

Геномное
секвенирование

|2016
NGS

СБОРНИК ТЕЗИСОВ

4-й Всероссийской научно-практической конференции
по геномному секвенированию

19 мая 2016 года
Москва

Конференция поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, проект No. 16-04-20054\16

Электронный вариант тезисов: <http://ngsconference.ru/archive/2016>

ISBN 978-5-9906541-1-2

Программный комитет конференции:

Дмитрий Алексеев (МФТИ)
Михаил Гельфанд (ИППИ РАН)
Сергей Куцев (МГНЦ)
Сергей Лукьянов (ИБХ РАН)
Всеволод Макеев (ИОГен РАН)
Николай Раввин (Центр "Биоинженерия" РАН)
Денис Ребриков (ДНК-Технология)
Николай Янковский (ИОГен РАН)

Организационный комитет конференции:

Дмитрий Коростин (Генотек)
Сергей Лукьянов (ИБХ РАН)
Денис Ребриков (ДНК-Технология)

МЕТОДЫ СВЕРХВЫСОКРАЗРЕШАЮЩЕЙ БЕЗЛИНЗОВОЙ ЛАЗЕРНОЙ МИКРОСКОПИИ НА ЧИПЕ - НОВАЯ ТЕХНИКА ДЛЯ NGS

А. Скрынник¹, О. Градов²

¹ОКБ "Гранат" им. В.К. Орлова (АО «Швабе-Исследования»)

²Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе РАН, Москва
e-mail: retromicroscopy@gmail.com

До разработки методов секвенирования нового поколения, совершенные для своего времени технологии автоматизированного секвенирования обычно базировались на лазерной технике: при разделении продуктов терминирующих реакций при электрофорезе в полиакриламидном геле возбуждалась флуоресценция красителей, которыми метились дидезоксинуклеотиды; по данным флуоресценции определялся характер мигрирующего агента. Количество и спектры красителей различались в зависимости от модели: ABI 373 использовал 4 красителя видимого диапазона, IR2 – двухканальную схему с полупроводниковыми твердотельными лазерами (на 680 нм и 780 нм) и инфракрасным диапазоном детектирования. Производительность процесса любого классического метода уступает методам NGS, как и предельная чувствительность или точность (обратная величина от вероятности аппаратной ошибки). Однако возможности ряда подходов, связанных с лазерно-опосредованным считыванием, далеко не исчерпаны. Так как большинство методов высокопроизводительного секвенирования / NGS реализуются в чипах, графическая регистрация которых поступает на обработку, можно совместить анализ на чипе с безлинзовой сканирующей лазерной сверхвысокоразрешающей микроскопией (в диапазоне МГц-сканирования с использованием 2-координатного акустооптического дефлектора) либо мультиоптоволоконным аналогом сканирующей ближнепольной оптической микроскопии на чипе с последующей обработкой методами биоинформатики (и статистического анализа кода с исправлением ошибок по данным сверхвыборки, полученной при сканировании). Нами был реализован первый тип установки для исследования с использованием фореа на чипе, в том числе – для анализа под различными углами с использованием SPR, а также рассчитан второй («λ-multiSNOM-NGS») метод. Исследования поддержаны грантом РФФИ 16-32-00914.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФАКТОРОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ ПОРЯДКА *BURKHOLDERIALES* НА ОСНОВЕ ДАННЫХ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

М.С. Кунда, Н.Е. Шарапова, О.Л. Воронина,
Е.И. Аксенова, Н.Н. Рыжова, А.Н. Семенов
Федеральный научно-исследовательский центр
эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва
e-mail: markunda99@gmail.com

Осложнения при муковисцидозе связаны с микробным инфицированием органов дыхания. Особенно опасны эпидемические штаммы *Achromobacter ruhlandii* ST36 и *Burkholderia cenocepacia* ST709. NGS позволяет получить наиболее полную информацию о геномах *A. ruhlandii* (6.3 Mb) и *B. cenocepacia* (7.9 Mb). Целью работы был сравнительный анализ факторов вирулентности *A. ruhlandii* SCCH3: Ach33-1365 (AruhSCCH3), штамма глобального распространения *B. cenocepacia* J2315 (BcnJ2315, NC_011000) и внутрибольничного штамма *B. contaminans* GIMC4509: Bct370 (Bct370).

Штаммы секвенировали по технологии 454 Roche; факторы вирулентности исследовали на основе данные базы VFDB (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>).

Анализ трех групп факторов патогенности бактерий: ответственных за адгезию, инвазию и способность к биопленкообразованию, показал, что наиболее консервативными являются факторы формирования флагелл. Сходство белков составило 100% для пары Bct370 и J2315; 44-78% - для J2315 и AruhSCCH3. Если у *E. coli* гены биосинтеза и регуляции флагелл организованы в 3 оперона, то у изучаемых штаммов - в 8. Три оперона, несущие преимущественно гены белков мотора флагеллы, имеют одинаковый состав. В пяти оперонах неизменными являются части, сформированные генами базального тела флагеллы и хемотаксиса. Гены регуляции синтеза флагелл и неохарактеризованных белков могут перераспределяться между пятью оперонами, а также иными оперонами, связанными с клеточной подвижностью. Отличительная особенность AruhSCCH3 - отсутствие гена *flhG* - регулятора количества полярных флагелл.

Вывод: Высококонсервативные факторы вирулентности могут быть кандидатными мишенями для разработки лекарственных препаратов.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ В ПОИСКЕ РЕГУЛЯТОРОВ БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ БАКТЕРИЙ ПОРЯДКА *BURKHOLDERIALES*

О.Л. Воронина, М.С. Кунда, Н.Н. Рьжова, Е.И. Аксенова, А.Н. Семенов, Ю.М. Романова
Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии
и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва
e-mail: olv550@gmail.com

Условно-патогенные бактерии *Burkholderia cepacia complex* (Всс) инфицируют дыхательные пути больных муковисцидозом и вызывают внутрибольничные инфекции в стационарах общего профиля. Биопленкообразование – один из ключевых факторов, осложняющих эрадикацию Всс. Целью данной работы был поиск регуляторов образования биопленок. Штамм *B. contaminans* GIMC4509:Vct370 и его мутант GIMC4587:Vct370-19, не образующий биопленок, были секвенированы по технологии 454 Roche. Для аннотации и анализа геномов были использованы специализированные ресурсы. Сравнительный анализ геномов штаммов *B. contaminans* показал, что в мутанте, не образующем биопленок, был поврежден единственный ген двухкомпонентного регулятора транскрипции (ДРТ), входящий в состав уникального по своей структуре 4-х генного оперона (BiofilmReg). Помимо гена ДРТ, оперон включал гены пептидогликан связывающего белка (ПСБ), гистидин киназы (ГК) и липопотеина DUF4136. В геномах *B. contaminans/B. lata* из 26 ДТР, входящих в опероны, только ДРТ BiofilmReg был отделен от ГК другим геном. Предсказанная локализация белковых продуктов оперона подтвердила его роль в процессинге внеклеточных сигналов. Опероны из 4-х и 3-х генов, аналогичные BiofilmReg, были идентифицированы и у других представителей Всс и порядка *Burkholderiales*: *Achromobacter*, *Bordetella*, *Ralstonia*, *Pandoraea*. Высокий полиморфизм сенсорных доменов белков, кодируемых генами оперона, согласуется с данными о высокой адаптационной способностью *Burkholderia* в различных экологических нишах. Проведенный анализ демонстрирует важность оперона BiofilmReg в регуляции образования биопленок. Наличие ортологичных генов в геномах других представителей *Burkholderiales* открывает возможности создания лекарственных препаратов против группы эпидемически значимых микроорганизмов.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ *DE NOVO* ГЕНОМА ЦИАНОБАКТЕРИИ *CYANOBACTERIUM SPP.* С УНИКАЛЬНЫМ ЖИРНО-КИСЛОТНЫМ СОСТАВОМ

А.Ю. Стариков, Ф.К. Сарсекеева, А.А. Усербаева, Б.К. Заядан, К.С. Миронов,
Р.А. Сидоров, А.Ю. Козлова, Е.В. Куприянова, М.А. Синетова, Д.А. Лось
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва
Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алма-Ата
e-mail: starikovay1393@gmail.com

Цианобактерии представляют интерес для биотехнологии как один из потенциальных источников для получения для получения CO₂-нейтрального биотоплива. Объект проведенной работы – цианобактерия, изолированная из озера Балхаш (Казахстан) и депонированная как *Cyanobacterium sp.* IPPAS B-1200 (на основании филогенетического анализа 16S рРНК). Данный штамм способен быстро расти в широком диапазоне температур (24-39°C), что говорит о высоком адаптивном потенциале клеток. Часто в основе этого лежит способность к быстрому изменению ненасыщенности жирных кислот (ЖК) липидов мембран. Анализ ЖК-состава суммарных липидов клеток *Cyanobacterium* с помощью ГЖХ-МС выявил высокое содержание миристиновой (14:0) и миристоолеиновой кислот (Δ9-14:1) (30% и 10% от суммы ЖК соотв.), что является редкостью для цианобактерий. Мы секвенировали *de novo* геном данного штамма на платформе Ion PGM (с реактивами Hi-Q). Геномную библиотеку готовили с помощью Ion Xpress Plus Fragment Library Kit. Ассемблер SPAdes 3.1.0 был использован для последующей сборки генома. Его расчётный размер составил 3 394 т.п.о., количество контигов – 119, N50 = 71 443, доля ГЦ-оснований в геноме – 37,7% (по данным Quast 3.0). Поиск открытых рамок считывания, а также их трансляцию *in silico* проводили в программе Geneious R7. По наличию консервативных доменов был найден фермент, претендующий на роль ацил-липидной десатуразы (DesC) *Cyanobacterium*. Мы предположили, что он ответственен за десатурирование остатков ЖК липидов данной цианобактерии. Эксперимент по гетерологичной экспрессии DesC показал, что при наличии субстрата, клетки *E. coli* нарабатывали соответствующие ЖК. Это является доказательством функциональной роли изучаемой десатуразы в клетках *Cyanobacterium sp.* IPPAS B-1200. Работа поддержана грантом РФФ № 14-24-00020.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ВНУТРЕННИХ ТРАНСКРИБИРУЕМЫХ СПЕЙСЕРОВ В ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕКЦИИ *ARHANONEURON* РОДА *LEYMUS* (РОАСЕАЕ)

Н.Б. Ешисамбуева¹, А.В. Мальжунова¹, Н.К. Бадмаева^{2,1}

¹Бурятский государственный университет, Улан-Удэ

²Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ

e-mail: Darieshisambueva@yandex.ru

Виды рода *Leymus* (Hochst.) – многолетние злаки, относятся к трибе *Triticeae*. Род *Leymus* полиморфный, содержащий много гибридогенных видов, и в систематике таксонов этого рода много неясных моментов. В работе представлено изучение филогенетических взаимоотношений пяти видов рода *Leymus* Hochst. с разных географических точек (России: Красноярска, Бурятии, Тувы, Алтая; Казахстана; Монголии; Китая) – *L. secalinus* (Georgi) Tzvel., *L. littoralis* (Griseb.) Peschkova, *L. dasystachys* (Trin.) Pilger, *L. ovatus* (Trin.) Tzvel., *L. jennisseiensis* (Turcz.) Tzvel, основанное на сравнении последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1–5.8S–ITS2 ядерной ДНК. Дополнительно взят в анализ вид *L. chinensis* (Trin.) Tzvel. из секции *Anisopyrum* (Griseb.) Tzvel. Для укоренения древа взят образец *Psathyrostachys juncea* (PI22050, Aghanistan) JQ360150.1 из Генбанка (GenBank NCBI). Молекулярно-генетическое исследование агрегата *Leymus secalinus* выявило, что виды *L. ovatus*, *L. jennisseiensis* являются искусственными видами. *L. secalinus* с берегов озера Байкал образовал отдельную кладу, что указывает на его обособленность. *L. littoralis* из Бурятии и *L. secalinus* с Монголии и Китая образовали отдельную кладу, что указывает на их единство. Из этого следует, что название таксона – *L. secalinus* (Georgi) Tzvel. относится только к байкальским популяциям, а китайские и монгольские следует отнести к *L. littoralis* (Griseb.) Peschkova. Участие в конференции поддержано компанией Thermo Fisher Scientific.

ПРОТОКОЛ ПЦР И ПОДБОР ХЛОРОПЛАСТНЫХ ПАЙМЕРОВ МАТК ДЛЯ ВИДОВ РОДА *LEYMUS* HOCHST. (*POACEAE*)

А.В. Мальжунова, Н.Б. Ешисамбуева
Бурятский государственный университет, Улан-Удэ
e-mail: noom03@mail.ru

Род *Leymus* (Hochst.) включает около 50 полиплоидных видов, хромосомные числа которых варьирует от $2n = 28, 42, 56, 84$. Тотальную ДНК выделяли с использованием кита «NucleoSpin Plant II Kit» (Macherey-Nagel). ПЦР для участка *matK* проводилась в растворе объемом 25 мкл, содержащем 4 мкл 10x Tag Buf с $MgCl_2$ в конц. 30mM, по 2 мкл F и R праймеры 10μM, 3 мкл 10 mM dNTPs, 0,2 мкл HS Taq Polymerase (5 U/μl), 2 мкл ДНК, dd H₂O. Праймеры *matK* подбирали из числа известных (Liang and Hilu, 1996; Hilu et al. 1999). Были протестированы 6 пар праймеров. Специфичными для видов рода *Leymus* оказались только две пары праймеров: WF-9R; s5-F1-1210R. Условия ПЦР *matK* подбирались опытным путем: температура и время предварительной денатурации, количество циклов и время денатурации, отжига и элонгации. Лучшие результаты получились при ПЦР: первичная денатурация 96°C – 3 мин; затем 35 циклов: денатурация – 30 с при 94°C, отжиг – 1,30 мин при 50°C, элонгация – 3 мин при 72°C; заключительная стадия элонгации 10 мин при 72°C. ПЦР-продукты визуализировали в 1%-ном агарозном геле с использованием Sybr Green (фирмы «BioDye» Москва) при 120 V. Амплификат очищали набором Mini Elute PCR Purification Kit (Qiagen, Германия). Концентрацию ДНК измеряли флуориметром Qubit (Invitrogen). Участок *matK* секвенировали с четырех праймеров по методу Сэнгера «Синтол» (Москва). Длина выровненных фрагментов последовательностей *matK* с четырех праймеров составила – 1419 пн. Участие в конференции поддержано Московским кластером медицинских технологий «Южный».

ИССЛЕДОВАНИЕ СИСТЕМАТИКИ АРХЕЙ РОДА *ACIDIPLASMA* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ NGS

А.Г. Булаев^{1,2}, А.В. Каныгина^{3,4}, А.И. Манолов⁴.

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

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, Москва

³Московский физико-технический институт (ГУ), Долгопрудный

⁴ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва
e-mail: bulaev.inmi@yandex.ru

Археи рода *Acidiplasma*, аэробные умеренно термофильные ацидофильные (рНопт~1.0) окислители железа – одна из доминирующих групп в биоокислении сульфидных руд. Применение методов NGS позволяет современными методами геносистематики исследовать таксономию рода. Описанные типовые виды *A. aeolicum* и *A. cupricumulans* (а также все известные штаммы рода) идентичны по 16S рРНК и разделены на основании ДНК-ДНК гибридизации (метода с низкой воспроизводимостью результатов). Объектом исследования были штаммы *A. aeolicum* V1T, *A. cupricumulans* BH2T и *Acidiplasma sp.* MBA-1. Последовательности геномов были секвенированы по технологии Illumina и депонированы в GenBank под номерами LKBG01000000, LKBH00000000 и JYHS00000000, соответственно. Размеры геномов составили 1817456, 1759073 и 1747364 п.н. Было проведено сравнение средней нуклеотидной идентичности (ANI), средней аминокислотной идентичности (AAI), частоты распределения тетра- и динуклеотидов в геноме (Karlin genomic signature), in-silico ДНК-ДНК гибридизация, а также филогенетический анализ с использованием коровых генов представителей порядка *Thermoplasmatales*, геномы которых депонированы в базах данных (773 общих гена). ANI между всеми штаммами были > 98%, AAI > 99%, сходство штаммов по частотам встречаемости тетра- и динуклеотидов > 99%, уровни ДНК-ДНК гибридизации > 90%. Последовательности коровых генов штаммов *Acidiplasma* были практически идентичны между собой. Таким образом, результаты показывают, что согласно принятым таксономическим критериям все исследованные штаммы должны быть отнесены к одному виду, а систематика рода должна быть пересмотрена. Секвенирование проводилось ООО «Генотек» и ООО «Геноаналитика». Исследование выполнено при поддержке РФФИ в рамках проекта № 14-04-31210 мол_а.

АНАЛИЗ МИКРОБИОМА РОТОВОЙ ПОЛОСТИ НА ОСНОВАНИИ ДАННЫХ ЭКЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

К.Ю. Цуканов
ООО «Генотек», Москва
e-mail: tsukanoffkirill@gmail.com

В последние годы возросло внимание к симбиотическим микробным сообществам человеческого организма. Больше всего известно о микробиомах ротовой полости и пищеварительной системы, которые влияют на ключевые физиологические процессы. Важная характеристика микробиома — его количественный и видовой состав. Результаты секвенирования экзома в классических подходах используются для поиска мутаций. Однако образцы слюны, из которых готовятся библиотеки ДНК, также содержат генетический материал бактерий, который сохраняется в библиотеках после обогащения экзомной панелью. Мы предположили, что такие прочтения содержат информацию о микробиоме полости рта. Мы оставили прочтения, которые *bwa* не картирует на референсный геном человека, с помощью *DIAMOND* определили их таксономический состав и использовали пакет *MEGAN* для функционального и количественного анализа микробиома. Мы проанализировали 9 собственных образцов из слюны и 2 контрольных метагеномных образца из проекта Human Microbiome Project. Образцы показали характерную картину микробиома ротовой полости. Результаты совпадают для экзомных и контрольных образцов. Несмотря на то, что последние содержат в среднем в 20 раз больше бактериальных прочтений, при уменьшении количества ридов выборка организмов остается репрезентативной. Некоторые находки представляют особый интерес: отдельные образцы содержат герпесвирусы или бактерии, связанные с заболеваниями полости рта. Количество прочтений бактериальной ДНК в результатах секвенирования экзома меньше, чем в исследованиях микробиома, и различается между образцами, что накладывает ограничения на глубину таксономического анализа. Несмотря на это, подход позволяет обнаруживать отклонения от нормального микробиома ротовой полости.

DRAFT GENOME SEQUENCE OF *METHYLOPHAGA SP. BUR1*

O.V. Vasilenko, N.V. Doronina,
S.V. Tarlachkov, M.N. Shmareva, Y.A. Trotsenko
G.K. Skryabin Institute of Biochemistry
and Physiology of Microorganisms, Pushchino
e-mail: shmarevam@gmail.com

Here, we report a draft genome and annotation of non-methane utilizing methylotroph, *Methylophaga sp. Bur1*, isolated from alkaline lake. *Methylophaga sp. Bur1* is a moderately halophilic methylotroph with RMP pathway of C1 assimilation. The genome was sequenced using the semiconductor genome analyzer Ion Torrent PGM with 400-bp sequencing kit and 318v2 chip. The total 778671 raw reads were assembled *de novo* into 2847715 contigs using Newbler 3.0 (454 Live Sciences Coroorstion, USA). The draft genome contained 2,847,715 bp and had a G+C content of 42,37%. The open reading frames as well rRNA sequences were predicted and annotated by Prokka v.1.11 with plugin Barrnap (v.0.5 by Torsren Seemann) for prediction rRNA genes. A total of 2,793 protein-encoding genes were predicted. There were 3 rRNAs, 39 tRNAs. Genes of RMP pathway and biosynthesis of osmoprotector ectoine were detected. This work was financially supported by the Russian Science Foundation grant no.14-14-01045.

ФИЛУМ *ACETOTHERMIA* В ТЕРМАЛЬНЫХ ИСТОЧНИКАХ БАЙКАЛЬСКОЙ РИФТОВОЙ ЗОНЫ

А.А. Раднагуруева, С.В. Зайцева

Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ

e-mail: aryuna_rg@mail.ru

Филум *Acetothermia* первоначально был предложен в качестве "кандидата в филотипы OP1". Термофильные хемолитоавтотрофные микроорганизмы этого филума по прогнозам являются одной из наиболее ранних эволюционных ветвей домена *Bacteria*. Уникальной особенностью термальных источников БРЗ является высокое обилие представителей *Acetothermia* в микробных сообществах. Так, в донных осадках источника Алла около 57% всех определенных последовательностей составляли представители этого фила. В микробных матах этого источника количество последовательностей фила *Acetothermia* не превышало 1,5%, а в воде содержание определенных варьировало от 0,9 до 4,7%. В воде Гаргинского источника эти бактерии отсутствовали, а в осадках присутствовали в очень незначительных количествах (0,6% от общего числа последовательностей). В поверхностных слоях осадков гидротермы Умхей количество последовательностей, связанных с *Acetothermia* составляло 5,4-6,6% от общего числа. Изучено распространение бактерий, относящихся к филуму *Acetothermia*, в зависимости от условий среды обитания. Показано, что температура и pH не оказывали значительного влияния на присутствие этих бактерий в пробах источников. Определены четкие зависимости распространения *Acetothermia* в зависимости от микро- и макрокомпонентного состава воды источников. Содержание в воде источников натрия, калия и кальция отрицательно коррелировало с числом последовательностей филума *Acetothermia*. Положительная зависимость высокого сравнительного обилия *Acetothermia* отмечена для таких микроэлементов как цинк, медь, никель, фосфор и др. Работа поддержана грантами РФФИ 16-34-00254, 15-04-01275, МОН №1990. Участие в конференции поддержано Московским кластером медицинских технологий «Южный».

«ЗЕРКАЛЬНЫЕ РИДЫ» В ДАННЫХ Hi-C

А.А. Галицына, А.А. Гаврилов, Е.Е. Храмева
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва
Институт биологии гена РАН, Москва
Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, Москва
e-mail: agalitzina@gmail.com

Подробное изучение пространственной структуры хроматина стало возможным благодаря развитию методов фиксации конформации хромосом. Одним из самых популярных и активно используемых является высокопроизводительный метод Hi-C, в основе которого лежит парноконцевое секвенирование. До сих пор существует неоднозначность интерпретации части результатов, например, пар ридов, картирующихся на один и тот же рестриктивный фрагмент при выравнивании на геном. В некоторых работах рекомендуется удалять из рассмотрения такие пары и утверждается, что их источником являются технические ошибки эксперимента Hi-C. В других работах такие случаи специально анализируются, предполагается их происхождение при взаимодействии гомологичных хромосом. Целью данной работы является изучение пар ридов, картирующихся на один рестриктивный фрагмент в одном направлении по результатам секвенирования Hi-C. Для них вводится термин “зеркальные риды”. Выдвигаются и тестируются гипотезы происхождения зеркальных ридов: дубликации в геноме, недавно прошедшая вилка репликации, когезия сестринских хроматид, взаимодействие гомологичных хромосом. В качестве исходных данных использованы полученные ранее результаты секвенирования Hi-C и ресеквенирования четырех линий *D. melanogaster*, а также открытые данные Hi-C, ChIP-Seq различных белков хроматина для опубликованных ранее экспериментов. В работе создан пакет на Python для удобного извлечения, анализа и визуализации зеркальных ридов из данных секвенирования Hi-C, налажена система для формирования и сопоставления геномных разметок. Использован анализ корреляции разметок с помощью программы StereoGene. В результате протестированы различные гипотезы происхождения зеркальных ридов в результате эксперимента Hi-C, показаны их возможное биологическое значение.

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ПРОГЕНЕТОРНЫХ МАРКЕРОВ В GLAST-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ РАЗЛИЧНЫХ РЕГИОНОВ МОЗГА КРЫС ПОСТНАТАЛЬНОГО ПЕРИОДА

*Е.О. Третьяков, И.Н. Доминова, О.П. Тучина, Н.Н. Шушарина, В.А. Касымов
Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта, Калининград
e-mail: Evgenii.o.tretiakov@gmail.com*

На сегодняшний день не решена проблема однозначной идентификации прогениторных клеток мозга [1,2]. Нами был проведён транскриптомный анализ GLAST+ клеток трёх регионов мозга (коры, гиппокампа, ствола) крыс 3-х, 6-ти, 11-ти и 20-ти дней, сортированных методом иммуномагнитной сепарации с целью исследования астроглии [3]. Однако в результате анализа коэкспрессии нами было показано, что данная группа клеток крыс раннего постнатального возраста сочетает транскрипты, характерные для клеток предшественников с известными для GLAST+ зрелых астроцитов [1]. Таким образом, мы планируем выделить субпопуляции прекурсоров методом клеточного сортирования с использованием маркера A2B5 [4], а также воспроизвести первоначальную методику выделения GLAST+ клеток, с дальнейшим выявлением уровней экспрессии групп генов, характеризующих субпопуляции различных прогениторных клеток, методом qRT-PCR. На основании чего путём биформатического анализа соотнести данные серий qRT-PCR и транскриптомного анализа, разделив выходные данные о субпопуляциях различных клеток. Участие в конференции поддержано компанией «Генотек».

-
1. Casarosa S., Bozzi Y., Conti L. Neural stem cells: ready for therapeutic applications? // *Molecular and cellular therapies*. – 2014. – V. 2. – №. 1. – P. 1.
 2. Mamber C. et al. Shades of gray: The delineation of marker expression within the adult rodent subventricular zone // *Progress in neurobiology*. – 2013. – V. 111. – 1-16 p.
 3. Jungblut M. et al. Isolation and characterization of living primary astroglial cells using the new GLAST- specific monoclonal antibody ACSA – 1 // *Glia*. – 2012. – V. 60. – №. 6. – 894-907 p.
 4. Dietrich J., Noble M., Mayer – Proschel M. Characterization of A2B5+ glial precursor cells from cryopreserved human fetal brain progenitor cells // *Glia*. – 2002. – V. 40. – №. 1. – 65-77 p

ОЦЕНКА ВОВЛЕЧЕННОСТИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА YJJM В РЕГУЛЯЦИЮ САХАРНОГО МЕТАБОЛИЗМА КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ С ПОМОЩЬЮ АНАЛИЗА ТРАНСКРИПТОМОВ

Д.И. Гагаринская^{1,2}, И.А. Суворова³, У.С. Швырева¹, В.В. Панюков⁴,
Ф.А. Кондрашов⁵, О.Н. Озолин¹, М.Н. Тутукина^{1,5}

¹Институт биофизики клетки РАН, Пущино

²Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино

³Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, Москва

⁴Институт математических проблем биологии РАН, Пущино

⁵Центр геномной регуляции – CRG, Барселона, Испания

e-mail: DeanaW@yandex.ru

Метаболизм гексуроновых кислот играет важную роль в подвижности бактерий и их способности колонизировать эпителий хозяина. Экспрессия генов, кодирующих ферменты метаболизма гексуронатов, находится под контролем cAMP-CRP и локальных факторов транскрипции семейства GntR. На основе структурной гомологии YjjM (LgoR) был предсказан как активатор L-галактонат-оксидоредуктазы YjjN (LgoD). Целью исследования был поиск всех потенциальных мишеней для YjjM среди генов сахарного метаболизма с помощью сравнительного анализа транскриптомов штамма *E. coli* K12 MG1655 и его делеционного мутанта по гену *yjjM*. Клетки растили на среде M9 с 5% LB и 0,2% глюкозы или глюкуроната до OD₆₅₀=0,6, выделяли РНК и готовили библиотеки кДНК. Секвенирование проводили на платформе Illumina HiSeq2000 (длина рида 50 nt). Данные были проанализированы с помощью программ Trimmomatic, Bowtie или TopHat и разработанных нами приложений Matcher. Во всех случаях на геном было картировано более 88% ридов (17-22 млн). Мишенями YjjM предсказуемо оказались гены *yjj-* и *ихи-оперонов*, а также ген глюкуронидазы *uidA*. Они были существенно активированы в мутанте, что говорит о репрессорной, а не активаторной функции YjjM. Больше генов сахарного метаболизма среди мишеней не оказалось. Зато в его отсутствие были сильно ингибированы гены ферментов и регуляторов азотного метаболизма (*hcrp*, *hcr*, *narGHJ*, *nirBCD*). Роль YjjM как репрессора генов *yjjK* и *yjjL* и активатора *narG* была полностью подтверждена qRT-PCR. Таким образом, белок YjjM, по-видимому, является бимодальным регулятором, способным локально контролировать экспрессию генов метаболизма галактоната и глюкуроната, а также других систем, связанных с сахарным метаболизмом лишь косвенно. Работа поддержана грантами РФФИ 15-04-08716 и 15-07-05783.

ПОИСК МЕЖВИДОВЫХ РАЗЛИЧИЙ В СТРОЕНИИ ХЛОРОПЛАСТНЫХ ГЕНОМОВ У ПАПОРОТНИКОВ РОДА *ADIANTUM*

М.С. Беленикин, А.А. Криницына,
М.Д. Логачева, С.В. Купцов, А.С. Сперанская
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва
e-mail: genetics.npcmpd@gmail.com

Адаптивная эволюция является одной из причин диверсификации близкородственных видов. Целью данной работы было проведение сравнительного анализа хлоропластного генома двух видов рода *Adiantum*: *A. hispidulum* и *A. capillus-veneris* и поиск структурных особенностей, отражающих способность растений к произрастанию в широком ареале обитания. *A. hispidulum* – пантропический, палеотропический вид, произрастание которого приурочено к сухим местам, выше 1800 м. обнаружен не был. *A. capillus-veneris* возник из пантропических предковых видов и распространился почти по всему миру. Встречается на различных высотах (до 3000 м), значительно более терпим к экологическим условиям произрастания. Мы провели секвенирование и де-ново сборку хлоропластного генома *A. hispidulum* (151,3 тыс. п.н.) и сравнили с ранее опубликованной последовательностью *A. capillus-veneris*. Было установлено, что геномы обоих видов имеют схожую структуру, одинаковое количество и расположение генов. Были найдены небольшие (~300 п.н.о.) инсерции, большая часть которых находится в последовательностях межгенных спейсеров. К потенциально физиологически значимым можно отнести инсерцию в интроне I гена *usc3* (кодирует фактор сборки фотосистемы I), обнаруженную в геноме *A. hispidulum*. Наличие изменений в интроне гена *usc3* может приводить к нарушению сплайсинга мРНК этого гена при неблагоприятных условиях обитания, что может отражаться на способностях *A. hispidulum* к произрастанию в условиях высокогорий. Работа выполнена при поддержке РФФИ №14-04-01852а и РФФ №14-50-00029.

ПОИСК АДАПТИВНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ХЛОРОПЛАСТНЫХ ГЕНОМОВ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДА *ALLIUM*, ОБУСЛАВЛИВАЮЩИХ УСТОЙЧИВОСТЬ К ОБИТАНИЮ В УСЛОВИЯХ ВЫСОКОГОРИЙ

М.С. Беленикин, А.А. Криницына,
М.Д. Логачева, С.В. Купцов, А.С. Сперанская
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва
e-mail: genetics.nrcmpd@gmail.com

Род *Allium* L. является одним из крупнейших родов мировой флоры. Многие виды этого рода введены в культуру: их используют в пищу и в декоративных целях. В естественных условиях представители рода произрастают в Северном полушарии, некоторые из них имеют довольно широкие ареалы обитания, тогда как другие приурочены к конкретным экологическим нишам. У видов, адаптировавшихся к произрастанию в различных условиях, могут возникать наследуемые изменения в генетическом материале, в том числе адаптационно значимые перестройки в хлоропластном геноме. Наибольший интерес представляет изучение видов, приспособившихся в процессе эволюции к выживанию в неблагоприятных для сельскохозяйственной деятельности условиях, например, в условиях высокогорий, особенностями которых являются повышенная дозировка УФ излучения, недостаточное увлажнение и резкие перепады суточных температур. В данной работе проведено выделение хлДНК, высокопроизводительное секвенирование и de novo сборка пяти видов рода *Allium*: *A. elatum* Regel., *A. obliquum* L., *A. paradoxum* (M. Bieb.) G. Don., *A. victorialis* L., *A. fistulosum* Auct. non L. (Syn. *A. microbulbum* Prokh., *A. altaicum* Pallas). Сравнительный анализ последовательностей хлоропластных геномов позволил установить различия, отражающие филогению этих видов. Также были найдены структурные особенности, предположительно связанные с эволюционной адаптацией видов к различным условиям произрастания. Работа выполнена при поддержке РФФИ №14-04-01852а и РНФ №14-50-00029.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ *DE NOVO* ХЛОРОПЛАСТНЫХ ГЕНОМОВ ПАПОРОТНИКОВ РОДА *DRYOPTERIS*

М.С. Беленикин, А.А. Криницына,
М.Д. Логачева, С.В. Купцов, А.С. Сперанская
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва
e-mail: genetics.npcmpd@gmail.com

Род *Dryopteris* включает около 400 видов, которые широко распространены по всему миру. В связи с хорошей изученностью, это род можно использовать в качестве возможной модели для изучения многих аспектов эволюции и биологии папоротников в целом. В настоящее время в филогенетических исследованиях очень широко используют данные о строении нуклеотидных последовательностей, в том числе и хлоропластных (хп) геномов. В связи с развитием технологии высокопроизводительного секвенирования все чаще для анализа используют протяженные участки или даже полные последовательности хп-геномов. Однако, несмотря на то, что более чем для 200 видов рода *Dryopteris* в открытом доступе имеются данные о строении 1-5 маркерных последовательностей, информации о полных последовательностях хп-геномов нет. Целью данной работы являлось секвенирование, *de novo* сборка и сравнительный анализ хп-геномов трех видов рода *Dryopteris* (*D. villarii* (Bell) Woyнар ex Schinz & Thell., *D. filix-mas* (L.) Schott и *D. blanfordii* (C. Hope) C. Christensen). В результате было показано, что размер хп-геномов указанных видов схож и составляет около 150 тыс. п.н. При сравнении было выявлено наличие инсерции примерно в 200 п.н. в хп-геноме *D. filix-mas*, которая отсутствует в хп-геномах других изученных видов. Кроме того, по анализу 7 маркерных последовательностей было уточнено систематическое положение *D. blanfordii*, которое до настоящего времени оставалось неясным. Работа выполнена при поддержке РФФИ №14-04-01852а и РФФ №14-50-00029.

АНАЛИЗ ПОЛНОГЕНОМНЫХ SRA-ДАННЫХ ПРОЕКТОВ NGS ДЛЯ РЕШЕНИЯ КРИМИНАЛИСТИЧЕСКОЙ ЗАДАЧИ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ДИКИХ КАБАНОВ И ДОМАШНИХ СВИНЕЙ НА ОСНОВЕ УНИКАЛЬНЫХ SNP

В.Н. Купень, С.А. Котова
ГУ «НПЦ Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь», НИЛ МБИ, Минск, Республика Беларусь
e-mail: slavakipen@rambler.ru

В экспертной практике ГУ «НПЦ Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь» (г. Минск, Республика Беларусь) за период 2015-2016 гг. было исследовано более 40 случаев незаконной добычи дикого кабана (*Sus scrofa*). На данный момент в экспертной практике задача по дифференциации дикого кабана от домашней свиньи может быть решена двумя способами: 1) анализ однонуклеотидного полиморфизма (SNP) в белок-кодирующих генах, полиморфизм в которых напрямую связан с фенотипом животных – MC1R (Fajardo V., 2007 г.), NR6A1 (Fontanesi L., 2014 г.); 2) совокупный анализ большого количества видоспецифичных STR-локусов (Conyers S., 2012 г.). Задачей данного исследования являлся поиск видоспецифичных SNP для дикого кабана (*Sus scrofa*) относительно домашних свиней (*Sus scrofa domesticus*) SRA-данных по полногеномному секвенированию (NGS), размещенных в открытом доступе на облачном сервисе DNAnexus (<http://sra.dnexus.com/>). Поисковой основой служили ранее опубликованные результаты исследования Ramos A. (2011 г.), полученные с использованием SNP-чипа «PorcineSNP60» (Illumina). Анализ был выполнен с помощью алгоритма SRA Nucleotide BLAST и программы BioEdit v.7.2.5. Количество включенных в анализ SNP – 193; число полногеномных прочтений для дикого кабана – 12, домашних пород свиней – 33. В результате, из 193 SNP было обнаружено 19 видоспецифичных, т.е. встречающихся только среди представителей дикого кабана, аллелей (по данным Ramos A. – 28). Таким образом, из изначально предложенных Ramos A. (2011 г.) 193 SNP 9,8% из них способны дифференцировать дикого кабана от крупной белой свиньи, а также от таких пород домашней свиньи, как дюроч, пьетрен и ландрас. Участие в конференции поддержано компанией «Евроген».

МЕТОДЫ «РАДИОИЗОТОПНОЙ БИОИНФОРМАТИКИ» ДЛЯ МУЛЬТИСПЕКТРАЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА АКТИВНОМ ЧИПЕ

*С.К. Панкратов, О.В. Градов
Институт энергетических проблем химической
физики им. В.Л. Тальрозе РАН, Москва
e-mail: camacsociety@gmail.com*

Известные с 80-х годов подходы мультиспектрального мультиплексного секвенирования предполагают возможность использования не только флуоресцентных меток с отличными спектральными характеристиками, но и радиоизотопных меток которые могут быть зафиксированы сцинтилляционным счетчиком \ координатным детектором частиц. Как и в методах мультиплексной мультиспектральной иммуногистохимии, задача в этом случае не сводится только к картированию, но требует количественного решения, что может быть причиной затруднений и артефактов: например, в случае, когда используется несколько меток либо препарат метки, в силу времени либо неустранимых проблем с очисткой, имеет ряд «переходных» состояний с другими временами полураспада и спектром излучения. Сравнение методов изотопного и неизотопного мечения нуклеиновых кислот указывает на то, что статистическая характеристика измерений на данных кардинально отличных принципах отлична по критериям оценки. Поэтому нужна новая референсная математическая модель и новая биоинформатика для описания данного типа мультиспектрального секвенирования. При работе с гетерогенными образцами надо учитывать, что распределение собственных изотопов, способных интерферировать с меткой, в морфогенезе является позиционно-чувствительным (как пример этого можно привести классические результаты по распределению изотопной метки на нуклеиновые кислоты по анимально-вегетативному градиенту в эмбриогенезе, либо по биологическому фракционированию изотопов углерода в биогеохимических циклах). По данной причине для созданных нами экспериментальных образцов позиционно-чувствительных активных чипов со сцинтилляционными ячейками разрабатывается принципиально новая форма представления данных для геномики – программный модуль с GUI «Радиоизотопная биоинформатика» («RadioScintGS»).

ПОДХОДЫ LFSM (OPFOS, SPIM, mSPIM, MuViSPIM) В АНАЛИЗЕ ПРОФИЛЕЙ РАСПРЕДЕЛЕНИЙ ПРИ КАПИЛЛЯРНОМ СЕКВЕНИРОВАНИИ И ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОМ РАЗДЕЛЕНИИ ТЕХНИКАМИ CGE / CZE

А.Г. Яблоков

Институт химической физики им. Н. Н. Семёнова РАН, Москва
Институт энергетических проблем химической
физики им. В.Л. Тальрозе РАН, Москва
e-mail: a.g.jablokow@gmail.com

В системах для высокопроизводительного разделения и количественной оценки нуклеиновых кислот типа Fragment Analyzer и в большинстве приборов для секвенирования ДНК методами капиллярного электрофореза капилляры доступны для визуального наблюдения внутри бокса – профили фронтов могут быть визуализированы встроенными техническими средствами или дополнительными контрольно-измерительными системами датчиков (в экспериментальных и исследовательских целях встраивающихся в бокс или внешний контур). Известны различия в профиле фронта при ламинарном и электроосмотическом потоке, что делает возможным ряд методов параметрической верификации процесса в режиме реального времени, помимо самой целевой аналитики. Преимуществом капиллярного электрофореза в разделении нуклеиновых кислот и соответствующем секвенировании является длина пути детектируемого излучения, составляющая всего $N \times 10$ мкм (обычно до 50 мкм). Поэтому является возможным прямое «*in situ*» наблюдение и картирование источника сигнала микроскопическими методами. Работа с микроскопией капилляров наиболее оптимально реализуется техникой LFSM, включающей ряд ответвлений, таких как OPFOS, SPIM, mSPIM, MuViSPIM, отличающихся геометрически по расположению и количеству объективов и возможности относительного вращения образца – капилляра (или турели микрообъективов вокруг него). Наличие открытых протоколов типа OpenSPIM и встраиваемость конструкции SPIM-подобных систем в стандартные боксы, даёт возможность воспроизвести разделение с небольшим количеством капиллярных каналов при использовании соответствующего количества SPIM-головок либо перемещений одной SPIM-головки в пространстве. При этом возможно сканирование вдоль всего капилляра или методы мониторинга определенного участка. Нами реализуются данная техническая схема и метод.

КООРДИНАТНО-СКАНИРУЮЩАЯ ВЕКТОРОГРАФИЯ И УГЛОВАЯ СКАНИРУЮЩАЯ ВЕКТОРОГРАФИЯ КАК МЕТОД СПЕКТРОЗОНАЛЬНОГО ОЦЕНИВАНИЯ В ДЕКОДИРУЮЩЕЙ ГИБРИДИЗАЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Ф.К. Орехов¹, О.В. Градов², В.-Дж. Линь³

¹Институт химической физики им. Н. Н. Семёнова РАН, Москва

*²Институт энергетических проблем химической
физики им. В.Л. Тальрозе РАН, Москва*

*³Cit. Sci. Group on Nonst. LoC, Maryland, USA
e-mail: theorehov@gmail.com*

В технологии Illumina BeadArray и её экспериментальных прототипах используется техника цветового кодирования микросфер (3 мкм), обладающих адресом из 23 олигонуклеотидов и пробой длиной в 50 олигонуклеотидов (существует 1520 корректных используемых адресов, 272 корректных не используемых адресов и 4769 некорректных адресов). Их декодирующая гибридизация должна осуществляться в позиционно-чувствительном режиме, так как стоит задача определения нахождения целевых олигонуклеотидов в заданных координатах ROI с учетом исходного расположения микросфер на расстоянии 5.7 мкм. Флуоресценция метки на бусине при цветовом кодировании, очевидно, спектральнональна. Поэтому для статистического анализа распределений рационально применять многоканальные колориметрические методы, соответствующие по числу каналов числу возможных спектральных поддиапазонов свечения метки. Нами рассчитаны и реализованы спектральнональные активные чипы с микрофильтрами (матричными) на базе CYGM, CYUM, RGBE, CMYW, RGBW (CFAK), но было показано, что неконтролируемое попадание модельной флуоресцирующей микросферы на неподходящий, с точки зрения спектральнонального анализа, элемент мозаики ведет к накоплению экстремально большого числа ошибок. В связи с этим сначала был осуществлен переход на сенсоры Foveon X3, что решило вопрос установления колокализации в режиме реального времени. Однако, по данным измерений, вставал вопрос об анизотропии флуоресценции в зависимости от позиции точечного источника на микросфере. Поэтому был осуществлен переход к микроскопической регистрации на подвижной платформе с возможностью сканирования по координатам, углам и спектральнональным каналам. Регистрация для оценивания в режиме реального времени была реализована на калиброванном вектроскопе в цветовых пространствах Y Pb/Cb Pr/Cr.

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

*М.В. Иванов, С.В. Мусиенко, В.А. Милейко
Биомедицинский холдинг АТЛАС, Москва
e-mail: m4merg@gmail.com*

Технология NGS дает возможность создавать гибкие диагностические решения, варьируя состав панелей, способы таргетного обогащения, и глубину секвенирования. Однако это серьезно ограничивает возможности кросс-валидации результатов и сравнения данных. Таким образом, универсальная система оценки надежности результатов NGS-исследования является важным инструментом для широкого внедрения NGS в клиническую практику. Несмотря на то, что зачастую биоинформатические пайплайны позволяют оценить «надежность» выявленных мутаций эти результаты рассчитываются и представляются по-разному различными алгоритмами. Авторами разработано программное обеспечение, позволяющее оценивать «клиническое качество» данных NGS независимо от использованного метода секвенирования и особенностей таргетной панели. Для каждого образца вычисляется предсказанная чувствительность (вероятность того, что клинически значимые мутации не упущены) и специфичность (вероятность того, что обнаруженные мутации не являются ложно-положительными). Помимо технических параметров секвенирования алгоритм может учитывать популяционные частоты клинически значимых мутаций, таким образом, он корректно переводит биоинформатические параметры на «язык» клинической диагностики. С помощью разработанного ПО было обнаружено, что в некоторых случаях при полно-экзонном анализе генов BRCA1 и BRCA2, предсказанная диагностическая чувствительность составляла менее 98%. Это указывает на необходимость для отдельных пациентов дополнительно исследовать определенные участки, потенциально содержащие клинически значимые мутации. С помощью предложенного подхода можно оценивать качество данных NGS в клиническом приложении. Помимо этого, метод может применяться также для сравнения как различных платформ, так и конкретных протоколов секвенирования.

АЛГОРИТМ ПОИСКА ПОЛИМОРФИЗМОВ В РЕЗУЛЬТАТАХ ИОННОГО ПОЛУПРОВОДНИКОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

*Н.А. Кулемин, А.Ю. Гришин, К.А. Бабалян, Э.В. Генерозов
ФНКЦ физико-химической медицины, Москва
e-mail: maveriksvao@gmail.com*

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

КОГДА ОДНА ЛУЧШЕ, ЧЕМ ДВЕ – ЕДИНАЯ БАЗА ГЕНОМНЫХ ДАННЫХ

И. Жегалова¹, А. Петухова¹, D. van Gent², D. Dworaczyk³, С. Сучков^{1,4}

¹Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва

²Erasmus University, Rotterdam, Netherlands

³Oracle, Redwood Shores, CA, USA

⁴EPMA, Brussels, Belgium

e-mail: ir.zhegalova@gmail.com

Бурный рост технологий секвенирования на сегодняшний день позволяет получить копию полного генома менее чем за неделю. Обрамленные в рамках персонализированной медицины и транслируемые в практику, геномные данные позволяют совершать значительные прорывы в сфере ранней (в том числе предиктивной и доклинической) диагностики для осуществления превентивных мероприятий в отношении осложнений, выявляемых на ранних стадиях развития хронических форм патологии. К сожалению, в клинической практике геномные данные, как правило, становятся объектом внимания лишь врача-генетика, а позже отправляются в «архив» и не используются в дальнейшем. Для крупных университетских клиник возможны потоки такого рода информации, достигающие нескольких тысяч записей. Между тем, мощный технологический арсенал и накопленные с его помощью знания позволяют говорить о возможности таргетной терапии – создании лекарств для групп пациентов с конкретными адресными задачами. Такой подход, однако, встречает преграду, которая существует и в терапии орфанных заболеваний – небольшое число подходящих лиц для клинических испытаний препаратов нового поколения. Увеличение случаев выявления орфанных заболеваний, нарастающая роль фармакогеномики и стремительное расширение сегмента рынка таргетных препаратов приводят к необходимости создания единой системы обмена информацией – «единой госпитальной системы» – для формирования потоков пациентов под клинические испытания узкоспециализированных препаратов. Необходимо, однако, четко представлять архитектуру такой системы, условия взаимодействия «Ищущих» и «Дающих» и получения данных, а также соблюдение анонимности, чтобы подобная система из изящного решения не превратилась в систему дискриминации по генетическому признаку.

ПРИМЕНЕНИЕ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ NGS В ИЗУЧЕНИИ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ФОРМ МУЦИНА 1

*Т.С. Егорова, Н.Н. Гурина, С.Г. Фомина,
Д.В. Новиков, Р.Г. Пегов, Н.В. Голубцова, В.В. Новиков
Институт биологии и биомедицины Нижегородского государственного
университета им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород
e-mail: orhideya257@yandex.ru*

Муцин 1 (MUC1) – трансмембранный гликопротеин, экспрессирующийся на апикальной поверхности эпителиальных клеток. Гиперэкспрессия MUC1 связана с развитием злокачественных новообразований. В результате альтернативного сплайсинга образуются изоформы MUC1, обнаружение которых является важным направлением в клинической практике. В данной работе исследовали 9 вариантов мРНК MUC1: A, B, C, D, X, Y, Z, MUC1-Rep, MUC1-Seq. Использовали 40 образцов опухолевых очагов рака молочной железы и 58 образцов опухолевых очагов рака толстой кишки. Методом ОТ-ПЦР выявляли три группы изоформ мРНК MUC1 с использованием специфичных праймеров. Результаты реакции оценивали электрофорезом нуклеиновых кислот в агарозном геле в присутствии бромида этидия. В опухолевых очагах рака молочной железы частота выявления альтернативных форм мРНК MUC1, входящих в 1 группу, отмечалась чаще (84% образцов), чем в опухолевых очагах рака толстой кишки (34%). Изоформы с выпадением вариабельных участков внеклеточного региона MUC1 (2 группы) обнаруживались в 25% образцов рака молочной железы и 9% образцов от больных раком толстой кишки. В ходе исследования также было выявлено, что изоформа MUC1-Seq является преобладающей как при раке молочной железы, так и при раке толстой кишки. Для подтверждения полученных результатов было проведено высокопроизводительное секвенирование. Процедуру экстракции ДНК осуществляли с использованием коммерческого набора реагентов «Cleanup Standard» (Евроген, Москва). Анализ полученных электрофореграмм для последовательности участка ДНК, кодирующего изоформы MUC1, проводили с помощью программы nucleotide blast официального сайта BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Все проанализированные образцы относятся к разным вариантам альтернативного сплайсинга гена MUC1. Участие в конференции поддержано компанией «Генотек».

СРАВНЕНИЕ ПОЛНОГЕНОМНЫХ ПРОФИЛЕЙ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

*И.С. Киселев, М.Р. Кабилов, О.Г. Кулакова,
Л.В. Данилова, Е.В. Попова, О.А. Батурина, Е.Ю. Царева,
Н.М. Баулина, А.Н. Бойко, А.В. Фаворов, О.О. Фаворова, В.В. Власов
Российский национальный исследовательский
медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва
e-mail: kiselev.ivan.1991@yandex.ru*

Рассеянный склероз (РС) – тяжелое нейродегенеративное заболевание с полигенным типом наследования. Помимо генетических факторов важную роль в развитии и течении РС могут играть эпигенетические механизмы, такие как метилирование ДНК. Для поиска дифференциально метилированных CpG сайтов, ассоциированных с развитием двух основных клинических форм РС – ремитирующего РС (РРС) и первично-прогрессирующего РС (ППРС), нами был проведен полногеномный анализ профиля метилирования ДНК в мононуклеарных клетках периферической крови больных РРС и ППРС в сравнении со здоровыми индивидами контрольной группы. Проведено также прямое сравнение профилей метилирования ДНК у пациентов с РРС и ППРС.

При всех трех попарных сравнениях выявлены существенные различия в профилях метилирования. При иерархической кластеризации по уровню метилирования обнаруженных дифференциально метилированных сайтов (ДМС) и при визуализации данных с помощью метода главных компонент наблюдается объединение образцов ДНК каждой из сравниваемых групп в отдельный кластер. При сравнении со здоровыми контролями для ППРС выявлено большее число ДМС, чем для РРС (67 против 30). Более половины всех ДМС расположено в генах. В случае РРС большая часть ДМС гипометилирована, в случае ППРС – гиперметилирована. В CpG-островках и соседних областях расположено 60% ДМС, выявляемых при сравнении РРС с контролями, и 79% - при сравнении ППРС с контролями. Прямое сравнение двух форм РС выявило 51 ДМС, из которых большая часть (82%) гиперметилирована при ППРС. В целом, ППРС отличается от РРС большими изменениями в паттерне метилирования ДНК.

Полученные результаты свидетельствуют об участии метилирования ДНК в развитии РС. Показано, что этот эпигенетический механизм вовлечен в формирование клинически различных форм РС – РРС и ППРС.

КОМБИНИРОВАННОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ REAL-TIME PCR И ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ФЕНИЛКЕТОНУРИИ

Д.Д. Абрамов¹, В.В. Кадочникова¹,
А.И. Никифорова², К.А. Огурцова⁴, Т.О. Кочеткова³, Е.С. Шубина³,
Н.О. Брюханова⁴, Е.А. Шестопалова⁴, А.Е. Донников^{2,3}, Д.Ю. Трофимов^{1,2,3}

¹ГНЦ Институт иммунологии, Москва

²ООО «НПФ ДНК-Технология», Москва

³Научный центр акушерства, гинекологии
и перинатологии им. В.И. Кулакова, Москва

⁴Морозовская детская городская клиническая больница, Москва

e-mail: abramov@dna-technology.ru

Фенилкетонурия (ФКУ) – наследственное заболевание обмена веществ, связанное с нарушением метаболизма аминокислот, главным образом фенилаланина. Без корректной терапии ФКУ ведет к накоплению в организме фенилаланина и его токсических продуктов, что приводит к тяжелому поражению ЦНС и нарушению умственного развития. Заболевание чаще всего связано с мутациями в гене *PAH*, кодирующем фенилаланингидроксилазу. На сегодняшний день в этом гене описано свыше 950 мутаций, однако лишь несколько из них встречаются в популяции с частотой более 1%. Целью данного исследования была детекция патогенных мутаций в гене *PAH* методами Real-Time PCR и высокопроизводительного секвенирования (NGS). Были проанализированы образцы ДНК 34 больных фенилкетонурией. Методом Real-Time PCR проведен скрининг 16 наиболее распространенных мутаций (R408W, R261Q, R158Q, IVS10nt546, IVS12+1G>A, Y414C, IVS4+5G>T, R252W, L48S, R261X, P281L, G188D, E280K, F331S, c.836C>T, IVS2+5G>C), затем секвенированы фрагменты гена *PAH*. По итогам генотипирования методом Real-Time PCR в 25 образцах из 34 выявлены гомозиготы по мутациям или 2 гетерозиготы. Для 7 образцов - выявлена только 1 гетерозигота, для 2 образцов мутаций в гене *PAH* не обнаружено. После проведения генотипирования методом NGS ещё в 6 образцах были выявлены следующие мутации: D222Ter, R270K, R111Ter, c.60+5G>T, c.1199+1G>C. Для одного из образцов, в котором методом Real-Time PCR мутации не обнаружены, методом NGS найдено сочетание мутаций E390G+A300S. У трех больных фенилкетонурией из 32 (10%) мутации в гене *PAH* не были выявлены ни одним из методов или обнаружены только в гетерозиготном состоянии. Возможно, эти случаи фенилкетонурии связаны с нарушениями функционирования генов дигидроптеридинредуктазы (*DHPR*) и 6-пирувоилтетрагидроптеринсинтетазы (*PTPS*), а не с мутациями в гене *PAH*. Таким образом, высокопроизводительное секвенирование представляется более продуктивным подходом для выявления известных и поиска новых мутаций в гене *PAH*, а также дает возможность в будущем провести поиск мутаций в генах альтернативных путей развития фенилкетонурии: *DHPR* и *PTPS*.

ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ СЕКВЕНИРОВАНИЯ СЛЕДУЮЩЕГО ПОКОЛЕНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ МУКОВИСЦИДОЗА

*М.В. Иванов, О.В. Глазова, А.Д. Мацвай,
С.А. Красовский, Е.Л. Амелина, К.Ф. Хафизов
Московский физико-технический институт (ГУ), Долгопрудный,
НИИ пульмонологии, Москва
e-mail: m4merg@gmail.com*

На сегодняшний день известно более 1500 мутаций в гене CFTR ассоциированных с развитием муковисцидоза (МВ), что затрудняет генетическое тестирование методами ПЦР и прямым секвенированием. С целью определения возможностей и ограничений технологии секвенирования нового поколения (NGS) для подтверждающей диагностики МВ, было проведено секвенирование гена CFTR для 89 пациентов на платформе Ion torrent PGM. Среди 82 пациентов с подтвержденным диагнозом МВ обнаружено 48 различных мутаций из них 25 обнаружены в единичных случаях. Все обнаруженные патогенные мутации были успешно подтверждены прямым секвенированием. Пациенты с мягким генотипом чаще проявляли легочную форму МВ (n=33 vs 3), в то время как с тяжелым – смешанную (n=44 vs 2, p<0.01). Сахарный диабет наблюдался только среди пациентов с тяжелым генотипом (22% vs 0%; p < 0.01). Для каждого пациента удалось обнаружить как-минимум две известные патогенные мутации в гетерозиготе или одну в гомозиготе. У десяти пациентов (12%) обнаружено 3 потенциально патогенные мутации. У троих из них обнаружен генотип [3849+10kbC>T, R668C; Phe508del], который был ассоциирован с пониженным весом пациентов (p=0.004). Обнаружить делеции 2,3 экзонов и дубликации 6,10 экзонов с помощью NGS не удалось. Широкий спектр обнаруженных мутаций в гене CFTR подтверждает экономическую и техническую эффективность применения NGS для подтверждения диагноза МВ, однако для применения в рутинной практике требуется валидация метода. Обнаруженные корреляции генотипа и фенотипа демонстрируют возможность использования результатов генетического тестирования для прогноза клинического проявления заболевания. Однако вопрос о важности модифицирующих мутаций в гене CFTR и прочих генах-модификаторах остается открытым. Работа выполнена при поддержке РФФИ (№15-04-04730).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ (NGS) ДЛЯ ПОДБОРА ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКОГО: ПРЕИМУЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ

*М.В. Иванов, Е.И. Новикова, Е.Н. Тельшева, П.А. Черненко,
В.В. Бредер, К.К. Лактионов, А. Баранова, В.А. Милейко
Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, Новосибирск
Российский научный центр рентгенорадиологии, Москва
Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина, Москва
School of Systems Biology, George Mason University, Manassas, VA, USA
ООО «Атлас ОнкоДиагностика», Москва
e-mail: m4merg@gmail.com*

Высокопроизводительное секвенирование (NGS) позволяет получать большой объем информации о геноме, по сравнению с рутинными методами, которая зачастую может быть использована для планирования терапии. С целью исследования спектра мутаций в драйверных генах у пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМКРЛ) было проведено секвенирование послеоперационных образцов 25 пациентов с НМКРЛ на платформе Illumina MiSeq с помощью панели Truseq Amplicon Cancer. В результате получены данные со средним покрытием не менее 2000x, что позволило анализировать даже малопредставленные соматические мутации. Всего клинически-значимые мутации обнаружены у 16 пациентов. В том числе, у 8 пациентов из 25 (32%) обнаружены активирующие мутации EGFR. При этом, у одного из них обнаружена вставка 18 н.п. в 19 экзоне, ранее не описанная в публично доступных базах данных (COSMIC). Эта мутация не была детектирована с помощью стандартного ПО Illumina Somatic Variant Caller, ввиду того, что она находится на краю чтения и приводит к некорректному выравниванию. Среди пациентов с мутациями EGFR у одного пациента выявлена вторичная мутация T790M, еще у одного пациента обнаружена вставка в 20 экзоне EGFR. Также обнаружены мутации в генах TP53 (40%), KRAS (20%), PIK3CA (4%), CTNNB1 (4%), BRAF (4%), PTEN (4%), AKT1 (4%). Таким образом, определение мутаций методом NGS позволяет дополнительно выявлять редкие мутации чувствительности к ингибиторам EGFR, а также исключать ложно-положительные результаты, характерные для ПЦР. При этом для корректного анализа данных NGS недостаточно использовать ПО от производителя и может потребоваться более сложный биоинформатический анализ. Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках проекта RFME-F160714X0098.

ПРЕДИКТОРЫ РАЗВИТИЯ АТЕРОСКЛЕРОЗА У БОЛЬНЫХ ОЖИРЕНИЕМ С УЧЕТОМ ГЕНОМНОГО АНАЛИЗА

*О.О. Черняк, И.В. Ворожко, А.Р. Богданов
ФИЦ питания и биотехнологии, Москва
e-mail: frau_helga@mail.ru*

Известно, что процесс атерогенеза начинается с дисфункции эндотелия и сопровождается накоплением липидных фракций в интиме сосудов. Однако нет достоверных данных о роли полиморфизма генов липидного обмена у пациентов с ожирением. Цель: изучить предикторы развития артериальной гипертензии у больных ожирением с учетом геномного анализа.

Было обследовано 123 больных ожирением в возрасте от 18 до 66 лет (34 мужчин и 89 женщин, средний возраст которых составил $38,6 \pm 2,09$ лет). Оценка состояния сердечнососудистой системы включала определение показателей кардиограммы с помощью аппарата SchillerAT-2 plus (Германия), данные эхокардиографии (Vivid 7 («GeneralElectric», США). На основании полученных результатов, были выделены две группы больных: 1-ю группу составили 50 пациентов с ожирением без сосудистой патологии (средний ИМТ – $42,8 \pm 0,12$), 2-ю группу составили 73 пациента с ожирением, осложненным атеросклерозом (средний ИМТ – $46,3 \pm 1,11$). Также были подобраны последовательности праймеров для проведения молекулярно-генетического исследования полиморфных локусов Ser447Ter гена LPL, Arg158Cys (с.526C>T) и Cys112Arg (с.388T>C) гена ApoE.

Сравнительный анализ распределения генотипов и аллелей полиморфного маркера Cys112Arg (аллель C) и Arg158Cys гена ApoE (аллель T) у больных с ожирением и атеросклерозом не показал статистически достоверных отличий по сравнению с группой больных с неосложненным ожирением ($p > 0,05$). Однако при изучении распределения аллелей гена LPL было установлено, что аллель Ter (G) имеет значительно более низкую частоту встречаемости в группе больных ожирением и атеросклерозом, чем у пациентов с неосложненным ожирением, что может указывать на его протективные свойства ($OR=0,43$ ($0,19 - 0,97$); $X^2=4,35$).

АНАЛИЗ ГЕТЕРОГЕННОСТИ И СУБГЕНОТИПИРОВАНИЕ ВИРУСА ГЕПАТИТА В У БОЛЬНЫХ ЛЕЙКОЗАМИ

*М.С. Беленикин, С.А. Кирьянов, А.В. Шанько, М.В. Соколова, М.В. Коноплева,
Т.А. Семененко, А.И. Баженов, М.А. Годков, Т.А. Туполева, А.П. Суслов
Федеральный научно-исследовательский центр
эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва
НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва
Гематологический научный центр, Москва
e-mail: genetics.nrcmpd@gmail.com*

Вирусный гепатит В является острой социально значимой проблемой. В работе проведены исследования коллекции изолятов вируса гепатита В (HBV) (2008-15гг) больных хроническим гепатитом (ХГВ), острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) и хроническим лимфобластным лейкозом (ХЛЛ) с помощью NGS (PGM, средняя глубина прочтения ~10000x). 25/32 образцов HBV имели генотип D; 3/32: A2; 1/32: A1; 3/32: рекомбинантный генотип D/E (D2/E, D3/E), сходный с D8. 25/32 образцов имели явно выраженную квазивидовую гетерогенность (квазивиды принадлежат к одному или разным субгенотипам HBV/D). Образцы генотипа D относятся к субгенотипам D2, D3, D1; точные субгенотипы 2 образцов определить не удалось. Анализ полученных и литературных данных позволил выявить ряд замен, потенциально ответственных за формирование устойчивости к антивирусной терапии. Гетерогенность изолятов с генотипом D по наличию двух и более кладов в группах ОМЛ, ХЛЛ и ХГВ составила 83%, 50% и 43%, соответственно. Построение филогенетических деревьев проводили по последовательностям гена S, а также всего вируса для более чем 300 HBV, включая найденные в NCBI рекомбинанты. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости коррекции классификации ряда субгенотипов HBV/D (например, объединения D3 и D6). Были найдены два новых субгенотипа-рекомбинанта (D2/E и D3/E). Найдено, что у больных лейкозом увеличение гетерогенности HBV происходит в основном за счет рекомбинационных областей гена X. При острой и хронической формах лейкоза аккумуляция мутаций в HBV/D происходит в разных рекомбинантных участках гена X. Анализ собственных и литературных полногеномных HBV данных демонстрирует необходимость совершенствования системы классификации субгенотипов HBV и учета квазивидового разнообразия на проводимую антивирусную терапию.

ТАРГЕТНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ДНК МОЧИ, ПЛАЗМЫ И ПАРАФИНОВЫХ СРЕЗОВ ТКАНЕЙ ПРОСТАТЫ ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ ПРОСТАТЫ

*Е. Шарова¹, К. Бабалян², Р. Султанов²,
А. Никитина^{1,2}, А. Васильев³, А. Говоров³, Е. Прилепская³,
С. Даниленко¹, Т. Бутусова¹, Л. Скородумова¹, Е. Кострюкова^{1,2}
¹ФНКЦ физико-химической медицины, Москва, Москва
²Московский физико-технический институт (ГУ), Долгопрудный
³МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва
e-mail: sharova78@gmail.com*

Одним из основных подходов к лечению рака предстательной железы (РПЖ) является анти-андрогенная терапия. Однако, не редки случаи развития к ней устойчивости, наличие которой выявляется уже на поздних стадиях прогрессии РПЖ. Перспективным способом выявления такой устойчивости на более ранних этапах представляется поиск генов, мутации в которых могут быть с ней ассоциированы и обнаружены в моче и/или плазме пациентов.

Целью нашего исследования являлось изучение представленности соматических мутаций в генах, ассоциированных с устойчивостью к анти-андрогенной терапии, в моче и плазме больных РПЖ. В исследовании участвовали 14 пациентов: 11 с РПЖ и 3 с доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ) в качестве группы контроля. Из 11 раковых пациентов по соотношению суммы Глиссона и уровня ПСА 2 относились к группе низкого риска, 7 к группе среднего риска и 2 к группе высокого риска биохимического рецидива. У всех пациентов перед операцией (радикальной простатэктомией или аденомэктомией) были взяты образцы мочи и плазмы крови, на основе ДНК из которых были приготовлены и отсекувенированы библиотеки с использованием панели Human Prostate Cancer Panel (Qiagen), содержащей 1837 пар праймеров для 32 генов. Мутации 7 генов панели (APC, AR, PTEN, ZFNХ3, TP53, PIK3CA, MYC) ассоциированы с устойчивостью к антиандрогенной терапии.

Нами было обнаружено более 4 одиночных соматических мутаций на пациента с РПЖ, не встречающихся у пациентов с ДГПЖ. В моче и плазме обнаруживается от 20% до 78% одиночных раковых соматических мутаций. Мутации в генах APC, AR, PTEN, ZFNХ3, TP53, PIK3CA, MYC были обнаружены у всех пациентов с РПЖ, в том числе и в моче и/или плазме. Часть из этих мутаций ранее обнаруживалась у пациентов с нечувствительностью к антиандрогенной терапии, но их роль в развитии нечувствительности пока остается неясной.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки РФ (субсидия No 14.607.21.0068, уникальный идентификатор RFME-F160714X0068).

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ИММУННОГО ОТВЕТА У ДЕТЕЙ С ИНФЕКЦИОННЫМИ ОСЛОЖНЕНИЯМИ ПРИ АНТИЛЕЙКЕМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

М.А. Авдони́на¹, И.С. Абрамов¹,

А.Ю. Иконникова¹, Ю.И. Амму́р², Т.В. Наседкина^{1,2}

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

²Федеральный научно-клинический центр детской гематологии,

онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва

e-mail: marysheilaus@gmail.com

На сегодняшний день химиотерапия остается самым распространённым и наиболее эффективным методом лечения лейкозов, но часто она сопряжена с развитием выраженных побочных реакций. Серьезную проблему в детской онкогематологии представляет возникновение инфекционно-воспалительных осложнений, приводящих к быстрой генерализации инфекции и развитию сепсиса. Генетическая изменчивость в генах иммунного ответа играет важную роль в развитии инфекционных заболеваний и сепсиса. 24 образца ДНК пациентов, имевших тяжелые инфекционные осложнения в ходе терапии, исследовали методом массового параллельного секвенирования. Был проведен одновременный анализ кодирующих участков 17 генов, участвующих в регуляции иммунного ответа: NOD2, NLRP3, STAT1, STAT3, CARD9, IL10, IL17RA, IL12RB1, IL1A, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, PTPN22, IL7R, IL7, MYD88. Приготовление библиотек фрагментов ДНК осуществляли по стандартному протоколу (Rapid Library), используя библиотеку зондов SeqCap EZ NimbleGen. NGS образцов пациентов проводили на приборе GS Junior/454 (Roche). Анализ данных секвенирования выявил 212 однонуклеотидных замен, приводящих к замене аминокислоты, в том числе, информативные генетические маркеры PTPN22 с.1858C>T (rs2476601), TLR4 с.896 A>G (rs4986790) и с.1196 C>T (rs4986791), IL7R с.197T>C (rs1494555) и с.412G>A (rs1494558). Результаты NGS подтверждены секвенированием по Сэнгеру. Выявление аллельных вариантов генов иммунного ответа, ассоциированных с нарушениями в работе иммунной системы, у детей с лейкозами позволит прогнозировать развитие инфекционных осложнений в ходе лечения и разрабатывать адекватную сопроводительную терапию. Работа выполняется при поддержке Федеральной целевой программы Министерства образования и науки России (Грант №14.604.21.0117, RFMEFI60414X0117).

BRCA-ТЕСТИРОВАНИЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ NGS ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И РАКЕ ЯИЧНИКОВ

*Т.С. Дубровина, А.В. Семьянихина, И.С. Абрамов,
А.М. Данишевич, О.Н. Архипова, М.Г. Филиппова, Л.Н. Любченко
Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина, Москва
e-mail: fuechsin@mail.ru*

Рак молочной железы (РМЖ) и рак яичников (РЯ) занимают лидирующее положение как в структуре заболеваемости женского населения злокачественными новообразованиями, так и в структуре смертности от них. По данным исследований ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» до 6% случаев РМЖ и до 21% случаев РЯ обусловлены мутациями в генах BRCA1/2.

Проведен анализ геномной ДНК 13 пациенток: 4 с диагнозом РМЖ, 4 с диагнозом РЯ, 5 пациенток с первично-множественными злокачественными новообразованиями органов женской репродуктивной системы. Средний возраст больных на момент постановки диагноза 41 год (от 23 до 55 лет). Семейный анамнез пациенток был отягощен РМЖ, РЯ, раком предстательной и поджелудочной железы. Все пациентки имели отрицательные результаты тестирования на наличие 8 частых мутаций в генах BRCA. Для создания библиотек использовали таргетную амплификацию всей кодирующей последовательности генов BRCA с использованием набора BRCA MAST (Multiplicom). Библиотека включала 93 ампликона длиной от 550 до 650 пар оснований. Секвенирование проводили на платформе GS Junior (454/Roche).

Выявлено 56 различных полиморфизмов и мутаций. У 5 из 13 пациенток (38,5%) обнаружены нонсенс-мутации p.Tyr1563Ter, p.Arg1751Ter в гене BRCA1 и p.Lys437Aspfs, p.Ser599Tyrfs, p.Pro2334Thrfs в гене BRCA2, приводящие к формированию преждевременного стоп-кодона и зарегистрированные в международных базах данных как клинически значимые. У трех пациенток были выявлены миссенс-мутации p.Trp1837Arg в гене BRCA1 и p.Leu1019Val, p.Asp1420Tyr в гене BRCA2 с неизвестным клиническим значением. Данные NGS были подтверждены секвенированием по Сэнгеру.

Выводы: NGS является эффективным методом выявления герминальных мутаций у пациенток с наследственными формами РМЖ и РЯ.

ПАТОГЕННЫЕ МУТАЦИИ В ГЕНОМЕ ЗДОРОВОГО ЧЕЛОВЕКА

М.В. Орлова
ООО «Генотек», Москва
e-mail: orlova@genotek.ru

Критерии патогенности мутаций в геноме человека меняются. Чтобы убедиться в адекватности общепринятых критериев, мы проверили экзомы здоровых людей на наличие патогенных мутаций по стандартам ACMG и AMP. Эта процедура позволяет выявить ошибки и понять, в чём неверно определение патогенности. Мы убедились, что найденные мутации не являются ошибками секвенирования. Мутации в одном образце (полногеномное секвенирование) были верифицированы двумя секвенированиями экзома с наборами от разных производителей и результатами микроматричного анализа. Две из трех мутаций были обнаружены во всех исследованиях, неподтвержденная мутация оказалась ошибкой работы алгоритма GATK. Это подтвердило, что мы можем анализировать патогенные мутации на выборках только одного типа экспериментов. Для выборки из 62 экзомных секвенирований здоровых людей определившиеся патогенные мутации разделились на три группы:

1. Патогенность данных мутаций доказана слабо: они описаны лишь в одной публикации и позже не исследовались. И даже в этой статье они описаны лишь как вызывающие предрасположенность, но не обязательно болезнь.
2. Мутации были определены как патогенные, однако, в действительности заболевание развивается лишь при различных сопутствующих факторах, таких как прием определенных препаратов (нарушен метаболизм лекарственных средств) или алкоголизм.
3. Один неочевидный случай — мутация, вызывающая синдром Штадгарта, который проявляется с возрастом. Убедиться в настоящий момент, будет человек здоров или нет, невозможно. Таким образом, основные ошибки, которые приводят к определению патогенных мутаций у заведомо здоровых людей, это наличие в базах недостаточно исследованных мутаций и недостаточность критериев для фильтрации мутаций, ассоциированных с заболеванием, но не вызывающих его однозначно.

ТРИО-АНАЛИЗ: ОТВЕТЫ ИЛИ НОВЫЕ ВОПРОСЫ?

М.С. Беленикин

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва
e-mail: genetics.npcmpd@gmail.com

Экзомное секвенирование получает все большее распространение в клинической практике. При анализе результатов NGS наибольшую сложность представляет поиск взаимосвязи клинической картины заболевания и вариантов с неописанной клинической значимостью. При изучении сложных случаев для увеличения информативности проводят трио-исследования (анализ данных пробанда и родителей), главная цель которого – поиск *де-ново* мутаций у пробанда. Цель данного кейса – демонстрация числа «*де-ново*» вариантов, которое может наблюдать врач-генетик при анализе данных трио. Приводимые результаты получены в ходе переанализа данных полноэкзомного секвенирования трио (секвенирование произведено в западной компании, одном из лидеров подобного рода исследований). Статистика и данные секвенирования свидетельствуют о высоком качестве пробоподготовки и секвенирования всех трех образцов и соответствия их требованиям, предъявляемым к подобного рода исследованиям. Средняя глубина прочтения: >120x. В данном кейсе остановлюсь только на согласованности данных и числе «*де-ново*» мутаций, определяемых по данным NGS. В файле вариантов пробанда представлено 120 гомозиготных и 1329 гетерозиготных «*де-ново*» вариантов (т.е. отсутствующих у хотя бы одного родителей) (при 50x; при снижении порога прочтения до 30x число вариантов возрастает в разы). У родителей было найдено суммарно 468 гомозиготных вариантов, отсутствующих у пробанда в гетерозиготном виде, что снижает информативность «*де-ново*» находок у пробанда. Хромосомных аномалий обнаружено не было (ХМА). Кейс наглядно демонстрирует наличие объема данных, потенциально являющихся артефактами NGS и требующих обязательного подтверждения другими методами исследований и рассмотрения исключительно в рамках клинической картины.

ОПЫТ ИДЕНТИФИКАЦИИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ СОБЫТИЙ ПРИ ОСТРОМ МИЕЛОИДНОМ ЛЕЙКОЗЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА RNA-SEQ

*Д.В. Изотов, А.В. Виноградов, П.Н. Меньшанов
Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург
e-mail: phoenix@yandex.ru*

Известно, что изолированное повреждение протоонкогена или гена-супрессора не является достаточным условием для злокачественной трансформации, также значительную роль играют вторичные повреждения и мутации резистентности к химиотерапии. Цель исследования – детекция молекулярно-генетических событий при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) методом RNA-Seq. Исследована проба костного мозга пациента с ОМЛ М7 возрастом 49 лет. Тотальную РНК выделяли набором «QIAamp RNA Blood Mini Kit», после выделения секвенировали на полногеномном секвенаторе «HiSeq 2000». Для образца было прочитано 7,407,406,054 пар оснований, получены 42,4 млн. 100-нуклеотидных односторонних последовательностей (Q20=96,88%, Q30=91,79% по PHRED). Выравнивание последовательностей проводили по алгоритму COBWEB относительно референтного генома человека hg19 и базы последовательностей транскриптов RefSeq. После выравнивания идентифицирована геномная локализация для 31,9 млн. последовательностей, неидентифицированные последовательности исключены из анализа. Точечные мутации определены в 11 целевых генах и были представлены 4 инсерциями и 8 делециями, приводящими к сдвигу рамки считывания, а также 12 несинонимичными нуклеотидными заменами. Среди замен нуклеотидов преобладающим вариантом были трансверсии (7 наблюдений). В 5 генах (KIT, MLL, CASP7, CASP9, SF3B1) наблюдались одновременно несколько мутаций, в остальных – по одной. Гомозиготные мутации определены в 3 генах (ATM, CASP9, TP53). В исследованном случае выявлены дефекты апоптозного каскада как на уровне регуляторов, так и каспаз, нарушения в системе регуляции пролиферации. Таким образом, метод секвенирования транскриптома позволяет комплексно выявлять молекулярно-генетические нарушения, что может быть использовано для персонализированного подхода к терапии. Участие в конференции поддержано компанией «БиоЛайн».

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ NGS

*Е.И. Новикова, Г.П. Снигирева
Российский научный центр рентгенорадиологии, Москва
e-mail: sni_gal@mail.ru*

Определение наследственного характера заболевания у пациентов с диагнозом рак молочной железы (РМЖ) необходимо для назначения адекватного лечения, а также для проведения профилактических мероприятий по предупреждению и ранней диагностики онкопатологии у здоровых родственников-носительниц мутаций. К настоящему времени накоплена информация о наследственных мутациях в генах BRCA1/2, однако они не охватывают весь спектр наследственных форм РМЖ. Мутации в генах BRCA1/2 наблюдаются не более чем в 30% семейных случаев РМЖ. Цель: Выявление наследственных мутаций, ассоциированных с риском развития РМЖ. Материалы и методы: 174 пациента с клиническими признаками наследственного заболевания были отобраны по признаку отсутствия часто встречающихся мутаций в генах BRCA1/2 и протестированы с применением технологии NGS на платформе MiSeq (Illumina) с использованием панели TruSight Cancer, включающей 94 гена, ассоциированные с риском развития онкопатологии. Результаты: У 65 пациентов были идентифицированы 82 клинически значимых генетических варианта в 20 генах. У 49 из них выявлены патогенные мутации в генах, ассоциированных с риском развития РМЖ (BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, NBN, PALB2, MSH6), среди которых 49% составляют редкие мутации в генах BRCA1/2. У 16 пациентов найдены мутации в генах, связь повреждений в которых с риском развития РМЖ на данный момент не подтверждена. 15 человек являются носителями одновременно нескольких клинически значимых мутаций. Выводы: Метод NGS позволил, в дополнение к стандартным методам, выявить среди пациентов с клиническими признаками наследственного РМЖ 49 пациентов (28%), являющихся носителями клинически значимых герминальных мутаций в генах предрасположенности к РМЖ.

ГЕНОМНЫЕ ПРЕДИКТОРЫ ПРИ ПРОГНОЗИРОВАНИИ РИСКА КАЛЬЦИФИКАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОТЕЗОВ КЛАПАНОВ СЕРДЦА, ИМПЛАНТИРОВАННЫХ В МИТРАЛЬНУЮ ПОЗИЦИЮ

*А.В. Понасенко, М.В. Хуторная,
А.Г. Кутихин, Н.В. Рутковская, Л.С. Барбараш
Научно-исследовательский институт комплексных
проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово
e-mail: ponasenkoav@yandex.ru*

Биологические протезы обеспечивают более физиологичные параметры внутрисердечной гемодинамики, не требуют пожизненного применения антикоагулянтов, при дисфункции не вызывают жизнеугрожающих осложнений. В 20% случаев причиной дисфункции протеза является его кальцификация, с последующими гемодинамическими нарушениями и необходимостью повторных операций. Поиск реципиент-зависимых факторов продолжается, а геномные предикторы кальцификации биологических протезов не выявлены. Цель. Определить генетические детерминанты высокого риска кальцификации имплантированного биологического протеза. Материалы и методы: ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции из крови от 72 реципиентов биологических клапанов сердца, установленных в митральную позицию. Генотипирование методом РТ-ПЦР. Как критерии риска оценивали клинические предиктивные факторы, с наибольшей частотой встречающиеся в группе (пол, возраст, степень недостаточности митрального клапана, ФК сердечной недостаточности, артериальная гипертензия, сахарный диабет, ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, заболевание периферических артерий, острое нарушение мозгового кровообращения, пиелонефрит) и генетические маркеры (48 сайтов 23 генов: CRP, IL1 β , IL1F9, IL6, IL6R, IL8, IL10, IL12B, TNF α , TLRs (1, 2, 4, 6, 8), TREM-1, APOE, LIPC, NOTCH1, VDR, CASR, OPG, LPA, CALCR). Статистический анализ осуществляли методом бинарной логистической регрессии с пошаговым включением предикторов. Результаты. Определены четыре критерия, имеющих наибольшее прогностическое значение: вариабельные сайты гена VDR rs2228570 и rs731236 (ОШ=28.27, 95%ДИ=4.06-196.59, p=0.0007 и ОШ=11.10, 95%ДИ=1.95-63.11, p=0.0066 соответственно), сайт rs2229238 (ОШ=12.56, 95%ДИ=2.35-67.19, p=0.0029) IL6R и мужской пол (ОШ=7.18, 95%ДИ=1.56-33,02, p=0.0132). Участие в конференции поддержано компанией «Евроген».

Подписано в печать 16.05.2016 г.

Заказ №4517 Тираж: 300 экз.

Печать цифровая.

Типография «Премиум Принт»

Москва, ул. Миклухо-Маклая 8/3

8 (499) 739-56-97

www.premium-print.ru