На правах рукописи

ЛЮ ГОЦЗЮНЬ

ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ГЕНОЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ ОТДЕЛЬНЫХ ТИПОВ ИММУНООПОСРЕДОВАННОЙ ПАТОЛОГИИ

14.03.03 – Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Екатеринбург - 2019

Работа выполнена на кафедре медицинской биохимии и биофизики Института естественных наук и математики ФГАОУ ВО «Уральский Федеральный Университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина».

Научные руководители:

Доктор медицинских наук, профессор, ЗДН РФ — **Тузанкина Ирина Александровна**

Академик РАН, доктор медицинских наук, профессор — **Черешнев Валерий Александрович**

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, профессор, директор Высшей медико-биологической школы, зав. лабораторией перспективных исследований молекулярных механизмов стресса ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет)» — **Цейликман Вадим Эдуардович**

Доктор медицинских наук, директор Центра иммунологии и клеточных биотехнологий, профессор кафедры Фундаментальной медицины Медицинского института Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта» — **Литвинова Лариса Сергеевна**

Ведущая организация - Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» (Москва)

Защита состоится «27» февраля 2020 года в ____ часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 004.027.02 на базе ИИФ УрО РАН (620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106)

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке УрО РАН и на сайте ИИФ УрО РАН – http://iip.uran.ru, с авторефератом – на сайте ВАК РФ http://vak2.ed.gov.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2020 года

Ученый секретарь Совета Д.004.027.02
на базе Института иммунологии и физиологии УрО РАН,
доктор медицинских наук, профессор, ЗДН РФ — И.А. Тузанкина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Современная патофизиология предполагает системный подход для анализа любого иммунопатологического процесса в организме. Стремительное развитие наук о жизни, являющихся интегративными и объединяющими для многих областей знаний, свидетельствует о том, что люди вступили в эру «больших данных». В эту эпоху требования к клиническим медицинским исследованиям непрерывно повышаются, а возникающие проблемы становятся все более сложными. Междисциплинарная модель (патофизиология, иммунология, генетика и биоинформатика) постепенно становится основной тенденцией развития медицинских и биологических исследований.

Благодаря развитию генетики появилась возможность выявлять общие закономерности сетевых взаимодействий внутри генома, которые помогают объяснить, как в ответ на конкретное точечное воздействие организм отвечает многочисленными разнонаправленными процессами. При этом компоненты врожденного и адаптивного иммунитета являются главными исполнителями поддержания гомеостаза.

Использование новых знаний о патогенетических механизмах развития иммуноопосредованной патологии позволит своевременно применять методы определения маркеров болезней для их ранней диагностики, патогенетического обоснования новых терапевтических технологий, предупреждения осложнений медицинских манипуляций и развитие необратимых изменений органов и систем, прогнозирование течения болезни и мониторинга эффективности терапии.

В нашем исследовании в качестве моделей иммунозависимой патологии отобраны такие заболевания, как рак мочевого пузыря и первичные иммунодефициты (ПИД), уделяется внимание одной из наиболее распространенных форм ПИД – общей вариабельной иммунной недостаточности и одной из самых редких форм – синдрому Хеннекама.

Рак мочевого пузыря (РМП) занимает девятое место среди наиболее распространенных видов рака во всем мире с ежегодной регистрацией около 430000 новых случаев (Cumberbatch M., et al., 2018). Известно, что микро РНК (мкРНК) во внеклеточной среде участвуют в регуляции локальных процессов. В последнее время исследованию регуляторной сети мкРНК семейства miR-200 и их целевых генов уделяют пристальное внимание со стороны патофизиологов и иммунологов (Pieraccioli M., et al., 2013, и Guan T., et al., 2018). Показано, что мкРНК семейства miR-200 (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 и miR-429) критически важны в патогенезе рака и метастазировании (Humphries B. и Yang C., 2014), а также необходимы для формирования CD8+ Т-клеток памяти (Guan T., et

al., 2018). Те же исследователи определили, что контролируемые miR-200 цинкзависимые транскрипционные факторы ZEB1 и ZEB2 принимают участие в различных процессах иммуногенеза и гемопоэза, поэтому гиперэкспрессия miR-200 может оказывать противоречивый эффект на развитие различных типов опухоли, в том числе влияя на мезенхимальную трансформацию. Снижение экспрессии опухоль-супрессивных miR-200 приводит к гиперэкспрессии генов, кодирующих так называемые «иммунные контрольные точки», - иммуносупрессорные белки (в том числе PD1-лиганд, Chen L., 2014), вследствие чего раковые клетки становятся иммунопривилегированными, благодаря анергии, апоптозу хелперных и цитотоксических Т-клеток, участвующих в противоопухолевом иммунитете (Halytskiy V., 2018). Поэтому мкРНК семейства miR-200 является мишенью иммунотерапии при различных видах рака, включая рак мочевого пузыря, а исследование взаимовлияний различных генов и микро РНК представляется важной задачей, как для понимания патогенеза иммунозависимых болезней, так и для разработки иммунотерапии. Ввиду многофункциональности, miR-200 неоднозначно влияют на опухолевый процесс. В частности, miR-200 повышается в клетках опухоли лёгкого (miR200b) и простаты (miR141, miR200b), но понижается в клетках опухоли молочной железы (miR-200bc, miR-429) и рака печени (miR200a). Таким образом, miR200 нельзя однозначно рассматривать в качестве противоопухолевых факторов без оценки типа опухоли и стадии опухолевого процесса.

Первичные иммунодефициты (ПИД) представляют собой гетерогенную группу генетических нарушений, обусловленных пороками развития или дисфункцией компонентов иммунной системы. Новые данные охарактеризовывают ПИД как широко распространенную патологию, которая серьезно влияет на выживаемость, качество жизни и увеличивает экономическое бремя семьи. Согласно последним исследованиям, пациенты с ПИД подвергаются повышенному риску рака (Mortaz E., et al., 2016).

Общая вариабельная иммунная недостаточность (ОВИН) является группой синдромов ПИД, наиболее часто связанных с раком, в том числе мочевого пузыря (Kralickova P., et al., 2019). В 2009 году Ortutay C., et al. предсказали 26 генов-кандидатов ПИД на основе данных аннотаций белок-белкового взаимодействия и обогащенной онтологии генов (GO). В 2009 году Keerthikumar S., et al. предсказали 1442 гена-кандидата ПИД, используя Киотскую энциклопедию генов и геномов (KEGG) и алгоритм опорных векторов. В 2015 году Itan Y. и Casanova J.L. предсказали более 3000 генов-кандидатов ПИД, которые имеют тесные взаимосвязи с уже известными генами. Совершить такое открытие они смогли благодаря анализу данных о межбелковых взаимодействиях (PPI) и их

математических моделей, которые называют коннектомом генома человека (HGC). В этом исследовании для эффективного прогнозирования генов-кандидатов ОВИН мы применили и усовершенствовали перечисленные методы, используя данные о сигнальных путях и ко-экспрессии, поскольку гены с аналогичными функциями, участвующие в том же сигнальном пути, как правило, более ко-экспрессируются, а также были учтены данные межбелкового взаимодействия и профили экспрессии генов большого количества образцов ОВИН.

Синдром Хеннекама известен как аутосомно-рецессивный синдром, характеризующийся ассиметричным расширением лимфатических сосудов, как периферических, так и внутренних, лицевым дисморфизмом и легкими или умеренными когнитивными нарушениями, возникающими в результате мальформации лимфатической системы. К 2015 году число пациентов с этим редким синдромом в США зарегистрировано около 50, в России к настоящему времени отсутствуют статистические данные по синдрому Хеннекама. Тем не менее, этот синдром является уникальной природной моделью для изучения механизмов формирования и функционирования лимфатических сосудов, циркуляции лимфы и её взаимосвязи с иммунитетом. Известно, что к синдрому Хеннекама могут приводить мутации гена CCBE1 (опухолевый супрессор, индуктор формирования эпителиального эндотелия лимфатических сосудов), гена FAT4 (синтез протокадгерина, участвует в генерации эндотелия лимфатических сосудов) и гена ADAMTS3 (индуктор VEGFc), но в половине зарегистрированных случаев причину синдрома установить не удаётся. Это обосновывает необходимость выявления генов заболевания с использованием NGS, биоинформатики, базы данных генетических вариаций человека. Полное использование этих ресурсов может значительно уменьшить трудности диагностики таких заболеваний и повысить эффективность терапии.

Цель исследования – выявление значимых патофизиологических механизмов формирования отдельных видов иммунозависимой патологии на основе биоинформационного анализа.

Задачи исследования:

1. Проанализировать патофизиологические механизмы гетерогенности мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря.

2. Выявить прогностические биомаркеры двух основных подтипов мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря.

3. Провести оценку экспрессии молекул ингибирующих иммунные функции (PD-1, PD-L1, CTLA-4, HAVCR-2 и LAG-3) у пациентов с различными подтипами мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря.

4. Проанализировать механизмы, лежащие в основе мультигенной природы общей вариабельной иммунной недостаточности.

5. Выявить новые кандидатные гены в группе болезней «общая вариабельная иммунная недостаточность».

6. Выявить мутации генов, приводящих к развитию первичного иммунодефицита «синдром Хеннекама».

Научная новизна. В результате проведенных научных исследований впервые в Российской Федерации выполнено следующее.

Впервые проведен систематический анализ сигнальных путей, значимых для иммунитета, приводящих к гетерогенности базального и люминального подтипов мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря.

Впервые при мышечно-инвазивном раке мочевого пузыря, при разных его подтипах, выявлены различия результатов молекулярных взаимодействий молекул мкРНК, днРНК и мРНК.

Впервые представлена новая перспектива понимания мультигенной природы группы синдромов первичных иммунодефицитов «Общая вариабельная иммунная недостаточность», благодаря полученным результатам анализа взаимосвязей генов.

Разработан новый метод прогнозирования генов-кандидатов группы синдромов первичных иммунодефицитов «Общая вариабельная иммунная недостаточность» путем включения в клинико-биоинформационный анализ факторов ко-экспрессии, межбелкового взаимодействия и данных сигнальных путей.

Представлен перечень вероятно-патогенных мутаций в генах, комбинация которых может приводить к развитию первичного иммунодефицита «синдром Хеннекама».

Теоретическая и практическая значимость исследования. Молекулы микро РНК miR-141-5p, miR-141-3p, miR-200C-3p, длинных некодирующих РНК (днРНК) AC010326.3 и AC073335.2 (контролирующие GATA3), MIR100HG (ингибирующая CLIC4 и PALLD), мРНК молекул CLIC4 (хлоридный внутриклеточный канал 4), GATA3 (транскрипционный фактор), PALLD (Palladin, белок, ассоциированный с цитоскелетом) имеют значение в онкогенезе и прогрессировании опухоли. Эти молекулы могут служить новыми прогностическими параметрами, а также маркерами классификации подтипов мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря. Выявлен факт повышенной экспрессии генов, относящихся к процессу эпителиально-мезенхимального перехода, метастазирования и функционирования иммунной системы, при базальном подтипе рака мочевого пузыря. Люминальный подтип характеризуется относительно повышенной экспрессией генов, отвечающих за метаболические

процессы. При базальном подтипе рака выявлены более высокие значения экспрессии иммуносупрессорных рецепторов (PD-1, PD-L1, CTLA-4, HAVCR-2 и LAG-3), чем при люминальном подтипе. Эти данные обеспечивают более глубокое понимание иммунологической гетерогенности рака мочевого пузыря.

Выводы о том, что гены ОВИН по своим функциональным взаимосвязям более похожи друг на друга и тесно взаимодействуют друг с другом по сравнению с остальными генами ПИД, помогают лучше понять мультигенную природу ОВИН. Предложенные 172 гена-кандидата ОВИН необходимо учитывать для ранней диагностике ОВИН и при создании таргетной терапии.

Гомозиготная мутация (g.125452634G>A) в гене FAT4 (член семейства кадгерина 4 - супрессор опухоли гомолог 4, функция неизвестна, распространён повсеместно), гетерозиготная мутация (g.36575963G>A) в гене RAG1 (ген активации рекомбиназы 1, функционирует при формировании антигенраспознающих молекул Т- и В-лимфоцитов), гетерозиготная мутация (g.9715914T>A) в гене PIK3CD (специфичная для лейкоцитов субъединица фермента фосфатидилинозитол-3-киназы) и гетерозиготной мутации (g.36471505C>T) в CSF3R (рецептор для колониестимулирующего фактора 3, необходимого для созревания лейкоцитов) могут иметь патогенетическую значимость и, с учетом понимания патогенеза синдрома Хеннекама, позволят расширить диагностические возможности.

Положения, выносимые на защиту:

1. В качестве диагностических маркеров иммунозависимой патологии – мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря, а также для прогноза и дифференциальной диагностики базального и люминального подтипа необходимо использовать данные об экспрессии молекул мкРНК miR-141-5p, miR-141-3p, miR-200C-3P, днРНК AC010326.3, AC073335.2, MIR100HG и мРНК CLIC4, GATA3, PALLD.

2. Разница в экспрессии иммуносупрессивных молекул PD-1, PD-L1, CTLA-4, HAVCR-2 и LAG-3 позволяет различать базальные и люминальные подтипы мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря - базальные опухоли демонстрируют более высокие уровни экспрессии иммуносупрессивных молекул, чем опухоли люминального подтипа.

3. Молекулярно-генетическую этиологию группы нозологических синдромов первичных иммунодефицитов «Общая вариабельная иммунная недостаточность» представляет расширенный спектр из 172 кандидатных генов, выделенных в настоящем исследовании.

Достоверность полученных результатов исследования обеспечена обоснованностью исходных теоретических позиций, достаточным объемом

выборки, использованием современных лабораторных методов, воспроизводимостью результатов, применением компьютерных программ статистического анализа полученных данных и подтверждена экспертной комиссией Института естественных наук и математики ФГАОУ ВО «Уральский Федеральный Университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» (составлен акт проверки первичной документации, приказ директора института от 03.12.2019).

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии на всех этапах диссертационного исследования, в создании базовой идеи, планировании научной работы, в формулировании рабочей гипотезы, задач, рабочих заданий, определении методологии исследования. Интерпретация и анализ полученных результатов проводились диссертантом совместно с научным руководителями.

Внедрение результатов исследования в практику. Полученные результаты внедрены в практику ГАУЗ Свердловской области «Областная детская клиническая больница», были использованы в работе Региональной комиссии Министерства здравоохранения Свердловской области по младенческой смертности. Список генов-кандидатов ОВИН внедрен для использования в работе лаборатории иммунологии воспаления Института иммунологии и физиологии УрО РАН в преподавательской деятельности и консультативной медицинской практике.

Апробация работы. Основные положения диссертации представлены на III Всероссийском конгрессе «Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания» (Москва, 16-17 ноября 2018 г.); X Конгрессе НОДГО «Актуальные проблемы и перспективы развития детской гематологии-онкологии в Российской Федерации» (Сочи, 27-29 апреля 2019 г.), IV Объединенном иммунологическом форуме в Новосибирске (24-29 июня 2019 г.), 17 Международном конгрессе по иммунологии (Пекин, 19-23 октября 2019), на II Санкт-Петербургском лимфологическом форуме «Лимфология XXI века: новые подходы и актуальные исследования (Санкт-Петербург, 10-11 октября 2019 г.), Международном Евро-Азиатском Конгрессе по вопросам биоэтики, молекулярной и персонализированной медицины «Biomed-inn-2019» (Пермь, 5-8 ноября 2019 г.).

Публикации. По результатам диссертации опубликовано 7 работ, из них, 5 - в изданиях, индексируемых в международных электронных базах Web of Science и Scopus, в изданиях, рецензируемых ВАК - 2.

Объем и структура диссертации. Диссертация представлена на 144 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», 3 глав с результатами собственных исследований, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка использованных литературных источников (204 источника, включая 5

отечественных и 199 зарубежных). Работа иллюстрирована 12 таблицами, 30 рисунками и 3 формулами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы. Данные секвенса мРНК и длинных некодирующих РНК (днРНК) 403 пациентов с мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря (МИРМП) и 19 относительно здоровых лиц, а также клинические данные были получены из публично доступного сервера «Атласа генома рака» (https://cancergenome.nih.gov); данные секвенса микро РНК (мкРНК) – из публично доступного сервера «Broad GDAC Firehose» (https://gdac.broadinstitute.org). Относительные уровни инфильтрирующих опухоль иммунных клеток для каждого образца были оценены с использованием CIBERSORT (https://cibersort.stanford.edu).

Вначале был проведен консенсусный кластерный анализ с использованием «ConsensusClusterPlus» на основе отдельных данных мРНК, мкРНК и днРНК, затем – анализ кластеризации кластеров, для определения подтипов базального и люминального рака мочевого пузыря с учетом всех трех наборов данных. Анализ выживаемости проводился на основе кривой Каплана-Мейера (К-М) с использованием R-пакета «Survival». Логарифмический ранговый тест использовался для сравнения времени выживания между двумя подтипами. Для проверки независимости выборок информации о подтипах и клинических показателях пациентов с МИРМП использовался критерий $\chi 2$, $p<0{,}001$. Т-критерий Вилкоксона использовался для проверки различий между двумя группами. Анализ обогащения по функциональной принадлежности был выполнен с использованием программы GSEA (версия 3.0). Две модели машинного обучения Random Forest и XGBoost использовались для скрининга репрезентативных РНК между двумя подтипами МИРМП (Mean Decrease Accuracy > 0 и Gain > 0). R-пакет «Ballgown» был использован для определения дифференциально экспрессируемых РНК между пациентами с МИРМП и здоровыми контрольными образцами (FDR $p<0{,}05$ и $|log_2 fold\ change|>0{,}57$). Коэффициент корреляции Пирсона ($|r|>=0{,}4$ и $p<0{,}05$) и базы данных miRWalk2.0 (http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/) были использованы для изучения взаимодействия мРНК, мкРНК и днРНК.

Данные экспрессии генов (GSE72625 и GSE51406), полученных с использованием микрочипов ДНК 111 пациентов с общим вариабельным иммунодефицитом (ОВИН) и 56 относительно здоровых контрольных образцов были получены из базы данных Gene Expression Omnibus (GEO) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov). Набор данных GSE72625 содержал сведения о 20 пациентах с ОВИН и 17 относительно здоровых взрослых, набор данных GSE51406 содержал сведения о 91 пациенте с ОВИН и 39 относительно здоровых взрослых.

Список из 351 известных на момент проведения исследования генов ПИД и, в том числе, 39 генов ОВИН были получены с сайта Европейского общества иммунодефицитов (https://esid.org). Данные межбелковых взаимодействий (PPI) для генов ПИД и ОВИН были получены из базы данных STRING (https://string-db.org/). Плотность сети, предоставленная Horvath S. et al., 2008, использовалась для расчета когезии сетей PPI группы из 39 генов ОВИН и десяти случайных групп (каждая группа состояла из 39 случайно отобранных генов ПИД). Расчет «биологического расстояния» в группе из 39 генов ОВИН и двух случайных групп (в каждой по 39 генов ПИД) выполнен с помощью пакета «Human gene connectome (HGC)», предоставленного Itan et al., 2013. Гены-кандидаты ОВИН были предсказаны с использованием корреляционного анализа Пирсона ($|r|> 0,9$ и $p<0,05$), данных 217 160 белок-белкового взаимодействия (PPI), предоставленных Cheng F., и анализа обогащения KEGG (пакета R «clusterProfiler», $p<0,05$).

Результаты клинического обследования пациента с синдромом Хеннекама получены из ГБАУЗ «Областная детская клиническая больница» вместе с письменным согласием родителей на проведение исследования. Геномная ДНК пациента была извлечена из лимфоцитов мононуклеаров периферической крови. Полногеномное секвенирование выполнено компанией Геномед (Москва). Анализ ДНК проводился по технологии секвенирования нового поколения методом парно-концевого чтения. Анализ покрывает 98,5% всего генома. Среднее покрытие составляло не менее 30х. Результаты секвенса были выровнены в соответствие со стандартной последовательностью человеческой генома hg38 при помощи программного обеспечения Burrows-Wheeler Aligner (BWA). Затем для изменения порядка, сортировки и преобразования файлов SAM, использовалась программа «SAMtools». Варианты однонуклеотидный (SNVs) и вставки / делеции (инсерции) вариантные вызовы были идентифицированы с анализом генома инструментария версией 4.1.2.0 (GATK4, http://www.broadinstitute.org/gatk/). Чтобы уменьшить некачественные результаты, возникающие из-за ошибок картирования, использовались варианты в экзонной области с глубиной чтения>10× и минимальным показателем качества отображения 30 с помощью программного обеспечения VCFtools. Затем мы отбросили все синонимичные SNV, вставки и удаления без сдвига рамки считывания (InDels) и варианты, экзонная функция которых помечена как «NA» или «неизвестно». Кандидаты SNVs и инсерции, полученные на предыдущих стадиях, были дополнительно отфильтрованы по связи с фенотипом, частоты минорного аллеля (MAF, minor allele frequency), патогенетическими, с использованием программного обеспечения ANNOVAR и онлайн-сервера CADD (https://cadd.gs.washington.edu). Анализ результатов секвенирования и выявление мутаций и однонуклеотидных полиморфизмов

осуществлялись на суперкомпьютере, предоставленном центром коллективного пользования ИММ УрО РАН «Суперкомпьютерный центр ИММ УрО РАН» (Екатеринбург).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение механизма гетерогенности опухолей при мышечно-инвазивном раке мочевого пузыря. Анализируя комплексные РНК-секвенирование и клинические данные 403 пациентов с мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря (МИРМП), оценивались уровни В-лимфоцитов, дендритных клеток, различных макрофагов, нейтрофилов, NK-клеток, CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов. Логарифмический ранговый тест и Т-критерий Вилкоксона показал, что из всех иммунологических параметров уровни макрофагов М2 сильно коррелировали с выживаемостью пациентов, злокачественностью и патологической стадией (p<0,01) (рисунок 1). Это логично вписывается в патогенез развития онкологического процесса, при котором тяжесть процесса коррелирует с большей активностью опухолевых макрофагов. Результаты наших исследований позволяют рекомендовать М2-макрофаги в качестве маркеров прогноза МИРМП.

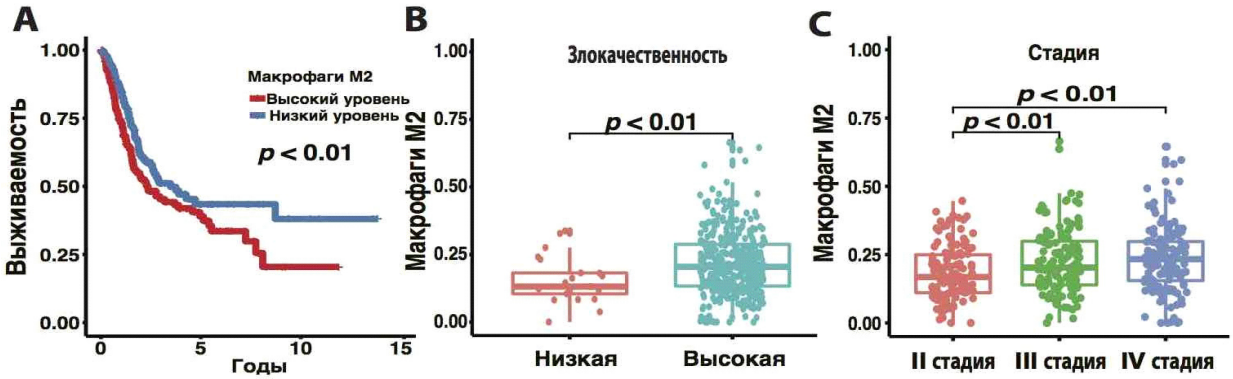

Рисунок 1 – Графики кривой Каплана-Мейера для М2-макрофагов (А) и уровень М2-макрофагов у пациентов с МИРМП в зависимости от стадии и злокачественности (В, С)

Используя данные секвенса РНК, имеющиеся в базе данных TCGA, мы классифицировали 403 образца МИРМП на два молекулярных типа, а именно подтип-1 и подтип-2, которые соответственно напоминают ранее идентифицированные люминальные и базальные подтипы (рисунок 2). Подтип-1 характеризовался высокой экспрессией люминальных маркеров, таких как CYP2J2, ERBB2 и KRT18, в то время как подтип 2 характеризовался высокой экспрессией базальных маркеров, таких как CD44, CDH3 и KRT1. Анализ выживаемости выявил общую 5-летнюю выживаемость при люминальном подтипе МИРМП 55%, а при базальном подтипе – 30 %, что свидетельствует о значительном различии в клиническом прогнозе (log-rank test, p<0,05). Тест Пирсона ($\chi 2$) использовался для

сравнения клинических показателей между двумя подтипами. Гистология, стадия рака, степень злокачественности и статус выживания значительно различались между двумя подтипами (p<0,01).

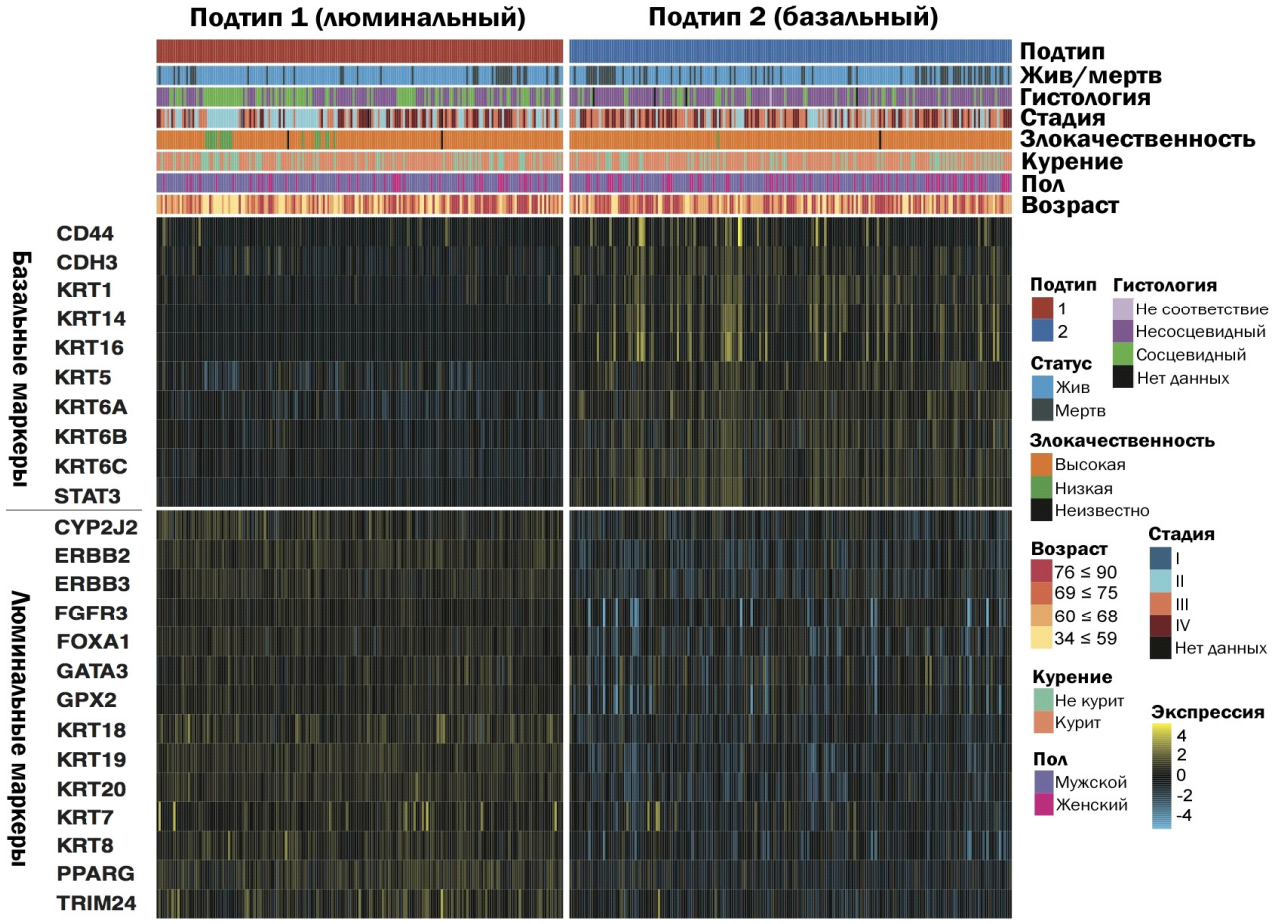

Рисунок 2 – Разделение мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря на подтип-1 и подтип-2

Примечание: тепловая карта изображает профили экспрессии базальных (верх) и люминальных (низ) биомаркеров в подтипе-1 (слева) и подтипе-2 (справа). Аннотация и соответствующие цвета указывают на некоторые клинические особенности. Желтый и бирюзовый цвета соответствуют высокому и низкому относительному уровню экспрессии.

Метод обогащения по функциональной принадлежности (GSEA – gene set enrichment analysis) выявил при люминальном подтипе высоко экспрессируемые сигнальные пути, участвующие, в основном, в метаболизме. В то же время высоко экспрессируемые пути при базальном подтипе связаны, в основном, с процессами в иммунной системе (организация внеклеточной структуры, отторжение аллотрансплантата, передача сигналов mTORC1, передача сигналов TNF-α через NF-kB), с метастазированием (фокальная адгезия, взаимодействие цитокин-цитокиновых рецепторов) и эпителиально-мезенхимальным переходом.

Что еще более важно, было выявлено мкРНК-зависимое перекрестное взаимовлияние мРНК и днРНК. Сеть перекрестной взаимозависимости состоит из GATA3, CLIC4, PALLD, miR-200c-3p, miR-141-3p, miR-141-5p, AC010326.3,

AC073335.2 и MIR100HG. Выявлено, что экспрессия генов в этой взаимозависимости значительно различалась между базальным и люминальным подтипами и имела тесную связь с прогнозом выживаемости (p<0,05) (рисунок 3). MiR-200c-3p, miR-141-3p, miR-141-5p могут быть ключевыми модуляторами иммунного ответа и развития опухоли при МИРМП. Эти результаты обеспечивают более глубокое понимание патофизиологических механизмов мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря.

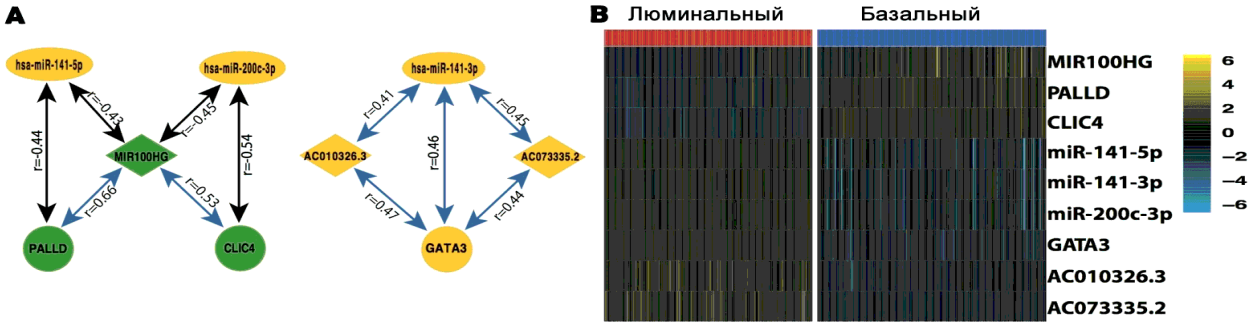

Рисунок 3 – Характерные для подтипов мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря мкРНК-зависимые мРНК-днРНК перекрестные взаимозависимости

Примечание: (А) - мкРНК-опосредованные мРНК-днРНК перекрестные взаимозависимости; зеленым обозначены молекулы с пониженной экспрессией в опухоли по сравнению с нормальным образцом, желтым - с повышенной экспрессией; синие линии представляют положительные корреляции, а черные - отрицательные. (В) - тепловая карта отображает уровень экспрессии девяти генов в базальном и люминальном подтипах, желтый и бирюзовый цвета соответствуют высокому и низкому относительному уровню экспрессии.

Оценка способности разных подтипов МИРМП отвечать на иммунотерапию. Исследована взаимосвязь между подтипами и маркерами иммунотерапии. Было обнаружено, что значения экспрессии молекул контрольных точек иммунного ответа (PD-1, PD-L1, CTLA-4, HAVCR-2 и LAG-3) позволяют различать базальные и люминальные подтипы МИРМП. При этом базальные опухоли демонстрировали более высокие уровни экспрессии молекул контрольных точек иммунного ответа, чем люминальный подтип (Т-критерий Вилкоксона, p<0,01), что необходимо учитывать при назначении иммунотерапии опухолей (рисунок 4).

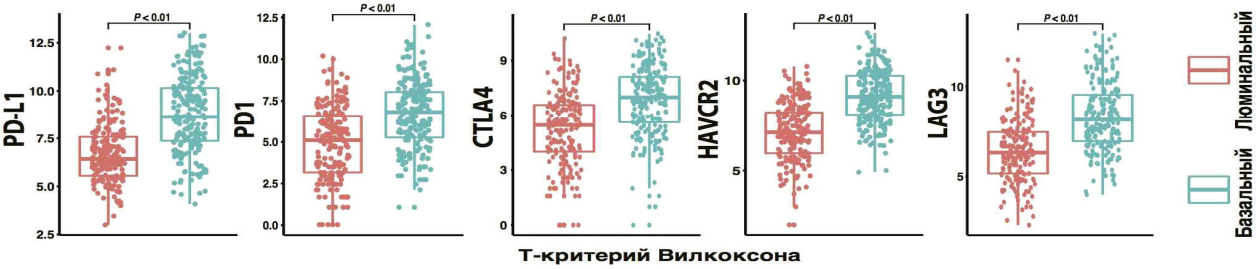

Рисунок 4 – Уровни экспрессии иммунных контрольных точек при базальном и люминальном подтипах МИРМП

Идентификация генов-кандидатов общего вариабельного иммунодефицита. Общий вариабельный иммунодефицит обладает глубокой фенотипической и генотипической гетерогенностью и вызывается как моногенными, так и сложными мультигенными причинами. Путем анализа плотности сети и плотности биологического расстояния мы выявили, что гены ОВИН функционально более похожи друг на друга и тесно взаимодействовали друг с другом по сравнению с другими генами ПИД. Это соответствует представлению о том, что ОВИН более мультигенная когорта заболеваний, по сравнению с большинством ПИД. С другой стороны, это ещё раз подтверждает идею о том, что ОВИН – скорее диагноз исключения и объединяет огромный перечень разнообразных нозологий с более или менее общими фенотипическими проявлениями, при которых ещё остаются невыявленными генетические предпосылки развития патологии и не определены соответствующие таргетные терапевтические воздействия.

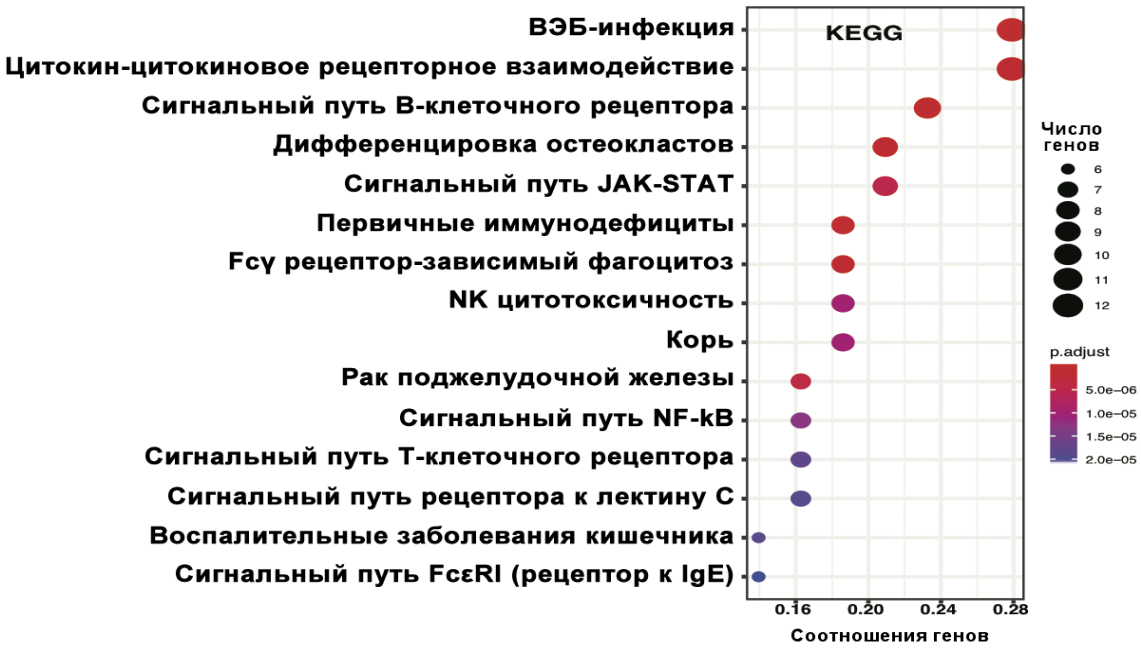

Рисунок 5 – Функциональное обогащение генов ОВИН биологическим значением из базы KEGG

Примечание: размер кружка соответствует количеству генов, а цвет кружка соответствует скорректированному p-значению.

На основе корреляционного анализа Пирсона и данных межбелковых взаимодействий, предоставленных Cheng F., et al., 2018, были получены 2751 ОВИН-специфических взаимодействий, включая 1716 генов-кандидатов. Используя R-пакет «clusterProfiler», нами был выполнен так называемый KEGG-анализ функционального обогащения известных генов ОВИН (по сути – привязка генов к их биологическим функциям) и обнаружено, что в общей сложности 15 сигнальных путей, описанных в базе KEGG (например, Эпштейна-Барр-вирусная инфекция, взаимодействие цитокин-цитокиновых рецепторов и сигнальный путь

рецептора В-клеток), были статистически значимыми (p<0,05, рисунок 5). Для определения генов-кандидатов, функционально сходных с известными генами ОВИН, был проведен скрининговый анализ определенных генов, имеющих какое-либо функциональное отношение к исследуемой проблеме, и связанных, по крайней мере, с одним из 15 сигнальных путей по данным базы данных KEGG.

Приведенный выше анализ выявил 172 новых гена-кандидата ОВИН и 414 ОВИН-специфических межбелковых взаимодействий между продуктами генов ОВИН. Результат построения сети межбелковых взаимодействий для известных генов ОВИН и генов-кандидатов ОВИН представлен на рисунке 6.

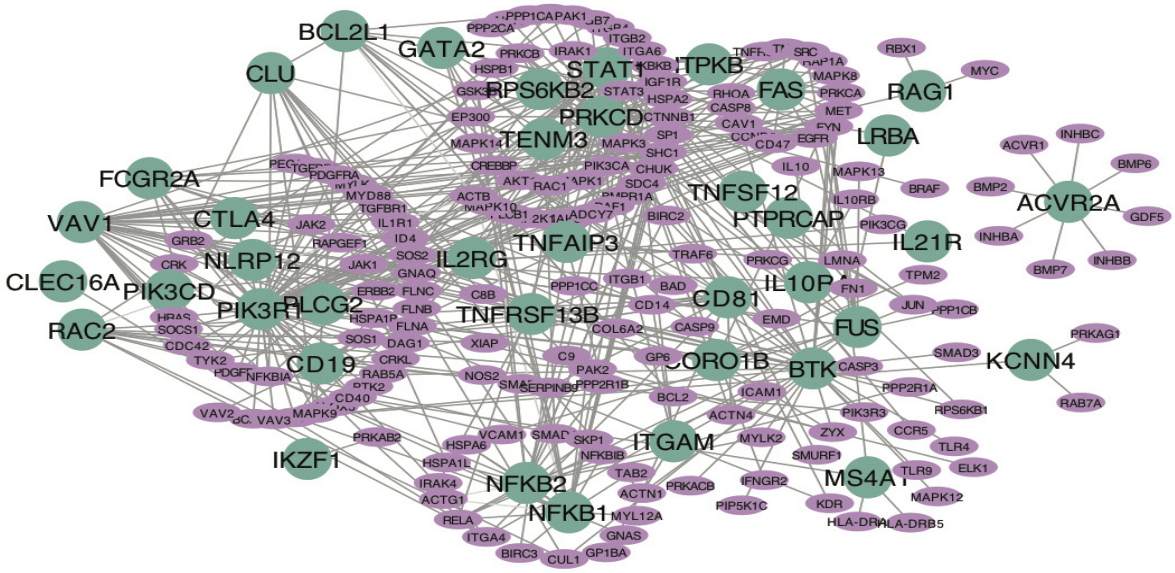

Рисунок 6 – Сеть межбелковых взаимодействий (PPI) генов-кандидатов ОВИН (светло-лиловый) и известных генов ОВИН (темно-зеленый)

Список из 172 выявленных генов-кандидатов ОВИН представлен в практических рекомендациях. Выявив новые гены-кандидаты, мы провели исследование качества прогноза, проведя обзор последних исследований. В частности, восемь генов-кандидатов ОВИН (AKT1, AKT3, RELA, SOCS1, STAT3, XIAP, CD40 и CASP8), которые не были включены в наш первоначальный список, но были нами предсказаны, оказались выявленными другими авторами в экспериментальных исследованиях. Это демонстрирует значимость выявленных генов-кандидатов ОВИН.

Идентификация мутаций генов (FAT4, RAG1, PIK3CD и CSF3R), приводящих к развитию заболевания у пациента с фенотипическими проявлениями синдрома Хеннекама. В поле зрения нашей исследовательской группы оказалась 5-летняя пациентка с фенотипическими проявлениями синдрома Хеннекама, но с некоторыми особенностями, позволявшими усомниться в правильности диагноза. После проведения полногеномного секвенирования в коммерческой лаборатории патогенных мутаций не было выявлено. Было принято

решение применить новые методы для выявления генов, связанных с фенотипом пациента.

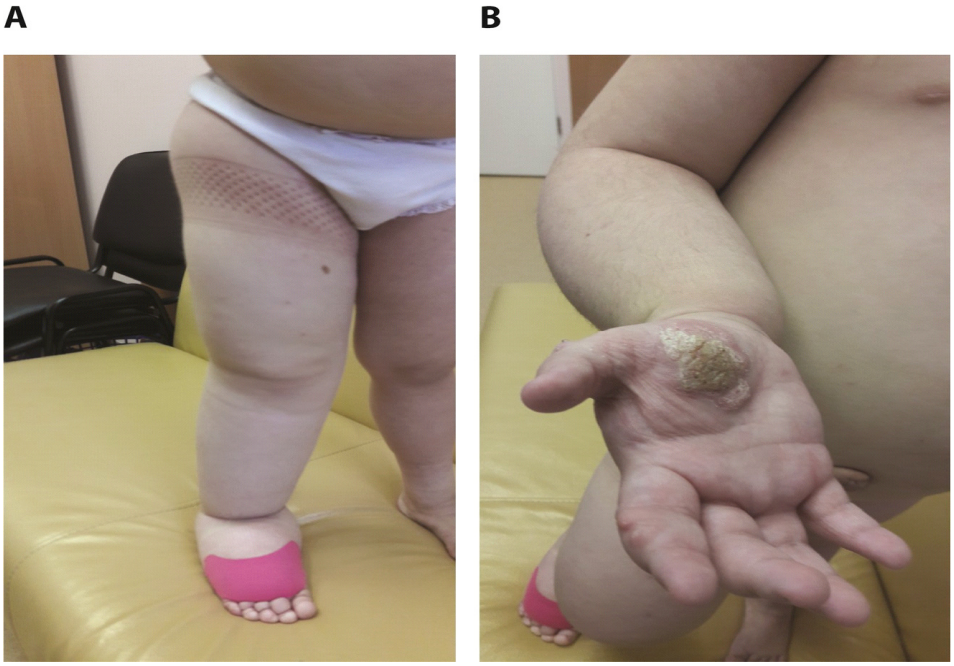

Рисунок 7 – Фотография пациентки с синдромом Хеннекама

Примечание: (А) - лимфедема правой половины тела (в частности, нижней конечности) и (В) - бородавчатые образования на правой ладони, асцит, лимфедема правой верхней конечности, гирсутизм (на предплечьи).

Клинические проявления включали следующие признаки болезни:

- ассиметричную лимфедему с преимущественным поражением правой стороны, впервые выявленную на 34 неделе гестации (рисунок 7А);
- бородавчатые образования на коже ладони, указательного и большого пальцев правой кисти (рисунок 7В);
- лифоаденопатию, лимфоангиоэктазию, которые осложнились присоединением кожного патологического процесса;
- хилезный асцит, выявленный с пренатального периода, который сохраняется до настоящего времени (рисунок 7В);
- правосторонний гидроторакс;
- внутреннюю бивентрикулярную открытую гидроцефалию;
- лимфоаденопатию всех групп шейных узлов (больше справа), надключичных, подключичных, парастернальных, а также грудных лимфузлов, множество мелких или увеличенных единичных подвижных лимфоузлов;
- кистозные дефекты нижней челюсти с вовлечением костной ткани;
- гирсутизм, выраженный на верхних конечностях (рисунок 7В);

В анамнезе – повышение мочевины, гипоплазия почки. Кроме того, в наследственности отмечены признаки иммунозависимой патологии в нескольких поколениях по обеим наследственным линиям.

Основные этапы фильтрации потенциально патогенных мутаций схематически представлены на рисунке 8. Вначале были исключены синонимичные SNV, не связанных с фреймами InDels и варианты, помеченных как "NA" или "неизвестно". Затем выявленные варианты были отфильтрованы через наложение на известные 351 ген ПИД и 2 гена синдрома Хеннекама (FAT4 и CSF3R). После исключения распространенных вариантов MAF>0,01 по ExAC, 1000g и gnomAD, осталось 6 редких вариантов мутаций. Для выбора патогенных мутаций были использованы модели CADD, FATHMM, и PROVEAN, и, наконец, были определены 4 мутации, которые являются «вероятно патогенными», то есть приводящими к развитию заболевания у этой пациентки с большой долей вероятности.

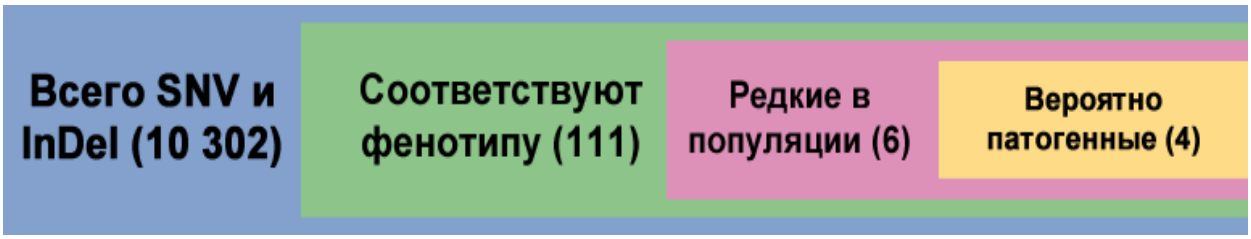

Рисунок 8 – Диаграмма, иллюстрирующая все четыре основных этапа фильтрации для идентификации потенциально патогенных мутаций
Примечание: количество отфильтрованных генов представлено в скобках.

В частности, была выявлена гомозиготная мутация (g.125452634G>A) гена FAT4, о которой уже сообщалось, что биаллельные и моноаллельные мутации связаны с синдромом Хеннекама (Alders M., et al., 2014). Кроме того, у пациентки были выявлены следующие мутации: гетерозиготная мутация (g.36575963G>A) в RAG1, гетерозиготная мутация (g.9715914T>A) в PIK3CD, гетерозиготная мутация (g.36471505C>T) в CSF3R.

Относительно гомозиготной мутации g.125452634G>A гена FAT4 встречаются противоречивые сведения. Так, по данным базы dbSNP Национального центра биотехнологической информации (NCBI) США, мутация является редкой и доброкачественной, не связанной с каким-либо фенотипом болезни (данные от 8 января 2016). По данным последней версии базы CADD, использующей референсный геном человека Ch38 (GRCh38-v1.5), мутация потенциально патогенная, поэтому её этиологическую значимость в оцениваемом нами случае полностью отрицать было нельзя.

Проверка патогенности этой мутации для данного пациента была проведена методом Сенгера. При сопоставлении ДНК родителей, сибса и пробанда выяснилось, что все родственники являются носителями той же самой гомозиготной мутации FAT4 (g.125452634G>A), что и у девочки, тогда как фенотип синдрома Хеннекама наблюдался только у пациентки. Это означает, что G>A замена на Chr4:125452634 в FAT4 может быть не патогенной. Однако,

идентичные мутации в одном и том же гене могут приводить к различным симптомам наследственного заболевания человека за счет изменения пенетрантности и переменной экспрессивности, которые могут индуцироваться такими факторами, как взаимодействия генов, факторы окружающей среды, аллельные вариации и стохастичность (Cooper D.N., et al., 2013). Следовательно, вопрос о том, может ли гомозиготная мутация (g.125452634G>A) в гене FAT4 приводить к различным симптомам у разных людей, заслуживают дальнейшего анализа.

Мутации в RAG1, PIK3CD и CSF3R также потенциально важны для оценки значимости в развитии патологии у этой пациентки. Ген активации рекомбинации 1 (RAG1) играет значительную роль в формировании комплекса белков для процесса V (D) J рекомбинации в лимфоцитах. Дефекты RAG1 или RAG2 приводят к различным первичным иммунодефицитам, в том числе Т-В-ТКИН, повышенной восприимчивости к цитомегаловирусной инфекции, аутоиммунным заболеваниям, синдрому Оменн и др. Мутации в гене CSF3R имеют значение для интрацитоплазматического домена G-CSFR, которые были открыты у больных с врожденной нейтропенией. Также известно, что эти мутации могут проявляться как соматические мутации, связанные с прогрессированием лейкемии при врожденной нейтропении. Мутации с усилением функции гена PIK3CD, который кодирует каталитические субъединицы P110δ и P85 фосфоинозитид-3-киназы-дельта, приводят к развитию так называемого синдрома активации Pi3-киназы (ранее считавшийся одним из ОВИН), в фенотипе которого одним из выраженных симптомов болезни является лимфопролиферация, вплоть до В-лимфом. Кроме того, для этого синдрома характерны гипогаммаглобулинемия, рецидивирующие вирусные инфекции, бронхоэктазы, герпесвирусные инфекции. Что ещё более важно, в лечении пациентки применяется эверолимус, препарат, ингибирующий сигнальный путь mTOR, роль которого при лимфоангиоэктазии отмечена многими исследователями (Pollack S., et al., 2015 и Altın Z., et al., 2018).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

От «Проекта генома человека» к «Инициативе точной медицины» научное и медицинское сообщество шаг за шагом движется в соответствии с установленными целями к «индивидуализированной медицине». С разработкой высокопроизводительной технологии секвенирования нового поколения началась генерация и накопление огромных объемов геномных данных, что обуславливает необходимость их интерпретации и решение более сложных технических проблем. Разумная интерпретация этих крупномасштабных и сложных многомерных данных становится ключевым шагом в современных исследованиях различной патологии

человека, включая иммунозависимые болезни, в том числе онкопатологию, аутовоспалительные, аутоиммунные болезни и первичные иммунодефициты.

Проведенные исследования позволили взглянуть на процессы системной биологии с патофизиологической точки зрения и выявить общие закономерности. Как первичные иммунодефициты, так и онкопатология могут быть представлены в единой схеме на уровне общих типовых патологических процессов, таких как, например, тканевой стресс и его участие в общих сигнальных и метаболических путях.

Благодаря проведенным исследованиям результатов секвенса РНК, подтвердилась концепция о том, что мышечно-инвазивный рак мочевого пузыря по своей генетической природе гетерогенен и, основываясь на результатах наших исследований, может быть классифицирован на два основных подтипа – базальный и люминальный. Были определены методы прогнозирования эффективности иммунотерапии этого типа рака и предложены биомаркеры для выявления субтипов.

Кроме того, были разработаны методы, объединяющие данные о ко-экспрессии и межбелковых взаимодействиях, а также данные, характеризующие функции генов, позволяющие выявлять среди них причинно-значимые для развития ПИД. В нашем исследовании были выявлены 172 новых гена-кандидата ОВИН, которые находятся во взаимозависимости с известными генами ОВИН, имеют сильные корреляционные связи между ними и функционирование на уровне одних и тех же сигнальных путей. Несколько проведенных нами проверок анализа, а также подтверждение в зарубежных экспериментальных исследованиях 8 выявленных генах ОВИН, предсказанных в нашем исследовании, подтверждают значимость прогнозируемых генов-кандидатов в развитии патологии. Проведенное нами исследование способствовало лучшему пониманию молекулярно-генетических механизмов ОВИН и позволило расширить перечень генов-кандидатов этой группы ПИД.

Многие из предсказанных и доказанных в экспериментальных исследованиях гены ОВИН обладают широкими функциями и полное выключение некоторых из них может привести к гибели человека в эмбриональном периоде.

Однако известно, что ОВИН довольно часто дебютирует у лиц в возрасте старше 20-40 лет. Мультигенная природа ОВИН объясняется, в частности, тем, что для дебюта болезни необходимо сочетанное воздействие множества факторов, приводящих к тому, что функционально слабые белки, в определенных условиях, индуцируют клинические проявления болезни.

Используя апробированные в теоретических исследованиях методы биоинформационного анализа, нами был проанализирован случай развития

патологии у пациентки с лимфангиэктазией-лимфедемой, бородавчатыми образованиями, гирсутизмом, гидротораксом и лимфатическим асцитом. Для лучшего понимания патогенеза и возможных точек таргетного воздействия, было выполнено полногеномное секвенирование. Выявлены четыре мутации в генах, известных, как патогенные при ПИД, включая синдром Хеннекама. Определение их роли в дальнейшем позволит приблизиться к более точному пониманию патогенеза и обосновать патогенетическое лечение пациента, а также определить происхождение этих мутаций и исследовать молекулярные механизмы формирования болезни.

Перспективы дальнейшей разработки темы. В нашем исследовании выявлена статистически значимая повышенная экспрессия молекул сигнальных путей цитокин-цитокиновых рецепторных взаимодействий, как при базальном типе МИРМП, так и при ОВИН. Продолжение исследований в данной области поможет раскрыть общие механизмы развития такой иммунопатологии, как рак, в том числе развывшейся как осложнение первичных иммунодефицитов.

Подход, примененный для выявления механизмов патогенеза ОВИН может быть экстраполирован для исследования формирования фенотипа других синдромов.

Выявление конкретных генов синдромов ОВИН и определение молекулярных основ иммунопатологии позволят изучить патогенез, дифференцировать нозологические формы из обширной неоднородной группы ОВИН и приблизить создание специфической таргетной терапии, улучшающей прогноз и качество жизни пациентов.

Процесс верификации генов первичных иммунодефицитов может быть усовершенствован разработкой программного обеспечения для прогнозирования генов-кандидатов различной иммунопатологии, обеспечивающего возможность его эффективного применения в клинических исследованиях.

Выявленные закономерности молекулярно-генетических основ иммунопатологии при формировании разных подтипов мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря в дальнейшем могут быть продолжены экспериментальными исследованиями. Взаимодействия микро-РНК miR-200c и miR-141, обнаруженные с помощью вычислительного анализа, также должны быть подтверждены биологическими экспериментальными исследованиями в дальнейшем.

Примененный комплексный подход выявления закономерностей формирования иммунопатологии может быть использован для исследований любых других нарушений иммунитета.

Относительно выявления причин развития синдромов мальформации лимфатических сосудов и наследственной лимфедемы при трактовке полученных

результатов необходимо учитывать другие формы передачи наследственной информации, в том числе аутосомно-доминантные, ко-доминантные и ко-экспрессивные, а также вариации ДНК вне экзонов. Это определяет необходимость продолжения поиска патогенетических основ формирования иммунопатологии с учетом новых данных о механизмах патогенеза и вовлеченных сигнальных путях, а также проведение полномасштабных исследований генома человека на международном уровне.

ВЫВОДЫ

1. Опухолевые макрофаги, относящиеся к семейству М2, значительно коррелировали с выживаемостью пациентов, злокачественностью, стадией опухоли мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря и являются маркерами опухолевого процесса при мышечно-инвазивном раке мочевого пузыря.

2. Перекрестное взаимовлияние различных кодирующих (GATA3, PALLD, CLIC4) и некодирующих РНК (мкРНК miR-200c-3p, miR-141-3p, miR-141-5p, днРНК AC010326.3, AC073335.2 и MIR100HG) играет значительную роль в онкогенезе и прогрессировании опухоли, а выявленные биомаркеры важны при определении подтипов мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря и прогнозировании развития патологии.

3. Экспрессии иммуносупрессивных молекул PD-1, PD-L1, CTLA-4, HAVCR-2 и LAG-3 позволяют различать базальные и люминальные подтипы мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря - базальные опухоли демонстрируют более высокие уровни экспрессии иммуносупрессивных молекул, чем опухоли люминального подтипа.

4. В основе мультигенной природы общей вариабельной иммунной недостаточности лежит функциональная общность генов и их более тесное взаимодействие между собой на уровне сигнальных путей, по сравнению с другими генами первичных иммунодефицитов.

5. Прогнозирование генов-кандидатов группы первичных иммунодефицитов «Общая вариабельная иммунная недостаточность», обеспеченное комплексным анализом развития иммунопатологии, данных ко-экспрессии и взаимодействий генов, сведениями об их биологической роли, позволило идентифицировать 172 гена-кандидата.

6. Идентифицированы «вероятно-патогенные» мутации в генах FAT4, RAG1, PIK3CD и CSF3R, которые могут иметь клиническое значение и приводить к фенотипу первичного иммунодефицита синдрома Хеннекама.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Перед началом иммунотерапии при мышечно-инвазивном раке мочевого пузыря следует определить подтип рака (базальный или люминальный) методом определения биомаркеров, что позволит сократить стоимость лечения и предупредить развитие побочных эффектов.

2. Для определения подтипа мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря необходимо исследование следующих биомаркеров заболевания: GATA3, PALLD, CLIC4, miR-200c-3p, miR-141-3p, miR-141-5p, AC010326.3, AC073335.2 и MIR100HG.

3. После определения клинического фенотипа первичного иммунодефицита при проведении исследований по прогнозированию генов-кандидатов общего вариабельного иммунодефицита необходимо включать в анализ факторы ко-экспрессии, межбелкового взаимодействия и анализ сигнальных путей.

4. Для дифференциальной диагностики синдромов группы первичных иммунодефицитов «Общая вариабельная иммунная недостаточность», необходимо дополнительно включить в перечень тестируемых генов 172 гена-кандидата, выявленных в нашем исследовании: LMNA, BAD, PRKAB2, CRK, CRKL, CASP8, CTNNB1, STAT3, HRAS, PTK2, JAK1, BCL2, PDGFRB, CHUK, JAK2, GRB2, SRC, RELA, NFKBIA, EGFR, CREBBP, EP300, MAPK1, IKBKB, PIK3CA, SHC1, PIK3CB, IL10, ERBB2, PPP1CA, TRAF6, INHBA, GNAQ, VAV2, TGFBR1, TGFBR2, BCAR1, NOS2, FYN, SOCS1, SMAD4, TAB2, TNFRSF1A, TNF, HLA-DRA, FLNA, ITGB1, ACTN1, AKT1, SP1, PIK3CG, BRAF, INHBC, CD47, MET, PIP5K1C, SOS1, GP6, JUN, ICAM1, GP1BA, PRKACA, PRKCA, PRKAG1, TYK2, KDR, ACTB, MAPK3, PLCB1, RAC1, ADCY7, RAF1, SDC4, IGF1R, ITGA6, ITGB4, ITGB7, PAK1, AKT3, CDC42, SMAD1, CCR5, CASP3, ZYX, ITGB2, RAP1A, PDGFRA, MAPK8, VAV3, CASP9, GSK3B, IRAK1, MYD88, TLR9, PRKCB, BMP7, RHOA, NFKBIB, MAPK14, BMP6, INHBB, GDF5, TLR4, CAV1, CD40, ITGA4, C8B, C9, IL10RB, PECAM1, PPP2CA, CUL1, IL1R1, CD14, HSPA1B, BIRC3, HSPA1L, IRAK4, BMP2, SOS2, MYLK, PIK3R3, RAPGEF1, MAPK13, GNAS, HSPA2, MAPK9, ELK1, MYC, PPP1CB, CCND3, MYLK2, HSPA6, BIRC2, DAG1, FLNB, FLNC, ID4, XIAP, ACTN4, SMAD3, MAPK12, PPP2R1A, PRKACB, MAPK10, MAP2K1, MAP2K6, MAP3K7, BMPR1A, HSPB1, PRKCG, ACVR1, PPP1CC, RPS6KB1, HLA-DRB5, SERPINB9, FN1, COL6A2, VCAM1, RAB7A, ACTG1, MYL12A, PPP2R1B, SKP1, ALOX5, RAB5A, PAK2, RBX1, SMURF1, EMD, TPM2, IFNGR.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рецензируемых ВАК, индексируемых в международных базах данных Scopus и Web of Science:

1. A co-expression network for differentially expressed genes in bladder cancer and a risk score model for predicting survival / Z. Chen, *Guojun Liu*, I. Tuzankina, M. Bolkov, Guoqing Liu, W. Tang // Hereditas. – 2019. – Vol. 156, № 1. – P. 24 (IF WoS - 0,896; Scopus CiteScore - 1).

2. Identification of candidate disease genes in patients with common variable immunodeficiency / *Guojun Liu*, M. Bolkov, I. Tuzankina, I. Danilova // Quantitative Biology. – 2019. – Vol. 7, № 3. – P. 190-201 (Scopus CiteScore - 0,84).

3. Identification of miR-200c and miR141-mediated lncRNA-mRNA crosstalks in muscle-invasive bladder cancer subtypes / *Guojun Liu*, Z. Chen, I.G. Danilova, M.A. Bolkov, I.A. Tuzankina, Guoqing Liu // Frontiers in genetics. – 2018. – Vol. 9. – P. 422 (IF WoS - 3,517; Scopus CiteScore - 3,6).

4. A novel mutation in FAT4 caused a mild form of Hennekam syndrome with warty formations / *G. Liu*, M. Bolkov, I. Tuzankina // European journal of immunology. Abstracts of IUIS 2019 Beijing 17th International Congress of Immunology. – 2019. – Vol. 49, № suppl_3. – P. 1228-1229 (IF WoS - 4,695; Scopus CiteScore -3,83).

5. Постмортальный анализ иммунозависимой патологии у детей раннего возраста / *Г. Лю*, М.А. Болков, С.С. Дерябина, Я.М. Крохалева, И.А. Тузанкина // Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания: научно-практ. ревматология: тез. докл. III Всерос. – Москва, 2018. – Т. 56, № 3, прил. 3. - С 5 (Scopus CiteScore - 0,27; РИНЦ - 1,306).

6. Функциональные взаимоотношения между генами общей вариабельной иммунной недостаточности в геноме человека / М.А. Болков, *Г. Лю*, И.А. Тузанкина, И.Г. Данилова // Российский журнал детской гематологии и онкологии. – 2019. – Т. 6, № 2. – С. 47 (РИНЦ - 0,81).

7. Молекулярно-генетическая природа синдрома Хеннекама / Лю Г., Тузанкина И.А., Болков М.А., Долгих М.А. // Трансляционная медицина: II Санкт-Петербургский лимфологический форум: Лимфология XXI века: новые подходы и актуальные исследования. – Санкт-Петербург, 2019. – прил. 2, окт. – С. 51 (РИНЦ 0,283).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

днРНК – Длинные некодирующие рибонуклеиновые кислоты
МИРМП – Мышечно-инвазивный рак мочевого пузыря
мкРНК – Микро рибонуклеиновые кислоты
мРНК – Матричные (ядерные) рибонуклеиновые кислоты
ОВИН – Общий вариабельный иммунодефицит
ПИД – Первичные иммунодефициты
РМП – Рак мочевого пузыря
ТКИН (SCID) – Тяжелый комбинированный иммунодефицит
BWA – Burrows-Wheeler Aligner – выравнивание Барроуза-Уилера
DEG – Метод оценки дифференциально экспрессируемых генов
ESID – Европейское общество иммунодефицитов
GATK4 – The Genome Analysis Toolkit – Программа для качественного определения вариаций в геноме из данных секвенирования
GEO – Gene Expression Omnibus – База данных экспрессии генов
GSEA – Gene set enrichment analysis – Анализ обогащения по функциональной принадлежности, анализ дополнения генетической информации биологическим значением
IGV – Integrated genomics viewer – Программа для просмотра секвенированной информации
InDels Insertions/deletions – варианты инсерций/делеций
KEGG – Киотская энциклопедия генов и геномов
NGS – Высокопроизводительное секвенирование
PD-1, PD-L1, CTLA-4, HAVCR-2 и LAG-3 – молекулы контрольных иммунных точек
PPI – Protein-protein interaction – Белок-белковые взаимодействия или межбелковые взаимодействия
SNV – Single nucleotide variants – однонуклеотидные замены
STRING – Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins – база данных и веб-ресурс для поиска информации об известных и предсказанных белок-белковых взаимодействиях
TCGA – The Cancer Genome Atlas – Атлас акового генома
XG/XGBoost – Алгоритм машинного обучения «eXtreme Gradient Boosting»

ЛЮ ГОЦЗЮНЬ

ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ГЕНОЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ ОТДЕЛЬНЫХ ТИПОВ ИММУНООПОСРЕДОВАННОЙ ПАТОЛОГИИ

14.03.03 – Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук