



КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ
ФГБУ «МГНЦ» РАМН

СБОРНИК ТЕЗИСОВ

30 октября 2013 г.

Конференц-зал

Федерального государственного бюджетного учреждения

«Медико-генетический научный центр»

Российской академии медицинских наук

Москва, ул. Москворечье, д. 1

Влияние хирургического вмешательства на экспрессию гена Об-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (*MGMT*)

Е.А. Алексеева, А.С. Танас

ФГБУ «МГНЦ» РАМН, Москва

Ген *MGMT* играет ключевую роль в устойчивости клеток опухоли к алкилирующим химиопрепаратам. Инактивация *MGMT* в результате генетических и эпигенетических изменений приводит к повышению чувствительности опухоли к алкилирующим агентам.

Современный стандарт лечения пациентов со злокачественными новообразованиями в большинстве случаев включает хирургическое вмешательство, проведение которого может отражаться на генной экспрессии. Показано, что хирургические манипуляции приводят к повышению экспрессии ряда генов, так называемых хирургически-индуцируемых. Целью данного исследования явилось изучение влияния хирургической операции на уровень экспрессии *MGMT*.

Образцы периферической крови до операции, во время операции и через 8 дней после операции получены от 10 пациентов, оперированных по поводу глиобластомы (ГБ), и от 10 пациенток, оперированных по поводу рака молочной железы (РМЖ).

Анализ экспрессии *MGMT* методом ПЦР в реальном времени показал у 10 исследованных пациентов, оперированных по поводу ГБ, повышение экспрессии мРНК *MGMT* в лимфоцитах крови в среднем почти в 3 раза уже в процессе операции по сравнению с экспрессией гена до операции. Анализ экспрессии гена *MGMT* через 8 дней после операции выявил дальнейшее повышение его экспрессии у 8 пациентов и снижение у 2 пациентов по сравнению с экспрессией во время операции.

В группе пациенток с РМЖ показано повышение экспрессии *MGMT* в процессе операции по сравнению с экспрессией гена до операции в 4 случаях, и снижение - в 6 случаях. Экспрессия *MGMT* через 8 дней после операции также показала неоднозначность динамики. Такие различия в картинах экспрессии *MGMT* у пациентов с ГБ и РМЖ могут быть связаны как с различиями в хирургических манипуляциях при ГБ и РМЖ, так и с влиянием гормонального фона у больных с РМЖ.

В настоящее время в клинической практике генетический статус *MGMT* является одним из наиболее важных прогностических маркеров ответа пациентов с ГБ на терапию алкилирующим препаратом темозоломидом. Широко применяемым подходом для оценки статуса *MGMT* является определение уровня его мРНК. Полученные нами результаты могут ставить вопрос об адекватности использования уровня экспрессии *MGMT* для оценки статуса гена в клинической практике, в связи с риском неправильного принятия решения об эффективности использования темозоломида при лечении конкретного пациента. Мы предполагаем, что более точными генетическими тестами, не зависящими от хирургического вмешательства, служат исследование метилирования промотора гена *MGMT* и делеций области его расположения на хромосоме 10q26.3.

**Изучение особенностей количественных профилей экспрессии и взаимодействий генов,
связанных с развитием светлоклеточного рака почки**

Н.В. Апанович¹, С.В. Поярков¹, А. С. Маркова², А. А. Коротаева¹, А. С. Бавыкин¹, В. П. Шубин¹, В.Б. Матвеев², А.В. Карпунин¹

¹ФГБУ “МГНЦ” РАМН, Москва;

²Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва,

Выявление генов, наиболее существенных для функционирования раковых клеток и прогрессии раковой опухоли, выяснение вопросов их регуляции и совместного функционирования, способно внести вклад в понимание особенностей функционирования генома человека и создания базы для разработки подходов к новым способам диагностики и прогноза развития опухолей. Рак почки является частым онкологическим заболеванием, характеризующимся плохим прогнозом. Наиболее распространенный тип – светлоклеточный рак почки. В настоящее время единая картина функциональной активности генов при светлоклеточном раке почки отсутствует, нет также единства в представлении об основной группе коэкспрессирующихся генов. Это может быть связано, в числе разных причин, и с межпопуляционной гетерогенностью профилей экспрессии.

В нашей работе использован подход, опирающийся на биоинформационный анализ накопленных данных по характеристикам экспрессии генов при светлоклеточном раке почки, полученных преимущественно с помощью микрочипов, с последующим количественным исследованием профилей экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Исследовано более 50 парных образцов опухоль-контроль. При анализе экспрессионных баз данных и публикаций выявлено 200 генов, экспрессирующихся в образцах опухоли в два раза выше, чем в нормальной ткани, в более 50% исследованных образцов. При экспериментальном исследовании экспрессии этих генов выявлен кластер 22 коэкспрессирующихся генов. Выявлен механизм совместной регуляции коэкспрессирующихся генов. Анализ регуляции транскрипции показал, что большинство этих генов регулируются одним геном - NIF1A. Это может являться основанием их коэкспрессии. В результате получена целостная картина, объединяющая экспериментально наблюдаемые характеристики экспрессии генов при светлоклеточном раке почки со вскрытием механизмов коэкспрессии и построением соответствующей генной сети. Найдена связь особенностей экспрессии выявленных генов с патологическими характеристиками опухоли. Выявленные гены по своей функции и роли в развитии рака могут быть маркерами прогноза, отражающими предрасположенность к агрессивному поведению опухоли.

Новая повторяющаяся протяженная делеция, включающая гены *GJB2* и *GJB6*, приводит к изолированному сенсоневральному нарушению слуха с аутосомно-рецессивным типом наследования

Е.А. Близнец¹, О.Н. Макиенко¹, Е.Г. Окунева¹, Т.Г. Маркова², А.В. Поляков¹

¹*ФГБУ “МГНЦ” РАМН, Москва;*

²*ФГБУН «Российский Научно-Практический Центр аудиологии и слухопротезирования ФМБА», Москва*

Наследственная тугоухость с аутосомно-рецессивным типом наследования генетического типа DFNB1, обусловленная мутациями в гене *GJB2*, является главной причиной врожденного несиндромального нарушения слуха в большинстве развитых стран мира, в том числе в России. Среди дефектов гена *GJB2* преобладают внутригенные точковые мутации, однако в отдельных популяциях, например, Испании, Великобритании, Франции, США, Бразилии, со значительной частотой встречаются и протяженные делеции в локусе DFNB1. Среди четырех известных протяженных делеций только одна затрагивает непосредственно последовательность гена *GJB2*, и описана в единственной семье. В данном сообщении описана и охарактеризована новая протяженная делеция последовательности генов *GJB2* и *GJB6* размером ~101 тыс.п.н. (NC_000013.10: g.20,757,021_20,858,394del), выявленная у трех неродственных российских пациентов. Предполагается ингушское происхождение данной мутации. Если новая делеция является частой, ее детекция очень важна для медико-генетического консультирования семей с наследственным нарушением слуха.

Анализ точковых мутаций в гене *SMN1* в выборке российских больных с диагнозом проксимальная спинальная мышечная атрофия I-IV типа с одной копией гена *SMN1*.

Забненкова В.В., Поляков А.В.

ФГБУ «МГНЦ» РАМН, Москва

Проксимальная спинальная мышечная атрофия (СМА) I-IV типа - тяжелое нейродегенеративное заболевание, характеризующееся развитием вялых симметричных параличей проксимальной мускулатуры с вовлечением в патологический процесс диафрагмы. Причиной заболевания являются мутации в гене *SMN1*, локализованном на хромосоме 5 в области инвертированного повтора. Ген *SMN1* имеет высокоомологичную копию – ген *SMN2*, изменения в котором не приводят к формированию фенотипа СМА. Оба гена кодируют один и тот же белок SMN (белок выживаемости мотонейронов), однако вследствие альтернативного сплайсинга экспрессия полноразмерного белка с гена *SMN2* составляет лишь 10%. Мажорной мутацией в гене *SMN1* является делеция экзонов 7 и/или 8 в гомозиготном состоянии, что встречается у 95% больных СМА. Остальные 5% пациентов представляют собой компаунд-гетерозиготы с делецией в одном аллеле и точковой мутацией - в другом.

Нами был проведен поиск точковых мутаций у пациентов НКО ФГБУ «МГНЦ» РАМН с направляющим диагнозом проксимальная СМА I-IV типа без делеции экзонов 7 и/или 8 гена *SMN1* в гомозиготном состоянии, но имеющих одну копию данного гена. Работа осуществлялась в два этапа.

На первом этапе проводили анализ минорных мутаций у больных с делецией гена *SMN2* в гомозиготном состоянии. Выборку составили 48 пациентов. Анализ числа копий гена *SMN1* проводили методом MLPA и с помощью ПДАФ-анализа внутригенных полиморфных маркеров: D5S1556 и GT-повтора, располагающегося в интроне 6 гена *SMN1*. Одна копия гена *SMN1* зарегистрирована у восьми пациентов, для которых и был проведен поиск точковых мутаций методом прямого автоматического секвенирования. В результате исследования изменений не выявлено. Возможно, наличие одной копии гена *SMN1* с минорной мутацией в сочетании с делецией гена *SMN2* является летальным вариантом. И такие больные не рождаются или погибают сразу после рождения.

На втором этапе поиск мутаций проводился у 13 пациентов с одной копией гена *SMN1* при наличии гена *SMN2*. При проведении прямого автоматического секвенирования у семи больных выявлено шесть точковых мутаций, описанных ранее: с.43C>T (p.Gln15X), с.815A>G (p.Tyr272Cys), с.821C>T (p.Thr274Ile), с.824G>C (p.Gly275Ala), с.835-2A>T, с.836G>T (p.Gly279Val). Мутация с.824G>C (p.Gly275Ala) встретилась дважды.

**Результаты исследования пациентов с подозрением на синдромы,
обусловленные микроделецией 22q11.2**

Ю.О. Козлова

ФГБУ «МГНЦ» РАМН, Москва

В работе представлены результаты клинического, цитогенетического, молекулярного и молекулярно-цитогенетического исследований пациентов, с подозрением на делецию локуса q11.2 хромосомы 22. С 2010 по 2012 гг. согласно разработанной авторами анкете было отобрано и проведено исследование 140 пробандов с фенотипом, характерным для синдромов делеции 22q11.2 (СД22q11.2). У всех пациентов были врожденные пороки сердца, в т.ч. конотрункальные, типичные для СД22q11.2 лицевые дисморфии, а также некоторые другие характерные фенотипические признаки. У всех пациентов исследовался кариотип GTG-методом: 6 случаев, где были выявлены числовые или структурные хромосомные aberrации, были исключены из исследования. В остальных 134 случаях пациентам с нормальным кариотипом было проведено FISH исследование с ДНК-зондом TUPLE1/ARSA (Abbott Molecular), которое позволило выявить микроделецию 22q11.2 в 43 случаях, что составило 32%. Для уточнения размеров делеции, а также поиска атипичных, более дистально расположенных, делеций 77 пациентам, исследованным ранее методом FISH, было проведено дополнительное исследование методом MLPA с набором P250-B1 DiGeorge Syndrome (MRC-Holland). В набор MLPA кроме локуса 22q11.2 включены локусы других хромосом - 4q34-qter, 8p23, 9q34.3, 10p14, 17p13.3, 22q13, aberrации в которых вызывают клиническую картину, схожую с таковой при делеции 22q11.2. Методом MLPA в 28 исследованных образцах была выявлена делеция 22q11.2, в 49 случаях ее не было. Результаты исследования показали полное совпадение диагностики делеции 22q11.2 методом FISH и MLPA и позволили установить размеры всех делеций. Самой частой в нашей выборке была делеция LRC22-A-B-C, которая встретилась в 22 случаях (79%), делеция LRC22-A-B выявлена в 4 случаях (14%), делеции LRC22-A и LRC22-A-B-C-D по одному случаю (по 3,5%). Не было обнаружено и делеций в других локусах хромосом, включенных в набор MLPA. Неясным оставалось наличие характерной клинической картиной синдрома у пациентов без делеции. В целях обнаружения возможной более мелкой мутации внутри главного гена *TBX1* 11 пациентам было проведено исследование методом прямого автоматического секвенирования по Сенгеру на приборе ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). Для мутационного анализа синтезированы праймеры, соответствующие последовательности альтернативного транскрипта гена *TBX1-TBX1C*. В результате исследования изменений нуклеотидной последовательности в гене *TBX1*, имеющих клиническую значимость, не выявлено. Зарегистрировано несколько частых полиморфизмов.

Эффективность лентивирусной трансдукции спонтанно трансформированных мультипотентных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани (ММСК ЖТ) человека.

Омельченко Д.О., Ржанинова А.А., Федюнина И.А., Ратушный А.Ю., Гольдштейн Д.В.

ФГБУ «МГНЦ» РАМН, Москва

В нашей лаборатории были получены культуры мультипотентных мезенхимных стромальных клеток из жировой (ММСК ЖТ) ткани здоровых доноров, часть из которых обладала характерными свойствами клеток, претерпевших неопластическую трансформацию. Полученные из этих клеток культуры являются новым и перспективным объектом для исследований неопластической трансформации ММСК человека. Исследование эффективности лентивирусной трансдукции и стабильности экспрессии трансгена при длительном ведении культур необходимо для использования данных клеток в исследованиях фундаментального и практического характера, где нужна постоянная генетическая модификация клеток. В данной работе мы провели исследование способности спонтанно трансформированных ММСК ЖТ к стабильной трансдукции лентивирусом с геном репортерного белка TagGFP2. Был разработан протокол для эффективной трансдукции клеток. Также проведена оценка стабильности трансгена и продукции белка TagGFP2 при длительном культивировании.

Клетки трансдуцировали лентивирусными частицами LVT-TagGFP2 (Евроген, Россия), содержащими ген флуоресцентного белка TagGFP2 под контролем промотора EF1 α . Наблюдали за культурами с помощью флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии. Селекцию клеток проводили с помощью антибиотика G418 в диапазоне доз 100-1200 мкг/мл в течении 2-х недель, а также изоляцией моноклональных культур трансфицированных клеток. Для определения копийности трансгена применяли метод количественного ПЦР в реальном времени. Продуктивность трансгена оценивали методом количественного измерения белка TagGFP2 с помощью флуориметрии лизатов клеток на планшетном ридере. Клетки наблюдали в течение 25 пассажей (~6 месяцев).

Результаты исследования показали, что при 50 MOI достигается эффективная трансдукция >90% клеток. Копийность трансгена в культурах после селекции антибиотиком находится на уровне 25-30 копий/кл, в моноклональных культурах копийность растет с пассированием, вплоть до 55 копий/кл в некоторых культурах к 25-му пассажу. Уровень продукции белка на ранних пассажах колеблется, но к 25 пассажу выравнивается по всем культурам и в среднем составляет 1 мкг/млн. клеток.

Случаи аутосомно-рецессивной патологии при направляющем диагнозе

«миодистрофия Дюшенна/Беккера»

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

ФГБУ «МГНЦ» РАМН, Москва

Миодистрофия Дюшенна/Беккера (МДД/Б) одно из самых распространенных и изученных наследственных заболеваний. Впервые его описал Дюшенн в 1853 г. В 1955 г. Беккер и Кинер описали его аллельную форму с более доброкачественным течением – миодистрофию Беккера. Заболевание встречается с частотой 1 : 3.500 новорожденных мальчиков и относится к поясно-конечностным мышечным дистрофиям (ПКМД). Несмотря на накопленные за эти годы знания, до сих пор нет критериев, на основании которых можно было бы однозначно поставить диагноз только на клиническом уровне. Целью данной работы явился генетический анализ частых форм ПКМД и СМА в выборке больных мальчиков с направляющим диагнозом миодистрофия Дюшенна/Беккера. Материалом для исследования стали ДНК 1355 пробандов из неродственных семей с направляющим диагнозом МДД/Б, а так же ДНК 791 неродственного жителя различных регионов РФ в качестве популяционной выборки. Было показано, что частые делеции гена *DMD* (Pm, 3, 4, 6, 8, 13, 17, 19, 32, 42-45, 47, 48, 50-53, 60 экзоны) обнаруживаются менее, чем у половины (40,6%) пациентов. У 2,7% пациентов выявляются мутации в гене *CAPN3*, приводящие к развитию ПКМД2А, у 1,8% в гене *SMN1*, приводящие к СМА и у 0,7% в гене *FKRP*, приводящие к ПКМД2I типа. Используемыми молекулярно-генетическими методами диагноз не был поставлен в 54,3% случаев. Таким образом, в выборке мальчиков с направляющим диагнозом МДД/Б более чем в 5 % случаев выявляется другая форма мышечной дистрофии. В выборке больных без мутаций в гене *DMD* данная вероятность составляет не менее 8,6%. В группе с входящим диагнозом Дюшенн частоты исследованных мышечных дистрофий распределились следующим образом: ПКМД2А – 0,7%, СМА – 0,9%, ПКМД2I – 1,1%. В группе с входящим диагнозом Дюшенн без мутаций в гене *DMD* вероятность выявления данных дистрофий составила 5%. В группе с входящим диагнозом Беккер частоты других форм мышечных дистрофий составили: ПКМД2А – 13,8%, СМА – 3,8%, ПКМД2I – 2,3%. В группе с входящим диагнозом Беккер без мутаций в гене *DMD* вероятность выявления данных дистрофий составила 30,7%. Таким образом, если у пациента с клиническим диагнозом МДД/Б не обнаружено мутаций в гене *DMD*, необходимо дальнейшее молекулярно-генетическое исследование генов, приводящих к распространенным формам ПКМД и СМА.

Определение статуса метилирования генов белков внеклеточного матрикса и их рецепторов в норме и при раке молочной железы

Симонова О.А., Кузнецова Е.Б.

ФГБУ «МГНЦ» РАМН, Москва

Белки внеклеточного матрикса (ВКМ) крайне необходимы для регуляции тканевого морфогенеза и гомеостаза путем модуляции тканевой архитектуры, клеточной адгезии и миграции. Одними из главных структурно-функциональных компонентов ВКМ являются белки семейства ламининов. Изменение экспрессии ламининов было показано для различного типа патологических состояний, в том числе и онкологических.

Наше исследование, посвященное изучению статуса метилирования 12 промоторных областей генов субъединиц ламининов при раке молочной железы, позволило классифицировать их на 3 группы:

1) гены, конститутивно метилированные в ткани молочной железы: *LAMB2*, *LAMA3A*, *LAMB3* и *LAMC2* (результаты исследований данной группы были подробно представлены на конференции молодых ученых ФГБУ «МГНЦ» РАМН – 2011).

2) гены, не показавшие значимых частот метилирования при РМЖ: *LAMA4*, *LAMA5*, *LAMB1*, *LAMB3*, *LAMC1*, *LAMC3*.

3) гены, аномально метилированные при РМЖ: *LAMA1*, *LAMA2*.

Частота метилирования промоторной области гена *LAMA1* (продукт которого критически важен для морфогенеза молочной железы) составила 34,9 % (37/106) а гена *LAMA2* – 41,5% (44/106). Несмотря на отсутствие статистически достоверных корреляций между метилированием этих генов и характеристиками опухолевого процесса, невозможно не отметить опухолеспецифичность их метилированного состояния.

Для составления более полной картины межмолекулярных взаимодействий, происходящих в ткани при РМЖ, нами были выбраны 9 генов интегринов, 2 гена нидогенов и 1 ген дистрогликана, продукты которых взаимодействуют с белками *LAMA1* и *LAMA2*, а также 3 гена кадгерина (кадгерины E, P и N). Анализ метилирования промоторных областей вышеуказанных генов позволил выявить закономерность совместного появления метилированных последовательностей в различных комбинациях. При этом наибольшую частоту метилирования продемонстрировали гены интегринов (*ITGA1*, *ITGA3*, *ITGA4*, *ITGA9*, *ITGB1*, *ITGB4*), нидогенов (*NID1*, *NID2*) а так же P- и N-кадгеринов. Подобное увеличение груза эпигенетической патологии, носящее системный характер, может свидетельствовать о критическом процессе, происходящем у ряда больных РМЖ, направленном на дисрегуляцию межклеточных взаимодействий и способствующем прогрессии опухоли.

XmaI-RRBS – первый протокол бисульфитного секвенирования ограниченных выборок для персонального геномного секвенатора Ion Torrent

Танас А.С., Борисова М.Э.

ФГБУ «МГНЦ» РАМН, Москва

RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing, бисульфитное секвенирование ограниченных выборок локусов) – высокопроизводительный метод анализа метиломов с разрешением до одного нуклеотида. Разработанные ранее протоколы подготовки библиотек фрагментов ДНК, обработанной бисульфитом натрия, для платформ Illumina и SOLID, слишком дороги для проведения массовых биомедицинских исследований. Разработка протокола RRBS для персонального геномного секвенатора Ion Torrent необходима для проведения исследований, включающих скрининг метилирования в CpG-островках в значительных выборках биологического материала (в первую очередь в области онкологии).

На первом этапе исследования разработан способ эффективного сокращения размера библиотеки без значительной потери представляющих интерес локусов CpG-островков. В оригинальном протоколе RRBS используется эндонуклеаза MspI (нечувствительный к метилированию изошизомер HpaII). Мы предположили возможность существования эндонуклеаз, сайт узнавания которых более специфичен последовательности CpG-островков генома человека. Для проверки этой гипотезы разработана компьютерная программа ReMark (<http://www.epigenetic.ru/projects/remark>), рассчитывающая оценку сайта узнавания эндонуклеазы – логарифм отношения правдоподобия сайта узнавания эндонуклеазы в моделях интересующей и избегаемой последовательностей, заданных цепями Маркова первого порядка (частоты динуклеотидов). Оценка ReMark для MspI составила 3,7. В базе данных рестриктаз REBASE выявлено 36 сайтов узнавания с более высокой оценкой ReMark (до 13,0), потенциально более специфичных последовательности CpG-островков человека. Большинство эндонуклеаз с высокой оценкой чувствительны к метилированию CpG-пар. В настоящее время единственной, нечувствительной к метилированию CpG-пар, эндонуклеазой с оценкой ReMark большей, чем у MspI, является XmaI (4,7). *In silico* определен оптимальный спектр длин фрагментов для подготовки библиотеки XmaI-RRBS – 110-200 п.н. При секвенировании такой библиотеки будут получены данные о состоянии более 110000 CpG-пар, из которых более 80000 находятся в составе CpG-островков.

В порядке апробации разработанного протокола получены данные о метилировании ДНК в клеточной линии рака молочной железы MCF7 и нормальной ткани молочной железы. Сравнение с данными MCF7, полученными в проекте ENCODE стандартным методом RRBS, показало высокую корреляцию (коэффициент Пирсона 0,89-0,92 – при сравнении с данными различных университетов, корреляция между университетами – 0,92-0,94). Значения коэффициента корреляции Пирсона при сравнении данных по нормальной ткани молочной железы составили 0,81-0,85, что может быть объяснено индивидуальными различиями профиля метилирования ДНК.