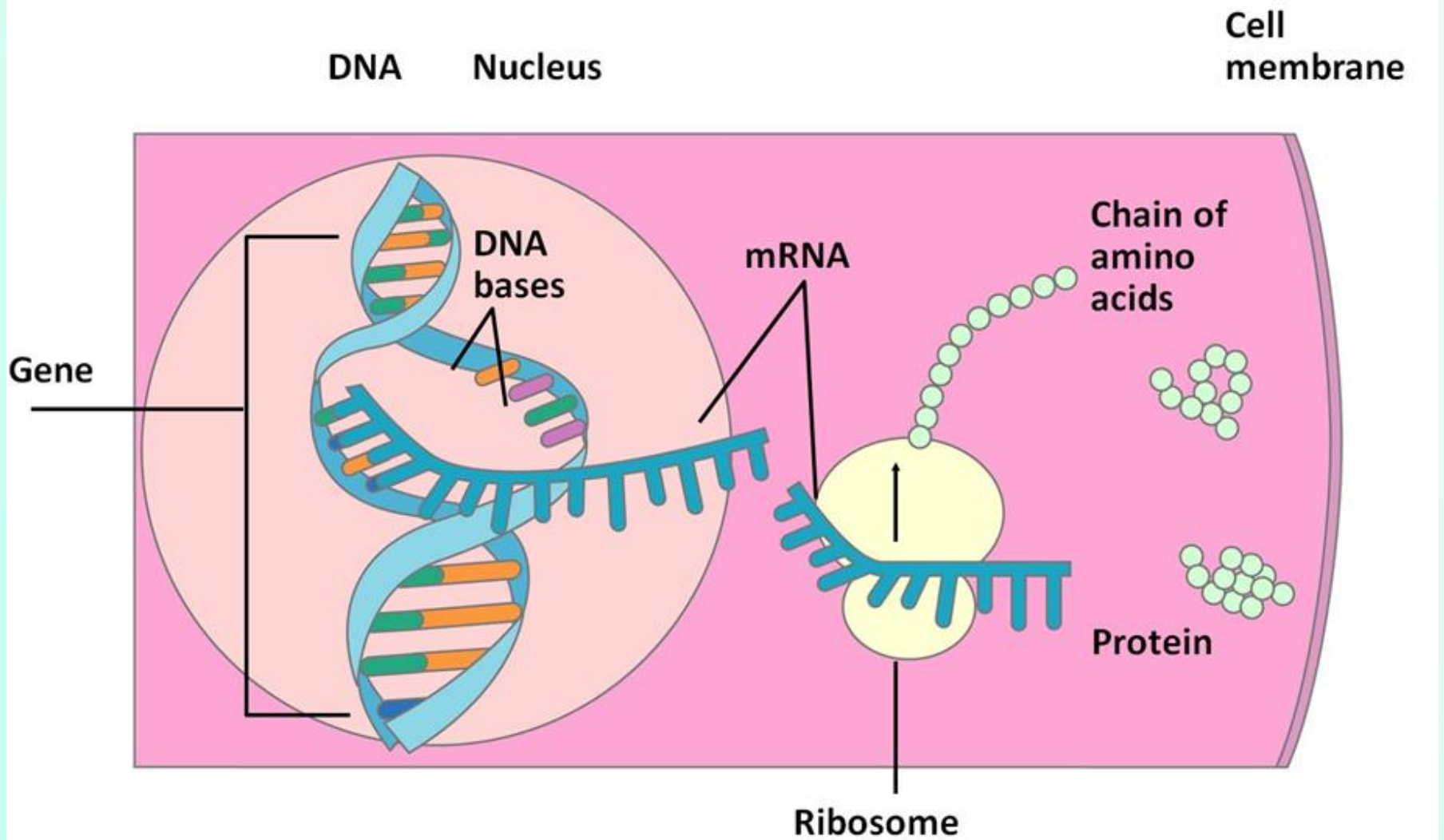
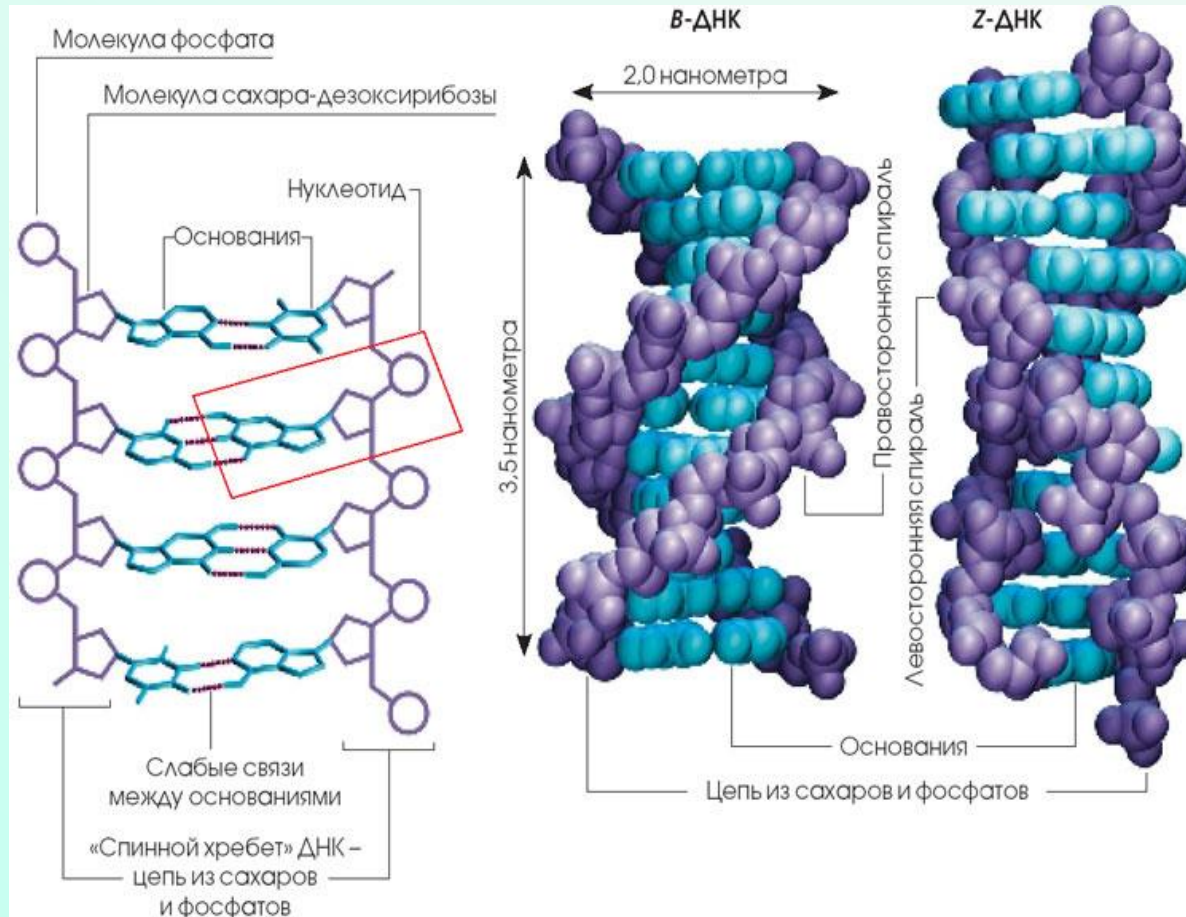


Современная генетическая диагностика



Наследственный материал - ДНК



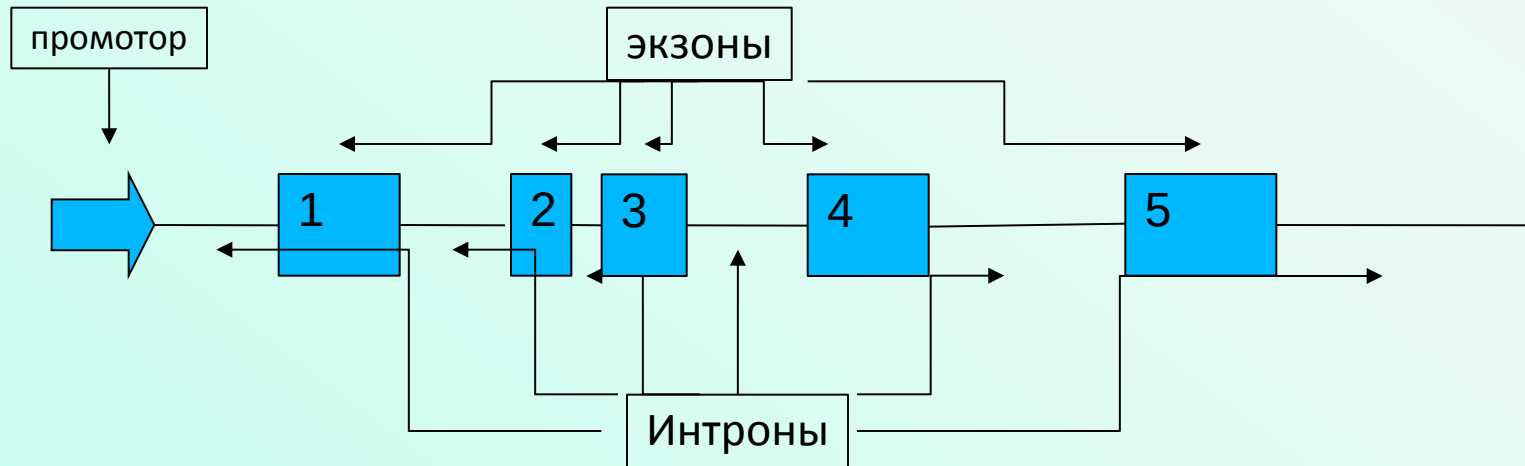
Наследственный материал: ДНК.

Локализация наследственного материала: ядро, митохондрии.

Составляющая единица ДНК: нуклеотид.

Строение нуклеотида: азотистое основание, сахар, фосфат

Структура гена



Нуклеотиды

А – аденин

Г – гуанин

Ц – цитозин

Т – тимин

ДНК из
2-х цепей

А-Т

Г-Ц

Кодон – 3 нуклеотида,
кодирующие аминокислоту

АТЦ_ЦЦГ_ТТА_ЦАГ_ТГТ_ЦЦЦ

Изменения наследственного материала

Мутации могут возникать как в соматических, так и половых клетках.

Различают геномные, хромосомные aberrации (мутации) и генные мутации.

- Геномные мутации - изменение количества наследственного материала (анеуплоидии, полиплоидии).
- Хромосомные aberrации - изменение структуры хромосом: делеция (отрыв части хромосомы), инверсия (поворот части хромосомы на 180°), транслокации (перемещение части одной хромосомы на другую) и др.
- Генные мутации - изменение структуры ДНК в пределах одного гена.

Типы генных мутаций

- Однонуклеотидные
- Делеции/инсерции, вариации числа копий генов
- Вариации числа функциональных повторов
- Эпигенетические нарушения
- Инверсии и транслокации

Методы исследования генетических нарушений

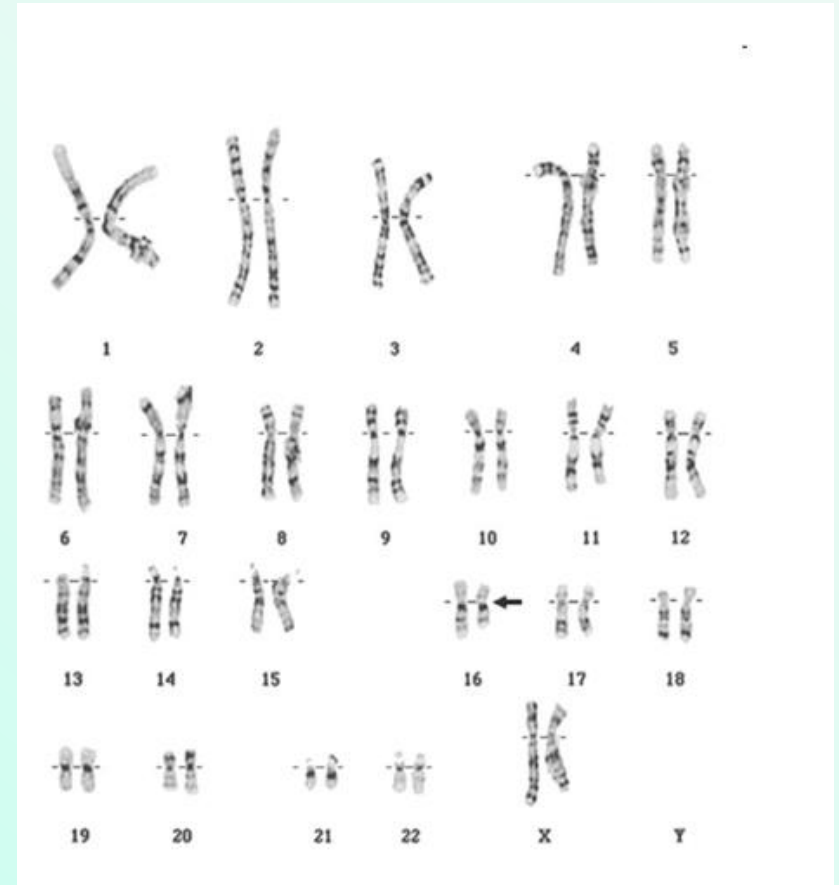
- Цитогенетические
- Молекулярно-генетические
- Биохимические

Кариотипирование

Кариотипирование – цитогенетический метод позволяющий выявить отклонения в структуре и числе хромосом, которые могут стать причиной бесплодия, наследственной болезни и рождения ребенка с врожденным пороком развития (ВПР).

Кариотипирование применяется для:

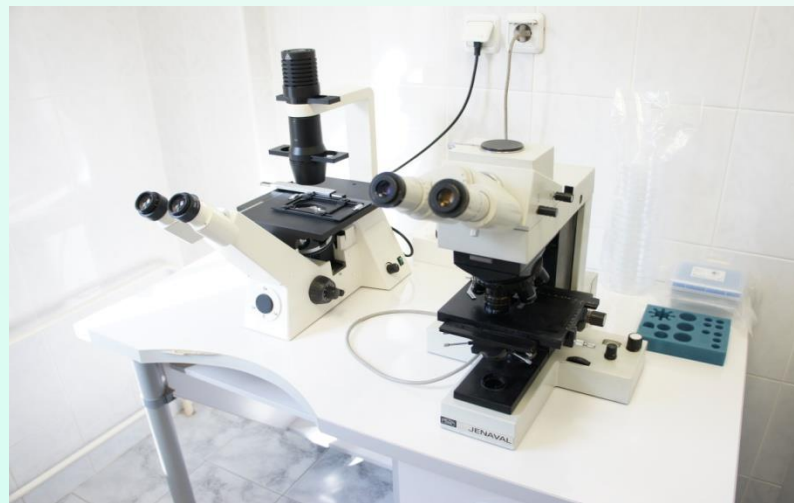
1. изучения кариотипа пациентов;
2. исследования хромосом плода – пренатальное кариотипирование;
3. онкологии.



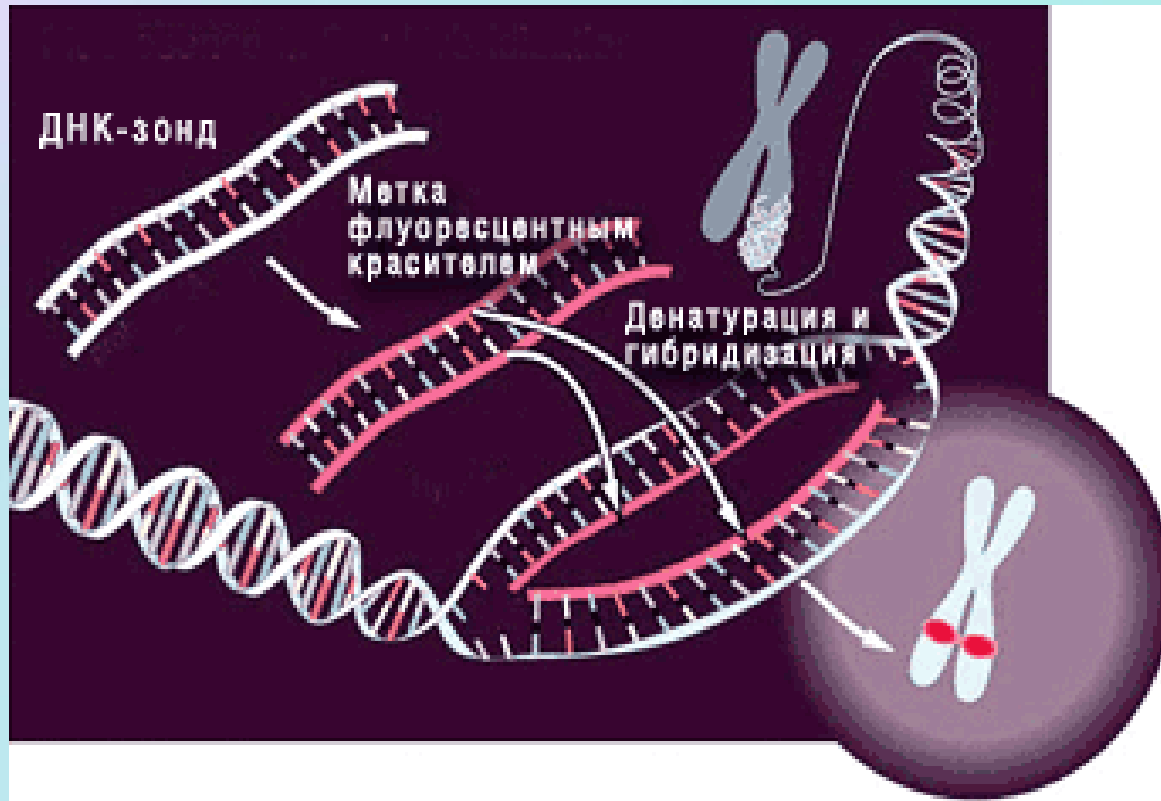
Наиболее часто диагностируемые методом классического кариотипирования хромосомные aberrации

- 21-трисомия (синдром Дауна) — 1:700;
- XXX (трисомия X) — 1:1000 (девочки);
- XYU (синдром дубль-Y) — 1:1000 (мальчики);
- XXU (синдром Клайнфельтера) — 1:1400 (мальчики);
- XO (синдром Шерешевского — Тернера) — 1:3300 (девочки);
- 46.5p (синдром «кошачьего крика») — 1:4000;
- 18-трисомия (синдром Эдвардса) — 1:6800;
- 13-трисомия (синдром Патау) — 1:7600.

Оборудование для кариотипирования



Гибридизация in situ с флуоресцентной меткой (Fluorescence in situ hybridization - FISH)

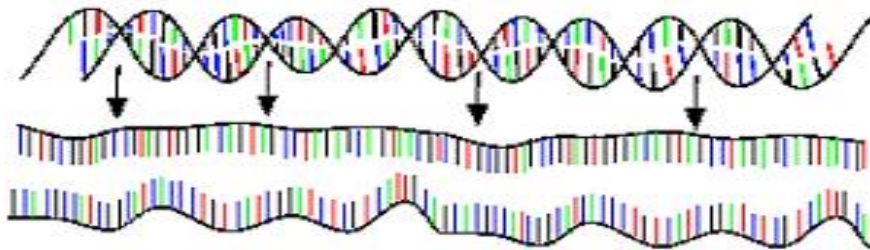


Принцип метода: комплементарность ДНК-зондов (коротких фрагментов ДНК с известной специфичностью) к ДНК-объекту с последующей регистрацией места локализации зонда по флуоресцентной метке

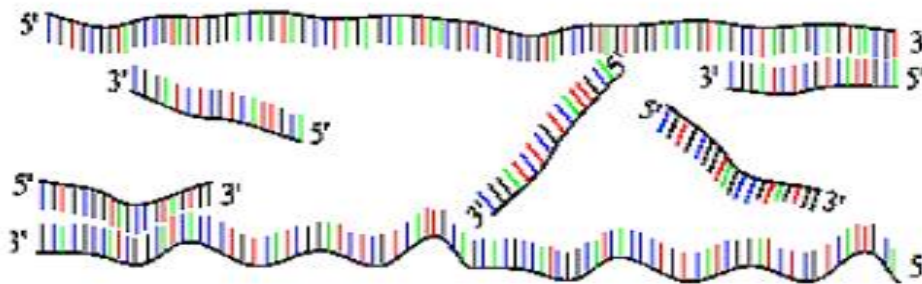
Молекулярно-генетические методы

- определение крупных перестроек методами блот-гибридизации и использованием ДНК-зондов**
- выявление крупных и мелких делеций с помощью ПЦР и гель-электрофореза**
- выявление мутаций в сайтах узнавания рестриктазами с помощью ПЦР**
- аллель-специфическая гибридизация (амплификация) с использованием олигонуклеотидов, комплементарных нормальной и мутантной последовательности ДНК**
- детекция конформационного полиморфизма одноцепочечной ДНК (SSCP)**
- гетеродуплексный анализ**
- секвенирование гена или его фрагмента**

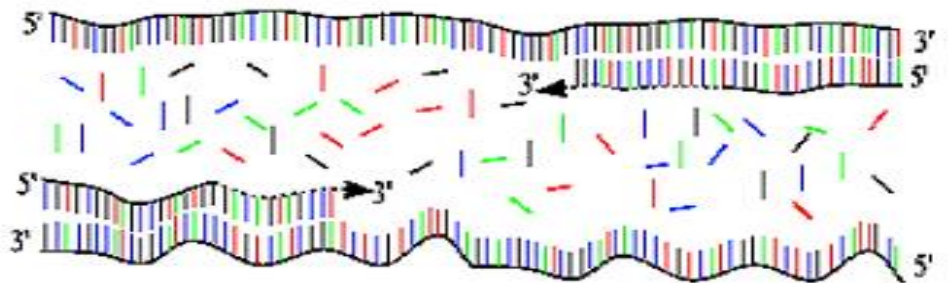
Полимеразная цепная реакция



Этап 1: Денатурация

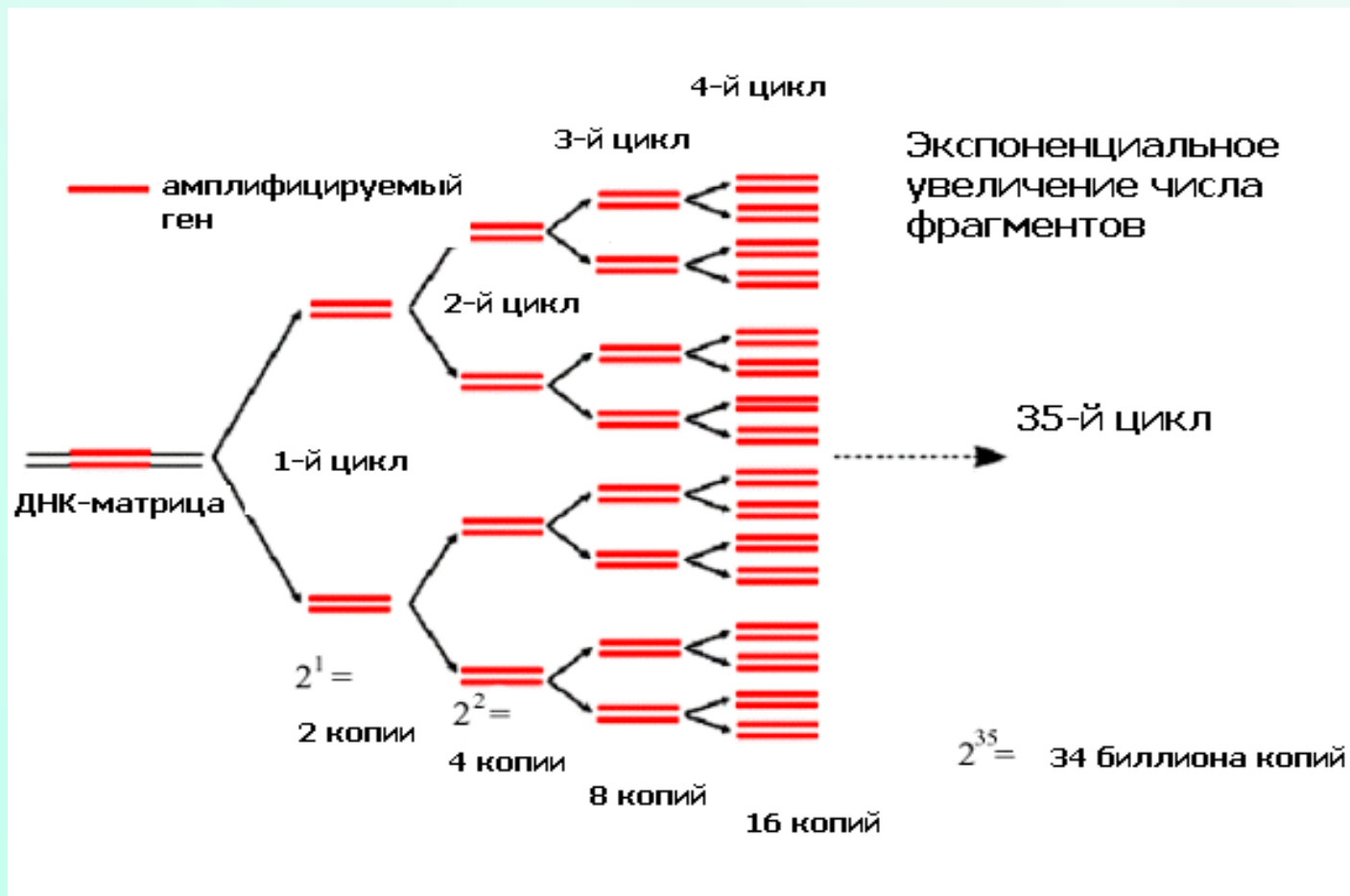


Этап 2: Отжиг праймеров



Этап 3: Синтез цепи ДНК

Полимеразная цепная реакция



Оборудование для определения мутаций и экспрессии генов методом ПЦР и RT-PCR



Генетическая диагностика

- Врожденные и наследственные заболевания
- Мультифакторные заболевания
- Фармакогенетика
- Онкогенетика
- Метагеномика

Генетически детерминированные заболевания

Группа болезней	Число
Хромосомные болезни	100
Моногенные болезни	8000
Мультифакториальные болезни	500

Муковисцидоз (кистозный фиброз / CF)

Аутосомно-рецессивное наследственное заболевание с распространенным поражением эндокринных желез, характеризующаяся кистозным перерождением поджелудочной железы, желёз кишечника и дыхательных путей из-за закупорки их выводных протоков вязким секретом.

Изменения белка (трансмембранного регулятора, CFTR), обеспечивающего функцию хлоридного канала приводит к нарушению транспорта хлоридов и воды в эпителиальных клетках. Ген трансмембранного регулятора хлоридного канала (CFTR) на хр. 7 q31-q32. 250 000 п.н. 27 экзонов 1480 ак. Известно более 300 мутаций, из них более 200 с патологическим эффектом (миссенс, делеции, нонсенс, сдвиг рамки, нарушения сплайсинга). Избыточное выделение хлоридов. Дегидратация секрета. Закупорка вязким секретом выводных протоков желёз. Развитие воспалительного процесса с присоединением вторичной инфекции.

Задержка умственного и физического развития. Средняя продолжительность жизни – 30 лет. Лечение - антибиотикотерапия, лаваж бронхолегочной системы, систематическое применение пищеварительных ферментов.

Частота. 1:2000 – 1:4000 новорожденных

www.orpha.net – портал по редким заболеваниям, информация о диагностике и методах лечения

Гены предрасположенности

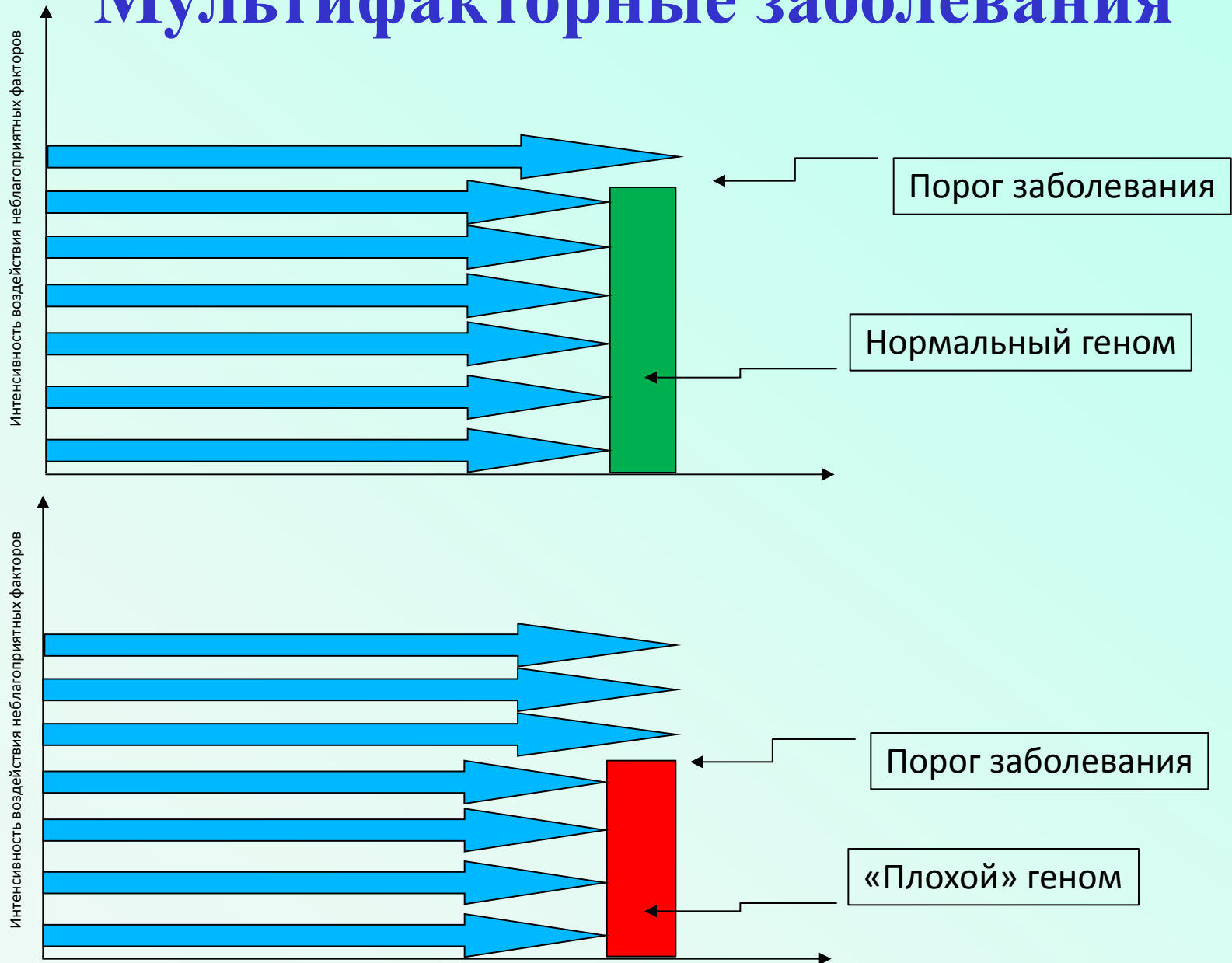
Многие болезни имеют генетическую предрасположенность.

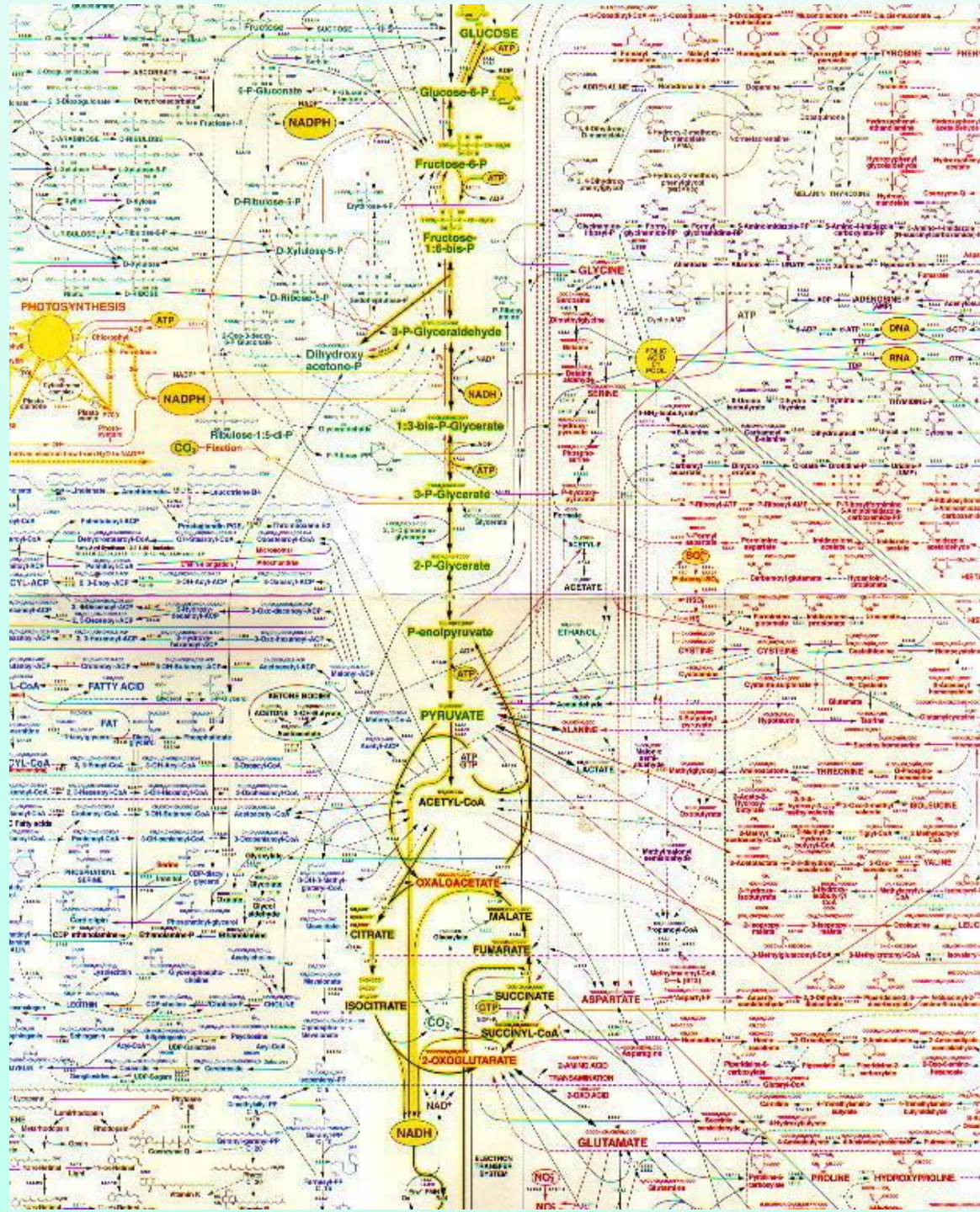
Существует множество однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), не приводящих зачастую к изменению функций кодируемых белков, но при этом имеющих четкие ассоциации с заболеваниями.

Ассоциация обычно выражается в степени увеличения риска развития данного заболевания и рассчитывается исходя из того как часто встречается данный полиморфизм у больных по сравнению со здоровыми. Например, наличие «плохого» варианта полиморфизма гена, кодирующего фактор роста TGF β , увеличивает вероятность развития рака молочной железы примерно на 7% при наличии 1 копии и на 17% в случаях, когда «плохие» обе копии гена.

Достоверность данных об ассоциации полиморфизма с заболеванием в значительной степени зависит от объема исследуемой выборки. Кроме того важно, чтобы результаты конкретного исследования были подтверждены другой работой. Существуют и популяционные вариации. Не всегда исследования, проведенные на азиатской группе обследуемых, в полной мере соответствуют данным, полученным в европеоидной популяции.

Мультифакторные заболевания



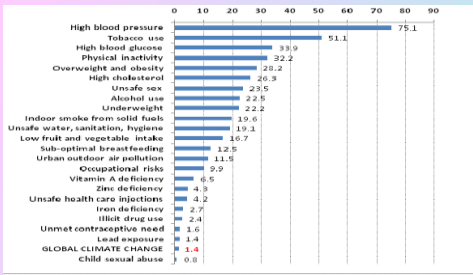


Инфаркт миокарда

Ген/Локус ¹	Однонуклеотидный полиморфизм ¹	Ваш генотип ²	Соотношение шансов ³	Ассоциированная аллель ²	Частота в популяции ⁴	Подтвержденный маркер ⁵	PMID ⁶
CXCL12	rs1746048	T/Ц	1.17	Ц	85%	подтверждено	19198609
Intergenic_1p13	rs646776	T/T	1.42	T	75%	подтверждено	19198609
Intergenic_21q22	rs9982601	Ц/Ц	1.00	T	21%	подтверждено	19198609
Intergenic_9p21	rs10757278	A/Г	1.28	Г	50%	подтверждено	17478679
MIA3	rs17465637	Ц/Ц	1.30	Ц	27%	подтверждено	19198609
PCSK9	rs11206510	T/T	1.32	T	84%	подтверждено	19198609
PHACTR1	rs12526453	Г/Ц	1.12	Ц	63%	подтверждено	19198609
SH2B3	rs3184504	T/Ц	1.13	T	44%	подтверждено	19198610
WDR12	rs6725887	T/Ц	1.17	Ц	16%	подтверждено	19198609
OR13G1	rs1151640	A/A	1.00	Г	46%	относительно	16175505
PRR4	rs1376251	T/Ц	1.23	Ц	65%	относительно	16175505

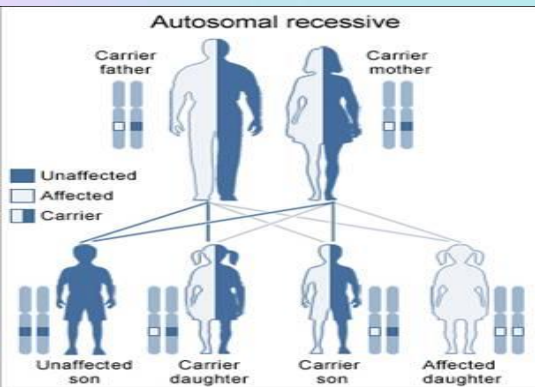
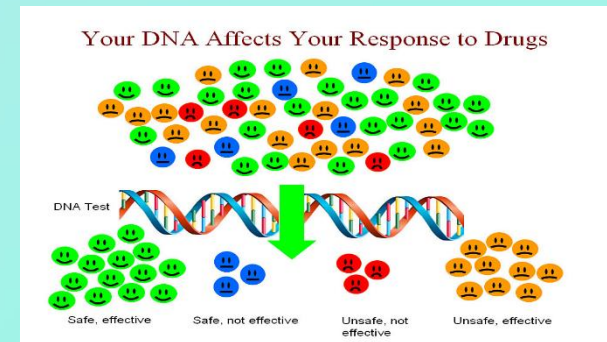
Генетический тест компании 23andme

Узнать происхождение — к какой популяционной группе вы относитесь, откуда Ваши праОтец и праМать, и как ваши предки расселялись по Земле, а также сколько у вас содержится ДНК неандертальца.



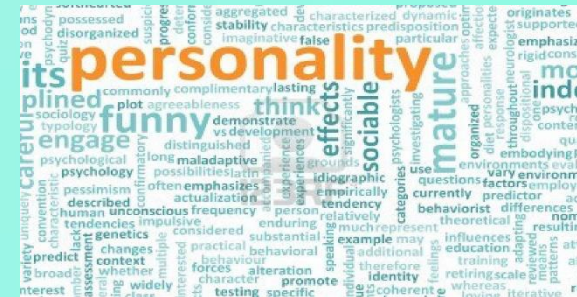
Выявить риск развития **более 100 мультифакторных заболеваний** (таких как инфаркт миокарда, ожирение, сахарный диабет 1 и 2 типа, онкологических заболеваний, болезни Альцгеймера, нарушений обмена и.т.д.), а значит предотвратить их развитие за счет своевременной диагностики.

Оценить индивидуальную реакцию на препараты, что позволит подбирать максимально эффективные препараты и избегать препараты, на которые высокий риск развития осложнений (**24 препарата**).



Провериться на носительство наследственных моногенных заболеваний (52 наиболее часто встречаемых заболевания).

Узнать индивидуальные свойства организма - такие как реакция на алкоголь, вероятность развития зависимостей, невосприимчивость к СПИДу и еще около **60 индивидуальных качеств**, зная которые вы сможете чувствовать себя максимально комфортно, соблюдая простые рекомендации.



Генетические тесты MGRC

Генетический скрининг сердечно-сосудистых заболеваний

Факторы риска развития атеросклероза	Количество маркеров
1. Семейная гиперхолестеринемия	1
2. Гипертриглицеридемия	1
3. Артериальная гипертензия	7
4. Ожирение	5

Генетические маркеры заболеваний	Количество маркеров
1. Инфаркт миокарда	3
2. Ишемическая болезнь сердца	2
3. Внезапная остановка сердца	1
4. Мерцательная аритмия	3
5. Аневризма (головного мозга и аорты)	8
6. Заболевания периферических артерий	2
7. Инсульт	2
8. Тромбоз глубоких вен (ТГВ) и легочной артерии (ТЭЛА)	5
9. Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ)	7

Побочные реакции на препарат	Количество маркеров
1. Плавикс	6
2. Статины	2
3. Варфарин	6
4. Метопролол (бета-блокаторы)	1
5. Буциндолол (бета-блокаторы)	2

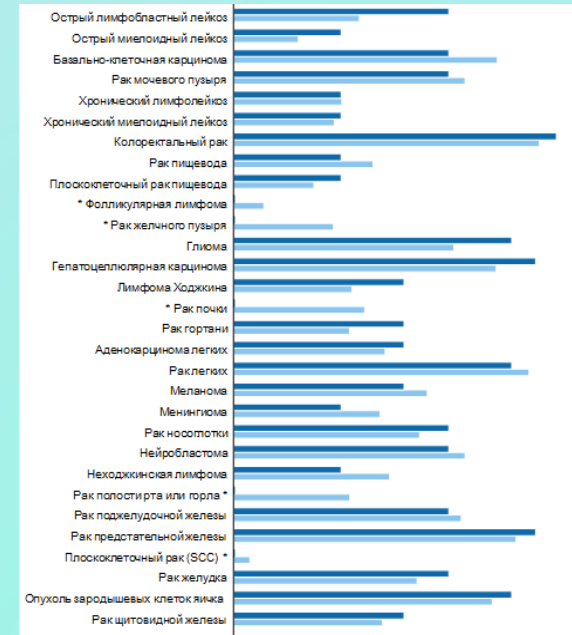
Генетический скрининг метаболических заболеваний

Факторы риска развития сахарного диабета	Количество маркеров
1. Сахарный диабет 1 типа	17
2. Сахарный диабет 2 типа	25
3. Гестационный диабет	2

Факторы риска развития болезней щитовидной железы	Количество маркеров
1. Гипотиреоз	1
2. Базедова болезнь	2
3. Хронический тиреоидит	1

Генетические маркеры заболеваний	Количество маркеров
1. Подагра	5
2. Желчнокаменная	4
3. Семейная гиперхолестеринемия	1
4. Гипертриглицеридемия	1
5. Дефицит G6PD	2
6. Непереносимость лактозы	1
7. Влияние курения на метаболический синдром	1

Генетический скрининг онкологических заболеваний



Аппаратурное обеспечение для определения нуклеотидных последовательностей (секвенирование)

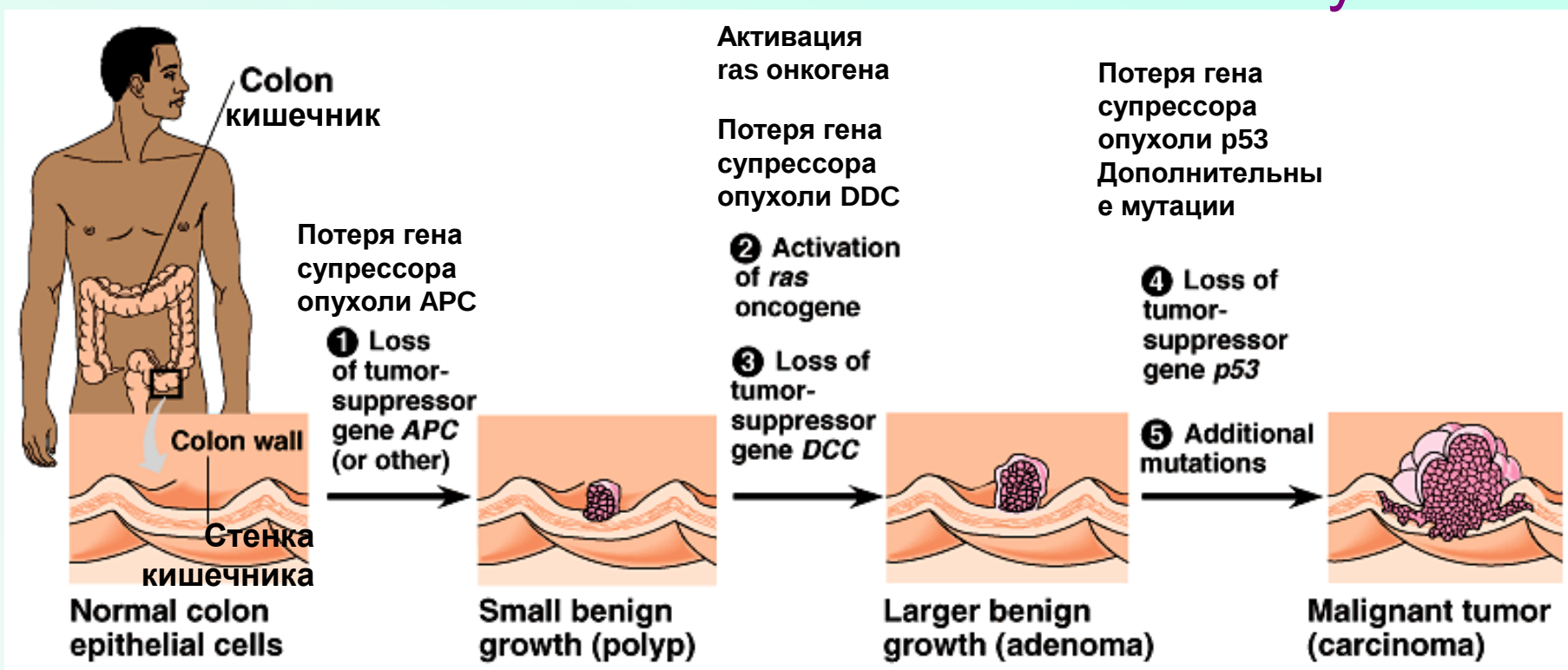


Молекулярно-генетическая диагностика в онкологии

- ❖ Выявление наследственной предрасположенности
- ❖ Ранняя диагностика, мониторинг течения заболевания
- ❖ Выбор эффективной химиотерапии, оценка эффективности лечения, выявление лекарственной непереносимости

Развитие опухоли

Множественные мутации приводят к раку кишечника
Генетические изменения → изменения опухоли



Нормальные клетки
эпителия кишечника

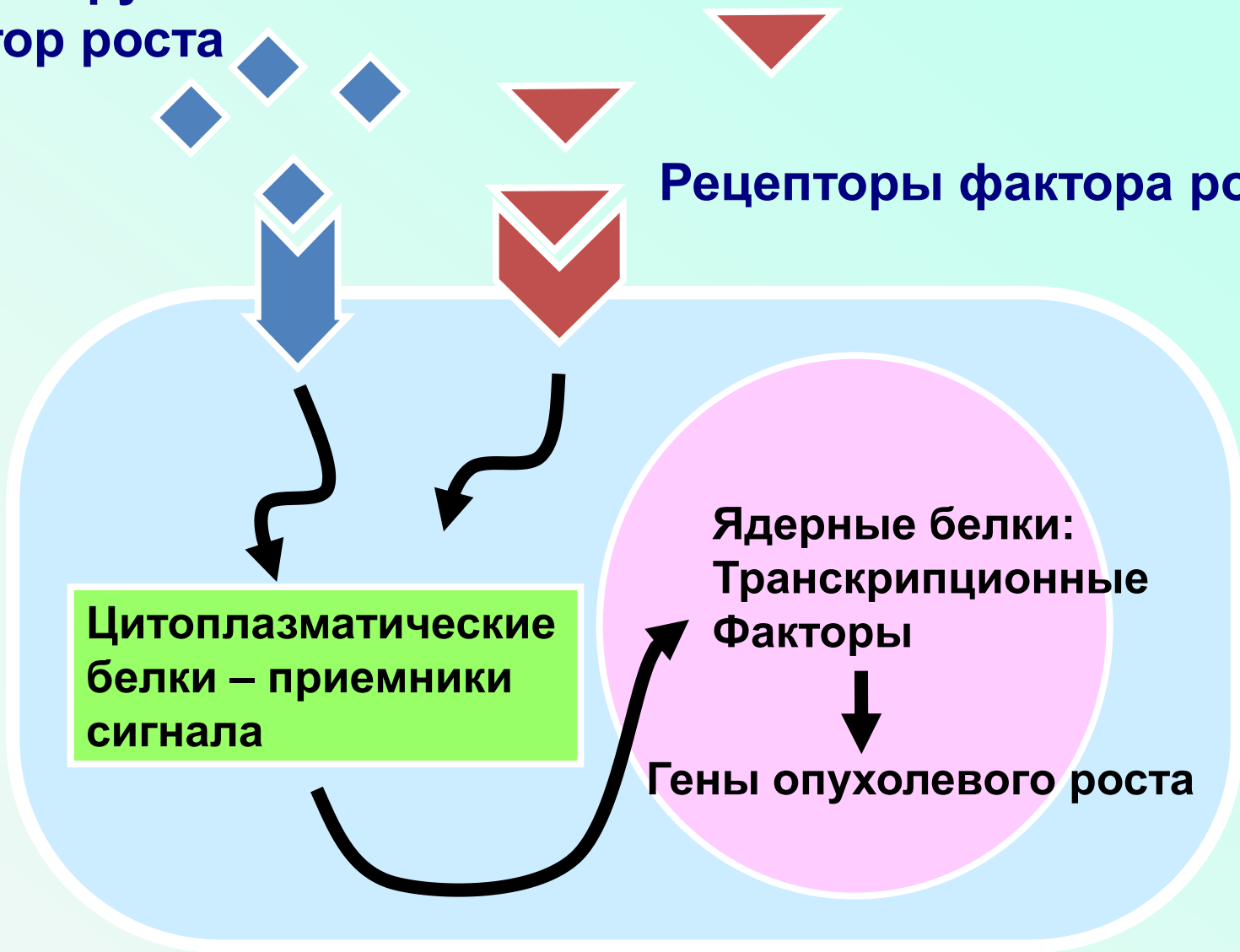
Небольшой
доброкачественный
рост (полип)

Большая
доброкачественная
опухоль (аденома)

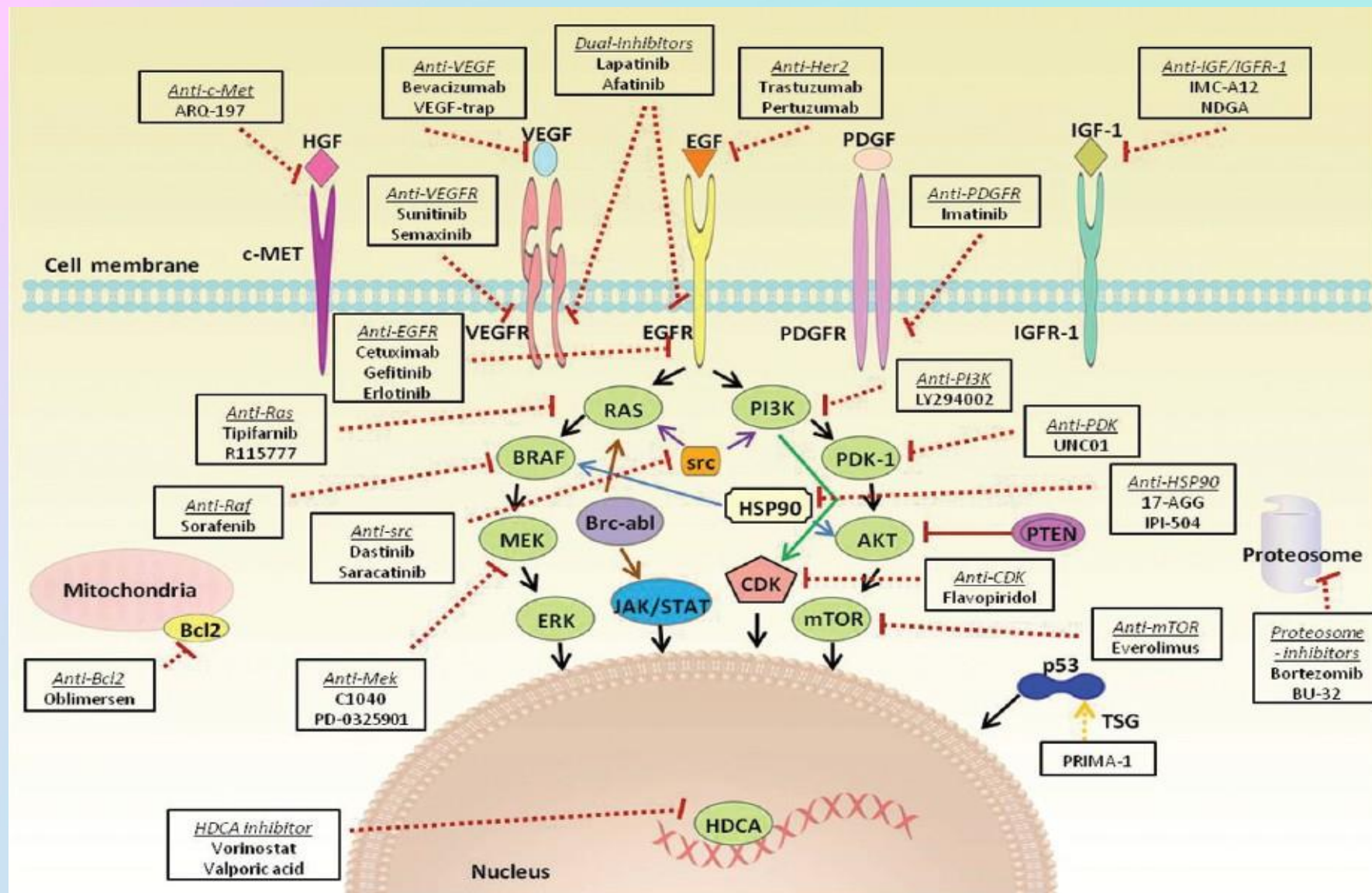
Злокачественная
опухоль
(карцинома)

**Секретируемый
фактор роста**

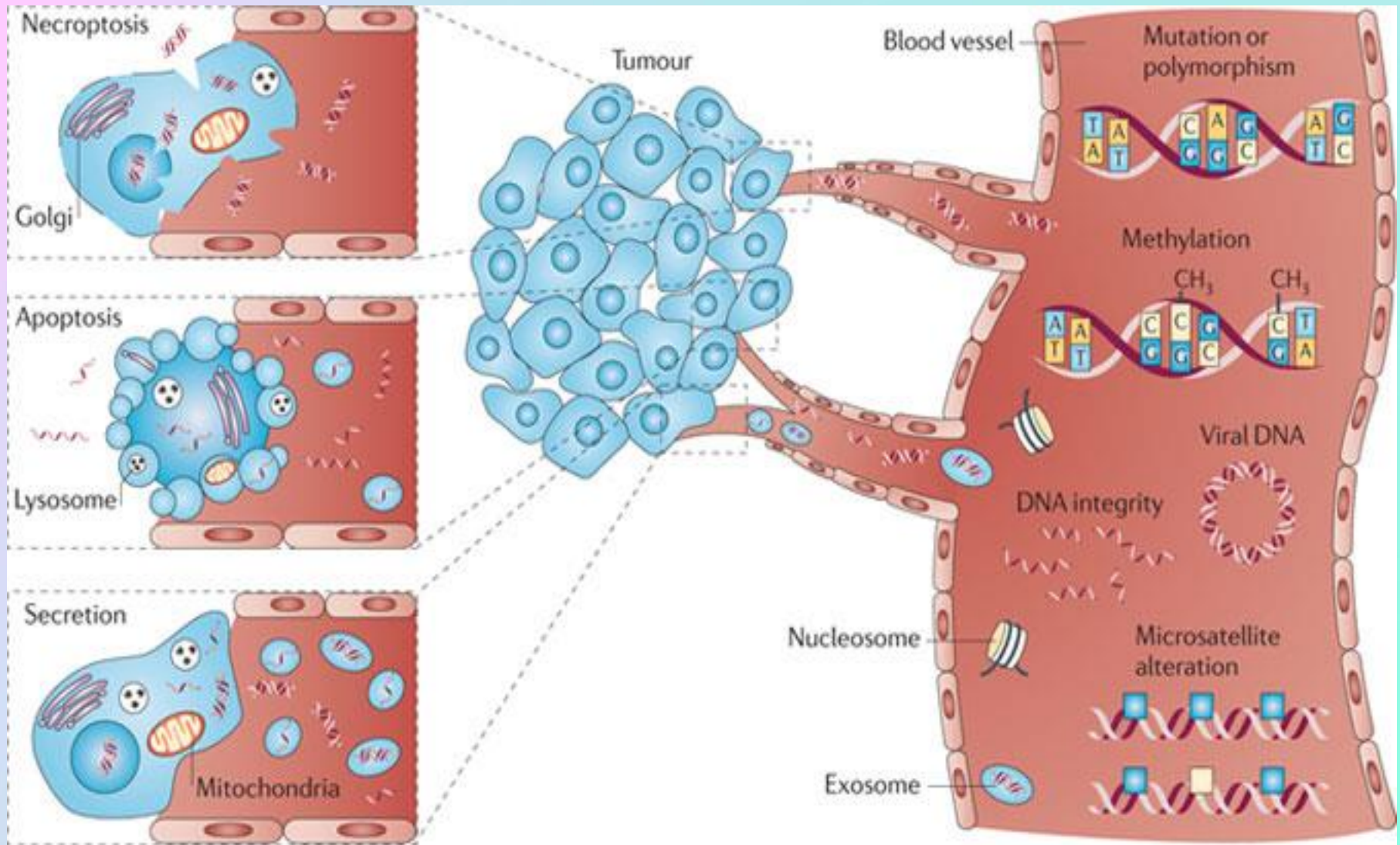
Рецепторы фактора роста



Таргетная терапия



Ранняя онкодиагностика —
исследование циркулирующих
нуклеиновых кислот

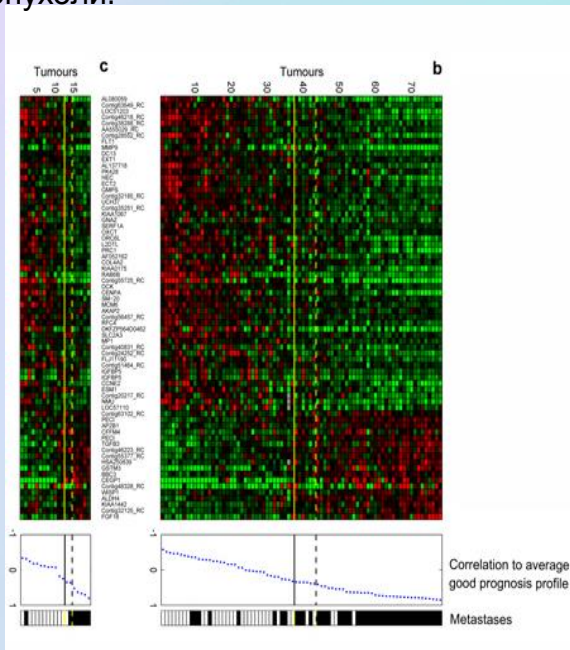


Тесты для онкологии



Mammaprint

MammaPrint представляет собой диагностический тест для оценки метастазирования при опухоли молочной железы, помогает врачам подобрать химиотерапию. Тест MammaPrint основан на анализе экспрессии 70 генов в образце опухоли.



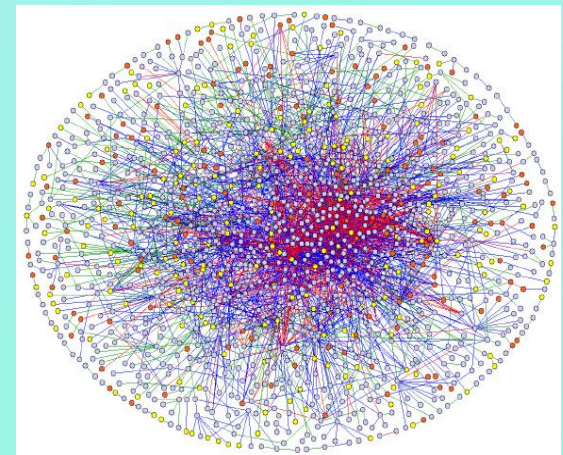
Oncotype DC

Oncotype DX, является диагностическим тестом, который количественно оценивает вероятность рецидива заболевания у женщин с ранними стадиями рака молочной железы (прогностическое значение) и оценивает вероятную выгоду от некоторых видов химиотерапии (терапевтическое значение). В настоящее время разработаны также тесты для рака кишечника и рака простаты



ПОНКЦ

Индивидуализированный крупномасштабный скрининг экспрессии генов позволяет подобрать наиболее эффективную стратегию лечения и понять причину развития заболевания на молекулярном уровне



Персонализация лекарственной терапии

Правильная доза

правильного препарата

правильному пациенту

в правильный момент времени

Примерно для 80 препаратов проведение фармакогенетических тестов рассматривается как желательное или крайне желательное для определения возможности назначения, подбора дозировки, определения эффективности и прогнозирования побочных эффектов

<http://www.fda.gov/Drugs/ScienceResearch/ResearchAreas/Pharmacogenetics/ucm083378.htm>



Practical recommendations for pharmacogenomics-based prescription: 2010 ESF–UB Conference on Pharmacogenetics and Pharmacogenomics

The present article summarizes the discussions of the 3rd European Science Foundation–University of Barcelona (ESF–UB) Conference in Biomedicine on Pharmacogenetics and Pharmacogenomics, which was held in June 2010 in Spain. It was focused on practical applications in routine medical practice. We provide practical recommendations for ten different clinical situations, that have either been approved or not approved by regulatory agencies. We propose some comments that might accompany the results of these tests, indicating the best drug and doses to be prescribed. The discussed examples include *KRAS*, cetuximab, panitumumab, *EGFR*–gefitinib, *CYP2D6*–tamoxifen, *TPMT*–azathioprine–6-mercaptopurine, *VKORC1/CYP2C9*–warfarin, *CYP2C19*–clopidogrel, *HLA-B*5701*–abacavir, *HLA-B*5701*–flucloxacillin, *SLCO1B1*–statins and *CYP3A5*–tacrolimus. We hope that these practical recommendations will help physicians, biologists, scientists and other healthcare professionals to prescribe, perform and interpret these genetic tests.

KEYWORDS: adverse drug reaction • azathioprine • cetuximab • clopidogrel • gefitinib • genetic testing • pharmacogenetics • statins • tacrolimus • tamoxifen • warfarin

Health Technology Assessment 2011; Vol. 15: No. 33
ISSN 1366-5278

The clinical effectiveness and cost-effectiveness of genotyping for *CYP2D6* for the management of women with breast cancer treated with tamoxifen: a systematic review

N Fleeman, C Martin Saborido, K Payne, A Boland, R Dickson, Y Dundar, A Fernández Santander, S Howell, W Newman, J Oyee and T Walley

Варфарин

Выбор начальной дозы варфарина у пациентов с тромбозами (ТЭЛА, тромбозы глубоких вен и другие венозные тромбозы, артериальные тромбоэмболии, включая эмболический инсульт) и у пациентов с высоким риском тромботических осложнений (постоянная форма фибрилляции предсердий, протезированные клапаны, послеоперационный период, в т. ч. в ортопедической практике).

Аллельные варианты (полиморфизмы), которые необходимо определять:

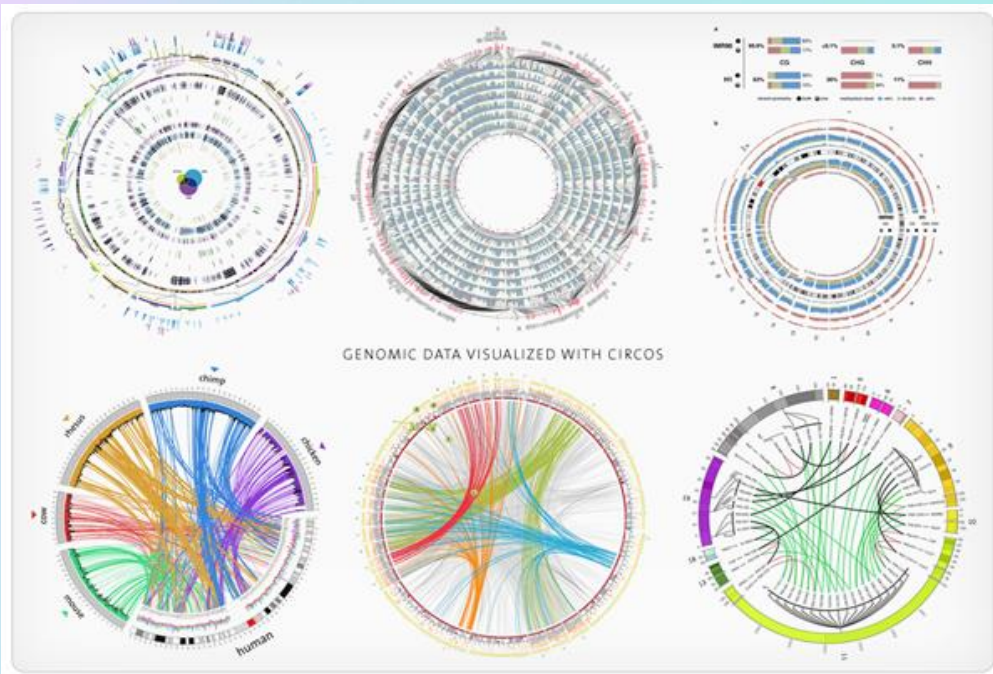
- CYP2 C9*2 и CYP2 C9*3 - аллельные варианты (полиморфные маркеры) гена CYP2 C9 (кодирует основной фермент биотрансформации варфарина - *цитохром Р-450*), активность фермента снижена
- Полиморфный маркер G3673A гена VKORC1 (кодирует молекулу-мишень для варфарина — субъединицу 1 витамин К эппоксидредуктазного комплекса).

Генотип VKORC1	Генотип CYP2 C9					
	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*2/*2	*2/*3	*3/*3
GG	5-7 мг	5-7 мг	3-4 мг	3-4 мг	3-4 мг	0,5-2 мг
AG	5-7 мг	3-4 мг	3-4 мг	3-4 мг	0,5-2 мг	0,5-2 мг
AA	3-4 мг	3-4 мг	0,5-2 мг	0,5-2 мг	0,5-2 мг	0,5-2 мг

2006 год, США – снижение затрат на 1 пациента = 2100 \$ при использовании фармакогенетического подхода

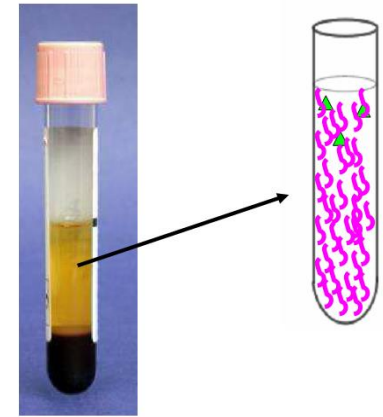
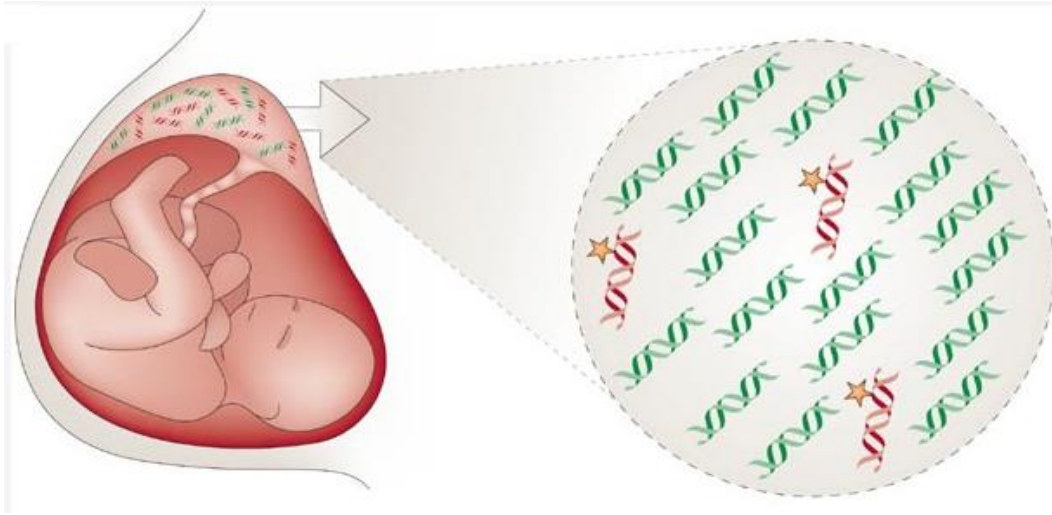
Секвенирование Экзома

В случае необходимости углубленного анализа, можно провести секвенирование экзома (всех кодирующих последовательностей) либо всего генома с 50 кратным покрытием и подробным биоинформатическим анализом обнаруженных вариантов



The image shows a close-up of a DNA microarray or sequencing data visualization. It features a grid of colored spots (red, green, blue, yellow) arranged in rows and columns, representing individual data points or sequences. The spots are arranged in a regular pattern, suggesting a high-throughput sequencing or microarray experiment.

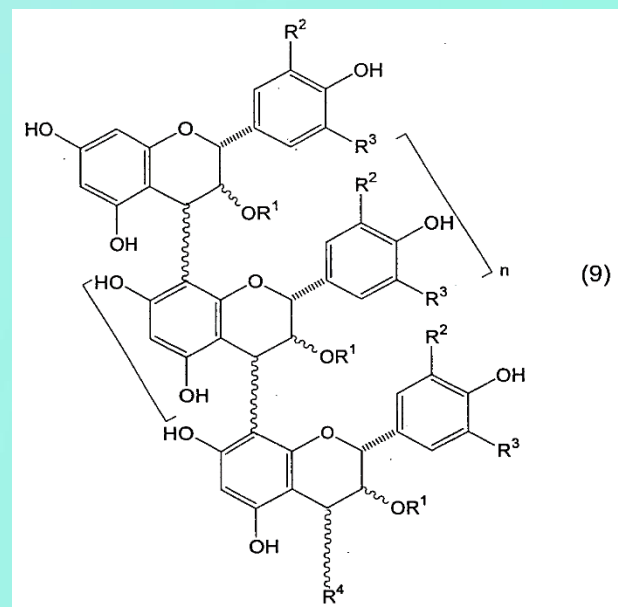
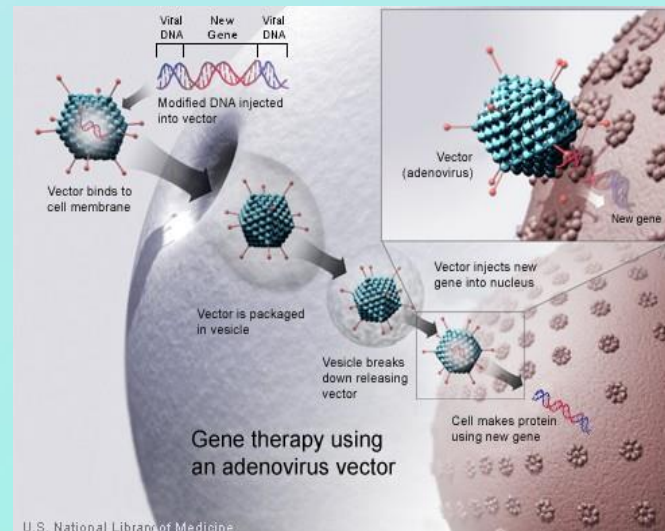
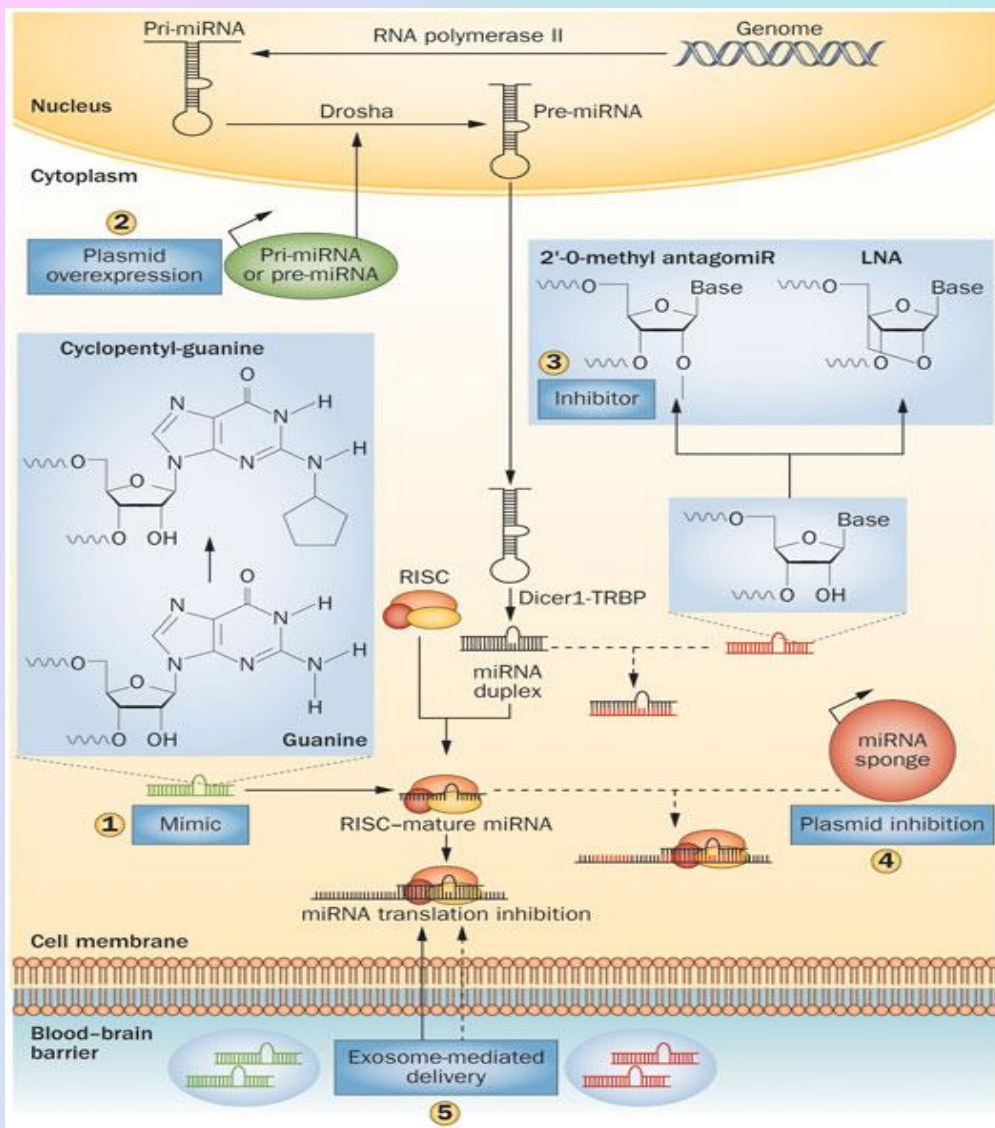
Неинвазивная пренатальная ДНК-диагностика



Появление фетальной ДНК в материнском кровотоке происходит при нормальных плацентарных процессах, приводящих к гибели клеток, вследствие чего выбрасываются фрагменты хромосом, большинство из которых 150-300 пар оснований. Доля фетальной ДНК из материнской крови увеличивается, в процессе беременности и составляет около 5%-15% от тотальной внеклеточной ДНК в течение первого и второго триместра.

Исследование фетальной ДНК может быть достоверно уже на седьмой неделе беременности. Циркулирующие ДНК быстро исчезают из крови матери после родов, за исключением случаев, когда остаются небольшие количества, в том числе клетки плода. Недавно было обнаружено, что весь геном плода в виде фетальной ДНК, присутствует в материнской крови.

Разработка новых препаратов и методов их доставки к поврежденным клеткам. Онкология, вирусология, сердечно-сосудистые заболевания, неврология, гепатология и другие.



Разработана специальная **номенклатура унифицированной записи** мутаций в генах и замены аминокислотной последовательности в белке. При наличии точковых мутаций, приводящих к замене одной аминокислоты в полипептидной цепи, чаще указывают изменение аминокислотной последовательности. При обозначении мутаций сплайсинга, делеций, инсерций и полиморфизмов, а также мутаций, возникающих в нетранслируемых участках генов, используют систему записи нуклеотидов. Принцип нумерации нуклеотидов следующий: номера присваиваются только тем нуклеотидам, которые входят в состав экзонов, т.е. № 1 - соответствует первому нуклеотиду 1-го экзона.

Для нумерации нуклеотидов в интронах необходимо определить номер ближайшего **нуклеотида** экзона и расположение интересующих нас нуклеотидов по отношению к 5'- и 3'-концам ДНК. Нуклеотид интрона, находящийся против рамки считывания по отношению к экзону, т.е. со стороны 5'-конца ДНК, записывается со знаком «—», например 982 - 1, а находящийся вдоль рамки считывания (со стороны 3'-конца) - со знаком «+», например, 81+1. При использовании буквенных обозначений нуклеотиды экзонов записываются заглавными буквами, а интронов - прописными.

При обозначении **аминокислотных замен** слева записывается нормальный вариант аминокислоты, справа — появившийся в результате мутации, а между ними обозначается место этой замены. Например, запись M366V означает замену метионина на валин в 366 положении полипептидной цепи, произошедшую в результате миссенс-мутации в гене. Это же обозначение может быть трехбуквенным и записываться как Met366Val. Для обозначения однонуклеотидных замен используют буквы A,C,T,G и запись может выглядеть следующим образом 1096A -> G или 1096A/G

В том случае, когда **происходит** нонсенс-мутация и синтез полипептидной цепи обрывается, место его остановки обозначают буквой X. Например, запись Q23X, означает, что в результате мутации в 23-ем кодоне, кодирующем глутамин возник стоп-сигнал. Отсутствие одной или нескольких аминокислот в белковой молекуле обозначают значком Д. Например, запись Д F508 означает отсутствие аминокислоты фенилаланина в 508-ом положении белка.

При наличии **делеции или инсерции** одного или двух нуклеотидов приводится их буквенное обозначение, а при делеции или инсерции трех и более нуклеотидов приводится их количество. Например, запись 345deiA означает, что в 345-ом положении произошла делеция нуклеотида A, а запись 546del24 означает, что произошла делеции 24 нуклеотидов, начинающаяся с 546-го нуклеотида.

Инсерции обозначают **символом** ins и записывают следующим образом. Вначале указывают интервал между нуклеотидами, в котором произошло встраивание сегмента, а затем обозначение сегмента. Например, 234-235insT означает, что между 234- и 235-м нуклеотидами произошла вставка T.

В случае мутаций **сплайсинга** запись начинают с номера крайнего нуклеотида в экзоне, ближайшем к мутации, затем указывают номер нуклеотида и характер нуклеотидной замены. Например, запись 621 + lg → t означает, что в первом основании интрона, который расположен за экзоном, заканчивающимся 621-м нуклеотидом, произошла замена g на t.

Динамические мутации, обусловленные экспансией тринуклеотидных повторов, записываются следующим образом. Вначале указывают номер нуклеотида с которого начинается экспансия повтора, затем описывают тип его тринуклеотидной последовательности и приводят количество повторов. Например, запись 28(CTG)200 означает, что, начиная с 28-го нуклеотида, выявлено 200 CTG-тринуклеотидных повторов.

Ala Аланин (A)
 Arg Аргинин (R)
 Asn Аспарагин (N)
 Asp Аспарагин. к-та (D)
 Cys Цистеин (C)
 Gln Глутамин (Q)
 Glu Глутамин. к-та (E)
 Gly Глицин (G)
 His Гистидин (H)
 Ile Изолейцин (I)
 Leu Лейцин (L)
 Lys Лизин (K)
 Met Метионин (M)
 Phe Фенилаланин (F)
 Pro Пролин (P)
 Ser Серин (S)
 Thr Треонин (T)
 Trp Триптофан (W)
 Tyr Тирозин (Y)
 Val Валин (V)

Таблица генетического кода

Аминокислота	Кодирующие триплеты (кодоны)
Аланин	ГЦУ ГЦЦ ГЦА ГЦГ
Аргинин	ЦГУ ЦГЦ ЦГА ЦГГ АГА АГГ
Аспарагин	AAУ AAЦ
Аспарагиновая кислота	ГАУ ГАЦ
Валин	ГУУ ГУЦ ГУА ГУГ
Гистидин	ЦАУ ЦАЦ
Глицин	ГГУ ГГЦ ГГА ГГГ
Глутамин	ЦАА ЦАГ
Глутаминовая кислота	ГАА ГАГ
Изолейцин	АУУ АУЦ АУА
Лейцин	ЦУУ ЦУЦ ЦУА ЦУГ УУА УУГ
Лизин	AAA AAG
Метионин	AUG
Пролин	ЦЦУ ЦЦЦ ЦЦА ЦЦГ
Серин	УЦУ УЦЦ УЦА УЦГ АГУ АГЦ
Тирозин	УАУ УАЦ
Треонин	ACY ACЦ ACА ACГ
Триптофан	УГГ
Фенилаланин	УУУ УУЦ
Цистеин	УГУ УГЦ
Знаки препинания	УАА УАГ УГА

В гене одной из гомологичных хромосом тимин в 38-м положении заменен на цитозин, что не приводит к изменению последовательности аминокислот в белке, в таком же гене другой хромосомы мутация в 245-м кодоне стала причиной замены пролина на серин. Запишите мутации. Если мутирован ген аутосомно-рецессивного заболевания, проявится ли оно?

Решение.

[38T/C + Pro245Ser].

Поскольку первое изменение представляет собой полиморфизм, не влияющий на активность продукта гена, а второе изменение (мутация) произошло только в одном аллеле гена, аутосомно-рецессивное заболевание не проявится.

1. Запишите мутацию замены тимина на гуанин во втором положении интрона, примыкающего к 97 нуклеотиду экзона слева. Каков возможный результат мутации?

2. Расшифруйте следующую запись: 216+7(cag)28. К какому типу её можно отнести? Каков возможный результат мутации?

3. Расшифруйте следующую запись: 702del21. Каков предполагаемый результат мутации?

4. Расшифруйте следующую запись: [23-24insAT; 59G→A]. В каком случае проявится патология, если ген отвечает: а) за аутосомно-доминантное заболевание; б) за аутосомно-рецессивное заболевание?