Россия

³ГБУ РС(Я) «Республиканская больница №2 - Центр экстренной медицинской помощи», г. Якутск, Россия

⁴ГБУЗ РТ «Республиканская больница №3», г. Кызыл, Россия

⁵ФГБНУ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, Россия

⁶ФГБОУ ВПО Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, г. Новосибирск, Россия

⁷ГБУ РС(Я) «Республиканская больница №1 - Национальный центр медицины», г. Якутск, Россия

⁸ФГБНУ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия

⁹ФГБНУ Институт гуманитарных исследований и проблем малочисленных народов Севера СО РАН, г. Якутск, Россия

¹⁰ФГБНУ Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, г. Уфа, Россия

¹¹Эстонский Биоцентр, г. Тарту, Эстония

¹²ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет», г. Уфа, Россия

*e-mail: nelloann@mail.ru

В настоящее время известно, что мутация сайта сплайсинга с.-23+1G>A является одной из частых мутаций в гене GJB2 (13q12.11) у пациентов с врожденной глухотой в ряде популяций Восточной Европы [Seeman et al., 2004; Pollak et al., 2006; Toth et al., 2009; Sansović et al., 2009; Близнач и др., 2012; Minárik et al., 2012; Shubina-Oleinik et al., 2014], Кавказа [Божкова и др., 2008; Близнач и др., 2012], Ближнего Востока [Sirmaci et al., 2006; Bonyadi et al., 2011; Alkowiari et al., 2012; Zeinali et al., 2014], Центральной Азии [Tekin et al., 2010], Южной [Бады-Хоо и др., 2014] и Восточной Сибири [Barashkov et al., 2011]. Ранее, с применением 8 STR-маркеров, фланкирующих участок гена GJB2, было показано, что на территории Якутии данная мутация распространилась в результате эффекта основателя [Barashkov et al., 2011]. 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 эзенец) с мутацией с.-23+1G>A в гомозиготном состоянии. Анализ был выполнен в Эстонском Биоцентре (Тарту) на платформе Illumina 730K в соответствии со спецификацией производителя. В результате исследования во всех четырех образцах были найдены блоки гомозиготности различной протяженности (от 1,4 Mb у русского и до 7,6 Mb 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>A гена GJB2 в изученных популяциях Евразии.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ №16-34-00234, проекта Министерства образования и науки РФ ГК №6.656.2014/К.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СЕМЕЙНЫХ АДЕНОМ ГИПОФИЗА

Т.С. Тарасова*, **Е.А. Пигарова**, **А.Н. Тюльпаков**, **Л.К. Дзеранова**
ФГБУ «Эндокринологический научный центр» МЗ РФ
Tarasova.TatianaS@gmail.com

Мотивация и цели. Определить роль генов, ассоциированных с развитием наследственных аденом гипофиза (АГ), а также генов, вероятно вовлеченных в патогенез спорадических АГ, в развитие синдрома семейных аденом гипофиза.

Методы. Обследовано 19 семей (45 пациентов) с семейными аденомами гипофиза различного вида секреции. Максимальное количество членов семьи с аденомами в одной семье составило 2. Семей с гомогенным типом секреции – 12 (с соматотропиномой, пролактиномой, кортикотропиномой), с гетерогенным типом – 7, из них все семьи с соматотропиномой/неактивной аденомой гипофиза. Всего в исследовании участвовали 30 (67%) мужчин и 15 (33%) женщины с аденомами гипофиза.

Проводилось выделение ДНК из цельной крови. Были проведены этапы подготовки проб перед высокопроизводительным параллельным секвенированием (next-generation sequencing, NGS) и собственно NGS на секвенаторе Ion Torrent PGM в соответствии со стандартными протоколами. Панель генов (MEN1, CDKN1B, PRKAR1A, GNAS, AIP, SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, PRKCA, CDKN2C, CDKN2A, POU1F1, PTTG2, DICER) создана с помощью программы Ion AmpliSeq™. Анализ данных NGS проводился с помощью программного обеспечения Torrent Suite. Аннотирование выявленных изменений проводилось с помощью программы ANNOVAR.

Результаты. У одного пациента с семейной макросоматотропиномой выявлена мутация в экзоне 6 гена AIP p.R271W; у еще одного пациента с макросоматотропиномой выявлена мутация в экзоне 15 гена DICER p.D871E. У одного пациента был выявлен полиморфизм с недоказанным патологическим значением в экзоне 14 гена SDHA p.V589V. У одного пациента с фенотипом синдрома МакКьюн-Олбрайта в экзоне 5 гена SDHB была выявлена гетерозиготная замена p.S163P, в литературе данная мутация описана у пациентов с медулярным раком щитовидной железы, можно ли данную мутацию считать патологической и влияющей на развитие синдрома МакКьюн-Олбрайта требует дальнейшего изучения.

Заключение. Таким образом, у 3 (7%) пациентов из группы семейных АГ были выявлены мутации (1 в гене AIP, 1 в гене DICER и 1 в гене SDHB).

ОБНАРУЖЕНИЕ ВАРИАЦИЙ ЧИСЛА КОПИЙ НА ОСНОВЕ ДАННЫХ ЭКЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

К. Ю. Цуканов**

* 000 «Генотек», Москва
tsukanoffkirill@gmail.com

Мотивация и цели. CNV — вариации числа копий генетической информации — представляют клинический интерес. Данные экзомного секвенирования в классических подходах используются для поиска мутаций. Однако они также содержат информацию о покрытии тех или иных регионов, которая позволяет обнаруживать CNV с высокой точностью. Мы описываем практический опыт внедрения пайплайна для обнаружения CNV в клинической среде.

Методы. CNV определяются на основе анализа глубины покрытия участков генома. Для устранения шума покрытие нормализуется с помощью пакета CNVKit, дополненного нашими собственными разработками. Информация о покрытии многих образцов используется для создания референсного про-

филя, на основании отклонений от которого и определяются CNV.

Обнаруженные CNV снабжаются значением абсолютного и относительного числа копий, а точность определения ограничена размерами таргетных регионов. CNV можно также обнаружить вне таргетных участков за счёт внетаргетных прочтений, хотя разрешение в таких регионах меньше на порядок.

Результаты. В партии из 138 образцов было обнаружено 825 вариантов числа копий. Из них 203 имели частоту в популяции менее 2% и представляли возможный клинический интерес. Медианный размер варианта составил 134 тыс. оснований, распределение их длин — от 1.3 тыс. до 9.1 млн оснований.

В одном примечательном случае удалось уточнить предыдущий вывод, сделанный на основе традиционных методов: предполагаемая концевая делеция короткого плеча 8-й хромосомы (12 млн нуклеотидов), как оказалось, располагается в середине плеча и затрагивает лишь часть одного гена (1.5 млн нуклеотидов).

Заключение. Представленный метод определения CNV позволяет получить дополнительную полезную информацию из данных экзомного секвенирования без проведения дополнительных исследований. В таргетных регионах его точность не уступает традиционным подходам с использованием микрочипов. В то же время, ограничением метода является резко сниженная чувствительность вне пределов таргетных регионов секвенирования.

ПРИМЕНЕНИЕ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ФОРМ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

А.С. Цуканов, **Н.И. Поспехова**, **И.Ю. Сачков**, **А.М. Кузьминов**, **С.И. Ачкасов**, **С.А. Фролов**, **В.Н. Кашников**, **Ю.А. Шельгин**, **В.П. Шубин**

Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение «Государственный научный центр колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Tjukanov81@rambler.ru

Мотивация и цели. Колоректальный рак в России занимает 2 место по заболеваемости среди злокачественных новообразований. До 10% всех случаев рака обусловлено наследственными мутациями определенных генов. Основными наследственными формами являются синдром Линча, семейный аденоматоз толстой кишки, а также синдром Пейца-Егерса. Случаи колоректального рака могут встречаться в семьях с другими наследственными онкологическими синдромами. Для поиска мутаций, вызывающих данные синдромы, в последние годы стали применяться секвенаторы «нового поколения». Целью работы стало исследование разных наследственных форм колоректального рака с помощью высокопроизводительного секвенирования.

Методы. Поиск наследственных мутаций проводился у 24 пациентов с колоректальным раком, имеющих наследственный онкологический анамнез (предположительный диагноз: синдром Линча, семейный аденоматоз толстой кишки, синдром Пейца-Егерса и др.).

ДНК из лимфоцитов периферической крови выделяли с использованием набора «ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА» фирмы ДНК-технология. Поиск наследственных мутаций осуществлялся с помощью системы GS Junior фирмы Roche.

Результаты. Для поиска герминальных мутаций была разработана панель, включающая 17 генов: MLH1, MSH2, MSH6, PMS1, PMS2, MLH3, POLE, POLD1, NTHL1, APC, MUTYH, STK11, CDH1, TP53, BRCA1, BRCA2, CHEK2. Мутации были обнаружены у 3 из 12 пациентов с предположительным диагнозом синдром Линча (2 в гене MSH2 и 1 в PMS2), у 3 из 4 больных с семейным аденоматозом (2 в гене APC и в гене MYH), у 2 из 3 пациентов с синдромом Пейца-Егерса (в гене STK11). Три мутации были обнаружены в генах BRCA1/2 у 5 пациентов, в чьих семьях встречались различные онкологические заболевания.

Заключение. Выявлены герминальные мутации в 11 семьях (из 24) с различными наследственными раковыми синдромами. Четыре из 11 мутаций найдены впервые в мире. Проведенное исследование показало возможность внедрения высокопроизводительного секвенирования с целью диагностики разных наследственных форм колоректального рака.

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ NGS СЕКВЕНИРОВАНИЯ В РАННЕЙ ДИАГНОСТИКЕ МУКОВИСЦИДОЗА, ФЕНИЛКЕТОНУРИИ И ГАЛАКТОЗЕМИИ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ

Ю.А. Чурюмова*, А.Ю. Морозова, Н.В. Вохмянина

Санкт-Петербургское государственное казенное учреждение здравоохранения «Диагностический центр [медико-генетический]»

chury.yuliya@gmail.com

Неонатальный скрининг – это комплекс мероприятий, проводимых с целью раннего выявления наследственных заболеваний обмена (НБО). Протокол неонатального скрининга включает молекулярно-генетические исследования как подтверждающий этап диагностики. В настоящее время для расширения панели тестируемых мутаций при проведении молекулярно-генетической диагностики НБО в структуре неонатального скрининга предлагается использование NGS секвенирования

Цель работы: оценить эффективность применения NGS секвенирования в структуре неонатального скрининга.

Материал и методы. Использовались сухие пятна крови новорожденных (182) с повышенными первичными значениями иммунореактивного трипсиногена (ИРТ)-120; фенилаланина (ФА)-21и общей галактозы (ГАО)- 41 в период с апреля 2015 по январь 2016 года для молекулярно-генетических исследований методом NGS секвенирования. Применялась панель праймеров VariFind Neoscreen Assay с количеством биомаркеров – 581 (ген муковисцидоза, CFTR-442, ген галактоземии, GALT-40, ген фенилкетонурии, PAH-99). Диагностические характеристики метода: чувствительность – 99,32%, специфичность – 100%.

Результаты. В группе с повышенными значениями ИРТ (120) идентифицировано 7 пациентов с 2 патогенными мутациями. При этом 3, из обнаруженных 6 мутаций (F508del, 1811+1,6kba>G, 2143delT, 3120+1G>A, K598X, R1066C), являются редкими и не входят в панель определения наиболее часто встречающихся мутаций, что составляет 50%. У 16 пациентов с повышенным первичным значением ИРТ и отрицательным результатом ретеста обнаружена 1 патогенная мутация.

В группе с повышенными значениями ФА (21) обнаружено 13 пациентов с 2 патогенными мутациями (R408W, Y414C, A300S, IVS10-11G>A, A403V, E390G, R261X, R252W, R243X), из которых 54% являются редкими. В 5 случаях генотип обследуемых содержал 1 патогенную мутацию.

В группе с повышенным значением ГАО (41) выявлено: 1) 3 пациента с 2 патогенными мутациями: Q188R/K285N, Q188R/IVS3-2A>C [2], 2) 21 пациент с 1 обнаруженной патогенной мутацией, 22 пациента с генетическими вариантами N314D, 5' UTR-119delGTCA, IVS4-27G>C, IVS5+62G>A, IVS5-24G>A, которые по литературным данным, ассоциированы с галактоземией формы Дуарте.

Выводы. Методом NGS секвенирования выявлены редкие мутации (среднем > 50% от общего количества), которые не идентифицируются панелью для детекции частых мутаций. Полученные результаты доказывают целесообразность использования NGS в неонатальном скрининге как подтверждающего метода для ранней диагностики НБО.

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ПОЛУПРОВОДНИКОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОДТВЕРЖДЕНИЯ СИНДРОМА АЛЬПОРТА У ДЕТЕЙ

Л.И. Шагам, А.В. Полякова, Т.А. Крыганова, В.С. Сухоруков, Н.Е. Конькова, З.Р. Баширова, В.В. Длин
Научно-Исследовательский Клинический Институт Педиатрии имени академика Ю.Е. Вельтищева
РНИМУ им. Н.И. Пирогова

Мотивация и цели. Синдром Альпорта (СА) – орфанное заболевание почек, частота которого составляет один случай на 5 000 – 53 000 человек, в зависимости от популяции. Заболевание вызвано мутациями в генах α -цепей коллагена IV типа COL4A3, COL4A4 и COL4A5. Секвенирование вышеупомянутых генов позволяет подтвердить диагноз. Генная панель представляется наиболее эффективным методом

исследования, позволяющим получить высокую полноту покрытия при минимальных финансовых затратах.

Методы. Исследована венозная кровь 33 неродственных пациентов в возрасте от 2 до 17 лет (18 мальчиков и 15 девочек, средний возраст 11 лет) с подтвержденным или подозреваемым диагнозом СА. Панель, покрывающая кодирующие экзоны и смежные участки интронов (5 п.н.) генов COL4A3, COL4A4 и COL4A5, была разработана с использованием технологии мультиплексной ПЦР-амплификации целевых участков Ion AmpliSeq™, секвенирование проведено на полупроводниковом секвенаторе Ion PGM™. Выявленные генетические варианты классифицированы согласно рекомендациям Американской ассоциации медицинских генетиков [Richards et al., 2015].

Результаты. Полнота покрытия целевых участков более 97%, теоретически рассчитанная чувствительность метода составила 93,4% для мальчиков и 84,5% для девочек. Среди 21 пациента с подтвержденным диагнозом, у 8 человек были выявлены патогенные мутации, у 9 – вероятно патогенные, у 3 – варианты с неясной клинической значимостью, у одного мутаций выявлено не было. Среди 12 пациентов с подозреваемым диагнозом эти цифры составили 5, 3, 3 и 1, соответственно. Таким образом, в первой группе генетическое подтверждение диагноза получено у 81% детей, во второй – у 67%. У каждого из 12 детей с предполагаемым на основании семейного анамнеза X-сцепленным типом наследования СА была обнаружена мутация в гене COL4A5.

Заключение. Апробирован эффективный метод генетического подтверждения синдрома Альпорта, чувствительность которого на исследованной выборке российских пациентов составила более 80%.

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРИЧИН РАЗВИТИЯ МЯГКОЙ ФОРМЫ СПИННО-МОЗЖЕЧКОВОЙ АТАКСИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ NGS-СЕКВЕНИРОВАНИЯ

М.В. Шульская^{1*}, М.И. Шадрин¹, С.А. Ключников², С.А. Лимборская¹, С.Н. Иллариошкин², П.А. Сломинский¹

¹Институт молекулярной генетики Российской академии наук, 123182 Москва, Россия.

m.shulskaya@gmail.com

²Научный центр неврологии, г. Москва. 125367 Москва, Россия

Мотивация и цели: Спинно-мозжечковые атаксии представляют собой крайне гетерогенную группу наследственных неврологических заболеваний. Симптомы атаксии могут сильно различаться в зависимости от каждого отдельного случая даже в пределах одного подтипа заболевания. Нами было проведено исследование четырех поколений семьи с аутосомно-доминантной прогрессирующей мягкой формой спинно-мозжечковой атаксии. Генотипирование данной семьи не выявило частых патогенных мутаций, характерных для российских больных. В связи с этим целью нашей работы стало выявление генетических причин развития заболевания в данной семье с использованием технологии полноэкзомного секвенирования.

Методы: Для трех членов данной семьи было проведено полноэкзомное секвенирование. Полученные данные были проанализированы с использованием баз данных dbSNP137, 1000 Genomes Project, NHLBI Exome Sequencing Project и программ SIFT, PolyPhen-2, fathmm, MutationAssessor, MutationTaster. Отобранные в результате анализа потенциально патогенетически значимые варианты были проверены на наличие или отсутствие у здоровых и больных членов семьи при помощи ПЦР и последующего секвенирования по Сэнгеру.

Результаты: Анализ полученных данных позволил идентифицировать гетерозиготную миссенс-мутацию с.4657G>A p.Val1553Met в гене ITPR1. Ранее данная мутация была выявлена один раз у неродственной семьи из Австралии.

Заключение: Наше исследование подтверждает важную роль гена ITPR1 в патогенезе спинно-мозжечковых атаксий, а выявленная в данном гене мутация является причиной развития заболевания в исследованной семье.

ПРИМЕНЕНИЕ МАССОВОГО ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ ТОЧКОВОЙ ГЕТЕРОПЛАЗМИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

М.В. Голубенко^{*1,2}, Н.П. Бабушкина¹, А.В. Марков¹, С.В. Буйкин¹, В.П. Пузырев¹

¹НИИ медицинской генетики, г. Томск

²НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, г. Кемерово

maria-golubenko@medgenetics.ru

Мотивация и цели: Технологии NGS применимы для изучения гетероплазии мтДНК, поскольку позволяют оценить даже очень низкий уровень точковых мутаций. Так как окислительный стресс, испытываемый эндотелием сосудов в процессе атерогенеза, может индуцировать повышенную частоту мутаций мтДНК, целью эксперимента было выявление и сравнение гетероплазмичных позиций в клетках, полученных из области атеросклеротических бляшек сонных артерий и в крови пациентов.

Методы: Секвенирование мтДНК осуществляли с помощью технологии Illumina (MiSeq) у 10 пациентов с атеросклерозом сонных артерий (материал для исследования получен в при выполнении каротидной эндартерэктомии).

Результаты: При учете гетероплазии на уровне более 0,9%, в исследованных образцах было выявлено 35 гетероплазмичных позиций в бляшках и 28 – в крови пациентов. В 12 случаях гетероплазия наблюдалась как в крови, так и в бляшке индивида. Только в 5 случаях доля минорного варианта была более 10%. Анализ локализации и спектра гетероплазмичных позиций выявил повышенную частоту миссенс-мутаций и мутаций в контрольном регионе мтДНК, а также более высокое значение отношения числа трансверсий к числу транзиций, по сравнению с популяционным полиморфизмом. Выявлены отдельные сайты мтДНК, для которых могут быть характерны ошибки при выравнивании ридов и оценке гетероплазии.

Заключение: Массовое параллельное секвенирование позволяет получить оценку гетероплазии мтДНК по отдельным позициям на протяжении всего митохондриального генома. Существуют определенные трудности в оценке гетероплазии делеций и инсерций; необходимо также учитывать вероятность контаминации, используя информацию о филогении мтДНК. В целом, полученные результаты свидетельствуют о распространенности гетероплазии мтДНК на низком уровне в исследованных тканях. Не выявлено значимого преобладания мутаций в атеросклеротических бляшках по сравнению с клетками крови.

Исследование поддержано грантом РФФ №14-15-00305.

