

На правах рукописи



КОВАЛЕНКО

Сергей Петрович

Наследственные и соматические мутации как молекулярные маркеры для
диагностики и лечения рака молочной железы

03.01.07 – молекулярная генетика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Новосибирск 2014

Работа выполнена в лаборатории генно-инженерных методов исследований Федерального государственного бюджетного учреждения "Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики" Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, г. Новосибирск.

Научный консультант: **Ляхович Вячеслав Валентинович, академик РАН**, доктор биологических наук, профессор, директор Федерального государственного бюджетного учреждения "Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики" СО РАМН, г. Новосибирск

Оппоненты: **Беклемишев Анатолий Борисович**, доктор биологических наук, заведующий лабораторией генной инженерии Федерального государственного бюджетного учреждения "Научно-исследовательский институт биохимии" СО РАМН, г. Новосибирск

Ильичев Александр Алексеевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом биоинженерии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Новосибирская область

Лебедев Игорь Николаевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией цитогенетики Федерального государственного бюджетного учреждения "Научно-исследовательский институт медицинской генетики" СО РАМН, г. Томск

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное учреждение "Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина" Российской академии медицинских наук, г. Москва

Защита состоится: 3 декабря 2014 г. в 10.00 на заседании диссертационного совета Д 003.074.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН (630090, Новосибирск, пр. академика Лаврентьева, 8/2, тел. (383)-363-90-45), тел: +7- 952-916-7858. e-mail: kokoza@mcb.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН mcb.nsc.ru/sites/mcb.nsc.ru/files/fck/Kovalenko_SP_thesis.pdf

Автореферат разослан « ____ » _____ 2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е. Б. Кокоза

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Рак молочной железы (РМЖ) – наиболее частое онкологическое заболевание у женщин. Каждая десятая женщина в течение жизни заболевает этим видом рака. Несмотря на явные успехи последних десятилетий в диагностике и лечении, в целом заболеваемость в развитых странах растет.

Молекулярно-генетический анализ – сравнительно новый инструмент в онкологии, однако именно молекулярно-генетический анализ позволяет выявлять наследственную предрасположенность к заболеванию, что обеспечивает возможность ранней диагностики для группы генетически отягощенных пациенток. Молекулярно-генетический анализ становится незаменимым инструментом и при выборе оптимальной лекарственной терапии, ряд современных препаратов эффективны только при определенных генетических изменениях в опухоли.

Молекулярно-генетический анализ начал входить в практику онкологов с обнаружением генов, дефекты в которых обуславливают наследственные формы РМЖ – это, прежде всего, мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*. За более чем 15 лет изучения распространенности этих мутаций в различных популяциях, исследования функциональных особенностей белков, кодируемых этими генами, возможностей профилактики возникновения злокачественных заболеваний у носителей мутаций возник целый ряд подходов к использованию таких знаний в онкологической практике. Во многих странах сформированы национальные рекомендации по наблюдению носителей мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*, рекомендации по необходимости генетического анализа у отдельных групп больных РМЖ.

Стало очевидным, что в рамках сегодняшних знаний направленность профилактических мероприятий именно на носителей мутаций ощутимо увеличит эффективность профилактики онкологических заболеваний. В то же

время широкое распространение методов молекулярной диагностики остро ставит вопросы стоимости молекулярно-генетического анализа, возможностей и необходимостей анализа мутаций в целом в популяции и у больных с диагнозом «РМЖ». Крайне актуальным становится разработка экономичных методов анализа мутаций, а в плане оценки ресурсов, необходимых для наблюдения пациентов – носителей мутаций, необходимым является анализ частот встречаемости таких мутаций в целом в популяции.

Стоит отметить, что для большинства мутаций, связанных с формированием наследственной предрасположенности к РМЖ, даже существующие в мире оценки частот распространенности мутаций крайне приблизительны. Отчасти это связано с отсутствием методов, позволяющих анализировать большие массивы образцов на наличие мутаций, отчасти – с трудоемкостью подобного исследования.

Несмотря на очевидную значимость специфических мер профилактики для носителей мутаций в генах, обуславливающих наследственную предрасположенность к РМЖ, анализ на наличие таких мутаций в большинстве стран был до недавнего времени рекомендован лишь при наличии семейного анамнеза заболевания. В практике российской онкологии выявление мутаций, обуславливающих наследственные формы РМЖ, не регламентировано и проводится спорадически.

В то же время ситуация начинает явно меняться с 2008 г., когда появились первые исследования, убедительно демонстрирующие эффективность специфической терапии для носителей мутаций в гене *BRCA1* с использованием цис-платина. Более того, на последних стадиях клинических испытаний находится препарат Олапариб (AstraZeneca), предназначенный для лекарственной терапии именно больных с наследственными мутациями в гене *BRCA1*. Сегодня анализ наличия мутаций в гене *BRCA1* становится необходимым не только для выделения групп высокого риска заболевания, но и как инструмент онколога для выбора корректной терапии. Вопросы выбора

корректных, надежных, экономически обоснованных методов анализа мутации в гене *BRCA1* приобретают совершенно новую окраску.

В настоящем исследовании нами были выбраны две группы наиболее значимых для практической онкологии молекулярно-генетических изменений при РМЖ – мутации в генах, обуславливающих наследственную предрасположенность к данному виду рака и амплификации фрагментов ДНК в клетках опухоли, приводящие к увеличению дозы гена *HER2/neu*. Выявление именно этих молекулярно-генетических изменений позволяет скорректировать подход к профилактике и лечению больных с диагнозом «РМЖ».

Несмотря на наличие множества методов анализа мутаций, большинство существующих методов не удовлетворяют требованиям экономичности, технологичности, точности, информативности, простоты воспроизведения. Разработка новых, экономичных и технологичных методов анализа мутаций по-прежнему остается актуальной задачей. В настоящем исследовании разработан новый оригинальный экономичный метод анализа мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*.

При выборе стратегии анализа наследственных мутаций в онкологической практике неизбежно встает вопрос о распространенности таких мутаций, как среди больных, так и в целом в популяции. Без ответа на этот вопрос невозможно планировать дальнейшие мероприятия по организации наблюдения носителей мутаций и по лечению больных с соответствующими наследственными мутациями, поскольку без информации о количестве больных с наследственными формами рака и количестве носителей мутаций невозможно корректно оценить стоимость необходимых мероприятий. Более того, распространенность мутаций в популяции позволяет сформулировать алгоритм выявления мутаций, ранжировать их по частотам встречаемости. Таким образом, анализ частот встречаемости мутаций в популяции – крайне актуальная задача.

Феномен амплификации фрагмента ДНК, содержащего ген *HER2/neu*, описан в многочисленных научных публикациях, именно амплификация

является первопричиной гиперэкспрессии рецептора HER2/neu на поверхности раковых клеток, что в свою очередь предопределяет ответ опухоли на лечение препаратами на основе моноклональных антител к рецептору HER2/neu. Существующая технология анализа гиперэкспрессии HER2/neu предполагает иммуногистохимический анализ (ИHC) с последующим уточнением результатов с помощью FISH-анализа. Высокая стоимость и трудоемкость FISH-анализа часто приводит к неполному выполнению требуемого исследования HER2/neu статуса опухоли, в реальности исследование ограничивается только иммуногистохимическим методом, что с неизбежностью приводит к неточностям в типировании опухоли. Таким образом, безусловно, актуальным является разработка удобного метода анализа, позволяющего выявлять гиперэкспрессию HER2/neu в единой аналитической процедуре.

Амплификация гена *HER2/neu* и сама по себе – слабо изученный феномен. Остается неясным механизм внутрихромосомной амплификации, не изучены вопросы об однородности или неоднородности амплифицируемого фрагмента, границах ампликона, функциональном значении вариабельности амплифицированного фрагмента. При наличии методов, позволяющих осуществлять тонкое картирование границ амплификации фрагмента ДНК, содержащего ген *HER2/neu*, характеристика амплифицированного фрагмента ДНК может дать новую информацию о специфике опухоли, новых возможностях ее лекарственной терапии в зависимости от варианта амплификации.

Так, в непосредственной близости к гену *HER2/neu* располагается ген *TOPO2*, коамплификация этого гена вместе с геном *HER2/neu* позволяет предположить возможную чувствительность опухоли к ингибиторам топоизомеразы. Таким образом, детальное исследование границ амплифицированного фрагмента вполне заслуживает пристального внимания, как с теоретической, так и с сугубо прикладной точек зрения.

В целом актуальность работы определяется явной потребностью практических онкологов в экономичных и технологичных методах анализа молекулярно-генетических изменений с одной стороны и необходимостью детального исследования наиболее значимых молекулярно-генетических изменений при раке молочной железы – с другой.

Цель и задачи исследования

Цель – разработать экономичные методы анализа наиболее значимых для практической онкологии молекулярно-генетических изменений, связанных с предрасположенностью к РМЖ, выбором лекарственной терапии при данном виде рака и изучить особенности этих молекулярно-генетических изменений на материале пациентов Сибирского региона.

Задачи:

1. Разработать метод анализа мутаций преждевременной терминации трансляции в гене *BRCA1* с использованием клонирования фрагментов генов *BRCA1* в единой трансляционной рамке с геном-репортером.
2. Сконструировать плазмидный вектор, позволяющий анализировать целостность рамок трансляции клонированных в нем фрагментов ДНК по простому хромогенному тесту.
3. Разработать экономичный метод анализа онкологически значимых наследственных мутаций в крупных выборках.
4. Исследовать частоты встречаемости мутаций в генах *BRCA1/2*, *BRIP1*, *BARD1* в популяции жителей г. Новосибирска среди населения в целом и среди больных РМЖ.
5. На основе данных о частотах встречаемости мутаций в генах *BRCA1/2*, *BRIP1*, *BARD1* в популяции жителей г. Новосибирска сформулировать рекомендации по анализу мутаций в этих генах для выявления группы лиц с наследственной предрасположенностью к РМЖ и раку яичников.

6. Разработать метод анализа амплификации гена *HER2/neu* с использованием ПЦР в режиме реального времени.

7. Исследовать разнообразие вариантов амплификации гена *HER2/neu* в клетках опухолей пациентов с диагнозом РМЖ.

8. Провести тонкое картирование и детальный анализ границ амплификации фрагментов ДНК вокруг гена *HER2/neu* в клетках опухолей при РМЖ.

Научная новизна

В работе впервые разработана технология анализа мутаций, приводящих к преждевременной терминации трансляции в гене *BRCAl* с использованием слитых белков. Впервые продемонстрирована возможность встройки протяженных полипептидных последовательностей в ферментативно активный белок – щелочную фосфатазу. Теоретический анализ структурной организации белковой молекулы щелочной фосфатазы с помощью методов компьютерного моделирования позволил выделить три наиболее вероятных района, инсерции чужеродных полипептидов в которые приводят к минимально возможному снижению ферментативной активности щелочной фосфатазы. Два из трех теоретически обоснованных района были использованы для встройки ряда чужеродных полипептидов в молекулу щелочной фосфатазы с использованием методов генетической инженерии.

Продemonстрирована возможность встройки ряда чужеродных полипептидов без значительного уменьшения ферментативной активности щелочной фосфатазы после Ala218 щелочной фосфатазы *E. coli*. На примере щелочной фосфатазы *E. coli* впервые показано, что теоретический анализ структурной организации белка может быть использован для выявления сайтов белка, встройка чужеродных полипептидов в которые не будет существенно сказываться на свойствах белка.

Впервые проведен анализ крупной выборки населения г. Новосибирска на наличие онкологически значимых наследственных мутаций. На примере анализа крупной выборки населения г. Новосибирска впервые получены

точные данные о встречаемости наиболее распространенных мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *BARD1*, *BRIP1* в России.

В работе впервые проведено тонкое картирование границ амплификации гена *HER2/neu* в клетках опухолей больных с диагнозом «РМЖ», впервые обнаружены структурные особенности границ амплификации фрагмента ДНК, содержащего ген *HER2/neu*. Впервые обнаружено, что границы внутривнутрихромосомной амплификации фрагментов ДНК, содержащих ген *HER2/neu*, включают сайты высокой торсионной напряженности (флексibility). Впервые сделано предположение о возможном участии сайтов высокой флексibility в инициации процесса внутривнутрихромосомной амплификации. Выявленная связь сайтов высокой флексibility с внутривнутрихромосомной амплификацией может содействовать выяснению механизмов крайне важного в канцерогенезе процесса внутривнутрихромосомной амплификации.

Практическая значимость

Разработанные методы анализа мутаций, приводящих к преждевременной терминации рамки трансляции с использованием клонирования исследуемых фрагментов ДНК, могут быть использованы как при анализе большинства мутаций в генах *BRCA1/2*, так и в молекулярной диагностике при анализе целого ряда других генов, мутации в которых приводят к преждевременной терминации трансляции. Созданная в ходе работы плаزمиды рPhoA-frame является уникальным инструментом анализа целостности рамок трансляции во фрагментах ДНК, что может быть использовано как в научно-исследовательской деятельности, так и в диагностической практике.

Продемонстрированная в ходе работы возможность теоретически выявлять районы белковой молекулы, встройка чужеродных полипептидов в которые не будет существенно сказываться на свойствах белка, может

использоваться для генно-инженерного конструирования гибридных белков с новыми свойствами.

В работе впервые получена детальная информация о распространенности онкологически значимых мутаций среди жителей г. Новосибирска. Эта информация поможет организаторам здравоохранения в планировании мероприятий по мониторингу носителей мутаций, определяющих предрасположенность к РМЖ и к раку яичников.

Разработанный метод анализа амплификации гена *HER2/neu* с использованием ПЦР в режиме реального времени может быть использован как экономичная альтернатива FISH-анализу. Полученные в работе данные по специфичным структурам ДНК на границах ампликонов, содержащих ген *HER2/neu*, могут быть использованы для поиска новых мишеней при лекарственной терапии РМЖ, ферментов, участвующих в процессах амплификации фрагментов ДНК.

Внедрение в практику

Методы анализа мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*, разработанные автором, используются практическими онкологами г. Новосибирска, Томска, Барнаула, Краснодара, Самары, Ростова для выявления носителей мутаций среди больных РМЖ. На основе разработанных методов созданы прототипы диагностических наборов для анализа мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*, наборы для анализа мутаций «Real-time PCR-BRCA1-5382insC», «Real-time PCR-BRCA1-del185AG», «Real-time PCR-BRCA1-T300G», «Real-time PCR-SNEK2-1100delC» (выпуск наборов начат компанией «Биолинк»).

Проделанная работа послужила основой для методических рекомендаций «Анализ мутаций в гене *BRCA1* среди больных с диагнозом "рак молочной железы" и "рак яичников". Специфика лечения, рекомендации по выявлению мутаций у родственников больных». Данные методические рекомендации представлены на обсуждение на XV Российском

онкологическом конгрессе (15–17 ноября 2011 г., г. Москва), приняты за основу для организации мероприятий по анализу мутаций в г. Новосибирске.

На основе данных работы в 2012 г. в Министерстве Здравоохранения Новосибирской области сформирован план мероприятий по мониторингу наследственных онкологических заболеваний. Программа развития онкологической службы на 2013–2015 гг. в Новосибирской области включает в себя разработанные в рамках исследования мероприятия.

Материалы работы используются в курсах лекций по молекулярной медицинской генетике для студентов Медицинского факультета Новосибирского государственного университета.

Апробация работы

Результаты работы были доложены на Всероссийской конференции с международным участием «Молекулярная онкология» (г. Новосибирск, 2008 г.), XI, XIV и XV Российских онкологических конгрессах (г. Москва, 2007, 2010 и 2011 г.), 3, 4, 5 и 6 конференциях по фундаментальной онкологии «Петровские чтения» (г. Санкт-Петербург, 2007–2010 гг.), IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (г. Новосибирск, 2008 г.), симпозиумах «Человек и лекарство» (г. Москва, 2012 и 2013 г.), конференции «Научно-практические аспекты модернизации онкологической службы регионального уровня» (г. Красноярск, 2012 г.), ежегодных конференциях «Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике» (г. Новосибирск, 2002–2012 гг.), 14 Европейской онкологической конференции ЕССО (г. Барселона, 2007 г.), Симпозиуме «16th International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research» (г. Коимбра, Португалия, 2010 г.), конгрессе «EPMA World Congress» (г. Бонн, Германия, 2011 г.), на Симпозиуме «In vitro Diagnostic Technologies and Industry Development Summit» (г. Шанхай, Китай, 2011 г.), конференции «Молекулярная онкология» (г. Киев, Украина, 2012 г.).

Публикации По материалам диссертации опубликовано 20 печатных работ в журналах, рекомендованных перечнем ВАК, 1 научно-методическое пособие, 11 статей в сборниках и 12 тезисов, получено 2 патента РФ.

Положения, выносимые на защиту

1. Сконструированная плаزمида pPhoA-frame позволяет с помощью простого хромогенного теста выявлять целостность рамок трансляции клонированных в этой плазмиде фрагментов ДНК. Данная плаزمида может быть использована для анализа целостности рамок трансляции во фрагментах гена *BRCA1*.
2. Разработанные методы анализа мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *BARD1* и *BRIP1* на основе аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени с использованием пулирования ДНК позволяют анализировать мутации в крупных выборках.
3. Носителями онкологически значимой мутации *BRCA1* 5382insC в г.Новосибирске являются 0,25% населения, а мутации *BRCA1* T300G – 0,05% населения. Среди больных РМЖ мутация *BRCA1* 5382insC встречается у 2,5% пациентов, а мутация *BRCA1* T300G – у 0,35% пациентов.
4. Мутации *BRCA1* 185delAG, 1675delA, 4153delA, 4184del4, *BRCA2* 6174delT в неселектированной выборки жителей г.Новосибирска встречаются крайне редко - менее, чем у 0,02% населения.
5. Разработанный метод анализа амплификации гена *HER2/neu* в клетках опухоли при РМЖ с использованием ПЦР в режиме реального времени может быть использован для детального анализа амплификации фрагментов ДНК в клетках опухоли.
6. В клетках опухолей при раке молочной железы границы амплификации фрагмента ДНК, содержащего ген *HER2/neu* варьируют, при этом в ряде случаев границы амплификации совпадают с сайтами высокой торсионной напряженности ДНК.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, выводов, списка литературы, приложения. Работа изложена на 249 страницах текста, приложение занимает 18 страниц текста, работа содержит 11 таблиц, 23 рисунка. Список литературы содержит 322 ссылки на зарубежные и отечественные работы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Разработка методов анализа мутаций, связанных с наследственными формами РМЖ

1.1. Разработка метода анализа непрерывности рамок трансляции во фрагментах ДНК с использованием клонирования исследуемых фрагментов в рамку с генами-репортерами

Многочисленные работы по секвенированию экзонов генов BRCA1/2 продемонстрировали, что не менее 80% всех обнаруженных мутаций – это мутации, приводящие к преждевременной терминации трансляции т. е. мутации сдвига рамки или нонсенс-мутации (BIC Database, <http://research.nhgri.nih.gov/projects>).

Эта информация стала отправной точкой к поиску методов, позволяющих заменить полное секвенирование другими, более простыми и экономичными технологиями выявления преждевременной терминации трансляции *BRCA1*. В частности, был разработан метод анализа Protein Truncation Assay (PTA), позволяющий по молекулярному весу белка BRCA1, синтезированного *in vitro* по матрице кДНК пациента, делать заключение о преждевременной терминации трансляции этого белка и, стало быть, о наличии мутации. Метод не получил широкого распространения из-за сложности воспроизведения и невысокой точности.

В русле поиска альтернативных методов анализа мутаций, приводящих к преждевременной термации трансляции, нами была предложена идея анализа целостности рамки трансляции клонированием исследуемого фрагмента ДНК в рамку с кодирующей частью ферментативно активного белка. Наиболее простой представлялась идея клонирования исследуемого фрагмента ДНК в рамку с α -пептидом β -галактозидазы *E. coli* в стандартных плазидах типа pUC18/19, серии pGEM или аналогичных (рисунок 1).

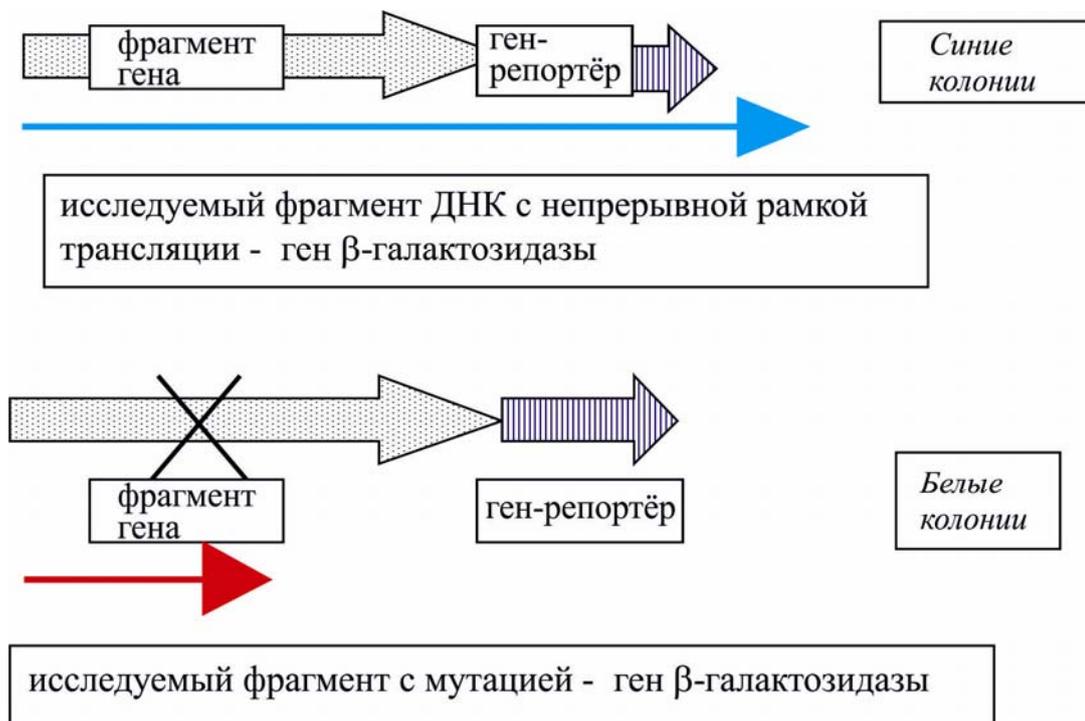


Рисунок 1. Схема анализа мутаций, приводящих к преждевременной термации трансляции с использованием клонирования исследуемого фрагмента ДНК в рамку с геном-репортером

В соответствии с этой идеей при трансформации клеток *E. coli* LacZ Δ M15 рекомбинантными плазидами, содержащими исследуемый фрагмент ДНК с нарушенной рамкой трансляции, должен был формироваться Lac⁻ фенотип, а при неизменной рамке трансляции – Lac⁺ фенотип. Фенотип колоний клеток *E. coli*, несущих соответствующие плазмиды, можно выявить на индикаторных чашках по цвету колоний.

Была проведена серия модельных экспериментов, в которых в единой трансляционной рамке с α -пептидом β -галактозидазы *E. coli*, а также с нарушением трансляционной рамки этого гена-репортера клонировали различные фрагменты экзона 11 гена *BRCAl*. При трансформации в клетки *E. coli* LacZΔM15 большая часть полученных рекомбинантных плазмид придавала этим клеткам Lac⁺ фенотип независимо от сохранения или нарушения рамки трансляции.

Проведенные эксперименты наглядно демонстрировали серьезные ограничения в традиционной процедуре селекции рекомбинантных плазмид по Lac⁺/Lac⁻ фенотипу клеток *E. coli*, в которые эти плазмиды были трансформированы. В то же время стало ясно, что клонирование фрагментов в полилинкерах стандартных плазмид не может быть использовано для анализа целостности рамки трансляции.

Для того чтобы преодолеть проблемы, связанные с ре-инициацией трансляции нами исследована возможность введения чужеродных полипептидных фрагментов в ферментативно активный белок так, чтобы ре-инициация трансляции не приводила к появлению ферментативной активности. В качестве белка-репортера была выбрана щелочная фосфатаза *E. coli*. Учитывая опыт возможной ре-инициации трансляции при клонировании чужеродных фрагментов вблизи от N-концевых последовательностей, нами предложена и исследована в эксперименте возможность инсерции чужеродных пептидов внутри молекулы щелочной фосфатазы *E. coli* таким образом, чтобы ферментативная активность можно было детектировать и после встройки протяженных полипептидов.

Работа по детальному теоретическому анализу структуры молекулы щелочной фосфатазы с точки зрения поиска сайтов возможной инсерции чужеродных пептидов была проведена А.З. Максютковым (ГЦ ВБ «Вектор»). При поиске возможных сайтов встройки чужеродных полипептидов учитывались три основных параметра: 1) расстояние от активного центра белка; 2) расстояния от сайта контакта мономеров при димеризации белка; 3)

возможное влияние на нарушение структуры белка. В результаты проделанной работы в качестве потенциальных сайтов инсерции были выбраны три петлевые структуры молекулы, достаточно далеко отстоящих от активного центра фермента: 184–188, 216–223 и 246–253.

Активность полученных вариантов щелочной фосфатазы с различными встройками чужеродных полипептидов оценивали, анализируя активность фермента в суспензии клеток *E. coli*, используя в качестве субстрата п-нитрофенилфосфат (рисунок 2).

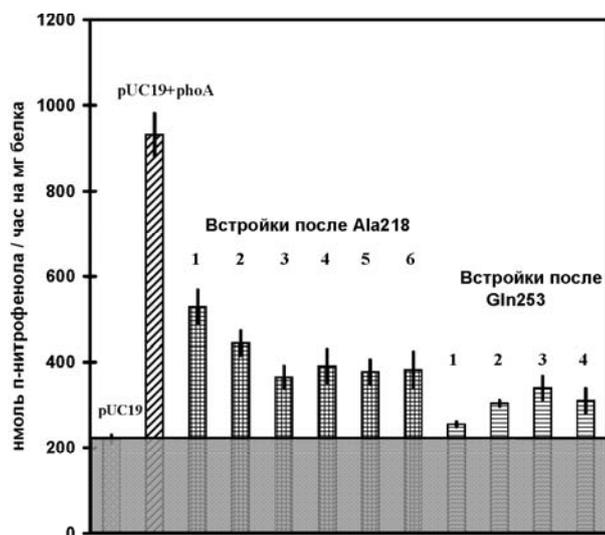


Рисунок 2. Результаты оценки активности модифицированной щелочной фосфатазы в суспензии клеток *E. coli*

Каждый столбик на диаграмме отражает активность щелочной фосфатазы (приведено среднее значение по трем измерениям) в клетках *E. coli*, несущих исходную плазмиду (pUC19 с геном щелочной фосфатазы), а также несущих плазмиду с вариантами модифицированной щелочной фосфатазы при введении инсерций после Ala218 и вариантов

модифицированной щелочной фосфатазы при введении инсерций после Gln253.

Поскольку встройки чужеродных полипептидов после Gln253 приводили к большей потере активности щелочной фосфатазы по сравнению со встройками после Ala218, все последующие эксперименты по введению тестируемых фрагментов ДНК проводились в ген щелочной фосфатазы после кодона Ala218. Для удобства дальнейшей работы была сконструирована плазмида, содержащая полилинкер внутри гена щелочной фосфатазы после кодона Ala218 (рисунок 3). Данная плазмида позволяет проводить анализ целостности рамки трансляции исследуемого фрагмента ДНК по простому хромогенному тесту.

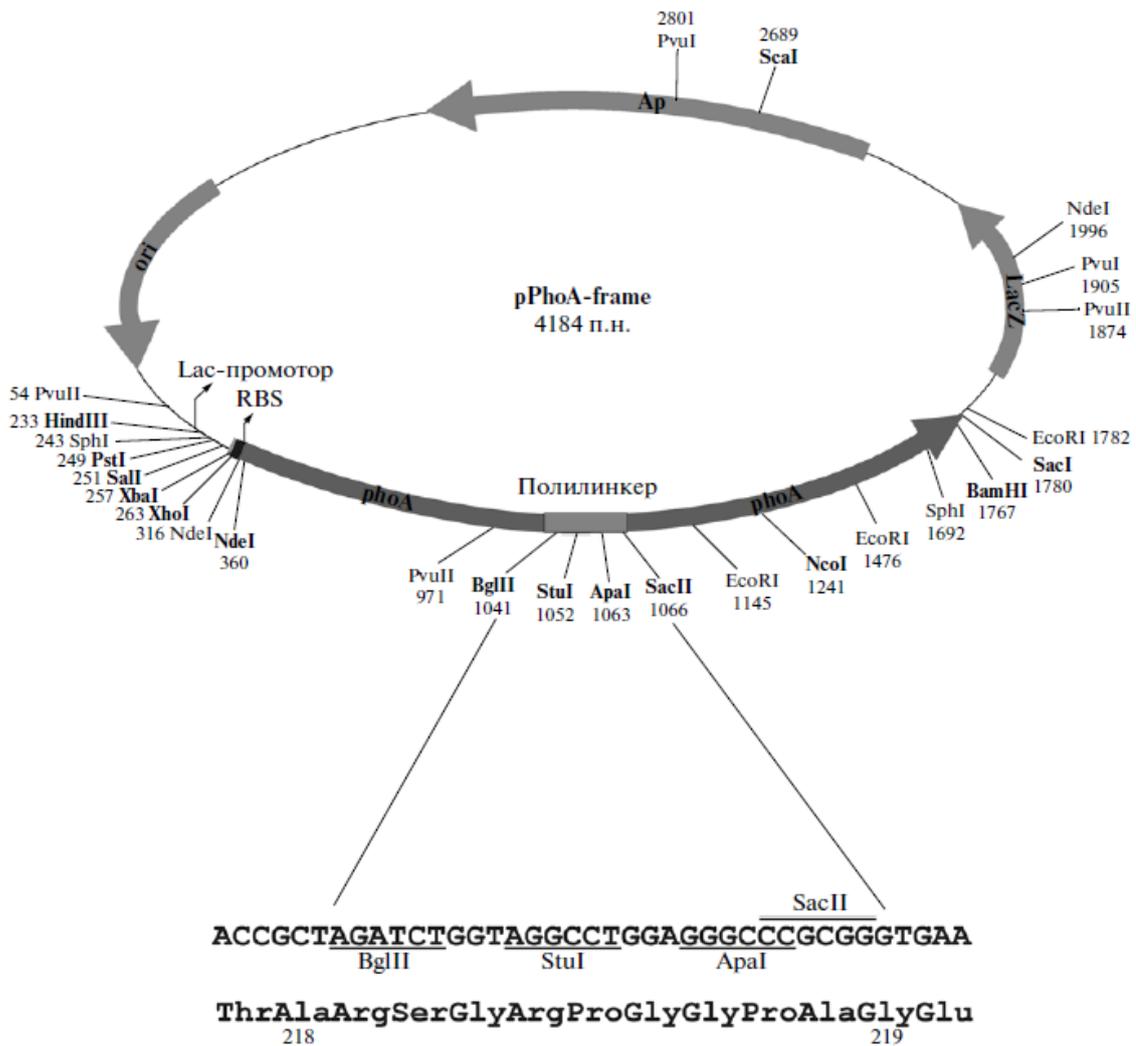


Рисунок 3. Схема плазмиды pPhoA-frame. Полужирным шрифтом выделены уникальные сайты

Xba I – Sac I фрагмент, встроенный в плазмиду pUC19 (см. рисунок 3), содержит: Nde I – Bam HI фрагмент гена *atpE* *E. coli*, включающий сайт инициации трансляции (RBS), встроенный в ген *phoA* полилинкер, содержащий сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции Bgl II, Stu I, Apa I, Sac II.

Возможность использования плазмиды pPhoA-frame для обнаружения нонсенс-мутаций и мутаций сдвига рамки проверяли в опытах по клонированию фрагментов гена *BRCA1* человека: BglIII - HpaI фрагмента экзона 11 и экзона 20 с прилегающими участками интронов. В случае фрагментов, которые не содержат мутаций, нарушающих рамку считывания, колонии трансформированных клеток были интенсивно окрашены. Стоп-кодона в фрагменте 11 и мутация сдвига рамки в экзоне 20 гена *BRCA1* (5382insC) приводили к полному отсутствию окраски клонов.

В работе показана принципиальная возможность выявления нонсенс-мутаций и мутаций сдвига рамки при помощи клонирования фрагментов гена в единой трансляционной рамке с геном *phoA E. coli* в составе плазмидного вектора pPhoA-frame. Метод выявляет как известные, так и неизвестные нонсенс-мутации и мутации сдвига рамки считывания. Использование плазмиды pPhoA-frame позволяет избежать ложноотрицательных результатов, обусловленных возможностью реинициации трансляции на участках, которые расположены после образованных в результате мутаций стоп-кодонов.

В составе плазмиды pPhoA-frame в единой трансляционной рамке с геном щелочной фосфатазы *phoA* нами были клонированы фрагменты ДНК различной длины. Было продемонстрировано, что клонирование фрагментов экзона 11 гена *BRCA1* размером до 824 пар оснований в этой плазмиде при трансформации ее в *E. coli* приводит к формированию окрашенных на соответствующем хромогенном субстрате колоний, что позволяет

анализировать такие фрагменты на целостность рамки трансляции с помощью предложенного метода.

Таким образом, в результате проделанной работы был разработан принципиально новый метод выявления целостности рамок трансляции путем клонирования исследуемого фрагмента ДНК в специально сконструированной плазмиде с последующим анализом репортерной активности фермента – щелочной фосфатазы по цвету сформировавшихся колоний прямо на чашках с соответствующей хромогенной средой.

Разработанный метод может быть применим при анализе мутаций в популяциях с большим разнообразием мутаций, большая часть из которых – мутации сдвига рамки. В то же время, согласно данным ряда лабораторий в славянских популяциях существует ярко выраженный «эффект основателя», основная мутация *BRCA1* 5382insC встречается в подавляющем большинстве случаев, несколько других мутаций присутствуют с небольшими частотами, спектр мутаций крайне ограничен [Любченко, 2009; Имянитов, 2010].

С учетом этих данных, для исследования реальной популяции нами были разработаны методы анализа ряда точковых мутаций с использованием ПЦР в режиме реального времени.

1.2. Разработка методов анализа мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *BARD1* и *BRIP1* с использованием аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени

Среди наиболее популярных подходов к дизайну аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени нами был выбран подход ПЦР с использованием «антипраймера» [Li J., 2006]. Общая схема технологии предполагает введение дополнительной последовательности на один из праймеров в аллель-специфичной реакции, эта последовательность не комплементарна ампликону или его фрагменту. «Дополнительная» последовательность содержит флюорофор.

Отдельно синтезируется олигонуклеотид, полностью комплементарный этой «дополнительной» последовательности, олигонуклеотид содержит тушитель флюоресценции. Таким образом, до реакции ПЦР сигнал отсутствует, поскольку флюорофор и тушитель пространственно сближены, а при проведении ПЦР олигонуклеотид, содержащий тушитель, вытесняется Taq ДНК-полимеразой, возникает флюоресценция, детектируемая прибором.

Такой подход максимально экономичен, так как в каждой реакции используются олигонуклеотиды с единственной модификацией каждый, один из олигонуклеотидов может быть общим для многих реакций. В то же время эта технология позволяет уверенно дискриминировать аллельные варианты при точковых заменах, микроделециях, инсерциях.

С использованием упомянутого подхода были разработаны методы анализа следующих мутаций: в гене *BRCA1* – 185delAG, T300G, 1675delA, 4153delA, 4184del4, 5382insC, в гене *BRCA2* – 6174delT, в гене *BRIP1* – C2392CT, в гене *BARD1* – G1743C, T2006C, G2355A.

В большинстве случаев корректность разработанных методов подтверждена прямым секвенированием соответствующих фрагментов генов. Было показано, что разработанные методы могут быть использованы как при выявлении мутаций в отдельных образцах, так и при анализе пулированных образцов (до 20 образцов в пуле).

2. РАЗРАБОТКА МЕТОДА АНАЛИЗА АМПЛИФИКАЦИИ ГЕНА *HER2/neu* В КЛЕТКАХ ОПУХОЛИ ПРИ РМЖ

Существующая технология анализа гиперэкспрессии *HER2/neu* предполагает иммуногистохимический анализ с последующим уточнением результатов с помощью FISH-анализа. При проведении FISH-анализа исследуют дозу гена *HER2/neu*, однако исследование дозы гена вполне осуществимо и с использованием ПЦР в режиме реального времени.

С использованием технологии TaqMan разработаны методы, позволяющие выявлять амплификацию гена *HER2/neu* в образцах, полученных при операциях или при биопсиях при РМЖ. Кроме того, были разработаны методы, позволяющие проанализировать копийность фрагментов, окружающих *HER2/neu* ген. Вполне возможно, что амплификация окружающих генов существенна в определении специфики протекания опухолевого процесса и в выборе наиболее эффективного лечения для пациенток.

3. АНАЛИЗ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ *BRC A1*, *BRC A2*, *BARD1* И *BRIP1* СРЕДИ ЖИТЕЛЕЙ г. НОВОСИБИРСКА И СРЕДИ БОЛЬНЫХ С ДИАГНОЗОМ «РМЖ»

Для большинства мутаций, связанных с формированием наследственной предрасположенности к РМЖ, даже существующие в мире оценки частот распространенности мутаций крайне приблизительны. Отчасти это связано с отсутствием методов, позволяющих анализировать большие массивы образцов на наличие мутаций, отчасти – с трудоемкостью подобного исследования. Использование ПЦР в режиме реального времени позволяет значительно сократить трудозатраты по анализу, получить данные по встречаемости мутаций с исследованием достаточно крупных выборок.

Нами была исследована выборка образцов ДНК 7920 жителей г. Новосибирска, из коллекции образцов ДНК, собранной в НИИ терапии СО РАМН и предоставленной для исследования доктором медицинских наук М.И. Воеводой. Анализ проводился с использованием пулирования ДНК (16 образцов в одном пуле). В случае выявления мутации в пуле проводился анализ индивидуальных образцов ДНК с последующим подтверждением наличия мутации прямым секвенированием соответствующих фрагментов ДНК. Во всех случаях секвенирование и аллель-специфичная ПЦР давали полностью совпадающие результаты.

Для анализа частот встречаемости мутаций среди больных РМЖ исследовали встречаемость мутаций среди пациентов онкологического отделения Новосибирской муниципальной больницы № 1 и Кемеровского областного онкологического диспансера. Проанализировано 570 образцов ДНК.

Для анализа были выбраны 6 мутаций в генах *BRCA1* (5382insC, 185delAG, 300T→G, 1675delA, 4153delA, 4184del4), одна мутация в гене *BRCA2* (6174delT), а также 1 мутация (2392C→T) в гене *BRIP1* и 1 мутация в гене *BARD1* (1743G→C). Связь мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2* выявлена в многочисленных исследованиях, выбранные мутации в этих генах являются самыми частыми в Российской популяции по данным ряда авторов [Любченко, 2009; Имянитов, 2010].

Таблица 1. Встречаемость мутаций среди жителей г. Новосибирска и среди больных с диагнозом «РМЖ» из клиник г. Новосибирска и г. Кемерово

Мутация	Жители г. Новосибирска (n = 7920)		Больные РМЖ Сибирского региона (n = 570)	
	Количество выявленных носителей мутации	Частота встречаемости мутации, %	Количество выявленных носителей мутации	Частота встречаемости мутации, %
BRCA1 5382insC	20	0,25	14	2,46
BRCA1 C61G	4	0,05	2	0,35
BRCA1 185delAG	0	≤0,01	1	0,18
BRCA1 4153delA	0	≤0,01	1	0,18
BRCA2 6174delT	0	≤0,01	0	≤0,18
BARD1 G1743C	313	3,95	25	4,43
BRIP1 C2392T	3	0,04	0	≤0,18

Из таблицы 1 видно, что частоты встречаемости исследованных мутаций в генах *BARD1* и *BRIP1* существенно не отличаются в общей популяции и среди больных РМЖ. Как и ожидалось, значительные различия в частотах встречаемости мутаций в общей популяции и среди больных РМЖ обнаружены для мутаций в гене *BRCA1*. Стоит отметить, что среди мутаций, связанных с формированием РМЖ в обследованной выборке были выявлены лишь 2 мутации: *BRCA1* 5382insC, *BRCA1* 300T→G. Частоты встречаемости других мутаций (из изученных в данном исследовании), связанных с формированием наследственных форм РМЖ в данной выборке меньше 0,01%.

Исходя из этих данных вполне обоснована рекомендация ограничиться анализом лишь двух мутаций (*BRCA1* 5382insC, *BRCA1* 300T→G) при анализе предрасположенности к РМЖ у жителей г. Новосибирска без семейной истории онкологических заболеваний. Выявление других мутаций у пациентов без семейной истории крайне маловероятно (вероятность меньше, чем 1:5000), при настоятельном желании пациентов провести подробный анализ и при отсутствии мутаций *BRCA1* 5382insC, *BRCA1* 300T→G более правомерным будет полное секвенирование кодирующих частей генов *BRCA1/2*.

Встречаемость мутаций *BRCA1* 5382insC среди больных РМЖ без семейной истории достаточно высока (почти 3%), что делает обоснованным организацию скрининга всех больных с диагнозом «РМЖ» как минимум на наличие мутации *BRCA1* 5382insC. Подобный скрининг будет достаточно эффективной мерой в плане выявления носителей мутаций среди больных и среди родственников уже заболевших носителей мутаций.

4. АНАЛИЗ АМПЛИФИКАЦИИ ФРАГМЕНТОВ ДНК, ОКРУЖАЮЩИХ ГЕН *HER2/neu* В КЛЕТКАХ ОПУХОЛЕЙ У БОЛЬНЫХ РМЖ

Анализ гиперэкспрессии рецептора *HER2/neu* в клетках опухоли при РМЖ стал стандартной процедурой для определения стратегии лечения больного. Гиперэкспрессия *HER2/neu*, как правило, определяется с помощью иммуногистохимического анализа гистологических срезов опухоли. В то же время оценки экспрессии 2+ (а иногда и 3+) рекомендовано перепроверять с помощью FISH-анализа, позволяющего выявить амплификацию гена *HER2/neu*. В многочисленных исследованиях было продемонстрировано, что именно амплификация гена *HER2/neu* – первопричина гиперэкспрессии рецептора на поверхности клеток опухоли.

FISH-анализ доступен далеко не в каждой лаборатории России, он достаточно дорог, требует квалифицированных кадров, высокоспециализированного дорогостоящего оборудования. Нами была предложена альтернатива FISH-анализу для определения амплификации гена *HER2/neu* – анализ дозы гена *HER2/neu* с помощью ПЦР в режиме реального времени. В отличие от FISH-анализа ПЦР в режиме реального времени позволяет анализировать копийность не только гена *HER2/neu*, но и окружающих генов. Вполне возможно, что разные варианты амплификации определяют разный прогноз течения заболевания, различную чувствительность к лекарственным препаратам. Так, находящийся вблизи от *HER2/neu* ген *TOPO2* кодирует топоизомеразу, поэтому есть основания предполагать, что амплификация гена топоизомеразы будет связана с устойчивостью к ингибиторам топоизомеразы II (Доксорубин, Этопозид, и др.).

В настоящем исследовании изменение дозы генов в клетках опухолей было исследовано в районе 1 Мб, содержащем ген *HER2/neu*. Исследуемый район (17q12-q21) представлен на рисунке 4.

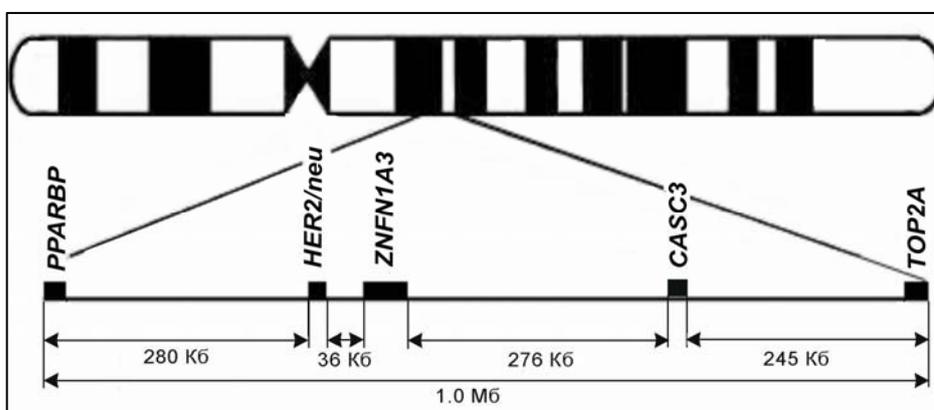


Рисунок 4. Локализация генов, выбранных для анализа копийности в клетках опухолей пациентов с РМЖ. Все гены находятся вблизи гена *HER2/neu* в районе 17q12-q21.

Материалом для настоящего исследования служили образцы опухолей РМЖ, полученные при операциях. Исходно было исследовано 154 образца, во всех образцах был проведен анализ копийности гена *HER2/neu* с использованием ПЦР в режиме реального времени, результаты нормировали к гену убиквитина.

Аналогично исследовали амплификацию других генов в районе 17q12-q21. В результате анализа в 56 образцах из 154 (36%) было обнаружено увеличение дозы гена *HER2/neu*. Анализ амплификации генов, прилежащих к *HER2/neu* выявил целый ряд вариантов генетических перестроек, сопровождающих увеличение копийности *HER2/neu* (рисунок 5).

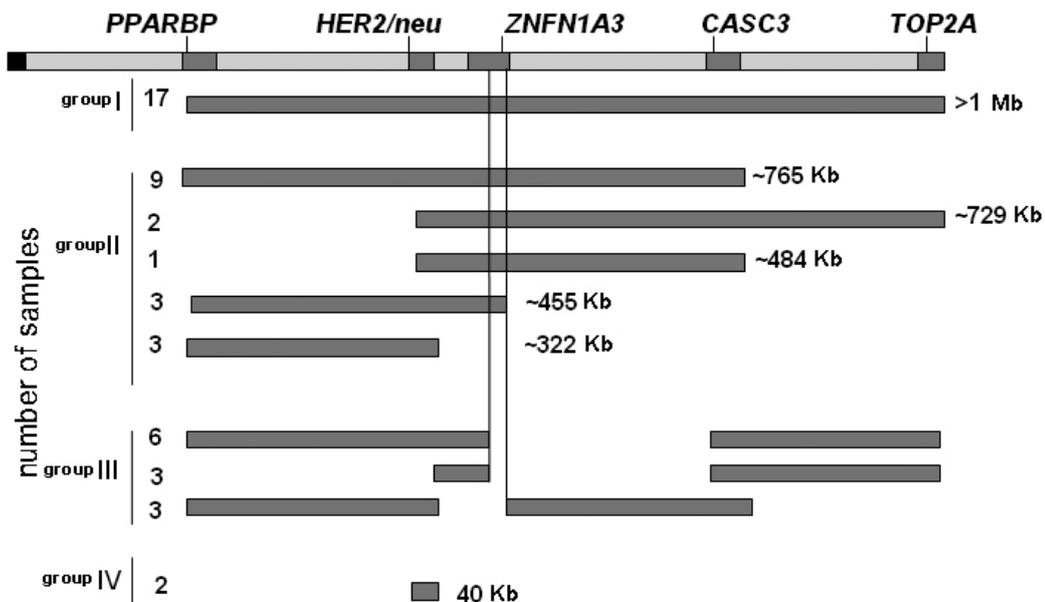


Рисунок 5. Различные варианты амплификации фрагментов ДНК в районе 17q12-q21 при амплификации гена *HER2/neu*

В верхней части рисунка 5 приведена карта проанализированного района, прямоугольные сегменты обозначают амплифицированные районы, слева указано количество образцов с каждым конкретным вариантом амплификации. Выделено 4 группы: 1 – амплифицированы все исследованные гены, 2 – несколько прилежащих к *HER2/neu* генов амплифицировано, 3 – амплифицированные фрагменты чередуются с неамплифицированными, 4 – амплифицирован только ген *HER2/neu*.

Среди выявленных вариантов генетических перестроек в 17 случаях (35%) амплифицирован был район крупнее изучаемого, вполне возможно, что эти случаи связаны с соматической анеуплоидией. В 15 случаях выявленная граница амплификации находилась в районе гена *ZNFN1A3*. С целью определить более точные границы амплификации проведен анализ дозы гена в этих 15 образцах непосредственно на границе амплифицированного фрагмента. В результате было обнаружено, что среди 15 образцов 6 образцов имеют границу внутри гена *ZNFN1A3* дистально от центromеры, 9 образцов – проксимально по отношению к центromере (рисунок 6).

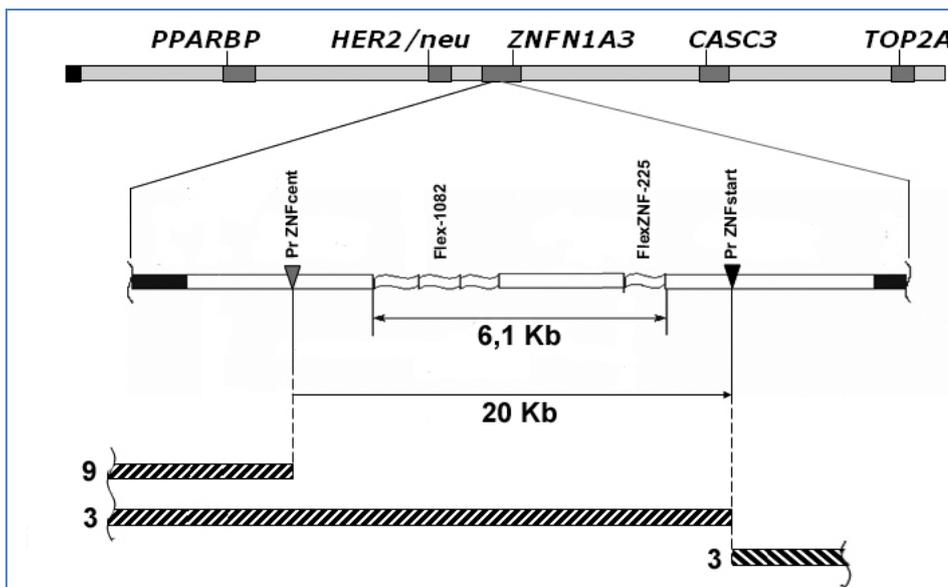


Рисунок 6. Анализ амплификации фрагментов ДНК внутри *ZNFN1A3* гена в режиме реального времени: сверху – карта района (заштрихованы

амплифицированные районы); слева от схем ампликонов – количество образцов с данным типом амплификации

Детальный анализ последовательности ДНК в исследуемом районе не выявил каких-либо специфических последовательностей, которые могли бы быть отнесены к «сайтам на границах амплификации». В то же время при анализе флексибельности (торсионной напряженности) ДНК в районе 1,7 Мб оказалось, что именно в районе гена *ZNFN1A3* находятся несколько пиков торсионной напряженности (флексибельности) ДНК (рисунок 7).

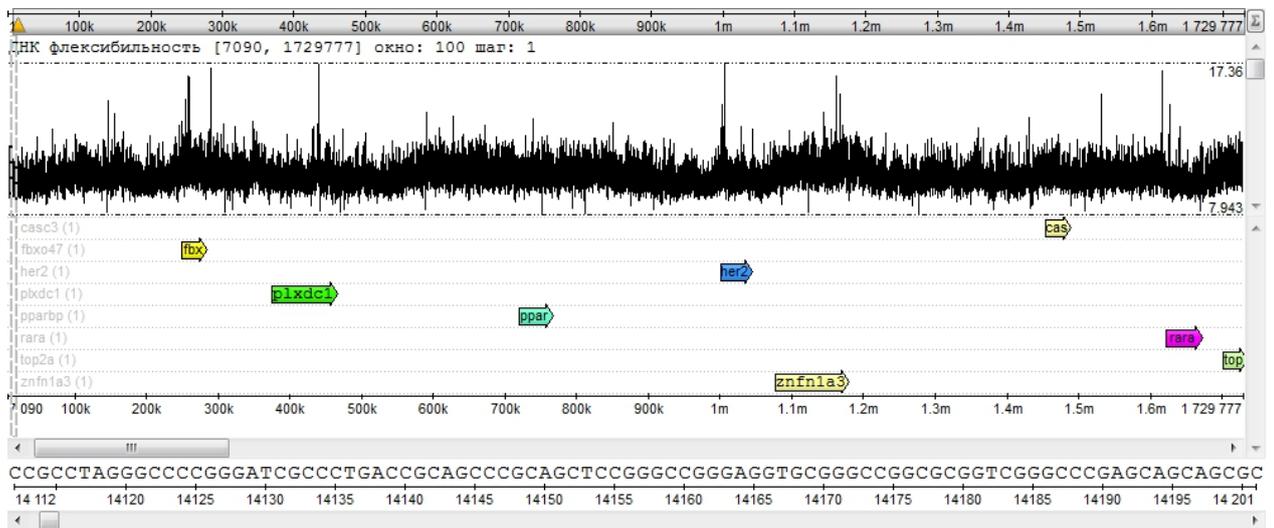


Рисунок 7. Диаграмма распределения сайтов флексибельности (торсионной напряженности) на участке 1,7 Мб, содержащем ген *HER2/neu*

Как видно на рисунке 7, ближайшие к *HER2/neu* гену пики флексибельности находятся непосредственно внутри *HER2/neu* гена и внутри прилежащего *ZNFN1A3* гена.

Выявленный в результате ПЦР-анализа границ амплификации район ДНК совпадал с районом высокой флексибельности внутри гена *ZNFN1A3*. Таким образом, в ходе данной работы был впервые выявлена закономерность формирования ампликонов в ходе внутривнутрихромосомной амплификации в соматических клетках. Судя по полученным в работе данным, как минимум в ряде случаев своеобразным «стартом» амплификации фрагментов ДНК могут служить точки высокой торсионной напряженности ДНК.

Для начала процессов амплификации ДНК необходимы разрывы, они более вероятны именно в районах ДНК с выраженной вторичной структурой, с высокой торсионной напряженностью. Хорошо известны Fga-сайты хромосом, где в специфических условиях происходят разрывы хромосом. Торсионная напряженность именно Fga сайтов максимальна в геноме. Вполне логично предположить, что сайты с меньшей, но все-таки достаточно выраженной торсионной напряженностью могут служить инициаторными сайтами для внутривнутрихромосомной амплификации. Учитывая, что внутривнутрихромосомная амплификация – крайне значимое в молекулярном карциногенезе событие, вполне возможно, что нацеленность именно на сайты, где проходит инициация амплификации (или на белки, связывающиеся с такими сайтами), позволит развить новое направление в создании противораковых препаратов завтрашнего дня.

ВЫВОДЫ

1. С помощью компьютерного моделирования петель молекулы щелочной фосфатазы *E.coli* предсказана и затем экспериментально подтверждена возможность встройки протяженных полипептидных последовательностей в петли щелочной фосфатазы, дистанцированные от активного центра фермента, с сохранением активности этого фермента. С использованием технологии встройки протяженных полипептидных последовательностей в петли щелочной фосфатазы в работе впервые разработан метод анализа мутаций, приводящих к преждевременной терминации трансляции;
2. При встройке чужеродных полипептидов в полипептидную цепь щелочной фосфатазы *E.coli* после позиции Ala218 щелочной фосфатазы активность фермента уменьшается, но вполне достаточна для регистрации ферментативной активности в составе анализируемого химерного полипептида.

3. Сконструирована оригинальная плаزمида pPhoA-frame, позволяющая с помощью простого хромогенного теста выявлять целостность рамок трансляции клонированных в этой плазмиде фрагментов ДНК. Данная плаزمида может быть использована для анализа целостности рамок трансляции во фрагментах гена *BRCA1*.
4. Впервые разработан метод выявления мутаций, приводящих к преждевременной терминации трансляции, основанный на клонировании исследуемых фрагментов ДНК внутри гена щелочной фосфатазы *E. coli*, экспрессируемого в составе сконструированного вектора pPhoA-frame. Метод может быть использован для анализа целостности рамки трансляции фрагментов гена *BRCA1* человека.
5. Разработаны методы анализа мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *BARD1* и *BRIP1* на основе аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени с использованием пулирования ДНК. Показана возможность анализа мутаций в крупных выборках с помощью разработанных методов.
6. Проведен анализ частот встречаемости мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *BARD1* и *BRIP1* среди жителей г. Новосибирска. Проведен анализ 7920 образцов ДНК жителей г. Новосибирска на наличие мутаций, связанных с формированием наследственных форм РМЖ и рака яичников. Выявлено, что среди исследованных мутаций только две мутации, связанные с формированием наследственных форм РМЖ, в г. Новосибирске встречаются чаще, чем 1:5000, а именно: *BRCA1* 5382 insC – с частотой 1:400 (0.25%), *BRCA1* T300G – с частотой 1:2000 (0.05%). Мутации *BRCA1* 185delAG, 1675delA, 4153delA, 4184del4, *BRCA2* 6174delT в исследованной выборке не были обнаружены.
7. Однонуклеотидные полиморфизмы в гене *BRIP1* – C2392C, и в гене *BARD1* – G1743C не связаны с формированием наследственных форм РМЖ.
8. Разработан метод анализа амплификации гена *HER2/neu* в клетках опухоли при РМЖ с использованием ПЦР в режиме реального времени.

Продемонстрирована возможность применения метода для детального анализа амплификации фрагментов ДНК в клетках опухоли.

9. Впервые проведено тонкое картирование границ ампликонов при увеличении дозы гена *HER2/neu* в клетках опухоли при РМЖ. Обнаружено, что существует широкий спектр вариантов генетических перестроек с вовлечением гена *HER2/neu*. Среди 56 образцов с увеличенной дозой гена *HER2/neu* было обнаружено 10 вариантов перестроек, включающих гены *PPARBP*, *ZNFN1A3*, *CASC3*, *TOPO2A*. В 15 вариантах перестроек границы амплификации были картированы внутри гена *ZNFN1A3*.
10. С помощью компьютерного анализа последовательности ДНК, окружающей ген *HER2/neu*, выявлены районы высокой торсионной напряженности в гене *HER2/neu* и в гене *ZNFN1A3*. Впервые продемонстрировано, что границы амплификации фрагмента ДНК, содержащего ген *HER2/neu* совпадают с сайтами высокой торсионной напряженности ДНК. Сделано предположение об участии сайтов высокой торсионной напряженности в инициации процесса внутривитриальной амплификации ДНК.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в журналах

1. Gutkina NI, Varlakhanova NV, Lysova MV, **Kovalenko SP** Limitations on the recombinant plasmid selection by Lac⁺/Lac⁻ colony phenotype detection // Biochemical and Biophysical Research communications – 2002. - V.298 - P.37-40.
2. Anisimenko MS, Mitrofanov DV, Chasovnikova OB, Voevoda MI, **Kovalenko SP**. BRCA1 gene mutations frequency estimation by allele-specific real-time PCR of pooled genomic DNA samples // Breast. – 2013. – V. 22 (4). – P. 532–536.
3. Sokolenko AP, Voskresenskiy DA, Iyevleva AG, Bit-Sava EM, Gutkina NI, Anisimenko MS, **Kovalenko SP**, Sherina NYu, Mitiushkina NV, Ulibina YuM, Yatsuk OS, Zaiteseva OA, Suspitsin EN, Togo AV, Semiglazov VF,

- Imyanitov EN. Large family with both parents affected by distinct BRCA1 mutations: implications for genetic testing // Human Hereditary cancer in Clinical Practice – 2009. - V. 7 (2) – P.1 -4.
4. Iyevleva AG, Suspitsin EN, Kroeze K, Gorodnova TV, Sokolenko AP, Buslov KG, Voskresenskiy DA, Togo AV, **Kovalenko SP**, Stoep NV, Devilee P, Imyanitov EN. Non-founder BRCA1 mutations in Russian breast cancer patients// Cancer Letters – 2010. - V. 298(2) - P.258-263.
 5. Гуткина Н.И., Гайдамакова Е.К., Варлаханова Н.В., **Коваленко С.П.** Возможность использования слитых белков для детекции мутаций сдвига рамки в гене BRCA1 // Молекулярная генетика, микробиология, вирусология – 2002. - Т.1 - С.31-36.
 6. В.В. Ляхович, В.А. Вавилин, А.Ю. Гришанова, Л.Ф. Гуляева, **Коваленко С.П.** Геномная медицина и новые подходы к диагностике и лечению онкозаболеваний // Бюллетень Сибирского отделения РАМН - 2004. - № 2. – С. 20-26.
 7. Ляхович В.В., Вавилин В.А., Гришанова А.Ю., Макарова С.И., **Коваленко С.П.** Фармакогенетика и современная медицина // Вестник РАМН. – 2004. - № 10. – С. 40-45.
 8. Васильева С.В., Красноусова Е.Е., Донина А.А., Абрамова Т.В., Жданова Л.Г., **Коваленко С.П.**, Сильников В.Н. Синтез флюоресцентно меченных олигонуклеотидов, несущих метку в положении 2 модифицированных аденозина и арабиноаденозина // Известия Российской Академии Наук, серия химическая – 2006. - №9. - С. 1618 – 1624.
 9. Маценко Н.Ю., **Коваленко С.П.** Анализ дозы гена her2 методом ПЦР с использованием внутреннего стандарта в образцах ткани опухоли молочной железы человека // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология – 2006. - №1 - С.34-38.
 10. Маценко Н.Ю., Рыжикова В.С., **Коваленко С.П.** Сравнение SYBR Green I и TaqMan форматов ПЦР в реальном времени для анализа дозы гена her2 в опухолях молочной железы человека // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2008. - Т. 145, №2 - С. 201-205.
 11. Митрофанов Д.В., Часовникова О.Б., Королева Л.С., Сильников В.Н., Жданова Л.Г., **Коваленко С.П.** Оценка частоты встречаемости мутации 735G→A в сайте сплайсинга интрона 14 гена

- дигидропиримидиндегидрогеназы (DPYD) с помощью флуоресцентно-меченных олигонуклеотидов среди жителей Новосибирской области // Генетика – 2008. – Т. 44, №12. - С. 1-8.
12. Часовникова О.Б., **Коваленко С.П.**, Митрофанов Д.В., Маценко Н.Ю., Сидоров С.В., Францкевич О.З., Ляхович В.В. Молекулярно-генетический анализ как инструмент современной онкологии // Бюллетень Сибирского отделения РАМН – 2008. - №4 (132). - С. 29-35.
 13. Соколенко А.П., Розанов М.Е., Митюшкина Н.В., Шерина Н.Ю., Иевлева А.Г., Чекмарева Е.В., Буслов К.Г., Шилов Е.С., Того А.В., Бит-Сава Е.М., Воскресенский Д.А., Чагунава О.Л., **Коваленко С.П.**, Трофимов Д.Ю., Devilee P., Cornelisse C., Семиглазов В.Ф., Имянитов Е.Н. Наследственные мутации при ранних, семейных и билатеральных формах рака молочной железы у пациенток из России // Сибирский онкологический журнал – 2008. - №3, С. 43- 49.
 14. Митрофанов Д.В., Часовникова О.Б., **Коваленко С.П.**, Ляхович В.В. Метод выявления мутации 5382insC в гене *BRCA1* человека с помощью флуоресцентно меченных олигонуклеотидов // Молекулярная биология – 2009. - Т. 43, №6. - С. 999- 1005.
 15. Часовникова О.Б., Митрофанов Д.В., **Коваленко С.П.**, Демченко Д.О., Сидоров С.В., Францкевич О.З. Анализ встречаемости девяти мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* у больных раком молочной железы в Сибирском регионе // Сибирский онкологический журнал - 2010. - №5 (41). - С. 31-35.
 16. Коростышевская А.М., **Коваленко С.П.**, Гуляева Л.Ф. Возможности магнитно-резонансной томографии в наблюдении за носителями BRCA мутаций и диагностике рака молочной железы // Сибирский онкологический журнал - 2011. - №3 (45) - С. 58-63.
 17. Максютлов А.З., Бакулина А.Ю., Гуткина Н.И., **Коваленко С.П.** Введение чужеродных пептидов в поверхностные петли щелочной фосфатазы // Молекулярная биология – 2012. - Т.46 №2. - С. 1-9.
 18. Гуткина Н. И., Богачев В. В., **Коваленко С.П.** Выявление нонсенс мутаций и мутаций сдвига рамки считывания в гене *BRCA1* с использованием нового плазмидного вектора pPhoA frame // Молекулярная биология – 2012. - Т.46, №4. - С. 1-7.
 19. Часовникова О. Б., Митрофанов Д. В., Анисименко М. С., Воевода М. И., **Коваленко С.П.**, Ляхович В. В. Анализ распространенности мутаций

BRCA1 5382insC и CHEK2 1100delC у жителей сибирского региона // Генетика – 2012. - Т. 48, № 6 - С. 768 – 772.

20. Маценко Н. Ю., **Коваленко С.П.** Структурные особенности ДНК на границах ампликонов при амплификации гена *ERBB2* в клетках опухоли рака молочной железы // Молекулярная биология – 2013.- Т.47, №5. - С.818-827.

Статьи в сборниках

1. **Коваленко С.П.**, Масленников А.Б. Наследственные формы рака молочной железы // Актуальные вопросы современной медицины: Сб. научн. трудов – Новосибирск. – 2001. - С. 43-44.
2. **Коваленко С.П.** Молекулярно-биологические подходы в диагностике и лечении рака молочной железы Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике: Сб. научн. трудов – Новосибирск. – 2002. - С. 53-58.
3. **Коваленко С.П.** Персонализированный подбор лекарственных препаратов при онкологических заболеваниях Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике: Сб. научн. трудов – Новосибирск. – 2003. - С. 158-165.
4. **Коваленко С.П.** Молекулярно-биологические технологии в современной онкологии Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике: Сб. научн. трудов – Новосибирск. – 2006. - С. 24-28.
5. Маценко Н.Ю. , **Коваленко С.П.** Амплификация фрагментов, содержащих ген *HER2/neu* при раке молочной железы. Сб. трудов конференции с международным участием «Молекулярная онкология». – Новосибирск. – 2008. - С. 44-45.
6. Анисименко М.С., Митрофанов Д.В., Воевода М.И., Максимов В.Н., Ромащенко А.Г., **Коваленко С.П.** Анализ встречаемости мутаций 735 G/A гена *DPYD* человека методом ПЦР в реальном времени на пулированной ДНК Сб. трудов конференции с международным участием «Молекулярная онкология». – Новосибирск. – 2008. - С. 69-70.
7. Часовникова О.Б., Митрофанов Д.В., Сидоров С.В., Францкевич О.З., Демченко Д.О., **Коваленко С.П.** Анализ встречаемости девяти основных мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* у больных раком молочной железы Сб. трудов конференции с международным участием «Молекулярная онкология». Новосибирск. – 2008. - С. 116-117.
8. Гуткина Н.И. Богачев В.В., **Коваленко С.П.** Возможность использования слитых белков для анализ непрерывности рамок

- трансляции во фрагментах гена *brca1*. Сб. трудов конференции с международным участием «Молекулярная онкология». Новосибирск. – 2008. - С. 114-115.
9. Митрофанов Д.В, Часовникова О.Б., **Коваленко С.П.** Выявление мутации 5382insC гена *BRCA1* помощью анализа флюоресценции в конечной точке ПЦР Сб. трудов. конференции с международным участием «Молекулярная онкология». – Новосибирск.- 2008.- С. 138-139.
 10. Маценко Н.Ю., **Коваленко С.П.** Полиморфизм длин фрагмента хромосомы 17 в районе сайта высокой флексибельности ДНК на границе ампликонов, включающих ген *HER2/neu*, при раке молочной железы Сб. трудов. конференции с международным участием «Молекулярная онкология». – Новосибирск. – 2008. - С. 132-133.
 11. Анисименко М.С. , Часовникова О.Б. , Митрофанов Д.В. , **Коваленко С.П.**, Францкевич О.З. , Демченко Д.О. , Чердынцева Н.В. , Ляхович В.В. Распространенность онкологически значимых мутаций среди жителей г.Новосибирска Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике: Сб. научн. трудов – Новосибирск. – 2010. - С. 143-149.

Учебно-методические пособия

1. Маценко Н.Ю., **Коваленко С.П.** Гиперэкспрессия онкогена *HER2/neu* в опухолевых клетках - молекулярные механизмы, технологии анализа, прогностическая значимость. Учебно-методическое пособие 48 стр., Изд. РИЦ НГУ, Новосибирск, 2006.

Тезисы конференций

1. **Коваленко С.П.**, Маценко Н.Ю. Анализ дозы гена *her2* методом ПЦР с использованием внутреннего стандарта в образцах ткани опухоли молочной железы человека // Тезисы докл. VIII Российского онкологического конгресса, Москва. – 2004. - С. 198.
2. **Коваленко С.П.**, Маценко Н.Ю. Анализ границ амплификации района, содержащего ген *ERBB2*, при раке молочной железы // Вопросы онкологии. – 2006. - Т. 52, № 1. – С. 23.
3. Matsenko N.Yu., **Kovalenko S.P.** Possible participation of fragile sites in *her2/neu* gene amplification on 17q12-21 chromosome in breast cancer // European Journal of Cancer. – 2007. - Vol.5, No 4, Supplement. - P.102.
4. Маценко Н.Ю., **Коваленко С.П.** Анализ участия фрагильных сайтов в перестройках хромосомы 17, ведущих к амплификации гена *HER2/neu*

- при раке молочной железы // Вопросы онкологии. – 2007. - Т. 53, №1. - С. 19.
5. Маценко Н.Ю., **Коваленко С.П.** Анализ хромосомных перестроек, приводящих к гиперэкспрессии онкогена HER2/neu при раке молочной железы // Тезисы докл. XI Российского онкологического конгресса. - Москва. – 2007. - С. 58.
 6. **Коваленко С.П.**, Гуткина Н.И., Богачев В.В., Бакулина А.Ю., Максютков А.З. Рациональный дизайн при встройке чужеродных полипептидов в щелочную фосфатазу E.coli // Тезисы докл. IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. – Новосибирск. – 2008. - С. 384.
 7. Гуткина Н.И. , **Коваленко С.П.** Анализ непрерывности рамок трансляции во фрагментах гена brcal с помощью конструирования рекомбинантных плазмид // Вопросы онкологии. – 2008. – Т. 54 (1). – С. 27.
 8. Анисименко М.С., Митрофанов Д.В., **Коваленко С.П.** Использование пулированной ДНК для определения частот встречаемости онкологически значимых мутаций среди жителей г.Новосибирска // Сибирский онкологический журнал. 2009. - № 2. - С. 14.
 9. Анисименко М.С., Митрофанов Д.В., **Коваленко С.П.** Использование пулированной ДНК для определения встречаемости онкологически значимых мутаций // Вопросы онкологии. – 2009. - Т. 55, №2. - С. 3.
 10. Маценко Н.Ю., **Коваленко С.П.** Полиморфизм длин фрагментов ДНК на границе HER2/neu ампликона // Вопросы онкологии. – 2009. -Т. 55, №2. - С. 26.
 11. Маценко Н.Ю., **Коваленко С.П.** Необычная структура ДНК на границе HER2/neu ампликона // Сибирский онкологический журнал. - 2009, приложение №2. - С. 134.
 12. Matsenko N., **Kovalenko S.P.** Prediction and prognostic value of gene amplification in breast cancer cells // 2011 In vitro Diagnostic Technologies and Industry Development Summit Proceedings, June 18-20. - Shanghai, China. – 2011. – P. 34.

Патенты

1. Патент 2506315 РФ. Плазмидный вектор и способ выявления нонсенс-мутаций и мутаций сдвига рамки считывания в гене Brcal/ Н.И. Гуткина, **С.П. Коваленко**// Бюлл. – 2014. - №4.
2. Патент 2473700 РФ. Способ выявления мутаций Brcal 5382insC и Snek2 1100delC / Анисименко М.С., **Коваленко С.П.** // Бюлл. – 2013. - №3

