

Геномное
секвенирование

|2015
NGS

СБОРНИК ТЕЗИСОВ

3-ей Всероссийской научно-практической конференции
по геномному секвенированию

14 мая 2015 года
Москва

Конференция поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, проект No.15-04-20037

Электронный вариант тезисов: <http://ngsconference.ru/archive/2015>

ISBN 978-5-9906541-0-5

Программный комитет конференции:

Дмитрий Алексеев (НИИ ФХМ)
Михаил Гельфанд (ИППИ РАН)
Сергей Лукьянов (ИБХ РАН)
Всеволод Макеев (ИОГен РАН)
Николай Равин (Центр "Биоинженерия" РАН)
Денис Ребриков (ДНК-Технология)
Евгений Рогов (UMASS Medical School)
Николай Янковский (ИОГен РАН)

Организационный комитет конференции:

Дмитрий Коростин (НЦАГиП им.Кулакова)
Сергей Лукьянов (ИБХ РАН)
Денис Ребриков (ДНК-Технология)

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА NGS ПРИ АНАЛИЗЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ФИТОВИРУСОВ С СЕГМЕНТИРОВАННЫМ +РНК-ГЕНОМОМ

*Т.В. Гасанова, Е.В. Скурат, П.А. Иванов
Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва
e-mail: tv.gasanova@genebee.msu.ru*

Метод NGS имеет значительные преимущества при изучении смешанных инфекций, анализе спектра растений-хозяев без выделения вирусных препаратов. Для определения видов, их филогенетических взаимосвязей метод NGS также применим, за исключением прочтения концевых участков геномных РНК. Для корректного отображения в базах данных требуется дополнительное определение 5'- и 3'-концевых участков. Таким образом, последовательности, определенные с помощью NGS, могут быть охарактеризованы только как "near complete". Ранее методом NGS был охарактеризован прибалтийский изолят нового вируса Gayfeather mild mottle virus (GfMMV), принадлежащего к роду Cucumovirus семейства Bromoviridae. В нашей лаборатории были определены последовательности трех геномных РНК нового московского изолята GfMMV, выделенного из растений *Arctium lappa*, при этом было обнаружено существенное расхождение по концевым участкам всех сегментов генома с опубликованными данными GenBank. Сравнение последовательностей репликативных генов выявило уровень гомологии 99,1%-99,5%. Филогенетический анализ кукумовирусов позволил показать раннее ответвление GfMMV от других вирусов данной группы. Несмотря на существенную разницу в географическом положении, разные изоляты имеют высокую степень гомологии, при этом не удается выявить отдельные штаммы или клады, что может быть связано как с недостаточностью материала для анализа, так и высокой консервативностью данного вида. Основным ограничением метода является необходимость использования конвенционального секвенирования концевых последовательностей. Также, NGS не позволяет определять последовательности сателлитных РНК, характерных для данной группы вирусов и существенно влияющих на развитие инфекции, а также не дает возможности анализировать инкапсулируемые субгеномные РНК.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНОМА ЭКСТРЕМАЛЬНО АЦИДОФИЛЬНОЙ АРХЕИ *ACIDIPLASMA SP. MBA-1*.

А.Г. Булаев¹, А.В. Каньгина²

¹ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва

² Московский физико-технический институт, Москва

e-mail: bulaev.inmi@yandex.ru

Археи р. *Acidiplasma* являются одной из доминирующих групп микроорганизмов в процессах биоокисления сульфидных руд. Представители р. *Acidiplasma* – полиэкстремофильные микроорганизмы: умеренные термофилы, устойчивые к низким значениям pH (до 0). Исследование их метаболизма и филогении в т.ч. с помощью методов NGS, представляется интересным для фундаментальной науки и биотехнологии, но геномы представителей *Acidiplasma* не были секвенированы. Объектом исследования являлся штамм *Acidiplasma sp. MBA-1*, для которого впервые для сем. *Ferroplasmaceae* была показано окисление серы. Секвенирование проводилось на платформе MiSeq (Illumina Inc). Сборку генома и аннотацию проводили с помощью программного обеспечения MIRA 4.0 и Prokka 1.7. Размер генома штамма составлял 1747 т.п.н., количество CDS – 1823. Геном штамма *Acidiplasma sp. MBA-1* был депонирован в GenBank под номером JYHS00000000 (версия JYHS01000000). В геноме штамма обнаружен ген, кодирующий медьсодержащий белок сульфоцианин – ключевой белок ЭТЦ окисления двухвалентного железа, обнаруженный у железоокисляющих архей филумов *Crenarchaeota* и *Euryarchaeota*, гены белков окисления соединений серы (оксидоредуктаза серы, сульфат-аденилилтрансфераза, сульфид-дегидрогеназа (SoxB)), а также гены ферментов катаболизма различных органических соединений и гены устойчивости к мышьяку. Исследование геномики представителей рода *Acidiplasma* может позволить пересмотреть систематику рода, так как описанные виды (*A. aeolicum* и *A. cupricumulans*) идентичны по последовательности гена 16S рРНК и разделены на основании ДНК-ДНК гибридизации, которая является методом с низкой воспроизводимостью результатов. Секвенирование проводилось ООО «Генотек». Исследование выполнено при поддержке РФФИ в рамках проекта № 14-04-31210 мол_а.

ПОЛНОГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ В ИССЛЕДОВАНИИ АДАПТИВНЫХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Е.И. Аксенова, О.Л. Воронина, М.С. Кунда, Н.Н. Рыжова, А.Н. Семенов, А.Л. Гинцбург
Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва
e-mail: aks16@bk.ru

Listeria monocytogenes – возбудитель листериоза, второй по смертности пищевой инфекции после сальмонеллеза. В контроле *L. monocytogenes* в природных очагах и продуктах эффективны методы мультилокусного секвенирования (MLST), в том числе, локусов факторов вирулентности. Близкородственные по данным MLST штаммы, выделенные из разных организмов-хозяев, были проанализированы с помощью полногеномного секвенирования (WGS) с целью выявления генов, отвечающих за адаптацию. Штаммы *L. monocytogenes* VIMVR081 (генотип, sequence type, ST145) (красная полевка, Приморский край) и VIMHA007 (ST2) (мертворожденный, Хабаровский край) секвенировали на платформе 454 Roche и аннотировали с помощью сервера RAST. В качестве референса использовали геном штамма ATCC 1911 (accession FR733643) ST2, выделенного от овцы. ST145 и ST2 – варианты по одному локусу аллельного профиля. Профили интерналинов у выбранных штаммов были идентичны. Результаты WGS подтвердили высокую консервативность геномов *L. monocytogenes*. Полностью сходны даже мобильные элементы геномов (IS, семейства IS3, и профаг, включающий, в том числе, гены лизина и антигена В). 96,3% кодируемых белков идентичны у штаммов VIMVR081 и ATCC 1911. Замены аминокислотных остатков выявлены в 87 белках: в 66 – консервативные, и только в 17 – радикальные. Это белки, участвующие в метаболизме углеводов (три из них кодирует оперон транспорта мальтозы), входящие в транспортные системы, отвечающие за устойчивость к пенициллину или относящиеся к факторам вирулентности. Таким образом, только WGS позволяет выявить замены в консервативном геноме *L. monocytogenes*, обеспечивающие адаптацию к определенному организму-хозяину.

ПОЛНОГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ДВУХ ШТАММОВ *NEISSERIA GONORRHOEAЕ* С НИЗКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ К ЦЕФТРИАКСОНУ

Д.В. Воробьев, А.В. Рунина, О.С. Кожушина, О.А. Образцова
Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии
Минздрава России, Москва
e-mail: v.denis083@gmail.com

Гонококковая инфекция, вызываемая *Neisseria gonorrhoeae*, относится к числу социально значимых инфекций, передаваемых половым путем. Для исследования были отобраны два мультирезистентных штамма *N. gonorrhoeae*, имеющие признаки резистентности к цефтриаксону (препарат выбора в настоящее время). Целью исследования являлось выявление неизвестных генов и мутаций, которые могут влиять на устойчивость *Neisseria gonorrhoeae* к β -лактамам антибиотикам, тетрациклинам, аминогликозидам и макролидам. Для полногеномного секвенирования было получено по 500 мкг ДНК каждого штамма. Для определения нуклеотидной последовательности ДНК исследуемых штаммов использовали секвенатор нового поколения GS-Junior (фирма Roche, Швейцария) с технологией пиросеквенирования. Процесс секвенирования проводили согласно протоколу, рекомендуемому производителем (www.454.com). Для сборки секвенированных геномов использовалась программа DeNovoAssembler (Newbler, Швейцария). В результате сборки генома первого штамма было получено 1119 контигов с N50=1543 нуклеотида. Общее количество нуклеотидов в результате сборки составило 1.6 млн. В результате сборки генома второго штамма получено 814 контигов с N50=2385 нуклеотида. Общее количество нуклеотидов в результате сборки составило 1.9 млн. Сравнение последовательностей изучаемых штаммов *N. gonorrhoeae* с референсной последовательностью *N. gonorrhoeae* NCCP11945 с использованием сервера RAST/SEED Viewer выявило различия в репертуаре открытых рамок считывания (ОРС). В исследовании мы обратили особое внимание на те возможные ОРС, которые, предположительно, связаны с развитием устойчивости к цефтриаксону. В результате проведенного исследования были выявлены несколько ОРС, которые потенциально могут влиять на развитие резистентности штаммов *N. gonorrhoeae* к антимикробным препаратам. Это мутации в генах, связанных с РНК-полимеразой (вливают на устойчивость к эритромицину и рифампицину), карбогидрат киназой (возможное развитие признаков устойчивости к цефтриаксону) и 5S рибосомальным белком (вливают на устойчивость к спектиномицину). Следует заметить, что анализ мутаций в 5S рибосомальном белке может помочь понять механизмы развития резистентности не только к спектиномицину, но и к цефтриаксону. Возможно, имеется связь в механизмах развития устойчивости к цефтриаксону и чувствительности к спектиномицину.

ДОКАЗАТЕЛЬСТВА АДАПТИВНОСТИ И ВИРУЛЕНТНОСТЬ ТРАНСМИССИВНОГО ШТАММА *ACHROMOBACTER RUHLANDII* ST36.

М.С. Кунда, О.Л. Воронина, Е.И. Аксенова, Н.Н. Рыжова,
А.Н. Семенов, А.Л. Гинцбург
Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и
микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва
e-mail: markunda@mail.ru

Achromobacter sp. - условно-патогенные микроорганизмы, вызывающие внутрибольничные инфекции и поражающие дыхательные пути больных муковисцидозом (МВ) в 23% случаев в выборке тяжелых пациентов. Наиболее опасен *A. ruhlandii* ST36, являющийся трансмиссивным. Для изучения особенностей этого генотипа было использовано полногеномное секвенирование. *A. ruhlandii* SCCH3:Ach 33-1365 (AR SCCH3) ST36 секвенирован по технологии 454 Roche на приборе GS Junior. Первичная аннотация проведена с помощью сервера RAST. Результаты секвенирования выявили высокий адаптивный потенциал AR SCCH3, в геноме которого обнаружено 19 IS элементов семейств IS3, Tn3, IS256, IS66 и IS5; 7 последовательностей CRISPR, обеспечивающих, в том числе, протективные свойства; 5 фагов, аналогичных фагам протеобактерий. Сравнение с доступным референсным геномом близкородственного вида *A. xylosoxidans* C54, CP009448, (AX C54) показало рекомбинацию 4-х протяженных участков генома (206793 - 349722 п.н.). Все проанализированные участки содержали гены белков основного метаболизма и белков, отвечающих за адаптацию микробной клетки. В протеоме AR SCCH3 по сравнению с AX C54 обнаружено 507 дополнительных белков, как ферментов, расширяющих источники получения энергии, так и белков, связанных с формированием вирулентности AR SCCH3 (бета-лактамазы, белки системы токсин/антитоксин; обеспечивающие устойчивость к соединениям хрома, коллаген-подобный поверхностный белок ScIB, отвечающий за адгезию бактериальной клетки к клеткам хозяина). Таким образом, полногеномное секвенирование позволило выявить отличительные особенности *A. ruhlandii* SCCH3:Ach 33-1365, отвечающие за формирование адаптивности и вирулентности этого трансмиссивного штамма.

АНАЛИЗ ДНК КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ПО ГЕНАМ ВИРУЛЕНТНОСТИ И ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ МЕТОДОМ МУЛЬТИЛОКУСНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Ю.О. Белай, М.В. Зайчикова
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва
e-mail: yazva8@yandex.ru

Цель работы - изучение разнообразия мутаций в генах, вовлеченных в формирование лекарственной устойчивости, а также оказывающих влияние на вирулентность возбудителя туберкулеза, в коллекции геномной ДНК 30-ти клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis* методом мультилокусного секвенирования (МЛС). Изоляты подразделены на три группы, в зависимости от сложности противотуберкулезной терапии. В работе изучались последовательности четырех генов *M.tuberculosis*. Гены *rpсA* и *inhA*, участвующие в формировании устойчивости к пиразинамиду и изониазиду соответственно. Гены *rv0624* и *rv0549с* принадлежат к семейству токсин-антитоксин и потенциально вовлечены в формирование покоящегося состояния, способствующего накоплению мутаций устойчивости. В задачи работы входит изучение соотношения выявленных мутаций с наличием или отсутствием устойчивости к противотуберкулезным препаратам в различных группах изолятов. В результате было отмечено, что гены *rv0624* и *rv0549с* не несут изменений ни у одного из 30-ти изолятов, что может говорить о незначительном вкладе этих генов в формировании лекарственной устойчивости. Мутации в гене *inhA* выявлены у двух устойчивых к изониазиду изолятов, вероятной причиной чего является факт наличия ряда генов с аналогичной функцией. На фоне большого количества выявленных мутаций *rpсA* замечена корреляция между наличием мутации и устойчивости к пиразинамиду у конкретных штаммов. Полученные данные подтверждают ожидаемую связь между характеристикой группы изолятов и числом мутантных по *rpсA* изолятов на группу. Метод МЛС позволил получить данные о точной локализации мутаций и обнаружить ранее не описанные мутации. Результаты работы подтверждают оправданность и значимость использования высокоразрешающего метода МЛС, как метода молекулярной диагностики туберкулеза.

ИЗУЧЕНИЕ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПРОКАРИОТ В АССОЦИАЦИЯХ С ПРОСТЕЙШИМИ МЕТОДОМ 16S МЕТАГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Е.А. Герасимова¹, Н.Е. Гоголева², А.О. Плотников¹

¹Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского
отделения РАН, Оренбург

²Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра
РАН, Казань
e-mail: ea-ermolenko@yandex.ru

В настоящее время проблема персистенции бактерий в ассоциациях со свободноживущими простейшими находится в центре внимания экологов и медиков в связи с обнаружением условно-патогенных и патогенных микроорганизмов в сообществах с инфузориями, амебами и жгутиконосцами. Наиболее перспективным в этом плане представляется применение высокочувствительных и специфичных методов NGS. В связи с этим мы оценили филогенетическую структуру прокариот в сообществе со свободноживущей инфузорией *Paramecium calkinsi*. Для этого отдельные клетки инфузорий отсаживали под микроскопом из водной пробы в чистую среду, путем пересадки трижды отмывали от внеклеточных бактерий и получали лизат с помощью гомогенизатора TissueLyser. В дальнейшем с применением праймеров к гену 16S и к гипервариабельной области V3-V4 в nested ПЦП получали ампликоны, которые очищали и анализировали на приборе MiSeq (Illumina). Для 10 образцов было определено 750767 последовательностей: от 37257 до 141396 на образец. Полученные риды попарно соединяли, подвергали фильтрации по качеству, проверяли на химерные последовательности и группировали в OTE на уровне рода и вида с помощью пакетов PrinSeq, USEARCH и базы NCBI GenBank. Во всех образцах было выявлено преимущественное доминирование трех филумов *Proteobacteria*, *Firmicutes* и *Actinobacteria* внутри домена *Bacteria*, охватывающего более 95% всех ридов. Рассматривая видовой состав бактерий-ассоциантов, следует отметить таких представителей как *Acinetobacter baumannii*, *A. baylyi*, *A. gernerii*, *Bacillus butanolivorans*, *Sphingopyxis chilensis*, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Aminobacter aminovorans*, *Staphylococcus fleuretii*, *S. vitulinus*. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 14-04-01796.

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОВЛИЯНИЯ СОСТАВА КОНСОРЦИУМОВ КИШЕЧНИКА И ПАРОДОНТА МЕТОДАМИ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

А.Б. Шевелев¹, А.В. Шибаяева², Н.Б. Петрухина³, О.А. Зорина³, Е.В. Трубникова⁴,
Ю.К. Кудыкина¹, А.Ю. Сунцова⁵, Е.О. Болдинова⁴, Е.В. Шубина⁶, Д.В. Ребриков⁵

¹Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им.М.П. Чумакова, Москва

²Институт биохимической физики им. Н.М.Эмануэля РАН, Москва

³Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и
челюстно-лицевой хирургии Минздрава России, Москва

⁴Курский государственный университет, Курск

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

⁶Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им.

В.И.Кулакова Минздрава России, Москва

e-mail: anna-shiba@mail.ru

Врачами-практиками замечена тенденция к более тяжелому течению пародонтита у пациентов с воспалительными заболеваниями желудочно-кишечного тракта. Однако природа этой связи остается невыясненной. Можно предполагать как взаимовлияние микробиомов различных слизистых, так и действие системных факторов организма, влияющих на состав микробных консорциумов. Задачей работы было с применением секвенирования 16S-рДНК на платформе Illumina MiSeq исследовать корреляции в составе консорциумов пародонта и кишечника в норме и патологии. Проведено обследование выборки парных образцов смывов пародонта и образцов фекалий от 10 пациентов, включая 3 полностью здоровых, 3 пациентов с агрессивным пародонтитом и 4 пациентов с хроническим пародонтитом. Установлено, что при сравнении пациентов с пораженным и здоровым пародонтом состав микробиома кишечника достоверно отличается. Установлены следующие закономерности: 1. Роды *Akkermansia*, *Thalassospira*, *Oxalobacter*, *Gracilibacter*, *Fibrobacter* и *Howardella* представлены в фекалиях лиц со здоровым пародонтом в (соответственно) 200, 100, 90, 50, 30 и 25 раз большей концентрации, чем в фекалиях пациентов с воспалительными поражениями пародонта. Они могут рассматриваться как потенциальные энтеропротекторы системного действия. 2. Со здоровым пародонтом ассоциирована повышенная доля на нем следующих бактерий: *Veillonella parvula*, новый вид рода *Veillonella*, *Streptococcus sanguinis*, *Aggregatibacter segnis*, *Aggregatibacter aphrophilus*, *Prevotella salivae*, *Campylobacter concisus*, *Treponema vancouverii*, *Neisseria subflava*, роды *Megasphaera*, *Alysiella*, *Comamonas*. В этой группе присутствуют таксономические родственники опасных пародонтопатогенов *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, и возбудителя гастроэнтерита *Campylobacter jejuni*.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОВОГО СОСТАВА МИКРОБИОЦЕНОЗОВ МЕТОДАМИ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

К.Ю. Цуканов, Д.И. Борисевич
Genotek Inc, Москва
e-mail: tsukanoffkirill@gmail.com

Видовые составы многих микробиоценозов Земли, особенно в удаленных локациях, практически не изучены. Известно, что бактерии и вирусы, из которых идентифицирована лишь крайне незначительная часть, играют важнейшую роль во всех популяциях. Эти организмы трудно анализировать и при этом они нередко подвержены быстрой и часто совместной эволюции, поэтому микробиоценозы отличаются значительно большим разнообразием. Изучение существующих микробиоценозов представляет собой важную задачу. Современные методы метагеномного секвенирования позволяют получить информацию сразу о всём биоценозе за один проход, при этом не требуется обладать какой-либо информацией о нём заранее. Однако существует проблема интерпретации получаемых объемов данных в терминах видового состава. Подходящего пайплайна для подобного анализа, который бы работал в общем случае, нами не было обнаружено. Разработка такого пайплайна могла бы быть полезна для изучения видового разнообразия с помощью методов секвенирования нового поколения. Нами обработаны данные метагеномного секвенирования образцов воды пресного озера. Собраны *de novo* и проанализированы контиги, произведен поиск в базах данных нуклеотидных и белковых последовательностей. Разработан пайплайн для анализа состава популяций и с его помощью идентифицирован видовой состав сообщества. Обнаружено, что сообщество состоит в основном из бактерий и цианофагов. Выявлено, что многие последовательности или совсем не имеют сходства с известными, или заметно отличаются от имеющихся в базах данных. Показано, что очень большое значение играет глубина секвенирования, которая влияет на качество получаемых результатов. Таким образом, продемонстрировано, что современные методы метагеномного секвенирования могут применяться для анализа неизвестных микробиоценозов.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ В ПШЕНИЦЕ *TRITICUM KIHARAE* DOROF. ET MIGUSH. ПУТЕМ АНАЛИЗА ТРАНСКРИПТОМОВ МЕТОДОМ NGS.

А.С. Ковтун^{1,2}, А.С. Касьянов³, Т.В. Коростылева³, Е.А. Истомина³, В.Ю. Макеев³,
А.М. Кудрявцев³, Т.И. Одинцова³

¹Московский физико-технический институт, Москва,

²Институт проблем проектирования в микроэлектронике РАН, Москва

³Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва
e-mail: kovtunas25@gmail.com

Заражение растений патогенами сопровождается активацией иммунного ответа, включающего синтез различных антимикробных соединений. Среди них антимикробным пептидам (АМП) принадлежит важнейшая роль. АМП растений - короткие (<100 ак), положительно заряженные, цистеин-богатые полипептиды, подавляющие рост и развитие широкого круга патогенов. Цель работы - идентификация транскриптов, кодирующих АМП в здоровых и зараженных *Fusarium oxysporum* проростках пшеницы *Triticum kiharae* Dorof. et Migush. с использованием высокопроизводительного секвенирования (NGS). Секвенирование библиотек кДНК проводили на приборе Illumina HiSeq2000. Сборку транскриптомов проводили с помощью сборщика Trinity. Была разработана методология поиска в транскриптомных данных антимикробных пептидов по цистеиновым мотивам основных семейств растительных АМП с использованием скрытых марковских моделей. Впервые в транскриптомах проростков пшеницы обнаружены десятки транскриптов АМП, относящихся к семействам липид-переносящих белков (ЛПБ), дефензинов и гевеиноподобных пептидов. Наиболее представленным оказалось семейство ЛПБ – 106 транскриптов. В транскриптом проростков пшеницы обнаружено 27 транскриптов класса дефензинов и 3 транскрипта, кодирующих гевеиноподобные пептиды. Большинство из обнаруженных АМП являются новыми, ранее не описанными у пшеницы. Показано, что экспрессия некоторых из обнаруженных генов АМП усиливается при заражении патогеном. Помимо АМП, относящихся к известным семействам растительных АМП, в транскриптомах пшеницы были выявлены цистеин-богатые пептиды с новыми цистеиновыми мотивами, роль которых в растениях еще предстоит установить. Работа поддержана грантами РФФИ №№15-04-0468015/15 и 15-29-02480.

ПРИМЕНЕНИЕ NGS ДАННЫХ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ХРОМОСОМ РАСТЕНИЙ: НА ПРИМЕРЕ *ALLIUM FISTULOSUM* И *CANNABIS SATIVA*

И.В. Киров, О.С. Александров, О.В. Разумова, М.Г. Дивашук,
Л.И. Хрусталева, Г.И. Карлов
Российский государственный аграрный
университет - МСХА имени К.А.Тимирязева, Москва
e-mail: kirovez@gmail.com

Идентификация хромосом является важным этапом в молекулярно-цитогенетическом исследовании геномов растений. Современные системы цитогенетических маркеров, позволяющие распознавать индивидуальные хромосомы, основаны на применении метода флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH). FISH позволяет идентифицировать хромосомы после их гибридизации с мечеными последовательностями ДНК (зондами). В качестве зондов для маркирования хромосом растений, как правило, выступают тандемные повторы ДНК, занимающие миллионы пар нуклеотидов. Интегрирование методов биоинформатики и секвенирования следующего поколения с методами молекулярной цитогенетики растений значительно упростили процесс поиска тандемных повторов. Мы использовали данные секвенирования следующего поколения *Allium fistulosum* и *Cannabis sativa* для поиска тандемных повторов. С помощью сервера RepeatExplorer (<http://www.repeatexplorer.org/>) и графического отображения кластеров ридов, мы идентифицировали несколько ДНК повторов в геномах этих двух видов. ПЦР анализ подтвердил тандемную организацию данных повторов в геномах *Allium fistulosum* и *Cannabis sativa*. С помощью FISH было проведено картирование найденных повторов на хромосомах. Особенности геномной организации выделенных повторов и их использование в качестве цитогенетических маркеров будет обсуждаться. Работа проводилась при финансовой поддержке РФФИ, проект № 15-04-06244-а «Первичное физическое картирование хромосом *Cannabis sativa* на основе данных полногеномного секвенирования».

ПОЛОЖЕНИЕ РОДА *ELYMUS* ТРИБЫ *TRITICEAE* С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ

К.С. Добрякова

Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург

e-mail: kdobryakova@mail.ru

Нами секвенированы и проанализированы 38 последовательностей района ITS1-ген 5.8S рРНК -ITS2 ядерного генома видов рода *Elymus*, 1 вида *Elytrigia*, 1 вида *Psathyrostachys*, 1 вида *Elyhordeum* и 3 последовательности ITS видов рода *Agropyron*, а также последовательности trnL-trnF генома хлоропластов 16 видов *Elymus* и 2 видов *Agropyron*. В анализ также были включены последовательности ITS и trnL-trnF, депонированные из международной базы данных GenBank. Полученные молекулярно-филогенетические данные выявили, что ITS последовательности видов рода *Elymus* имеют 3 гаплотипа, возможно, разделение последовательностей на клады происходит в соответствии с субгеномами видов *Elymus*. Мы показали родство последовательностей ITS и trnL-trnF видов рода *Elymus* и *Elytrigia*, полученные молекулярно-филогенетические данные согласуются с исследованиями зарубежных агрологов (Liu et al., 2006, Mason-Gamer, 2013). Liu Q., Ge S., Tang H., Zhang X., Zhu G., Lu B.R., 2006. Phylogenetic relationships in *Elymus* (*Poaceae: Triticeae*) based on the nuclear ribosomal internal transcribed spacer and chloroplast trnL-F sequences// New Phytol. 170 (2), 411-420. Mason-Gamer R.J., 2013. Phylogeny of a Genomically Diverse Group of *Elymus* (*Poaceae*) Allopolyploids Reveals Multiple Levels of Reticulation// PLoS_ONE 8:e78449.

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ АСПЕКТОВ МИНИАТЮРИЗАЦИИ НА ПРИМЕРЕ ПАРАЗИТИЧЕСКОЙ ОСЫ *MEGAPHRAGMA AMALPHITANUM* (*HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMIDAE*)

Ф.С. Шарко, А.В. Недолужко, Е.С. Булыгина, С.В. Цыганкова, А.С. Соколов,
А.А. Полилов, Е.Б. Прохорчук, К.Г. Скрябин
Центр «Биоинженерия» РАН, Москва
e-mail: fedosic@gmail.com

Megaphragma amalphitanum – одна из самых маленьких паразитических ос (около 200 мкм длину), которая принадлежит семейству паразитических наездников *Trichogrammatidae* (*Hymenoptera*), встречающихся в основном в Италии. Основной целью настоящей работы явилась реконструкция полной последовательности митохондриального генома паразитической осы *M. amalphitanum*. В качестве исходного материала нами были использованы данные, полученные при секвенировании (исходный формат *.fastq) ДНК-библиотек, приготовленных из геномной ДНК. Для сборки полной последовательности митохондриального генома паразитической осы мегафрагмы, были использованы 35 043 964 парных чтений длиной 150 нуклеотидов (сгенерированы на геномном секвенаторе Illumina HiSeq1500). На первом этапе сборки мы «слили» исходные чтения с помощью программы Pear и удалили ПЦР-дубликаты. Для реконструкции митохондриального генома *M. amalphitanum* применялась программа MITObim, в качестве референсной последовательности использовалась митохондриальная ДНК близкородственной паразитической осы *Philotrypesis pilosa* (*Hymenoptera: Agaonidae*). Размер полученного митохондриального генома составил – 15900 нуклеотидов. Параллельно проводилось *de novo* сборка, используя несколько общедоступных программ (Abyss, Velvet, CLC и Spades). Spades продемонстрировал наилучшие результаты и поэтому использовался в дальнейшем. В итоге было собрано 553 157 контигов с N50 4285 нуклеотидов. Используя программу BLAST и сборку, полученную программой MITObim, мы отобрали два крупных контига (7668 и 7572 нуклеотидов, соответственно) и собрали консенсусную последовательность длиной в 15,041 нуклеотидов. Митохондриальная ДНК *M. amalphitanum* состоит из 13 белок-кодирующих генов, 2 рРНК гена и 22 тРНК гена. Работа поддержана грантом РФФИ 14-24-00175.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО ИЗМЕРЕНИЯ ТРАНЛЯЦИОННЫХ СПОСОБНОСТЕЙ НА ОСНОВЕ КОМБИНАЦИИ FACS И DNA/RNA-SEQ ДЛЯ БИБЛИОТЕК ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ РЕПОРТЁРОВ С РАНДОМИЗИРОВАННЫМ 5'-UTR

С.А. Евфратов¹, И.А. Остерман¹, Е.С. Андреева², М.П. Рубцова¹,
Е.С. Кострюкова³, Т.А. Семашко³, В.М. Говорун³, П.В. Сергеев¹, О.А. Донцова¹

¹Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

²Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

³НИИ Физико-химической медицины ФМБА России, Москва

e-mail: evfratov@gmail.com

Эффективность бактериальной трансляции зависит от хорошо изученного элемента 5'-нетранслируемой области (5'-UTR) — последовательности Шайна-Дальгарно (SD) и энергии образования вторичной структуры 5'-UTR. Во многих работах показана зависимость эффективности трансляции (TE) от длины и расположения SD, однако, не все наблюдаемые для природных мРНК TE могут быть объяснены только исходя из размера/положения SD и вторичной структуры 5'-UTR. Для систематического изучения влияния структуры 5'-UTR на трансляцию была разработана методика высокопроизводительного измерения TE для библиотек рандомизированных 5'-UTR на основе протокола FlowSeq. В двухрепортёрную конструкцию, содержащую флуоресцентные белки RFP (внутренний контроль) и CER (репортёр), вводились вырожденные последовательности в область 5'-UTR CER длиной от 10 до 30 нт, порождая библиотеку плазмид со случайными 5'-UTR. После трансформации библиотекой и наработки клеточной массы выполнялся FACS на 8 фракций с фиксированным диапазоном («сеть координат») величин отношений интенсивностей CER/RFP (C/R). Для связи C/R с TE FACS применялся и к набору калибровочных конструкций, для которых величины TE точно известны, в той-же «сети координат». После FACS, наработки культур, выделения рDNA и totalRNA получались ампликоны, содержащие рандомизированную область и необходимые адаптеры, после проводилось полупроводниковое секвенирование. По фракционному распределению вариантов 5'-UTR в DNA-Seq вычислялись их величины C/R, по распределению в DNA-Seq калибровочных конструкций определялись TE, по данным RNA-Seq выполнялась коррекция TE на транскрипцию. Данным методом изучено порядка 10 тыс. 5'-UTR, получены примеры аномально сильных 5'-UTR, массив данных пригоден для построения систем прямой и обратной инженерии 5'-UTR.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИЙ ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ АГРЕГИРОВАННЫХ ДАННЫХ ЭКОМНОГО И ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Д.И. Борисевич¹, Д.В.Ребриков², В.В. Ильинский^{1,2}

¹Genotek Inc., Москва

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

e-mail: valery@genotek.ru

Предсказание патогенных мутаций является сложной задачей и существующие вычислительные методы не позволяют с достаточной точностью определять степень патогенности каждого отдельного варианта. Сравнение распространенности этих вариантов в различных популяциях, является важным этапом в понимании принципов, определяющих патогенность мутаций. Популяционный анализ является важным средством для анализа распространенности вариантов. Для этого анализа требуются данные о генотипах большого числа людей из различных популяций, и его точность ограничивается количеством проанализированных особей, и разнообразием изученных популяций. Основным методом получения генетических данных в настоящее время является секвенирование нового поколения. Ранее подробный популяционный анализ вариантов генома среди людей был невозможен ввиду недостаточного количества данных секвенирования человека, доступных для анализа в едином источнике и стандартизованном формате. Однако в октябре 2014 года консорциумом Exome Aggregation Consortium была опубликована база данных, собравшая из различных источников данные экзомного и полногеномного секвенирования 60 706 человек из 7 различных популяций. С помощью данных, полученных из базы, нами проанализированы выборки генетических вариантов, ассоциированных с заболеваниями, и предположительно безвредных вариантов, проведен сравнительный анализ частот этих вариантов и частот гомо- и гетеро- зигот в представленных популяциях, определена степень соответствия наблюдаемых данных распределению Харди-Вайнберга в каждой популяции, выявлены отдельные мутации, значительно выпадающие из данного распределения. Обнаружены значительные отличия между популяциями в распространенности общих вариантов.

ОЦЕНКА УРОВНЯ ГЕТЕРОПЛАЗМИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК В КРОВИ И АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННЫХ СОСУДАХ НА ПЛАТФОРМЕ ILLUMINA

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

¹ФГБНУ «НИИ медицинской генетики», Томск

²ФГБНУ «НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»,

Кемерово

e-mail: maria-golubenko@medgenetics.ru

Развитие атеросклероза ассоциировано с окислительным стрессом. МтДНК кодирует белки, задействованные в продукции активных форм кислорода (АФК). Накапливающиеся в течение жизни соматические мутации мтДНК могут нарушать функцию митохондрий. С другой стороны, мтДНК подвержена мутагенному действию АФК. Многокопийность мтДНК обуславливает гетероплазмия – присутствие мутации только в части молекул мтДНК. Секвенирование по Сэнгеру не выявляет гетероплазмии на уровне менее 10%. Таким образом, изучение соматических мутаций мтДНК и оценка уровня гетероплазмии возможно только с помощью NGS-технологий. Цель исследования – сравнение изменчивости мтДНК в клетках крови и в атеросклеротических бляшках сонных артерий. Эксперимент был проведен на платформе Illumina (MiSeq) по протоколу секвенирования митохондриального генома человека. Исследовано 24 образца: 10 пар тканей от пациентов и 4 образца крови лиц, не имеющих клинических проявлений атеросклероза. Анализ был проведен для главной некодирующей области мтДНК. Пороговым значением детектируемой гетероплазмии считали 1,5%. Всего выявлено 60 случаев гетероплазмии (без учета участков 16184-16193 и 303-315) в 28 позициях. В 16 случаях одна и та же гетероплазмичная позиция отмечена и в крови, и в бляшке пациента. В контрольных образцах зарегистрировано в среднем 2,75 гетероплазмичных позиции на образец, в крови пациентов – 2,7, в бляшках – 3,6. Только в 24% случаев уровень гетероплазмии находился в пределах, детектируемых секвенированием по Сэнгеру. У 60% пациентов число гетероплазмичных позиций в бляшке превышало число гетероплазмий, выявленных в крови. Полученные результаты указывают на повышенный уровень соматических мутаций мтДНК в клетках атеросклеротической бляшки. Исследование поддержано грантом РФ №14-15-00305.

МЕДИЦИНСКАЯ СИСТЕМА ИНТЕРПРЕТАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ И ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ДАННЫХ ДЛЯ МЕНДЕЛЕВСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

А.С. Ракитько^{1,2}, Д.И. Борисевич^{1,2}, В.В. Ильинский^{1,3}

¹Genotek Inc., Москва

²МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

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

e-mail: valery@genotek.ru

Количество менделевских заболеваний в современном мире исчисляется тысячами, и каждая из этих болезней имеет как каузальные генетические факторы, так и определенный набор фенотипических проявлений. Знания о наличии тех или иных патогенных мутаций в геноме человека играют важную роль при выборе терапии наследственных заболеваний. Одним из главных шагов на пути к лечению или коррекции нарушения является своевременное и точное установление диагноза. Целью данной работы было создание медицинской системы, позволяющей на основе генетических данных пациента и наблюдаемых симптомов выявить наиболее вероятные заболевания. Для работы системы необходимо ввести генетическую и фенотипическую информацию о пациенте. В качестве генетических данных могут выступать, например, результаты секвенирования экзома, фенотипические характеристики формируются в ходе осмотра пациента у врача. В основе устройства системы находятся базы данных следующих трех типов связей: болезнь-симптом, болезнь-ген, болезнь-тип наследования. Данные о генетической составляющей рассматриваемых болезней были получены из таких баз, как OMIM, Orphanet, Decipher и другие. Набор симптомов, ассоциированных с менделевским заболеванием, приводится в базе аннотаций НРО (Human Phenotype Ontology). Одна из проблем, решаемых разработанной медицинской системой, состоит в том, что, как правило, врач в результате осмотра пациента указывает неполный или неточный набор симптомов, не характерный никакой из болезней. С помощью выбора подходящей метрики семантической схожести наборов симптомов осуществляется ранжирование возможных диагнозов (с учетом генетических данных). Оценка достоверности полученного результата основана на вычислении соответствующего р-значения посредством метода Монте-Карло.

ПРЕДИМПЛАНТАЦИОННЫЙ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ С ПОМОЩЬЮ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

*Е.С. Шубина, Д.О. Коростин, А.Н. Екимов, Н.П. Макарова,
Н.В. Александрова, Д.Ю. Трофимов
Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии
им. В.И.Кулакова Минздрава России, Москва
e-mail: jekaterina.shubina@gmail.com*

Одной из важных причин неудачных исходов беременности, в том числе и в ходе проведения программы экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), является наличие у эмбрионов хромосомных аномалий (ХА). Предимплантационный генетический скрининг позволяет обнаружить ХА до переноса эмбриона и значительно увеличить вероятность успеха ЭКО. В настоящее время для проведения предимплантационного скрининга как правило используются методы FISH и, реже, сравнительной геномной гибридизации (аCGH). Развитие технологий высокопроизводительного секвенирования и снижение их стоимости может позволить проводить Предимплантационный скрининг быстрее и с меньшими затратами. Целью данного исследования было оценить возможность проведения предимплантационного скрининга с помощью полупроводникового высокопроизводительного секвенирования и сравнить результаты, получаемые с помощью секвенирования с результатами матричной сравнительной геномной гибридизации. Нами было проведено исследование 8 образцов. По данным сравнительной геномной гибридизации 2 из них были с нормальным кариотипом, 3 с анеуплоидиями и 3 с множественными мелкими перестройками. Сравнительная геномная гибридизация проводилась на платформе Agilent, США с использованием чипов SurePrint G3 Human, 8x60K согласно инструкции фирмы-производителя. Секвенирование проводилось на платформе Ion PGM Torrent с наборами Ion Sequencing Kit и чипами 316v1 (Life Technologies Thermo Fisher) согласно протоколу производителя. Дальнейший анализ данных проводился по разработанному авторами протоколу. Результаты, полученные с помощью высокопроизводительного секвенирования полностью совпали с результатами матричной сравнительной геномной гибридизации, что позволяет сделать выводы о применимости секвенирования для проведения предимплантационного скрининга.

НЕИНВАЗИВНАЯ ПРЕНАТАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА (NIPT) НА БАЗЕ ПЛАТФОРМЫ ION PROTON

*Д.О. Коростин, Е.С. Шубина, Т. Кочеткова, Н.А. Каретникова, Д.Ю.Трофимов
Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии
им. В.И.Кулакова Минздрава России, Москва
e-mail: d.korostin@gmail.com*

В конце 90-х гг XX века было доказано наличие небольшой, около 5-10%, фракции фетальной ДНК, свободно циркулирующей в кровяном русле матери вне клеток. На основе использования платформ для NGS были разработаны подходы к диагностике наличия анеуплоидий у плода по внеклеточной ДНК в крови матери. Серия научных работ подтвердила высокую чувствительность и специфичность методики, что в итоге привело к внедрению коммерческого теста в США и Китае в клиническую практику на наиболее производительных платформах типа SOLiD 5500 и Illumina HiSeq. Целью данного исследования была валидация протокола подготовки образцов под платформу Ion Proton и алгоритма обработки данных секвенирования, а так же оценка чувствительности и специфичности метода. Нами было проведено исследование 218 образцов плазмы (178 нормальных, 24 с трисомией по 21 хромосоме, 8 с трисомией по 18 хромосоме, 2 с трисомией по 13 хромосоме, 1 с трисомией по 16 хромосоме, 4 с кариотипом 45X и 1 с кариотипом 47XXX) на сроках 10-20 недель беременности. Для всех образцов кариотип плода был подтвержден инвазивными методами. Образцы были секвенированы с использованием химии v2 и v3 и чипа Ion Proton P1v2. На одном чипе мультиплексировали 5 – 7 образцов. В среднем для каждого образца было получено 6,5 млн. ридов. 22 из 24 образцов с трисомией по 21 хр., все образцы с трисомиями по 18, 13, 16 хр. и кариотипами 45X и 47XXX были определены верно. Для ложноотрицательных образцов с трисомией по 21 хр. доля плодовой ДНК составляла менее 4%. Кроме того, было получено 2 ложноположительных результата для трисомии по 13 хр. и 45X, возможно они связаны с плацентарным мозаицизмом. Исследование подтвердило высокую специфичность (99%) и чувствительность (94,5%) NIPT с использованием полупроводникового секвенирования.

ВОЗМОЖНОСТИ NGS В ДИАГНОСТИКЕ РЕДКИХ НАСЛЕДСТВЕННЫХ СИНДРОМОВ

*А.В. Семьянихина¹, И.С. Абрамов^{1,2}, А.С. Тюляндина¹, О.В. Крохина¹,
Т.В. Наседкина², Л.Н. Любченко¹*

¹Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина, Москва

*²Институт Молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН,
Москва*

e-mail: alexandra_silina@mail.ru

Синдром Ли-Фраумени (СЛФ) - редкий наследственный аутосомно-доминантный синдром, фенотипически и генетически гетерогенный, ассоциированный с высокими рисками развития 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 нами представлен клинический случай наблюдения 33-летней пациентки с ПМЗН в составе синдрома Ли-Фраумени: рак правой молочной железы в 2009 г. Прогрессирование в 2010 году. Метахронный рак левой молочной железы в 2011 г. Прогрессирование РМЖ на фоне беременности в 2013 г. Анапластическая олигоастроцитома правой лобной доли головного мозга в 2013 г. Прогрессирование заболевания в 2014 году. Состояние после установки резервуара Оммайа в кистозный компонент опухоли правой лобной доли головного мозга 01.07.2014г. 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 результате которого в 7 экзоне гена TP53 выявлена герминальная миссенс-мутация с.722C>A (p.S241Y), в последующем валидированная секвенированием по Сэнгеру, подтвержден клинический диагноз: TP53-ассоциированные ПМЗН в составе синдрома Ли-Фраумени. Вывод: представленные результаты демонстрируют высокую диагностическую эффективность современных методов ДНК-диагностики в онкологической практике, в т.ч. технологий массивного параллельного секвенирования.

РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА P.1105V (RS1695) ГЕНА GSTP1 В УВЕЛИЧЕНИИ РИСКА РАЗВИТИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ДЛЯ ПАЦИЕНТОВ ИЗ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

*В.Н. Купень, С.Б. Мельнов
УО “МГЭУ им. А.Д. Сахарова”, Минск, Республика Беларусь
e-mail: slavakipen@rambler.ru*

Метаболиты I фазы детоксикации ксенобиотиков, образуемые цитохромами, часто потенциально более вредны, чем исходные вещества, и важно, чтобы они не накапливались в организме. Ферменты II фазы инактивируют эти промежуточные метаболиты. Ген GSTP1 имеет несколько полиморфных вариантов. Функционально значимой является замена p.1105V (rs1695). Принято считать, что этот вариант гена GSTP1 увеличивает восприимчивость человека к различным заболеваниям, в том числе к разным видам рака. Нами была предпринята попытка оценить роль полиморфизма p.1105V в увеличении риска развития рака молочной железы среди пациентов из Республики Беларусь. В исследование были включены 169 пациентов со спорадической формой РМЖ. Критериями отбора пациентов для исследования были: 1) отсутствие основных патогенетически значимых мутаций в генах BRCA1, BRCA2, TP53, CHEK2 и NBS1; 2) отсутствие в личном анамнезе случаев билатеральных (как синхронных, так и метасинхронных) форм РМЖ; 3) отсутствие ранней манифестации. Возрастная медиана для пациентов с РМЖ на момент возникновения опухоли составила 45,0 лет (25-я перцентиль – 40,2 года, 75-я перцентиль – 48,2 года, возрастной интервал – 29,1-54,1 года). В группу сравнения вошли 185 условно здоровых пациента без онкологической патологии в анамнезе на момент забора крови. Группа сравнения соответствовала по возрасту и этническому составу выборке больных РМЖ. Все участники исследования подписали информированное согласие на проведение молекулярно-генетических исследований. Образцы ДНК были выделены с помощью метода водно-метанольной экстракции по протоколу HC Johanson с модификациями. При сравнении результатов анализа генетического полиморфизма в группах использовали критерий Фишера или критерий χ^2 . Анализ ассоциации генотипов с риском развития развития заболевания проводился с использованием базового аллельного теста и расчета показателя отношения шансов (ОШ) для минорной аллели каждого анализируемого локуса (с расчетом 95% доверительного интервала). Так, при сравнении основной группы и группы сравнения для полиморфизма p.1105V были найдены статистически значимые различия ($p < 0,001$): как генотип GG, так и аллель G чаще встречается среди пациентов с РМЖ. Основываясь на результатах сравнения частот распространенности генотипов по ОНП p.1105V в основной группе и группе сравнения, для генотипов/аллелей были рассчитаны значения отношения шансов (ОШ). Так, протективным генотипом (снижающим риск развития заболевания) является AA (ОШ=0,45 при 95%ДИ=0,29–0,70, $p < 0,001$), патогенетическим генотипом (соответственно, увеличивающим риск развития заболевания) — GG (ОШ=3,33 при 95%ДИ=1,56–7,10, $p < 0,001$). Данное заключение справедливо и в контексте сравнения генотипов при анализе как доминантной, так и рецессивной моделей наследования. Однако при парном сравнении генотипов обнаруживается, что наличие именно генотипа GG способно значительно увеличить риск развития РМЖ. Таким образом, наличие генотипа GG по p.1105V в гене GSTP1 способно более чем в три раза увеличить риск развития РМЖ среди женщин в пременопаузальном (до 50 лет) возрасте.

ПРИМЕНЕНИЕ МАССОВОГО ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ ПРИ АДЕНОКАРЦИНОМЕ ЛЕГКОГО И КИШЕЧНИКА

*А.А. Баринов, И.М. Гагарин, М.Б. Гикало, И.А. Демидова
ГБУЗ «Московская городская онкологическая больница № 62
Департамента здравоохранения города Москвы»
e-mail: gerbarinov@gmail.com*

В настоящее время в клинической практике активно используется геномное профилирование для персонализированного подхода к терапии для онкологических нозологий таких, как рак легкого, колоректальный рак и др. Спектр генетических нарушений, для различных нозологий отличается по набору исследуемых генов и локусов и зависит от поставленных диагностических задач по мониторингу, прогнозированию и подбору чувствительности-резистентности к трагнетным препаратам. В связи с этим выбор унифицированного метода весьма затруднителен и, как правило, подразумевает мультиплатформенный подход с использованием диагностических систем с различными требованиями к входящему материалу, а также различающихся заявленной аналитической чувствительностью. Основываясь на том, что мультиплексная ПЦР является методом с минимальным требованием к количеству геномной ДНК, нами была предпринята попытка проанализировать генетический профиль архивных препаратов рака легкого и колоректального рака, а также рассмотреть возможность использования массового параллельного секвенирования, как основного метода в диагностике соматических мутаций для солидных опухолей. После выделения ДНК из архивного материала, проводили мультиплексный ПЦР с помощью разработанной праймерной панели для таргетного ресеквенирования включающей основные горячие участки следующих генов: EGFR, KRAS, NRAS, BRAF, KIT, PDGFR, PI3KCA, ERBB2, с последующим лигированием адаптеров с помощью набора Truseq Nano с модификациями. Полученные данные свидетельствуют о высокой конкордантности предложенного метода относительно классических методов генотипирования ания таких как аллель специфическая Taqman PCR, HRM и секвенирование по Сэнгеру, а также указывают на ряд проблем связанных с выбором proofreading полимеразы и нормализации библиотеки.

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕРМИНАЛЬНЫХ МУТАЦИЙ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ ЖКТ С ПОМОЩЬЮ ТАРГЕТНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

*И.С. Абрамов, Ч.А. Джумакова, А.В. Семьянихина, М.Г. Филиппова,
Л.Н. Любченко, Т.В. Наседкина
Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина, Москва
Институт молекулярной биологии имени В.А.Энгельгардта РАН, Москва
e-mail: abriv@bk.ru*

Существует ряд генетических нарушений, при которых риск развития рака толстой кишки и рака желудка очень высок. Наследственный неполипозный рак (синдром Линча) ассоциирован с мутациями в генах MLH1, PMS1, PMS2, MSH2 и MSH6. Семейный аденоматозный полипоз обусловлен мутациями в гене APC, MYH-ассоциированный полипоз - мутациями в гене MUTYH, а наследственный рак желудка - мутациями в гене CDH1. Был проведен анализ геномной ДНК 36 пациентов с раком толстой кишки и/или рак желудка и отягощенным семейным анамнезом. Отбор целевых последовательностей проводили с помощью технологии жидких чипов NimbleGen Sequence Capture. Библиотека зондов включала 2.1 миллиона олигонуклеотидов длиной 50-105 нуклеотидов, комплементарных кодирующим участкам генов MLH1, PMS1, PMS2, MSH2, TP53, MSH6, CDH1, APC, BMPR1A, CHEK2, EPCAM, MYT1H, PTEN, SMAD4 и STK11. Секвенирование проводили на платформе GS Junior (454/Roche). В результате было выявлено более 50 полиморфизмов и мутаций, включая описанные патогенные варианты. Редкие варианты были представлены синонимичными заменами (Tyr214= в гене MSH6, Asn751= в гене CDH1), миссенс-мутациями (Gly256Asp в гене MSH2, Val22Met в гене MUTYH, Thr511Ala в гене PMS2, Ile157Thr в гене CHEK2). Также были обнаружены нонсенс-мутации, приводящие к формированию преждевременного стоп-кодона (p.Gln816Ter, p.Arg406Ter, p.Leu744Ter в гене MSH2). Данные высокопроизводительного секвенирования были подтверждены секвенированием по Сэнгеру. Высокопроизводительное секвенирование является эффективным методом выявления герминальных мутаций и может быть использовано в диагностике злокачественных новообразований ЖКТ с последующим анализом семейного наследования патогенного аллеля.

СВЕТЛОКЛЕТОЧНАЯ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНАЯ КАРЦИНОМА: РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПТОМНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ НА УРОВНЕ ГЕНОМА

*С.А. Солодских, Т.М. Горбачева, А.В. Паневина, В.Ю. Башмаков,
А.А. Михайлов, А.Ю. Маслов, И.П. Мошуров, В.Н. Попов
ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж
e-mail: solodskikh@bio.vsu.ru*

Почечно-клеточный рак (ПКР) – наиболее распространенный вид рака почек у взрослых, встречающийся в 80% случаев, является основной причиной смертности при раке выделительной системы. Объектами исследования являлись 4 пациента Воронежского клинического онкологического диспансера в возрасте от 50 до 75 лет с подтвержденным светлоклеточным ПКР. Анализ профилей экспрессии проводили при помощи ДНК-микрочипов HuGene 1.1ST на платформе Affymetrix GeneAtlas. Статистический анализ результатов проводился в ПО Partek Genomics Suite 6.6, биологическая интерпретация данных - в ПО Ingenuity Pathway Analysis. Секвенирование ДНК проводили на платформе Ion Torrent PGM с панелью праймеров AmpliSeq CHP v2. Экспрессия 3528 генов в опухолевых тканях изменилась более чем в 2 раза с уровнем значимости $p < 0.05$. Наиболее репрезентативными метаболическими путями были «FXR/RXR Activation», «Atherosclerosis Signaling», «LXR/RXR Activation», «Production of NO and ROS in Macrophages». Секвенирование показало 56 мутаций в кодирующих последовательностях опухолевой ДНК и 33 мутации в промоторных зонах. Общими для всех пациентов были миссенс-мутации в генах KDR, CTC, APC и NRAS, а так же в промоторных зонах генов EGFR, PDGFRA, и HNF1A. На основе профилей экспрессии и выявленных мутаций были получены комбинированные регуляторные генные сети. Факторы транскрипции и элементы сигнальных каскадов, несущие значимые мутации, включались в анализ вместе с генами с измененной экспрессией. Данный метод интеграция геномных и транскриптомных данных позволил определить источники имеющих изменения экспрессии мРНК. Ряд мутаций и характерные изменения активности генов, полученные в ходе данного исследования говорят о популяционной гетерогенности ПКР и о различиях в молекулярных механизмах протекания заболевания.

Подписанно в печать 06.05.2015 г.

Заказ №2649 Тираж: 400 экз.

Печать цифровая.

Типография «Премиум Принт»

Москва, ул. Миклухо-Маклая 8/3

8 (499) 739-56-97

www.premium-print.ru