

**Семинар**

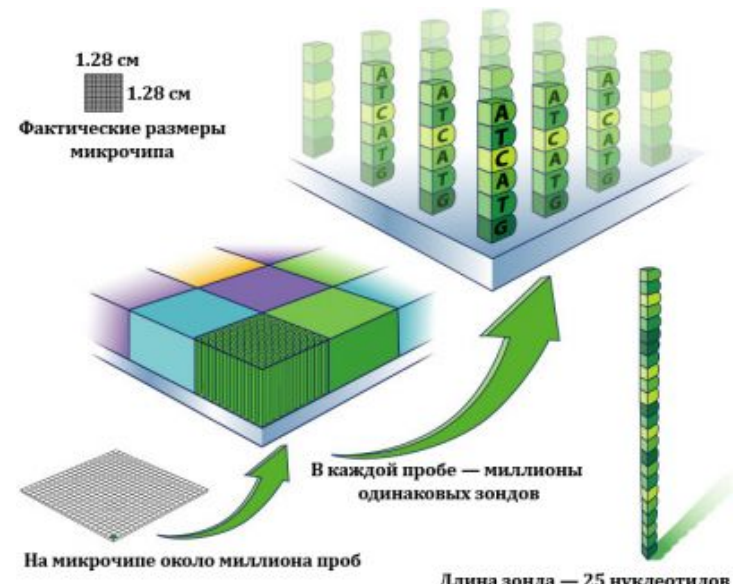
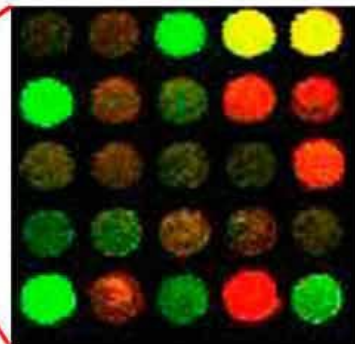
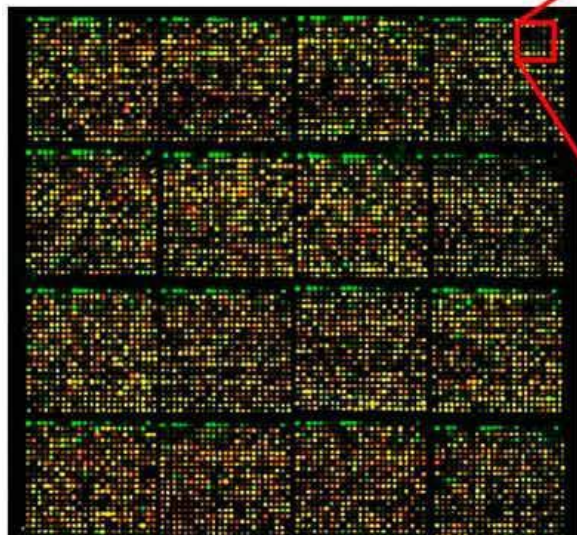
**Медицинская генетика**

**Фармация Курс 3 ЦИОП «Медицина  
будущего»**

**Методы полногеномного анализа в  
медицине**

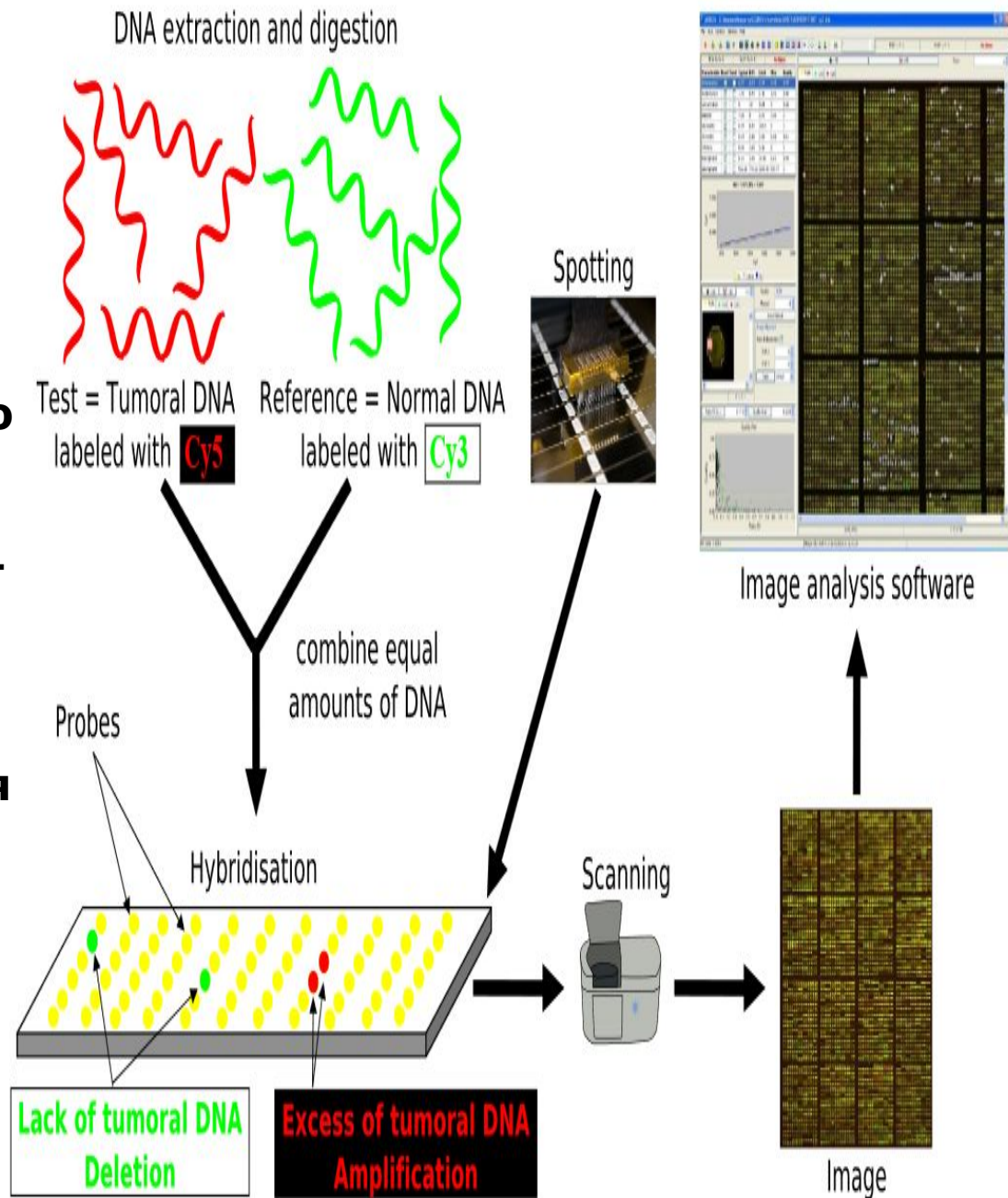
- Одним из основных достижений последних лет следует считать переход от исследования единичных генов, маркеров и полиморфизмов, к комплексным исследованиям сразу множества генов или продуктов их экспрессии
- **Технология микрочипов.** Микрочип – совокупность ДНК последовательностей генома человека, закрепленная на твердой подложке в компьютерные программы для анализа результатов

Результат ДНК-микрочипового исследования

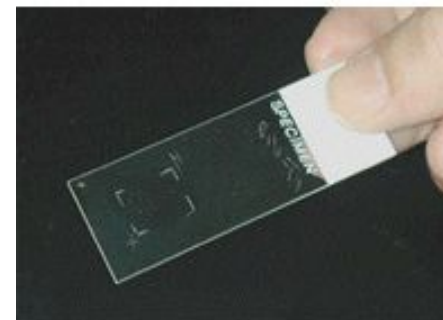


**Принцип полногеномного исследования с помощью микрочипов:**

- 1. Выделение геномной ДНК из тестируемого и референсного образцов, обработка нуклеазой и получение пула фрагментов.**
- 2. Мечение ДНК тестируемого образца флуорофором Cy5, референсного – Cy3.**
- 3. Гибридизация. Смешивают эквимольные количества меченой ДНК двух образцов, денатурируют, наносят на микрочип, далее – инкубация и отмывка.**
- 4. Визуализация. Флуоресцентный сканирующий микроскоп с необходимыми фильтрами и высоким разрешением.**



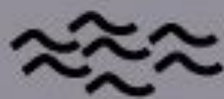
# Экспрессионные микрочипы – исследуют результат работы генов, их экспрессию



glass slide on which a microarray  
experiment take place

## Prepare cDNA Probe

"Normal"



Tumor



RT / PCR

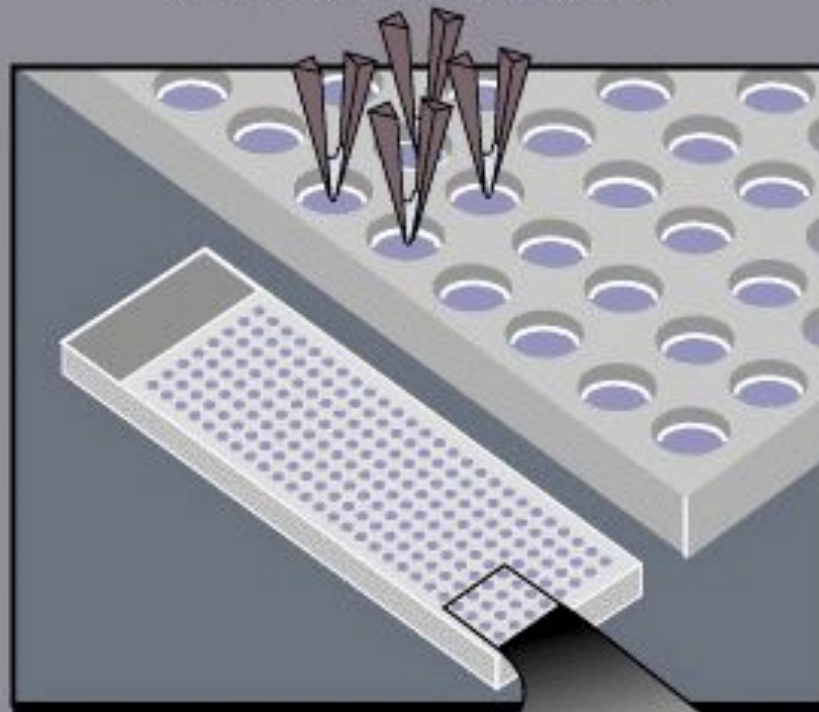
Label with  
Fluorescent Dyes



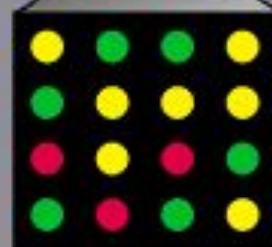
Combine  
Equal  
Amounts

Hybridize  
probe to  
microarray

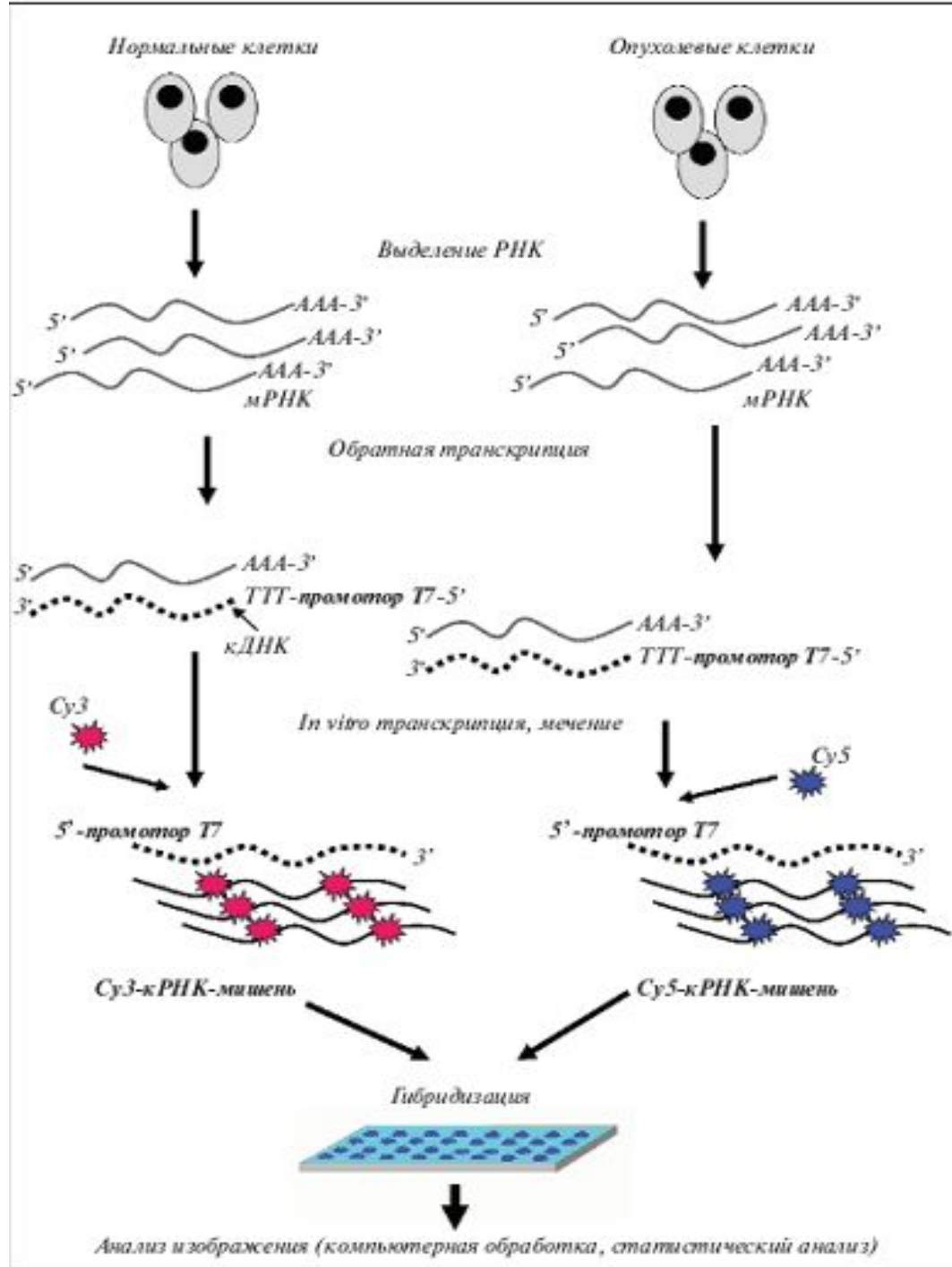
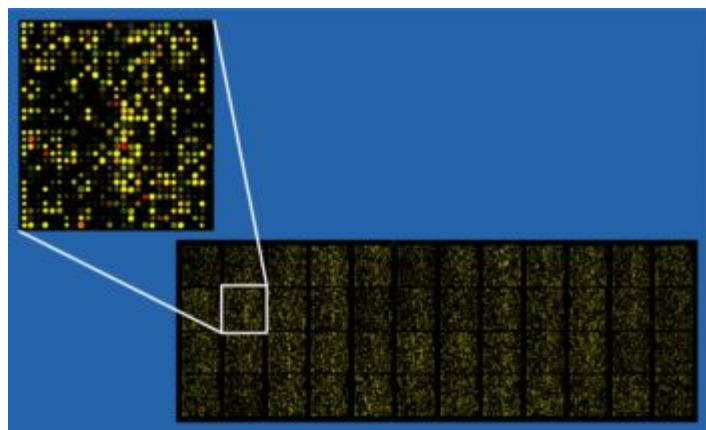
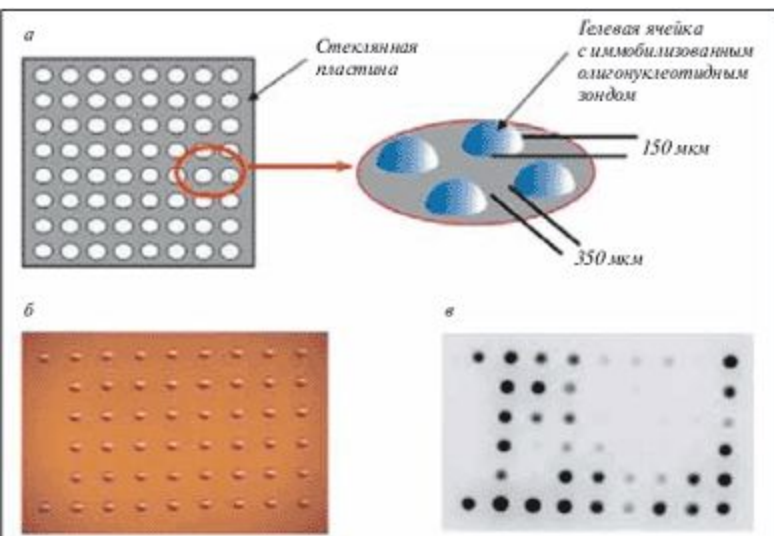
## Prepare Microarray



SCAN



# Исследование экспрессионных профилей



**Экспрессионные микрочипы позволяют определить различия экспрессионного профиля в нормальной и опухолевой ткани**

- **позволяют идентифицировать дополнительные экспрессионные маркеры, связанные с клиническим течением, появлением инвазии и метастазирования**
- **предложить новую классификацию опухолей определенного типа, основанную на различии экспрессионных профилей, внести дополнение в морфологическую классификацию**
- **позволяют определять гены, со специфической экспрессией, характерной для определенного типа опухоли, которые получили название *генетической подписи***

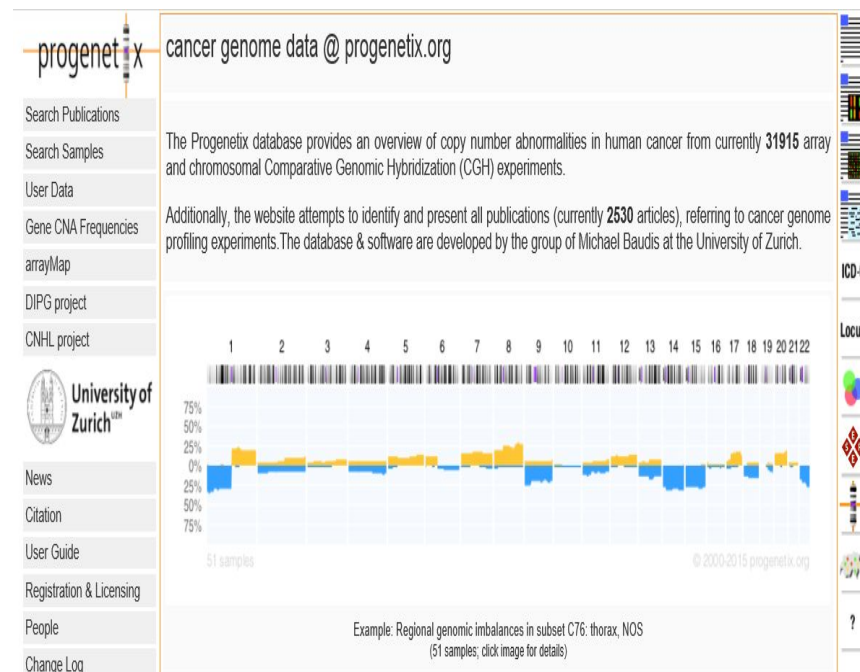
# Сравнительная геномная гибридизация

Сравнительная геномная гибридизация (CGH – comparative genomic hybridization) – метод молекулярной цитогенетики, позволяющий выявлять отклонения от нормы в количестве копий локусов ДНК (CNV – copy number variations).

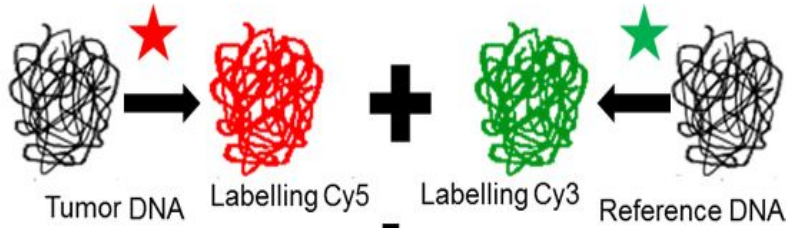
Впервые CGH провели Kallioniemi et al. в 1992 г. в University of California для анализа первичных опухолей при раке мочевого пузыря и клеточных линий рака молочной железы. Первоначальный вариант CGH, в котором роль зондов выполняет ДНК цитологического препарата, называют обычной (conventional) CGH. Современный высокоразрешающий CGH, в котором тысячи зондов иммобилизованы на гибридизационном микрочипе – array-CGH.

Области применения CGH:

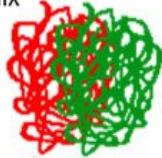
1. Обнаружение CNV в опухолях. Субмикроскопические делеции/инсерции – частые типы мутаций в канцерогенезе. Информацию о разных CGH-экспериментах в онкологии собирают в проекте Progenetix.
2. Хромосомные мутации при наследственных и врожденных заболеваниях: диагностика микроделеционных синдромов, пренатальная диагностика небольших делеций/инсерций.



# Сравнительная геномная гибридизация

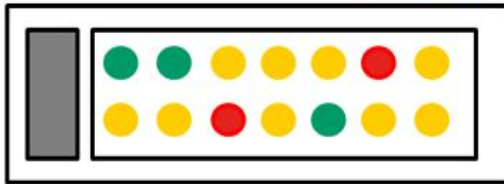


Labelled DNA mix

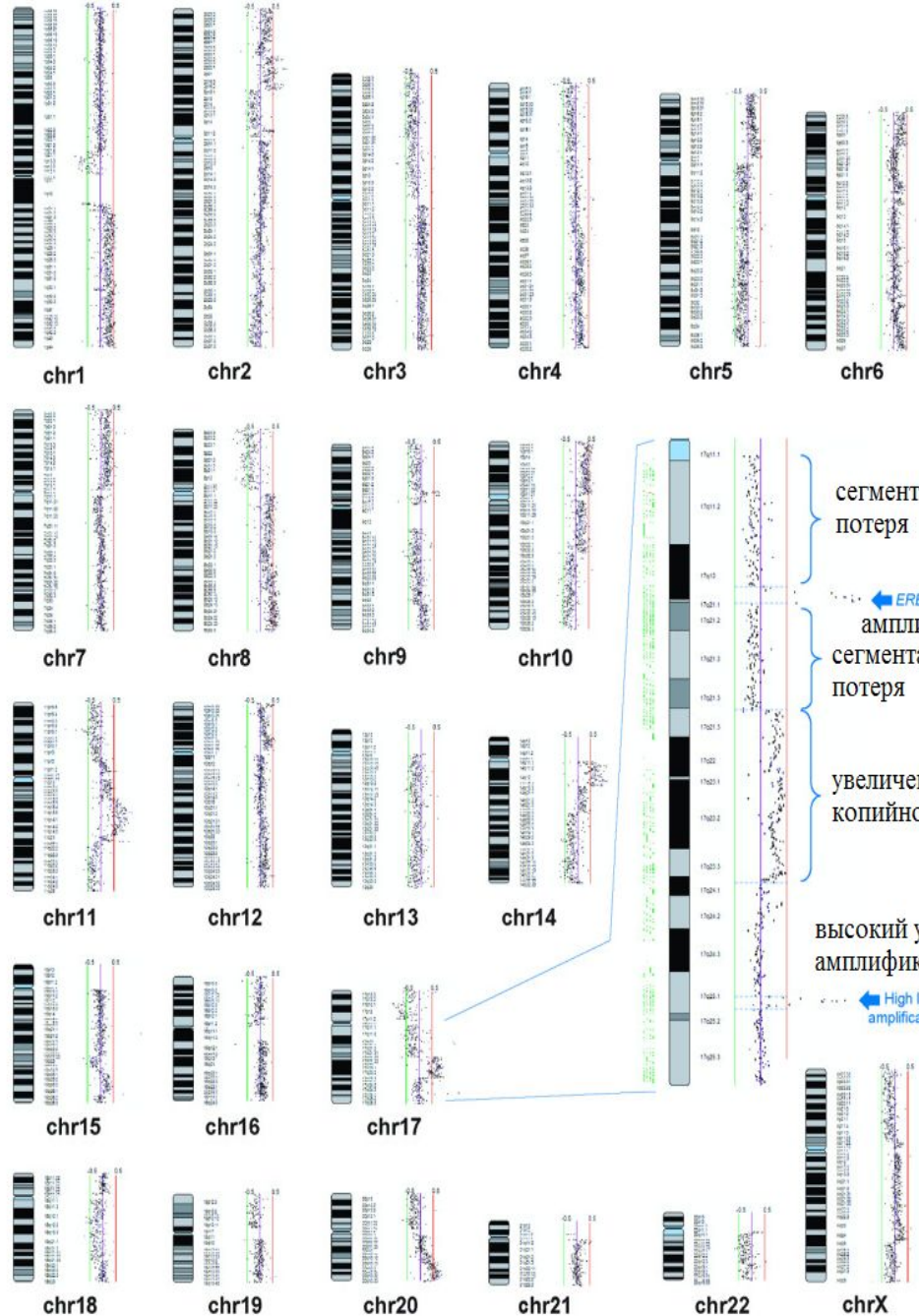
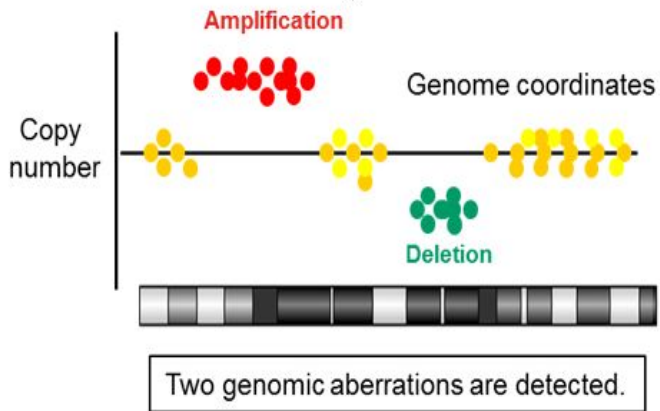


● DNA Amplification (Red)  
 ● DNA Deletion (Green)  
 ● Balanced DNA (Yellow)

Hybridization on array CGH



Data interpretation  
 Bioinformatics tools





**Array-CGH** – молекулярно-цитогенетический метод, представляющий собой усовершенствование обычной (conventional) CGH с существенно более высокой разрешающей способностью вследствие использования гибридных микрочипов, содержащих до 2 млн зондов.

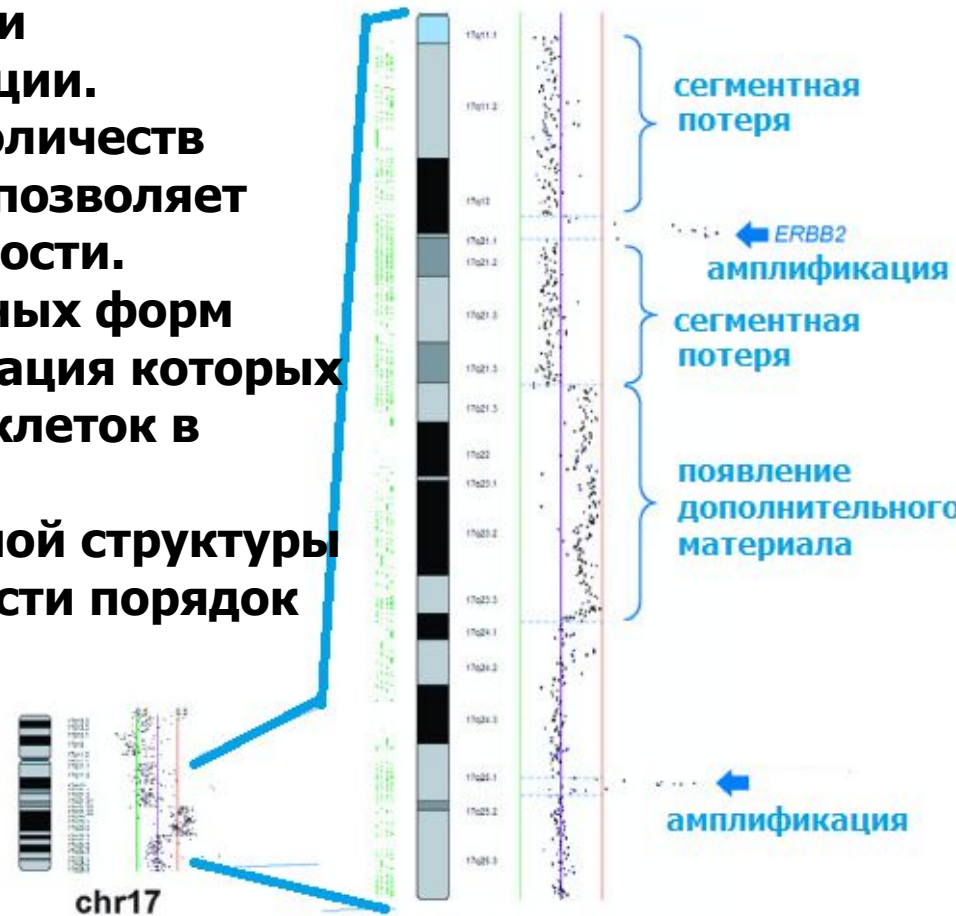
Впервые array-CGH провели Solinas-Tolodo et al. и Pinkel et al. в 1997-1998 гг. для анализа клеток злокачественных опухолей. Сейчас метод позволяет **детектировать CNV** с разрешением 5-10 т.п.н. вместо 2-5 млн.п.н. обычной CGH (некоторые модификации high-resolution array-CGH могут детектировать CNV на участке менее 1 т.п.н.), можно разделить на полногеномный array-CGH (зонды равномерно покрывают весь геном) и таргетный array-CGH (зонды покрывают только интересующую область(и)/гены, но с более высокой плотностью, чем в первом варианте).

Array-CGH на основе conventional CGH стало возможным благодаря:

- . Завершению проекта «Геном человека» – появилась возможность получать зонды к любой интересующей нуклеотидной последовательности. Сейчас зонды можно получать из кДНК, ПЦР-продуктов, ВАС-клонов (ВАС – bacterial artificial chromosome).
- . Развитию микрочиповых технологий – сейчас производят микрочипы высокой плотности в промышленных масштабах.
- . Развитию программного обеспечения – высокопроизводительные компьютеры и софт для обработки миллионов флуоресцентных сигналов от одного образца и выстраивание диаграммы ploidy участков хромосом.

## Ограничения метода CGH :

1. Невозможность определения сбалансированных хромосомных перестроек и полиплоидии. Сбалансированные aberrации хромосом не приводят к изменению числа копий ДНК, поэтому и не могут быть выявлены при помощи сравнительной геномной гибридизации. Использование в реакции равных количеств тестируемой и контрольной ДНК не позволяет диагностировать нарушения ploидности.
2. Сложности в диагностике мозаичных форм хромосомных аномалий, идентификация которых зависит от количества аномальных клеток в исследуемом образце.
3. Невозможность определения точной структуры хромосомной перестройки. В частности порядок и ориентация сегментов хромосом, вовлеченных в перестройку, не могут быть определены с помощью CGH и требуют применения дополнительных методов исследования.
4. Невозможность определения точковых мутаций



# Кариотип 1956 - 2014

---

## ХРОМОСОМНЫЙ МИКРОМАТРИЧНЫЙ АНАЛИЗ ЗАМЕНИЛ ИССЛЕДОВАНИЕ КАРИОТИПА

---

Хромосомный  
микроматричный  
анализ внедрен в  
ведущих генетических  
лабораториях РФ

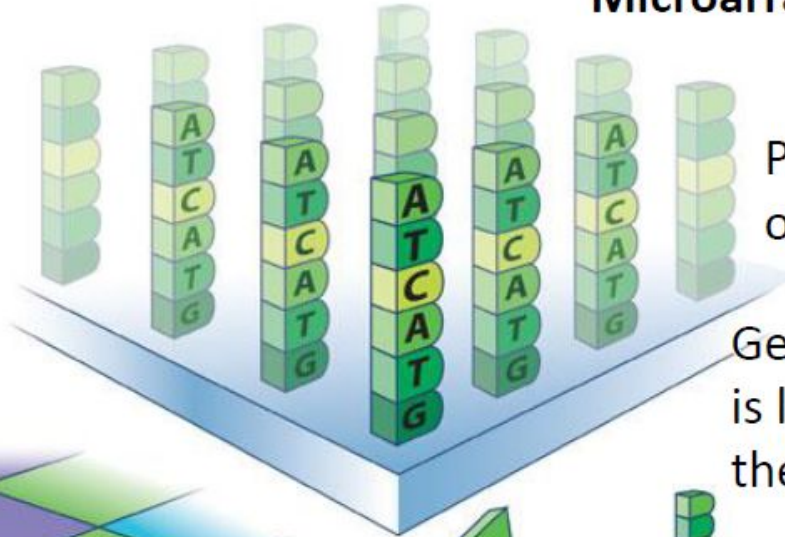
Организовано обучение  
молекулярных  
цитогенетиков

Разработка  
национальных  
рекомендаций по  
молекулярной  
цитогенетике.

# ЧТО ТАКОЕ МИКРОМАТРИЦА?

## Microarray:

1.28 cm  
1.28 cm  
Actual size of  
GeneChip® array



Probes are immobilised on array

Genomic DNA in solution is labelled and added to the array of probes

**Для диагностики  
гибридизация с  
нормальной ДНК не  
используется, а  
информация о  
нормальном  
распределении сигнала  
уже имеется в софте, с  
ней ведется сравнение**

Probes are synthesised onto the array. Their sequences are complementary to millions of different genomic targets

Millions of locations available on each GeneChip array

The probes are all between 25 and 49 bp in length



# ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МИКРОМАТРИЦЫ CytoScan HD

- **Лучшее покрытие всего генома чем у любых других микроматриц**
  - Покрытие >36,000 RefSeq генов - 1 маркер на 880 оснований
  - Некодирующие участки - 1 маркер на 1 737 оснований
- **Высокая плотность SNPs и CN маркеров перекрывающая весь геном**
  - 2.67 миллионов маркеров, включая:
    - 750,000 SNPs
    - 1.9 миллиона непалиморфных проб
- **Увеличенная плотность маркеров в конституциональных и опухолевых генах**
  - Гены, рекомендуемые ISCA (1 маркер / 384 нуклеотида)
  - Опухолевые гены (1 маркер / 553 нуклеотида)
  - X хромосома (1 маркер / 486 нуклеотидов)
  - 12,000 OMIM генов (1 маркер / 659 нуклеотидов)
- **Время анализа от образца до результата 2.5 дня**
- **Программное обеспечение для анализа и формирования отчета**
- **Подбор оптимальных маркеров.**
  - Все маркеры эмпирически отобраны из >20 миллионов маркеров
  - Клинические испытания проведены на более чем 3,000 пациентах.



# ВОЗМОЖНОСТИ SNP

- Детекция потери гетерзиготности, однородительских дисомий и родства
- Анализ числа аллельспецифических копий и подтверждение отцовства (материнства).
- Дополнительное подтверждение изменений количества генетического материала
- Возможность дифференцировать триплоидии, гетерогенность образца, и контаминацию материнской ДНК при пренатальной диагностике.
- Увеличенная чувствительность позволяющая измерять уровень мозаицизма и оценивать качество образца.

Высокая плотность SNP (>500000) позволяет получить разрешение на уровне отдельных генов



# ХРОМОСОМНЫЙ МИКРОМАТРИЧНЫЙ АНАЛИЗ ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ

Сбалансированные перестройки (инверсии, транслокации)

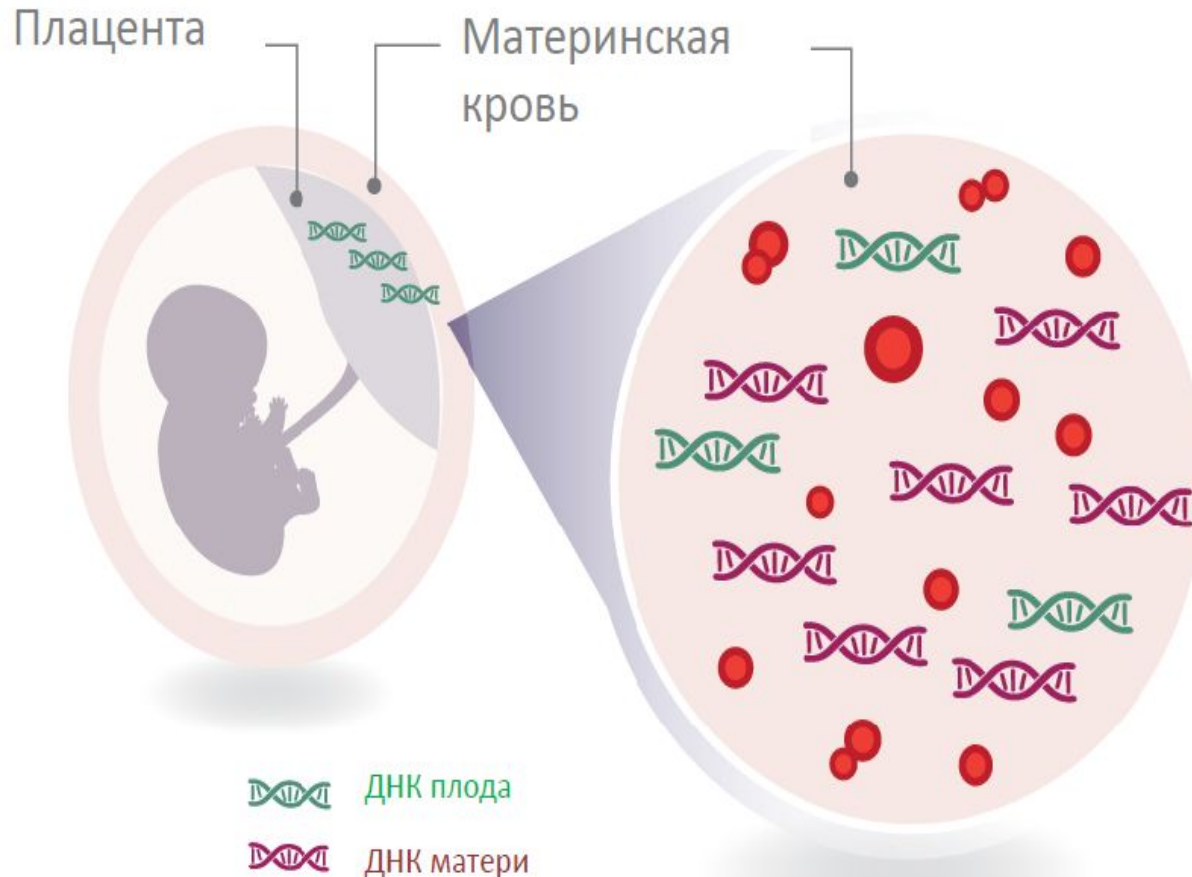
Точковые мутации

Болезни экспансии (синдром ломкой X хромосомы)





# Внеклеточная фетальная ДНК (cfDNA)



2000г.

Количественная ПЦР (Q-PCR)

2005г.

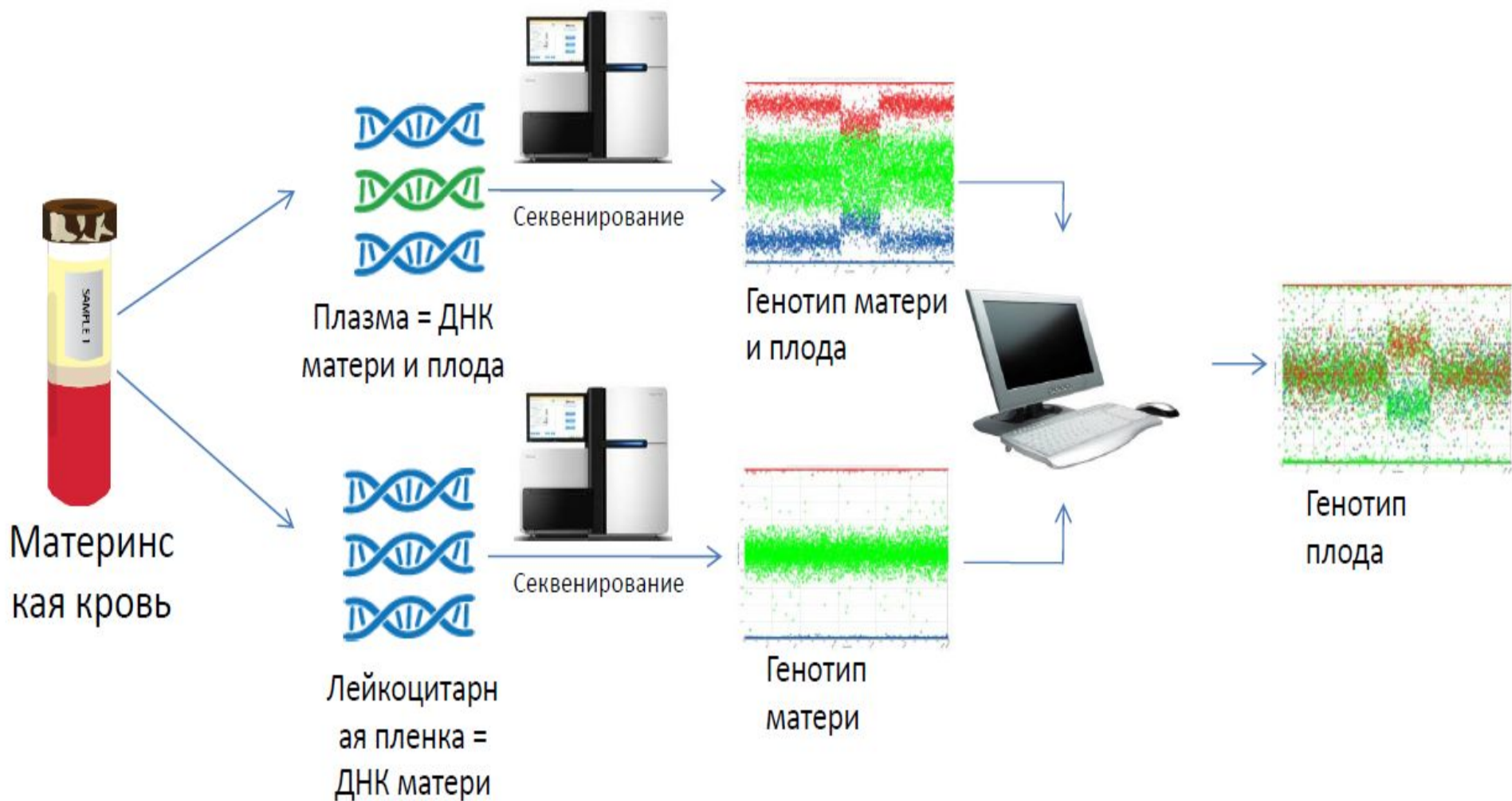
Времяпролетная масс-спектрометрия (MALDI-TOF MS)

2010г.

Массивное параллельное секвенирование – секвенирование следующего поколения (NGS)

Lo, Y. M., et al. (1998). "Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis".  
*American Journal of Human Genetics*. 62 (4): 768-775.

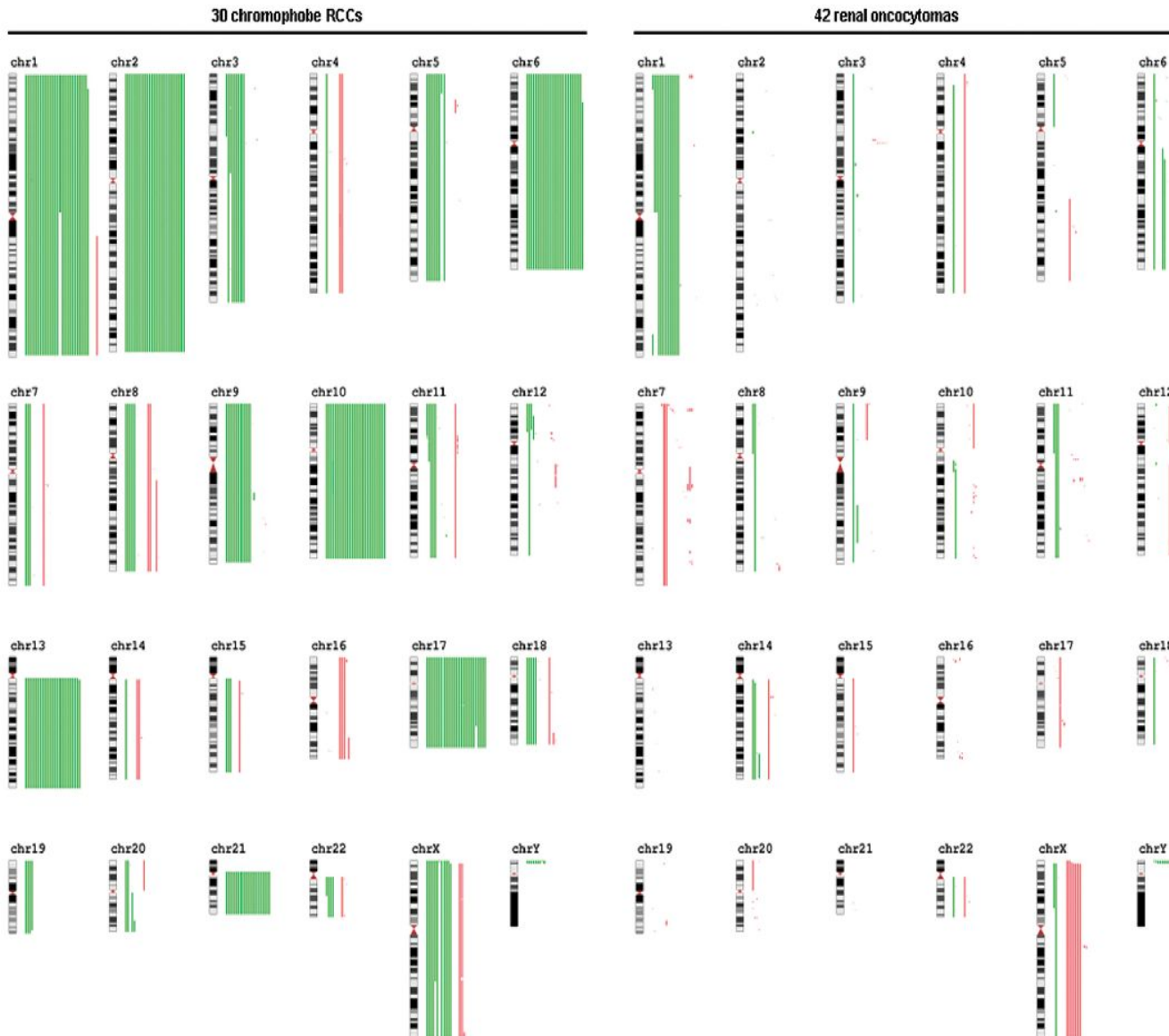
# Как работает неинвазивный пренатальный ДНК тест (SNP)



# **Сравнительная геномная гибридизация в онкологии**

- **Позволяет исследовать копийность хромосомных локусов и определять хромосомные поломки в опухолевой ткани**
- **Позволяет выявить хромосомные районы, стандартно подвергающиеся перестройкам, с потерей или появлением дополнительного хромосомного материала, которые являются специфичными для различных клинических и гистологических опухолевых подтипов**
- **Позволяет выявить новые структурные маркеры клинического течения**

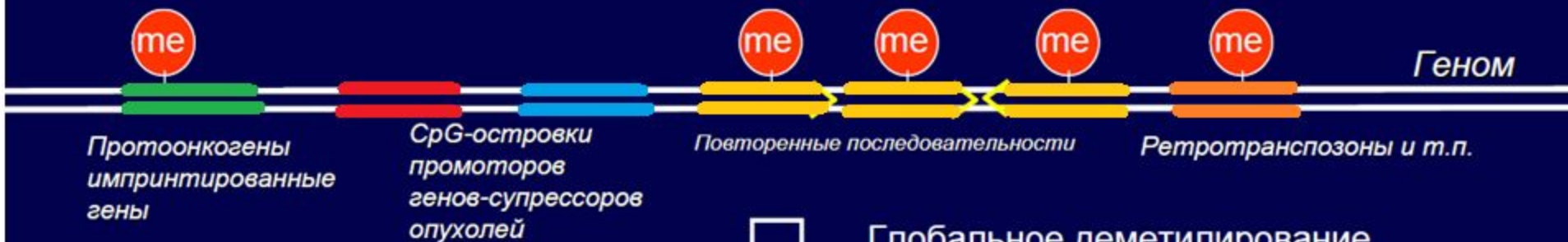
# Дифференциальная диагностика опухолей с помощью array-CGH



**Онкоцитома – доброкачественная, а хромофобная карцинома – злокачественная опухоли почки, т.е. необходим дифференциальный диагноз, от которого зависит план лечения. Часто имеют схожее морфологическое строение. Но характеризуются разным паттерном CNV, определяемым методом CGH (зеленый – делеции, красный – амплификации).**

# Метилирование и канцерогенез

нормальная клетка



опухолевая клетка



Активация

стимуляция роста и пролиферации

Репрессия

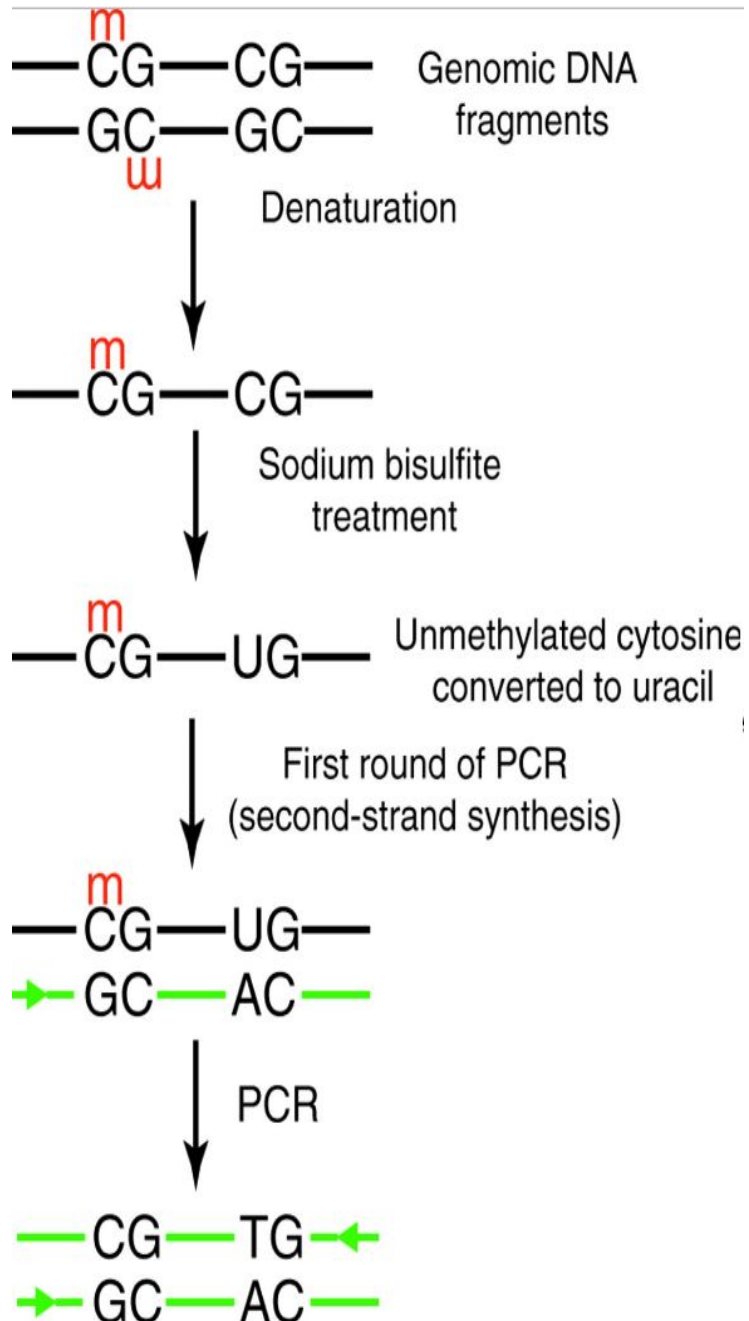
уход от апоптоза, изменение клеточного цикла, нарушение репарации, стимуляция инвазии и метастазирования

Активация

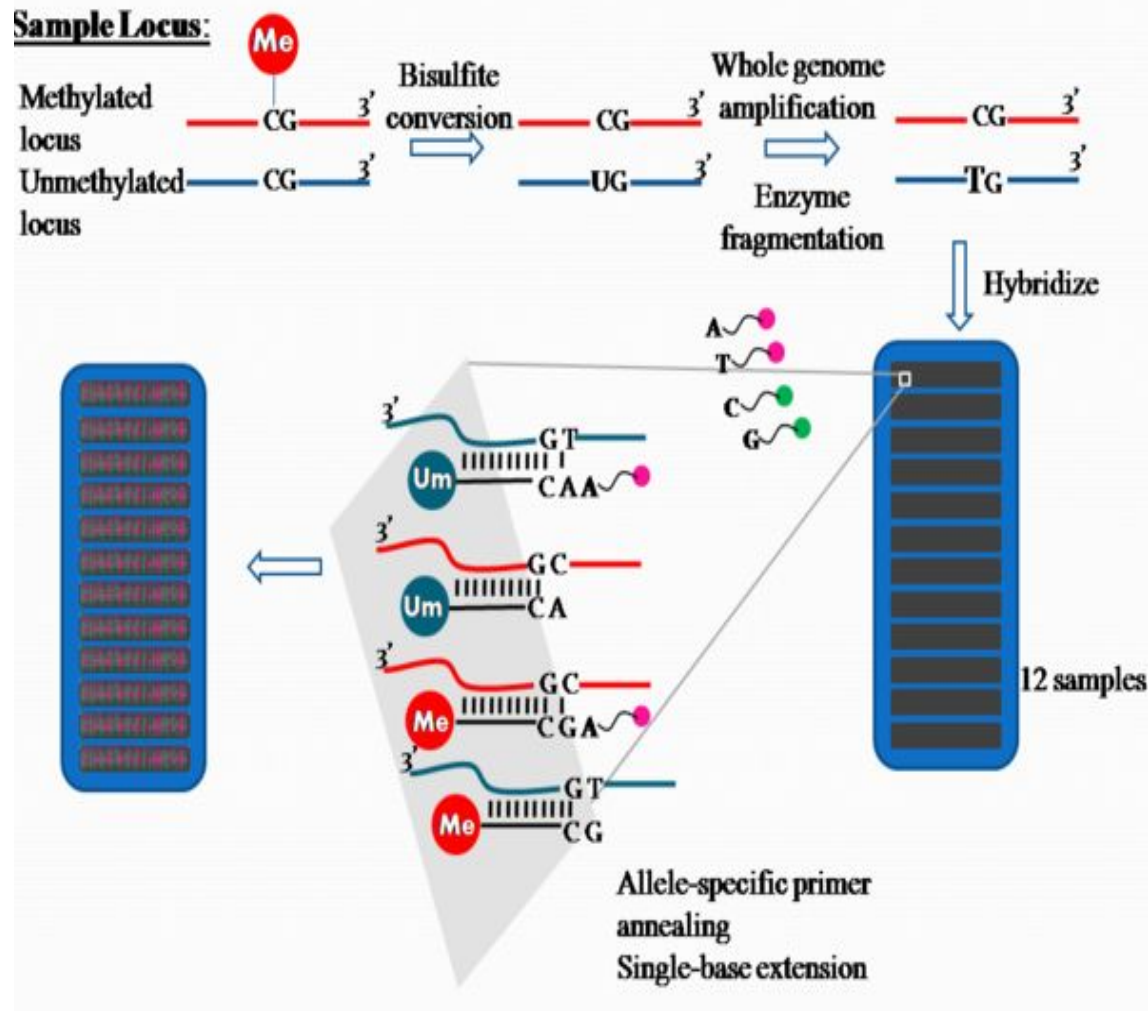
Высокая частота рекомбинации  
Нарушения сегрегации хромосом

точковые мутации в генах

## Бисульфитная конверсия



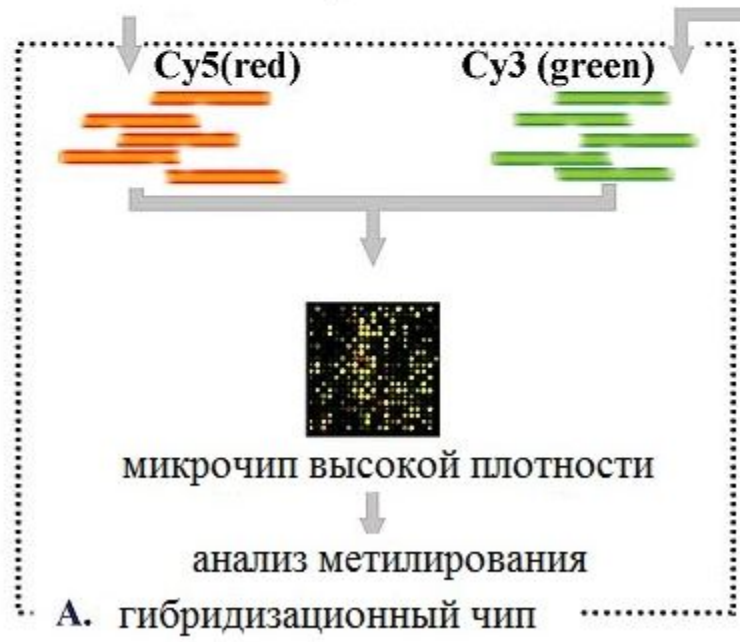
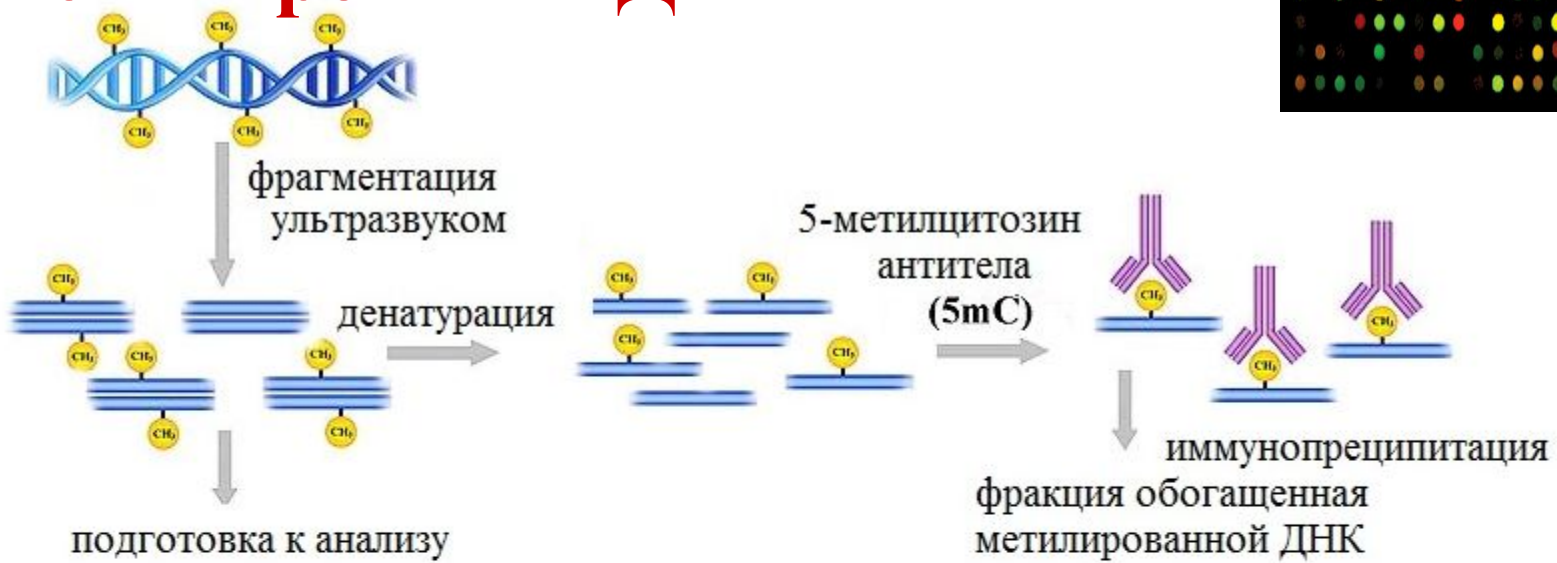
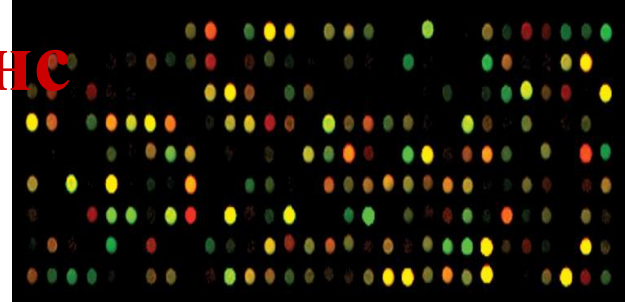
## Методика полногеномного исследования метилирования на чипах







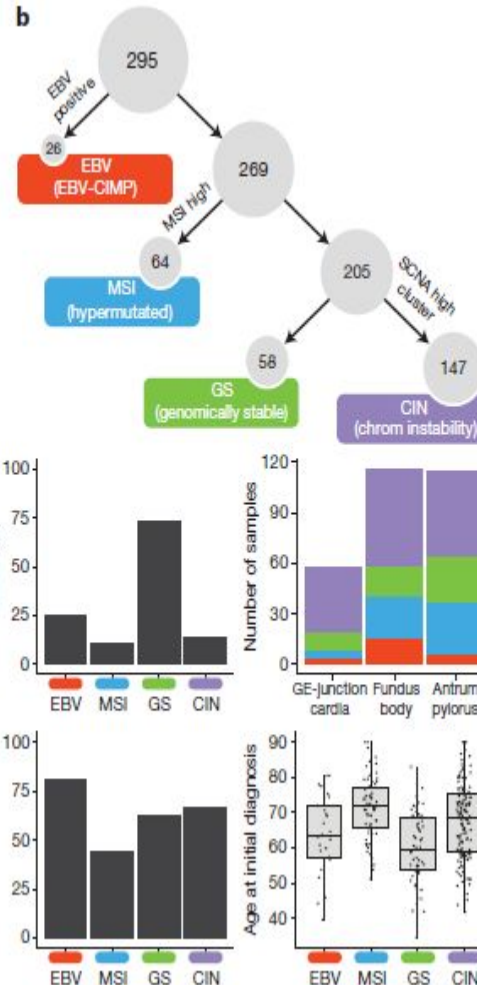
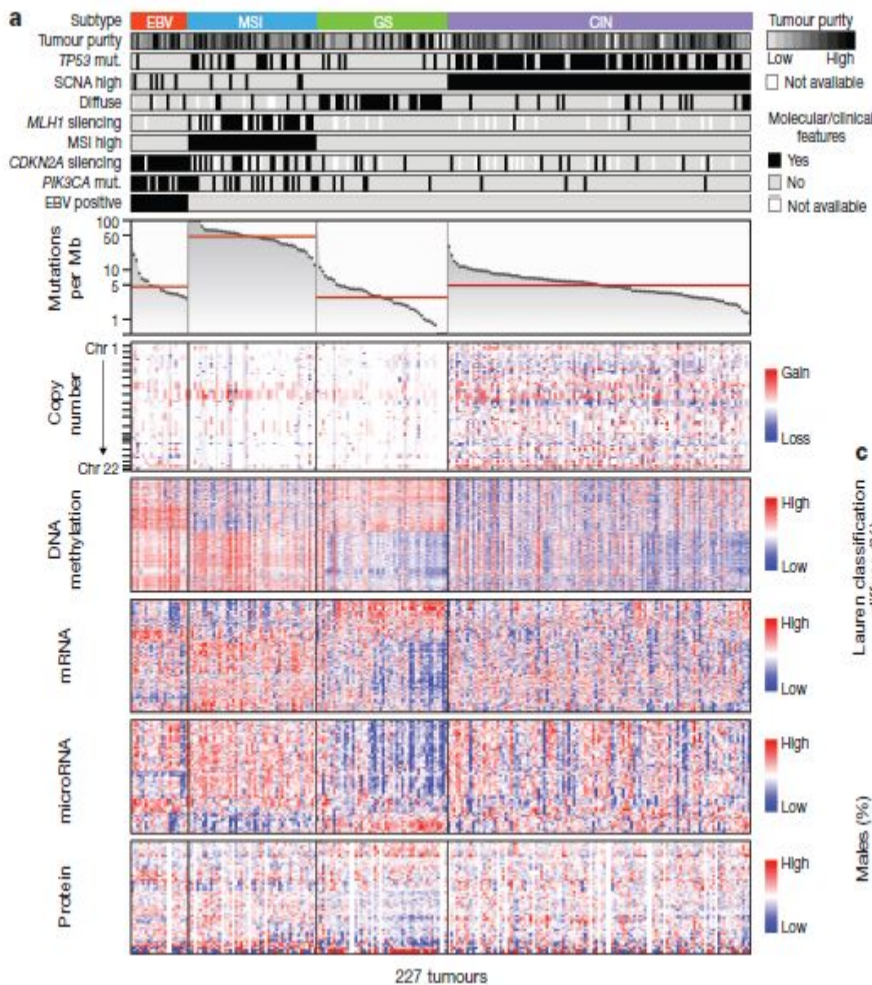
# Метилочипы исследуют дисбаланс метилирования ДНК



# **Комплексное исследование опухолевой ткани + компьютерные технологии = интегральный портрет опухоли**

- **Экспрессионные чипы –  
экспрессионное профилирование  
опухолей**
- **Микроматричный анализ и  
сравнительная геномная  
гибридизация - профилирование  
структурных изменений**
- **Метилочипы – метильное  
профилирование**

# Новая классификация рака желудка, предложенная в результате проведения полногеномных исследований



Эпштейн-Барр зависимый рак

Рак желудка с микросателлитной нестабильностью

Рак желудка с хромосомной нестабильностью

Рак желудка геномно стабильный

The Cancer Genome Atlas Research Network\* // Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma //, Nature, 513, №11, 2014

# Comprehensive molecular characterization of breast carcinoma

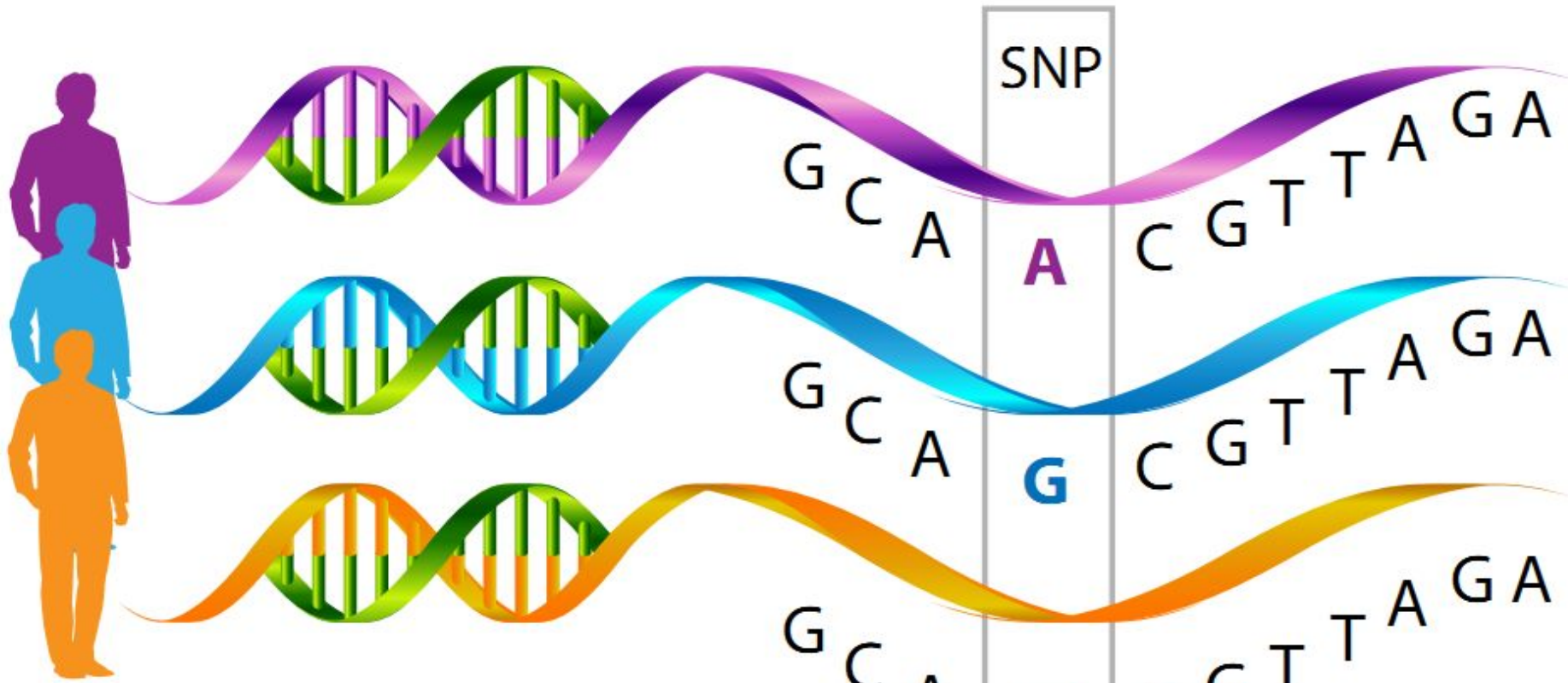
## The Cancer Genome Atlas Research Network\*

NATURE | VOL 490 | 4 OCTOBER 2012

**Table 1 | Highlights of genomic, clinical and proteomic features of subtypes**

Subtype	Luminal A	Luminal B	Basal-like	HER2E
ER <sup>+</sup> /HER2 <sup>-</sup> (%)	87	82	10	20
HER2 <sup>+</sup> (%)	7	15	2	68
TNBCs (%)	2	1	80	9
TP53 pathway	<i>TP53</i> mut (12%); gain of <i>MDM2</i> (14%)	<i>TP53</i> mut (32%); gain of <i>MDM2</i> (31%)	<i>TP53</i> mut (84%); gain of <i>MDM2</i> (14%)	<i>TP53</i> mut (75%); gain of <i>MDM2</i> (30%)
PIK3CA/PTEN pathway	<i>PIK3CA</i> mut (49%); <i>PTEN</i> mut/loss (13%); <i>INPP4B</i> loss (9%)	<i>PIK3CA</i> mut (32%); <i>PTEN</i> mut/loss (24%); <i>INPP4B</i> loss (16%)	<i>PIK3CA</i> mut (7%); <i>PTEN</i> mut/loss (35%); <i>INPP4B</i> loss (30%)	<i>PIK3CA</i> mut (42%); <i>PTEN</i> mut/loss (19%); <i>INPP4B</i> loss (30%)
RB1 pathway	Cyclin D1 amp (29%); <i>CDK4</i> gain (14%); low expression of <i>CDKN2C</i> ; high expression of <i>RB1</i>	Cyclin D1 amp (58%); <i>CDK4</i> gain (25%)	<i>RB1</i> mut/loss (20%); cyclin E1 amp (9%); high expression of <i>CDKN2A</i> ; low expression of <i>RB1</i>	Cyclin D1 amp (38%); <i>CDK4</i> gain (24%)
mRNA expression	High ER cluster; low proliferation	Lower ER cluster; high proliferation	Basal signature; high proliferation	HER2 amplicon signature; high proliferation
Copy number	Most diploid; many with quiet genomes; 1q, 8q, 8p11 gain; 8p, 16q loss; 11q13.3 amp (24%)	Most aneuploid; many with focal amp; 1q, 8q, 8p11 gain; 8p, 16q loss; 11q13.3 amp (51%); 8p11.23 amp (28%)	Most aneuploid; high genomic instability; 1q, 10p gain; 8p, 5q loss; <i>MYC</i> focal gain (40%)	Most aneuploid; high genomic instability; 1q, 8q gain; 8p loss; 17q12 focal <i>ERRB2</i> amp (71%)
DNA mutations	<i>PIK3CA</i> (49%); <i>TP53</i> (12%); <i>GATA3</i> (14%); <i>MAP3K1</i> (14%)	<i>TP53</i> (32%); <i>PIK3CA</i> (32%); <i>MAP3K1</i> (5%)	<i>TP53</i> (84%); <i>PIK3CA</i> (7%)	<i>TP53</i> (75%); <i>PIK3CA</i> (42%); <i>PIK3R1</i> (8%)
DNA methylation	–	Hypermethylated phenotype for subset	Hypomethylated	–
Protein expression	High oestrogen signalling; high MYB; RPPA reactive subtypes	Less oestrogen signalling; high FOXM1 and MYC; RPPA reactive subtypes	High expression of DNA repair proteins, PTEN and <i>INPP4B</i> loss signature (pAKT)	High protein and phospho-protein expression of EGFR and HER2

\*Data are based on 466 tumours under list. Amp, amplification; mut, mutation.

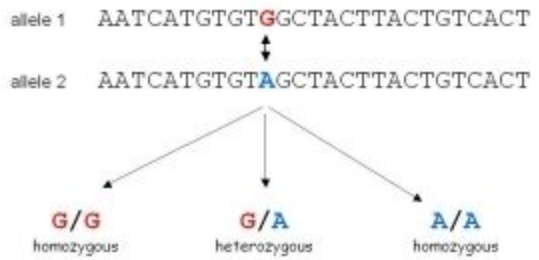


**Преимущества SNP над другими типами генетических маркеров:**

- ☐ Высокая частота встречаемости в геноме
- ☐ Разработано много относительно простых методов детекции
- ☐ В отличие от STR-маркеров, не являются «горячими точками» мутагенеза при некоторых патологических состояниях (в опухолях, например)

**Недостатки SNP по сравнению с другими маркерами:**

- ☐ Низкая гетерозиготность
- ☐ Как правило, есть только два аллеля



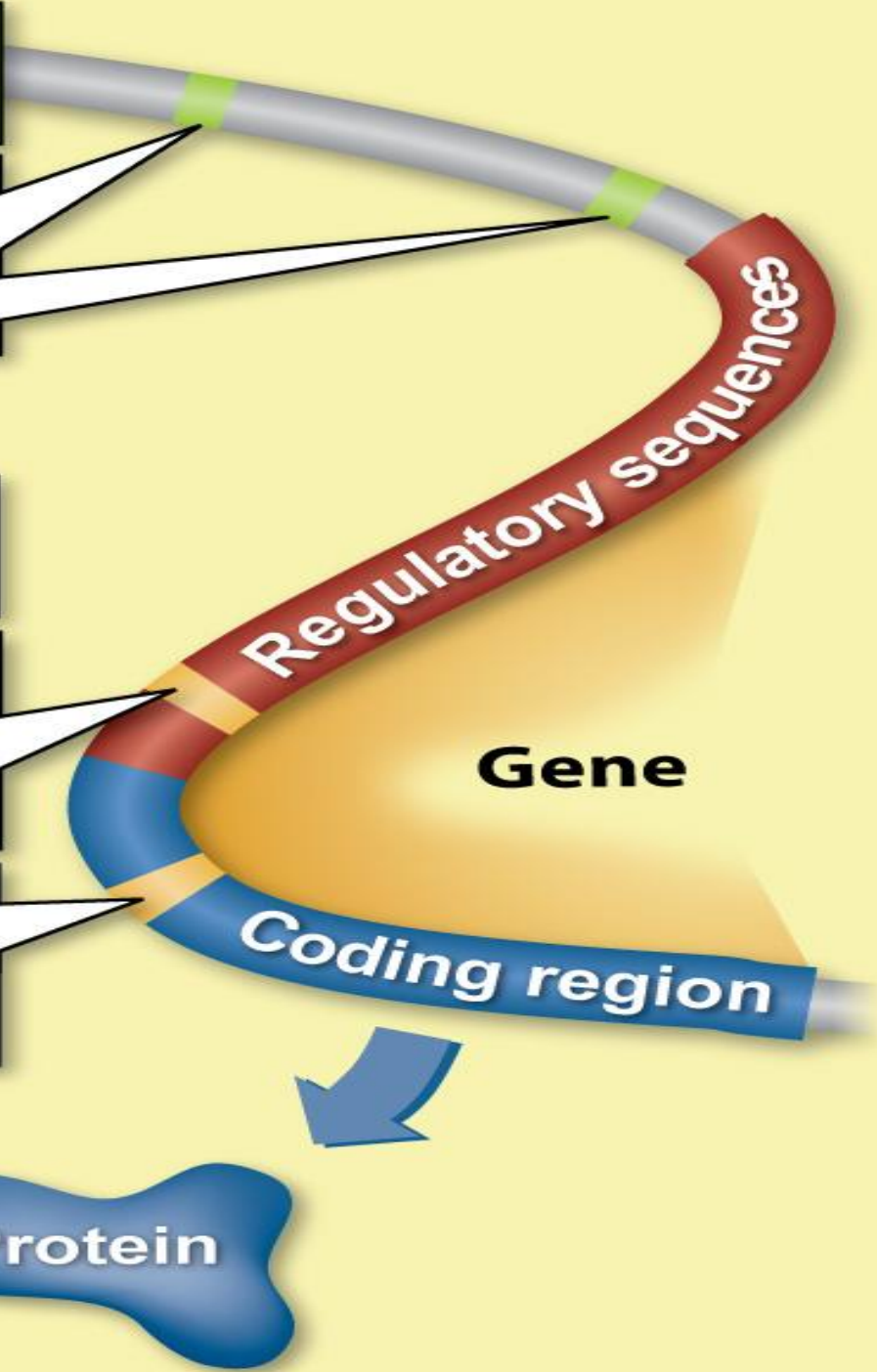
**Linked SNPs**  
*outside of gene*

no effect on protein production or function

**Causative SNPs**  
*in gene*

**Non-coding SNP:**  
● changes amount of protein produced

**Coding SNP:**  
● changes amino acid sequence

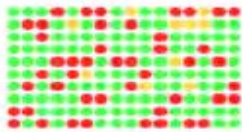


# Анализ SNP генома с помощью

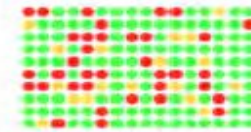
Affected Individuals



Unaffected Individuals



SNPs analyzed  
and compared  
statistically



**GWAS** (genome-wide association study) – исследование связи генотипа с различными фенотипическими признаками в масштабе всего генома. Сравнивают геномы тестируемой выборки (cases) с геномами контрольной выборки (control). Благодаря исследованиям в рамках International SNP Consortium и International HarMap project в базе данных dbSNP NCBI сейчас имеются данные ~ 10 млн SNP в геноме человека. Из них около 500 тыс. показали ассоциации с теми или иными признаками в исследованиях случай-контроль и могут рассматриваться в качестве компонентов тест-системы для GWAS.

## **Как проводятся исследования по изучению генома?**

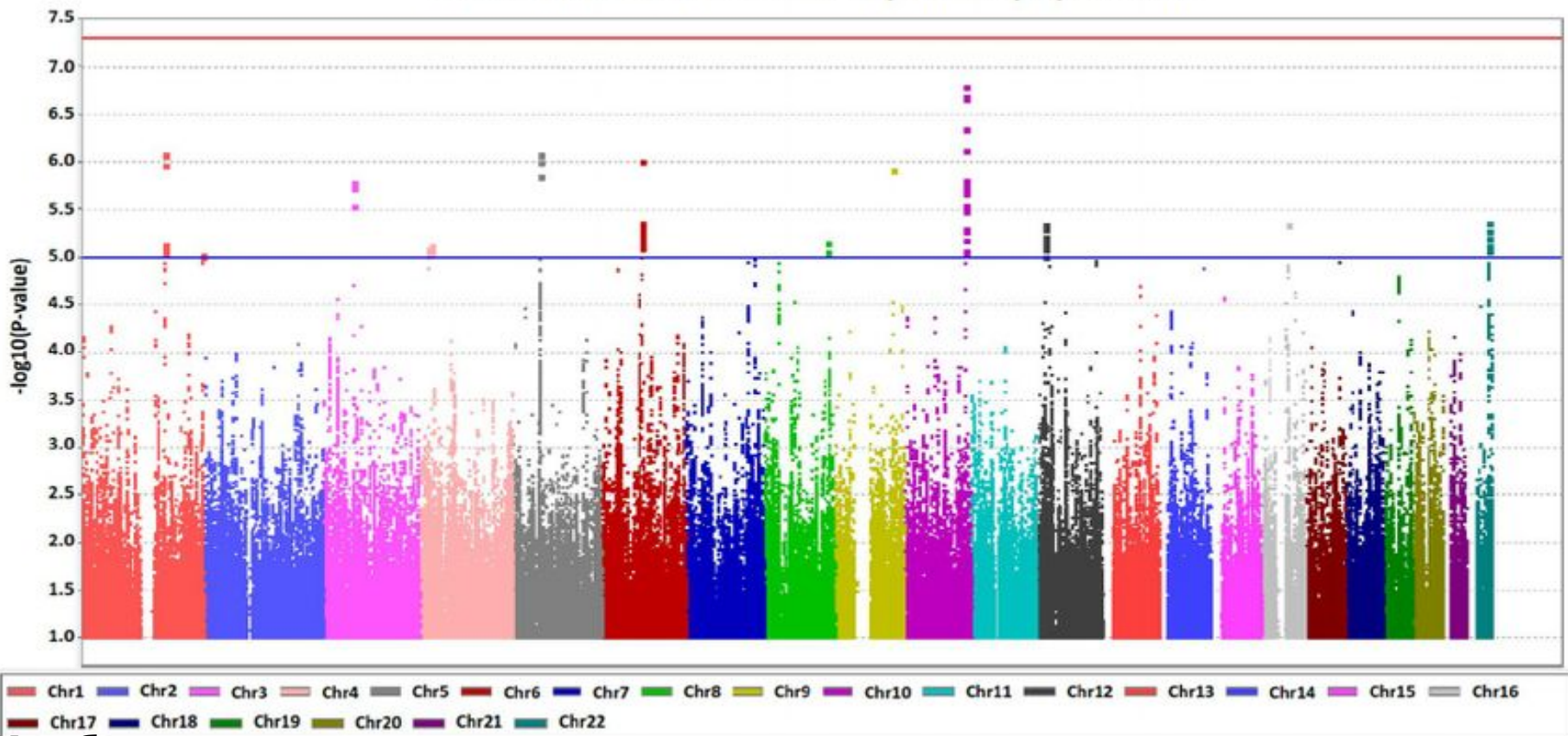
**Для проведения исследования ассоциаций используют две группы участников: людей с изучаемым заболеванием и похожих людей без заболевания. Получают ДНК от каждого участника, обычно образец крови или из клеток внутренней поверхности рта, полученные с помощью ватного тампона для сбора клеток.**

**Геномная ДНК каждого человека затем очищается, гибридизуется на чипах и сканируется на автоматизированном лабораторном оборудовании. Машины быстро просматривают геном каждого участника для поиска маркеров генетической изменчивости, которые называются однонуклеотидными полиморфизмами или SNP. Если обнаружено, что определенные генетические изменения значительно чаще встречаются у людей с заболеванием по сравнению с людьми без болезней, считается, что эти изменения «связаны» с заболеванием. Связанные генетические вариации могут служить мощными указателями на область генома человека, где находится проблема, вызывающая болезнь.**

**Сами связанные варианты не могут непосредственно вызывать заболевание. Они могут просто «пометить» фактические причинные варианты. По этой причине исследователям часто приходится предпринимать дополнительные шаги, такие как секвенирование ДНК в данной области генома, для определения точных генетических изменений, участвующих в развитии этого заболевания.**



## GWAS of breast cancer in Japanese population

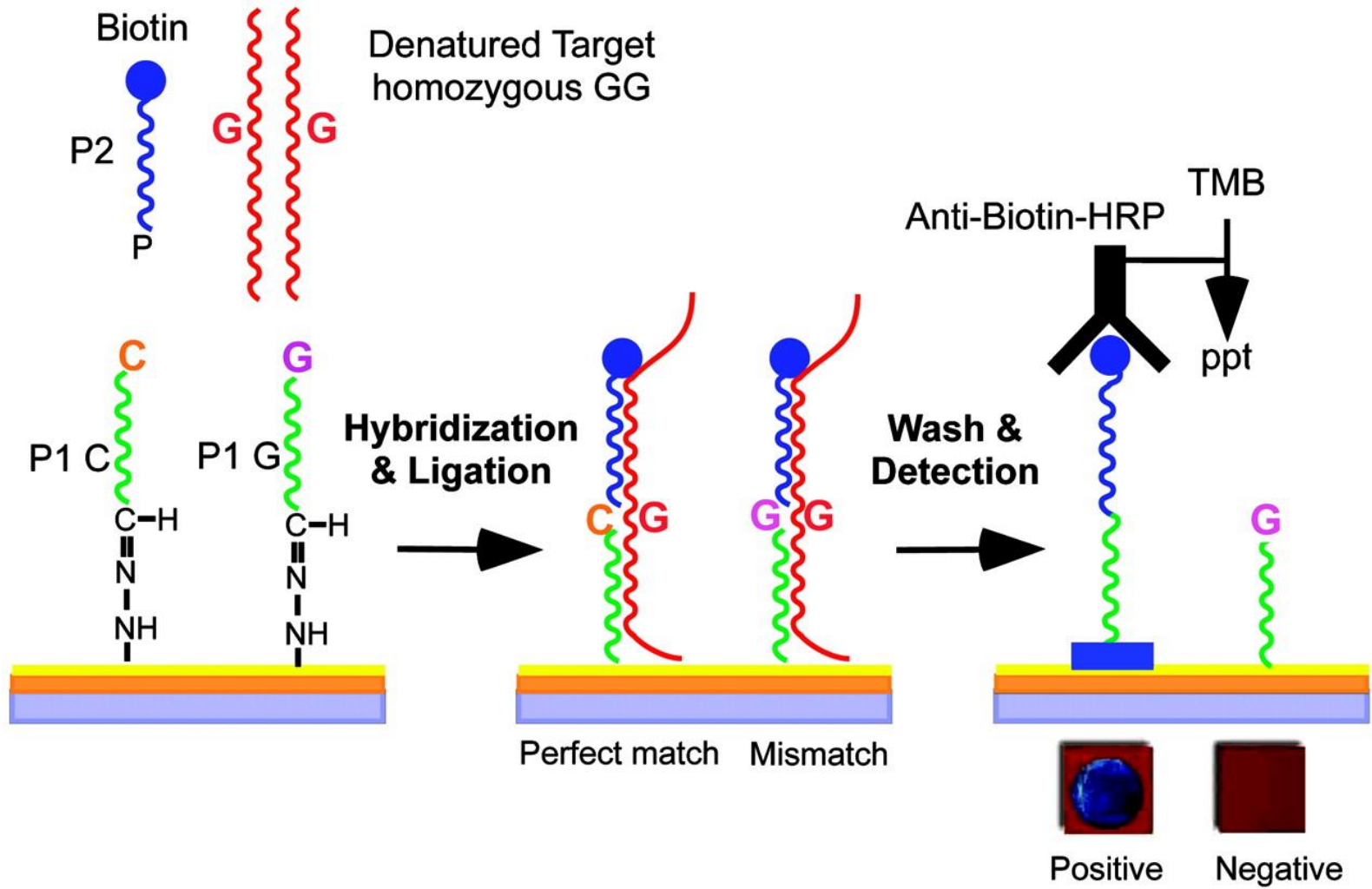


**Наиболее часто используемые методы определения однонуклеотидных замен:**

- ПЦР и ПДРФ
- ПЦР в реальном времени (аллель-специфичные праймеры и краситель SYBR Green I или система с TaqMan-зондами)
- SSCP-анализ (для неизвестных замен)

*Все названные методы позволяют генотипировать несколько SNP для нескольких десятков образцов в рамках одного эксперимента – если нужна большая производительность, то нужны микрочиповые технологии.*

# Strategy for SNP detection on thin-film biosensor chips (see text).



Xiao-bo Zhong et al. PNAS 2003;100:11559-11564

## **Что представляет собой GWAS?**

**Исследование, связанное с изучением генома, представляет собой подход, который предусматривает быстрое сканирование маркеров полного набора ДНК или геномов многих людей для поиска генетических вариаций, связанных с конкретным заболеванием. Как только новые генетические ассоциации идентифицированы, исследователи могут использовать эту информацию для разработки лучших стратегий обнаружения, лечения и профилактики заболевания. Такие исследования особенно полезны для нахождения генетических вариаций, способствующих распространенным, сложным заболеваниям, таким как астма, рак, диабет, болезни сердца и психические заболевания.**

## **Почему такие исследования возможны сейчас?**

**С завершением проекта генома человека в 2003 году и Международного проекта ХарМар в 2005 году у исследователей появился набор исследовательских инструментов, которые позволяют найти генетический вклад в общие болезни. Эти инструменты включают в себя компьютеризованные базы данных, которые содержат эталонную последовательность генома человека, карту генетической вариации человека и набор новых технологий, которые могут быстро и точно анализировать образцы всего генома для генетических вариаций, способствующих возникновению заболевания.**

## **Каким образом исследования генома в целом помогут человеческому здоровью?**

**Вклад GWAS в медицине в может быть значительным. Такие исследования закладывают основу для персонализированной медицины, в которой нынешний подход к оказанию медицинской помощи уступит место более индивидуальным стратегиям.**

**В будущем, после улучшения стоимости и эффективности сканирования генома и других инновационных технологий, специалисты здравоохранения смогут предоставить пациентам индивидуальную информацию об их рисках развития определенных заболеваний. Эта информация позволит специалистам здравоохранения адаптировать программы профилактики к уникальному генетическому составу каждого человека. Кроме того, если пациент заболевает, информация может быть использована для выбора наиболее эффективных методов лечения и наименьшей вероятности возникновения побочных реакций у этого конкретного пациента.**

## **Какие исследования по геному были проведены?**

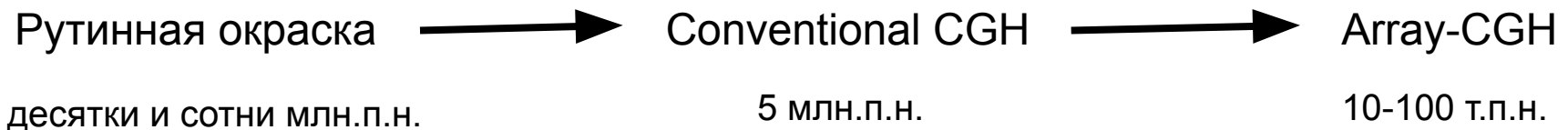
**Используя эту новую стратегию, в 2005 году три независимых исследования показали, что общая форма возрастной слепоты связана с изменением в гене фактора комплемента H, который продуцирует белок, участвующий в регуляции воспаления. Раньше немногие считали, что воспаление может в значительной степени способствовать этому типу слепоты, который называется **возрастной макулярной дегенерацией**.**

**Подобные успехи были зарегистрированы с использованием полногеномных исследований для выявления генетических вариаций, которые способствуют риску развития диабета типа 2, болезни Паркинсона, сердечных заболеваний, ожирения, болезни Крона и рака предстательной железы, а также генетических вариаций, которые влияют на ответ на антидепрессанты лекарства.**

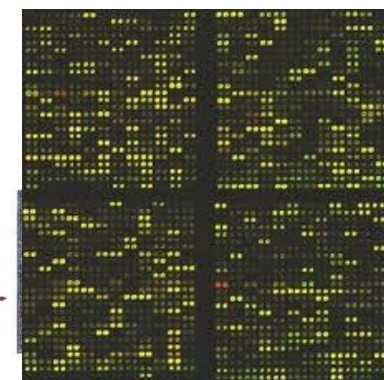
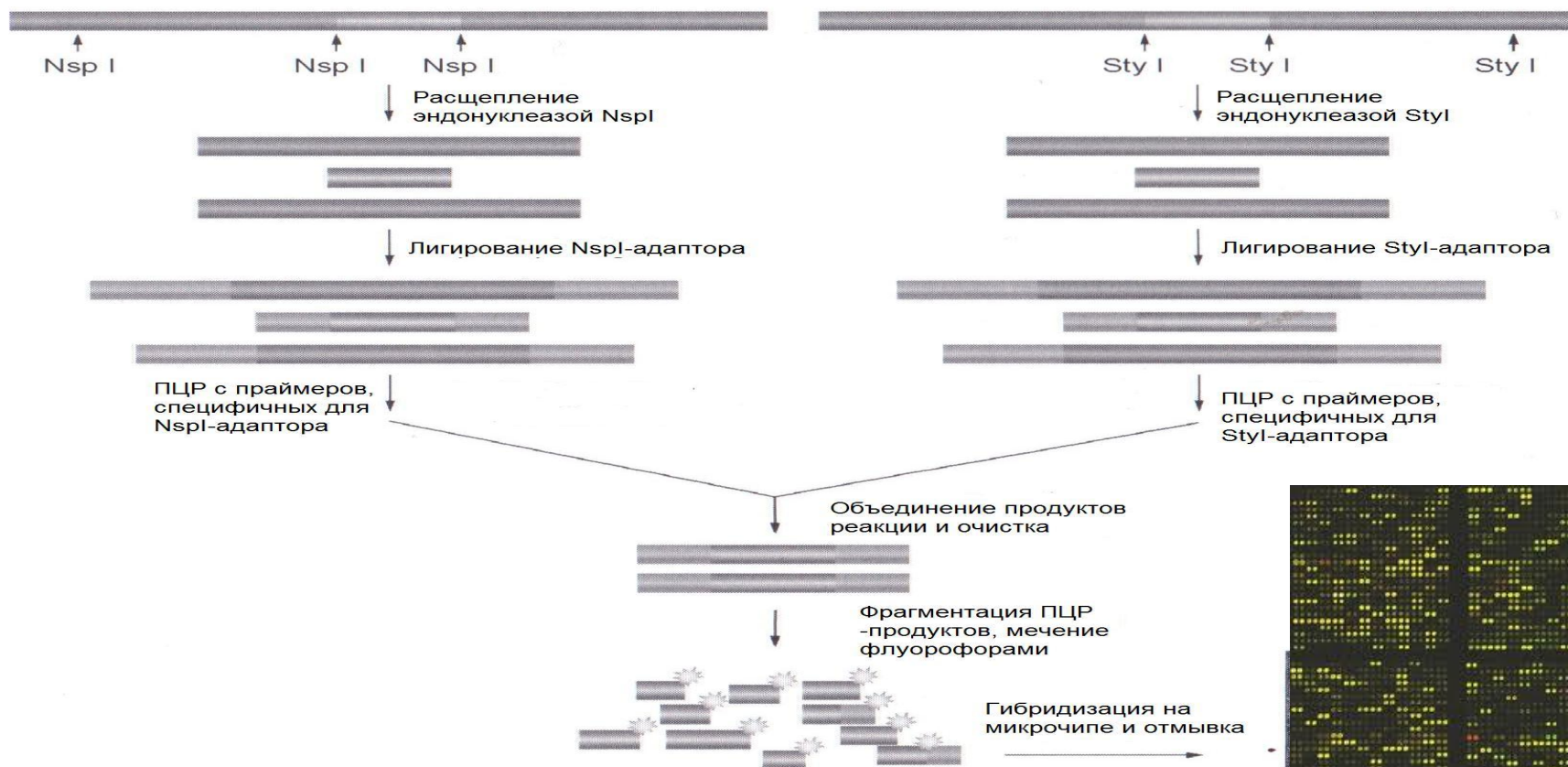
# Ограничения метода CGH

1. Можно выявить только несбалансированные хромосомные перестройки. Если количество копий исследуемого локуса не отличается от нормы (сбалансированные перестройки), то сигнал будет как от нормальной ДНК (нельзя увидеть сбалансированные транслокации, инверсии, мозаицизм).
2. Не полностью блокированные повторяющиеся элементы могут давать ложные результаты.
3. Низкая разрешающая способность conventional CGH для широкого использования в ДНК-диагностике, но этого недостатка лишена array-CGH.
4. Относительно высокая стоимость анализа с помощью array-CGH, однако это вопрос обоснованного применения метода и способа финансирования работы.

При планировании экспериментов по выявлению CNV надо иметь в виду рост разрешающей способности от традиционной окраски метфазных хромосом по Гимзе до array-CGH и выбирать адекватный метод:



Компания Affymetrix первая представила на рынке SNP-микрочип в 1998 г., он включал тогда 600 SNP. Современные микрочипы Affymetrix содержат 250-900 тыс. SNP. Это 6 млн. кластеров размерами 5x5 мкм, которые содержат олигонуклеотид с определенной последовательностью из 25 звеньев. Например, два взаимодополняемых микрочипа «500К» включают все GWAS-значимые SNP со средней гетерозиготностью 30%, перекрывающие геном с частотой встречаемости 1:5.8 т.п.н., причем каждый SNP читается на микрочипе от 24 до 40 раз.



# Анализ экспрессии генов с помощью микрочипов

В общем виде, эксперимент заключается в выделении РНК, получении кДНК, мечении фрагментов и их последующей гибридизации с олигонуклеотидами известной последовательности на микрочипе, отмывки и детекции интенсивности флуоресцентного сигнала.

Нормализация сигнала:  
отрицательные контроли +  
экспрессия генов «домашнего хозяйства»

Желательно подтверждение изменения экспрессии генов-кандидатов с помощью независимых методов: ПЦР в реальном времени, Нозерн-блоттинг, иммуногистохимией.

