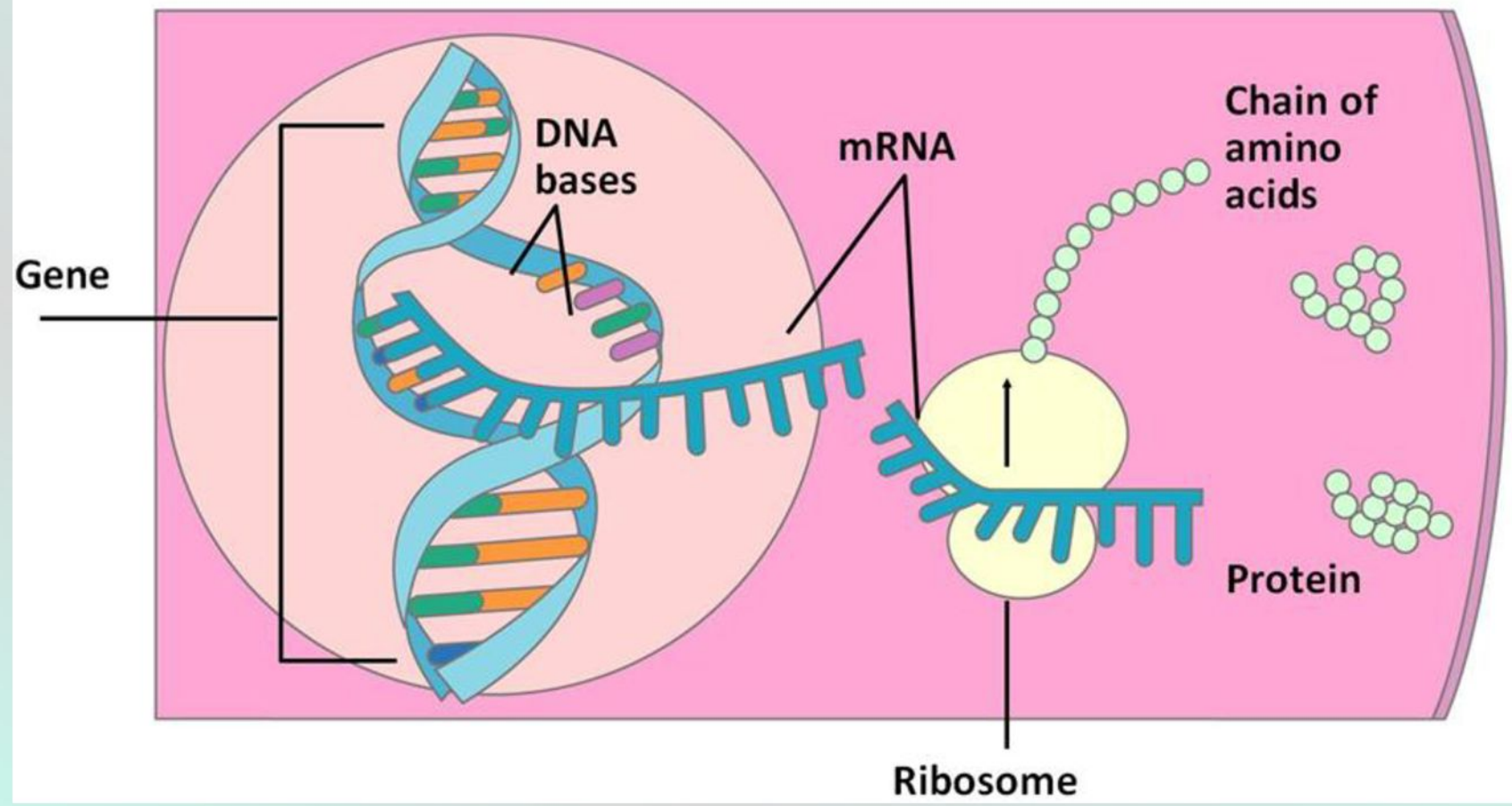


# Современная генетическая диагностика

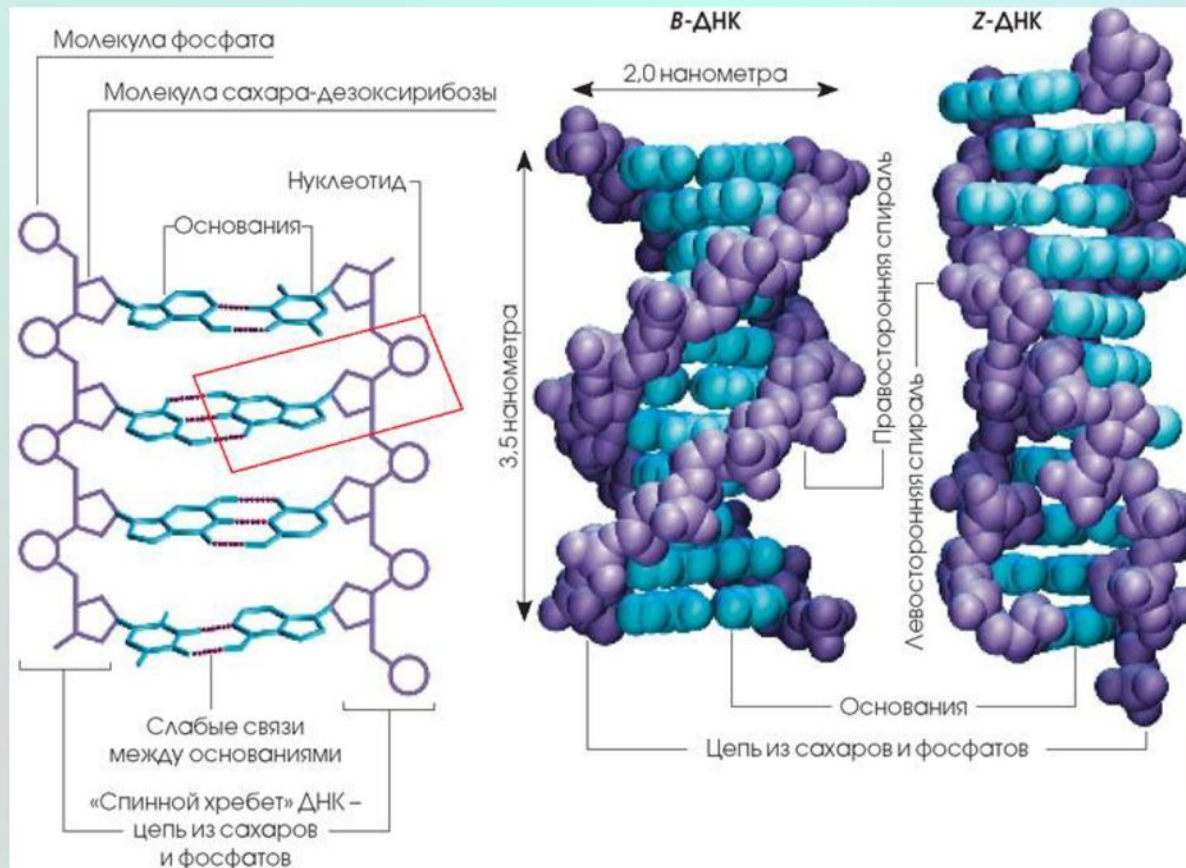
Абрамов Александр Андреевич

DNA Nucleus

Cell membrane



# Наследственный материал - ДНК



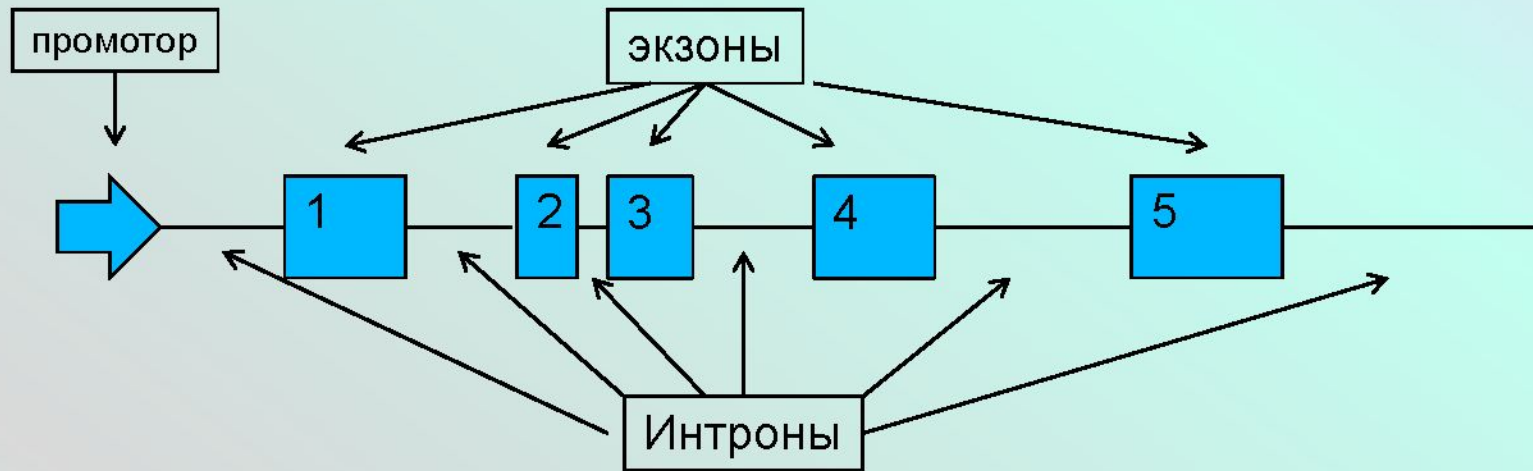
Наследственный материал: ДНК.

Локализация наследственного материала: хромосомы, митохондрии.

Составляющая единица ДНК: нуклеотид.

Строение нуклеотида: 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  $180^\circ$ ), 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

# Метода исследования генетических нарушений

- Цитогенетические
- Молекулярно-генетические
- Биохимические

# Кариотипирование

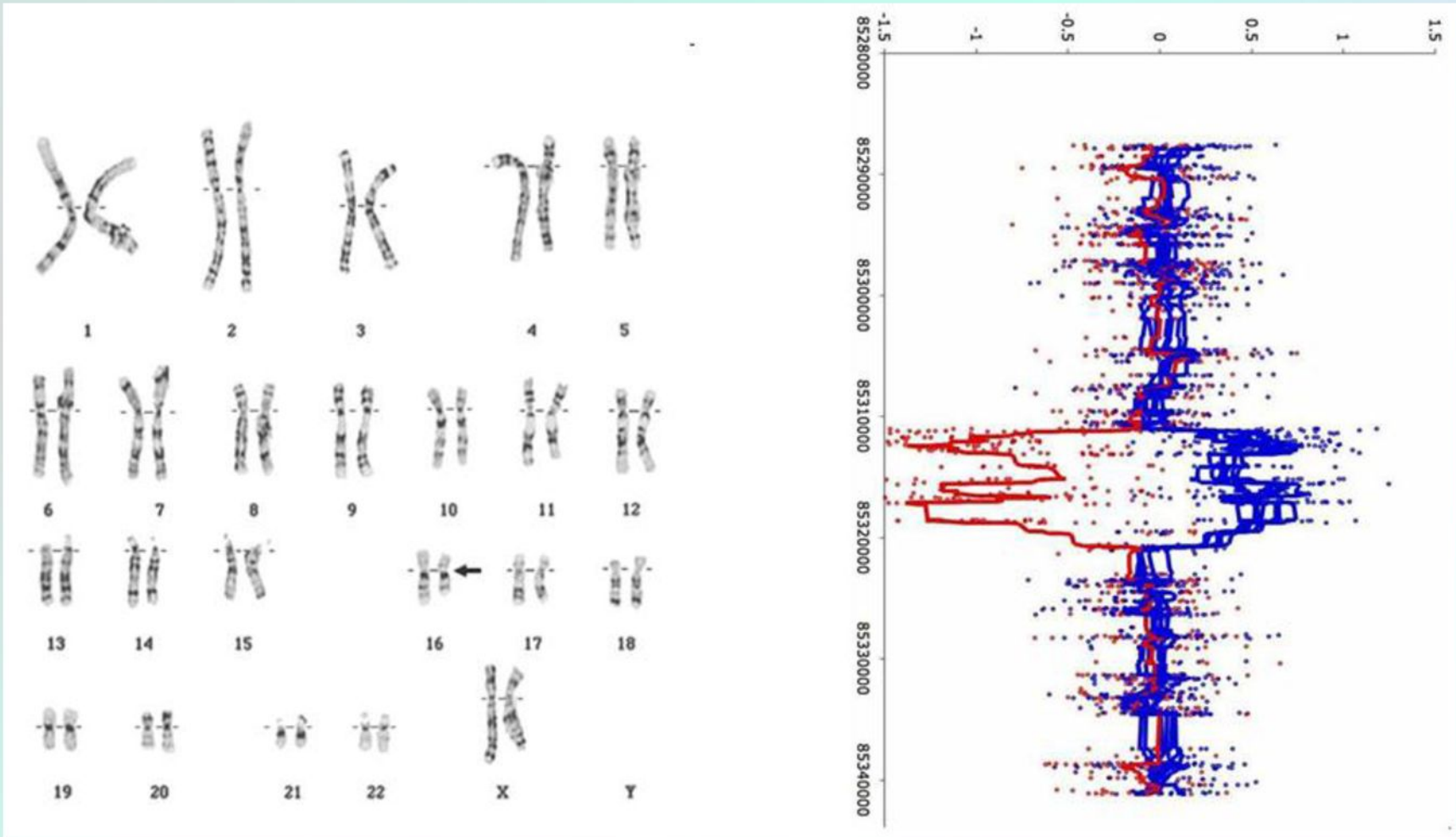
Кариотипирование – цитогенетический метод позволяющий выявить отклонения в структуре и числе хромосом, которые могут стать причиной бесплодия, наследственной болезни и рождения ребенка с врожденным пороком развития (ВПР).

**Кариотипирование применяется для:**

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



# Кариотип и CGH («молекулярный кариотип»)



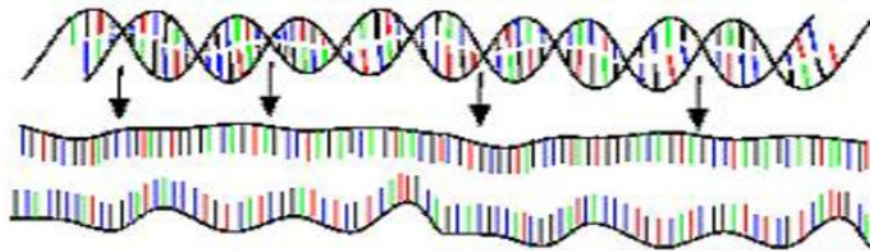
## Наиболее часто диагностируемые методом классического кариотипирования хромосомные aberrации

- 21-трисомия (синдром Дауна) — 1:700;
- ХХХ (трисомия Х) — 1:1000 (девочки);
- ХУУ (синдром дубль-У) — 1:1000 (мальчики);
- ХХУ (синдром Клайнфельтера) — 1:1400 (мальчики);
- ХО (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.

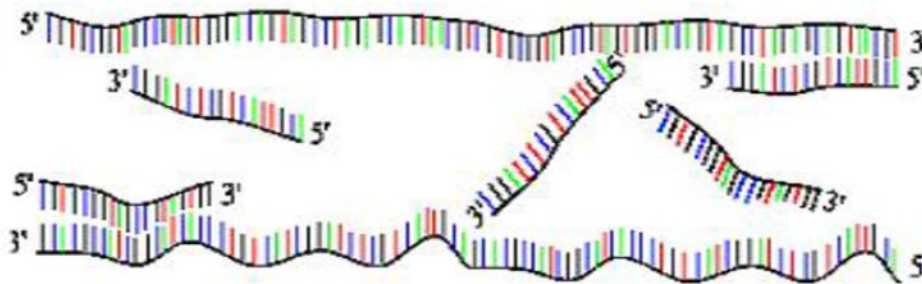
# Молекулярно-генетические методы

- 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-ПДРФ
- аллель-специфическая гибридизация (амплификация) с использованием олигонуклеотидов, комплиментарных нормальной и мутантной последовательности ДНК
- детекция конформационного полиморфизма одноцепочечной ДНК (SSCP)
- гетеродуплексный анализ
- секвенирование гена или его фрагмента

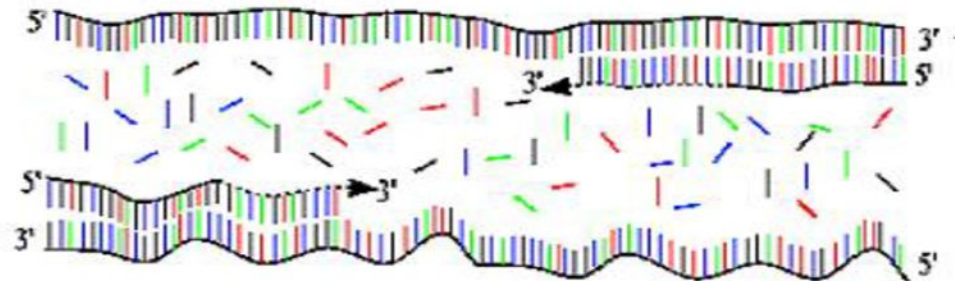
# Полимеразная цепная реакция



Этап 1: Денатурация

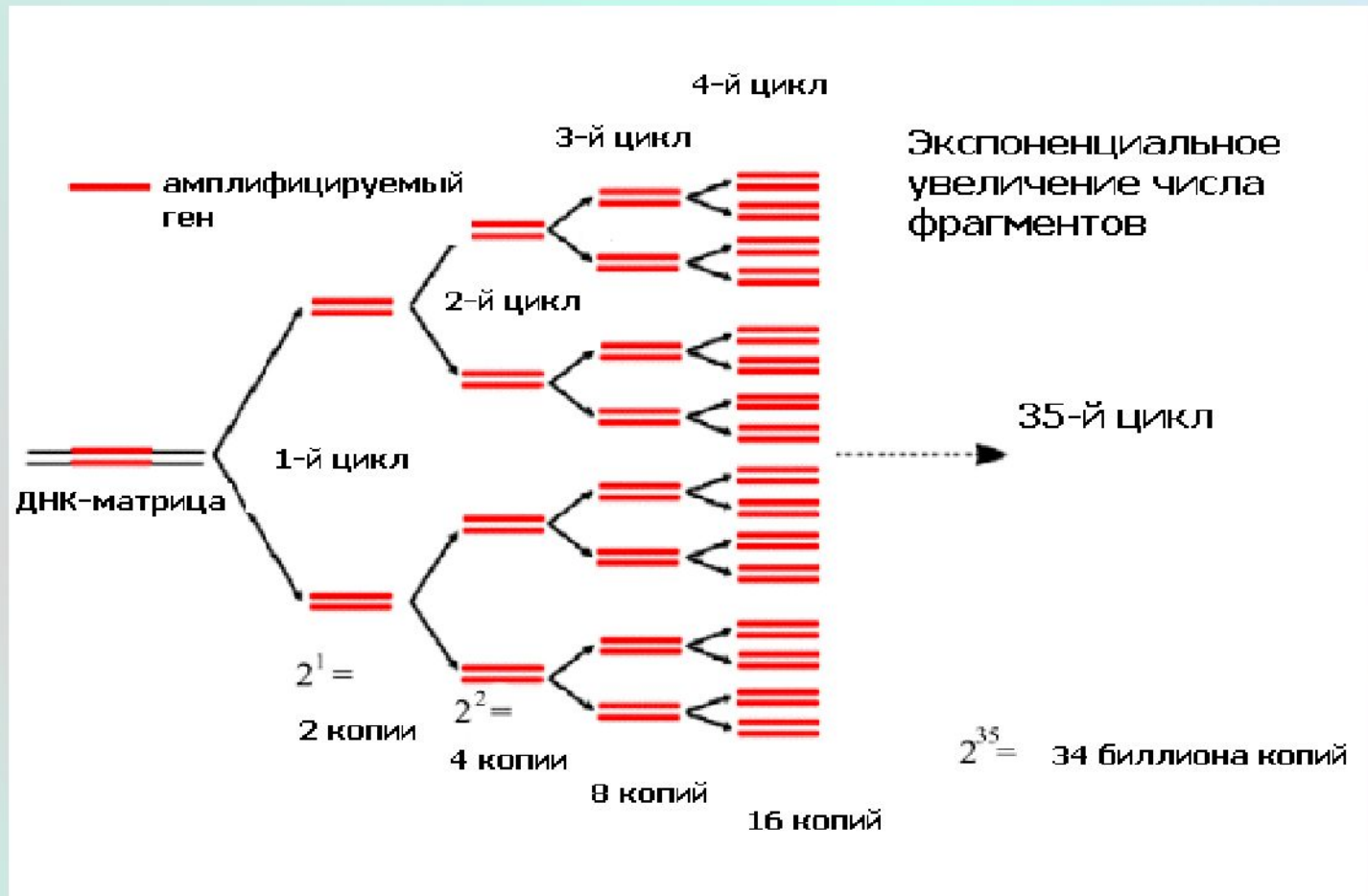


Этап 2: Отжиг праймеров



Этап 3: Синтез цепи ДНК

# Полимеразная цепная реакция



# Генетическая диагностика

- Моногенные наследственные заболевания
- Мультифакторные заболевания
- Фармакогенетика
- Онкогенетика

# Генетически детерминированные заболевания

<b>Группа болезней</b>	<b>Число</b>
Хромосомные болезни	<b>100</b>
Моногенные болезни	<b>6000</b>
Мультифакториальные болезни	<b>500</b>

# 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 вязки секретом.

Изменения белка (трансмембранного регулятора, CFTR), обеспечивающего функцию хлоридного канала приводит к нарушению транспорта хлоридов и воды в эпителиальных клетках. 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.** МД ~ 1:2000 – 1:4000 новорожденных

**Молекулярная генетика.** 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). До 70% всех случаев – делеция 3 п.н. в кодоне 508 - ΔF-508, приводящая к делеции фенилаланина в белке.



# Гены предрасположенности

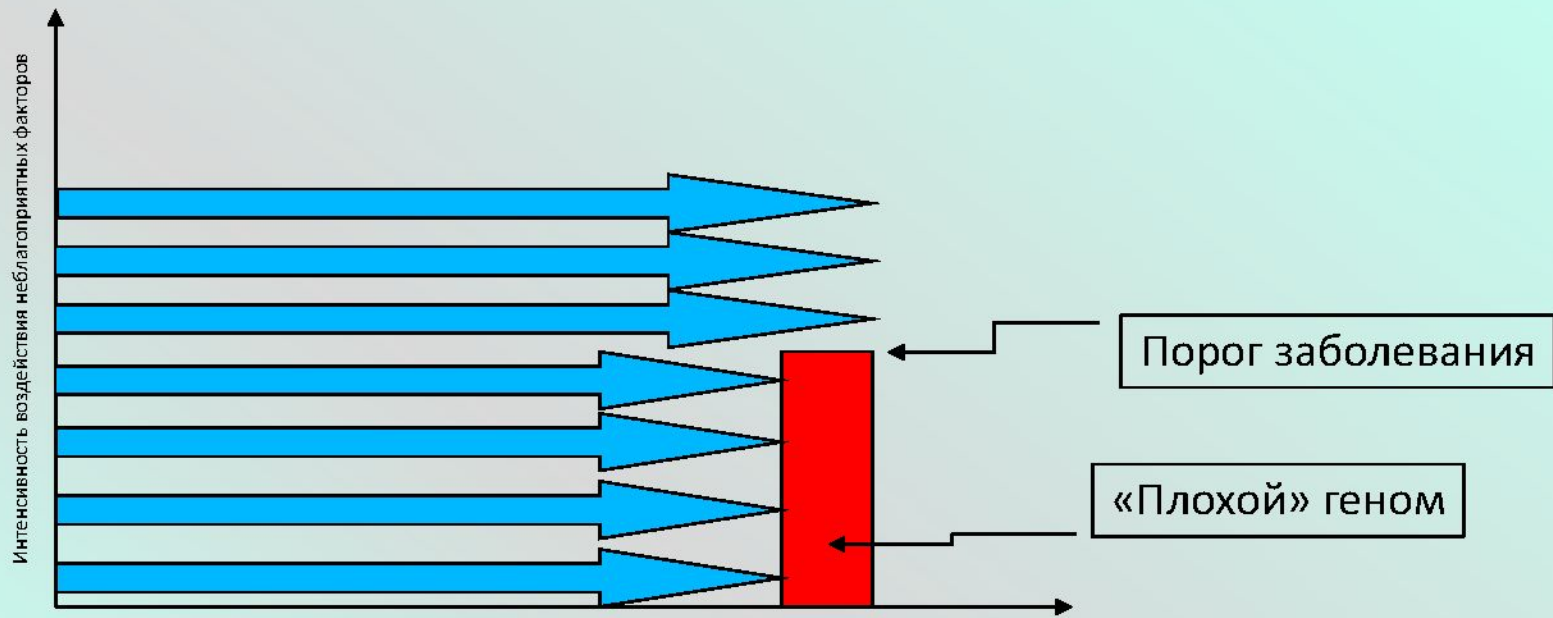
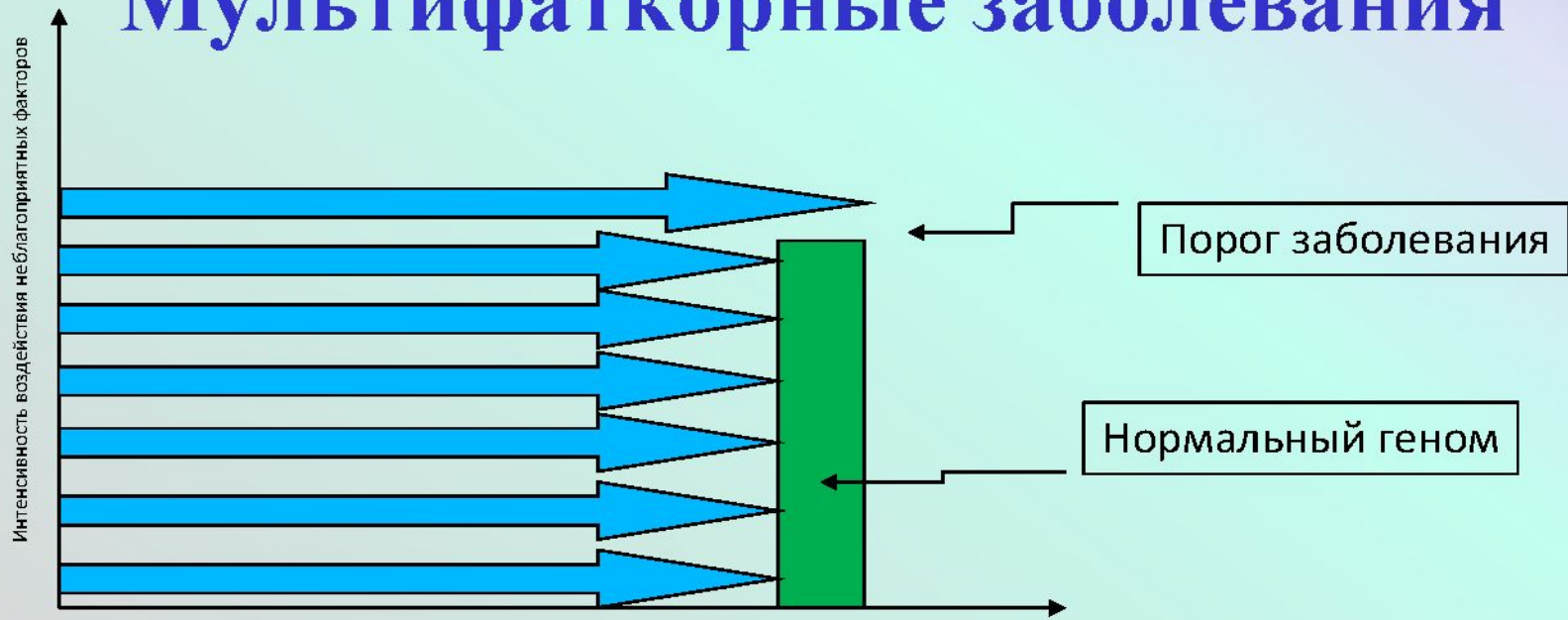
Многие болезни имеют генетическую предрасположенность.

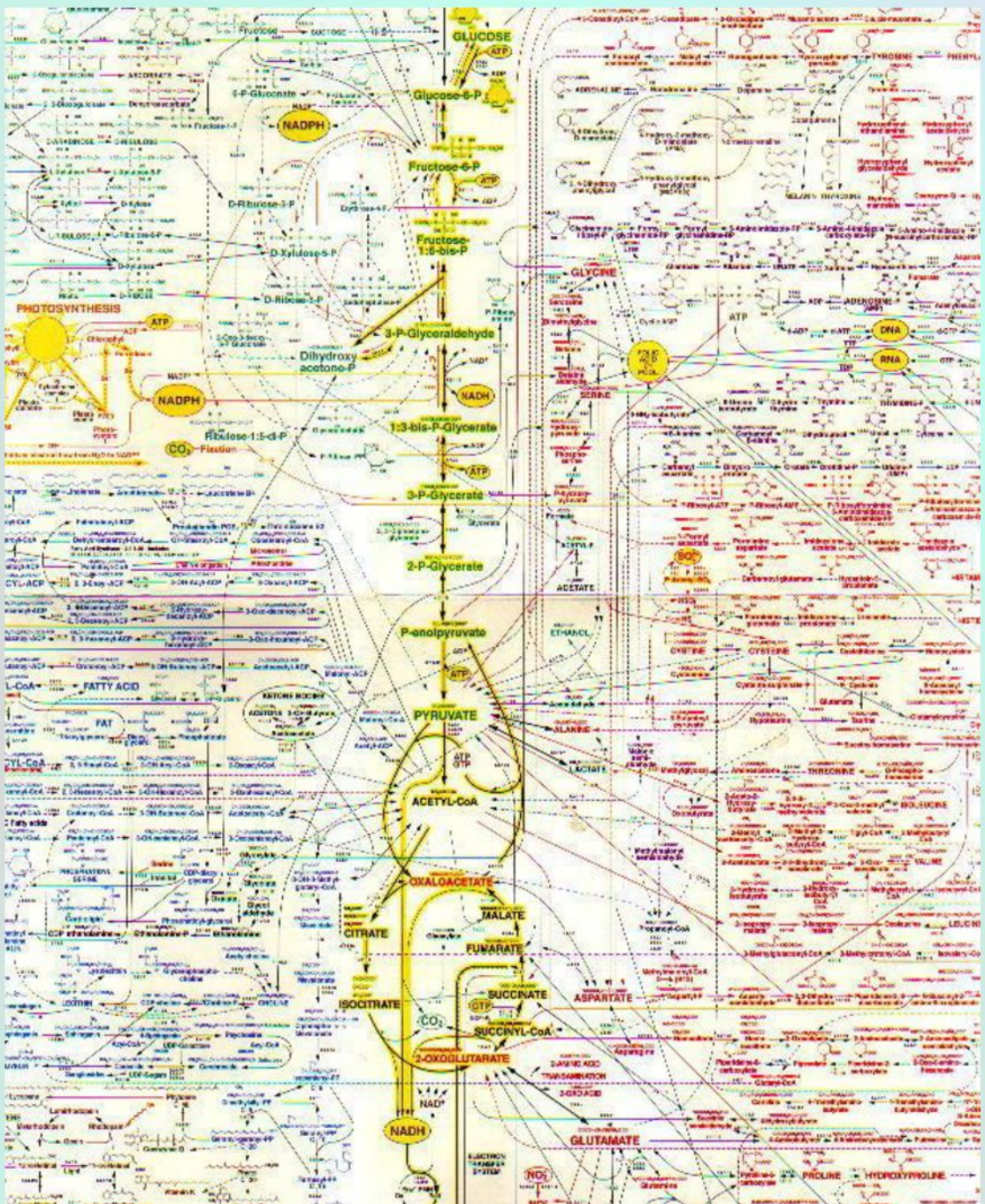
Существует множество однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), не приводящих зачастую к изменению функций кодируемых белков, но при этом имеющих четкие ассоциации с заболеваниями.

На данный момент такие исследования продолжают проводиться, так как для утверждения об ассоциации полиморфизма с конкретным заболеванием и оценки степени этой ассоциации (она 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 $\beta$  увеличивает вероятность развития рака молочной железы примерно на 7% при наличие 1 копии и на 17% в случаях, когда «плохие» обе копии гена).

Достоверность данных об ассоциации в значительной степени зависит от объема исследуемой выборки. Кроме того важно, чтоб результаты конкретного исследования были подтверждены другой работой. При этом существует еще и определенная роль популяционных вариаций и скажем исследования проведенные на азиатской группе обследуемых не всегда и не в полной мере соответствуют данным полученным у европеоидной популяции.

# Мультифакторные заболевания





# Гены предрасположенности к развитию РГН

(Astanand Jugessur, Min Shi, Håkon Kristian Gjessing et al., 2009)

**MDR1** - ген множественной лекарственной резистентности - точки C1236T и C3435T

**MTHFR** - ген метилентетрагидрофолатредуктазы – точка C677T

**IRF6** - ген интерферон-регулирующего фактора 6 - точка rs2013162 и 274 кодон

**ADH1C** - ген алкогольдегидрогеназы - точки rs698, rs1693482 и rs2241894

**WNT** - ген белка сигнального пути Wnt - точки rs752107, rs1533767, rs1745420 и rs70602

**CYP1A1** - ген арилуглеводородкарбоксилазы, кодирующий фермент участвующий в метаболизме веществ, содержащихся в табачном дыме - точка rs4646421

**NAT2A** - ген ариламин-N-ацетилтрансферазы. Этот фермент катализирует ацетилирование ароматических и гетероциклических аминов и относится к ферментам II фазы биотрансформации ксенобиотиков.- точка rs1799930

## Инфаркт миокарда

Ген/Локус <sup>1</sup>	Однонуклеотидный полиморфизм <sup>1</sup>	Ваш генотип <sup>2</sup>	Соотношение шансов <sup>3</sup>	Ассоциированная аллель <sup>2</sup>	Частота в популяции <sup>4</sup>	Подтвержденный маркер <sup>5</sup>	PMID <sup>6</sup>
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

# Молекулярно-генетическая диагностика в онкологии

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

# Персонализация лекарственной терапии

Правильная доза

правильного препарата

правильному пациенту в

правильных 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 тромбозы, 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 (rs1799853) и CYP2 C9\*3 (rs1057910)- аллельные варианты (полиморфные маркеры) гена CYP2 C9 (кодирует основной фермент биотрансформации варфарина)/

Полиморфный маркер G3673 A (rs9923321) гена VKORC1 (кодирует молекулу-мишень для варфарина — субъединицу 1 витамин К эпиксидредуктазного 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

# Оборудование для кариотипирования и регистрации флуоресцентных молекулярных методов



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



# Аппаратурное обеспечение для определения нуклеотидных последовательностей (секвенирование)



## **Некоторые общие методические приемы, которые могут быть использованы при решении задач**

- Каждая гамета получает гаплоидный набор хромосом (генов). Все хромосомы (гены) имеются в гаметах.**
- В каждую гамету попадает только одна гомологичная хромосома из каждой пары (только один ген из каждой аллели).**
- Число возможных вариантов гамет равно  $2^n$ , где  $n$  – число хромосом, содержащих гены в гетерозиготном состоянии.**
- Одну гомологичную хромосому (один аллельный ген) из каждой пары ребенок получает от отца, а другую (другой аллельный ген) – от матери.**
- Гетерозиготные организмы при полном доминировании всегда проявляют доминантный признак. Организмы с рецессивным признаком всегда гомозиготны.**
- Решение задачи на дигибридное скрещивание при независимом наследовании обычно сводится к последовательному решению двух задач на моногибридное (это следует из закона независимого наследования).**

Для облегчения решения можно записать схему брака (скрещивания) на черновике, отмечая фенотипы и генотипы особей, известных по условию задачи, а затем начать выполнение операций по выяснению неизвестных генотипов. Для удобства неизвестные гены на черновике можно обозначать значками \*, \_ или ?.

Выяснение генотипов особей, неизвестных по условию, является основной методической операцией, необходимой для решения генетических задач. При этом решение всегда надо начинать с особей, несущих рецессивный признак, поскольку они гомозиготны и их генотип по этому признаку однозначен –  $aa$ .

Выяснение генотипа организма, несущего доминантный признак, является более сложной проблемой, потому что он может быть гомозиготным ( $AA$ ) или гетерозиготным ( $Aa$ ).

При оформлении задач необходимо уметь пользоваться символами, принятыми в традиционной генетике и приведенными ниже:

символ	обозначает
♀	женский организм
♂	мужской организм
x	знак скрещивания
P	родительские организмы
F <sub>1</sub> , F <sub>2</sub>	дочерние организмы первого и второго поколения
A, B, C...	гены, кодирующие доминантные признаки
a, b, c...	аллельные им гены, кодирующие рецессивные признаки
AA, BB, CC...	генотипы особей, моногетерозиготных по доминантному признаку
Aa, Bb, Cc...	генотипы моногетерозиготных особей
aa, bb, cc...	генотипы рецессивных особей
AaBb, AaBbCc	генотипы ди- и тригетерозигот
A B, CD a b cd	генотипы дигетерозигот в хромосомной форме при независимом и сцепленном наследовании
A, a, AB, cd	гаметы



## Пример записи схемы скрещивания (брака)

A – желтая окраска семян, a – зеленая окраска семян.

Запись в буквенной форме:				Запись в хромосомной форме:			
<u>P</u>	♀ <u>Aa</u>	×	♂ <u>aa</u>	<u>P</u>	♀ A a	×	♂ a a
	желтая		зеленая		желтая		зеленая
гаметы	○ A    ○ a		○ a	гаметы	○ A	○ a	○ a
F <sub>1</sub>	<u>Aa</u>		<u>aa</u>	F <sub>1</sub>	A a		a a
	желтая		зеленая		желтая		зеленая
	50%		50%		50%		50%

Ген черной масти у крупнорогатого скота доминирует над геном красной масти. Какое потомство  $F_1$  получится от скрещивания чистопородного черного быка с красными коровами? Какое потомство  $F_2$  получится от скрещивания между собой гибридов?

### Решение

**A** – ген черной масти,

**a** – ген красной масти.

Красные коровы несут рецессивный признак, следовательно, они гомозиготны по рецессивному гену и их генотип – **aa**.

Бык несет доминантный признак черной масти и является чистопородным, т.е. гомозиготным. Следовательно, его генотип – **AA**.

Гомозиготные особи образуют один тип гамет, поэтому черный бык может продуцировать только гаметы, несущие доминантный ген **A**, а красные коровы несут только рецессивный ген **a**.

Они могут сочетаться только одним способом, в результате чего образуется единообразное поколение  $F_1$  с генотипом **Aa**.

Гетерозиготы с равной вероятностью формируют гаметы, содержащие гены **A** и **a**. Их слияние носит случайный характер, поэтому в  $F_2$  будут встречаться животные с генотипами **AA** (25%), **Aa** (50%) и **aa** (25%), то есть особи с доминантным признаком будут составлять примерно 75%.

### Схема скрещивания

P	♀ <u>aa</u> красные	×	♂ <u>AA</u> черный
гаметы	○ a		○ A
F <sub>1</sub>	<u>Aa</u> 100% черные		
F <sub>1</sub>	♀ <u>Aa</u> черные	×	♂ <u>Aa</u> черные
гаметы	○ A    ○ a		○ A    ○ a
F <sub>2</sub>	<u>AA</u> <u>Aa</u>		<u>Aa</u> <u>aa</u>
	75% черные		25% красные

### Ответ

При скрещивании чистопородного черного быка с красными коровами все потомство будет черного цвета. При скрещивании между собой гибридов F<sub>1</sub> в их потомстве (F<sub>2</sub>) будет наблюдаться расщепление: 3/4 особей будет черного цвета, 1/4 – красного.

Одна из форм шизофрении наследуется как рецессивный признак.

Определить вероятность рождения ребенка с шизофренией от здоровых родителей, если известно, что бабушка со стороны отца и дед со стороны матери страдали этими заболеваниями.

### Решение

Мужчина и женщина здоровы, следовательно, они несут доминантный ген **A**. У каждого из них один из родителей нес рецессивный признак шизофрении (**aa**), следовательно, в их генотипе присутствует также рецессивный ген **a**, и их генотип – **Aa**.

P	♀ <u>Aa</u> здорова		×	♂ <u>Aa</u> здоров	
гаметы	○ A	○ a		○ A	○ a
F <sub>1</sub>	<u>AA</u> здоров 25%	<u>Aa</u> здоров 25%		<u>Aa</u> здоров 25%	<u>aa</u> болен 25%

Вероятность появления больного ребенка равна 1/4 (число событий, при котором появляется генотип **aa**, равно 1, число всех возможных событий равно 4).

### Ответ

Вероятность рождения ребенка, больного шизофренией, равна 25% (1/4).

У человека альбинизм – аутосомный рецессивный признак. Мужчина альбинос женился на женщине с нормальной пигментацией. У них родилось двое детей – нормальный и альбинос. Определить генотипы всех указанных членов семьи.

Ген доминантного признака шестипалости (**A**) локализован в аутосоме. Ген рецессивного признака дальтонизма (**d**) расположен в **X**-хромосоме. От брака шестипалого мужчины-дальтоника и здоровой женщины родился шестипалый сын-дальтоник и здоровая дочь. Каковы генотипы родителей и детей?

Женщина-правша с карими глазами и нормальным зрением выходит замуж за голубоглазого мужчину-правшу дальтоника. У них родилась дочь с голубыми глазами, левша и дальтоник. Какова вероятность того, что следующий ребенок у них будет иметь такие же признаки, если известно, что карий цвет глаз и преимущественное владение правой рукой – доминантные признаки, гены которых расположены в разных аутосомах, а дальтонизм кодируется рецессивным, сцепленным с **X**-хромосомой геном?

**наследование групп крови** системы АВ0. Наличие той или иной группы крови определяется парой генов (точнее, локусов), каждый из которых может находиться в трех состояниях ( $J^A$ ,  $J^B$  или  $j^0$ ). Генотипы и фенотипы лиц с разными группами крови приведены в таблице 1.

**Таблица 1. Наследование групп крови системы АВ0**

Группа	Генотип
I (0)	$j^0j^0$
II (A)	$J^AJ^A, J^AJ^0$
III (B)	$J^BJ^B, J^BJ^0$
IV (AB)	$J^AJ^B$

У мальчика I группа, у его сестры – IV. Что можно сказать о группах крови их родителей?

В родильном доме перепутали двух детей. Первая пара родителей имеет I и II группы крови, вторая пара – II и IV. Один ребенок имеет II группу, а второй – I группу. Определить родителей обоих детей.

Глухота и болезнь Вильсона (нарушение обмена меди) – рецессивные признаки. От брака глухого мужчины и женщины с болезнью Вильсона родился ребенок с обеими аномалиями. Какова вероятность рождения в этой семье здорового ребенка?

### Решение

**A** – нормальный слух, **a** – глухота, **B** – нормальный обмен меди, **b** – болезнь Вильсона.

Ребенок болеет глухонемой и болезнью Вильсона (рецессивные признаки), значит, его генотип – **aabb**.

Мужчина глухой, следовательно, он гомозиготен по рецессивному признаку глухоты (**aa**). Он не страдает болезнью Вильсона, значит, имеет доминантный ген **B**. Мужчина должен иметь также рецессивный ген **b**, так как у него есть ребенок с этим заболеванием. Следовательно, генотип мужчины – **aaBb**.

Женщина страдает болезнью Вильсона, значит, она гомозиготна по рецессивному гену **b**. Она имеет нормальный слух (ген **A**), но у нее есть ребенок с глухонемой (гомозиготный по рецессивному гену **a**). Поэтому генотип женщины – **Aabb**

### Схема брака

P	♀ <u>Aabb</u> нормальный слух, <u>б. Вильсона</u>		×	♂ <u>aaBb</u> глухота, нормальный обмен	
гаметы	○ <u>Ab</u>	○ <u>ab</u>		○ <u>aB</u>	○ <u>ab</u>
F <sub>1</sub>	<u>AaBb</u> здоров 25%	<u>Aabb</u> б. Вильсона 25%		<u>aaBb</u> глухота 25%	<u>aabb</u> глухота, б. Вильсона 25%

Вероятность рождения здорового ребенка определяется по [формуле \(1\)](#) и равна отношению числа ожидаемых событий (рождение здорового ребенка – 1) к числу всех возможных событий (4), в данном случае она равна 1/4 (25%).

#### Ответ

Вероятность рождения здорового ребенка – 1/4 (25%).



Классическая гемофилия передается как рецессивный, сцепленный с X-хромосомой, признак. Мужчина, больной гемофилией, женился на здоровой женщине (все ее предки были здоровы). У них родилась здоровая дочь. Определить вероятность рождения больного гемофилией ребенка от брака этой дочери со здоровым мужчиной.

**СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!**

Абрамов Александр Андреевич  
arhelios@yandex.ru