

**Название проекта: «Технология непредвзятого скрининга  
дифференциального метилирования геномов для фундаментальных  
научных исследований и диагностики онкологических заболеваний»**

**1. Краткая аннотация.**

Проект представляет собой разработку принципиально нового алгоритма скрининга дифференциального метилирования геномов, основанного на сочетании классического генноинженерного подхода – амплификации интерметилованных сайтов (АИМС), высокоразрешающего способа разделения фрагментов нуклеиновых кислот – капиллярного электрофореза, и оригинальных компьютерных программ: AIMS in silico и PeakPick. Технология определения геномной принадлежности выявляемых дифференциально метилированных фрагментов ДНК исключает необходимость их реамплификации, клонирования и секвенирования. Настоящая технология расширяет фундаментальные представления о роли метилирования ДНК в норме и при патологии и позволяет значительно расширить генный состав диагностических панелей применяемых в онкологии. В настоящее время разработка используется для выявления новых маркеров метилирования рака молочной железы (РМЖ) и острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) у детей. Для РМЖ на основе найденных маркеров предложена система идентификации опухолевой ткани, предназначенная для диагностики и определения распространенности опухолевого процесса. Разрабатывается система определения минимальной остаточной болезни при ОМЛ у детей. Подход использует унифицированный способ качественного и количественного определения аномального метилирования ДНК, что позволяет формировать диагностические панели, состоящие из значительного количества маркеров, и как следствие, достигать высокой клинической чувствительности диагностики.

**2. Соответствие проекта тематике научной платформы  
«Инновационные фундаментальные технологии в медицине».**

Целью научной платформы медицинской науки «Инновационные фундаментальные технологии в медицине» является создание отечественных и импортозамещающих высокоинформативных, высокочувствительных и высокоспецифичных средств диагностики и коррекции социально значимых заболеваний на молекулярном и физиологическом уровне. Представляемый проект полностью соответствует этой цели, поскольку направлен на разработку и внедрение инновационного метода диагностики онкологических заболеваний на молекулярном уровне. Предлагаемый подход использует унифицированный способ качественного и количественного определения аномального метилирования ДНК, что позволяет формировать диагностические панели, состоящие из значительного количества маркеров, и как следствие, достигать высокой клинической чувствительности диагностики. Разработка полностью отечественная, не имеет близких аналогов за рубежом. Импортозамещение обеспечивается за счет собственного дизайна тест-систем и использования при их производстве реагентов отечественного производства.

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации является участником платформы «Инновационные фундаментальные технологии в медицине», согласно Приложению N 14 к Приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации от 30 апреля 2013 г. N 281.

Проблема идентификации генов, вовлеченных в канцерогенез, и характеристика аномалий их функционирования - ключевой момент при решении задач онкогеномики. Нарушение функционирования генов, вовлеченных в процессы канцерогенеза, связывают не только со структурными повреждениями, но и с эпигенетическими аномалиями, к числу которых относятся, в частности, метилирование/деметилование ДНК геномов злокачественных новообразований.

Метилирование ДНК – эпигенетическая модификация, несущая ответственность за дифференциальную экспрессию генов, отвечая, таким образом, за формирование специфического фенотипа клетки. Наблюдаемые различия в характере метилирования ДНК, ассоциированные с нормальными и патологическими биологическими процессами, стимулируют разработку стратегий поиска метилированных локусов генома, в том числе создание сравнительных профилей дифференциально метилированных локусов в норме и при патологии. Сайты метилирования ДНК распространены по всему геному, поэтому особой популярностью пользуются именно техники поиска метилированных участков ДНК на уровне целого генома, так называемые техники «отпечатков». Один из таких методов – это метод амплификации интерметилованных сайтов (АИМС), генерирующий большое число фрагментов, отражающих профиль метилирования ДНК в клетке.

В нашей лаборатории был разработан принципиально новый алгоритм скрининга дифференциального метилирования геномов, основанный на сочетании классического генноинженерного подхода – амплификации интерметилованных сайтов (АИМС), высокоразрешающего способа разделения фрагментов нуклеиновых кислот – капиллярного электрофореза, и оригинальных компьютерных программ: AIMS in silico и PeakPick.

На первом этапе оригинального протокола метода АИМС ДНК обрабатывают метилчувствительной рестриктазой SmaI (сайт узнавания CCC/GGG), которая оставляет фрагменты с «тупыми» концами. Метилированные гексануклеотиды CCCGGG, оставшиеся интактными, затем расщепляются рестриктазой XmaI (сайт узнавания C/CCGGG), которая формирует фрагменты с «липкими» концами. Последние способны взаимодействовать с адаптерами в реакции лигирования и подвергаться амплификации в последующей ПЦР. Для идентификации новых аномально метилированных CpG-островков проводится ПЦР всей совокупности лигированных фрагментов с радиоактивно меченых праймеров, в целом гомологичных адаптеру, но удлиненных на 1-4 случайно выбранных нуклеотида. Использование таких «удлинителей» снижает сложность конечной картины АИМС, позволяя добиться уровня разрешения, адекватного для анализа.

Модификации, введенные нами в оригинальный протокол формирования продуктов АИМС, касаются этапов лигирования и амплификации продуктов рестрикции; протокол этапа рестриктазной обработки сохранен в виде, предложенном авторами метода (Frigola et al., 2002). Процедура лигирования подразумевает ковалентные сшивки липких концов полученных фрагментов с последовательностями двуцепочечных адаптеров. Адаптеры формируются из двух олигонуклеотидных последовательностей – Blue (ATTCGCAAAGCTCTGA) и MCF (CCGGTCAGAGCTTTGCGAAT) – путем денатурации. Подготовленный таким образом адаптер имеет следующую конфигурацию:

5'-ATTCGCAAAGCTCTGA-3'

3'-TAAGCGTTTCGAGACTGGCC-5'

Оба олигонуклеотида удерживаются в составе адаптера водородными связями. Молекулы адаптера, не вступившие во взаимодействие в реакции лигирования, окажутся в дальнейшем в смеси для проведения ПЦР и на этапе температурной денатурации распадутся на исходные олигонуклеотиды – MCF и Blue. Освободившийся олигонуклеотид Blue – потенциальный праймер для амплификации

любого из адаптированных продуктов рестрикции анализируемого образца ДНК. Как уже указывалось, для проведения амплификации интерметилованных сайтов используются универсальные праймеры, гомологичные адаптеру, но удлиненные на 1-4 нуклеотида для сокращения количества результирующих продуктов ПЦР, что необходимо для их лучшего разделения электрофорезом в геле. Олигонуклеотид Blue таких удлинителей лишен, вследствие чего его присутствие в ПЦР-смеси будет приводить к равновероятному отжигу на всех лигированных фрагментах, результатом амплификации которых станет картина, неразрешимая в геле.

Из приведенной структуры адаптера видно, что его липкий конец может комплементарно взаимодействовать как с липким концом продукта гидролиза геномной ДНК рестриктазой XmaI, так и с липким концом другой молекулы адаптера, находящейся в реакционной смеси. Продукты взаимодействия (димеры) адаптеров, попадающие на следующем этапе в смесь для ПЦР, на этапе денатурации не будут приводить к возникновению праймеров для неспецифической амплификации, поскольку 3'-конец олигонуклеотида Blue в составе димера заблокирован ковалентной связью с олигонуклеотидом MCF партнера по димеризации (на схеме олигонуклеотиды Blue отмечены курсивом):

5'-*ATTGCAAAGCTCTGACCGGTCAGAGCTTTGCGAAT*-3'  
3'-TAAGCGTTTCGAGACTGGCCAGTCTCGAAACGCTTA-5'

В связи с этим одной из главных задач при разработке лабораторного протокола АИМС было создание таких условий реакции лигирования продуктов рестрикции ДНК с адаптерами, при которых молекулы адаптера были бы полностью израсходованы.

Такой результат обеспечивает лигирование с частично застроенным 5'-выступающим концом фрагмента. Частичная застройка проводится с помощью фрагмента Кленова и нуклеотида dCTP после этапа образования «липких» концов. Это предотвращает образование «димеров» фрагментов, и позволяет проводить лигирование с адаптером в концентрации соответствующей концентрации липких концов фрагментов без избытка адаптеров. При этом лигирование частично застроенных фрагментов с адаптером одностороннее, поэтому ПЦР следует начинать с ник-трансляции второй нити адаптера. В реакцию также был введен второй праймер/адаптер, при наличии которого фрагменты с одинаковыми адаптерами складываются в односторонние кольца и не амплифицируются.

Дизайн эксперимента осуществляется предназначенной для этих целей программой AIMS in silico. В первом варианте эксперимента используется удлинитель универсального праймера CCG. Общее число фрагментов модельного эксперимента 72. Из них 97% представляют собой CpG-островки (86% - промоторные, 11% - межгенные), 3% относятся к другим C,G-богатым последовательностям. Во втором варианте эксперимента с удлинителем GCG исследуется 65 локусов (80% - CpG-островки, 20% локусов входит в состав неканонических областей гиперметилирования). Таким образом, использование метода АИМС с удлинителями CCG и GCG позволяет определять состояние метилирования 137 геномных участков, 122 из которых относятся к CpG-островкам.

В настоящем протоколе АИМС позволяет выявлять аномальное метилирование опухолевых клеток в значительном избытке нормального биологического материала, так как визуализация продуктов амплификации проводится с помощью фрагментного анализа на базе капиллярного электрофореза. Анализ электрофореграмм проводится программой PeakPick, позволяющей сравнивать образцы, выявляя дифференциально метилированные локусы. Возможности программы позволяют определять количественное содержание метилированных молекул, а также проводить анализ уровня метилирования до и после лечения, базируясь на площадях константно метилированных локусов. Возможности расширения динамического диапазона метода

основаны на модификациях исходного протокола, позволяющих менять спектр аномально метилированных локусов.

1. Frigola J, Ribas M, Risques RA, Peinado MA. Methylome profiling of cancer cells by amplification of inter-methylated sites (AIMS). // *Nucleic Acids Res.* 2002 Apr 1; 30(7):e28.

### **3. Актуальность исследования.**

Задачами онкогеномики являются изучение молекулярных механизмов канцерогенеза и разработка эффективных методов диагностики, прогноза течения, оптимизации лечения и мониторинга рецидивирования опухолей. Процесс злокачественной трансформации клеток характеризуется накоплением большого количества повреждений в геноме опухолевой клетки. Нарушение функционирования генов, вовлеченных в процессы канцерогенеза, связывают как со структурными повреждениями, так и с эпигенетическими аномалиями, к числу которых относится гиперметилирование ДНК в регуляторных областях генов (Esteller M. et al., 2001). Анализ маркеров метилирования на сегодняшний день является оптимальным инструментом молекулярно-генетической диагностики и мониторинга в онкологии. По специфичности он не уступает анализу экспрессии генов, значительно превосходя последний по простоте и доступности. Что же касается анализа структурных аномалий, то это остается достаточно дорогостоящей процедурой и находит применение в основном в диагностике наследственных онкологических синдромов и для выявления стандартных мутаций, определяющих чувствительность опухолей к тем или иным химиопрепаратам (Васильев Е.В. с соавт., 2009; Бабенко О.В. с соавт., 2009).

Анализ метилирования ДНК имеет ряд преимуществ перед детекцией мутаций при выявлении клеток рака в образцах тканей или свободной ДНК из опухолевых клеток в биологических жидкостях. Во-первых, частоты аномального метилирования CpG-островков множества генов значительно превышают частоты структурных повреждений тех же генов при канцерогенезе (Kaneda et al., 2002; Miyamoto et al., 2003). Во-вторых, выявление аномально метилированных молекул ДНК в избытке нормального биологического материала не вызывает значительных проблем, детекция же мутаций/делеций в этой ситуации практически невозможна. В-третьих, анализ метилирования технически прост и в большинстве случаев сводится к ПЦР одного локуса. Поиск мутаций в одном гене требует анализа многих локусов; кроме того, 100%-ная эффективность достигается только после секвенирования фрагментов ПЦР. Наконец, аномальное метилирование наблюдается в пренеопластических тканях и может служить одним из наиболее ранних маркеров канцерогенеза (Esteller M. et al., 2001).

Несмотря на диагностические преимущества маркеров метилирования ДНК, они до сих пор не получили широкого распространения в клинической онкологии. Это объясняется, в частности, недостатком хорошо изученных и охарактеризованных генов, аномальное метилирование которых достоверно связано с тем или иным патоморфологическим типом опухоли (Jones P. et al., 2007). В связи с этим особую актуальность приобретает идентификация и подробная характеристика особенностей метилирования новых геномных локусов, непосредственно или опосредованно вовлеченных в канцерогенез.

Использование методов непредвзятого скрининга дифференциального метилирования геномов, разрабатываемых коллективом исполнителей проекта, уже привело к выявлению целого ряда новых маркеров рака молочной железы (Tanas et al., 2010), которые в настоящее время активно изучаются как с точки зрения участия в процессах канцерогенеза, так и с точки зрения диагностических приложений (Rutella, S. et al., 2009; Hawes S.E. et al., 2010; Wang Y., Rekeya R., 2010). Разработка и внедрение более современных протоколов скрининга дифференциального

метиляции и характеристики новых маркеров аномального метилирования должны повысить эффективность создания систем молекулярных маркеров для диагностически онкологических заболеваний.

1. Бабенко О.В., Саакян С.В., Немцова М.В., Залетаев Д.В. Молекулярная диагностика ретинобластомы // Учебник под ред. М.А.Пальцева и Д.В.Залетаева «Системы генетических и эпигенетических маркеров в диагностике онкологических новообразований» для студентов медицинских вузов. М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2009. С. 284-317
2. Васильев Е.В., Румянцев П.О., Немцова М.В., Залетаев Д.В. Системы ДНК-маркеров в диагностике папиллярного и медулярного рака щитовидной железы // Учебник под ред. М.А.Пальцева и Д.В.Залетаева «Системы генетических и эпигенетических маркеров в диагностике онкологических новообразований» для студентов медицинских вузов. М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2009. С. 247-283
3. Esteller M, Paul G. Corn, Stephen B. Baylin, and James G. Herman. A Gene Hypermethylation Profile of Human // Cancer Cancer Res, April 15, 2001 61; 3225
4. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. // Cell. 2007 Feb 23;128(4):683-92.
5. Kaneda A, Kaminishi M, Yanagihara K, Sugimura T, Ushijima T. Identification of silencing of nine genes in human gastric cancers. Cancer Res. 2002 Nov 15;62(22):6645-50.
6. Miyamoto, K., K. Asada, T. Fukutomi, E. Okochi and Y. Yagi et al., 2003. Methylation-associated silencing of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-Osulfotransferase-2 (3-OST-2) in human breast, colon, lung and pancreatic cancers. Oncogene, 22: 274-280.
7. Tanas A.S., Shkarupo (Rudenko) V.V., Kuznetsova E.B., Zaletayev D.V., Strelnikov V.V. Novel tools for unbiased DNA differential methylation screening // Epigenomics, 2010. Vol. 2. No. 2. P. 325-333

#### **4. Научный коллектив.**

Научный коллектив сформирован из сотрудников лаборатории молекулярной генетики человека Научно-исследовательского института молекулярной медицины, являющегося структурным подразделением ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России.

*Руководитель проекта:* Стрельников Владимир Викторович, д.б.н., доцент, в.н.с.

*Исполнители:*

Алексеева Екатерина Александровна, н.с.

Петруненко Екатерина Григорьевна, студент, лаборант-исследователь

Руденко Виктория Владимировна, к.б.н., лаборант-исследователь

Танас Александр Сергеевич, к.б.н., с.н.с.

Все исполнители проекта – молодые ученые до 35 лет. Руководитель коллектива – молодой доктор наук (40 лет).

Исследование метилирования ДНК в норме и при патологии – один из основных научных интересов научной группы; опыт работы руководителя проекта в этой области – более 15 лет. Деятельность коллектива связана с исследованием молекулярных механизмов канцерогенеза и, в первую очередь, исследованием эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов. Основное внимание уделяется поиску и характеристике молекулярных маркеров, имеющих диагностическое и прогностическое значение. Мы выделяем несколько основных аспектов: молекулярная диагностика наследственных форм рака, поиск и характеристика маркеров неблагоприятного прогноза, диагностика микрометастазов, поиск и характеристика молекулярных маркеров канцерогенеза на

досимптоматической стадии заболевания. Основным результатом этих исследований являются диагностические протоколы, позволяющие повысить качество диагностики и эффективность лечения. В рамках этого направления проводятся исследования стромально-мезенхимных взаимодействий, исследования клонального происхождения опухолей и их рецидивов.

На тематической основе предлагаемой технологии непредвзятого скрининга дифференциального метилирования геномов было защищено 2 кандидатских диссертации: «Анализ дифференциального метилирования геномов методами непредвзятого скрининга», Танас А.С. (2012), «Новые маркеры аномального метилирования при раке молочной железы, идентифицированные непредвзятым скринингом дифференциального метилирования геномов», Руденко В.В. (2012).

Коллективом исполнителей проекта (Tanas, Rudenko et al, 2010) был выявлен ряд новых маркеров метилирования ДНК при РМЖ, на базе которых проведено сравнение профилей метилирования в РМЖ и прилежащих, условно нормальных тканях молочной железы. Помимо выявления маркеров РМЖ, не ассоциированных до этого в литературе с данным типом злокачественных новообразований, был определен ряд существенных корреляций клинко-диагностических и иммуногистохимических особенностей опухоли с продемонстрированной картиной метилирования (Руденко с соавт., 2012). Выявленные при анализе геномов клеточных линий рака молочной железы ZR-75-1, HBL-100, HS 578 T, BT-474, MCF7 и T-47D дифференциально метилированные геномные локусы также могут служить субстратом для разработки молекулярно-генетических маркеров рака молочной железы.

Участники проекта являются соавторами патента «Способ формирования панелей маркеров метилирования ДНК», номер 2472859, Роспатент, Москва, 2011. Патентообладатель - Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздравсоцразвития России. Изобретение включено в базу данных ФГУ ФИПС перспективных российских разработок, получен диплом Роспатента в номинации «100 лучших изобретений России за 2013 год». Также участники проекта являются соавторами новой медицинской технологии «Скрининг аномального метилирования ДНК на основе метода амплификации интерметилованных сайтов для диагностики злокачественного опухолевого процесса» (Разрешение ФС № 2011/132 от 27.05.2011г.) (рис.3) и упомянутых в проекте компьютерных программ, использующихся при проведении непредвзятого скрининга дифференциального метилирования геномов: программа дизайна эксперимента «AIMS in silico» (Регистрационный номер ВНИИЦ 50201151514) и визуализации, анализа и дифференциации капиллярных электрофореграмм продуктов PeakPick (Регистрационный номер ВНИИЦ 50201050040). Коллектив авторов награжден дипломом лауреата Всероссийской премии в области онкологии Ассоциации онкологов России в номинации «Лучший проект года», подноминации «Лучший научно-исследовательский проект» за участие в проекте «Лабораторная система скрининга аномального метилирования ДНК для диагностики злокачественного опухолевого процесса на основе постгеномных технологий», 2013.

Результаты разработок коллектива внедрены в практику Первого МГМУ им. И.М.Сеченова Минздравсоцразвития России и ФГБУ «МГНЦ» РАМН.

Новые технологии и научные результаты, полученные научным коллективом, включены в учебники для студентов медицинских вузов:

1. учебник «Системы генетических и эпигенетических маркеров в диагностике онкологических новообразований» для студентов медицинских вузов. М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2009;
2. учебник «Введение в молекулярную диагностику» для студентов медицинских вузов. М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2011. Т. 2.

## **Информация о руководителе и исполнителях проекта.**

**Стрельников Владимир Викторович** - руководитель проекта. 1974 г.р., окончил медико-биологический факультет РГМУ по специальности «медицинская биохимия» в 1997 г. В лаборатории молекулярной генетики человека НИИ молекулярной медицины ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России работает с 2002 г. Научно-исследовательская деятельность связана с изучением структурно-функциональной организации генома человека, роли молекулярно-генетических нарушений в развитии онкологических заболеваний, разработкой методов и протоколов скрининга дифференциального метилирования ДНК, а также разработкой и оптимизацией молекулярно-генетических подходов к диагностике наследственных заболеваний.

В 2000 г. В.В.Стрельников защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.15 – генетика. Докторская диссертация на тему «Комплексное исследование метилотипов злокачественных новообразований: фундаментальные и прикладные аспекты» по специальности 03.02.07 – генетика защищена в 2012 году.

Под его руководством защищены три кандидатских диссертации, в настоящее время руководит выполнением четырех диссертационных исследований.

В.В.Стрельников является автором и соавтором 8 новых медицинских ДНК-технологий:

1. Диагностика аномального метилирования ломких хромосомных участков FRAXA, FRAXE и FRAXF у мальчиков. Авторы: Стрельников В.В., Кузнецова Е.Б., Немцова М.В., Залетаев Д.В. Разрешение ФС № 2011/135 от 27.05.2011 г.

2. Диагностика премутаций и полных мутаций экспансии CGG-повтора гена FMR1 у женщин. Авторы: Стрельников В.В., Кузнецова Е.Б., Немцова М.В., Залетаев Д.В. Разрешение ФС № 2011/134 от 27.05.2011 г.

3. Скрининг аномального метилирования ДНК на основе метода амплификации интерметилированных сайтов для диагностики злокачественного опухолевого процесса. Авторы: Руденко В.В., Танас А.С., Стрельников В.В., Кузнецова Е.Б., Залетаев Д.В. Разрешение ФС № 2011/132 от 27.05.2011 г.

4. Молекулярно-генетическая методика определения генетического статуса Об-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы у пациентов со злокачественными опухолями головного мозга для оптимизации терапии темозоломидом. Авторы: Землякова В.В., Стрельников В.В., Пальцева Е.М., Кузнецова Е.Б., Смолин А.В., Залетаев Д.В. Разрешение ФС № 2009/316 от 4.09.2009 г.

5. Молекулярно-генетическая методика определения потери гетерозиготности хромосомных районов 1p и 19q у пациентов с анапластической олигодендроглиомой. Авторы: Стрельников В.В., Пальцева Е.М., Кузнецова Е.Б., Смолин А.В., Залетаев Д.В. Разрешение ФС № 2009/332 от 5.10.2009 г.

6. Молекулярная диагностика нарушений метилирования импринтированных районов IGF2, H19, KCNQ1OT1 у пациентов с синдромом Видеманна-Беквита. Авторы: д.б.н., проф. Немцова М.В., д.б.н., проф. Залетаев Д.В., к.б.н. Стрельников В.В. Разрешение ФС № 2011/131 от 27.05.2011 г.

7. Молекулярно-генетические аспекты анализа точковых мутаций в гене MeCP2 и исследования инактивации X-хромосомы у девочек с синдромом Ретта и неспецифической умственной отсталостью. Авторы: к.б.н. Бабенко О.В., к.б.н. Стрельников В.В., к.м.н. Михайленко Д.С., д.б.н., проф. Залетаев Д.В. Разрешение ФС № 2011/133 от 27.05.2011 г.

8. Молекулярно-генетическая методика определения неслучайной инактивации X-хромосомы у пациенток с преждевременной недостаточностью яичников. Авторы:

к.м.н. Кекеева Т.В., к.м.н. Михайленко Д.С., к.б.н. Стрельников В.В., к.б.н. Бабенко О.В., д.б.н., проф. Залетаев Д.В. Разрешение ФС № 2011/136 от 27.05.2011 г.

В.В.Стрельников – соавтор патента на изобретения № 2472859 «Способ формирования систем маркеров метилирования ДНК» /Руденко В.В., Танас А.С., Кузнецова Е.Б., Стрельников В. В., Залетаев Д.В.

Соавтор восьми компьютерных программ, прошедших государственную регистрацию.

В.В.Стрельников - руководитель гранта РФФИ № 08-04-01685 «Общие закономерности структурно-функциональной организации эпигеномов клеток рака молочной железы», соисполнитель НИР по государственному контракту № 8/3-655н-08 от 31 декабря 2009 «Поиск и характеристика новых молекулярных маркеров для ранней диагностики, прогноза течения, мониторинга эффективности лечения рака мочевого пузыря», по государственному контракту № 8/3-657н-08 от 31 декабря 2009 «Поиск и характеристика новых молекулярных маркеров для ранней диагностики, прогноза течения, мониторинга эффективности лечения рака почки», по государственному контракту № 02.740.11.0089 от 15 июня 2009 в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы по теме «Разработка новых диагностических технологий на основе механизмов эпигенетической регуляции», руководитель гранта Earlier Breast Cancer Test Foundation “Development and validation of a differential methylation screening technology applicable for the identification of early breast cancer diagnostic markers” (2007-2010 гг.). В настоящее время руководит НИР по гранту РФФИ № 14-04-01606 А «Идентификация метилотипов рака молочной железы на основе высокопроизводительного бисульфитного секвенирования ДНК» (2014-2016 гг.).

За последние 5 лет В.В.Стрельниковым опубликовано 55 печатных работ, в том числе 18 статей в журналах, 21 тезис, 8 новых медицинских ДНК-технологий, 8 зарегистрированных компьютерных программ, 1 патент. Индекс Хирша 7.

Принимал активное участие в написании глав в учебниках для студентов медицинских вузов и монографиях:

1) три главы в учебнике « Системы генетических и эпигенетических маркеров в диагностике онкологических заболеваний». / М.А.Пальцев, Д.В.Залетаев - Москва: Изд-во ОАО «Издательство «Медицина», 2009.- 384 с. (Учеб. лит. для студ. мед. вузов);

2) восемь глав в учебнике «Введение в молекулярную диагностику»: в 2-х т. Т. 2/ «Молекулярно-генетические методы в диагностике наследственных и онкологических заболеваний». / М.А.Пальцев, Д.В.Залетаев - Москва: Изд-во ОАО «Издательство «Медицина», 2011.- 504 с. (Учеб. лит. для студ. мед. вузов);

3) глава в учебнике «Биология стволовых клеток и клеточные технологии». Том 1 под ред. М.А.Пальцева. / Залетаев Д.В., Немцова М.В., Стрельников В.В. Эпигенетическая регуляция экспрессии генов на ранних стадиях развития и в эмбриональных стволовых клетках – Москва: Издательство ОАО «Издательство «Медицина», издательство «Шико», 2009. - 272 с. (Учеб. лит. для студ. мед. вузов);

4) глава в монографии «Наследственные болезни: национальное руководство» под ред. акад. РАМН Н.П.Бочкова, акад. РАМН Е.К.Гинтера, акад. РАМН В.П.Пузырева / Залетаев Д.В., Немцова М.В., Стрельников В.В. Эпигенетика человека: норма и патология – Москва: Издательство ГЕОТАР-Медиа, 2012. - 936 с.;

Стрельников В.В. – лауреат Премии Российского общества онкологов « In vita veritas» в номинации «Лучший научно-исследовательский проект», 2013 г.; обладатель почетной грамоты президиума Российской академии медицинских наук «За плодотворный труд по развитию медицинской науки и здравоохранения», 2009 г.



**Танас Александр Сергеевич**, к.б.н., 1980 г.р., окончил с отличием факультет автоматики и вычислительной техники Магнитогорского государственного технического университета им. Г.И. Носова в 2002 году. Научно-исследовательской работой занимается с 2008 года: изучением роли молекулярно-генетических нарушений в развитии онкопатологий, разработкой методов и протоколов скрининга дифференциального метилирования ДНК, введением математического моделирования экспериментов в практику лабораторных исследований. В лаборатории молекулярной генетики человека НИИ молекулярной медицины ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России работает с 2010 года.

В 2012 г. Танас А.С. защитил кандидатскую диссертацию на тему «Анализ дифференциального метилирования геномов методами непредвзятого скрининга» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 03.02.07 – генетика и 03.01.09 – математическая биология, биоинформатика.

Танас А.С. принимает личное участие в осуществлении перспективных научных исследований и разработок. Применяя мультидисциплинарный подход к решению научных и прикладных задач, он разрабатывает инновационные алгоритмы скрининга дифференциального метилирования геномов на основе сочетания классических генноинженерных подходов и современных высокопроизводительных методов анализа ДНК с математическим моделированием экспериментов.

Танас А.С. является соавтором новой медицинской ДНК-технологии «Скрининг аномального метилирования ДНК на основе метода амплификации интерметилированных сайтов для диагностики злокачественного опухолевого процесса», зарегистрированной Росздравнадзором (разрешение ФС № 2011/132 от 27.05.2011г.). Эта технология, основанная на исследовании ДНК, представляет собой метод выявления злокачественного опухолевого процесса, маркером которого служит аномальное метилирование/деметилирование ДНК геномов опухолевых клеток, и предназначена для использования в медико-диагностических центрах, онкологических диспансерах и клиниках, оснащенных ПЦР-лабораториями.

Для осуществления математического моделирования условий лабораторных экспериментов и эффективного, научно обоснованного планирования экспериментов, а также анализа результатов лабораторных тестов Танасом А.С. разработаны оригинальные компьютерные программы, которые прошли государственную регистрацию (регистрационные номера ВНИИЦ 50201050017, 50201151514, 50201050040, 50201050039).

Танас А.С. – соавтор изобретения «Способ формирования систем маркеров метилирования ДНК», патент Российской Федерации №2472859.

Танас А.С. - соисполнитель НИР по государственному контракту № 8/3-655н-08 от 31 декабря 2009 «Поиск и характеристика новых молекулярных маркеров для ранней диагностики, прогноза течения, мониторинга эффективности лечения рака мочевого пузыря», по государственному контракту № 8/3-657н-08 от 31 декабря 2009 «Поиск и характеристика новых молекулярных маркеров для ранней диагностики, прогноза течения, мониторинга эффективности лечения рака почки», по государственному контракту № 02.740.11.0089 от 15 июня 2009 в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы по теме «Разработка новых диагностических технологий на основе механизмов эпигенетической регуляции» Соисполнитель грантов Earlier Breast Cancer Test Foundation “Development and validation of a differential methylation screening technology applicable for the identification of early breast cancer diagnostic markers” (2007-2010 гг.), РФФИ № 08-04-01685 А «Общие закономерности структурно-функциональной организации эпигеномов клеток рака молочной железы» (2008-2010 гг.), РФФИ № 14-04-01606 А «Идентификация метилотипов рака молочной железы на основе высокопроизводительного бисульфитного секвенирования ДНК» (2014-2016

гг.), РФФИ 14-04-01792 А "Эпигенетика факторов инвазии и метастазирования злокачественных опухолей у человека" (2014-2016 гг.), РФФИ № 14-04-32295 мол\_а «Аномальное метилирование ДНК как универсальный маркер минимальной остаточной болезни при остром миелоидном лейкозе у детей» (2014-2015 гг.), РФФИ № 12-04-31005 «Поиск молекулярно-генетических маркеров папиллярной почечно-клеточной карциномы» (2012-2013 гг.), РФФИ № 14-04-31832 мол\_а «Комплексная молекулярно-генетическая характеристика хромосомного района 10q23.3-26.3 при глиобластоме» (2014-2015 гг.).

За последние 5 лет им опубликовано 30 печатных работ, в том числе 2 главы в учебниках для студентов медицинских вузов, 2 монографии, 18 тезисов. Две статьи и 4 тезиса опубликованы в журналах с импакт-факторами от 0,7 до 4,4. Результаты исследований ежегодно представляются на российских и международных конференциях.

Танас А.С. – победитель конкурса 2012-2014 года на получение стипендии Президента РФ молодым ученым и аспирантам.

**Руденко Виктория Владимировна**, к.б.н. 1985 г.р., в 2008 году окончила медико-биологический факультет Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Российский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» по специальности «медицинская кибернетика». С 2007 года занимается научно-исследовательской работой в лаборатории молекулярной генетики человека НИИ молекулярной медицины ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России: изучением роли молекулярно-генетических нарушений в развитии онкопатологий, разработкой методов и протоколов скрининга дифференциального метилирования ДНК, введением математического моделирования экспериментов в практику лабораторных исследований.

В 2012 г. Руденко В.В. защитила кандидатскую диссертацию на тему «Новые маркеры аномального метилирования ДНК при раке молочной железы, идентифицированные непредвзятым скринингом дифференциального метилирования геномов» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Круг научных интересов Руденко В.В. в области молекулярной онкологии охватывает рак молочной железы, почки, мочевого пузыря и рак желудка. В частности, Руденко В.В. впервые в российской практике применила многомерный анализ соответствий для выявления клинико-генетических ассоциаций при раке мочевого пузыря и раке желудка. В области молекулярной генетики Руденко В.В. принимала участие в исследованиях роли неслучайной инактивации X-хромосомы и полиморфизмов андрогенового рецептора при синдроме поликистозных яичников (СПКЯ) и андрогенной алопеции. Руденко В.В. была установлена зависимость между вариантом полиморфизма гена андрогенового рецептора и различными фенотипами СПКЯ.

Руденко В.В. является соавтором 1 новой медицинской ДНК-технологии «Скрининг аномального метилирования ДНК на основе метода амплификации интерметилованных сайтов для диагностики злокачественного опухолевого процесса», зарегистрированной Росздравнадзором (разрешение ФС № 2011/132 от 27.05.2011г.), изобретения «Способ формирования систем маркеров метилирования ДНК», патент Российской Федерации №2472859, трех компьютерных программ, прошедших государственную регистрацию: ВНИИЦ 50201050017, ВНИИЦ 50201151514, ВНИИЦ 50201050040).

Руденко В.В. является руководителем НИР по гранту РФФИ № 14-04-32295 мол\_а «Аномальное метилирование ДНК как универсальный маркер минимальной

остаточной болезни при остром миелоидном лейкозе у детей», соисполнитель НИР по государственному контракту № 8/3-655н-08 от 31 декабря 2009 «Поиск и характеристика новых молекулярных маркеров для ранней диагностики, прогноза течения, мониторинга эффективности лечения рака мочевого пузыря», по государственному контракту № 8/3-657н-08 от 31 декабря 2009 «Поиск и характеристика новых молекулярных маркеров для ранней диагностики, прогноза течения, мониторинга эффективности лечения рака почки», по государственному контракту № 02.740.11.0089 от 15 июня 2009 в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы по теме «Разработка новых диагностических технологий на основе механизмов эпигенетической регуляции», соисполнитель грантов Earlier Breast Cancer Test Foundation “Development and validation of a differential methylation screening technology applicable for the identification of early breast cancer diagnostic markers” (2007-2010 гг.), РФФИ № 08-04-01685 «Общие закономерности структурно-функциональной организации эпигеномов клеток рака молочной железы» (2008-2010 гг.), РФФИ № 14-04-01606 А «Идентификация метилотипов рака молочной железы на основе высокопроизводительного бисульфитного секвенирования ДНК» (2014-2016 гг.).

За последние 5 лет соискателем опубликовано 18 печатных работ, в том числе 8 статей в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки, 2 монографии, 8 тезисов. Две статьи и 3 тезиса опубликованы в журналах с импакт-факторами от 0,74 до 5,215. Результаты исследований ежегодно представляются на российских и международных конференциях. Руденко В.В. - лауреат Национальной премии отечественных научных сообществ для участия в конгрессе ESHG2012.

**Алексеева Екатерина Александровна**, 1986 г.р., окончила медико-биологический факультет РГМУ по специальности «медицинская биохимия» в 2010 году. В 2010 году Алексеева Е.А. поступила в клиническую ординатуру ФГБУ «МГНЦ» РАМН по специальности «генетика», которую закончила в 2012 году. В лаборатории молекулярной генетики человека НИИ молекулярной медицины ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России работает с 2011 года. Основная научная и практическая деятельность Алексеевой Е.А. связана с изучением злокачественных опухолей на молекулярно-генетическом уровне для поиска и разработки систем молекулярно-генетической диагностики маркеров.

Алексеева Е.А. принимает личное участие в осуществлении перспективных научных исследований, проводимых в рамках тем НИР лаборатории молекулярной генетики человека. Владение современными методами молекулярной биологии и геномной инженерии позволяет ей успешно решать научные и прикладные задачи по изучению структурно-функциональных нарушений генома человека при онкологических заболеваниях, принимать участие в разработке и создании диагностических протоколов для различных форм наследственной патологии.

Алексеева Е.А. является руководителем НИР по гранту РФФИ № 14-04-31832 мол\_а «Комплексная молекулярно-генетическая характеристика хромосомного района 10q23.3-26.3 при глиобластоме». Алексеева Е.А. – соисполнитель НИР по государственному контракту № 02.740.11.0089 от 15 июня 2009 в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы по теме «Разработка новых диагностических технологий на основе механизмов эпигенетической регуляции», по гранту РФФИ № 12-04-31005 «Поиск молекулярно-генетических маркеров папиллярной почечно-клеточной карциномы», по гранту РФФИ 14-04-01606 «Идентификация метилотипов рака молочной железы на основе высокопроизводительного бисульфитного секвенирования ДНК».

По результатам исследований Алексеевой Е.А. опубликовано 12 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, 8 тезисов.

Алексеева Е.А. принимает участие в российских и зарубежных конференциях. За время работы в лаборатории Алексеева Е.А. участвовала с устными докладами и постерами в 7 конференциях, 2 из которых зарубежные.

**Петруненко Екатерина Григорьевна**, 1989 г.р., студент 5 курса лечебного факультета, лаборант-исследователь лаборатории молекулярной генетики человека НИИ молекулярной медицины ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России. Работает в лаборатории молекулярной генетики человека с 2009 г., за время работы освоила современные молекулярно-генетические методы (экстракция геномной ДНК из биологических образцов, ПЦР, рестрикционный анализ, электрофорез нуклеиновых кислот, микросателлитный анализ ДНК), изучает профильную научную литературу, активно участвует в семинарах лаборатории.

Работала соисполнителем по государственному контракту № 02.740.11.0089 от 15 июня 2009 в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы по теме «Разработка новых диагностических технологий на основе механизмов эпигенетической регуляции», выполнявшемся в ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России в 2009-2011 гг. В настоящее время является исполнителем по гранту РФФИ 14-04-01792 А "Эпигенетика факторов инвазии и метастазирования злокачественных опухолей у человека", 2014-2016 гг.

## **5. Финансовая модель.**

Результаты работы могут быть использованы как при выполнении научных исследований фундаментального (изучение молекулярного этиопатогенеза злокачественных новообразований, систематизация типов опухолей), так и прикладного (разработка систем молекулярно-генетических маркеров) характера, а также в практическом здравоохранении.

Перспективы коммерциализации, широта и масштабность внедрения результатов работы определяются высоким научным и практическим интересом к области эпигеномики. Исследования, направленные на эпигенетическую систематизацию и характеристику типов злокачественных опухолей, могут составить около четверти всех профильных работ. В настоящее время количество таких исследований невелико вследствие отсутствия адекватного способа анализа геномного метилирования. Результаты заявленной работы могут обеспечить технологический прорыв и значительное повышение доли эпигеномных исследований в онкологии. В области разработки средств эпигенетической терапии результаты работы могут стать основой мониторинга состояния эпигеномов при проведении клинических испытаний. Конкуренция предлагаемым разработкам в настоящее время в мире практически отсутствует.

*Целевой рынок продукта* - медицинская промышленность.

*Исследование рынка:* в России на конец 2012 г. на учете в онкологических учреждениях состояли более 3,0 млн. больных. Смертность населения от онкологических заболеваний в Российской Федерации в 2011 г. составила 204,6 случаев на 100 тыс. населения. За последние 10 лет число онкологических больных в стране увеличилось на 25,5%. Каждую минуту ставится один онкодиагноз. Через 10 лет – если ситуацию не менять – больных станет больше еще на 15–20%. Кроме того, заболевание в 60% диагностируется на III–IV стадиях, что значительно повышает

стоимость лечения и уровень инвалидизации. Ежегодный экономический ущерб от онкологических заболеваний – более 90 млрд. рублей.

*Емкость рынка* – пациенты с онкозаболеваниями и пренеопластическими процессами.

Возможными *потребителями* научно-технических результатов являются научные учреждения медико-биологического профиля и клинико-диагностические лаборатории.

*Необходимые действия по доведению* научного результата до его потребителя:

1. публикации результатов в виде научных статей и выступлений на профильных конференциях;
2. публикация лабораторных протоколов и распространение программных продуктов;
3. создание и испытания опытных образцов продукции;
4. регистрация и серийный выпуск наборов реагентов и расходных материалов для проведения анализа метилирования ДНК и диагностики типов злокачественных новообразований.

*Оценка социально-экономического эффекта:* в среднесрочной перспективе использование полученных результатов должно привести к повышению качества молекулярно-генетической диагностики онкологических заболеваний, необходимому для снижения смертности и инвалидизации.

*Характеристика народно-хозяйственного эффекта:* следствием прогнозируемого повышения качества диагностики должно стать снижение общих затрат на лечение и обслуживание онкологических больных.

В структуре производства наборов реагентов для анализа метилом доля разрабатываемых продуктов может составить не менее 10%.

*Вновь создаваемая интеллектуальная собственность является полностью инновационной и патентоспособной.*

## **5. Конкурентные преимущества проекта.**

Несмотря на очевидную ценность метилирования ДНК как диагностического маркера, накопленных на сегодняшний день данных об особенностях метилирования участков генома человека в норме и при патологии недостаточно для формирования эффективных систем эпигенетических маркеров опухолевого процесса (Shin S.H. et al, 2010; Wang W. et al, 2010; Suijkerbuijk K.P.M. et al 2011). Предполагается, что прогресс в разработке новых высокотехнологичных методов скрининга дифференциального метилирования ДНК позволит переломить эту ситуацию (Bock C., 2009).

Подходы к скринингу дифференциального метилирования ДНК можно принципиально разделить на две группы. Первая группа подразумевает предварительный отбор локусов для исследования, осуществляемый на основании некоторой гипотезы, предсказывающей наиболее вероятное выявление дифференциального метилирования именно этих локусов. Задача методов, осуществляющих подходы этой группы, - проверка исходной гипотезы о наличии дифференциального метилирования заранее отобранных последовательностей ДНК (Nemtsova M.V. et al., 2005; Wojdacz T., 2009; Ushijima T., 2005). Вторая группа подразумевает непредвзятый скрининг дифференциального метилирования. При помощи соответствующих методов в ходе скрининга сначала выявляется дифференциальное метилирование заранее неизвестных локусов генома, а затем проводится идентификация их нуклеотидных последовательностей (Fraga M.F., Esteller M., 2001). Непредвзятый скрининг эффективно выявляет дифференциальное метилирование геномных участков, которые, в силу недостаточной изученности

эпигеномов, не подпадают ни под одну из современных гипотез и не включаются в анализ методами первой группы, что не только расширяет фундаментальные представления о роли метилирования ДНК в норме и при патологии, но и способствует диверсификации основ разработки эпигенетических диагностических маркеров (Gebhard C. et al., 2006).

До недавнего времени возможности применения методов непредвзятого скрининга были в значительной степени ограничены сложностью геномной идентификации выявляемых дифференциально метилированных участков ДНК. Предложенный Е.Б.Кузнецовой с соавторами в 2006 г. протокол прямого секвенирования дифференциально метилированных фрагментов ДНК облегчает процесс геномного картирования за счет исключения этапа клонирования фрагментов, однако все еще требует их физического извлечения из полиакриламидных гелей. Секвенирование генома человека в сочетании с математическим моделированием раскрыло ранее недоступный способ картирования дифференциально метилированных локусов, выявляемых методами непредвзятого скрининга. Были предприняты попытки разработки виртуального изображения результатов одного из методов скрининга дифференциального метилирования - рестрикционно-ориентированного геномного сканирования - для идентификации фрагментов ДНК с использованием симулирующего программного обеспечения. Разработанные системы не получили распространения, вероятно, вследствие сложности самого метода скрининга.

Таким образом, в сегменте разработки высокотехнологичных методов геномного анализа метилирования в диагностике онкологических заболеваний конкуренция практически отсутствует. Активно разрабатываемые подходы на основе секвенирования ДНК нового поколения, при высочайшей информативности, не способны занять диагностическую нишу вследствие заградительно высокой себестоимости. Таким образом, предлагаемый проект можно назвать не столько конкурентоспособным, сколько полностью инновационным.

1. Кузнецова Е.Б., Стрельников В.В. Методы анализа метилирования ДНК // 2006. Медицинская генетика, 5(11), 3 - 11.
2. Bock C. Epigenetic biomarker development // 2009. Epigenomics, 1(1), 99-110.
3. Esteller M., Corn P., Baylin S., Herman J. A gene hypermethylation profile of human cancer // Cancer Res. 2001. - Vol. 61. - P. 3225-3229.
4. Fraga M.F., Esteller M. DNA methylation: a profile of methods and applications // BioTechniques. 2002. - Vol. 33. - P. 632-649.
5. Gebhard C., Schwarzfischer L., Pham T.-H., Schilling E., Klug M., Andreesen R., Rehli M. Genome-Wide Profiling of CpG Methylation Identifies Novel Targets of Aberrant Hypermethylation in Myeloid Leukemia // 2006. Cancer Res., 66, 6118 6128.
6. Nemtsova M., Zemlyakova V., Kusnetsova E., Strelnikov V., Lyubchenko L., Zaletayev D. Methylation profiling of carcinogenesis-associated genes in sporadic breast cancer // 2005. Breast Cancer Research, 7(Suppl 2), P4.17.
7. Shin S.H., Kim B.H., Jang J.J., Suh K.S., Kang G.H. Identification of novel methylation markers in hepatocellular carcinoma using a methylation array // 2010. J. Korean Med. Sci., 25(8), 1152 1159.
8. Suijkerbuijk K. P. M., van Diest P. J., van der Wall E. Improving early breast cancer detection: focus on methylation // 2011. Ann. One., 22, 24 29.

9. Ushijima T., Morimura K., Hosoya Y., et al. Establishment of methylation-sensitive-representational difference analysis and isolation of hypo-and hypermethylated genomic fragments in mouse liver tumors // PNAS. 1997. -Vol. 94.-P. 2284-2289.
10. Wang W., Srivastava S. Strategic Approach to Validating Methylated Genes as Biomarkers for Breast Cancer // 2010. Cancer Prevention Research, 3, 16-24.
11. Wojdacz T.K. Current methylation screening methods // 2009. Epigenomics, 1(2), 223-226.

## 7. Инновационность.

В результате уже проведенных исследований коллективом разработан принципиально новый современный алгоритм скрининга дифференциального метилирования геномов, основанный на сочетании классического генноинженерного подхода – амплификации интерметилованных сайтов (АИМС), высокоразрешающего способа разделения фрагментов нуклеиновых кислот – капиллярном электрофорезе, и оригинального компьютерного обеспечения. Разработанная в рамках исследования программа AIMS *in silico* является первым компьютерным симулятором адаптор-опосредованной ПЦР, применимым к полному геному человека. Впервые охарактеризованы количественные и качественные параметры продуктов АИМС, получаемых при различных экспериментальных условиях; критически переоценены закономерности редукции результирующей картины при увеличении длин универсальных праймеров АИМС в зависимости от нуклеотидного состава удлинителей. Впервые предложено рестриктазное картирование дифференциально метилированных фрагментов ДНК на основе математического моделирования.

Программа компьютерной симуляции результатов АИМС – AIMS *in silico* - позволяет в кратчайшие сроки провести научно обоснованное моделирование эксперимента с заранее заданными параметрами и определить оптимальный дизайн реальных экспериментов, исходя из задач исследования и приборной базы. Модуль программы AIMS *in silico*, обеспечивающий моделирование рестриктазного геномного картирования продуктов АИМС, позволяет быстро и эффективно проводить дизайн рестриктазного картирования. Разработанный способ определения геномной принадлежности выявляемых дифференциально метилированных фрагментов ДНК исключает необходимость их реамплификации, клонирования и секвенирования.

Охарактеризованная иерархия продуктов АИМС служит удобным руководством к предварительной оценке степени снижения сложности результирующей картины при увеличении длин универсальных праймеров АИМС в зависимости от нуклеотидного состава удлинителей. Программа просмотра и анализа электрофореграмм PeakPick обеспечивает удобную среду для осуществления дифференциального анализа репрезентаций эпигеномов и, кроме того, является одной из немногих общедоступных программ анализа результатов капиллярного электрофореза в целом.

Применение скрининга дифференциального метилирования геномов для изучения РМЖ позволило выявить 4 константно метилированных и 19 дифференциально метилированных областей генома. Дифференциальное метилирование при раке молочной железы впервые показано для 15 генов: *LAMB1*, *RAI1*, *KCNH8*, *DOCK6*, *GPC2*, *SH3KBP1*, *PPP2R5C*, *PHF15*, *ATMIN*, *C2CD2*, *KIAA1324L*, *IQSEC2*, *AX746725/AK127124*, *TMEM176A/TMEM176B*, *FOXMI/HKMT1188*. Четыре дифференциально метилированные области впервые выявлены в межгенных областях на хромосомах 1p33, 5p15.33, 12q13.13 и 13q32.1.

Проведена оценка частот аномального метилирования указанных локусов. Особенности метилирования выявленных областей охарактеризованы впервые.

Впервые продемонстрированы ассоциации метилирования CpG-островков генов *SH3KBP1*, *PHF15*, *GPC2* и *LAMB1* с клинико-морфологическими свойствами опухолей молочной железы. Промоторы *SH3KBP1* и *PHF15* достоверно чаще метилированы в опухолях со второй степенью злокачественности по сравнению с третьей степенью злокачественности. В то же время CpG-островок гена *GPC2* обнаруживает различия уже в пределах второй степени злокачественности, что говорит о субъективизме критерия «степень злокачественности» и недостаточности только морфологических характеристик для его определения. Также показано, что ген *SH3KBP1* достоверно чаще метилирован в группе опухолей молочной железы с размером T1 против опухолей с размером T2. Метилирование промоторного CpG-островка гена *LAMB1* в образцах рака молочной железы ассоциировано с негативным иммуногистохимическим статусом эстрогеновых рецепторов.

Сформированы оригинальные системы маркеров метилирования для диагностики рака молочной железы, демонстрирующие высокие показатели чувствительности и специфичности. Показано, что для формирования системы, обеспечивающей молекулярную классификацию тканей молочной железы со специфичностью 100%, достаточно семи маркеров метилирования.

## 8. Информация о профильных публикациях, грантах и соисполнителях.

### Список профильных публикаций коллектива

1. Tanas A.S., Shkarupo (Rudenko) V.V., Kuznetsova E.B., Zaletayev D.V., Strelnikov V.V. Novel tools for unbiased DNA differential methylation screening // *Epigenomics*, 2010. Vol. 2. No. 2. P. 325-333
2. Strelnikov V.V., Tanas A.S., Shkarupo (Rudenko) V.V., Kuznetsova E.B., Zaletaev D.V. Unbiased differential methylation screening assay for applications in cancer epigenetic research. 11 European Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Solid Tumours // *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, 2008. P. 59-60
3. Shkarupo (Rudenko) V.V., Tanas A.S., Kuznetsova E.B., Zavalishina L.E., Frank G.A., Zaletaev D.V., Strelnikov V.V. A semi-automated unbiased differential methylation screening assay for applications in cancer epigenetic research // *Eur. J. Hum. Genet.*, 2008. V.16. Suppl. 2. P. 223
4. Tanas A.S., Shkarupo (Rudenko) V.V., Kuznetsova E.B., Zaletaev D.V., Strelnikov V.V. Amplification of intermethylated sites, Bioinformatics and Capillary electrophoresis: the ABC of the cancer methylomes // *Eur. J. Hum. Genet.*, 2009. V.17. Suppl.2. P. 284
5. Tanas A.S., Shkarupo (Rudenko) V.V., Kuznetsova E.B., Zaletayev D.V., Strelnikov V.V. Software for Genomic/Epigenomic Research // *Eposters.net – the online journal of scientific posters*, 2009. EP10983
6. Strelnikov V., Tanas A., Shkarupo V., Kuznetsova E., Gorban N., Zaletaev D. Non-microarray DNA differential methylation screening in breast cancer // *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 2010. Vol.203 No 1, P. 93
7. Tanas A., Shkarupo (Rudenko) V., Kuznetsova E., Zaletaev D., Strelnikov V. AIMS in silico & PeakPick: a software package supporting unbiased screening of DNA differential methylation in cancer // *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 2010. Vol.203 No 1, P. 94
8. Strelnikov V. A State-of-the-Art Differential Methylation Screening Technique Based on the Amplification of Intermethylated Sites // *Epigenetics World Congress – Event Proceedings*, 2009. P. 27
9. Rudenko V.V., Tanas A.S., Kuznetsova E.B., Kekeeva TV, Zaletaev D.V., Strelnikov V.V., New epigenetic markers of breast cancer identified by unbiased screening of differential methylation of the genomes // *Eur. J. Hum. Genet.* - 2012 - V.20, Sup.1 - P. 185



10. Стрельников В.В., Танас А.С., Шкарупо (Руденко) В.В., Кузнецова Е.Б., Кекеева Т.В., Завалишина Л.Э., Франк Г.А., Залетаев Д.В. Современный высокотехнологичный метод скрининга дифференциального метилирования геномов на основе амплификации интерметилованных сайтов // Молекулярная медицина, 2009. № 4. С. 18-26
11. Залетаев Д.В., Стрельников В.В., Немцова М.В., Бабенко О.В., Кузнецова Е.Б., Землякова В.В., Кекеева Т.В., Михайленко Д.С., Шкарупо (Руденко) В.В., Танас А.С. Маркеры метилирования в диагностике онкологических заболеваний // Медицинская генетика, 2010. Т.9 №1. С. 15-21
12. Танас А.С., Шкарупо (Руденко) В.В., Кузнецова Е.Б., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. Дизайн эксперимента и анализ результатов амплификации интерметилованных сайтов с использованием компьютерной программы AIMS in silico // Молекулярная биология, 2010. Т.44 № 2. С. 355-365
13. Танас А.С., Стрельников В.В., Шкарупо (Руденко) В.В., Кузнецова Е.Б., Залетаев Д.В. Современный высокотехнологичный метод диагностики маркеров метилирования в онкологии // Онкогематология, 2008. №4. С. 73-74
14. Руденко В.В., Танас А.С., Стрельников В.В. Новые маркеры аномального метилирования ДНК при раке молочной железы // LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG, 2012
15. Танас А.С., Руденко В.В., Стрельников В.В. Дифференциальное метилирование геномов // LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG, 2014
16. Шкарупо (Руденко) В.В., Танас А.С., Кузнецова Е.Б., Стрельников В.В., Залетаев Д.В. Метод анализа структурно-функциональной организации эпигеномов клеток рака молочной железы // Тезисы V Конференции молодых ученых России с международным участием «Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины» Москва, 2008. С. 489
17. Стрельников В.В., Танас А.С., Шкарупо (Руденко) В.В., Кузнецова Е.Б., Залетаев Д.В. Синтетический непредвзятый метод скрининга дифференциального метилирования геномов опухолевых клеток // V Международная конференция «Молекулярная медицина и биобезопасность», научная программа и тезисы, 2008. С. 94-95
18. Танас А.С., Шкарупо (Руденко) В.В., Кузнецова Е.Б., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. Программное обеспечение для скрининга дифференциального метилирования геномов на основе амплификации интерметилованных сайтов // Медицинская генетика, 2009. Т.8. №12 (90). С. 33
19. Шкарупо (Руденко) В.В., Танас А.С., Кузнецова Е.Б., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. Современные подходы к скринингу дифференциального метилирования геномов клеток рака молочной железы // Медицинская генетика, 2009. Т.8. №12 (90). С. 41
20. Стрельников В.В., Танас А.С., Шкарупо (Руденко) В.В., Кузнецова Е.Б., Залетаев Д.В. Современные высокотехнологичные методы диагностики маркеров метилирования ДНК в онкологии // Пятый московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития», 16-20 марта 2009. С. 90-91
21. Шкарупо (Руденко) В.В., Танас А.С., Кузнецова Е.Б., Стрельников В.В., Залетаев Д.В. Скрининг дифференциального метилирования геномов клеток рака молочной железы // Материалы VI съезда Российского общества медицинских генетиков, г.Ростов-на-Дону, 14-18 мая 2010. С. 197
22. Стрельников В.В., Кузнецова Е.Б., Шкарупо (Руденко) В.В., Танас А.С., Залетаев Д.В. Уроки непредвзятого скрининга дифференциального метилирования ДНК // Материалы VI съезда Российского общества медицинских генетиков, г.Ростов-на-Дону, 14-18 мая 2010. С. 172-173
23. Танас А.С., Руденко В.В., Стрельников В.В., Залетаев Д.В. Алгоритмы и программное обеспечение скрининга эпигенетических нарушений при раке // Шестой московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития», 2011. С. 139-140

24. Танас А.С., Руденко В.В., Кузнецова Е.Б., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. Алгоритмы и программное обеспечение скрининга дифференциального метилирования геномов клеток злокачественных новообразований // III Международная Студенческая Научно-практическая Конференция РУДН, 2011. С. 25-26
25. Руденко В.В., Кузнецова Е.Б., Танас А.С., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. Скрининг дифференциального метилирования геномов клеток рака молочной железы // III Международная Студенческая Научно-практическая Конференция РУДН, 2011. С. 24-25
26. Танас А.С., Руденко В.В., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. Алгоритмы и программное обеспечение непредвзятого скрининга дифференциального метилирования геномов // Труды XX международной конференции и дискуссионного научного клуба «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» - 2012 - С. 208-210
27. Стрельников В.В., Руденко В.В., Танас А.С., Кузнецова Е.Б., Бабенко О.В., Симонова О.А., Залетаев Д.В. Комплексное исследование метилотипов злокачественных новообразований: фундаментальные и прикладные аспекты // Труды XX международной конференции и дискуссионного научного клуба «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» - 2012 - С. 24-27
28. Танас А.С., Шкарупо (Руденко) В.В., Стрельников В.В. Компьютерная программа AIMS in silico // Рекламно-техническое описание, описание программы, описание применения. Регистрационный номер ВНТИЦ 50201050017. Москва, 2010 г.
29. Танас А.С., Руденко В.В., Стрельников В.В. Компьютерная программа PeakPick // Рекламно-техническое описание, описание программы, описание применения. Регистрационный номер ВНТИЦ 50201050040. Москва, 2010 г.
30. Руденко В.В., Танас А.С., Стрельников В.В., Кузнецова Е.Б., Залетаев Д.В. Скрининг аномального метилирования ДНК на основе метода амплификации интерметилированных сайтов для диагностики злокачественного опухолевого процесса // Медицинская ДНК-технология, Разрешение ФС № 2011/132 от 27.05.2011г.
31. Танас А.С., Руденко В.В., Стрельников В.В. Программа для ЭВМ "AIMS in silico2". Рекламно-техническое описание, описание применения. Регистрационный номер ВНТИЦ 50201151514, Москва, 2011 г.
32. Симонова О. А., Кузнецова Е. Б., Бабенко О. В., Руденко В. В., Франк Г. А., Завалишина Л. Э., Кекеева Т. В., Любченко Л. Н., Горбань Н. А., Залетаев Д. В., Стрельников В. В. Метилирование генов субъединиц ламинина -5 в норме и при раке молочной железы. Вестник Российского онкологического научного центра имени Н. Н. Блохина РАМН. 2011.-№4.-С. 32-38.
33. Стрельников В.В. Основные направления молекулярно-генетических исследований в онкологии // Медицинская генетика. - 2012. - № 10. - С. 3-16.
34. Залетаев Д.В., Руденко В.В., Танас А.С., Кузнецова Е.Б., Стрельников В.В., Немцова М.В., Михайленко Д.С., Бабаян А.Ю., Кекеева Т.В., Землякова В.В., Алексеева Е.А., Симонова О.А. Структурно-функциональный анализ опухолевых геномов и разработка тест-систем для ранней диагностики, прогноза течения и оптимизации терапии злокачественных новообразований. Вестник РАМН, 2013, № 9, с. 7-14.
35. Кузнецова Е.Б., Пудова Е.А., Танас А.С., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. *SEMA6B* - кандидат на роль гена супрессора опухолевого роста в критическом хромосомном районе 19p13.3 // Медицинская генетика. – 2013. – Т. 12. - № 2. – С. 32-36.
36. Стрельников В.В., Танас А.С. \*, Руденко В.В., Кузнецова Е.Б., Залетаев Д.В. Геномный анализ метилирования ДНК с использованием секвенирования нового поколения // Медицинская генетика. – 2014. – Т. 13. - № 3. – С. 32-37.

## Информация о профильных грантах

№п/п	Название проекта	Срок выполнения проекта	Основные результаты по проекту
1	«Общие закономерности структурно-функциональной организации эпигеномов клеток рака молочной железы», грант РФФИ № 08-04-01685	2008-2010	Разработан метод скрининга дифференциального метилирования геномов, основанный на амплификации интерметилированных сайтов с флуоресцентно меченых праймеров. Выявлено 27 новых локусов генома, подверженных аномальному метилированию при раке молочной железы. Ассоциации метилированного/неметилированного состояния по крайней мере с одним клинико-морфологическим критерием опухолей показаны для 17 новых локусов, а также для интегральной характеристики опухолевого эпигенома - индекса метилирования.
2	«Разработка новых диагностических технологий на основе механизмов эпигенетической регуляции», государственный контракт № 02.740.11.0089 от 15 июня 2009 в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы	2009-2011	Проведена масштабная характеристика эпигенетических маркеров различных новообразований. Разработаны схема ДНК-чипа низкой плотности, условия подготовки и гибридизации пробы. Разработана линейка чип-детекторов, позволяющих регистрировать чипы различной природы с разным способом проявления, с программным обеспечением. Созданы набор реактивов и расходных материалов для подготовки образцов к анализу на чипе и лабораторные образцы биологического микрочипа низкой плотности.
3	“Development and validation of a differential methylation screening technology applicable for the identification of early breast cancer diagnostic markers”, грант Earlier Breast Cancer Test Foundation	2007-2010	Впервые выявлено аномальное метилирование целого ряда генов - VCIP1P1, BIN1, KCNH2, CACNG4, ATR2B4, PSMF1, AX746725, AK127124, TMEM176A, TMEM176B, FOXM1, C12orf32, C2CD2, IQSEC2, KIAA1324L, ITGA9, HOXB13, PFH15, PURB, ATMIN, ASCL2, EST CN371412 – в образцах рака молочной железы. Изучены клинико-генетические корреляции и предложен лабораторный протокол многолокусной реакции для одновременной диагностики аномального метилирования десятков локусов генома.
4	"Идентификация метилотипов рака молочной железы на основе высокопроизводительного бисульфитного секвенирования ДНК", грант РФФИ № 14-04-01606 А	2014-2016	Идет первый год выполнения
5	«Аномальное метилирование ДНК как универсальный маркер минимальной остаточной болезни при остром миелоидном лейкозе у детей», грант РФФИ №14-04-32295 мол_a	2014-2015	Идет первый год выполнения

## Информация о соисполнителях

Участие соисполнителей в проекте не предусмотрено.

# РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



## ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2472859

### СПОСОБ ФОРМИРОВАНИЯ СИСТЕМ МАРКЕРОВ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК

Патентообладатель(ли): *Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (ГОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздравсоцразвития России) (RU), Российская Федерация, от имени которой выступает Министерство образования и науки Российской Федерации (Минобрнауки России) (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2011119871

Приоритет изобретения **18 мая 2011 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации **20 января 2013 г.**

Срок действия патента истекает **18 мая 2031 г.**

Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

Б.П. Симонов





Серия АА

0001091

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ  
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

# РАЗРЕШЕНИЕ

НА ПРИМЕНЕНИЕ НОВОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ

ФС № 2011/ 132

от «27» мая 2011 г.

**«Скрининг аномального метилирования ДНК на основе метода амплификации интерметилованных сайтов для диагностики злокачественного опухолевого процесса»**

**Разрешение выдано на имя:**

- ГОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова (119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8/2).
- ГУ Медико-генетический научный центр РАМН (115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1).

**Показания к использованию медицинской технологии:**

- Выявление аномального метилирования геномной ДНК, ассоциированного с малигнизацией, в образцах биопсийного материала, протокового аспирата молочной железы, в свободной ДНК из плазмы крови и в других источниках биологического материала, содержащих ДНК, для выявления опухолевого процесса.

**Противопоказания к применению медицинской технологии:**

- Невозможность экстрагировать из исследуемого биологического материала достаточного для проведения анализа количества ДНК (не менее 5 мкг).

**Возможные осложнения при использовании медицинской технологии и способы их устранения:**

Отсутствуют.

Врио руководителя



(подпись, печать)

Е.А.Тельнова



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ  
СОБСТВЕННОСТИ

FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL  
PROPERTY



НАГРАЖДАЮТСЯ

В номинации «100 лучших изобретений России-2013»

Патентообладатели: Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (ГОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздравсоцразвития России), Российская Федерация, от имени которой выступает Министерство образования и науки Российской Федерации (Минобрнауки России)

Авторы: Руденко Виктория Владимировна, Танас Александр Сергеевич, Кузнецова Екатерина Борисовна, Стрельников Владимир Викторович, Залетаев Дмитрий Владимирович за разработку «Способ формирования систем маркеров метилирования ДНК»

(патент Российской Федерации № 2472859)



Руководитель

Б.П. Симонов



IN VITA VERITAS

ВСЕРОССИЙСКАЯ ПРЕМИЯ В ОБЛАСТИ ОНКОЛОГИИ  
АССОЦИАЦИИ ОНКОЛОГОВ РОССИИ

# ДИПЛОМ ЛАУРЕАТА

НОМИНАЦИЯ «ЛУЧШИЙ ПРОЕКТ ГОДА»  
ПОДНОМИНАЦИЯ  
«ЛУЧШИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ПРОЕКТ»

НАГРАЖДАЕТСЯ

**РУДЕНКО ВИКТОРИЯ ВЛАДИМИРОВНА**

к.б.н., научный сотрудник лаборатории эпигенетики ФГБУ  
«Медико-генетический научный центр» Российской академии медицинских наук

**за участие в проекте**

«Лабораторная система скрининга аномального метилирования  
ДНК для диагностики злокачественного опухолевого  
процесса на основе постгеномных технологий»

Сопредседатели Экспертного совета

Хасанов Р.Ш.

Бутенко А.В.

г. Санкт-Петербург  
12 сентября 2013 г.





IN VITA VERITAS

ВСЕРОССИЙСКАЯ ПРЕМИЯ В ОБЛАСТИ ОНКОЛОГИИ  
АССОЦИАЦИИ ОНКОЛОГОВ РОССИИ

# ДИПЛОМ ЛАУРЕАТА

НОМИНАЦИЯ «ЛУЧШИЙ ПРОЕКТ ГОДА»  
ПОДНОМИНАЦИЯ  
«ЛУЧШИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ПРОЕКТ»

НАГРАЖДАЕТСЯ

**ТАНАС АЛЕКСАНДР СЕРГЕЕВИЧ**

к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики человека  
НИИ молекулярной медицины ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России

**за участие в проекте**

«Лабораторная система скрининга аномального метилирования  
ДНК для диагностики злокачественного опухолевого  
процесса на основе постгеномных технологий»

Сопредседатели Экспертного совета

Хасанов Р.Ш.

Бутенко А.В.

г. Санкт-Петербург  
12 сентября 2013 г.