



КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ
ФГБУ «МГНЦ» РАМН

СБОРНИК ТЕЗИСОВ

12 декабря 2014 г.

Конференц-зал

Федерального государственного бюджетного учреждения

«Медико-генетический научный центр»

Российской академии медицинских наук

Москва, ул. Москворечье, д. 1

Между морем и степью: особенности генофонда народов Крыма по данным анализа Y-хромосомы, мтДНК и полногеномных панелей маркеров

Агджоян А.Т., Схалыхо Р.А., Балановский О.П.

ФГБУ «МГНЦ» РАМН, Москва

Крымский полуостров является местностью, где на протяжении веков сходились пути народов из контрастных регионов Евразии. Однако современных коренных народов Крыма не так уже много. Крымские греки являются далёкими наследниками античных древнегреческих и последующих греческих переселенцев из Византии. Крымские татары - наиболее многочисленный на сегодня народ Крыма - сформировались в результате миграции степных кочевников в XIV веке, которые отчасти включили в свой состав более раннее население полуострова. Караимы – крайне немногочисленная группа, происхождение которой дискуссионно. Для надежной реконструкции происхождения крымских татар и крымских греков были использованы наиболее информативные современные системы генетических маркеров: полногеномные панели аутосомных SNP-маркеров, полные сиквенсы митохондриальной ДНК и филогенетически глубокий анализ Y-хромосомы. Проанализировано 400 образцов ДНК, полученных от неродственных между собой мужчин – представителей трёх субэтнотипов крымских татар и двух субэтнотипов крымских греков. Гаплогруппы Y-хромосомы определены с высоким разрешением в результате анализа 40 филогенетически наиболее информативных SNP-маркеров, а изменчивость внутри гаплогрупп охарактеризована по 17 STR-маркерам. Представители всех 5 субэтнотипов генотипированы по 1 000 000 SNP-маркеров с использованием Illumina Human 1M-Duo BeadChip. Результаты анализа маркеров как гаплоидных систем - Y-хромосомы и митохондриальной ДНК (многомерное шкалирование, кластерный анализ, карты генетических расстояний, филогенетический анализ по полным сиквенсам мтДНК), так и аутосомного генома (метод главных компонент, анализ соотношения предковых компонентов методом ADMIXTURE) выявили идентичные закономерности в структуре генофонда исследованных групп.

Показано, что степной субэтнотип крымских татар генетически приближен к народам Евразийской степи и Приуралья; генофонд горных и южнобережных крымских татар и обеих групп крымских греков сходен с популяциями Восточного Средиземноморья (в особенности греков и турков); не выявляется сходство народов Крыма с их географическими соседями – русскими и украинцами. Полученные результаты геномных исследований указывают на сохранение в генофонде Крыма как первоначального «средиземноморского» компонента на протяжении более 2,5 тысяч лет, так и более позднего - «евразийского степного» компонента - в северных районах Крыма.

**Анализ экзоста опухолевых клеток у больных хроническим миелоидным
лейкозом**

*Адильгереева Э.П.¹, Лавров А.В.^{1,3}, Смирнихина С.А.¹, Чельшева Е.Ю.², Шухов О.А.²,
Туркина А.Г.², Куцев С.И.^{1,3}*

¹ФГБУ «МГНЦ» РАМН, Москва

²ФГБУ «Гематологический научный центр» МЗ РФ, Москва

³ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И.Пирогова МЗ РФ, Москва

Хронический миелолейкоз (ХМЛ) – онкогематологическое миелопролиферативное заболевание, характеризующееся появлением в стволовой кроветворной клетке специфического цитогенетического маркера – t(9;22)(q34;q11.2), или филадельфийской (Ph) хромосомы. Ph-хромосома образуется в результате реципрокной транслокации между хромосомами 9 и 22. В результате транслокации образуется химерный ген *BCR-ABL*, который обладает высокой тирозинкиназной активностью.

Ингибиторы тирозинкиназ (ИТК) являются высокоэффективными препаратами для лечения хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ). Тем не менее, существует проблема резистентности к терапии ингибиторами тирозинкиназ. Неэффективность терапии может быть обусловлена активацией *BCR-ABL* независимых путей лекарственной устойчивости. В данной работе мы предприняли попытку найти экзомные варианты, обуславливающие клиническую гетерогенность и лекарственную устойчивость к терапии ИТК.

Нами было секвенировано 8 человек: 4 имели оптимальный ответ на терапию ИТК и 4 не достигли оптимального ответа на терапию.

Эффективность терапии определяли через 6 месяцев лечения: устойчивость к терапии – *BCR-ABL* >1% и/или цитогенетический ответ >10%, а оптимальный ответ на терапию при *BCR-ABL* <1% и цитогенетический ответ 0%.

Экзомное секвенирование проводили на платформе Ion PGM с использованием набора для обогащения экзоста Exome Enrichment Kit (LifeTechnologies).

Анализ полученных данных выявил однонуклеотидные варианты в 11 генах (*ANKRD35*, *FCRL3*, *ATP7B*, *IGHV4-31*, *ANPEP*, *DNAH9*, *CCDC165*, *LRP2*, *FANCD2*, *KLB*, *MAGEC1*) в группе пациентов, достигших оптимального ответа, и в 3 генах (*MORN2*, *TMX4*, *PTCRA*) в группе пациентов с неудачей терапии.

Обнаруженные варианты могут являться генетическими маркерами эффективности терапии ИТК при ХМЛ.

Фенокопии как возможная причина молекулярно недиагностированных случаев мышечной дистрофии Эмери-Дрейфусса

Т.А.Адян¹, Г.Е.Руденская¹, Е.Л.Дадали¹, О.С.Грознова²,
Д.В.Влодавец², О.П.Рыжкова¹, А.В. Поляков¹

¹ФГБУ «МГНЦ» РАМН, Москва

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

Мышечные дистрофии Эмери-Дрейфусса (ЭДМД) – клинически и генетически гетерогенная группа наследственных заболеваний, характеризующихся триадой типичных симптомов: первичными контрактурами локтевых и голеностопных суставов, возникающими в раннем детстве, медленно прогрессирующей мышечной слабостью лопаточно-плечевой и тазово-перонеальной групп мышц и выраженной кардиомиопатией (КМП) с нарушениями ритма и внутрисердечной проводимости. К настоящему времени описано семь генетических вариантов ЭДМД с различными типами наследования: X-сцепленным, аутосомно-доминантным и аутосомно-рецессивным, однако более чем у 50% больных с фенотипом ЭДМД мутации в этих генах не находят. В группе 104 неродственных семей с подозрением на ЭДМД проведен поиск мутаций трех основных генов *EMD*, *LMNA* и *FHL1*, связанных с ЭДМД типов 1, 2 и 6, соответственно. Мутации выявлены в 40 семьях (38,5%): в 17 семьях (16,3%) – 16 разных мутаций *EMD*, в 22 (21,2%) – 17 разных мутаций *LMNA*, в одной (1%) – мутация *FHL1*. Сравнение клинических характеристик ЭДМД типов 1 и 2 выявило некоторые качественные различия КМП. При клинико-генеалогическом анализе отмечено фенотипическое разнообразие всех типов ЭДМД, в том числе, внутрисемейное. У 64 больных с ненайденными мутациями в 3 генах ЭДМД проведен поиск частых мутаций генов *CAPN3*, *FKRP*, *SGCA*, *ANO5*, *DYSF*, ответственных за основные формы аутосомно-рецессивных конечностнопоясных МД типов 2А, 2I, 2D, 2L и 2В, соответственно. У 4 больных найдены мутации *CAPN3*, у одного – *ANO5*. С учетом этих больных доля верифицированных диагнозов в исходной выборке составила 43,3%. Очевидно, большая доля молекулярно нерасшифрованных случаев при фенотипах ЭДМД частично связана с фенокопиями ЭДМД среди других МД, в частности, конечностнопоясных.

Комплексная молекулярно-генетическая характеристика хромосомного района 10q23.3-26.3 при глиобластоме

Алексеева Е.А.

ФГБУ “МГНЦ” РАМН, Москва

Глиобластома – наиболее частая и агрессивная первичная опухоль головного мозга среди взрослого населения. Наиболее частым генетическим изменением в этой опухоли (до 80% случаев) является потеря гетерозиготности (ПГ) маркеров длинного плеча 10-й хромосомы (10q). Однако ПГ отражает только наличие аллельного дисбаланса в исследуемой области, но при этом не уточняет, является ли это изменение увеличением или уменьшением копийности. Изучение области ПГ на 10q методами, позволяющими охарактеризовать изменение копийности генов-кандидатов, картированных в исследуемом участке, позволит идентифицировать потенциальные маркеры прогноза течения заболевания и ответа на терапию. Цель настоящей работы - комплексная молекулярно-генетическая характеристика района 10q23.3-26.3, содержащего гены-кандидаты *PTEN*, *FGFR2*, *MKI67*, *MGMT*.

Образцы глиобластомы и периферической крови получены от 120 больных. Исследование ПГ в области 10q23.3-26.3 осуществляли с помощью микросателлитного анализа. Система маркеров для выявления ПГ областей расположения генов *PTEN*, *FGFR2*, *MKI67* и *MGMT* включала 6, 3, 1 и 10 микросателлитных повторов, соответственно. Частота ПГ областей генов *PTEN*, *FGFR2*, *MKI67*, *MGMT* составила 54,2% (64/118), 56,2% (50/89), 64,8% (35/54) и 63,2% (74/117), соответственно. Доля образцов с аллельным дисбалансом в исследованной выборке глиобластомы составила 72,5% (87/120).

Исследование характера аллельного дисбаланса проводили новым методом для определения изменения числа геномных локусов – количественного микросателлитного анализа в реальном времени (КМА). Принцип метода основан на TaqMan ПЦР в реальном времени. Зондом служит олигомер, состоящий из 21 нуклеотида, комплементарный к (CA)*n*-повтору, а не к специфической последовательности ДНК. Эндогенным контролем служит одновременная амплификация набора пар праймеров к 6 геномным локусам, содержащим (CA)*n*-повторы и расположенным на различных хромосомах, нарушения копийности которых не характерны для глиобластомы. С помощью КМА проанализировано 50 образцов глиобластомы с выявленной ПГ. В 36 образцах выявлены делеции исследуемых областей, а в 14 – неизменная копийность ДНК (однородительская дисомия).

Таким образом, нами исследована молекулярная патология генов *PTEN*, *FGFR2*, *MKI67*, *MGMT* в контексте копийности генетического материала и впервые показано, что ПГ области 10q23.3-26.3 в глиобластоме может являться как делецией, так и однородительской диссомией, что важно учитывать при использовании изменений в этих генах в качестве молекулярных маркеров.

Исследование поддержано грантом РФФИ 14-04-31832 мол_а

FGF21 – универсальный маркер митохондриальных заболеваний?

Иткус Ю.С.

ФГБУ “МГНЦ” РАМН, Москва

Мышечная биопсия – золотой стандарт в диагностике митохондриальных заболеваний в виду отсутствия универсального биохимического маркера в крови. До настоящего времени основными значимыми биомаркерами считались лактат, пируват и их соотношение в крови, но далеко не всегда эти показатели оказывались информативными. Совсем недавно было обнаружено, что FGF21 (фактор роста фибробластов 21) является хорошим биомаркером при митохондриальных заболеваниях с вовлечением мышечной патологии. FGF21 играет важную роль в липидном обмене и в ответе на голодание; его концентрация повышается в скелетных мышцах и в плазме крови у мышей с нарушением дыхательной цепи митохондрий. Мы измерили уровень FGF21 в плазме крови 144 пациентов с клиническими признаками митохондриального заболевания и у 13 здоровых контролей. Средняя концентрация биомаркера в контрольной группе – 96 пг/мл, у пациентов – 567 пг/мл. Граница нормы FGF21, по литературным данным, составляет 200 пг/мл. У 28 пациентов был определен молекулярный дефект: АЗНЛ (15); синдром Ли (SURF1) (1); Ли-подобный синдром с мутацией мтДНК (3); MELAS (1); недостаточность пируватдегидрогеназного комплекса (1); SANDO (2); синдром Альперса (1); LCHADD (1); синдром Кернс- Сейра (4). У 12 из них уровень FGF21 был повышен. Небольшое повышение концентрации FGF21 было у пациентов с Ли и Ли-подобным синдромом (среднее значение 307 пг/мл). Только у двоих пациентов с АЗНЛ концентрация биомаркера значительно превысила норму (657 и 1738 пг/мл). У всех пациентов с мутациями в гене POLG значения FGF21 были в пределах нормы. А у пациентов с синдромом Кернс-Сейра концентрация фактора роста фибробластов 21 более чем в 14 раз превысила норму. Интересным оказался случай пациента с недостаточностью пируватдегидрогеназного комплекса (мутация в гене PDH). Концентрация FGF21 в плазме его крови составила всего 90 пг/мл, в то время как уровень лактата был очень высокий. Еще один интересный образец с концентрацией FGF21 в 80 раз превышающей норму был получен у пациента с LCHADD во время криза. Возможно, это объясняется тем, что у этого пациента нарушен фермент, отвечающий за получение энергии из определенных жиров, особенно в период голодания, а FGF21 является медиатором метаболических ответов на голодание. У пациентов с неустановленным молекулярным дефектом примерно в половине случаев концентрация превышала норму. Результаты нашей работы согласуются с данными публикаций. Среди наших пациентов заметное повышение концентрации FGF21 наблюдалось у пациентов с заболеваниями, для которых характерна мышечная патология. Таким образом, мы можем говорить, что FGF21 является хорошим биомаркером для первичной диагностики митохондриальной патологии, но не является универсальным. Необходимо провести дальнейшие исследования пациентов с печеночной и мышечной патологией не митохондриальной этиологии.

Молекулярно-генетическая диагностика и частота врожденной мерозин-негативной мышечной дистрофии в России

Миловидова Т.Б., Дадали Е.Л., Руденская Г.Е., Поляков А.В.

ФГБУ «МГНЦ» РАМН, Москва

Врожденные мышечные дистрофии (ВМД) представляют собой группу нервно-мышечных заболеваний, характеризующихся тяжелой гипотонией, мышечной слабостью и контрактурами. Мутации гена *LAMA2*, кодирующего $\alpha 2$ -цепь мерозина, приводят к ВМД1А, проявляющейся дефицитом мерозина при иммуногистохимическом исследовании, патологическими симптомами мышечной дегенерации, фиброзом и характерными изменениями белого вещества головного мозга. Ген *LAMA2* расположен на длинном плече хромосомы 6, покрывает 633.43 kb и состоит из 65 экзонов, что делает молекулярно-генетическую диагностику ВМД1А трудоемкой, длительной и дорогостоящей. В связи со сказанным выше возникает необходимость разработки дешевых и быстрых способов молекулярно-генетической диагностики ВМД1А в отягощенных семьях.

В исследование вошли 26 семей с диагнозом ВМД1А. Поиск мутаций осуществлялся методом прямого автоматического секвенирования по Сенгеру на приборе ABI Prism 3100 (Applied Biosystems) с использованием протокола фирмы производителя. Анализ результатов секвенирования осуществлялся с помощью программ Chromas и BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Разработка системы детекции частых мутаций гена *LAMA2* осуществлялась методом мультиплексной ПЦР с последующей рестрикцией. Для определения частоты ВМД1А использовалась ДНК 1000 здоровых неродственных человек, проживающих на территории РФ.

В результате исследования 26 пробандов с ВМД1А, мутации в гомо- или гетерозиготном состоянии были выявлены в 21 случае, что составляет 81%. Определен спектр мутаций гена *LAMA2* у российских больных. Примечательно, что были выявлены частые мутации гена *LAMA2*: с.2049_2050delAG (ex 14), составляющая 9,5%, с.7536delC (ex 54), составляющая 19%, и с.7732C>T (ex 55), составляющая 7%. На основании этих и литературных данных были выбраны 6 мутаций, описание которых встречается многократно, была разработана система детекции частых мутаций гена *LAMA2*, информативность которой составила не менее 50%.

С помощью данной системы был проведен поиск частых мутаций гена *LAMA2* у 1000 здоровых неродственных человек. В результате исследования было выявлено 2 мутации в гетерозиготном состоянии. По закону Харди-Вайнберга впервые проведена оценка популяционной частоты шести мутаций в гене *LAMA2* среди жителей РФ и расчетной частоты заболевания ВМД1А.

Скрининг на наследственные болезни гликозилирования в России

Каменец Е.А.¹, Байдакова Г.В.¹, Захарова Е.Ю.¹, Михайлова С.В.²

¹ФГБУ «МГНЦ» РАМН, Москва

²ФГБУ РДКБ Минздрава России, Москва

Наследственные болезни гликозилирования (Congenital disorders of glycosylation, CDGs) – это гетерогенная группа редких мультисистемных генетических заболеваний, обусловленных дефектами ферментов системы гликозилирования биомолекул (более 50 нозологических форм). CDG следует подозревать при любом метаболическом синдроме неясной этиологии. Первичный этап лабораторной диагностики CDG – гликопрофилирование гликопротеинов, в первую очередь – трансферрина крови. В зависимости от локализации генетического дефекта выделяют аномальные гликопрофили первого и второго типа. Нами разработан метод анализа гликоформ трансферрина в пятнах крови, основанный на методике анализа в плазме.

Исследование проводили пациентам с неясными метаболическими синдромами в возрасте от 6 месяцев до 5 лет с такими симптомами как задержка психомоторного развития, аксиальная гипотония, аплазия мозжечка, повышенная активность лизосомальных ферментов и трансаминаз в крови, гипопропротеинемия.

Фракции трансферрина анализировались в плазме и пятнах крови с помощью изоэлектрофокусирования (ИЭФ) в агарозном геле. Визуализация проводилась с помощью иммунофиксации с последующей окраской кумасси. В зависимости от результатов биохимического исследования проводился молекулярно-генетический анализ.

К настоящему моменту проведен селективный скрининг 350 пациентов. У 6 из них обнаружены аномальные ИЭФ-паттерны трансферриновых фракций. Пятеро демонстрируют паттерны, характерные для CDG типа I. Также обнаружен 1 пациент с паттерном, характерным для CDG типа II. Троим пациентов с паттернами типа I проведен генетический анализ гена *PMM2*, дефекты в котором являются наиболее частой причиной CDG. У всех троих выявлены дефекты *PMM2*: двое гетерозиготны по двум мутантным аллелям: с.[470T>C(;548T>C] и с.[169G>C(;422G>A] соответственно, и один монозиготен по аллелю с.[303C>G]. Генотипирование остальных трех пациентов с аномальными гликопрофилями проводится.

Скрининг на CDG впервые проводится в России. Генетическая и клиническая гетерогенность затрудняют диагностику CDG. Наш метод с использованием сухих пятен крови позволяет проводить отбор и изучение группы высокого риска вне зависимости от географической локализации.

Высокоразрешающая респирометрия в диагностике митохондриальной патологии

Крылова Т.Д., Цыганкова П.Г., Иткис Ю.С.

ФГБУ “МГНЦ” РАМН, Москва

Митохондриальные заболевания - гетерогенная группа болезней, связанная с нарушением работы дыхательной цепи митохондрий и характеризующаяся мультисистемным поражением, вариабельностью возраста манифестации и прогрессирующим течением. Общая частота митохондриальной патологии достигает по некоторым данным 1:5000 живых новорожденных.

Высокоразрешающая респирометрия – метод, позволяющий измерять скорость потребления и концентрацию кислорода живыми клетками и тканями, максимально приближая измерения к *in vivo*. Биоматериал в специальной дыхательной среде помещают в закрытые камеры, в которых работает сверхчувствительный и стабильный кислородный сенсор. Для более детальной информации о функции отдельных белковых комплексов дыхательной цепи и работы митохондриальной дыхательной системы в целом применяют протоколы с добавлением субстратов-ингибиторов-разобщителей КДЦМ. Оксиграфия используется для изучения патологического эффекта, вызванного нарушением окислительного фосфорилирования (апоптоз, старение, митохондриальные и метаболические заболевания, ишемическое повреждение), а также для оценки эффектов действия различных веществ на дыхательную цепь.

Для оценки работы КДЦМ был использован протокол на интактных клетках-фибробластах у пациентов с клиническим диагнозом митохондриальной патологии (n=4). Респирометрия проводилась на оксиграфе OxuGraph-2k (Oroboros, Austria) с дальнейшей обработкой данных в программе DatLab5.0.

У двух пациентов с ранее выявленными секвенированием новыми заменами в мтДНК обнаружены отклонения в показателях респирометрии. Данный метод в совокупности с другими исследованиями помогает оценить патогенность обнаруженных мутаций при митохондриальных заболеваниях.

**Результаты модельного эксперимента по выделению и анализу клеток трофобласта
в целях неинвазивной пренатальной диагностики**

Мусатова Е.В.

ФГБУ «МГНЦ» РАМН, Москва

Трофобласты являются одним из типов плодных клеток, циркулирующих в крови беременных женщин, и представляют собой заманчивый объект для неинвазивной пренатальной диагностики. Это клетки исключительно плодного происхождения, которые поступают в материнский кровоток, начиная с 5 недели беременности, и быстро элиминируются из организма женщины после родов. Для оценки возможности выделения и исследования клеток трофобласта был проведен модельный эксперимент, материалом для которого послужили 29 образцов искусственно созданных (артифициальных) смесей, полученных при добавлении клеток ворсин хориона замерших беременностей с известным кариотипом в образцы периферической венозной крови взрослых индивидуумов. Для последующего генетического анализа трофобластов были отобраны три образца искусственных смесей, содержащих клетки хориона с кариотипами 46, XX, 46, XY, 47, XX, +13.

На первом этапе исследования было проведено «обогащение» образцов искусственных смесей клетками трофобласта при центрифугировании в градиенте плотности растворов Percoll. Было установлено, что в основном трофобласты локализуются в клеточной фракции на границе плазмы и раствора Percoll плотностью 1,066 г/мл. Однако эта клеточная фракция кроме трофобластов содержала и большое количество лейкоцитов. Для истощения (деплеции) лейкоцитов была использована отрицательная магнитно-активированная клеточная сортировка (МАКС) с антителами к панлейкоцитарному антигену CD45, что позволило максимально удалить эти клетки. Детекцию клеток трофобласта в цитологических препаратах, полученных после МАКС, проводили методом иммуноцитохимического окрашивания с использованием моноклональных антител к цитоплазматическому белку цитокератину 7 (СК7). Единичные СК7-положительные клетки были изолированы с помощью лазерной микродиссекции с последующим проведением полногеномной амплификации. Анализ генетического материала изолированных цитотрофобластов методом метафазной сравнительной геномной гибридизации (CGH) во всех случаях показал, что кариотип диссектированных клеток соответствовал кариотипу клеток хориона, использованных для приготовления соответствующих искусственных смесей, то есть изолированные клетки были плодными по происхождению.

Молекулярно-генетический анализ пациентов с болезнью Помпе

Проскурина Е.А., Байдакова Г.В., Букина Т.М.

ФГБУ «МГНЦ» РАМН, Москва

Болезнь Помпе (БП) – аутосомно-рецессивное заболевание, относящееся к лизосомным болезням накопления (гликогеноз тип *II*). Данное заболевание обусловлено мутациями структурного гена *GAA*, кодирующего лизосомную α -1,4-глюкозидазу. Ген картирован на длинном плече 17 хромосомы, в локусе q25.2-q25.3 и состоит из 20 экзонов. Фермент α -1,4-глюкозидаза (кислая мальтаза) участвует в гидролизе гликогена. Недостаточность кислой мальтазы ведет к отложению негидролизованного гликогена в лизосомах мышц (сердечной и скелетных), что сопровождается картиной прогрессирующей мышечной дистрофии.

При проведении селективного скрининга (1521 пациент) на шесть лизосомных ферментов с помощью МС/МС (Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS/MS)) у 11 человек было обнаружено снижение активности фермента α -1,4-глюкозидазы в высушенных пятнах крови 0.40 ± 0.25 (0.01-0.81), норма 1-25 мкМ/л/ч (9.1 ± 5.2). При проведении молекулярно-генетического анализа гена *GAA* у 11 пациентов диагноз болезнь Помпе был подтвержден: 7 больных с ранним дебютом и 4 с поздним дебютом. Из 22 аллелей было выявлено 16 различных мутаций: три повторяющиеся, которые, возможно, являются частыми для российских пациентов – с.-32-13T>G (3/22 аллелей), с.1655T>C (2/22 аллелей) и с.307 T>G (2/22 аллелей). У двух пациентов были обнаружены мутации в гомозиготном состоянии: с.525delT (инфантильная форма) и p.Gly334Ser (ювенильная форма), выявленные в семьях, где родители пробандов состояли в близкородственном браке. У 9 пациентов были выявлены еще 14 мутации, 10 из которых описаны ранее. Три неописанные мутации: с.2077_2078dupA, с.1379_1380insCGA и с.1951_1952delGGinsT связаны с тяжелой формой и инфантильным началом БП. Также был определен вариант с.2799+4A>G, патогенность которого неоднозначна. Данное изменение выявлено в компаунд-гетерозиготном состоянии с мутацией с.743T>C (p.Leu248Pro) и обнаружено у двух родных братьев с поздним началом и крайне мягкой формой БП.

В нашей группе пациентов тяжесть проявления заболевания коррелирует с характером мутаций в гене *GAA*, в связи с чем, анализ генотипа при БП является важным инструментом для прогнозирования клинического течения заболевания.

Разработка системы детекции точковых мутаций в гене *DMD* на основе NGS, пригодной для клинического использования

О.П. Рыжкова, Н.В. Комарова, А.Н. Логинова, А.В. Поляков

ФГБУ «МГНЦ» РАМН, Москва

Мышечная Дистрофия Дюшенна/Беккера (МДД/МДБ) – одно из самых частых наследственных заболеваний, встречающихся с частотой 1 на 3-3,5 тысячи новорожденных мальчиков. Ген *DMD* локализован на длинном плече X-хромосомы и является одним из самых протяженных генов (3mb). В связи с этим возникают существенные трудности при его молекулярно-генетическом исследовании.

В большинстве лабораторий в РФ проводится анализ только протяженных делеций/дупликаций в гене *DMD*, которые составляют около 70% всех мутаций. Еще треть составляют точковые замены, а так же небольшие делеции/дупликации, для которых не разработаны дешевые и эффективные подходы к анализу.

Целью данной работы стало создание системы детекции точковых мутаций в гене *DMD* на основе NGS, пригодной для клинического использования.

Нами были переработаны и улучшены протоколы исследования, представленные фирмами-производителями NGS-технологий. Так как в клинической практике необходимо максимально снизить возможную ошибку, мы ввели возможность визуального и технического контроля на всех этапах создания библиотек. Так же мы улучшили «выравнивание» концентраций конечных продуктов амплификации и унифицировали праймеры, для получения колоний фрагментов библиотеки на твердых носителях, что дает возможность более равномерного секвенирования фрагментов и меньшего разброса в их «покрытии». Нами был проведен дизайн собственных праймеров, что значительно снизило себестоимость исследования на образец и дало возможность дальнейшего адаптирования используемой методики для других исследований. Так же мы предусмотрели возможность расширения и улучшения предлагаемой нами системы.

В результате работы была создана и протестирована система детекции точковых мутаций методом NGS, включающая анализ генов *DMD*, *EMD*, *FHL1* и *LMNA A/C*.

Влияние нового водорастворимого производного фуллерена [C60], содержащего 3-фенилпропионильные заместители, на эмбриональные фибробласты легкого человека

Сергеева В.А.

ФГБУ «МГНЦ» РАМН, Москва

Растворимые в воде фуллерены - относительно новый класс соединений, который предполагается использовать для адресной доставки лекарств в клетки организма. Однако пока еще мало известно о влиянии на клетки человека этих производных. Мы впервые изучили влияние нового водорастворимого производного фуллерена C60, содержащего 3-фенилпропионильные заместители (F-828), на фибробласты легкого эмбриона человека. Обнаружено, что F-828 обладает слабой флуоресценцией в диапазоне длин волн 600-712 нм, что позволило детектировать его в митохондриях фибробластов.

Для оценки цитотоксичности F-828 использовали МТТ-тест, выявляющий относительное количество живых метаболически активных клеток, митохондриальные и цитоплазматические дегидрогеназы. F-828 токсичен для клеток при концентрациях выше 50 мкМ. При действии на фибробласты F-828 в нетоксичной концентрации наблюдали нелинейную зависимость количества метаболически активных клеток от концентрации фуллерена. Повышение активности митохондрий наблюдалось в интервале концентраций 10 – 30 мкМ.

Обнаружена нелинейная зависимость накопления в клетках маркера двунитевых разрывов – фосфорилированной формы гистона γ -H2AX, изменение экспрессии генов и транскрипционных факторов, отвечающих за репарацию ДНК, от концентрации F-828. В интервале концентраций 4 - 40 мкМ F-828 вызывает в клетках ответ на повреждение ДНК. Составляющими ответа являются активация p53 и снижение уровня экспрессии маркера пролиферации Ki-67, что объясняется блокированием процесса пролиферации. Показано усиление процесса репарации двунитевых разрывов ДНК в клетках: увеличение в 1,5 - 2 раза экспрессии генов *ATM*, *ATR* и *BRCA1*. В интервале концентраций F-828 10-40 мкМ увеличивалось количество маркера PCNA в клетках, что можно объяснить усилением процесса эксцизионной репарации ДНК. В ответе фибробластов на действие F-828 принимает участие фактор NF- κ B: увеличивается количество активной (фосфорилированной) формы белка p65 и происходит транслокация фактора в ядро клетки. В области концентраций, где проявляется максимальная активность митохондрий, наблюдается увеличение уровня экспрессии гена *NOX4* на уровне мРНК и белка. Снижаются количества белков, участвующих в процессах аутофагии (*LC3*, *beclin*), антиокислительном ответе (*NRF2*); снижается уровень экспрессии антиапоптотических генов *BCL2A1*, *BIRC2*, *BIRC3*, *BCL2*.

Возможная причина резких изменений в активности митохондрий при концентрациях F-828 от 4 до 40 мкМ может заключаться в изменении размера частиц фуллерена при увеличении его концентрации в среде культивирования клеток.

Вывод. Фуллерен C60 с 3-фенилпропионильными заместителями не является нейтральным соединением для клеток человека. В широком диапазоне концентраций это производное может вызывать усиление синтеза супероксиданиона ферментами семейства NOX, что приводит к возникновению двунитевых разрывов в ДНК ядер и развитию ответа клетки на повреждения (DNA damage response, DDR). Известно, что DDR может являться причиной хромосомных перестроек и ускоренного клеточного старения.

Геногеографический анализ тюркоязычного мира Евразии

Схаляхо Р.А.

ФГБУ «МГНЦ» РАМН, Москва

Народы тюркской группы, уже в историческое время расселившиеся на пространствах Евразии и смешавшиеся с дотюркским населением, представляют сложную проблему и для популяционной генетики, и для смежных наук.

Проведен геногеографический анализ генофонда тюрков трех регионов: кавказского, уральского и южносибирского. Выявлена значительная гетерогенность их генофондов. Показано, что родоплеменные популяции башкир имеют своеобразные «генетические портреты» по спектру гаплогрупп Y-хромосомы. Впервые проведен картографический анализ всей совокупности генофондов тюркоязычного мира Евразии с использованием оригинальной программы GeneGeo (рук. О.П. Балановский) и обширной информации о полиморфизме Y-хромосомы в населении Евразии «Y-base», содержащей почти все опубликованные и широкий массив неопубликованных данных лаборатории популяционной генетики МГНЦ РАМН и лаборатории геномной географии ИОГен РАН.

Генетические ландшафты карт генетических расстояний от шести историко-культурных провинций тюрков до всех популяций Евразии оказались чрезвычайно различны: тюрки больше похожи на своих географических соседей, чем на тюрков других провинций. Однако карта ландшафта генетических расстояний от Алтае-Саянских тюрков обнаружила определенное сходство с генетическими ландшафтами всех остальных историко-культурных провинций и картой расстояний от средних генетических параметров всех тюрков Евразии. Это указывает на сохранение малой части прототюркского генофонда в современном генофонде тюрков и подтверждает гипотезу, что Алтае-Саянский регион является основным кандидатом на звание прародины современных тюрков.

Проведено сопоставление полученных результатов по Y-хромосоме и аутосомного генома (результатов полногеномного анализа, полученных в рамках международного сотрудничества с Эстонским биоцентром). Итоги сравнения подтверждают модель доминирования элиты, объясняющую современное лингвистическое родство столь разнообразных тюркских народов. Согласно этой модели, вследствие распространения тюркских языков с численно малой «правлящей элитой» возникает наблюдаемый феномен тюрков: при большом генетическом сходстве со своими географическими соседями все тюркоязычные народы в той, или иной степени несут в себе гены древней прапопуляции, которая может служить кандидатом на роль основной «прототюркской» популяции.

Опыт применения секвенирования нового поколения для поиска мутаций при нейрофиброматозе

М.С. Чаплыгина, Е.Б. Кузнецова, В.В. Стрельников, А.С. Танас

ФГБУ «МГНЦ» РАМН, Москва

Нейрофиброматозы являются наследственными заболеваниями, относящимися к группе факоматозов. Чаще всего в популяции встречается нейрофиброматоз 1 типа (частота 1:2500-3000 новорождённых), и нейрофиброматоз 2 типа (частота 1 на 25000). Высокая частота встречаемости и необходимость дифференциальной диагностики для объективного медико-генетического консультирования обуславливает актуальность проведения эффективной молекулярной диагностики этих заболеваний.

Нейрофиброматоз 1 типа (NF1) и нейрофиброматоз 2 типа (NF2) – это аутосомно-доминантные заболевания, обусловленные мутациями генов *NF1* и *NF2*, расположенных на 17 и 22 хромосомах, соответственно.

Поиск мутаций осуществлялся с применением секвенирования нового поколения (NGS) на приборе Ion Torrent PGM (Life Technologies, США).

Нами был проведен скрининг мутаций в генах *NF1* и *NF2* у 69 больных, изменения обнаружены в 73% случаев (таблица 1).

Наряду с функционально значимыми мутациями (64%), нами в большом проценте случаев (36%) были обнаружены замены, локализованные в 3'- или 5'-нетранслируемых областях, а также в интронах исследуемых генов. Исходя из локализации, сделать однозначный вывод о влиянии этих нарушений на функцию гена сложно.

В случаях отсутствия мутаций или обнаружения структурных изменений с затрудненной интерпретацией в генах *NF1* и *NF2*, мы провели дополнительное исследование протяженных делеций методом MLPA. В результате у 4 (25%) из 16 больных определены делеции всего гена.

При сопоставлении подходов скрининга мутаций на основе методов SSCP и NGS, метод секвенирования нового поколения показал более высокую эффективность обнаружения мутаций (73%) и широкий спектр структурных изменений (таблица 1) по сравнению с методом SSCP (25%).

Мутации/ген	Ген <i>NF1</i>	Ген <i>NF2</i>
Миссенс-мутации	11	1
Нонсенс-мутации	11	2
Мутации сдвига рамки считывания	9	0
Мутация сайта сплайсинга	4	0
Однонуклеотидные замены в 3' нетранслируемых областях	0	8
Однонуклеотидные замены в 5' нетранслируемых областях	1	0
Однонуклеотидные замены в интронах до 110 нуклеотидов	9	3

Таблица 1. Спектр структурных изменений в генах *NF1* и *NF2*

Генофонд народов Передней Азии в контексте индоевропейской проблематики

Чухряева М.И.

ФГБУ «МГНЦ» РАМН, Москва

Передняя Азия (включающая Месопотамию, Аравию, Левант и Переднеазиатское нагорье, составленное тремя сегментами - Малоазиатским, Армянским и Иранским нагорьями), несмотря на преобладание горных и аридных ландшафтов, стала не только родиной древнейших государств, но и, согласно анатолийской гипотезе, прародиной индоевропейской языковой семьи. Отличается ли генофонд индоевропейских народов Передней Азии от соседних народов, говорящих на семитских и тюркских языках? Является ли географический ландшафт фактором формирования ландшафта генетического? Для ответа на эти вопросы мы изучили по SNP и STR маркерам Y-хромосомы генофонд народов Передней Азии, включив в анализ наряду со всей совокупностью накопленных литературных данных (более 4 000 индивидов) и новые собственные данные о пяти популяциях армян, охватывающих ареал исторической Армении (436 индивидов). График многомерного шкалирования выявил в Передней Азии две генетически резко отличные зоны: горную (приуроченную к Переднеазиатскому нагорью) и равнинную. Иерархический анализ межпопуляционной изменчивости (AMOVA) подтверждает эту закономерность - генетические различия между «горными» и «равнинными» популяциями в несколько раз выше дифференциации, полученной при использовании стандартных географических параметров широты и долготы. Многомерное шкалирование в контексте соседних регионов также выявляет единый кластер популяций Переднеазиатского нагорья, а внутри его - особый армянский субкластер. При этом географические соседи армян - грузины - отделились в другой (кавказский) кластер вместе с абхазами и большинством народов Северного Кавказа. Картографический анализ четко очерчивает эти ареалы - народы Северного Кавказа и грузины Закавказья генетически далеки от популяций Переднеазиатского нагорья, формирующих единую зону генетического сходства. При анализе генетической дифференциации популяций Передней Азии согласно лингвистической классификации выявлены значительные различия между генофондами народов, говорящих на тюркских, семитских и индоевропейских языках. Это позволяет говорить о том, что лингвистическая структура народов Передней Азии отражается и на структуре их генофонда. Индоевропейские народы - армяне и ираноязычное население Ирана - на графике многомерного шкалирования кластеризуются совместно, а семитоязычное население Передней Азии генетически далеко от них и образует отдельный кластер. Таким образом, несмотря на многочисленные эпизоды исторических миграций иноязычных народов, в генофонде индоевропейцев Передней Азии сохранились общие черты.

Исследование поддержано грантом РФФИ 13-04-01711