

**федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ имени И.М. СЕЧЕНОВА
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(Сеченовский Университет)**

**Институт фармации им. А.П. Нелюбина
Кафедра биотехнологии**

ЕЛИСТРАТОВА МАРИЯ ГЕОРГИЕВНА
студентка 5 курса 09-01 группы

**БИОИНФОРМАЦИОННОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНОВ,
АССОЦИИРОВАННЫХ С ЗАБОЛЕВАНИЕМ МУЛЬТИФОРМНАЯ
ГЛИОБЛАСТОМА, И РЕКОНСТРУКЦИЯ ГЕННЫХ СЕТЕЙ**

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА
по направлению подготовки (специальности)
06.05.01 Биоинженерия и биоинформатика

**МОСКВА
2022**

Работа выполнена на кафедре информационных и интернет-технологий (КИИТ) Института цифровой медицины Сеченовского Университета.

зав. кафедрой биотехнологии,
доктор биологических наук,
профессор

Луценко С.В.

Научные руководители дипломной работы: 

зав. кафедрой информационных
и интернет-технологий,
доктор технических наук

Лебедев Г.С.

доктор биологических наук,
профессор РАН

Орлов Ю.Л.

С дипломной работой можно ознакомиться на кафедре биотехнологии Института фармации им. А.П. Нелюбина Сеченовского университета по адресу: пр-т Вернадского, д. 96, корп. 1.

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1. Мультиформная глиобластома	6
1.2. Клиническая диагностика	8
1.3. Лабораторные диагностические исследования	10
1.4. Терапия	14
1.6. Биоинформационные методы исследования заболеваний	17
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	22
2.1. Материалы	22
2.1.1. База данных GDC Data Portal	22
2.1.2. База данных GeneCards	22
2.2. Методы	22
2.2.1. Ресурс Gene Ontology	22
2.2.2. Ресурс g:GOSt	22
2.3.3. Ресурс STRING-DB	23
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	24
3.1. Получение списка генов, связанных с наследственной предрасположенностью к мультиформной глиобластоме	24
3.2. Расчет категорий генных онтологий	26
3.3. Реконструкция генных сетей для генов мультиформной глиобластомы	36
3.4. Детальный анализ генов	41
3.4.1. Ген PIK3R1	41
3.4.2. Ген ANK1	42
3.4.3. Ген TTN	43
ВЫВОДЫ	44
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	45
Приложение А	51
Приложение Б	60

ВВЕДЕНИЕ

Глиомы входят в число преобладающих первичных опухолей центральной нервной системы, насчитывая 35,5 %, причем 15,6 % от общего числа первичных опухолей мозга составляет глиобластома [48]. Мультиформная глиобластома (англ. Glioblastoma multiforme, GBM) является самым агрессивным и наиболее распространенным типом первичных опухолей центральной нервной системы с высокой смертностью [41]. Возникает *de novo*, без признаков предшествующей менее злокачественной опухоли (первичная глиобластома), и развивается в течение нескольких месяцев. Несмотря на достигнутый прогресс в изучении молекулярных и генетических механизмов мультиформной глиобластомы, а также появлении новых терапевтических подходов, продолжительность жизни пациентов после постановки диагноза остается низкой из-за малой вариативности эффективного лечения и недостаточно полными представлениями о механизме происхождения этих опухолей [41, 1]. По прогнозам ежегодные показатели заболеваемости в ближайшие 30 лет увеличатся почти на 50% [2].

Мутации играют существенную роль в канцерогенезе, диагностике и выборе терапии пациентов. Реконструкция и анализ генных сетей является одним из основных инструментов исследования генетических факторов, ответственных за развитие заболеваний. На основе выявленных новых молекулярно-генетических характеристик и генов, вносящих наиболее значимый вклад в развитие патологии, могут быть предсказаны перспективные мишени для терапии и разработаны современные подходы к диагностике и прогнозированию возникновения заболевания.

В связи с этим актуальной задачей является применение методов современной биоинформатики с интеграцией имеющейся информации из международных баз данных и геномных проектов относительно мультиформной глиобластомы.

Целью данной работы является теоретическое биоинформационное


изучение проблемы описания молекулярных механизмов мультиформной глиобластомы на основе анализа доступных баз данных и научных публикаций.

В соответствии с заданной целью были сформированы следующие задачи:

1. Изучить имеющуюся актуальную научную литературу по данной проблеме.
2. Построить список генов, ассоциированных с развитием мультиформной глиобластомы, с помощью баз данных и онлайн-инструментов биоинформатики.
3. Определить значимые категории генных онтологий для такого списка генов для анализа молекулярных механизмов и поиска ассоциаций с другими заболеваниями.
4. Реконструировать генную сеть данного заболевания с помощью онлайн-инструментов биоинформатики.
5. Рассмотреть молекулярные механизмы для ключевых генов заболевания мультиформная глиобластома, полученных с помощью анализа структуры генной сети.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Мультиформная глиобластома

В 1926 году, почти через 100 лет после того, как глиомы были впервые описаны, более чем через 50 лет после описания их клеток-предшественников и первой предложенной классификации Вирхова, Персиваль Бейли и Харви Кушинг успешно ввели термин “мультиформная глиобластома”. Где “глиобластома” означала, что опухоль происходит от глиобластов, предшественников глиальных клеток, а “мультиформная” означала чрезвычайно изменчивый фенотип опухоли из-за наличия зон некроза, кровоизлияний и кист. Эта работа дала основу для современной классификации глиом, на которой основана текущая классификация ВОЗ [41, 31]. 

Первичная глиобластома представляет собой разновидность злокачественной глиомы, характеризующаяся беспорядочным расположением опухолевых клеток, полиморфизмом их ядер, наличием очагов некроза, изменениями сосудов, ярким инвазивным фенотипом, отсутствием четких границ распространения опухоли и способностью к продолженному росту после хирургического удаления, что затрудняет их лечение. Успешность лечения зависит от множества факторов. Наибольшее прогностическое значение имеет объем остаточной опухоли после хирургического лечения, но в силу инфильтрирующего характера, полное удаление опухолевой ткани невозможно. К другим факторам, влияющим на прогноз, относят: возраст пациентов, их функциональное состояние до операции, наличие сопутствующей патологии, гистологические характеристики опухоли, ее локализация. Дополнительным фактором является агрессивность опухоли, которая определяется частотой возникновения новых случаев опухоли после лечения (в частности, метастаз, или возникновение опухолей более высокой степени злокачественности) [1, 32, 24].

Мультиформная глиобластома может возникнуть в любом возрасте. Прослеживается более высокая заболеваемость у мужчин или увеличение риска возникновения мультиформной глиобластомы с возрастом [30]. В 60% случаев встречается у лиц в возрасте старше 50 лет (в среднем в 64 года), и встречается чаще среди мужчин (соотношение 1,6:1). Согласно различным исследованиям, медиана выживаемости с момента постановки диагноза составляет 12-15 месяцев, а при адъювантном лечении лучевой терапией и темозоломидом медиана продолжительности жизни увеличивается до 15-17 месяцев. Менее 10% пациентов выживают через 2 года после постановки диагноза [1, 2, 24].

В настоящее время считается, что глиобластома является спонтанной опухолью, несмотря на то, что есть истории болезни описывающие развитие глиомы у родственников. Семейная форма этой опухоли описана в 1% случаев. Тем не менее, генетический фон для развития этого типа глиобластомы отличается от тех, которые возникают спонтанно [50].

Среди женщин более высокий риск возникновения мультиформной глиобластомы отмечен у женщин в постменопаузе, поэтому была выдвинута гипотеза об участии половых гормонов в развитии глиобластомы. Заболеваемость данной опухолью также связана с ростом и индексом массы тела, где высокие значения этих двух признаков увеличивают риск заболеваемости глиобластомой [7].

Механизм происхождения глиобластомы, на данный момент, недостаточно изучен. С точки зрения системной биологии предполагается, что при различных патологических состояниях клетки наблюдается разница в экспрессии генов, которые ко-экспрессируются в группе в составе генной сети [33].

Многие генетические факторы и факторы окружающей среды были изучены при заболевании мультиформная глиобластома, но не было выявлено ни одного фактора риска, на который приходится большая часть глиобластом. Таким образом, как и многие другие виды рака, мультиформная глиобластома является спорадическим явлением, хотя исследования показали высокую

распространенность предшествующего терапевтического облучения среди пациентов с мультиформной глиобластомой. Некоторые исследования показали риск возникновения мультиформной глиобластомы в связи со сниженной восприимчивостью к аллергии, иммунными факторами, иммунными генами и некоторыми однонуклеотидными полиморфизмами, обнаруженными в исследованиях полногеномной ассоциации. Нет существенных доказательств связи с факторами образа жизни, такими как курение, употребление алкоголя, употребление наркотиков или воздействие N-нитрозосоединений [17].

Выяснено, что мультиформная глиобластома может также возникать в ходе генетических заболеваний, таких как туберозный склероз, синдром Туркота, множественная эндокринная неоплазия типа ПА и нейрофиброматоз типа I, NF1. Приобретенные травмы головы, возникшие в результате ушиба головного мозга, могут также предрасполагать к появлению глиобластомы [9].

Гипоксия представляет собой характерный фактор риска для онкогенеза большинства опухолей, который играет ключевую роль в прогрессировании рака, включая мультиформную глиобластому [39]. Было доказано, что гипоксическая микросреда играет важную роль в патогенезе мультиформной глиобластомы и тесно связана с ростом и развитием опухоли и плохим прогнозом. Гипоксия повышает резистентность опухолевых клеток к лучевой терапии и химиотерапии и приводит к рецидиву заболевания. При действии гипоксии происходит гиперэкспрессия белков, что оказывает заметное влияние на протеомный состав секрета клеток мультиформной глиобластомы [51].

1.2. Клиническая диагностика

Радиогеномика является многообещающей стратегией прогнозирования общей выживаемости для неинвазивного лечения мультиформной глиобластомы. Кроме того, данные о мутациях генов и другие генные биомаркеры могут быть

объединены с рентгеномическими характеристиками для оценки общей выживаемости [15].

Интерпретация результатов визуализации у пациентов с нейроонкологией должна проводиться с учетом того, что новая классификация Всемирной организации здравоохранения основана на генотипе опухоли, который определяет не только ее биологическое поведение, но и ее внешний вид на магнитно-резонансной томографии при первоначальном диагнозе. На сегодняшний день результаты визуализации не позволяют установить IDH-статус глиомы достоверно; однако некоторые различия могут указывать рентгенологу на основной тип опухоли, такой как возраст, локализация, степень некротического компонента, увеличенные значения относительного объема мозговой крови и сниженные значения аналого-цифрового преобразования [4].

На снимке магнитно-резонансной томографии опухоль проявляется как темное пятно в центре – некротическая и гетерогенная кольцевидная масса, то есть область мертвых клеток, окруженная светлой областью – это область вазогенного отека, при котором плазма клеток выходит во внеклеточное пространство. Опухоль, поражающая заднюю часть височной доли (стрелки) и переднебоковую часть затылочной доли (стрелки) с распространением на задний край островкового белого вещества (звездочки) (рис. 1). Чаще всего глиобластома обнаруживается в больших полушариях головного мозга, однако она может поражать и другие отделы [4].

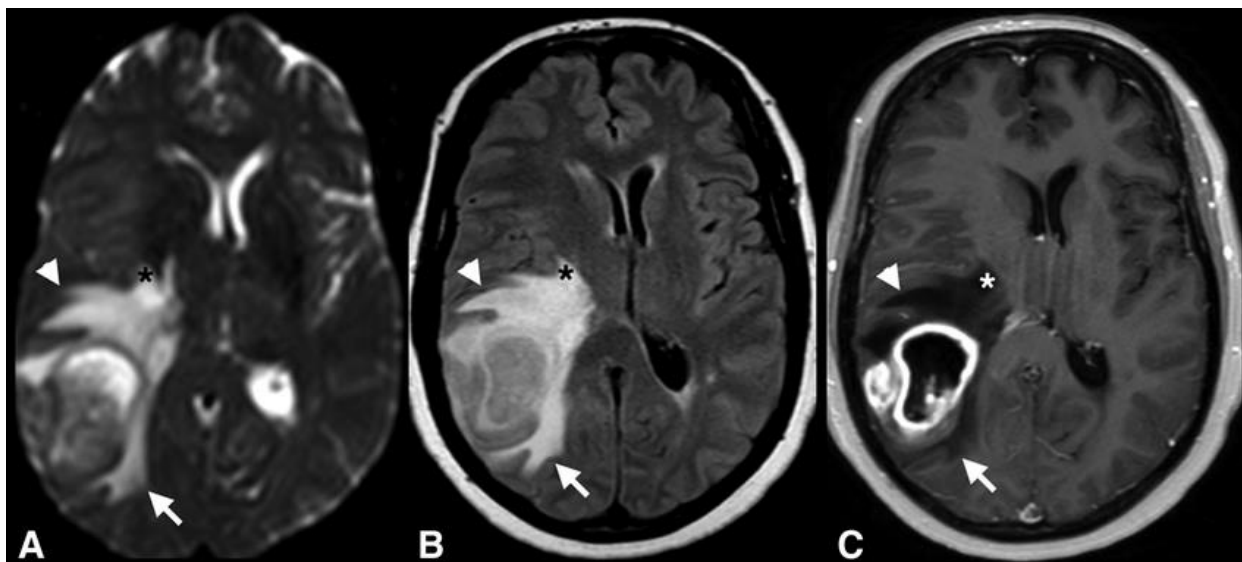


Рисунок 1. Магнитно-резонансная томография головного мозга 60-летней пациентки с диагнозом правосторонняя глиобластома IDH дикого типа, ассоциированная с мутацией гена EGFR (ADC-карта (A), изображениях T2-FLAIR (B) и T1w с гадолинием (C)) [4].

1.3. Лабораторные диагностические исследования

Маркеры, экспрессируемые в мультиформной глиобластоме, варьируются от нейронных предшественников/подобных стволовым клеткам, нейрональных и астроглиальных маркеров, что подчеркивает ее гетерогенность [1].

Согласно клиническим рекомендациям для уточнения прогноза, пациентам при глиобластоме о рекомендовано молекулярно-генетическое исследование мутаций в генах IDH1 и IDH2 в биопсийном (операционном) материале, определение метилирования гена MGMT в биопсийном (операционном) материале [48]. Мультиформную глиобластому подразделяют на три подгруппы в зависимости от статуса мутации изоцитратдегидрогеназы-1 (IDH1) и изоцитратдегидрогеназы-2 (IDH2): IDH-мутантная, IDH-дикого типа и NOS (не указано). Однако, несмотря на эту классификацию, большинство пациентов с глиобластомой получают идентичное лечение, и в настоящее время существует несколько таргетных методов лечения, что способствует неблагоприятным

исходам, обычно наблюдаемым у пациентов с глиобластомой [34]. Обнаружение мутации IDH1 и метилирования MGMT у пациентов с глиобластомой может помочь в прогнозировании их ответа на лечение и моделей выживания, и их комбинация лучше, чем использование любого из них по отдельности [20].

Ведущими генетическими мутациями в патогенезе злокачественных глиальных опухолей считаются: потеря гетерозиготности (loss of heterozygosity – LOH) в длинном плече хромосомы 10 (LOH 10q), мутация гена PTEN (10q23.3), мутации в различных экзонах гена опухолевого супрессора p53, амплификация гена EGFR, делеция или инактивирующие мутации гена p16, а также гиперметилирование промотора гена MGMT. Эти мутации могут служить новым прогностическим фактором наряду с клиническими факторами прогноза и открывают новые перспективы и подходы в лечении [7]. Последовательное изменение генов EGFR/PTEN/Akt/mTOR является основным патогенетическим путем развития первичной глиобластомы [36]. Амплификация гена EGFR встречается в 40% всех случаев первичных глиобластом и тесно связана с возрастом пациентов [7].

Глиобластома характеризуется большим количеством потенциально таргетируемых молекулярно-генетических нарушений. Известно, что развитие мультиформной глиобластомы связано с дерегуляцией контрольной точки G1 / S в клеточном цикле и возникновением многих генетических нарушений в клетках глиомы, таких как потеря генетического материала в пределах хромосомы 10q, амплификация генов EGFR, FGFR2, IRS2 и AKT3, а также мутации в генах PTEN, TP16, TP53, PARK2, PTPRD и NF1 [14].

Наиболее характерные молекулярно-генетические маркеры для мультиформной глиобластомы считаются мутации гистонов (характерны для детских опухолей), CDKN2A, метилирование MGMT, TP53 и TERT. Часто встречается явление глобального гипометилирования промоторов генов; например, в качестве нового эпигенетического прогностического биомаркера глиом обсуждается гипометилирование промотора гена POTEH (POTE ankyrin

domain family, member H); экспрессия POTEH возрастает с увеличением стадии заболевания и является неблагоприятным прогностическим фактором [47].

TP53 и EGFR, которые являются наиболее мутированными генами в подгруппах взрослых и пожилых людей, не мутируют в подгруппе молодых людей, в которой ATRX является наиболее затронутым драйверным геном. Кроме того, выявлено уникальное распределение соматических мутаций в молодой и взрослой популяции, особенно в генах, связанных с репарацией ДНК и ремоделированием хроматина ATRX, MGMT и IDH1 [12].

Более чем 70% мультиформных глиобластом содержит мутацию P53, в сочетании с патологией генов MDM2 и p14ARF. Были предложены наносистемы таргетной доставки активной формы гена P53 в клетки мультиформной глиобластомы. Мутации генов IDH1/IDH2 более характерны для первичных форм мультиформной глиобластомы у молодых пациентов. Мутация гена Гиппеля – Ландау (VHL) – стратегический фактор канцерогенеза мультиформной глиобластомы. Ген регулирует реакцию тканей на гипоксию, и является регулятором трафика стволовых клеток и инициатором процессов ангиогенеза. Характерные для мультиформной глиобластомы мутации генов NF1 и NF2, CDH1, APC, CTNNB1, SMO, PTCH и Мус дестабилизируют геном, и ведут к нарушению экспрессии других генов. Фактор роста тромбоцитов (белок PDGF- α) является одним из наиболее значимых лигандов в биологии мультиформной глиобластомы. Взаимодействие PDGF со своим рецептором активирует в клетках мультиформной глиобластомы экспрессию генов семейства Akt и резко усиливает пролиферацию неопластических клеток и рост опухоли. Концентрация HGF в мультиформной глиобластоме коррелирует с вероятностью рецидива после удаления. Высокая агрессивность мультиформной глиобластомы ассоциирована с гиперметилированием генов p14ARF, IDH1 и гена каспазы-8 [44].

Ингибиторы тирозинкиназы EGFR, а также экспериментальные ингибиторы PI3K не продемонстрировали эффективности при лечении пациентов с данным заболеванием. Напротив, применение ингибиторов BRAF в комбинации с

ингибиторами MEK или радиотерапией, а также ингибиторов PARP и IDH1/2 является перспективной стратегией терапии мультиформной глиобластомы. Однако необходимо дальнейшее изучение эффективности этих групп препаратов и биомаркеров ответа на больших выборках пациентов [45].

Результатом исследования на основании данных секвенирования множества образцов мультиформной глиобластомы является определение прогностической генной сигнатуры, которая может дополнить общепринятые клинические прогностические факторы и дополнительно обеспечить возможность персонализированной терапии. В генную сигнатуру вошли такие гены как CD79B, MAP2K3, IMPDH1, SLC16A3, MPZL3 и APOBR [43].

В качестве потенциальных маркеров гипоксического фенотипа мультиформной глиобластомы предложены S100A6, HEY1, ZIP3, S100A4, ZEB2, для которых было доказано участие в патогенезе мультиформной глиобластомы [51].

Высокая экспрессия белков ALK-1, h-TERT и ALK-A плохо влияет на прогноз мультиформной глиобластомы. Соответственно, экспрессия белка ALK-1, экспрессия белка h-TERT и обнаружение изменения гена ALK могут использоваться в качестве ценных прогностических маркеров у пациентов с глиобластомой [8].

CDKN1A также может служить биомаркером при лечении пациентов с мультиформной глиобластомой. Ген CDKN1A связан с химиорезистентностью мультиформной глиобластомы, связанной с инфекцией HTLV-1, и показывает значительную корреляцию с плохим прогнозом. Было обнаружено, что CDKN1A участвует в АКТ-опосредованной устойчивости клеток глиомы к темозоломиду. Экспрессия CDKN1A связана с инфильтрирующими опухоль лимфоцитами и иммуномодуляторами [13].

Гены MAOA, MAOB, GATM, GLDC, AMT и SHMT1 определены как ключевые признаки, способствующие нарушению процессов обмена аминокислот

глицина, треонина и серина, кривой роста аксональных конусов и миграции клеток при глиоме [37].

GPX2 является кандидатом в качестве протоонкогена для GBM. GPX2 может быть потенциальной терапевтической мишенью для пациентов с мультиформной глиобластомой [11].

SLC22A3 является независимым благоприятным прогностическим биомаркером GBM. Пациенты с низким уровнем SLC22A3 могут быть более подвержены высокому риску и должны получать более интенсивное послеоперационное наблюдение и лечение [26].

Клетки глиобластомы с высокой экспрессией ABCG2 накапливают меньше фотосенсибилизатора и требуют более высоких доз света для элиминации. Ингибирование ABCG2 во время накопления фотосенсибилизатора и облучения обещает восстановить полную восприимчивость популяции опухолевых клеток к фотодинамическому воздействию [23].

Изменения в сигнальном пути EGFR/PTEN/PI3K значительно чаще встречаются при первичных глиобластомах (63%), чем при вторичных глиобластомах (31%). Это говорит о том, что лечение, направленное на этот сигнальный путь, будет особенно эффективным при первичных глиобластомах с изменениями в сигнальном пути EGFR/PTEN/PI3K [18].

LHX5 и TLX1 являются генами, связанными с рецидивом, у пациентов с глиобластомой и могут служить жизнеспособными молекулярными биомаркерами рецидива глиобластомы [28].

1.4. Терапия

Согласно клиническим рекомендациям и исследованиям для пациентов с глиобластомой стандарт лечения включает хирургическую резекцию опухоли с последующей лучевой терапией в сочетании с химиотерапией и темозоломидом. При рецидиве варианты лечения ограничены из-за отсутствия

универсального стандарта лечения рецидивирующей мультиформной глиобластомы. Сопутствующей проблемой для эффективного лечения является гематоэнцефалический барьер, который препятствует проникновению в головной мозг лекарственных средств с молекулярной массой ниже 400-600 кДа, сводя к минимуму клиническое применение большинства противоопухолевых препаратов для лечения опухолей головного мозга [1,48]. Темозоломид, алкилирующий агент с простым пероральным введением и благоприятным профилем токсичности, используется в сочетании с лучевой терапией и после нее [38].

Современная комбинированная терапия предлагает новые стратегии эффективного лечения мультиформной глиобластомы. Было показано, что комбинация аспирина и темозоломида повышает эффективность лечения мультиформной глиобластомы [29]. Низкомолекулярная терапия на сегодняшний день не достигла существенного прогресса, хотя подавляющее большинство новых клинических испытаний по-прежнему сосредоточено на низкомолекулярной терапии. Имея в новые молекулы и мишени, а также более продуманный выбор комбинированной терапии и адаптивный дизайн клинических испытаний имеет перспективное будущее [42].

В обосновании новых биоинженерных подходов к созданию персонифицированных клеточных препаратов для терапии глиальных опухолей с учетом молекулярно-биологических характеристик опухолевых стволовых клеток показано, что основным инструментом терапевтического воздействия могут быть собственные стволовые клетки онкологического больного, а протеом опухолевой стволовой клетки может рассматриваться как основная мишень клеточной терапии. Стандарт лечения глиальных опухолей помимо хирургической операции и облучения должен включать химиотерапию с обязательным применением современных таргетных препаратов для коррекции генетических нарушений и эпигенетических сбоев, культур цитотоксических лимфоцитов и индивидуализированных противоопухолевых вакцин. Создание клеточных

биомедицинских препаратов для направленного воздействия на опухолевые стволовые клетки приведет к повышению эффективности конвенционных методов лечения и существенно продлит жизнь онкологических больных. Терапия эпигенетических нарушений при мультиформной глиобластоме и других злокачественных глиальных опухолях пока не получила широкого распространения в клинике [44].

К настоящему моменту в терапии мультиформной глиобластомы помимо золотого стандарта лечения вводятся новые подходы, включающие цитотоксическую химиотерапию, генную терапию, иммунотерапию, фототерапию, термотерапию, антиангиогенную терапию, нанотерапию и высокочастотные электрические поля. Однако, клинических результатов новых методов лечения сейчас недостаточно. На данном этапе нельзя сказать, что существует эффективная монотерапия, но наиболее перспективным направлением можно считать иммунную терапию. Комбинация иммунотерапии с лекарственной и химиотерапией повышает мутационную нагрузку, экспрессию стрессовых и других факторов, которые увеличивают антигенпрезентацию опухолевых клеток иммунокомпетентным клеткам [1,45].

Вирусная генная терапия показала сильный терапевтический потенциал в лечении глиобластомы. В будущем исследования должны быть сосредоточены на терапевтической эффективности и мониторинге побочных эффектов, прежде чем вирусные векторы будут широко использоваться в клинической практике [19]. Онколитические вирусы могут служить универсальными врожденными адъювантами для повышения адаптивного противоопухолевого иммунитета. Вполне вероятно, что синергетическая комбинированная терапия, например, с ингибиторами иммунных контрольных точек, в конечном итоге будет необходима для лечения глиобластомы [21].

За последнее десятилетие были достигнуты значительные успехи в разработке новых терапевтических подходов с использованием генетических стратегий. Эти передовые методы могут регулировать экспрессию онкогенов

мультиформной глиобластомы без изменения генотипа и, таким образом, избегать возможной генотоксичности [10].

Феномен резистентности глиобластом к стандартным методам лечения связан с их биологической сложностью и различными клеточными и молекулярными механизмами, активируемыми во время онкогенеза и прогрессирования болезни. Несмотря на то, что концепция таргетной терапии, основанная на молекулярной стратификации глиобластом, привлекательна и научно обоснована, таргетная монотерапия глиобластомы способствует развитию лекарственной устойчивости путем селекции опухолевых клонов и, как следствие, развитию рецидива. Будущая иммунотерапия глиобластом представляется наиболее обнадеживающим методом комбинированной терапии, управляемой биомаркерами. Клинические испытания оценивают использование ингибиторов контрольных точек иммунитета в сочетании с новыми перспективными методами лечения, включая вакцинотерапию, CAR-T-клеточную и вирусную терапию [52].

1.6. Биоинформационные методы исследования заболеваний

Для анализа генов предрасположенности к развитию заболеваний используют он-лайн инструменты биоинформатики и базы данных медицинской генетики.

Существуют открытые международные базы данных по общей аннотации генома и транскриптома человека, например Ensembl (<http://ensembl.org/>), общие базы данных белковых взаимодействий HPRD (<http://hprd.org/>), биохимических реакций KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) и Interactome (<http://interactome.org/>). В COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer, <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) содержатся данные о соматических мутациях при раке. Часто для получения базового списка генов человека, ассоциированных с заболеванием, используют базу данных генов и фенотипов заболеваний OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man, <https://omim.org/>) [3,49,53].

Помимо общих баз данных существуют специализированные: по экспрессии в клетках опухолей различных типов The Cancer Gene Atlas (cancergenome.nih.gov/), экспрессии генов в компартментах мозга Allen Brain Atlas, по транскриптомному профилированию опухолей (<https://cghub.ucsc.edu/>) и секвенированных геномов опухолей Ivy Glioblastoma Atlas Project (<http://glioblastoma.alleninstitute.org/>) [49].

С помощью Samtools и VCFTools оставляют списков геномных мутаций с последующим нахождением мутаций, встречающихся только определенных в образцах.

Проект Gene Ontology (GO) — биоинформатический проект, посвященный созданию унифицированной терминологии для аннотации генов и генных продуктов всех биологических видов. Представляет из себя структурированный и контролируемый словарь терминов и отношений для каталогизации функций генов. Термины подразделяются на три непересекающиеся онтологии: молекулярные функции (molecular function, MF), биологические процессы (biological process, BP) и клеточные компартменты (cellular compartment, CC). Каждая онтология описывает конкретный аспект функциональности гена или продукта гена, а также связь между ними. Аннотации в GO могут быть получены экспериментально или с помощью вычислений, разные классы аннотаций имеют разный уровень достоверности [6].

Консорциум генных онтологий (GOC) предоставляет наиболее полный доступный в настоящее время ресурс для вычисляемых знаний о функциях генов и генных продуктов. По мере развития проекта продолжается пересмотр старых аннотаций в свете новых результатов и для обеспечения согласованности с другими онтологиями. Эта информация не только удобна для чтения человеком, но и машиночитаема, и поэтому играет решающую роль в вычислительном анализе геномных и биомедицинских данных. Ресурс охватывает гены множества различных организмов из всех царств жизни, а также вирусы. Для хорошо изученных организмов большая часть информации в базе знаний GO получена непосредственно из опубликованных экспериментов [35].

Для анализа и визуализации категорий генных онтологий используют ресурсы DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, <https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>), ресурс PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships, <http://pantherdb.org/>), а также Gene Ontology (<http://geneontology.org/>), AmiGO (<http://amigo.geneontology.org/amigo>) и g:GOSt (<http://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>) [53,5,22,27,14].

Генные сети – это молекулярно-генетические системы, обеспечивающие формирование фенотипических характеристик организмов (молекулярных, биохимических, структурных, морфологических, поведенческих и т.д.) на основе информации, закодированных в их геномах. Реконструкция генной сети — это задача биоинформатики, целью которой является моделирование сложной регуляторной активности, которая может происходить между генами. Эта задача обычно решается с помощью методов прогнозирования связей, которые анализируют данные об экспрессии генов. Однако реконструированные сети часто страдают от большого количества ложноположительных фронтов, которые на самом деле являются результатом косвенной регулирующей деятельности из-за наличия явлений общей причины и общего следствия или, другими словами, из-за того, что принятые индуктивные методы не учитывают возможную причинно-следственную связь явлений [25].

Для реконструкции генной сети взаимодействий генов используют ресурсы GeneMANIA (<https://genemania.org/>), STRING-DB (<https://string-db.org/>), Reactome <https://reactome.org/> [40,9]. Pathway Studio, STRING, Biblio-MetReS, Meshop и Coremin являются хорошо известными примерами систем анализа текстов, предназначенных для реконструкции молекулярно-генетических сетей. [53]

Для реконструкции и анализа молекулярно-генетических сетей на основе автоматизированного метода анализа текста была разработана система Associative Network Discovery (AND) Она дает подробное описание различных типов взаимодействий между генами, белками, микроРНК, метаболитами, лигандами, клеточными компонентами, путями и ассоциативные связи этих веществ с

заболеваниями с учетом специфики клеточных линий и организмов. Система использует методы автоматического анализа текстов рефератов PubMed, а также информации из баз данных о взаимодействиях биологических объектов (рис. 2). Хотя точность ANDSystem сравнима с другими перечисленными ранее инструментами для анализа текста, он превосходит их по способности идентифицировать большее количество типов взаимодействия [16,46].

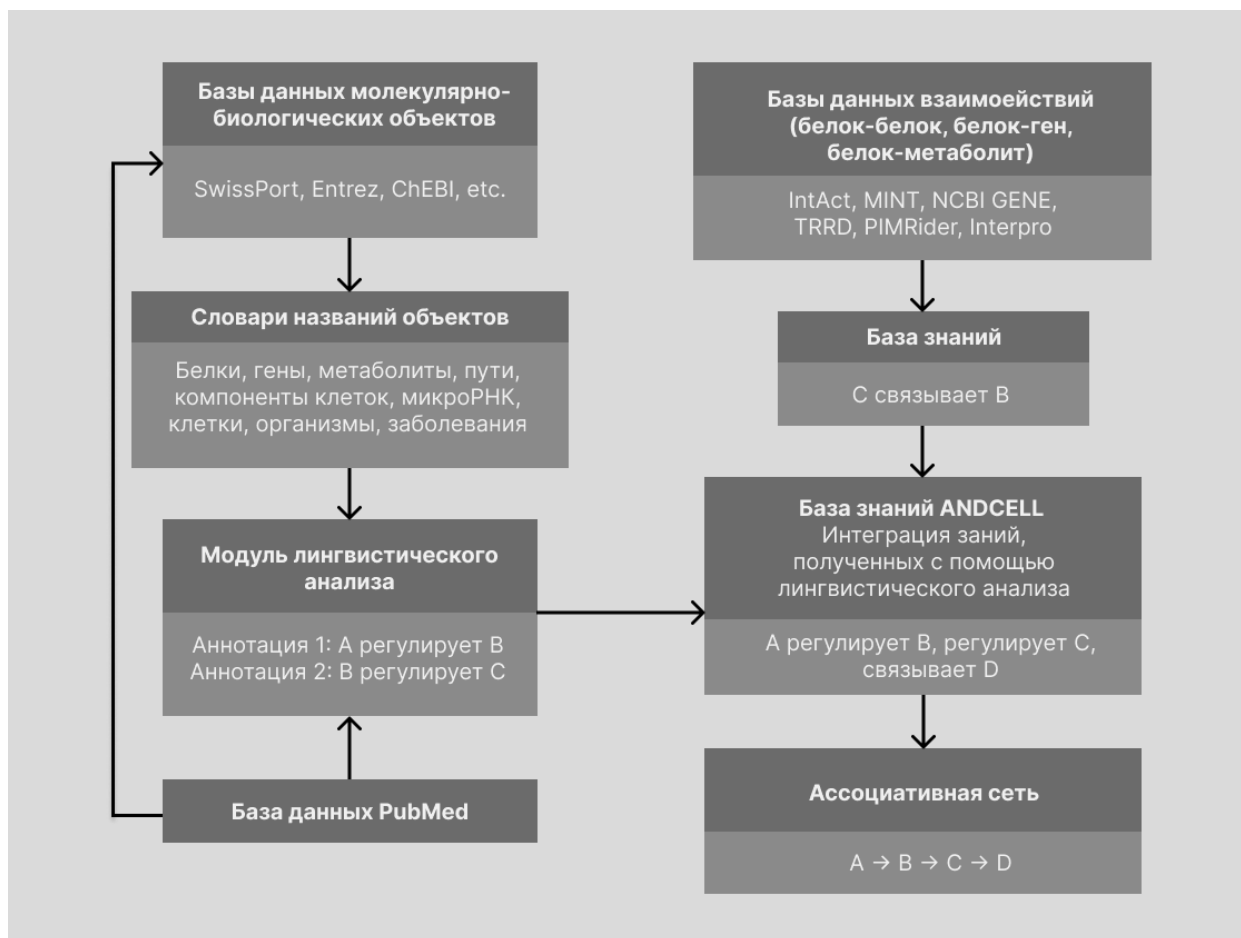



Рисунок 2. Схематическая иллюстрация литературы и интеллектуальный анализ базы данных, реализованные в системе AND (адаптировано с [16]).


С помощью базы данных GeneCards (<https://www.genecards.org/>) определяют лекарственные средства, влияющие на гены. По данным PDB (Protein Data Bank, <https://www.rcsb.org/>) можно определить структуру белка. Сервис MalaCards (<https://www.malacards.org/>) используют для выявления сопутствующих заболеваний. Данные секвенирования множества образцов мультиформной

глиобластомы были заархивированы в базах данных открытого доступа, таких как Китайский атлас генома глиомы (CGG  <http://www.cgga.org.cn/>) и Атлас генома рака (TCGA, <https://portal.gdc.cancer.gov/>) [43].


2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. База данных GDC Data Portal


Для анализа генов рассмотрены данные секвенированных геномов мультиформной глиобластомы, полученные из открытой международной базы данных GDC Data Portal (Genomic Data Commons, <https://portal.gdc.cancer.gov/>), в которой представлены данные проекта The Cancer Genome Atlas (TCGA) 

2.1.2. База данных GeneCards

С помощью базы данных GeneCards (<https://www.genecards.org/>)  детальный анализ генов, играющих ключевую роль в развитии заболевания.

2.2. Методы


2.2.1. Ресурс Gene Ontology

Анализ генных онтологий для списка генов был выполнен с помощью ресурса Gene Ontology (<http://geneontology.org/>) 

2.2.2. Ресурс g:GOSt

Повторный анализ и визуализация генных онтологий был использован онлайн-инструмент g:GOSt (<http://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>), позволяющий построить график точечных значений категорий генных онтологий.

2.3.3. Ресурс STRING-DB

Для реконструкции генной сети взаимодействий генов мультиформной глиобластомы использовались ресурс STRING-DB (<https://string-db.org/>). 

2.3.4. Ресурс AmiGO

Для расшифровки функционального значения категорий генных онтологий использовался сервис AmiGO (<http://amigo.geneontology.org/amigo>).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Получение списка генов, связанных с наследственной предрасположенностью к мультиформной глиобластоме

Поиск по ключевому слову «GBM» дал 14302 гена, из которых только 150 наиболее часто мутирующих были взяты для анализа (приложение А). 20 наиболее часто мутирующих генов (табл. 1) были визуализированы в график (рис. 3).

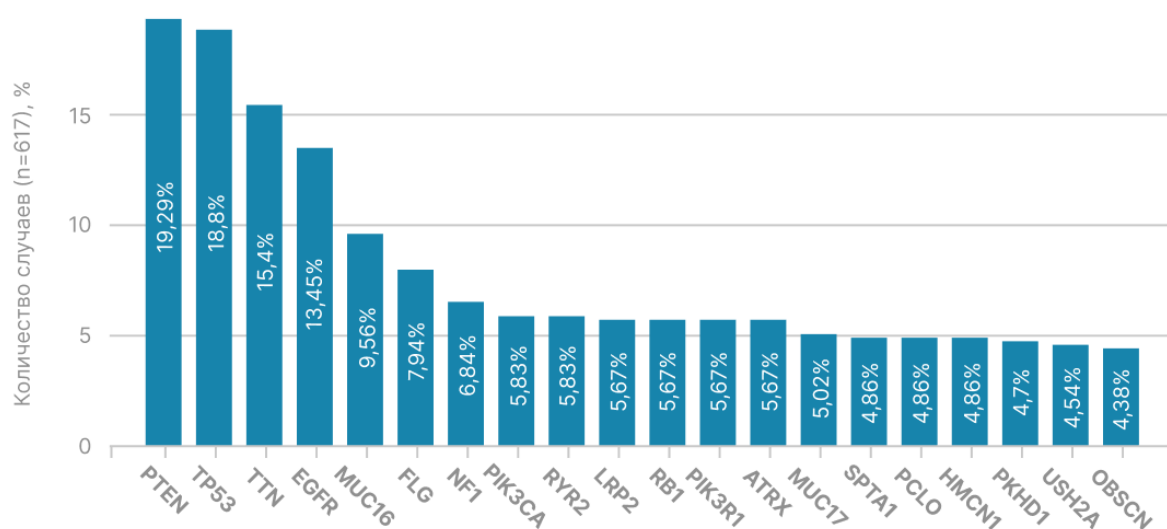



Рисунок 3. Распределение наиболее часто мутирующих генов (адаптировано с электронного ресурса )

https://portal.gdc.cancer.gov/exploration?filters=%7B%22content%22%3A%5B%7B%22content%22%3A%7B%22field%22%3A%22genes.is_cancer_gene_census%22%2C%22value%22%3A%5B%22true%22%5D%7D%2C%22op%22%3A%22in%22%7D%5D%2C%22op%22%3A%22and%22%7D&searchTableTab=genes)

Таблица 1. Список наиболее часто мутирующих генов при мультиформной глиобластоме

№	Ген	Наименование
1	PTEN	phosphatase and tensin homolog
2	TP53	tumor protein p53
3	TTN	titin
4	EGFR	epidermal growth factor receptor
5	MUC16	mucin 16, cell surface associated
6	FLG	filaggrin
7	NF1	neurofibromin 1
8	PIK3CA	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
9	RYR2	ryanodine receptor 2
10	LRP2	LDL receptor related protein 2
11	RB1	RB transcriptional corepressor 1
12	PIK3R1	phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1
13	ATRX	ATRX chromatin remodeler
14	MUC17	mucin 17, cell surface associated
15	SPTA1	spectrin alpha, erythrocytic 1
16	PCLO	piccolo presynaptic cytomatrix protein
17	HMCN1	hemicentin 1

Продолжение таблицы 1.

№	Ген	Наименование
18	PKHD1	PKHD1 ciliary IPT domain containing fibrocystin/polyductin
19	USH2A	usherin
20	OBSCN	obscurin, cytoskeletal calmodulin and titin-interacting RhoGEF

Согласно изученной литературе из двадцати наиболее часто мутирующих генов при диагнозе мультиформная глиобластома, представленных на рисунке 3 и в таблице 1, только четыре гена (PTEN, TP53, EGFR, NF1) являются ранее изученными.

3.2. Расчет категорий генных онтологий

Были выбраны только 3 основные генные онтологии (Gene Ontology):

- GO biological process - биологические процессы;
- GO molecular function - молекулярные функции;
- GO cellular component - клеточные компартменты.

Список 150 генов человека был загружен через интерфейс Gene Ontology для поиска значимых категорий генных онтологий для этой группы генов. В качестве референсного генома выбран Homo sapiens. Из списка генов все идентификаторы были распознаны. Всего в референсном геноме по использовалось 20589 генов. Применена коррекция Бонферрони.

Было выполнено три аналогичных анализа для разных групп генных онтологий с ограничением значения с P-Value до E-06 для биологических процессов, E-04 для молекулярных функций и E-05 для клеточных компартментов для представления наиболее информативных результатов. Построены таблицы категорий генных онтологий (табл. 2-4).

Таблица 2. Список категорий генных (GO biological process) онтологий по Gene Ontology для мультиформной глиобластомы

№	Категория генных онтологий	Число генов	P-Value (значимость)
1	multicellular organismal process	102	6.52E-14
2	anatomical structure development	87	8.10E-13
3	animal organ development	67	3.05E-12
4	developmental process	91	3.78E-12
5	multicellular organism development	75	5.77E-11
6	system development	70	1.48E-10
7	movement of cell or subcellular component	42	6.63E-10
8	cell adhesion	34	7.60E-10
9	anatomical structure morphogenesis	51	1.16E-09
10	localization	81	1.17E-08
11	animal organ morphogenesis	30	1.00E-06
12	cytoskeleton organization	33	1.76E-06
13	circulatory system development	28	2.12E-06
14	cell-cell adhesion	22	2.32E-06
15	tissue development	39	2.76E-06
16	localization of cell	30	2.77E-06

Продолжение таблицы 2.

№	Категория генных онтологий	Число генов	P-Value (значимость)
17	cell motility	30	2.77E-06
18	locomotion	33	3.05E-06
19	cell differentiation	58	7.74E-06
20	cellular developmental process	58	9.18E-06

Таблица 3. Список категорий генных (GO molecular function) онтологий по Gene Ontology для мультиформной глиобластомы

№	Категория генных онтологий	Число генов	P-Value (значимость)
1	calcium ion binding	33	7.89E-13
2	ion binding	92	1.11E-10
3	structural molecule activity	27	4.40E-08
4	cytoskeletal motor activity	13	4.87E-08
5	minus-end-directed microtubule motor activity	7	1.50E-06
6	cation binding	67	4.47E-06
7	extracellular matrix structural constituent	13	4.78E-06
8	metal ion binding	66	6.13E-06
9	dynein light intermediate chain binding	7	1.98E-05
10	microtubule motor activity	9	2.11E-05

Продолжение таблицы 3.

№	Категория генных онтологий	Число генов	P-Value (значимость)
11	protein-containing complex binding	31	3.77E-05
12	actin filament binding	13	6.51E-05
13	dynein intermediate chain binding	7	1.06E-04
14	adenyl ribonucleotide binding	33	2.24E-04
15	adenyl nucleotide binding	33	2.63E-04
16	ATP binding	32	2.87E-04
17	ATP-dependent activity	18	9.76E-04

Таблица 4. Список категорий генных (GO cellular component) онтологий по Gene Ontology для мультиформной глиобластомы

№	Категория генных онтологий	Число генов	P-Value (значимость)
1	cell periphery	104	2.97E-16
2	plasma membrane	91	4.63E-11
3	myofibril	18	8.78E-10
4	contractile fiber	18	1.72E-09
5	sarcomere	17	2.43E-09
6	supramolecular fiber	33	2.95E-09
7	supramolecular polymer	33	3.72E-09
8	cell junction	47	1.46E-08

Продолжение таблицы 4.

№	Категория генных онтологий	Число генов	P-Value (значимость)
9	plasma membrane bounded cell projection	47	9.99E-08
10	cell projection	48	1.39E-07
11	plasma membrane region	33	5.32E-07
12	extracellular matrix	22	1.12E-06
13	external encapsulating structure	22	1.15E-06
14	supramolecular complex	34	1.62E-06
15	I band	12	2.97E-06
16	Z disc	11	1.31E-05
17	anchoring junction	25	1.34E-05
18	cytoskeleton	44	2.90E-05
19	dynein complex	8	3.66E-05
20	collagen-containing extracellular matrix	17	7.58E-05

Такой же список генов был загружен через интерфейс g:GOST для поиска значимых категорий генных онтологий и получения графика точечных значений категорий генных онтологий генов мультиформной глиобластомы (рис. 4). В качестве референсного генома выбран *Homo sapiens*. Применена коррекция Бонферрони.

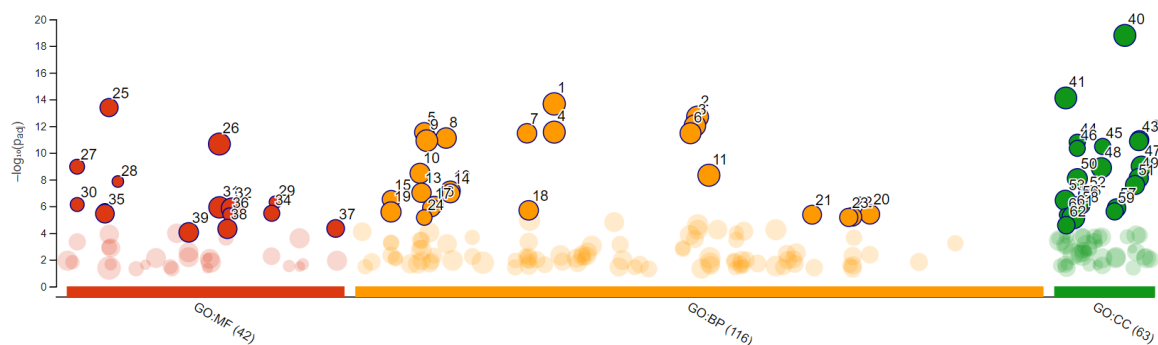


Рисунок 4. Распределение категорий генных онтологий (иллюстрация взята с ресурса <http://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>)

Выполнен анализ с ограничением значения с P-Value до 10^{-06} для биологических процессов и клеточных компартментов, 10^{-05} для молекулярных функций для представления наиболее информативных результатов. Построены таблицы категорий генных онтологий (табл. 5-7).

Таблица 5. Список категорий генных (GO biological process) онтологий по g:GOST для мультиформной глиобластомы

№	Категория генных онтологий	Padj (значимость)
1	multicellular organismal process	2.194×10^{-14}
2	anatomical structure development	2.099×10^{-13}
3	system development	9.354×10^{-13}
4	developmental process	2.846×10^{-12}
5	cell adhesion	2.952×10^{-12}
6	animal organ development	3.442×10^{-12}
7	biological adhesion	3.483×10^{-12}

Продолжение таблицы 5.

№	Категория генных онтологий	P _{adj} (значимость)
8	anatomical structure morphogenesis	7.876×10^{-12}
9	multicellular organism development	1.234×10^{-11}
10	movement of cell or subcellular component	3.450×10^{-9}
11	localization	4.803×10^{-9}
12	tissue development	7.244×10^{-8}
13	cytoskeleton organization	9.820×10^{-8}
14	animal organ morphogenesis	1.105×10^{-7}
15	circulatory system process	3.063×10^{-7}
16	blood circulation	8.142×10^{-7}
17	heart development	1.329×10^{-6}
18	cell projection organization	2.038×10^{-6}
19	system process	2.692×10^{-6}
20	plasma membrane bounded cell projection organization	4.073×10^{-6}
21	circulatory system development	4.339×10^{-6}
22	cell-cell adhesion	6.239×10^{-6}
23	supramolecular fiber organization	6.875×10^{-6}

Продолжение таблицы 5.

№	Категория генных онтологий	P_{adj} (значимость)
24	homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules	7.044×10^{-6}

Таблица 6. Список категорий генных (GO molecular function) онтологий по g:GOST для мультиформной глиобластомы

№	Категория генных онтологий	P_{adj} (значимость)
1	calcium ion binding	4.125×10^{-14}
2	ion binding	2.211×10^{-11}
3	cytoskeletal motor activity	1.103×10^{-9}
4	minus-end-directed microtubule motor activity	1.415×10^{-8}
5	dynein light intermediate chain binding	4.960×10^{-7}
6	microtubule motor activity	7.511×10^{-7}
7	cation binding	1.217×10^{-6}
8	metal ion binding	1.499×10^{-6}
9	extracellular matrix structural constituent	2.446×10^{-6}
10	actin filament binding	3.385×10^{-6}
11	structural molecule activity	3.607×10^{-6}
12	dynein intermediate chain binding	4.088×10^{-6}

Продолжение таблицы 6.

№	Категория генных онтологий	P_{adj} (значимость)
13	ATP-dependent activity	4.657×10^{-5}
14	protein-containing complex binding	5.002×10^{-5}
15	adenyl ribonucleotide binding	9.107×10^{-5}

Таблица 7. Список категорий генных (GO cellular component) онтологий по g:GOST для мультиформной глиобластомы

№	Категория генных онтологий	P_{adj} (значимость)
1	cell periphery	1.632×10^{-19}
2	plasma membrane	7.870×10^{-15}
3	supramolecular fiber	1.103×10^{-11}
4	supramolecular polymer	1.385×10^{-10}
5	myofibril	1.619×10^{-10}
6	contractile fiber	3.362×10^{-11}
7	sarcomere	4.686×10^{-11}
8	plasma membrane bounded cell projection	1.004×10^{-9}
9	cell projection	1.329×10^{-9}
10	supramolecular complex	7.794×10^{-9}

Продолжение таблицы 7.

№	Категория генных онтологий	P _{adj} (значимость)
11	cell junction	8.632×10^{-9}
12	plasma membrane region	2.587×10^{-8}
13	I band	1.363×10^{-7}
14	cytoskeleton	3.624×10^{-7}
15	Z disc	7.065×10^{-7}
16	extracellular matrix	8.117×10^{-7}
17	external encapsulating structure	8.369×10^{-7}
18	anchoring junction	1.368×10^{-6}
19	dynein complex	1.594×10^{-6}
20	collagen-containing extracellular matrix	2.454×10^{-6}
21	axonemal dynein complex	4.294×10^{-6}
22	membrane	6.903×10^{-6}

Из наиболее значимых категорий для генов мультиформной глиобластомы, представленных в таблицах 2-7, в каждой группе можно выделить следующие категории:

- 1) биологические процессы - организация цитоскелета, развитие кровеносной системы и сердца, межклеточная адгезия;

- 2) молекулярные функции - связывание ионов кальция, моторная активность микротрубочек, направленная в минус-конец, связывание легкой промежуточной цепи динеина, связывание актиновых филаментов, связывание аденилрибонуклеотида, связывание АТФ, АТФ-зависимая активность;
- 3) клеточные компартменты - I-зона и Z-диск саркомера.

Таким образом, на основе проведенного анализа, можно отметить связь онкогенеза мультиформной глиобластомы с нарушением сокращения сердечной мышечной ткани, а также нарушением внутриклеточного транспорта крупных молекул.

3.3. Реконструкция генных сетей для генов мультиформной глиобластомы

Генная сеть для генов мультиформной глиобластомы была реконструирована с помощью GeneMANIA (рис. 5). Все загруженные 150 генов из списка были распознаны.

Статистика сети показывает:

- количество узлов - 150;
- количество ребер - 434;
- средняя степень связности узла - 5,79;
- средний локальный коэффициент кластеризации - 0,436;
- ожидаемое количество ребер - 159;
- значимость плотности белок-белковых взаимодействий - $< 1,0e-16$.

Обновленная статистика сети показывает:

- количество узлов - 34;
- количество ребер - 28;
- средняя степень связности узла - 0,373;
- средний локальный коэффициент кластеризации - 1,194;
- ожидаемое количество ребер - 8;
- значимость плотности белок-белковых взаимодействий - $1.57e-08$.

В сети четко выделяются 10 кластеров. Наибольшее число связей у гена EGFR, PIK3R1, TP53, ANK1 и TTN, из которых EGFR и TP53 ранее подробно изученные онкогены. Самый большой кластер включает 9 генов: EGFR, LRP1, LRRK1, PDGFRA, PIK3C2B, PIK3CA, PIK3CG, PIK3R1, PLCG2. Следующие по количеству вовлеченных узлов кластеры включают гены ANK1, NEB, OBSCN, SPTA1, TTN и ATRX, PTEN, RB1, TP53, TRRAP соответственно (рис. 7).

“Красный кластер” функционально связан с негативной регуляцией процесса апоптоза фибробластов и передачей сигналов фосфатидилинозитол-3-киназы. Фибробласты являются ключевым компонентом ответа организма на повреждение, вызванными опухолевыми клетками. Фибробласты, ассоциированные с опухолью, играют роль в создании внеклеточного матрикса и перепрограммировании метаболизма и иммунитета в микроокружении опухоли и ее адаптации к химиотерапии. Фосфатидилинозитол-3-киназа является ключевым элементом PI3K сигнального пути. Сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR — это один из универсальных сигнальных путей, который имеет несколько тканеспецифичных функций, например, в работе сердца.

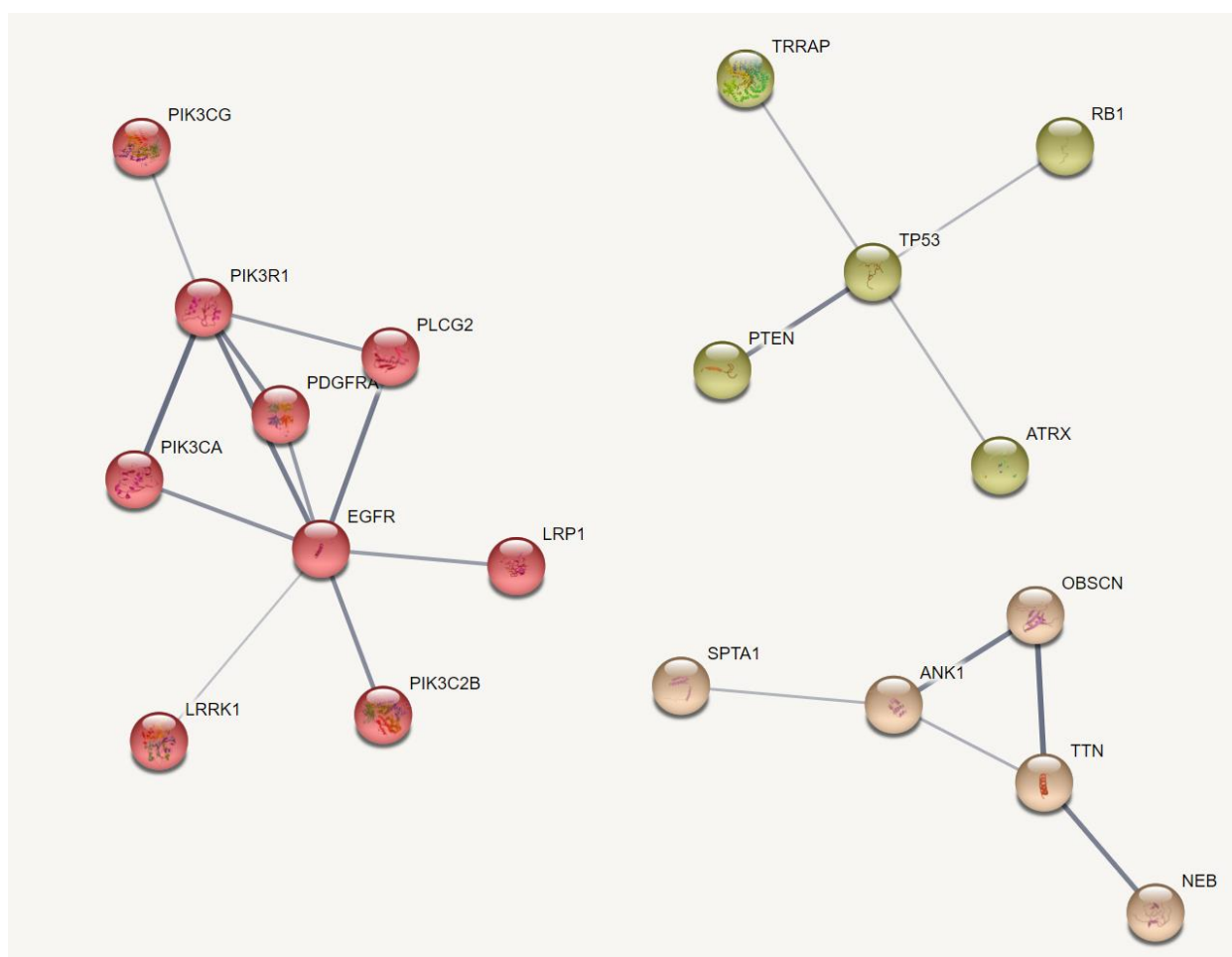


Рисунок 7. Наиболее крупные кластеры генной сети мультиформной глиобластомы (иллюстрация взята с ресурса <https://string-db.org/cgi/network?taskId=bKBq9UM05vF6&sessionId=biWGnhtJ1LNd>).

“Желтый” кластер функционально связан с процессом апоптоза глиальных клеток, позитивной регуляцией процесса апоптоза клеток сердечной мышцы. Глиальные клетки напрямую связаны с патологиями развития центральной нервной системы.

“Оранжевый” кластер функционально связан со сборкой миофибрилл сердечной мышцы, скольжением мышечных волокон, связыванием актиновых филаментов и связыванием белков цитоскелета. Нарушения работы сердечно-сосудистой системы может быть связано с таким фактором риска развития мультиформной глиобластомы, как гипоксия.

3.4. Детальный анализ генов

Рассмотрены гены наиболее связанные нов[ые] гены полученной генной сети мультиформной глиобластомы PIK3R1, ANK1 и TTN.

3.4.1. Ген PIK3R1

Необходим для стимулированного инсулином увеличения поглощения глюкозы и синтеза гликогена в чувствительных к инсулину тканях. Играет потенциальную роль в гомеостазе глюкозы. Фосфоинозитид 3-киназы, представляют собой семейство липидкиназ, способных фосфорилировать 3'ОН инозитолового кольца фосфоинозитидов. Они отвечают за координацию разнообразных клеточных функций, включая пролиферацию и выживание. Ген PIK3R1 расположен в 5 хромосоме 5q13.1 (рис. 8).

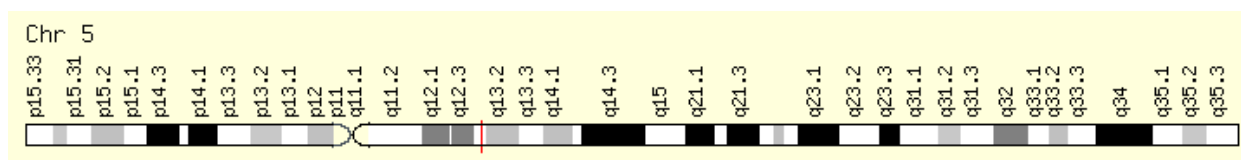


Рисунок 8. Расположение гена PIK3R1 (иллюстрация взята из базы данных GeneCards <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PIK3R1&keywords=pik3r1>).

Фенотипические проявления, которые гипотетически можно использовать для клинического анализа: определения в крови уровня аспаратаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, триглицеридов, липопротеинов низкой и высокой плотности, холестерина, глобулина и половых гормонов.

Заболевания, связанные с PIK3R1, включают синдром Шорта и агаммаглобулинемию [54].

3.4.2. Ген ANK1

Анкирины представляют собой семейство белков, которые связывают интегральные мембранные белки с лежащим в их основе спектрин-актиновым цитоскелетом и играют ключевую роль в пролиферации. Анкирин-1 был впервые обнаружен в эритроцитах, а в последствии также и в головном мозге и мышцах. Мутации в эритроцитарном анкирине-1 были обнаружены примерно у 50% пациентов с наследственным сфероцитозом. Также были идентифицированы специфические для мышц изоформы анкирина-1. Анкирины эритроцитов связывают спектрин (бета-цепь) с цитоплазматическим доменом анионообменного белка эритроцитов. Присоединяют интегральные мембранные белки к элементам цитоскелета. В скелетных мышцах может обеспечивать молекулярную связь между саркоплазматическим ретикулумом и миофибриллами. Ген ANK1 расположен в 8 хромосоме 8p11.21 (рис. 9).

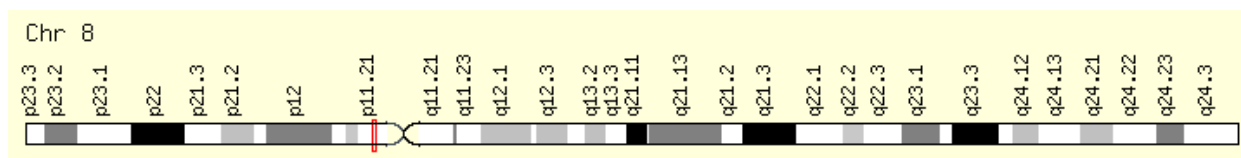


Рисунок 9. Расположение гена ANK1 (иллюстрация взята из базы данных GeneCards <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ANK1&keywords=ANK1>).

Фенотипические проявления, которые гипотетически можно использовать для клинического анализа: определение в крови уровня ретикулоцитов и средней концентрации гемоглобина в эритроците.

Заболевания, связанные с ANK1, включают сфероцитоз 1 типа и наследственный сфероцитоз [55].

3.4.3. Ген TTN

Этот ген кодирует белок титин поперечнополосатых мышц, который обладает киназной активностью. Титин содержит сайты связывания белков, поэтому он участвует в адгезии при формировании сократительного механизма в мышечных клетках. Ключевой компонент в сборке и функционировании поперечнополосатых мышц позвоночных. Обеспечивает связи на уровне отдельных микрофиламентов. В нем мышечных клетках играет роль в конденсации хромосом и сегрегации хромосом во время митоза. Может связывать сеть пластинок с хроматином или ядерным актином, или с обоими во время интерфазы. Ген TTN расположен во 2 хромосоме 2q31.2 (рис. 10).

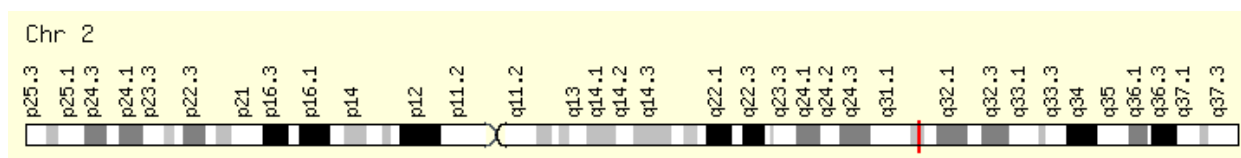


Рисунок 10. Расположение гена TTN (иллюстрация взята из базы данных GeneCards <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TTN>).

Фенотипические проявления, которые гипотетически можно использовать для клинического анализа: определение частоты сердечных сокращений в покое и интервала PR, наличие мерцательной аритмии.

Заболевания, связанные с TTN, включают гипертрофическую кардиомиопатию, наследственную миопатию с ранней дыхательной недостаточностью и миопатию Салиха. Также мутации в этом гене связаны с семейной гипертрофической кардиомиопатией, а аутоантитела к титину вырабатываются у пациентов с аутоиммунным заболеванием склеродермия [56].

ВЫВОДЫ

1. Изучена имеющаяся актуальная научная литература по заболеванию мультиформная глиобластома. Несмотря на то, что исследуемое заболевание занимает небольшую долю от общего числа онкологических заболеваний, мультиформная глиобластома на сегодняшний день считается неизлечимым заболеванием, при котором продлить жизнь пациента можно только посредством временной ремиссии.
2. Построен список генов, ассоциированных с развитием мультиформной глиобластомы, с помощью баз данных и онлайн-инструментов биоинформатики.
3. Определены значимые категории генных онтологий. Среди значимых категорий генных онтологий для списка генов, ассоциированных с развитием мультиформной глиобластомы, четко выделяются категории, связанные с функционированием поперечнополосатой сердечной мышц.
4. Реконструирована генная сеть заболевания мультиформная глиобластома. Выявлены новые гены PIK3R1, ANK1, TTN, которые потенциально могут быть использованы как мишени для таргетной терапии или в качестве молекулярно-генетических маркеров заболевания.
5. Проанализированы гены PIK3R1, ANK1, TTN. Определены заболевания, потенциально связанные с мультиформной глиобластомой: дисфункция синусового узла, агаммаглобулинемия, сфероцитоз и различные миопатии. Определены фенотипические проявления, которые потенциально могут быть использованы в клинической диагностике с помощью ЭКГ и анализа крови.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aldoghachi A. F., Ahmed F. A., Koen B. et al. Recent advances in the therapeutic strategies of glioblastoma multiforme //Neuroscience. – 2022. – V. 491. – P. 240-270.
2. Alexopoulos G., Zhang J., Karampelas I. et al. Long-Term Time Series Forecasting and Updates on Survival Analysis of Glioblastoma Multiforme: A 1975–2018 Population-Based Study //Neuroepidemiology. – 2022. – T. 56. – №. 2. – С. 75-89.
3. Amberger J. S., Bocchini C. A., Scott A. F. et al. OMIM. org: leveraging knowledge across phenotype–gene relationships //Nucleic acids research. – 2019. – T. 47. – №. D1. – С. D1038-D1043.
4. Arevalo O. J., Valenzuela R., Esquenazi Y. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a practical approach for gliomas, part 2. Isocitrate dehydrogenase status—imaging correlation //Neurographics. – 2017. – T. 7. – №. 5. – С. 344-349.
5. Du Plessis L., Škunca N., Dessimoz C. The what, where, how and why of gene ontology—a primer for bioinformaticians //Briefings in bioinformatics. – 2011. – T. 12. – №. 6. – С. 723-735.
6. Ekstrand A. J., Sugawa N., James C. D. et al. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N-and/or C-terminal tails //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1992. – T. 89. – №. 10. – С. 4309-4313.
7. Elsans D., Temerik D. F., Attia A. M. et al. Prognostic role of ALK-1 and h-TERT expression in glioblastoma multiforme: correlation with ALK gene alterations //Journal of Pathology and Translational Medicine. – 2021. – T. 55. – №. 3. – С. 212.

8. Fabregat A., Sidiropoulos K., Viteri G. et al. Reactome pathway analysis: a high-performance in-memory approach //BMC bioinformatics. – 2017. – T. 18. – №. 1. – C. 1-9.
9. Ghani A. R. I., Yahya E. B., Allaq A. A et al. Novel insights into genetic approaches in glioblastoma multiforme therapy //Biomedical Research and Therapy. – 2022. – T. 9. – №. 1. – C. 4851-4864.
10. Guo B., Liao W., Wang S. The clinical significance of glutathione peroxidase 2 in glioblastoma multiforme //Translational neuroscience. – 2021. – T. 12. – №. 1. – C. 032-039.
11. Herrera-Oropeza G. E., Angulo-Rojó C., Gástelum-López S. A. et al. Glioblastoma multiforme: a multi-omics analysis of driver genes and tumour heterogeneity //Interface focus. – 2021. – T. 11. – №. 4. – C. 20200072.
12. Hu K., Li J., Wu G. et al. The novel roles of virus infection-associated gene CDKN1A in chemoresistance and immune infiltration of glioblastoma //Aging (Albany NY). – 2021. – T. 13. – №. 5. – C. 6662.
13. Huang D. W., Sherman B. T., Lempicki R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources //Nature protocols. – 2009. – T. 4. – №. 1. – C. 44-57.
14. Islam M., Wijethilake N., Ren H. Glioblastoma multiforme prognosis: Mri missing modality generation, segmentation and radiogenomic survival prediction //Computerized Medical Imaging and Graphics. – 2021. – T. 91. – C. 101906.
15. Ivanisenko V.A., Saik O.V., Ivanisenko N.V. et al. ANDSystem: an Associative Network Discovery System for automated literature mining in the field of biology //BMC systems biology. – 2015. – T. 9. – №. 2. – C. 1-10.
16. Kanderi T., Gupta V. Glioblastoma multiforme //StatPearls [Internet]. – StatPearls Publishing, 2021.
17. Kita D., Yonekawa Y., Weller M. et al. PIK3CA alterations in primary (de novo) and secondary glioblastomas //Acta neuropathologica. – 2007. – T. 113. – №. 3. – C. 295-302.

- 18.Li J., Wang W., Wang J. et al. Viral Gene Therapy for Glioblastoma Multiforme: A Promising Hope for the Current Dilemma //Frontiers in Oncology. – 2021. – T. 11.
- 19.Mahmoud M. S., Khalifa M. K., Nageeb A. M. N. M. et al. Clinical Impact of IDH1 Mutations and MGMT Methylation in Adult Glioblastoma Multiforme //medRxiv. – 2022.
- 20.Martikainen M., Essand M. Virus-based immunotherapy of glioblastoma //Cancers. – 2019. – T. 11. – №. 2. – C. 186.
- 21.Mi H., Muruganujan A., Thomas P. D. PANTHER in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees //Nucleic acids research. – 2012. – T. 41. – №. D1. – C. D377-D386.
- 22.Müller P., Gaber S. A. A., Zimmermann W. et al. ABCG2 influence on the efficiency of photodynamic therapy in glioblastoma cells //Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2020. – T. 210. – C. 111963.
- 23.Ohgaki H., Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma //The American journal of pathology. – 2007. – T. 170. – №. 5. – C. 1445-1453.
- 24.Pio G., Ceci M., Prisciandaro F. et al. Exploiting causality in gene network reconstruction based on graph embedding //Machine Learning. – 2020. – T. 109. – №. 6. – C. 1231-1279.
- 25.Redekar S. S., Varma S. L., Bhattacharjee A. Identification of key genes associated with survival of glioblastoma multiforme using integrated analysis of TCGA datasets //Computer Methods and Programs in Biomedicine Update. – 2022. – T. 2. – C. 100051.
- 26.Reimand J., Arak T., Adler P. et al. g: Profiler—a web server for functional interpretation of gene lists (2016 update) //Nucleic acids research. – 2016. – T. 44. – №. W1. – C. W83-W89.
- 27.Ren P., Wang J., Li, L., Lin X. et al. Identification of key genes involved in the recurrence of glioblastoma multiforme using weighted gene co-expression network

- analysis and differential expression analysis //Bioengineered. – 2021. – T. 12. – №. 1. – C. 3188-3200.
- 28.Saraf R., Agah S., Datta A. et al. Drug target ranking for glioblastoma multiforme //BMC biomedical engineering. – 2021. – T. 3. – №. 1. – C. 1-17.
 - 29.Simińska D., Korbecki J., Kojder K. et al. Epidemiology of anthropometric factors in glioblastoma multiforme—Literature review //Brain Sciences. – 2021. – T. 11. – №. 1. – C. 116.
 - 30.Stoyanov G. S., Dzhenkov D. L. On the concepts and history of glioblastoma multiforme—morphology, genetics and epigenetics //Folia Med. – 2018. – T. 60. – №. 1. – C. 48-66.
 - 31.Stupp R., Mason W. P., Van den Bent M. J. et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma //New England journal of medicine. – 2005. – T. 352. – №. 10. – C. 987-996.
 - 32.Suzuki H., Aoki K., Chiba K. et al. Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas //Nature genetics. – 2015. – T. 47. – №. 5. – C. 458-468.
 - 33.Taylor O. G., Brzozowski J. S., Skelding K. A. Glioblastoma multiforme: an overview of emerging therapeutic targets //Frontiers in oncology. – 2019. – T. 9. – C. 963.
 - 34.The Gene Ontology resource: enriching a GOld mine //Nucleic acids research. – 2021. – T. 49. – №. D1. – C. D325-D334.
 - 35.Urbańska K., Sokołowska J., Szmidt M. et al. Glioblastoma multiforme—an overview //Contemporary oncology. – 2014. – T. 18. – №. 5. – C. 307.
 - 36.Vaja R. D. Gene Expression Analysis of Glioma Neural Stem Cells Shows Disturbed Amino Acids Metabolism and Axonal Growth Cone Dynamics in Glioblastoma Multiforme //bioRxiv. – 2021.
 - 37.Van Meir E. G., Hadjipanayis C. G., Norden A. D. et al. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma //CA: a cancer journal for clinicians. – 2010. – T. 60. – №. 3. – C. 166-193.

38. Wang K., Lu Y., Liu Z. et al. Establishment and External Validation of a Hypoxia-Derived Gene Signature for Robustly Predicting Prognosis and Therapeutic Responses in Glioblastoma Multiforme //BioMed Research International. – 2022. – Т. 2022.
39. Warde-Farley D., Donaldson S. L., Comes O. et al. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function //Nucleic acids research. – 2010. – Т. 38. – №. suppl_2. – С. W214-W220.
40. WHO Classification of Tumours Editorial Board. World Health Organization Classification of Tumours of the Central Nervous System. 5th ed. // Lyon: International Agency for Research on Cancer - 2021.
41. Zanders E. D., Svensson F., Bailey D. S. Therapy for glioblastoma: is it working? //Drug discovery today. – 2019. – Т. 24. – №. 5. – С. 1193-1201.
42. Zuo S., Zhang X., Wang L. A RNA sequencing-based six-gene signature for survival prediction in patients with glioblastoma //Scientific reports. – 2019. – Т. 9. – №. 1. – С. 1-10.
43. Брюховецкий И. С., Брюховецкий А. С., Хотимченко Ю. С. Фармакогенетический и биоинженерный подходы к лечению глиальных опухолей головного мозга //Гены и клетки. – 2014. – Т. 9. – №. 3. – С. 140-146.
44. Генс Г. П. и др. Глиобластома: молекулярно-генетический портрет и современные терапевтические стратегии лекарственного лечения //Успехи молекулярной онкологии. – 2021. – Т. 8. – №. 3. – С. 60-76.
45. Деменков П. С., Аман Е. Э., Иванисенко В. А. Associative Network Discovery (AND)-компьютерная система для автоматической реконструкции сетей ассоциативных знаний о молекулярно-генетических взаимодействиях //Вычислительные технологии. – 2008. – Т. 13. – №. 2. – С. 15-19.
46. Кит О.И., Водолажский Д.И., Росторгуев Э.Е. и др. Молекулярно-генетические маркеры глиом //Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2017. – Т. 35. – №. 4. – С. 132-140.

47. Клинические рекомендации Министерства Здравоохранения Российской Федерации «Первичные опухоли центральной нервной системы», 2019. – 72с.
48. Ковалев С.С., Леберфарб Е.Ю., Губанова Н.В. и др. Компьютерный анализ альтернативного сплайсинга генов в культурах клеток глиом по данным RNA-seq // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Информационные технологии. – 2018. – Т. 16. – №. 3. – С. 22-36.
49. Ковалев, С. С., Белоусова, Ю. П., Галиева, Э. Р. и др. Исследование молекулярных основ глиобластомы с помощью электронных ресурсов и баз данных // Биоразнообразие и сохранение генофонда флоры, фауны и народонаселения Центрально-Азиатского региона. – 2019. – №. 5. – С. 138-141.
50. Кушнир Т.И., Арноцкая Н.Е., Кудрявцев И.А. и др. Влияние гипоксии на секретом клеток мультиформной глиобластомы человека // Успехи молекулярной онкологии. – 2021. – Т. 8. – №. 1. – С. 32-40.
51. Митрофанов А.А., Насхлеташвили Д.Р., Алешин В.А. и др. Причины лекарственной устойчивости и рецидивов глиобластом // Опухоли головы и шеи. – 2021. – Т. 11. – №. 1. – С. 101-108.
52. Орлов, Ю. Л., Ковалев, С. С., Белоусова, Ю. П. и др. Реконструкция генной сети глиомы с помощью он-лайн инструментов биоинформатики // Марчуковские научные чтения. – 2020. – №. 2020. – С. 165-165.
53. Электронный ресурс GeneCards URL: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PIK3R1&keywords=pik3r1>
54. Электронный ресурс GeneCards URL: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ANK1&keywords=ANK1>
55. Электронный ресурс GeneCards URL: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TTN>

**Список наиболее часто мутирующих генов
для мультиформной глиобластомы**



№	Ген	Название
1	PTEN	phosphatase and tensin homolog
2	TP53	tumor protein p53
3	TTN	titin
4	EGFR	epidermal growth factor receptor
5	MUC16	mucin 16, cell surface associated
6	FLG	filaggrin
7	NF1	neurofibromin 1
8	PIK3CA	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
9	RYR2	ryanodine receptor 2
10	LRP2	LDL receptor related protein 2
11	RB1	RB transcriptional corepressor 1
12	PIK3R1	phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1
13	ATRX	ATRX chromatin remodeler
14	MUC17	mucin 17, cell surface associated
15	SPTA1	spectrin alpha, erythrocytic 1

№	Ген	Название
16	PCLO	piccolo presynaptic cytomatrix protein
17	HMCN1	hemicentin 1
18	PKHD1	PKHD1 ciliary IPT domain containing fibrocystin/polyductin
19	USH2A	usherin
20	OBSCN	obscurin, cytoskeletal calmodulin and titin-interacting RhoGEF
21	DNAH5	dynein axonemal heavy chain 5
22	IDH1	isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 1
23	COL6A3	collagen type VI alpha 3 chain
24	PIK3CG	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit gamma
25	DNAH11	dynein axonemal heavy chain 11
26	LRP1	LDL receptor related protein 1
27	RELN	reelin
28	AHNAK2	AHNAK nucleoprotein 2
29	SYNE1	spectrin repeat containing nuclear envelope protein 1
30	GRIN2A	glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A
31	RIMS2	regulating synaptic membrane exocytosis 2
32	HCN1	hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated potassium channel 1

№	Ген	Название
33	DNAH2	dynein axonemal heavy chain 2
34	DOCK5	dedicator of cytokinesis 5
35	LAMA1	laminin subunit alpha 1
36	DNAH3	dynein axonemal heavy chain 3
37	KIF2B	kinesin family member 2B
38	APOB	apolipoprotein B
39	DNAH8	dynein axonemal heavy chain 8
40	CFAP47	cilia and flagella associated protein 47
41	DST	dystonin
42	FRAS1	Fraser extracellular matrix complex subunit 1
43	TCHH	trichohyalin
44	DSP	desmoplakin
45	FCGBP	Fc fragment of IgG binding protein
46	TMEM132D	transmembrane protein 132D
47	SDK1	sidekick cell adhesion molecule 1
48	NOS1	nitric oxide synthase 1
49	RYR3	ryanodine receptor 3
50	MXRA5	matrix remodeling associated 5
51	FER1L6	fer-1 like family member 6

№	Ген	Название
52	FLG2	filaggrin family member 2
53	PDGFRA	platelet derived growth factor receptor alpha
54	TAF1L	TATA-box binding protein associated factor 1 like
55	FAT2	FAT atypical cadherin 2
56	PRDM9	PR/SET domain 9
57	FBN2	fibrillin 2
58	HYDIN	HYDIN axonemal central pair apparatus protein
59	GRM3	glutamate metabotropic receptor 3
60	ADGRV1	adhesion G protein-coupled receptor V1
61	GABRA6	gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit alpha6
62	CSMD3	CUB and Sushi multiple domains 3
63	ADAMTS12	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 12
64	DNAH9	dynein axonemal heavy chain 9
65	CD163L1	CD163 molecule like 1
66	LZTR1	leucine zipper like transcription regulator 1
67	CNTNAP2	contactin associated protein 2
68	PCDHA1	protocadherin alpha 1
69	PTPRT	protein tyrosine phosphatase receptor type T
70	SCN9A	sodium voltage-gated channel alpha subunit 9

№	Ген	Название
71	SLIT3	slit guidance ligand 3
72	KSR2	kinase suppressor of ras 2
73	CALCR	calcitonin receptor
74	GALNT17	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 17
75	DMD	dystrophin
76	XIRP2	xin actin binding repeat containing 2
77	ABCC9	ATP binding cassette subfamily C member 9
78	STAG2	stromal antigen 2
79	DCHS2	dachsous cadherin-related 2
80	TRRAP	transformation/transcription domain associated protein
81	PIK3C2B	phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase catalytic subunit type 2 beta
82	COL1A2	collagen type I alpha 2 chain
83	FGD5	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 5
84	FLNA	filamin A
85	ADAMTS16	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 16
86	ANK1	ankyrin 1
87	ADAM29	ADAM metalloproteinase domain 29
88	CPAMD8	C3 and PZP like alpha-2-macroglobulin domain containing 8

№	Ген	Название
89	EPB41L3	erythrocyte membrane protein band 4.1 like 3
90	PLCG2	phospholipase C gamma 2
91	CDH9	cadherin 9
92	NEB	nebulin
93	MYO15A	myosin XVA
94	MYH2	myosin heavy chain 2
95	AHNAK	AHNAK nucleoprotein
96	CACNA1S	calcium voltage-gated channel subunit alpha1 S
97	NLRP12	NLR family pyrin domain containing 12
98	PCDHA3	protocadherin alpha 3
99	TSHZ2	teashirt zinc finger homeobox 2
100	EPHA8	EPH receptor A8
101	TEX15	testis expressed 15, meiosis and synapsis associated
102	SCN10A	sodium voltage-gated channel alpha subunit 10
103	ABCB4	ATP binding cassette subfamily B member 4
104	SLIT2	slit guidance ligand 2
105	ITGAM	integrin subunit alpha M
106	GRIN2B	glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B
107	SPAG17	sperm associated antigen 17

№	Ген	Название
108	GRM8	glutamate metabotropic receptor 8
109	KEL	Kell metallo-endopeptidase (Kell blood group)
110	SIM1	SIM bHLH transcription factor 1
111	SAMD9	sterile alpha motif domain containing 9
112	DOCK8	dedicator of cytokinesis 8
113	FAT4	FAT atypical cadherin 4
114	GRIP1	glutamate receptor interacting protein 1
115	SYNE2	spectrin repeat containing nuclear envelope protein 2
116	MAPRE3	microtubule associated protein RP/EB family member 3
117	PPP1R3A	protein phosphatase 1 regulatory subunit 3A
118	BCOR	BCL6 corepressor
119	HRNR	hornerin
120	KDR	kinase insert domain receptor
121	DYNC1I1	dynein cytoplasmic 1 intermediate chain 1
122	LRP1B	LDL receptor related protein 1B
123	COL14A1	collagen type XIV alpha 1 chain
124	VWF	von Willebrand factor
125	KMT2C	lysine methyltransferase 2C
126	DSG4	desmoglein 4

№	Ген	Название
127	TRHDE	thyrotropin releasing hormone degrading enzyme
128	HSPG2	heparan sulfate proteoglycan 2
129	CASR	calcium sensing receptor
130	KPRP	keratinocyte proline rich protein
131	NLRP4	NLR family pyrin domain containing 4
132	CDH18	cadherin 18
133	DPP10	dipeptidyl peptidase like 10
134	RIMBP2	RIMS binding protein 2
135	DNAH7	dynein axonemal heavy chain 7
136	TG	thyroglobulin
137	NPAP1	nuclear pore associated protein 1
138	MYH1	myosin heavy chain 1
139	SLC1A6	solute carrier family 1 member 6
140	RBM47	RNA binding motif protein 47
141	LTBP2	latent transforming growth factor beta binding protein 2
142	SLCO6A1	solute carrier organic anion transporter family member 6A1
143	MSH6	mutS homolog 6
144	NAV2	neuron navigator 2
145	QSER1	glutamine and serine rich 1

№	Ген	Название
146	CALN1	calneuron 1
147	MYH6	myosin heavy chain 6
148	CSMD2	CUB and Sushi multiple domains 2
149	LRRK1	leucine rich repeat kinase 1
150	PCDH11Y	protocadherin 11 Y-linked

Публикации и участие в конференциях

1. R.R. Shakirova, N.G. Orlova, M.G. Elistratova, A.V. Korobeynikova, Y.A. Mozyleva, Y.L. Orlov (2022) Gene network analysis for complex disease using online bioinformatics tools // In: Proceedings book of the XXVIII Symposium "Bioinformatics and Computer-aided Drug Discovery" – Moscow: Institute of Biomedical Chemistry, 2022. P. 50. (ISBN 978-5-900760-18-6) DOI: 10.18097/BCADD2022
2. Das R., Elistratova M.G., Orlov Y.L. Note on genomic ancestry and variation in disease susceptibility // BGRS/SB-2022 (принят постерный доклад).
3. Elistratova M.G., Shakirova R.R., Orlov Y.L. Computer analysis of genes associated with Kaposi's sarcoma // BGRS/SB-2022 (принят доклад).