

11-Я ВСЕРОССИЙСКАЯ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
ЦЕНТРОВ ГЕНОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
МИРОВОГО УРОВНЯ

ГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ И РЕДАКТИРОВАНИЕ

СБОРНИК ТЕЗИСОВ



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ "РОССИЙСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.И. ПИРОГОВА" (ФГАОУ ВО РНИМУ ИМ. Н.И. ПИРОГОВА МИНЗДРАВА РОССИИ)

«Геномное секвенирование и редактирование»

СБОРНИК ТЕЗИСОВ

11-й Всероссийской научно-практической конференции центров геномных исследований мирового уровня

Москва РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России 2023 Г27 «Геномное секвенирование и редактирование» СБОРНИК ТЕЗИСОВ 11-й Всероссийской научно-практической конференции центров геномных исследований мирового уровня. Москва: РНИМУ им. Н.И. Пирогова, 2023. — 24 с

ISBN 978-5-88458-663-5

В сборнике представлены тезисы докладов-участников конференции, посвящённые новейшим методам анализа и модификации генома различных видов организмов, включая человека.

УДК 577.21 ББК 28.04

ISBN 978-5-88458-663-5

Определение состава микробиологических сообществ, способных разрушать адгезивные живописные материалы

Д.А. Авданина¹, В.И. Кукушкина¹, Н. Симоненко², А.И. Голубейко³, А.А. Жгун¹

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН, институт Биоинженерии им. К.Г. Скрябина, г. Москва, ² Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курчакова РАН, г. Москва, ³ Государственная Третьяковская галерея, Москва

zzhgun@mail.ru

Адгезивные материалы используют в живописи для устойчивого соединения красочного слоя с холстом. Как и большинство живописных материалов, в случае локальных отклонений от условий музейной консервации, они могут быть потенциальными источниками питания специализированных микробиомов. Поэтому на первом этапе работы сравнили биозащитные свойства 6-ти типов адгезивных материалов природного и синтетического происхождения. Для этого 9 тест-культур, полученных на основании композиций микроорганизмов (ранее изолированных в Государственной Третьяковской галерее), инокулировали на 12 вариантов макетов с 6-ю типами адгезивных материалов, после и без искусственного старения. Тест-культуры содержали от 12-ти до 50-ти ранее охарактеризованных и выделенных в чистые линии микроорганизмов и проявляли рост на большинстве макетов. Создание тест-культур позволило сравнить биозащитные свойства материалов, поскольку изученные на предварительном этапе чистые культуры не проявляли свойств биодеструкции против изучаемых макетов. Для характеристики консорциумов, разрушающих адгезивные материалы, отобрали пробы, выросшие после инокуляции тест-культур микроорганизмов. Провели их характеристику методом SEM, выделили метагеномную ДНК и амплифицировали филогенетически-значимые районы рДНК прокариот (V3/V4) и грибов (ITS2) для последующего секвенирования на платформе Illumina. Сравнительный анализ микробиомов, способных разрушать различные адгезивные материалы позволит вычленить доминантных деструкторов, что открывает возможность для эффективной консервации и реставрации при музейном хранении живописных произведений и таргетированного подбора антисептиков нового поколения.

Микробиологическое сообщество залов древнерусской живописи Государственной Третьяковской галереи: практическое значение определения микроорганизмов-деструкторов темперной живописи

Жгун А.А.¹, Авданина Д.А.¹, Потапов М.П.¹, Федоров Д.Е.², Троян Е.В.³, Шитов М.В.³

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт Биоинженерии им. К.Г. Скрябина, Москва ² ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва, ³ Государственная Третьяковская галерея, Москва

zzhgun@mail.ru

В залах древнерусской живописи основного исторического здания Государственной Третьяковской галереи (ГТГ, Лаврушенский переулок, 10) в течение десятилетий в результате прессинга со стороны регламентированных процессов музейной консервации и реставрации происходила селекция микроорганизмов, способных выживать в таких экстремальных условиях. Анализ микробиома экспонатов и поверхностей залов Домонгольского периода (№56), Ростово-суздальской школы (№57) и Иконописи XVI-XVIII вв. (№61) показал, что доминантными представителями среди нескольких сот микроорганизмов оказались ксерофильные грибы, относящиеся к родам Aspergillus (STG 25G, STG-57, STG-86, STG-93W и STG-106), Cladosporium (STG-52B и STG-93B), Ulocladium (STG-36), Simplicillium (STG-96), Microascus (STG-103), Penicillium (STG-117) и Mucor (STG-30) [Zhgun A, et. al, 2020, PLoS ONE 15(4):e0230591]. Эти микроорганизмы сумели выделить в чистые линии, показали, что примерно половины из них характерна для других ведущих музеев мира. Также, с использованием специальных макетов, изготовленных в отделе реставрации ГТГ, показали, что такие микроорганизмы способны эффективно разрушать органические материалы, используемые в темперной живописи и научной реставрации. Полученное знание о составе микробиома музея имеет практическое значение, связанное с разработкой превентивных и экстренных мер борьбы с биопоражением, а также разработкой таргетированных антисептиков нового поколения.

Гонококковый генетический остров в глобальной популяции Neisseria gonorrhoeae: генетическое разнообразие и ассоциация с устойчивостью к противомикробным препаратам

Кравцов Д.В., Шаскольский Б.Л., Кандинов И.Д., Дементьева Е.И., Грядунов Д.А.

Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН)

solo13.37@yandex.ru

Гонорея, возбудителем которой являются грамотрицательные микроорганизмы N. gonorrhoeae — одна из наиболее распространенных в мире инфекций, передаваемых половым путем. История применения противомикробных препаратов для терапии N. gonorrhoeae свидетельствует о стремительном распространении устойчивости к ним, что объясняется исключительной способностью этой бактерии к изменению своего генетического материала, в том числе, благодаря механизмам горизонтального переноса генов. Одним из таких механизмов у N. gonorrhoeae является система секреции IV типа, кодируемая генами гонококкового острова (gonococcal genetic island, GGI). Она позволяет N. gonorrhoeae выбрасывать во внеклеточную среду ДНК, которая затем специфично распознается пилями клетки-реципиента и рекомбинируется в ее геном.

Нами выполнен анализ GGI в глобальной выборке в 14763 геномов изолятов N. gonorrhoeae, собранных в 1996-2019 годах в 68 странах, включая 48 секвенированных и собранных нами de novo геномов российских изолятов (BIOPR]ECT PRJNA768989). Задачами работы являлось изучение генетического разнообразия GGI, выявление ассоциации между GGI и молекулярными типами из традиционных схем молекулярного типирования NG-MAST (Neisseria gonorrhoeae Multi-Antigen Sequence Typing) м MLST (Multi-Locus Sequence Typing), а также установление связи GGI с устойчивостью к антимикробным препаратам.

По литературным данным, GGI встречается примерно у 80% изолятов N. gonorrhoeae. В ходе же нашего анализа выяснилось, что только 66% изолятов имеют GGI, при этом 22% из них имеют изменения и поломки (стоп-кодоны, сдвиги рамки считывания и другие) в генах GGI, приводящие к потере функциональности, т.е. способности секретировать ДНК.

На основании кластеризации и филогенетического анализа предложена модель, описывающая разделение глобальной популяции изолятов N. gonorrhoeae, имеющих GGI, на три суперкластера: А1, А2 и В, насчитывающих, в сумме, 51 кластер. Информация о принадлежности к кластеру позволяет сделать заключение как о генном составе, так и об активности GGI. В частности, показано, что внутри суперкластеров А1 и А2 изоляты большинства кластеров обладают функциональным GGI, в то время как все изоляты кластеров, входящих в состав суперкластера В — нефункциональным.

Найдено, что схемы молекулярного типирования MLST и NG-MAST (с точностью 83% и 91%, соответственно) позволяют сделать вывод как о наличии GGI, так и о кластере GGI, а значит и о структуре гонококкового острова и его способности секретировать ДНК.

Проведено попарное сравнение распределения устойчивости к антимикробным препаратам у изолятов с функциональным GGI и изолятов без GGI. Установлено статистически достоверное различие (р << 0,01) между долями изолятов N. gonorrhoeae, устойчивых к цефиксиму (доля устойчивых изолятов с функциональным GGI была больше в 6,0 раз, чем без него), тетрациклину (в 3,4 раза), пенициллину (в 2,6 раза) и ципрофлоксацину (в 1,2 раза). В то же время, для азитромицина наблюдалась обратная картина – доля устойчивых изолятов с функциональным GGI в 5 раз меньше, чем без него. При сравнении популяций изолятов, имеющих функциональный и нефункциональный GGI, было получено, что доля устойчивых к цефиксиму изолятов в этом случае была повышена в 3,4 раза, к тетрациклину - в 3,9 раза, к пенициллину - в 2,9 раза, к ципрофлоксацину - в 2,2 раза, но, в то же время, к азитромицину — не изменилась. Последнее свидетельствует об отсутствии связи GGI и устойчивости N. gonorrhoeae к азитромицину, о возможности ее распространения иным механизмом, что требует дальнейших исследований.

Работа выполнена при поддержке Соглашения с Министерством науки и высшего образования РФ № 075-15-2019-1660.

Организация полногеномного секвенирования десятков тысяч образцов генома человека

Антоненко А.Н., Белов Р.О., Родионова Д.А., Пудова Е.А., Панферова А.А., Леонова В.С., Золотопуп А.А., Голованова М.А., Василенко А.К., Губона М.А., Сафина С.А., Ревкова М.А., Уланова П.В., Криницына А.А., Беленикин М.С.

Медико-генетическая лаборатория ООО «Эвоген»

antonenko@evogenlab.ru

Организация лабораторного процесса высокопроизводительного секвенирования большого количества полных геномов человека в рамках небольшой лаборатории достаточно нетривиальная задача. Процесс должен не только включать все этапы: преаналитическую обработку биоматериала, подготовку образцов к секвенированию (выделение ДНК, подготовка библиотек), проведение секвенирования с заданными параметрами качества и объема данных, биоинформатическую обработку данных секвенирования, но и обеспечивать минимальные риски кроссконтаминации образцов в процессе прохождения пробоподготовки. Собственная приборная и лабораторная база компании на сегодняшний день позволяет в потоковом режиме проводить свыше 1500 полногеномных исследований человека в месяц. Для работы с образцами на внутрилабораторном этапе был разработан и оптимизирован собственный рабочий процесс, охватывающий все этапы: от обработки биоматериала до первичной обработки полученных данных секвенирования. Отдельное внимание уделялось сравнению результатов секвенирования на DNBseq-G400 и DNBseq-T7 и оценке параметров секвенирования по результатам анализа случайных 500 образцов на DNBseq-T7 (протокол v1.3: Q30 > 90%) и 250 образцов на DNBseq-G400 (125 образцов: v1.2: Q30 93,8%; 125 образцов: v1.3: Q30 93,2%).

В рамках выполнения научно-исследовательских работ по проектам заказчиков за два года на платформе MGI (DNBseq-G400, DNBseq-T7) было проведено высокопроизводительное секвенирование (со средней глубиной прочтения 30х) нескольких десятков тысяч полных геномов как условно-здоровых людей, так и геномов лиц с наследственными и орфанными заболеваниями. Полученные данные 20000 полных геномов, из которых 75% составляют геномы условно-здоровых лиц, были использованы для оценки частот вариантов.

Многолетний эволюционный эксперимент на мицелиальном грибе Podospora anserina

Кудрявцева О.А.¹, Герасимов Е.С.¹, Гаспарян А.А.¹, Агроскин С.М.¹, Белозерский М.А.², Дунаевский Я.Е.²

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва ² НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

for-ol-ga@yandex.ru

Длительные эволюционные эксперименты, проводимые в строго контролируемых лабораторных условиях на различных микроорганизмах, представляют большой интерес. Они призваны описывать эволюционную динамику экспериментальных популяций, а также выяснять молекулярные механизмы наблюдаемых изменений.

Наша научная группа проводит непрерывный эволюционный эксперимент с 2012 года, используя для этого модельный аскомицетный гриб Podospora anserina. Рост восьми независимых линий поддерживают в жидкой питательной среде методом единовременных серийных пассажей. В данном сообщении мы приводим результаты полногеномного анализа всех экспериментальных линий спустя 8 лет от старта проекта, что соответствует 532 пассажам.

Принятые в настоящей работе достаточно строгие критерии в сумме позволили выявить 312 достоверных однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs) и 39 коротких инсерционно-делеционных полиморфизмов (инделей). Причем, 153 SNPs были обнаружены в кодирующих участках геномов. Зная, что кодирующие последовательности составляют около 47% генома Р. апserina, можно говорить о практически равной вероятности фиксации точечных замен в кодирующих и некодирующих областях. Синонимических, или «молчащих» мутаций было выявлено всего 38. Существенное преобладание значимых замен дает основание полагать, что, по крайней мере, часть из них носит адаптивный характер. Среди них 42 были классифицированы как нонсенс- и 73 как несинонимические мутации. Чуть более половины инделей (21 из 39) также локализованы в кодирующих областях, причем большая часть из них (17 из 21) — это фреймшифт-мутации. Практически для всех мутаций в нашей модельной системе выполняется эмпирическое правило: единожды закрепившись, данная мутация сохраняется во времени.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, грант № 23-24-00318.

Лабораторная система как ядро лабораторного процесса

Родионова Д.С., Антоненко А.Н., Белов Р.О., Панферова А.А., Криницына А.А., Беленикин М.С.

Медико-генетическая лаборатория ООО «Эвоген»

alekseevna.dari@gmail.com

Развитие технологии высокопроизводительного секвенирования за последние 10 лет способствовало значительному увеличению объёмов полногеномных исследований, которые становятся все более распространены и доступны. По мере увеличения потоков исследований возникает необходимость разработки лабораторных протоколов и систем для маршрутизации большого количества образцов с учетом особенностей процесса. Для оперирования образцами в лаборатории был разработан и оптимизирован внутренний процесс с логикой от преаналитической обработки биоматериала до секвенирования. В случае выпадения образца по одному из критериев оценки качества образец возвращается на один из предыдущих этапов. Основой процесса является 96-образцовый пул. Сборка 96-образцового планшета для этапа подготовки библиотек производится на основе информации об образцах ДНК, прошедших оценку по количеству и качеству с учетом информации о концентрации (используется для нормализации; учитывается совместимость баркодов). Все этапы, допускающие вероятность ошибки по причине человеческого фактора, верифицируются с помощью сканера. Подготовленные библиотеки группируются и направляются на этапы секвенирования на приборы DNBseq-T7 и DNBseq-G400. В зависимости от количества полученных данных секвенирования в соответствии с критериями заказчика производится досеквенирование нужного объема данных по образцу. Отдельно стоит отметить логику работы с данными. После секвенирования данные помещаются в систему хранения данных, и для проведения последующей биоинформационной обработки извлекаются по набору внутренних координат, представляющих собой уникальные номер образца и номер проточной ячейки, используемую дорожку (в случае DNBseq-G400), номер соотнесенного с образцов баркода. Разработанная логическая система находится в стадии цифровизации

Возможности применения SNP-анализа растений в экспертно-криминалистической практике

Рябухина М.В., Одиноков Г.Н.

Экспертно-криминалистический центр МВД РФ

Разработка высокопроизводительных методов секвенирования, для определения однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) привела к революции в их использовании в качестве молекулярных маркеров. Определение однонуклеотидных полиморфизмов становятся предпочтительным методом в генетическом анализе и широко используются при исследовании хозяйственно ценных видов растений. Применение SNP маркеров в молекулярно-генетическом анализе хозяйственно ценных растений позволяет проводить построение генетических карт с высоким разрешением, картирование ассоциаций, генетическую диагностику, анализ генетического разнообразия, идентификацию сортов, филогенетический анализ. В последующем может применятся в экспертной практике при расследовании преступлений в сфере экологии и природопользования, контроля поставки древесины и продукции на ее основе, подтверждения законности лесозаготовки, регистрации и маркирования лесоматериала. Использование SNP анализа становится более распространенным с учетом снижения стоимости и увеличения производительности анализов SNP, а также появлением отечественных разработок.

Генетические нарушения при немелкоклеточном раке легкого высокого риска метастазирования

А.А. Щеголева, Т.С. Геращенко, Р.С. Воробьев, О.Е. Родионов, О.В. Панкова, В.М. Перельмутер, Е.В. Денисов

НИИ онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, Томск

shegolmay@yandex.ru

Основными причинами высокой смертности пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) являются позднее обнаружение опухолевого процесса и высокая частота гематогенного метастазирования. Поиск способов предсказания вероятности метастазирования НМРЛ является актуальной задачей. Ранее коллективом НИИ онкологии Томского НИМЦ было показано, что наличие изолированной базальноклеточной гиперплазии (иБКГ) связано с высокой частотой гематогенного метастазирования. Механизмы, обусловливающие данную ассоциацию неизвестны.

Целью исследования явилось изучение генетических нарушений у больных НМРЛ с высоким риском гематогенного метастазирования.

Материалы и методы. В исследование включены 70 больных НМРЛ, разделенных на две группы: 1) пациенты с высоким риском метастазирования (с наличием иБКГ); 2) пациенты с низким риском метастазирования (без иБКГ). Образцы ДНК выделяли из свежезамороженных образцов опухолевой ткани легкого и периферической крови с последующей подготовкой полноэкзомных библиотек набором SureSelect XT Human All Exon v. 7. Секвенирование проводили на платформе NextSeq 2000. Анализ данных секвенирования выполняли с помощью инструментов GATK, Mutect2, ANNOVAR.

Результаты. У больных с высоким риском метастазирования обнаружены мутации в 25 генах, которые не встречались у пациентов с низким риском метастазирования. Функциональное аннотирование генов, специфичных для больных с высоким риском метастазирования, выявило их вовлеченность в регуляцию клеточной подвижности и адгезии, организацию внеклеточного матрикса и другие процессы.

Таким образом, обнаруженные особенности мутационного профиля НМРЛ могут лежать в основе ассоциации высокого риска метастазирования с иБКГ.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (№ 20-75-10060).

Распространенность герминальных вариантов, ассоциированных с развитием онкологических заболеваний, в популяции Российской Федерации

Гусакова М.С., Джуманиязова И.Х., Зеленова Е.А., Каштанова Д.А., Иванов М.В., Мамчур А.А., Румянцева А.М., Терехов М.В., Митрофанов С.И., Голубникова Л.А., Акиньшина А.И., Грамматикати К.С., Калашникова И.Г., Мальченко А.В., Максютина В.В., Гуськова Н.И., Маралова Е.Д., Ивашечкин А.А., Закубанский А.В., Юдин В.С., Макаров В.В., Кескинов А.А., Юдин С.М.

ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства

dzhumaniiazova.irina@gmail.com

В работе исследуются случайные находки патогенных и вероятно патогенных вариантов 28 генов, ассоциированных с онкологическими синдромами, у населения Российской Федерации.

В анализ вошли результаты полногеномного секвенирования 74996 человек из 52 регионов РФ и 2872 долгожителя (90 и более лет). Данные для рекомендованных АСМG (3 версия, 2021 год) 28 генов, были проаннотированы при помощи InterVar (v.27.07.21), сохранены экзонные несинонимичные замены, вставки/делеции участков экзонов и сайтов сплайсинга. Полученные варианты были разделены на группы по интерпретации в ClinVar, большинство были перепроверены экспертами вручную с использованием данных литературы.

Среди 74996 человек мы сообщаем о 279 патогенных (П) и вероятно патогенных (ВП) вариантах (232 П и 46 вП) и 216 ожидаемо патогенных (ОП) вариантов неопределенного значения (из них 175 вариантов обнаружены de novo). Наиболее распространенной оказалась замена гза6053993 (ВП) гена МUТУН (АF – 0.0052). У 1365 (1.82%) участников имелись П или ВП варианты генов АРС, ВМРR1А, ВRCA1,ВRCA2, МЕN1, МLН1, МSH2, МSH6, МUТУН, NF2, PALB2, PMS2, PTEN, RET, SDHAF2, SDHB, SDHC, SDHD, SMAD4, TMEM127, TP53, TSC1, TSC2, VHL, WT1, большинство носителей из Москвы или МО. Среди 2872 долгожителей – 21 П и ВП, 16 ОП вариантов, П и ВП варианты встречались у 55 (1.98%) участников в генах SDHD, TP53, BRCA1, BRCA2, MUТУН, PALB2, PMS2, SDHB.

Это исследование позволяет оценить бремя наследственных мутаций, ассоциированных с развитием злокачественных новообразований среди населения РФ, а также особенности географии и миграционных процессов, которые могут стать основанием для разработки новых подходов в области генетического скрининга и первичной профилактики онкологических заболеваний РФ.

Когнитивные нарушения среди долгожителей: поиск полногеномных ассоциаций, полигенная оценка рисков и моделирование белка APOE

Д.А. Каштанова¹, А.А. Мамчур¹, И.Х. Джуманиязова¹, М.В. Иванов¹, В.В. Ерема¹, Е.А. Зеленова¹, А.Ю. Яковчик¹, М.С. Гусакова¹, А.М. Румянцева¹, М.В. Терехов¹, Л.Р. Маткава¹, А.А. Акопян², И.Д. Стражеско², И.В. Тарасова², В.С. Юдин¹, В.В. Макаров¹, С.А. Краевой¹, О.Н. Ткачева², С.М. Юдин¹

ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства;
 Российский геронтологический научно-клинический центр РНИМУ им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации

dzhumaniiazova.irina@gmail.com

Когнитивные нарушения, или деменция — это ассоциированное со старением состояние, которое лишает людей независимости и усложняет уход за ними. Его причины, средовые и генетические, на данный момент не изучены до конца.

В исследовании генетики когнитивных нарушений приняли участие 2559 долгожителей (90+ лет), когнитивный статус которых был оценен с помощью теста MMSE (краткая шкала оценки психического статуса). По результатам полногеномного секвенирования проведен поиск ассоциаций в двух вариантах: с использованием линейной (линейный GWAS, баллы MMSE - непрерывная величина) и логистической регрессий (бинарный GWAS, сравнение групп участников без нарушений – баллы MMSE>24, и дементных – баллы MMSE<10). Пол и возраст вводились в качестве ковариат. Построены полигенная шкала риска (PRS) и модель белка APOE.

Оба варианта GWAS выявили одинаковые значимые полиморфизмы (rs113288717, rs10414043, rs769449, rs113472381, rs10048455, rs1293508533 ассоциированы с деменцией, rs11118728 – с нормой), а также известный маркер деменции rs429358 в гене APOE (линейный GWAS: коэффициент -2.49, p=2.28*10-12, бинарный GWAS: коэффициент 1.24, p=7.70*10-10). Полиморфизм rs429358 приводит к аминокислотной замене C112R, что повышает подвижность в шарнирном и С-концевом доменах и нарушает стабильность липид-связывающей области бел-ка. В PRS вошли 15 полиморфизмов бинарного GWAS, обученная модель имела ROC AUC=73.58% (F1=48%, точность=76%, специфичность=36%, чувствительность=72%).

Множественные значимые полиморфизмы в результатах GWAS и в PRS подчеркивают многофакторность развития деменции в пожилом возрасте. Результаты моделирования APOE показывают возможный механизм влияния аминокислотной замены на фенотип.

Генетические предикторы гематогенного метастазирования немелкоклеточного рака легкого

Геращенко Т.С.¹, Щеголева А.А.¹, Воробьев Р.С.¹, Артемов Н.Н.³, Скитченко Р.К.⁴, Хозяинова А.А.¹, Родионов Е.О.¹, Куанышева К.А.², Шефер Н.А.², Топольницкий Е.Б.², Панкова О.В.¹, Денисов Е.В.¹

¹ НИИ онкологии, Томский НИМЦ РАН, г. Томск, Россия ² Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, Россия ³ Broad Institute, Кембридж, США ⁴ ИТМО, г. Санкт-Петербург, Россия

t_gerashenko@list.ru

Основной причиной высокой смертности пациентов с раком легкого является высокая частота гематогенного метастазирования. Ранее показано, что наличие воспалительных изменений по типу базальноклеточной гиперплазии (БКГ) в эпителии бронхов у больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) вдали от опухолевого очага увеличивает риск развития гематогенного метастазирования. Причины, лежащие в основе данного феномена, не изучены. Целью работы явилось изучение герминальных и соматических генетических нарушений, ассоциированных с гематогенным метастазированием НМРЛ.

В исследование включено 172 пациента с НМРЛ (T1-4N0-3M0), 61,7±8,5 лет. Свежезамороженные образцы опухолевой ткани легкого и периферической крови больных НМРЛ использовались для подготовки полноэкзомных библиотек (SureSelect XT Human All Exon v7, Agilent, США). Секвенирование проведено на платформе NextSeq 2000 (Illumina, США) и Genolab M (GeneMind, Китай). Биоинформатический анализ данных секвенирования выполнен с помощью пайплайнов GATK и Hail.

У больных с наличием БКГ в мелких бронхах в отдалении от опухоли обнаружена герминальная миссенс-замена С>Т в регионе 2р.11 (р=9.34*10-6), которая ассоциирована с гематогенным метастазированием (р=2.0*10-5) и низкими показателями безметастатической выживаемости (НR 6,05 (95%СІ, 2,77-13,2); р=6.0*10-6). Оценка мутационной нагрузки показала у таких больных высокую частоту однонуклеотидных вариантов в генах MALRD1, PRH2 и др., в т.ч. в генах-драйверах канцерогенеза: ТР53, FAT3 и др., и аберраций числа копий ДНК в регионах 15q11 и 16p12. Таким образом, у больные с наличием БКГ в мелких бронхах являются носителями герминального варианта в регионе 2р.11, ассоциированного с гематогенным метастазированием.

Исследование поддержано РНФ (проект № 20-75-10060).

Антагонистический паттерн ингибирования путей контроля клеточного цикла по отношению к путям репарации ДНК в разных типах опухолей

Золотовская М.А.¹,², Сунцова М.В.¹,², Поддубская Е.В.¹, Ефимов В.В.², Модестов А.А.¹, Сорокин М.И.¹,², Секачева М.И.¹, Буздин А.А.¹,²

 ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва;
 ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Долгопрудный

vfhbfv2008@ya.ru

Канцерогенез тесно связан с репарацией ДНК, которая может играть двойственную роль: она минимизирует связанные с опухолевым процессом изменения, с другой стороны, она может способствовать выживанию опухолевых клеток после лучевой терапии и генотоксической химиотерапии.

В данной работе были исследованы уровни активации 79 путей репарации ДНК, среди которых выделено 38 наиболее значимых, для опухолей в 9 локализациях (головной мозг, молочная железа, толстая кишка, легкие, щитовидная железа, шейка матки, почки, желудок и поджелудочная железа). Всего проанализированы 1531 профиль здоровых и 7790 профилей опухолевых каней, как полученных экспериментально, так и из публичных баз The Cancer Genome Atlas, The Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium и Proteomic Data Commons. Анализ проводился на уровне транскриптома и протеома.

Для большинства образцов наблюдалась общая тенденция: все типы опухолей демонстрировали ингибирование пути контрольной точки G2/M клеточного цикла, а также пути ВВСА1-опосредованной регуляции клеточного цикла с помощью факторов транскрипции E2F. Также наблюдался низкий уровень активации путей, опосредованных белком p53. Остальные пути репарации ДНК имели высокие значения уровней активации. Ингибирование пути контрольной точки G2/M может быть связано с антагонистическим влиянием промитотических генов (CDK1 и CCNB) и генов GADD45, отвечающих за остановку клеточного цикла. Также выяснилось, что гены ATM, TP53 и CDKN1A накапливают мутации с потерей функции, а гены семейства циклинов В – трансформирующие мутации. Полученные результаты свидетельствуют о разных паттернах активации молекулярных путей репарации ДНК при прогрессировании опухоли.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 20-75-10071).

Изучение отличия чувствительности неинвазивного пренатального тестирования двумя алгоритмами для плодов разных полов

Золотопуп А.А., Леонова В.С., Голованова М.А., Быкадоров П.А., Беленикин М.С.

Медико-генетическая компания ООО «Эвоген»

anna.zolotopup@gmail.com

При проведении неинвазивного пренатального тестирования методом полногеномного секвенирования малой глубины для анализа доступны все хромосомы плода. Важным параметром является доля плацентарной ДНК, называемой фетальной фракцией (ФФ), содержащейся в крови беременной. При скрининге больший процент ФФ приводит к большей чувствительности метода. В случае с плодами мужского пола прямым маркером служит У-хромосома, а для плодов женского пола используют участки генома, дифференциально метилированные в материнских и плацентарных клетках. При секвенировании участки будут иметь разную представленность, позволяя оценить ФФ с помощью алгоритма F-QuantSc. Комбинация из малой глубины прочтения и разделения на два алгоритма, согласно полу, широко используется. Целью работы являлось сравнение этих двух алгоритмов при потоковом скрининге клинических образцов.

Для 40000 образцов ФФ для плодов мужского пола составила 10,97±4,4%, а для плодов женского пола 7,28±2,7%. Разница фиксировалась на протяжении всего гестационного срока и для всего спектра ИМТ матери. Для плодов женского пола чувствительность оказалась ниже по трём основным трисомиям (13,18 и 21), а доля образцов с промежуточным неинтерпретируемым результатом выше (75 образцов против 657).

При повторном скрининге с использованием той же аликвоты плазмы крови, среднее отклонение ФФ для плодов мужского пола составило 0,59%, а для плодов женского пола 1,14%. В случаях первичного неинтерпретируемого результата вероятность получения положительного и повторного неинтерпретируемого результата теста для методов Y-хромосомного и FF-QuantSC различалась: 26,6% vs 2,7% и 2,6% vs 30,1%. Это говорит в пользу пересмотра стратегии универсального менеджмента образцов и целесообразности перезабора биоматериала для плодов женского пола.

Частота встречаемости неврологических болезней у детей рожденных в близкородственных браках

Абдуллаева М.Н., Шамансуров Ш.Ш.

Центр развития профессиональной квалификации медицинских работников, Республиканский Перинатальный центр Ташкент Узбекистан

p_serenity@mail.ru

Актуальность: С каждым годом растет число родившихся детей с врожденными физическими и умственными патологиями, большая часть которых приходится на родственные браки. Как известно, родственные браки повышают вероятность рождения ребенка с наследственной патологией. Близкородственные браки для различных популяций создали проблемные часто встречаемые заболевания, которые в большинстве случае являются их спусковыми механизмами.

Цель обследования: Изучить частоту и особенности клинических заболеваний нервной системы у детей, рожденных в близкородственных браках.

Материал и методы: Из числа больных, состоящих на учете в Скрининг центре РесУз были отобраны 50 детей, рожденных в близкородственных браках в возрасте от 2 до 12 лет. Из них 27 мальчиков и 23 девочки. Исследуемая группа детей условно были разделены на 2 группы.

Результаты и обсуждения: Неврологические нарушения у большинства детей отмечались в виде задержки и в отставании высших корковых функций, наличие судорожных припадков, аффективных расстройств, патологии поведения, признаков органического поражения центральной нервной системы, выражающихся в неврологическом дефиците различной степени выраженности. При обследовании детей у тематических больных І группы при наличии родственных браков и наследственной отягощенности среди неврологических расстройств наибольший процент занимала задержка умственного развития.

Дизайн генных панелей через таргетное обогащение амплификацией длинных фрагментов для высокопроизводительного секвенирования

Уланова П.В., Антоненко А.Н., Родионова Д.А., Доморацкая Е.А., Ревкова М.А., Сафина С.А., Чеснокова О.В., Криницына А.А., Беленикин М.С.

> Медико-генетическая лаборатория ООО «Эвоген», г. Москва, Россия ulanova@evogenlab.ru

Введение. Диагностические системы скрининга генетических вариантов на основе таргетных панелей, проводимые с использованием технологий высокопроизводительного секвенирования, являются активно используемым молекулярно-генетическим методом исследования. На практике для изучения целевых участков отдельных генов используют разные подходы — это и секвенирование методом Сенгера, и мультиплексная ПЦР коротких фрагментов, и гибридизационные методы/экзомное секвенирование. Для решения научно-исследовательских задач по научно-исследовательских проектам возникает необходимость в таргетном методе, оперирующем с длинными целевыми фрагментами, что расширяет потенциал использования панелей и позволяет их использовать при решении отдельных клинически важных задач.

Цель. Целью данной работы является разработка варианта таргетной генной панели на основе обогащения методом амплификации длинных фрагментов ДНК. В качестве тестовых генов были выбраны гены предрасположенности к наследственному раку молочной железы и яичников — ВRCA1 и BRCA2.

Материалы и методы. Для дизайна панели для BRCA1 и BRCA2 оценивали регионы заданных исследованием описанных патогенных и условно-патогенных генетических вариантов согласно базам данных вариантов. Для формирования таргетных ПЦР-библиотек подбирали праймеры и оптимизировали условия, которые позволяют получать продукты амплификации размером около 10 т.п.н. После объединения и нормализации ПЦР продуктов проводили высокопроизводительное секвенирование образцов на секвенаторе DNBseq-G400 (MGI, Китай).

Результаты. Разработанный вариант тестовой панели для генов BRCA1 и BRCA2 охватил 96,98% и 100,00% кодирующих областей, соответственно. В состав панели вошли клинически значимые варианты, рекомендованные к тестированию при диагностике наследственного рака молочной железы и яичников. NGS-секвенирование генной панели и комплексная аннотация полученных данных с дальнейшей валидацией вариантов методом секвенирования по Сэнгеру продемонстрировали возможность эффективного выявления искомых целевых вариантов в генах BRCA1 и BRCA2.

Выводы. Технология генного тестирования на основе обогащения амплификацией длинных фрагментов в сочетании с NGS обладает двумя преимуществами по сравнению с NGS-панелями на основе мультиплексной ПЦР, — позволяет минимизировать ошибки ПЦР в сложных GC-богатых областях, а также готовить таргетные регионы для секвенирования с помощью подходов, позволяющих проводить секвенирование длинных фрагментов, например нанопорового секвенирования.

Точность определения микросателлитной нестабильности методом таргетного высокопроизводительного секвенирования

Якушина В.Д.^{1,2}, Лебедева А.А.¹, Григорьева Т.В.^{1,3,4}, Кузнецова О.А.^{1,5}, Белова Е.В.^{1,6}, Кавун А.И.¹, Алиярова С.И.¹, Веселовский Е.М.¹, Трякин А.А.⁵, Федянин М.Ю.^{4,5,7}, Милейко В.А.¹, Иванов М.В.^{1,8}.

¹ ООО "Онкодиагностика Атлас" (Москва, Россия); ² ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова» (Москва, Россия);

³ ГНЦ ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (Москва, Россия);

 ФГАОУ «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава РФ (Москва, Россия);

⁵ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ (Москва, Россия);

⁶ МГУ им. М.В. Ломоносова (Москва, Россия);

⁷ ММКЦ «Коммунарка» Минздрава РФ (Москва, Россия);

⁸ МФТИ (Национальный исследовательский университет) (Долгопрудный, Россия)

vdyakushina@gmail.com

Цель работы: оценить точность определения микросателлитной нестабильности (MSI) методом таргетного высокпроизводительного секвенирования с помощью разработанного подхода, включающего набор реагентов Atlas+ и алгоритм анализа в составе программного обеспечения "Solo AVES".

Оценка точности определения MSI с помощью разработанного подхода выполнена на 36 образцах опухолевого материала FFPE с известным MSI статусом: 24 образца с MSI, 12 образцов MSS. Все образцы имели результаты исследования MSI двумя стандартными подходами: ИГХ и ПЦР. Образец считался MSI положительным если хотя бы один из стандартных методов дал положительный результат. Дополнительную контрольную группу составили 41 образец опухолевого материала новообразований в которых по данным литературы встречаемость MSI менее 1% (рак молочной железы, немелкоклеточный рак легкого, меланома кожи).

Наборов реагентов Atlas+ обеспечивает секвенирование 28 мононуклеотидных микросателлитов. Детектирование нестабильности длины микросателлитов проводилось через анализ представленности k-меров.

Чувствительность разработанного подхода составила 87% (21 корректно определенный случай из 24). Три MSI образца, определённые как MSS с помощью разработанного подхода, по ИГХ были MSI, из них ПЦР подтвердил диагноз MSS для двух образцов, для одного ПЦР определил MSI. MSS статус был установлен во всех 12 образцах MSS. PPV и NPV разработанного подхода составили 100% и 80%, соответственно. Сходимость результатов разработанного подхода выше с ПЦР, чем с ИГХ. В дополнительной контрольной группе новообразований разработанный подход определил MSS во всех образцах.

Результаты получены при средней глубине прочтения x1300 - x1800. Снижение in silico средней глубины прочтения таргетных регионов до x250 показало отсутствие потери точности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (22-75-10154; https://rscf.ru/project/22-75-10154/).

Дизайн генных панелей через таргетное обогащение амплификацией длинных фрагментов для высокопроизводительного секвенирования

Уланова П.В., Антоненко А.Н., Родионова Д.А., Доморацкая Е.А., Ревкова М.А., Сафина С.А., Чеснокова О.В., Криницына А.А., Беленикин М.С.

Медико-генетическая лаборатория ООО «Эвоген», г. Москва, Россия

ulanowa.p@yandex.ru

Введение. Для изучения целевых участков отдельных генов используют капиллярное (методом Сенгера) и высокопроизводительное (мультиплексная ПЦР, гибридизационные методы/ экомное) секвенирование. Для решения научно-исследовательских задач и расширения диагностического потенциала применения генных панелей возникает необходимость в таргетном методе, оперирующем длинными целевыми фрагментами ДНК.

Целью работы является разработка варианта таргетной панели с помощью амплификации длинных фрагментов ДНК на примере генов BRCA1 и BRCA2.

Материалы и методы. Дизайн панели проводили с учетом регионов с заданными исследованием патогенных и условно-патогенных генетических вариантов согласно специализированным базам данных. Для формирования ПЦР-библиотек подбирали праймеры и оптимизировали условия для получения продуктов амплификации большой длины (~10 тыс.п.н.) После нормализации и объединения ПЦР-продуктов нужных участков проводили высокопроизводительное секвенирование (DNBseq-G400 (MGI, Китай)).

Результаты. Протестированный вариант генной панели включал 96,98% и 100,00% белок-кодирующих областей генов BRCA1 и BRCA2, соответственно. Валидацию вариантов, определенных высокопроизводительным секвенированием, проводили методом секвенирования по Сэнгеру.

Выводы. Разработанный подход генного тестирования панели, полученной путем амплификации длинных фрагментов в сочетании с высокопроизводительным секвенированием обладает двумя преимуществами по сравнению с панелями на основе мультиплексной ПЦР, — позволяет минимизировать ошибки ПЦР в ГЦ-богатых областях (при их наличии) и проводить исследования на платформах секвенирования для генерации длинных прочтений.

Изучение маркирования мезенхимных клеток из костного мозга мыши вектором системы LeGO на основе HIV-1 с использованием маркирования индивидуальных молекул ДНК на платформе ILLUMINA MISEQ.

Д.В. Карпенко, *, А.Е. Бигильдеев

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

d @list.ru

Интеграция лентивирусного вектора в случайное место ДНК создаёт генетически наследуемую и уникальную для каждого акта заражения метку. Это позволяет изучать разнообразие и размер клонов маркированных клеток. Стромальный подслой (n = 10) длительной культуры костного мозга мыши, содержащий как мезенхимные стволовые клетки, так и более зрелые не стволовые стромальные клетки, был трансдуцирован самоинактивирующимся вектором 3-го поколения системы LeGO на основе HIV-1. Подслой был имплантирован под капсулу почку сингенному реципиенту. Через 6 недель клетки извлекали и исследовали клональный состав с помощью Illumina MiSeq. Произведен учёт индивидуальных молекул ДНК, содержащих сайты интеграции, до ПЦР-амплификации библиотек. Анализ показал значительную контаминацию прочтениями, которые были получены как результат рекомбинации исходно различных молекул ДНК, известную также как index hopping. Значительная кроссконтаминация между библиотеками, приготовленными отдельно, показала, что процесс образования химер происходит также непосредственно при запуске в самой ячейке NGS. Реальную сложность представляли химеры, возникающие между молекулами ДНК одной библиотеки: для их идентификации требовались отдельные решения. Анализ показал, что крупных маркированных клонов было всего 10 из 2165 среди всех образцов. Следовательно, клетки с высоким пролиферативным потенциалом не были эффективно заражены. Это подразумевает, что эффективность генной терапии, может быть ограничена и определяется, в основном, временем жизни зараженных не стволовых клеток. С другой стороны, это означает сниженную вероятность нарушения функций стволовых клеток. Картирование сайтов интеграции с использованием NCBI BLAST показало, что они распределены по всему геному мыши с небольшим предпочтением к генам.

Высокопроизводительное секвенирование для испытания на наличие контаминации вирусами генотерапевтических и клеточных препаратов

Коростин Д.О.¹, Попов К.В.², Силачев Д.Н.², Ребриков Д.В.^{1,2}

¹ ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России ² ФГАОУ ВО «Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России

Одним из обязательных требований, обеспечивающих качество и безопасность высокотехнологичных генотерапевтических и клеточных лекарственных препаратов, является оценка вирусной безопасности материалов, используемых при производстве препаратов, человеческого или животного происхождения, для производства и готовых продуктов. Развитие методов высокопроизводительного секвенирования позволило предложить метод обнаружения вирусной контаминации без предварительной информации о ее роде. Метод оценки вирусной безопасности на основе NGS позволяет детектировать всю совокупность вирусов, содержащихся в биологическом образце — виром. Секвенирование РНК позволяет обнаружить геномы РНК-содержащих вирусов и экспрессируемые вирусные гены, а секвенирование ДНК — соответственно геномы ДНК-содержащих вирусов. Обнаружение латентных инфекций необходимо для оценки риска образования инфекционных частиц в ходе генетической модификации клеточных линий или длительного культивирования.

Целью данной работы являлась разработка лабораторного и биоинформатического пайплайна, включающего методики пробоподготовки, секвенирования и анализа данных NGS для выявления контаминации вирусами генотерапевтических и клеточных препаратов.

С использованием панели вакцин проведена оценка чувствительности и специфичности разработанного пайглайна. Разработан комплект стандартных операционных процедур (СОПов), предназначенных для применения в рамках GMP-производства генотерапевтических и клеточных препаратов.

Работы выполнены в рамках государственных заданий: 123020800098-5 и 123020800102-9

Секвенирование следующего поколения как метод контроля качества генотерапевтических и клеточных препаратов

Силачев Д.Н., Попов К.В., Горюнов К.В.

ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России

Высокотехнологичные лекарственные препараты на основе соматических клеток и БМКП представляют собой терапевтические средства, состоящие из живых клеток, выделенных, размноженных и/или модифицированных в лабораторных условиях. Эти клетки можно использовать в различных биомедицинских приложениях, таких как регенеративная и персонализированная медицина. Обеспечение качества и воспроизводимости процесса производства этих клеточных продуктов имеет решающее значение для их эффективности в биомедицинских приложениях. NGS можно использовать в качестве метода контроля качества клеточных продуктов на нескольких этапах производства клеточных продуктов. Подтверждение идентичности клеток в клеточном продукте достигается путем секвенирования ДНК клеток и сравнения с известными эталонными геномами (клетки из мастер-банка, персонализированные образцы). Сравнение образцов исходного биологического материла и готового продукта при производстве аутологичных препаратов обеспечивает прослеживаемость распространения инфекционных заболеваний вследствие кросс-контаминации биологических материалов. Помимо подтверждения клеточной идентичности, NGS также можно использовать для выявления любых генетических вариаций или мутаций, которые могут присутствовать в клеточном продукте, а также для контроля воспроизводимости процесса производства клеточных продуктов путём сравнения геномов и транскриптомов клеток из разных партий клеточного продукта. Наконец, NGS можно использовать для контроля безопасности клеточных продуктов. Секвенируя ДНК клеток клеточного продукта до и после введения пациентам, исследователи могут отслеживать любые изменения в генетическом составе клеток. Так, например, существенное изменение в клональном составе клеток после введения пациенту служит индикатором онкогенности и туморогенности.

Работы выполняются в рамках государственных заданий: 123020800098-5, 123020800103-6

Разработка Пайплайна доклинического in vitro исследования генотоксичности генотерапевтических и клеточных препаратов на основе высокопроизводительного секвенирования

Коростин Д.О.¹, Попов К.В.², Силачев Д.Н.², Ребриков Д.В.^{1,2}

¹ ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России ² ФГАОУ ВО «Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России

Одним из важнейших аспектов исследования безопасности препаратов генной и клеточной терапии является исследование их генотоксичности, поскольку методы их производства могут вызывать повреждение и мутации ДНК клеток, делая невозможным последующее клиническое применение разработанного препарата. Цель работы — разработка пайплайна in vitro исследования генотоксичности, включающего методики подготовки клеточных моделей, пробоподготовки, секвенирования и биоинформатического анализа данных NGS.

Проведена комплексная оценка действия генетических конструкций на культуры клеток гепатоцитов, полученных дифференцировкой iPS, геномодефицированных MMCK и гематопоэтических стволовых клеток. Исследование включало идентификацию потенциальных генотоксических событий, таких как мутации, хромосомные перестройки и анализ профиля сайтов интеграции вектора, профиля клоногенности в зависимости от сайта интеграции, клональных различий экспрессионных профилей, профиля транскриптов векторной конструкции и профиля метилирования.

Установлено, что сопоставление данных о сайтах интеграции, транскриптоме и метиломе позволяет получить интегральную оценку потенциальной генотоксичности конструкции. Такая оценка особенно важна для ранней стадии разработки генетических конструкций, поскольку позволяет быстро исключить из разработки их наиболее опасные варианты, тем самым ускоряя создание препаратов и вывод в практическую медицину.

Работы выполнены в рамках государственных заданий: 123020800103-6, 123020800102-9

Пример диагностической эффективности секвенирования экзома для пациента с синдромом Барттера 3 типа

Буянова А.А.¹, Петросян Э.К.², Рыжова А.В.², Белова В.А.¹, Сучалко О.Н.¹, Павлова А.С.¹, Казиева К.Р.², Коростин Д.О.¹

¹ Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ, Москва ² ОСП РДКБ ФГАОУ ВО РНИМУ имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва

e-mail: anastasiiabuianova97@gmail.com

Синдром Барттера (СБ) представляет собой гетерогенную группу орфанных заболеваний, патогенетически объединенных дефектом реабсорбции натрия и хлоридов в толстом восходящем колене петли Генле. Мы представляем клинический случай пациента с гипонатриемией, гипохлоремией и гипокалиемией. Мальчик был рожден на сроке 33 недели гестации путем экстренного кесаревого течения на фоне остро возникшего многоводия, с массой тела 2500 г и длиной тела 48 см. Электролитные нарушения впервые были зарегистрированы после перевода пациента в ОРИТ. В возрасте 7 месяцев у него начались эпизоды немотивированного повышения температуры тела до 37,7 С, в 9 месяцев первично поступил в РДКБ, по клинико-анамнестическим данным было принято решение о проведении полноэкзомного секвенирования (WES).

Секвенирование белок-кодирующих последовательностей было осуществлено методом парно-концевых прочтений на приборе G-400 (MGI Tech) по протоколу производителя. Биоинформатическая обработка включала в себя оценку качества секвенирования (FastQC), удаление разбалансированных оснований и ридов с низким качеством (Trimmomatic), выравнивание прочтений на референсный геном GRCh37/hg19 при помощи BWA-MEM, идентификацию вариантов (BCFtools), а также их аннотацию (ANNOVAR). Анализ числа копий (инсерций и делеций) проводился с помощью CNVkit. Варианты были интерпретированы в соответствии с критериями ACMG.

Обнаружена ранее описанная [PMID: 9326936] гомозиготная делеция, включающая в себя ген СLCNКВ целиком и 4 последних экзона гена FAM131C. С геном СLCNКВ ассоциирован синдром барттера 3 типа (OMIM 607364). Обнаружен вариант нуклеотидной последовательности в интроне 3 гена МУВРС1 (chr12:102011022G>A) в гетерозиготном состоянии, приводящий к замене канонического нуклеотида сайта сплайсинга (NM_002465.4). Герминальные мутации в гене МУВРС1 в гетерозиготном состоянии описаны у пациентов с врожденной миопатией 16 (OMIM 618524). Алгоритмы предсказания патогенности in silico расценивают вариант как патогенный. У пациента присутствует характерная для СБ мышечная гипотония, однако она может иметь другую этиологию. Обнаружен ранее описанный вариант нуклеотидной последовательности в экзоне 3 гена NLRP3 (chr1:247587343G>A) в гетерозиготном состоянии, приводящий к замене аминокислоты в позиции 200 белка (р.Val200Met, ENST00000336119.3). Частота варианта в контрольной выборке gnomAD равна 0,00832.

Научное издание

«Геномное секвенирование и редактирование» СБОРНИК ТЕЗИСОВ

11-й Всероссийской научно-практической конференции центров геномных исследований мирового уровня

Подписано в печать 17.05.2023 Формат 60×90 1/16. Усл. печ. л. 1,5. Тираж 200 экз. Заказ № 35-23.

Отпечатано ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1.

ISBN 978-5-88458-663-5

