

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра генетики

ЛИТВИНОВОЙ
Дарьи Юрьевны

**РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ГЕНА *RB1* В
ПАТОГЕНЕЗЕ РЕТИНОБЛАСТОМЫ**

Аннотация к дипломной работе

Научный руководитель:
ГУ «РНПЦ детской онкологии,
гематологии и иммунологии»
Старший научный сотрудник
И.Е. Гурьянова

Минск, 2022

РЕФЕРАТ

Дипломная работа содержит 64 страницы, 14 рисунков, 10 таблиц, 85 литературных источника.

Ключевые слова: ГЕН *RB1*, РЕТИНОБЛАСТОМА, ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ, ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КОНСУЛЬТИРОВАНИЕ.

Объект исследования: Пациенты с диагнозом ретинобластома и их кровные родственники.

Цель работы: Установить спектр врожденных генетических нарушений в гене *RB1*, а также связи с клиническим фенотипом в группе пациентов детского возраста с ретинобластомой.

Материалы и методы исследования: В исследование включено 20 пациентов из неродственных семей. Соотношение пациентов с монолатеральной и билатеральной ретинобластомой составило 9:11 соответственно. Геномную ДНК выделяли из суспензии лейкоцитов периферической крови фенол-хлороформной экстракцией. Далее проводили серию ПЦР для амплификации фрагментов, включающих последовательности всех экзонов, регионы прилегающих сплайс-сайтов и промоторные области. Детектирование последовательностей ампликонов выполняли методом высокопроизводительного секвенирования. Обнаруженные нарушения, имеющие клиническую значимость, подтверждали методом капиллярного секвенирования по Сэнгеру. Крупные поломки определяли методом мультиплексной проба-зависимой лигазной реакции или флуоресцентной гибридизации *in situ*. При выявлении нарушения у пробанда, выполняли молекулярно-генетическое исследование его кровным родственникам. Таким образом, был изучен генетический материал 5 семей.

Полученные результаты: У 14 пациентов выявлено 13 различных генетических нарушений, 4 из которых ранее не были идентифицированы у пациентов с ретинобластомой среди других популяций. Среди 13 уникальных нарушений: 5 дефектов в сплайс-сайтах; 2 миссенс; 2 небольших делеций, приводящих к сдвигу рамки считывания; 3 крупных делеции; 1 нонсенс. Герминальные нарушения определены у 33,3% (3/9) пациентов с монолатеральной ретинобластомой и у 100% (11/11) с билатеральной, среди которых у 10% (2/20) пациентов определён наследственный характер ретинобластомы. При исследовании 5 семей, у 3 пробандов нарушения были классифицированы как возникшие *de novo*. Все выявленные генетические нарушения были детектированы в гетерозиготном состоянии. У 70% (14/20) пациентов мутации гена *RB1* были определены как врождённые.

РЭФЕРАТ

Дыпломная праца змяшчае 64 старонкі, 14 малюнкаў, 10 табліц, 85 літаратурных крыніцы.

Ключавыя словы: ГЕН *RB1*, РЭТЫНАБЛАСТОМА, ВЫСОКАПРАДУКЦЫЙНАЕ СЕКВІНІРАВАННЕ, МАЛЕКУЛЯРНА-ГЕНЕТЫЧНАЕ ТЭСТАВАННЕ, ГЕНЕТЫЧНАЕ КАНСУЛЬТАВАННЕ.

Аб'ект даследавання: Пацыенты з дыягназам рэтынабластома і іх кроўныя сваякі.

Мэта працы: Усталяваць спектр прыроджаных генетычных парушэнняў у гене *RB1*, а таксама сувязі з клінічным фенатыпам ў групе пацыентаў дзіцячага ўзросту з рэтынабластомай.

Матэрыялы і метады даследавання: У даследаванне ўключана 20 пацыентаў з няроднасных сем'яў. Суадносіны пацыентаў з моалатэральнай і білатэральнай рэтынабластомай склала 9:11 адпаведна. Геномную ДНК вылучалі з завісі лейкацытаў перыферычнай крыві фенол-хлараформнай экстракцыяй. Далей праводзілі серыю палімеразных ланцуговых рэакцый для ампліфікацыі фрагментаў, якія ўключаюць паслядоўнасці ўсіх экзонаў, рэгіёны прылеглых сплайс-сайтаў і праматарныя вобласці. Дэтэктаванне паслядоўнасцяў ампліконаў выконвалі метадам высокапрадукцыйнага секвінравання. Выяўленыя парушэнні, якія маюць клінічную значнасць, пацвярджалі метадам капілярнага секвінравання па Сэнгеру. Буйныя паломкі вызначалі метадам мультыплекснай проба-залежнай лігазнай рэакцыі або флуарэсцэнтнай гібрыдызацыі *in situ*. Пры выяўленні парушэння ў прабанды, выконвалі малекулярна-генетычнае даследаванне яго кроўным сваякам. Такім чынам, быў вывучаны генетычны матэрыял 5 сем'яў.

Атрыманыя вынікі: У 14 пацыентаў выяўлена 13 розных генетычных парушэнняў, 4 з якіх раней не былі ідэнтыфікаваныя ў пацыентаў з рэтынабластомай сярод іншых папуляцый. Сярод 13 унікальных парушэнняў: 5 дэфектаў у сплайс-сайтах; 2 міссэнс; 2 невялікіх дэлецыі, якія прыводзяць да зруху рамкі счытвання; 3 буйных дэлецыі; 1 нонсэнс. Гермінальныя парушэнні вызначаны ў 33,3% (3/9) пацыентаў з моалатэральнай рэтынабластомай і ў 100% (11/11) з білатэральнай, сярод якіх у 10% (2/20) пацыентаў вызначаны спадчыны характар рэтинобластомы. Пры даследаванні 5 сем'яў, у 3 пробандов парушэнні былі класіфікаваныя як ўзніклі *de novo*. Усе выяўленыя генетычныя парушэнні былі дэцэктываны ў гетэрозіготном стане. У 70% (14/20) пацыентаў мутацыі гена *RB1* былі вызначаныя як прыроджаныя.

ABSTRACT

The diploma work contains 64 pages, 14 figures, 10 tables, 85 literary sources.

Keywords: *RB1* GENE, RETINOBLASTOMA, NEXT GENERATION SEQUENCING, GENETIC TESTING, GENETIC COUNSELING.

The object of the study: Patients with retinoblastoma and their blood relatives.

Objective: To establish the spectrum of hereditary genetic disorders in the *RB1* gene, as well as the connection with the clinical phenotype in a group of pediatric patients with retinoblastoma.

Materials and research methods: 20 patients from unrelated families were included in the study. The ratio of patients with monolateral and bilateral retinoblastoma was 9:11, respectively. Genomic DNA was isolated from a suspension of peripheral blood leukocytes by phenol-chloroform extraction. Next, a series of PCR was performed to amplify fragments including sequences of all exons, regions of splice sites and promoter regions. Detection genetic analysis was performed by next generation sequencing. The detected disorders that are of clinical significance were confirmed by the Sanger capillary sequencing method. Large-scale mutations were determined by multiplex ligation-dependent probe amplification or fluorescent hybridization *in situ*. If a mutation was detected in a proband, then a molecular genetic study was performed for his blood relatives. Thus, the genetic material of 5 families was studied.

The results obtained: 13 different genetic disorders were detected in 14 patients, 4 of which were not previously identified in patients with retinoblastoma among other populations. Amidst the 13 unique mutations were: 5 defects in splice sites; 2 missences; 2 small deletions resulting in a frameshift; 3 large deletions; 1 nonsense. Germinal disorders were detected in 33.3% (3/9) of patients with monolateral retinoblastoma and in 100% (11/11) with bilateral, among which 10% (2/20) of patients had hereditary retinoblastoma. In the study of 5 families, in 3 probands, violations were classified as *de novo*. All identified genetic disorders were detected in a heterozygous state. In 70% (14/20) of patients, mutations of the *RB1* gene were identified as hereditary.