

ГЕНОМ ЧЕЛОВЕКА. МУЛЬТИФАКТОРИАЛЬНЫЕ БОЛЕЗНИ



***к.б.н., доцент кафедры медицинской генетики и ФМ,
Мустафин Рустам Наилевич***

**Геном –
это вся совокупность нуклеотидных последовательностей ДНК
клетки, или организма.**

Размеры генома оцениваются по весу и по длине.

Вес суммарной ДНК

из одной диплоидной соматической клетки человека составляет
6 пикограммов (пк), т.е. $6 \cdot 10^{12}$ грамма.

Длина генома измеряется:

в метрических единицах - ангстремах, миллиметрах, сантиметрах, метрах;

по числу точек кроссинговера - в морганидах или сантиморганидах;

по числу пар оснований или нуклеотидов- в базах, килобазах, мегабазах.

1 сМ=1Мб=1 млн. п.о.

Длина полностью деспирализованной суммарной ДНК

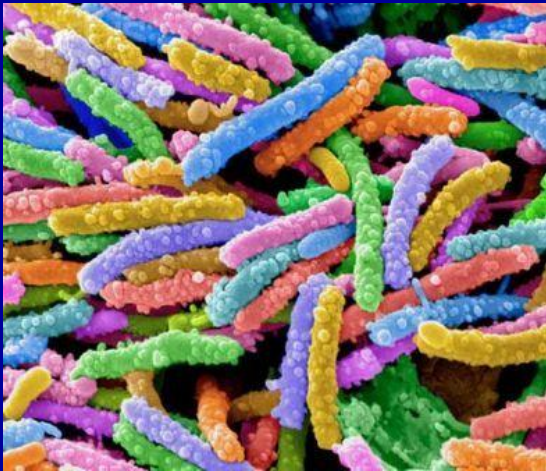
из одной диплоидной соматической клетки человека составляет
110 см, $6.4 \cdot 10^9$ п.о. или 6400 Мб или 6400 сМ

Физический размер генома

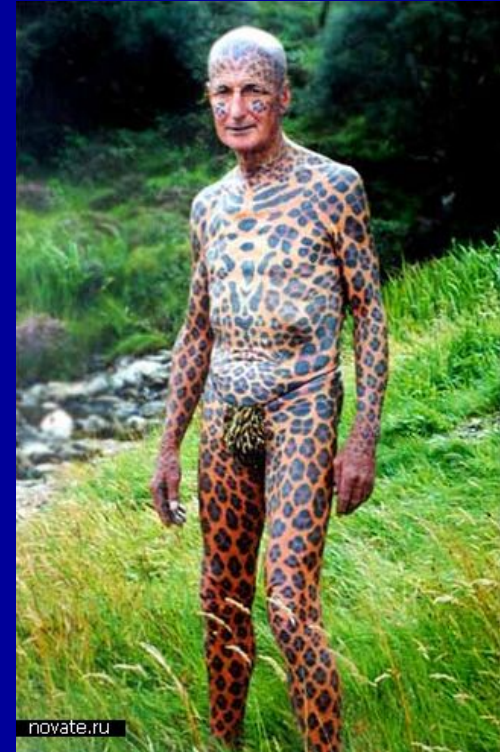
Прокариоты - до $8 \cdot 10^6$ п.н.
Эукариоты $10^6 - 10^{11}$ п.н.

Человек $3,3 \cdot 10^9$

кишечная палочка $4 \cdot 10^6$



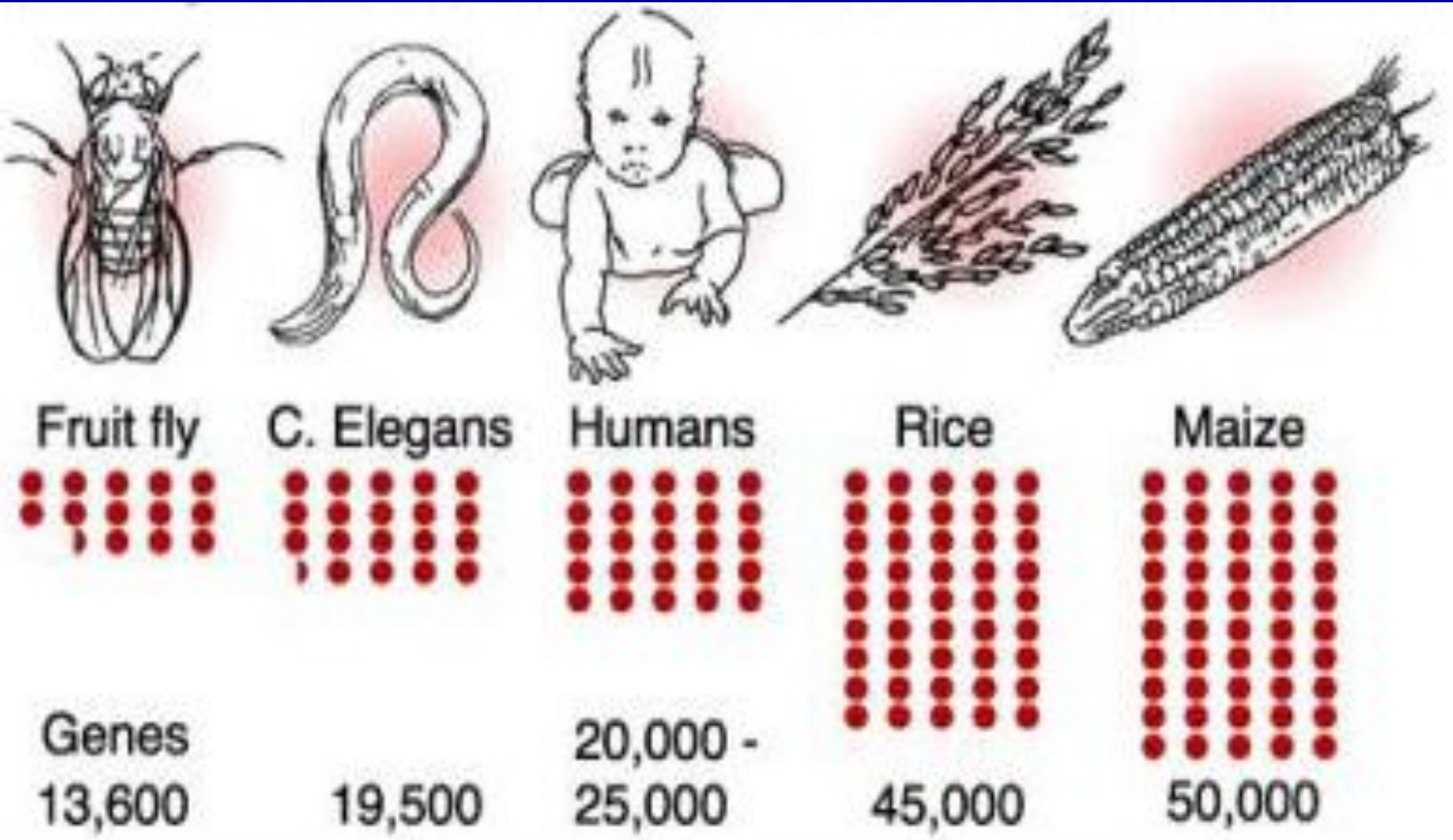
Дрозофила $1,4 \cdot 10^8$



Геном человека:

- двунитевой прерывистый ДНК-геном;
- содержит 3 млрд. пар оснований, 24-26 тыс. генов;
- только 1% приходится на долю кодирующих участков (экзонов): транскрибируемая часть генома составляет 28-30%, но транслируется до белков не более 5% (экзонная порция);
- 45-50% ДНК генома представлено повторяющимися последовательностями.
- **вариабельный** (индивидуальные отличия в 0,1% геномов).
- **геномы двух разных индивидов пересекаются примерно по половине однонуклеотидных полиморфизмов**
- между структурными генами, расположенными по всей длине хромосом, находятся участки некодирующей межгенной ДНК
- имеются **кластеры генов** - совокупности структурных (смысловых) генов с незначительными различиями по нуклеотидному составу, кодирующих один и тот же полипептид, но с определенными функциональными особенностями;
- **выявлены гены**, мутации которых лежат в основе развития более 350 известных заболеваний, в том числе некоторых типов рака, болезней Альцгеймера, Паркинсона и т.д.);

Число генов у человека оценено в 20 - 25 тысяч, (оценка 2001 г. - 35 – 40 тыс) Nature 21oct 2004 ili 15 oct 2004 19 600 exp validated



Порядок формирования полинуклеотидной цепи

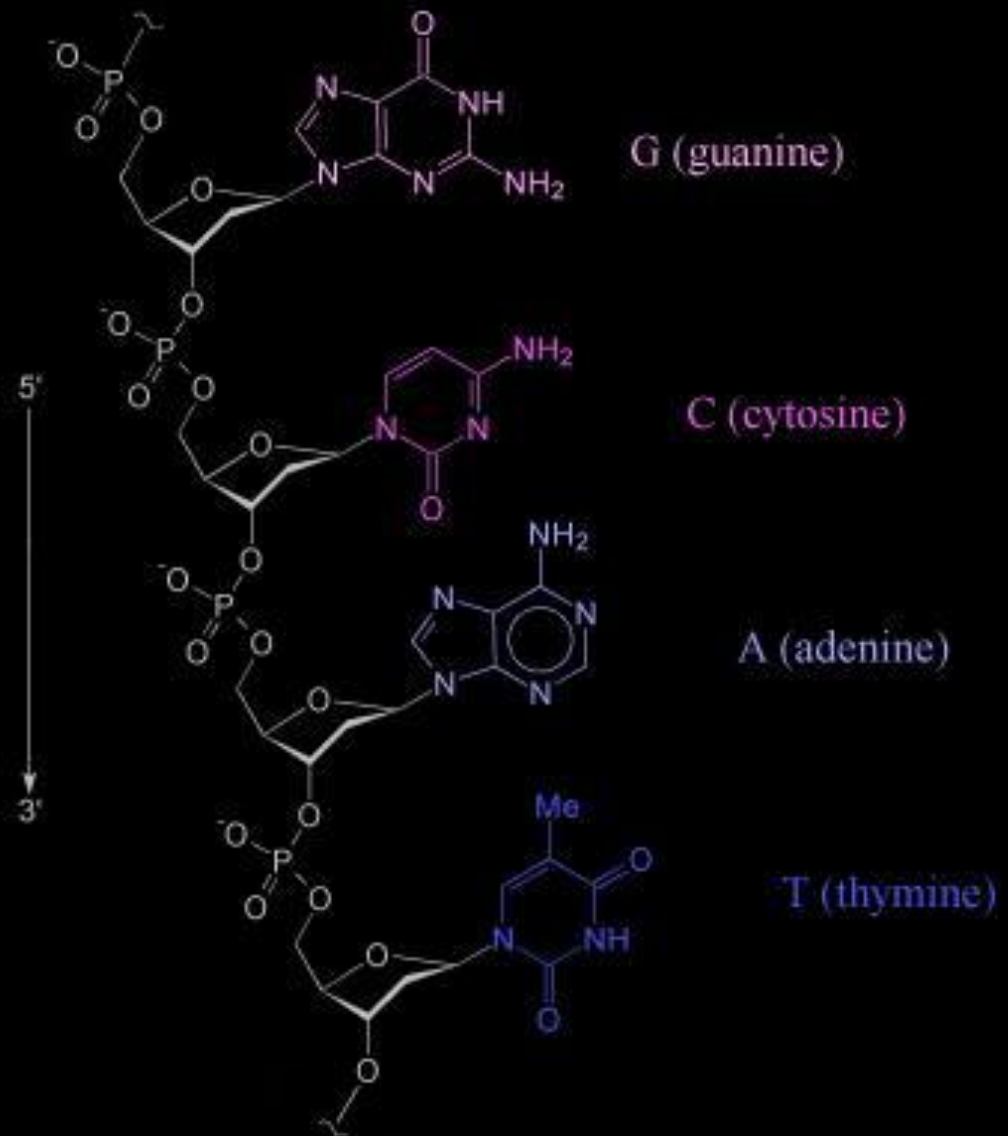
Фермент – ДНК-полимераза

Связь – **фосфо-ди-эфирная**
или **5' – 3' связь**

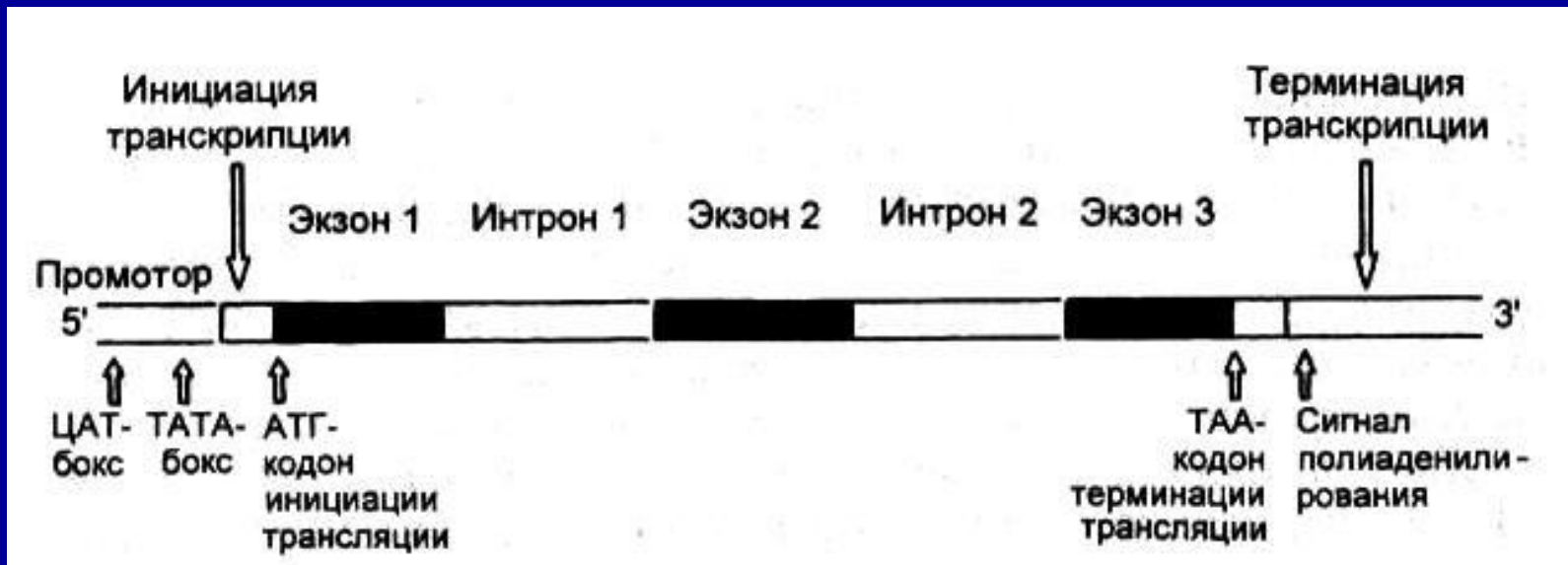
Полинуклеотидная цепь –
полярна:

5' - фосфатный конец
3' – гидроксильный конец

Полинуклеотидная цепь -
сахарофосфатный остов, на
котором сидят **азотистые**
основания,
число, состав и порядок
расположения
которых уникален для каждой
молекулы



Организация гена у эукариот (5' – 3' кодогенная цепь ДНК)



- Большинство генов человека имеет интрон-экзонную структуру.
- Каждый ген имеет определенное количество интронов и экзонов.
- Количество и размеры интронов и экзонов у разных генов различны.
- Суммарные размеры интронов значительно превышают размеры экзонов.
- Каждый ген начинается и заканчивается экзонами.
- На границе экзонов и интронов располагается **консенсусная**, т.е. эволюционно консервативная последовательность, которая распознается ферментами сплайсинга, осуществляющими вырезание интронов из первичного РНК-транскрипта.

Классификация генов

Человека

1. По структуре:

Содержащие интроны

Не содержащие интронов

2. По размерам:

Малые Средние Большие Гигантские Супергигантские

100 – 5000 5000 – 50 000 50 000-150 000 200 000 – 1 000 000 более 1 000 000
пар нуклеотидов

3. По локализации в хромосоме:

Одиночные
разделены спейсерами

Сгруппированные
кластеры

(группа последовательно расположенных генов, занимающих определенный район ДНК или хромосомы, кластер α -глобиновых и β -глобиновых генов)

супергены

(кластер из большого числа генов, кодирующих функционально или родственно-связанные белки, расположенные в сегментах некоторых хромосом, суперген HLA комплекса)

семейства генов

(группа эволюционно родственных генов, кодирующих продукты с близкими функциями, могут располагаться в разных частях генома, семейство глобиновых генов – α , β , γ , δ , ϵ , ζ –глобины)

4. По числу копий и значимости генного продукта:

Гены «домашнего хозяйства» «house keeping gens»

десятки и сотни копий

кодируют общеклеточные
структуры и функции

работают в большинстве клеток
и постоянно

Гены «роскоши» «luxury gens»

единицы копий

кодируют тканеспецифические
структуры и функции

работают в определенных клетках
на определенных этапах онтогенеза

5. По состоянию активности:

Активные

(транскрибируемые,
экспрессирующиеся)

Неактивные

(нетранскрибируемые,
неэкспрессирующиеся)

Псевдогены

6. По функции:

Структурные

Гены тРНК

Гены рРНК

Гены белков

размножения

- ферментов (более 30%)
- модуляторов белковых функций (активаторов, стабилизаторов и т.д.)
- гистонов и транскрипционных факторов
- белков внутри- и внеклеточного матрикса
- трансмембранных переносчиков и каналов
- клеточных сигналов, олигопептидов, гормонов
- экстраклеточных переносчиков
- иммуноглобулинов

Регуляторные

Регуляторы активности других генов
(промоторы, энхансеры, сайленсеры)

Регуляторы онтогенеза

Регуляторы клеточного

Основная часть генома человека занята НЕ генами (63 - 74%). Сам ген внутри «пустой»: 95% - некодирующая часть). Общая длина кодирующих областей – 1 – 1,5%

Размер генома (включая бреши)	2,91 млрд. п.н.
Часть генома, состоящая из повторов	35%
Число аннотированных генов (и гипотетических)	25 000
Число экзонов	442 785
Часть генома, приходящаяся на межгенную ДНК, %	от 74.5 до 63,6
Часть генома, занимаемая генами, %	от 25,5 до 37,8
Часть генома, занимаемая экзонами, %	от 1,1 до 1,5
Ген с максимальным числом интронов (Titin)	234 экзона
Средний размер гена	27 тыс. п.н.
Максимальный размер гена (миодистрофин).	2400 тыс. п.н.

Итоги структурных и функциональных исследований генома человека приводят к смене основных молекулярно-генетических представлений.

ОДИН ГЕН - ОДНА ПОЛИПЕПТИДНАЯ ЦЕПЬ
ОДИН ЛОКУС - ТЫСЯЧИ БЕЛКОВ

Тысячи изоформ нейрексина генерируется с трех генов за счет альтернативных промоторов и альтернативного сплайсинга.

Эти изоформы представлены на поверхности клеток, причем разные нейроны экспрессируют различные комбинации изоформ.

Neurexins: three genes and 1001 products. M.Messler, T.C.Sudhof

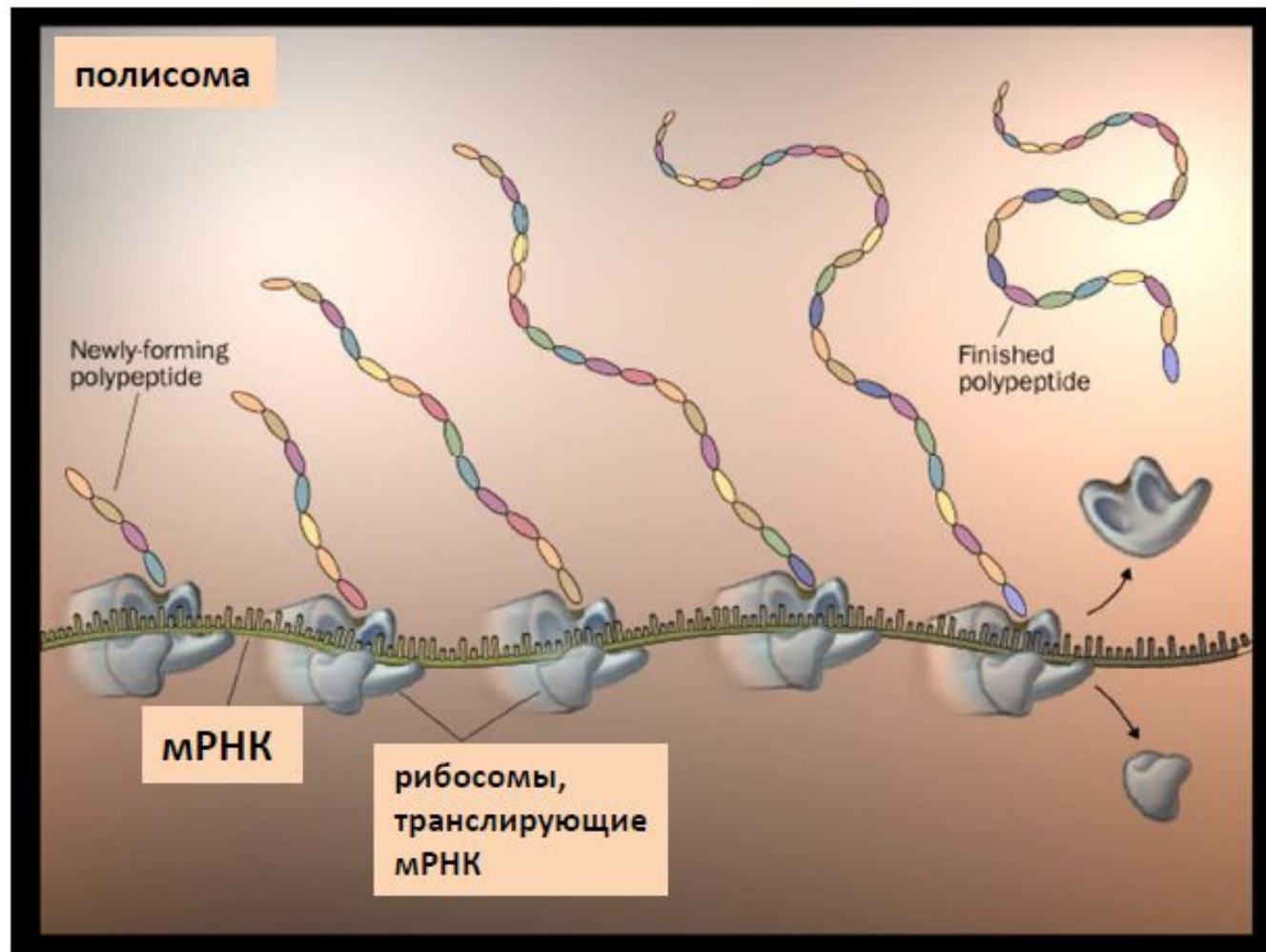
TIG JANUARY 1998 VOL. 14 No. 1 p. 20 - 26

The human brain has approximately 10^{12} (N.Y.) neurons, three orders of magnitude more than there are basepairs in the human genome.

Сопряжение транскрипции и трансляции у прокариот



У эукариотических организмов процессы транскрипции и трансляции разобщены. Транскрипция и созревание РНК идет в ядре, а трансляция – в цитоплазме после выхода мРНК, рРНК и тРНК из ядра через ядерные поры.



Процессинг пре-мРНК

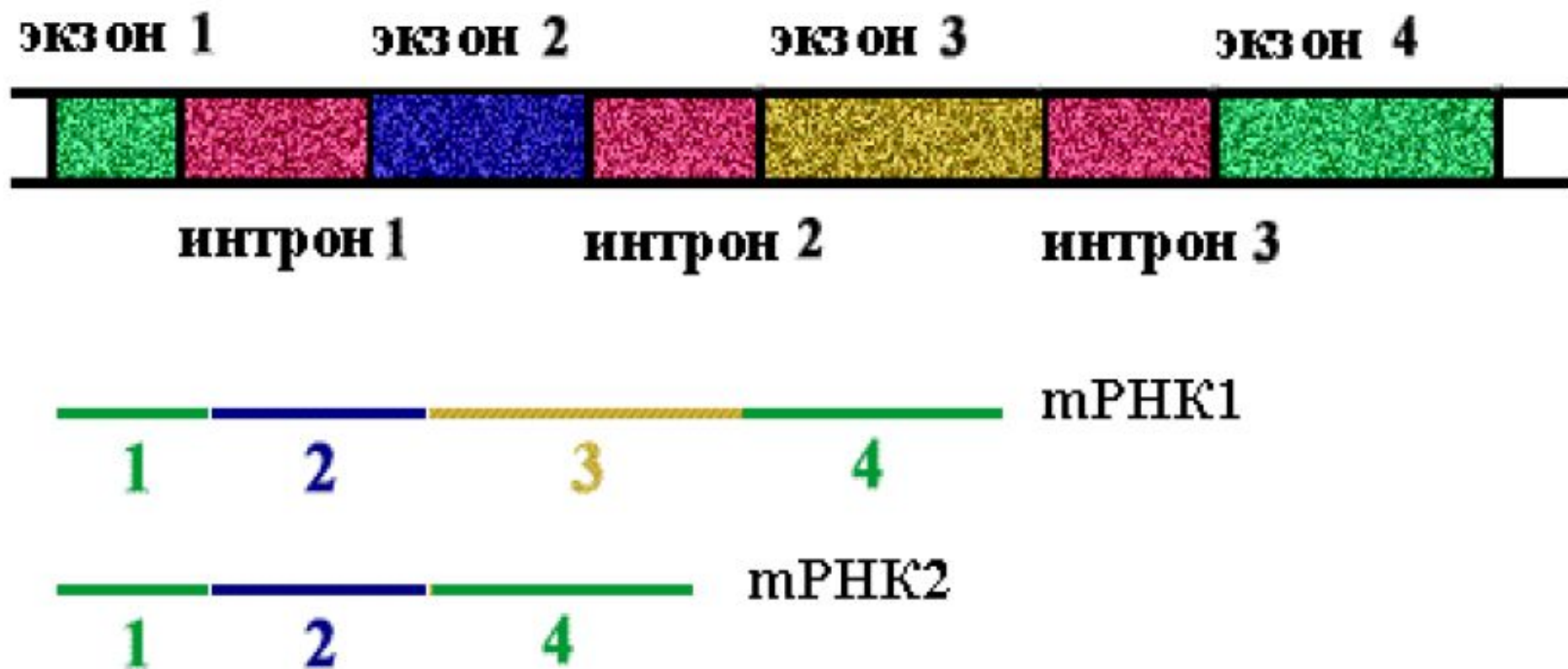
- 1. Созревание 5'-конца пре мРНК.** Присоединение КЭПа к 5'-концу (для 100 % мРНК).
- 2. Созревание 3'-конца пре-мРНК.** Присоединение полиА-хвоста к 3'-концу (95 %) мРНК.
- 3. Удаление интронов (сплайсинг) из пре-мРНК (95 % мРНК).** Сплайсингу подвергаются только полиаденилированные мРНК.
- 4. Редактирование (исправление ошибок на мРНК).** Показано лишь для нескольких мРНК.

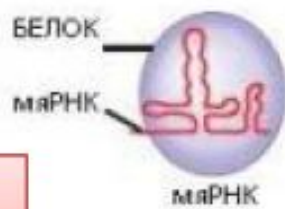
Для мРНК высших организмов существуют обязательные *правила сплайсинга*:

**Правило 1. 5' и 3' концы интрона консервативны:
5'(ГТ-интрон-АГ)3'.**



Правило 2. При шивании экзонов соблюдается порядок их расположения в гене, но некоторые из них могут быть выброшены.

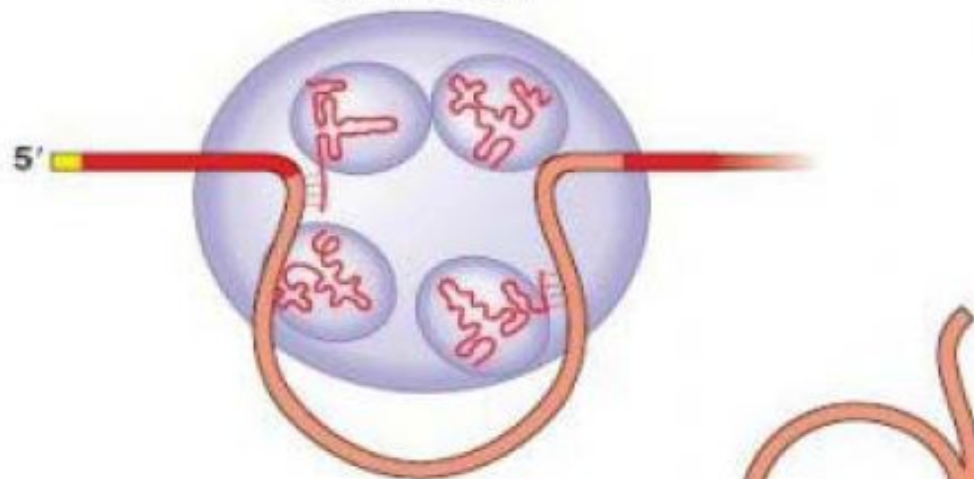




150 белков

**5 типов мяРНК
(U1,U2,U3,U4,U5)**

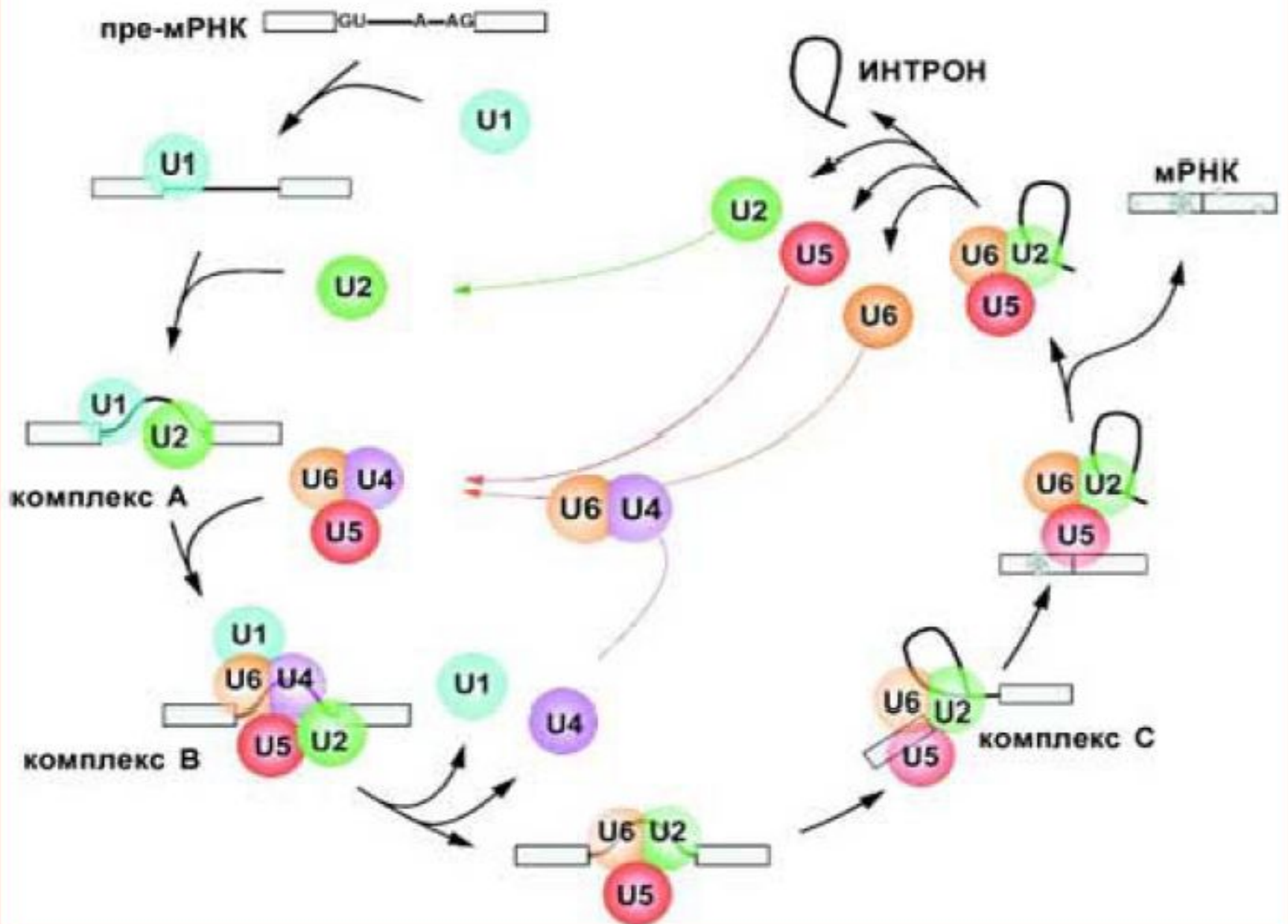
СПЛАЙСОСОМА



мРНК

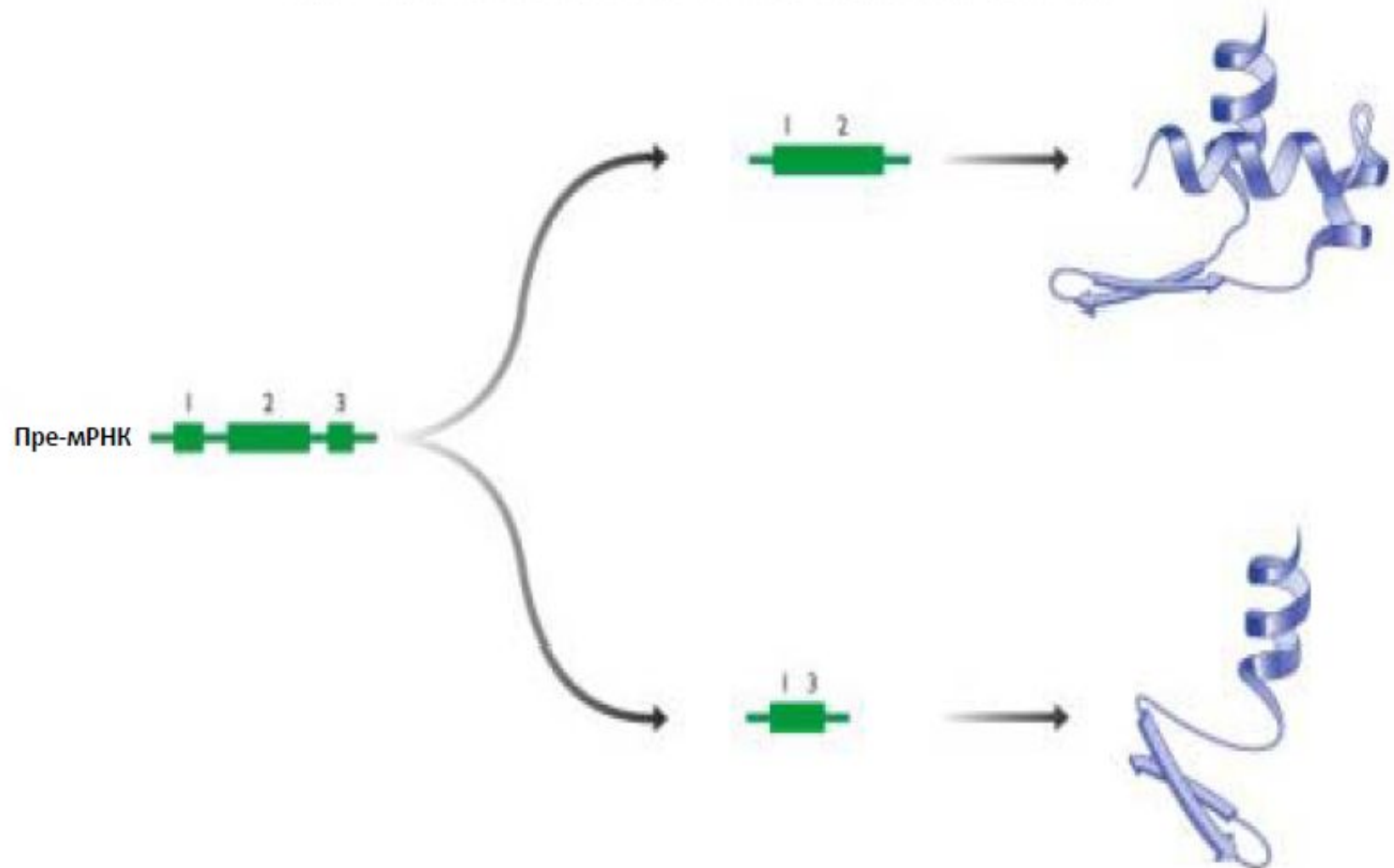


КАК РАБОТАЕТ СПЛАЙСОСОМА

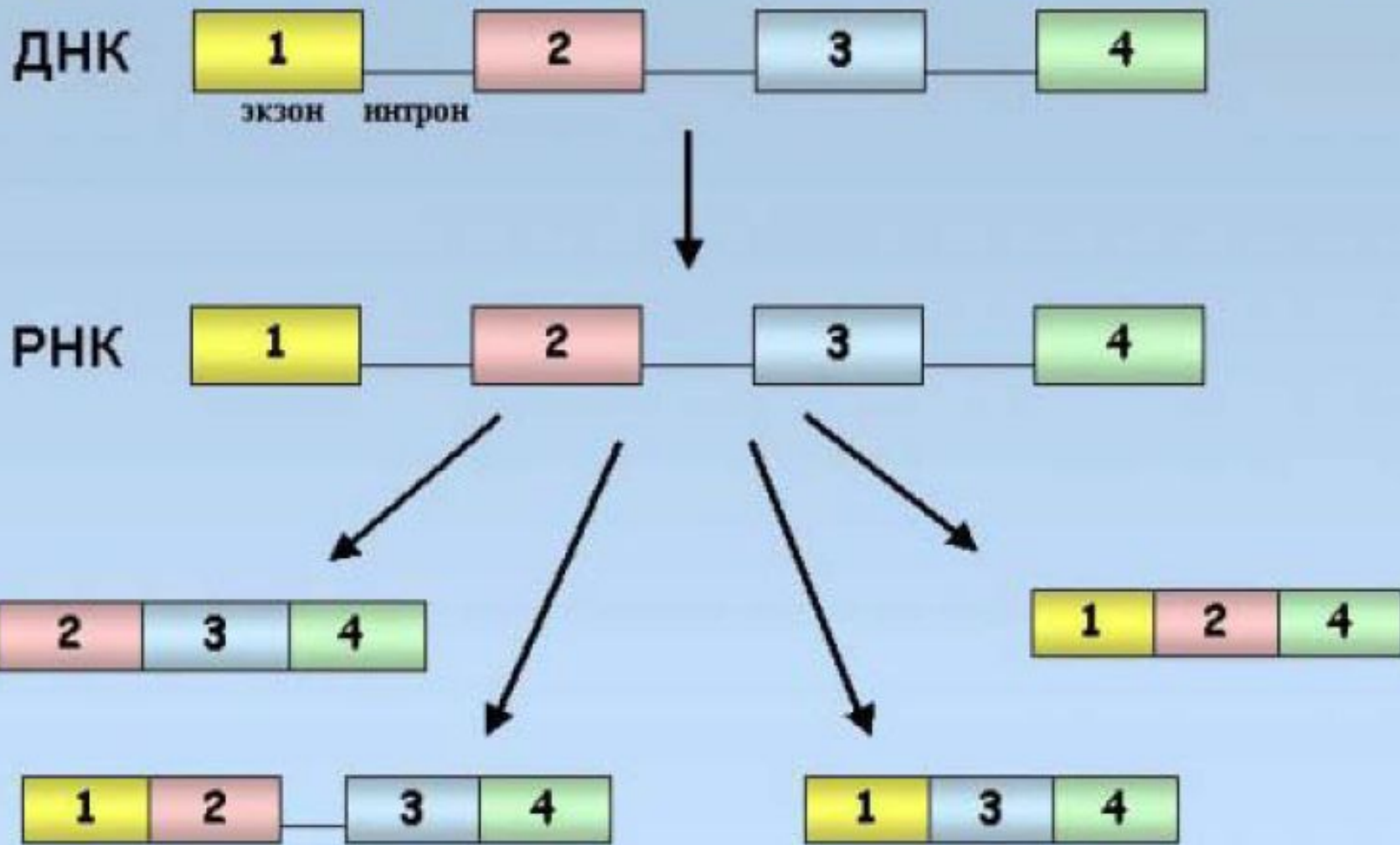


Пример альтернативного сплайсинга пре-мРНК

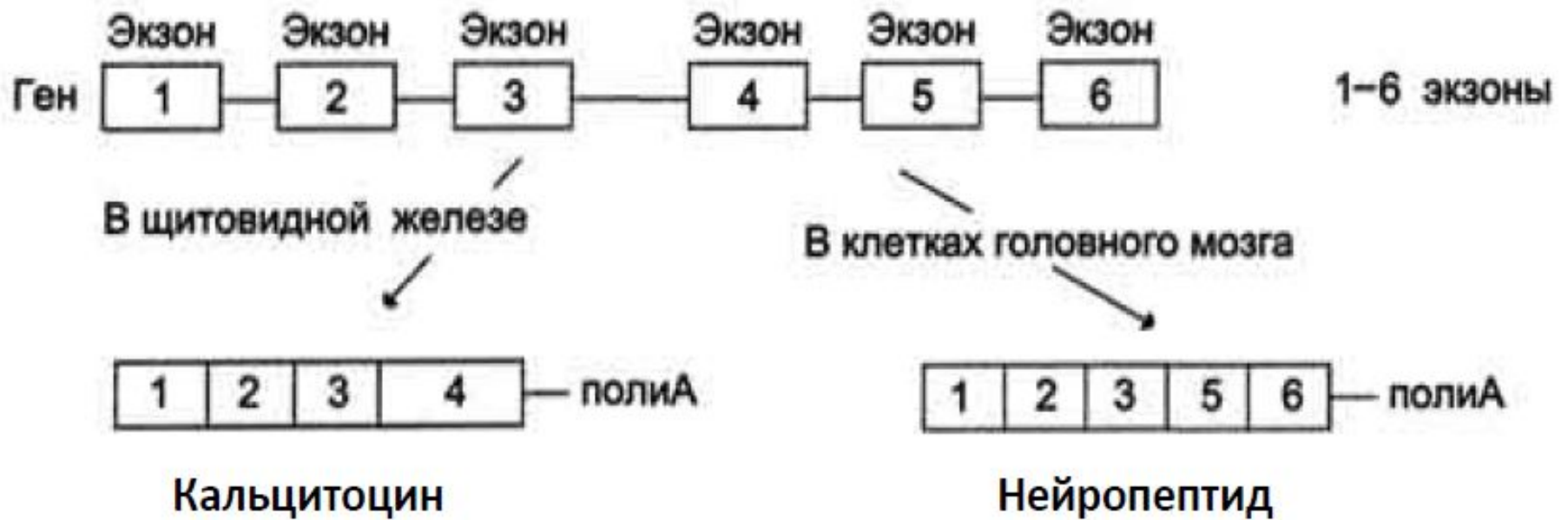
Альтернативный сплайсинг – различные комбинации экзонов остающиеся в зрелой мРНК получаемой из одной и той же пре-мРНК



Альтернативный сплайсинг



варианты сплайсинга РНК



В клетках щитовидной железы сплайсинг первичного транскрипта приводит к образованию кальцитониновой мРНК, включающей 4 экзона (1, 2, 3 и 4) и полиА-хвост.

В клетках мозга образуется мРНК, содержащая: экзоны 1, 2, 3, 5, 6 и полиА-хвост.

Пример альтернативного сплайсинга

У человека есть ген *slo*. Он «работает» во внутреннем ухе, в частности, этот белок присутствует в ворсинках, которые отвечают за распознавание высоты звука.

Ген *slo* состоит из 35 экзонов, 8 из которых могут или присутствовать, или отсутствовать в зрелой мРНК. Возможны 40 320 вариантов сплайсинга, но только около 500 из них обнаружены. В результате протекания 500 вариантов альтернативного сплайсинга образуются разные типы волосяных клеток внутреннего уха, которые реагируют на звуки разных частот от 20 до 20 000 герц.

Различия клеток в восприятии частоты определяются свойствами альтернативных сплайс-форм белка *Slo*.

ГЕНОМИКА

посвящена изучению
ГЕНОМА и ГЕНОВ живых организмов

установить полную генетическую
характеристику всей клетки

позволяет выразить сущность
организма

ГЕНОМИКА

```
graph TD; A[ГЕНОМИКА] --> B[Структурная]; A --> C[Функциональная]; A --> D[Сравнительная]; B --> E[содержание и организация геномной информации]; C --> F[реализация информации, записанной в геноме, от гена – к признаку]; D --> G[сравнительные исследования содержания и организации геномов разных организмов];
```

Структурная

содержание и
организация геномной
информации

Функциональная

реализация информации,
записанной в геноме, от гена – к
признаку

Сравнительная

сравнительные
исследования содержания
и организации геномов
разных организмов

МОЛЕКУЛЯРНАЯ МЕДИЦИНА -

диагностика, лечение и профилактика наследственных и ненаследственных болезней с помощью изучения нуклеиновых кислот и продуктов их экспрессии

ДИАГНОСТИКА -

хромосомные, генные и мультифакториальные болезни; пренатальная диагностика

ЛЕЧЕНИЕ -

*лечение генов и лечение генами
генная терапия*

ПРОФИЛАКТИКА -

предиктивная медицина

ОСОБЕННОСТИ Молекулярной Медицины:

- 1. индивидуальный характер;**
- 2. профилактическая направленность.**

Новая парадигма медицины в XXI веке

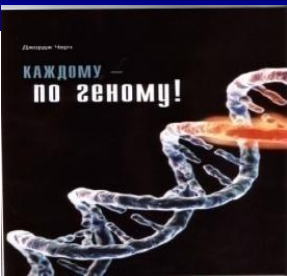
Основные принципы 7P Medicine



Предиктивная (предсказательная) – предсказание особенностей здоровья (заболевания, возможные в будущем, особенности реагирования и др.) конкретного человека, до появления первых симптомов.



Превентивная (предупредительная) – проведение профилактических мероприятий в отношении возможных, предсказанных заболеваний до появления первых симптомов.



Персонализированная – выбор лечебных воздействий с учетом индивидуальных (генетических) особенностей конкретного человека.



Партисипативная – активное участие пациента в профилактике возможных заболеваний и их лечение.

Новая парадигма медицины в XXI веке

Основные принципы 7P Medicine



медицина обеспечивающая - providing, подготовка новых кадров для здравоохранения за счет трансдисциплинарного медицинского образования



Упреждающая - preemptive, междисциплинарные исследования на дальний горизонт



Точка ухода за пациентом - point of care, которая предполагает эволюцию соприкосновения больного с медициной не только в больнице, но и за ее пределами



Реализация трансляционной персонализированной медицины.

Болезни человека

Моногенные
наследственные

менее
5%

Дефект в одном гене
приводит к развитию
болезни

Фенилкетонурия, галактоземия, адреногенитальный синдром, нейрофиброматоз, синдром Марфана, муковисцидоз и др.

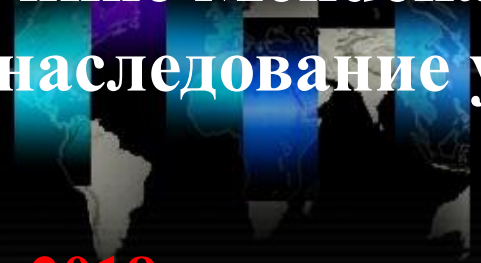
Многофакторные или
наследственно-
обусловленные

95%

Дефекты разных генов
могут приводить к болезни
под воздействием факторов
внешней среды

Ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, инсульт, астма, диабет, язвенная болезнь желудка, онкологические заболевания и ВПР.

Электронная база данных OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) "Менделевское наследование у человека"



Статистика OMIM на 20 марта 2018 г.

Тип наследования	АУТОСОМ.	X-СЦЕПЛ.	Y-СЦЕПЛ.	МИТОХОНДР.	ВСЕГО
ГЕНЫ	15041	728	49	35	15 853
ГЕНЫ С ИЗВЕСТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ И ФЕНОТИПЫ	82	2	0	2	86
ФЕНОТИПЫ С ИЗВЕСТНОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОСНОВОЙ	4844	324	4	31	6 171
ФЕНОТИПЫ ИЛИ ЛОКУСЫ С НЕИЗВЕСТНОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОСНОВОЙ	1455	128	5	0	1542
ДРУГИЕ ФЕНОТИПЫ, ДЛЯ КОТОРЫХ ПРЕДПОЛАГАЕТСЯ МЕНДЕЛЕВСКОЕ НАСЛЕДОВАНИЕ	1703	112	2	0	1817

ДНК диагностика наследственных болезней

- Идентифицированы **15 000** генов наследственных болезней
- Для **2000** заболеваний возможна дородовая и пресимптоматическая ДНК-диагностика в мире
- Для **500** заболеваний - в России и РБ



Мультифакториальные заболевания:

**являются результатом совместного
действия многих генетических
факторов в сочетании с факторами
внешней среды и случайными
причинами**

МФЗ

```
graph TD; MФЗ[MФЗ] --> Monogenic[Моногенные]; MФЗ --> Polygenic[Полигенные];
```

Моногенные

В основу включен один мутантный ген. (Реакция организма на лекарственные препараты, пыль, пищевые добавки, погодные условия)

Полигенные

В основе лежит комбинация многих генов взаимодействия со многими факторами среды.

- Полигенная природа болезней с наследственной предрасположенностью подтверждается с помощью молекулярно-генетического, клинико-генеалогического, близнецового и популяционно-статистического методов. Достаточно объективен и чувствителен близнецовый метод.
-
- С помощью близнецового метода показана наследственная предрасположенность к некоторым инфекционным заболеваниям (туберкулез, полиомиелит) и многим распространенным болезням ишемическая болезнь сердца, сахарный диабет, язвенная болезнь, шизофрения и др.

МФЗ – патология, связанная как с суммарным (аддитивным) действием генетических и средовых факторов.

- 1) ВПР: пороки невральной трубки (анэнцефалия, *spina bifida*, врожденная косолапость, врожденный вывих бедра, гипоспадия, расщелина верхней губы и неба, болезнь Гиршпрунга, атрезия пищевода, синдром Робена (микрогения, глоссоптоз – недоразвитие и западение, расщелина неба).
- 2) Хронические распространенные заболевания: ГБ, БА, ИБС, ЗНО, псориаз, ревматизм, сах. диабет 1 типа, шизофрения, МДП, ЯБЖидК.

Частота встречаемости МФЗ

ВПР на 1000 новорожденных:

Косолапость = 5, гипоспадия = 3, вывих бедра = 2,
спинномозговая грыжа = стеноз привратника =
расщелина губы и неба = черепно-мозговая грыжа =
1, гидроцефалия = 0,5.

Соматические болезни на 1000 населения:

ГБ = 200, ИБС = 100, ЯБЖ = 50, псориаз = диабет = 20

Болезни нервной системы на 1000 населения:

Шизофрения = 20, эпилепсия = 10, БПР = 5

Гены предрасположенности
Гены предрасположенности к заболеванию представляют структурные варианты генов (аллели), «которые совместимы с рождением и жизнью в постнатальном периоде, но при определённых неблагоприятных условиях могут способствовать развитию того или иного заболевания.

Гены внешней среды:

ответственны за метаболизм, деградацию и детоксикацию ксенобиотиков.

P-450: CYP3A4, CYP1A1, CYP2C и др;

Суперсемейства глутатион-трансфераз: GSTM1, GSTT1, GSTP1 и др.;

NAT1, NAT2; PON

Гены «триггеры»:

Обеспечивают ключевые биохимические реакции.
ACE, Apo E, MTHFR (метилен-тетрагидрофолат-редуктаза)

Гены клеточных рецепторов

определяют поступление веществ в клетки
AT1R, AR, CCR-5 (С-С-рецептор хемокина 5)

Генные сети

Организм (в понятии биоинформатики) - это глобальная сеть из множества локальных генных сетей. А все процессы в организме — результат взаимодействия (интеграции) его генных сетей.

Горизонтальная интеграция - взаимодействие сетей одного уровня.

Вертикальная (иерархическая) интеграция - регулировка работы сети другого уровня.

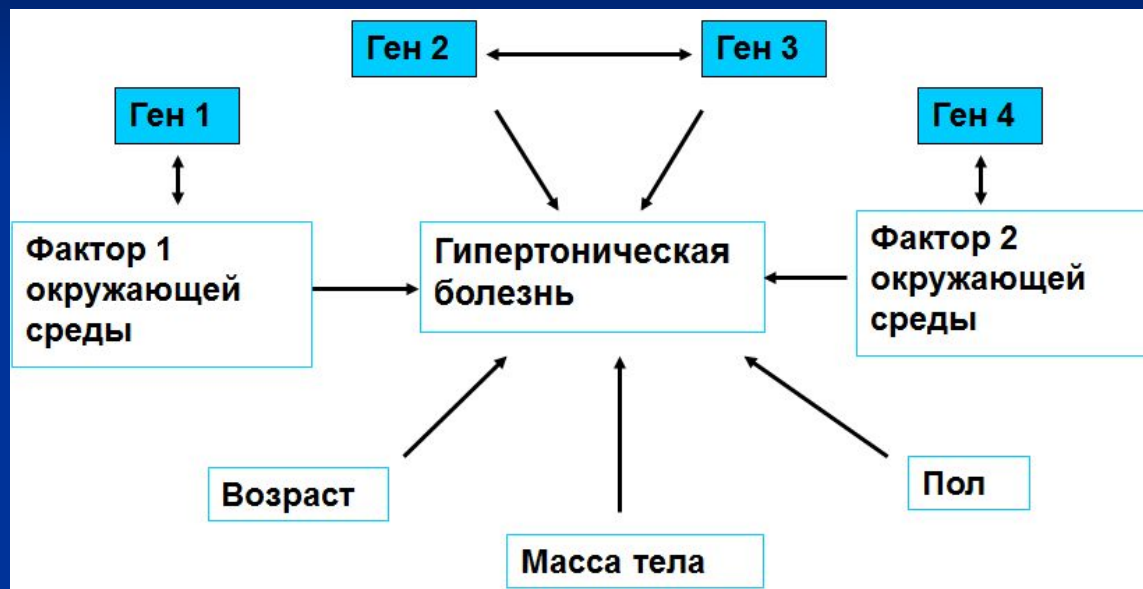
Генная сеть (ГС) - группа координированно экспрессирующихся генов, контролирующих выполнение определенной функции организма.

Экспрессия генов - процесс преобразования наследственной информации от гена (последовательности нуклеотидов ДНК) до функционального продукта (РНК или белка).



Особенности многофакторных болезней

- Имеют сложный характер наследования
- Связаны с действием многих генов



Мультифакториальная модель детерминации гипертонической болезни

Модель демонстрирует потенциальное влияние генов, факторов окружающей среды и демографических факторов на риск развития заболевания.

Особенности МФЗ:

- 1) Высокая частота встречаемости в популяции.
- 2) Несоответствие наследования законам Менделя.
- 3) Выраженная аллельная и межаллельная генетическая гетерогенность.
- 4) Риск развития болезни у обследуемого зависит от тяжести МФЗ у его родителей или родственников (чем тяжелее, тем больше риск).
- 5) Риск развития МФЗ зависит от количества больных родственников 1 степени родства (для сахарного диабета – если больны оба родителя риск=40%, если один=20%, если не больны=10%).
- 6) Риск развития МФЗ в семье зависит от ЧВ болезни в данной популяции.

НАСЛЕДСТВЕННАЯ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ - это преобладающий генетический компонент, от вклада которого зависит результат суммарного эффекта генетических и средовых факторов, вызывающих у обследуемого вероятность заболеть МФЗ.

ПОРОГ ПОДВЕРЖЕННОСТИ – уровень значений предрасположенности, при превышении которого запускается механизм развития МФЗ.

ОСОБЕННОСТЬ МФЗ – аддитивное (суммарное) действие множества генных локусов и большого числа внешних факторов.

Коэффициент наследуемости $h^2 = V_g / V_p$,

где V_g – генетическая компонента дисперсии, V_p – фенотипическая компонента дисперсии.

Дисперсия – это разнообразие признаков в популяции.

ПРИ ИЗУЧЕНИИ МФЗ ОПРЕДЕЛЯЮТ:

- 1) Вклад распространенных SNP (single nucleotide polymorphism) генов в развитие болезни.
- 2) Роль полиморфных тандемных повторов в патогенезе заболевания (VNTR – variable number tandem repeats).
- 3) Значение определенных генов в развитие болезни для уточнения ее патогенеза.
- 4) Ассоциацию развития болезни со средовыми факторами с целью их устранения (гиподинамия и избыток холестерина в пище в развитии болезней ССС).

Для поиска генетических причин предрасположенности к МФЗ исследуется ассоциация с полиморфными генами.

АССОЦИАЦИЯ – более высокая частота полиморфного гена-маркера при конкретном МФЗ.

Ассоциации с антигенами системы **HLA**:

HLA-B27 – болезнь Бехтерева и Рейтера, псориатический спондилит,

HLA-DRB1 – рассеянный склероз,

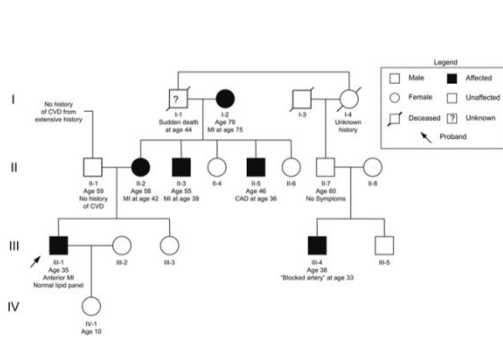
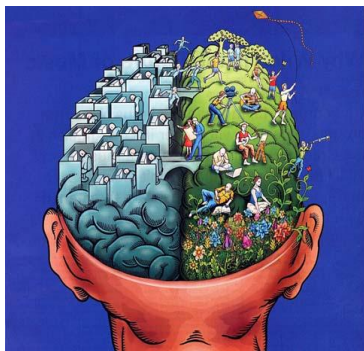
HLA-DR4 – сахарный диабет 1 типа,

HLA-A3 – гемохроматоз,

HLA-CW6 – псориаз.

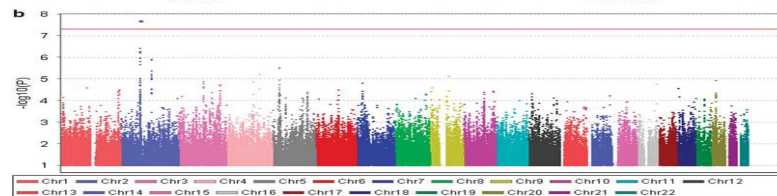
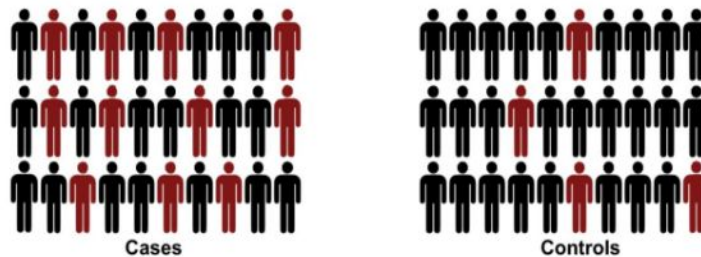
Для анализа сцепления МФЗ с полиморфными маркерами используются от 300 до 500 ДНК-маркеров, распределенных по всему геному – метод полногеномного скрининга (GWAS - **Genome-wide association study**).

Молекулярно-генетические подходы к изучению многофакторных болезней



TTGGCCAGCTGGACGAGGGCGATGAC

TTGGCCAGCTGGATGAGGGCGATGAC



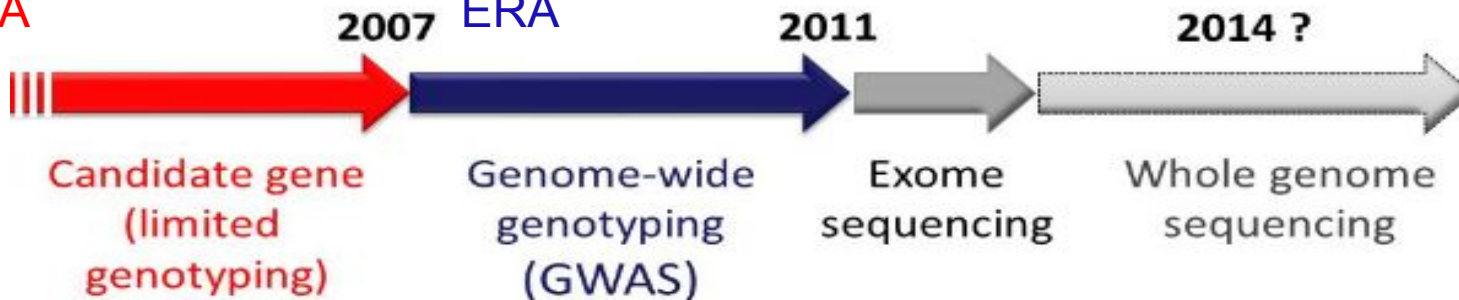
* Анализ сцепления признака

* Поиск ассоциаций с генами-кандидатами

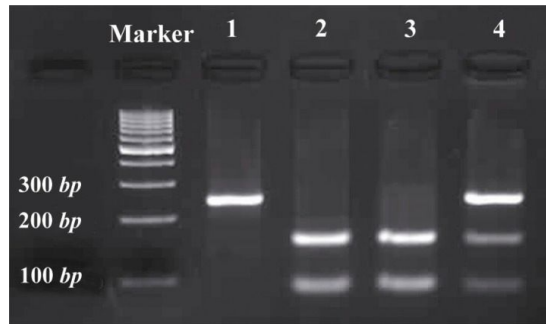
* Полногеномный анализ ассоциаций (GWAS)

PRE-GENOMIC ERA

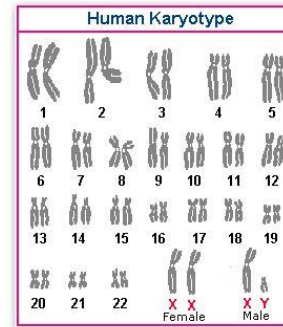
GENOMIC ERA



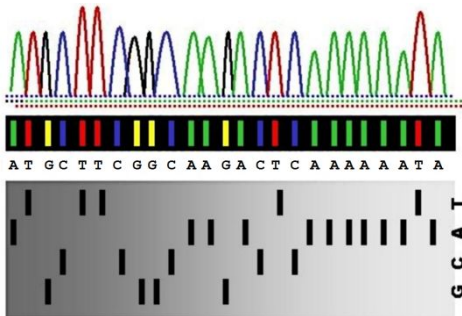
Молекулярно-генетические технологии



ПДРФ, 1980-е



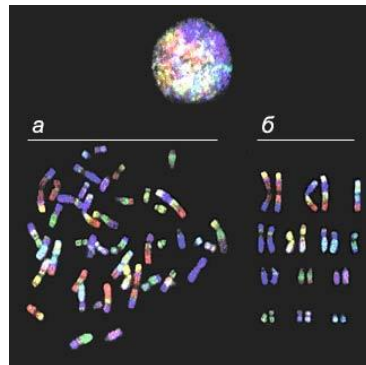
Кариотипирование, 1950-е



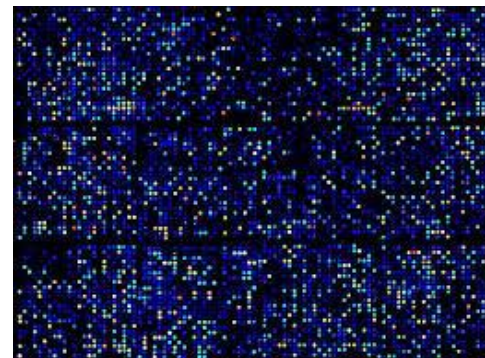
Секвенирование по Сэнгеру, 1970-е



NGS (MPS), 2010-е



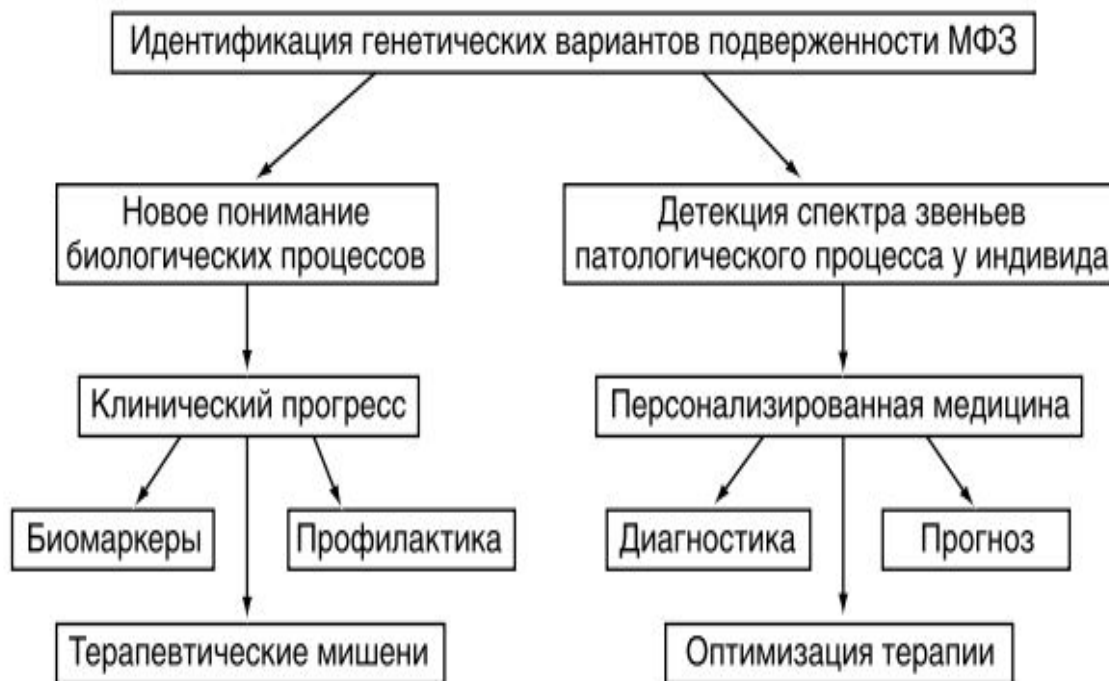
FISH, 1990-е



Микрочипы, 2000-е

Идентификация генов предрасположенности к МФЗ

- Характеристика структуры генов и их многочисленных аллельных вариантов;
- Определение точной локализации генов на определенной хромосоме.



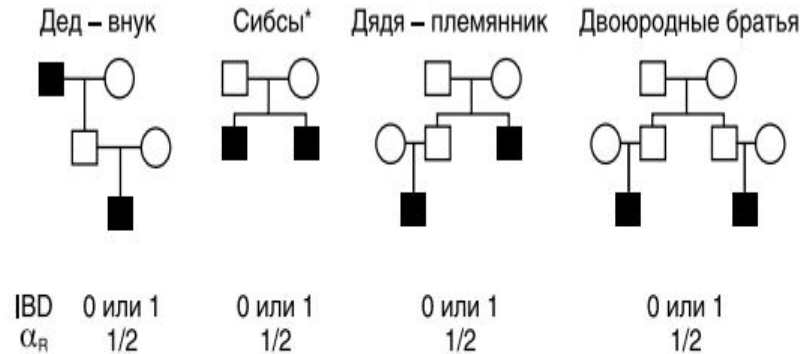
Идентификация генов предрасположенности к МФЗ

- Анализ сцепления - метод генетического картирования, основанный на прослеживании ко segregации генов при передаче от родителей к потомкам в ряду поколений. Он состоит в проверке сегрегации признаков и генетических маркеров в родословной на соответствие определенной модели наследования;
- При этом рассчитывают шансы (вероятности) за и против сцепления в конкретной семье;
- Анализ картирования простых моногенных признаков;
- Зависит от: размера родословной, типа наследования, уровня пенетрантности, распределения генотипов в популяции;

Идентификация генов предрасположенности к МФЗ

- **Метод идентичных по происхождению аллелей (IBD – identical by descent)** информация о сцеплении только на основе наследования маркеров в парах больных родственников без предположения о типе наследования и других параметрах;

Оценивают, насколько чаще по сравнению со случайной сегрегацией пара больных родственников наследует одну и ту же (идентичную по происхождению) копию участка генома;



IBD – число аллелей общего происхождения

α_R – IBD-статистика при случайной менделевской сегрегации (вероятность иметь один идентичный аллель для данной пары родственников)

*Сибсы рассматриваются как две полусибсовские пары

- **Тест на неравновесие при передаче (TDT – transmission disequilibrium test)** – если какой-то аллель изучаемого локуса ассоциирован с заболеванием, то его должны чаще обнаруживать у больных людей по сравнению с другими аллелями того же локуса;

Для проверки этого в TDT применяют сравнение частот аллелей, наследуемых и ненаследуемых больными потомками от своих родителей; Особенность TDT состоит в том, что в расчет принимают аллели, полученные только от гетерозиготных по изучаемому локусу родителей.

Гипотезы рискованных аллелей

- CD/CV (common disease/common variant — распространенная болезнь/распространенный вариант гена) — значительную часть аллелей подверженности МФЗ составляют аллели, существовавшие до начала глобального расселения человечества, или те из них, которые прошли положительный отбор;
- CD/RA (common disease/rare allele — распространенная болезнь/редкий аллель) — основана на том, что в основном предрасположенность к МФЗ определяет избыток у индивидуума редких рискованных аллелей генов метаболических и сигнальных путей, ответственных за формирование соответствующего болезненного фенотипа.

Параметры	CD/CV	CD/RA
Частота аллелей предрасположенности	Высокая	Низкая
Величина эффекта аллелей предрасположенности	Небольшая	Умеренная
Локусная гетерогенность (число локусов предрасположенности для болезни)	Высокая	Может быть небольшой
Аллельная гетерогенность (число различных аллелей предрасположенности в локусе)	Низкая	Высокая
Происхождение аллелей предрасположенности	От общего древнего предка	Относительно недавние мутации
Технология детекции факторов предрасположенности	Ассоциативные исследования	Ресеквенирование

Идентификация генетических вариантов в соответствии с частотой рисковых аллелей и силой генетических эффектов



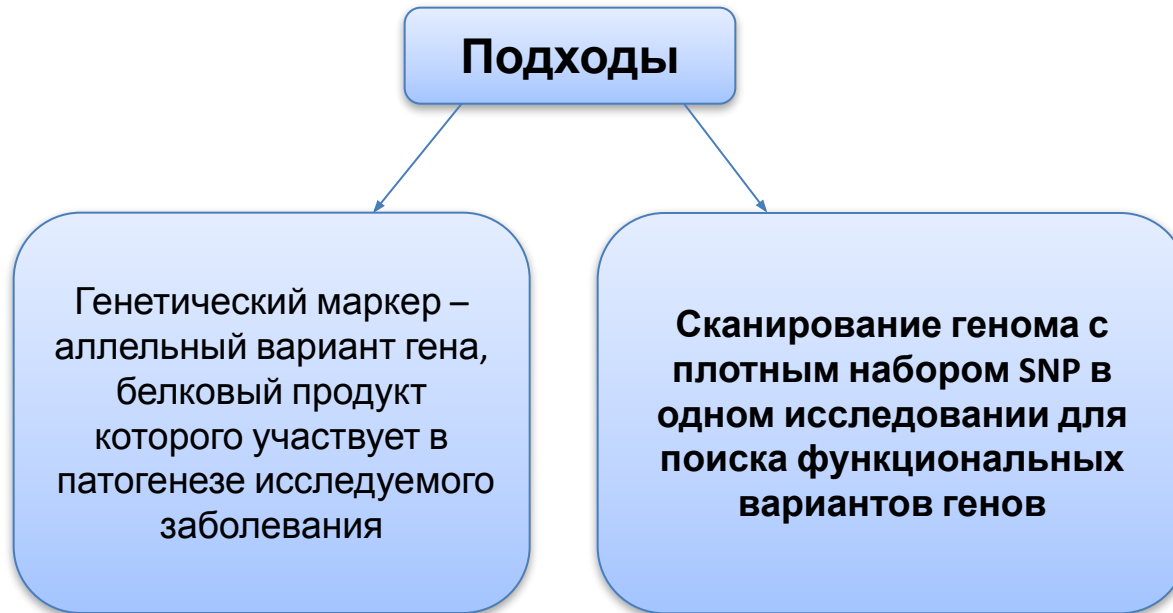
Поиск ассоциаций с генами-кандидатами

Сначала формируется гипотеза о связи какого-либо гена с признаком.

В ассоциативных исследованиях сопоставляется встречаемость определенного аллеля гена-кандидата в популяции в целом и у лиц, обладающих интересующим признаком.

Если данный аллель чаще встречается у носителей более выраженного признака, можно предположить участие этого аллеля в наследственной детерминации данного признака.

Генетические ассоциации МФЗ (поиск ассоциаций с генами кандидатами)



$$OR = \frac{M^1_{с} \times M^2_{к}}{M^2_{с} \times M^1_{к}}$$

OR – отношение шансов

OR= 0 - ∞,

OR = 1 – при отсутствии влияния одного показателя маркера на другой

Отношение шансов (OR – odds ratio) – используют в исследованиях «случай-контроль».

OR получают путем сравнения частот двух сравниваемых показателей M^1 и M^2

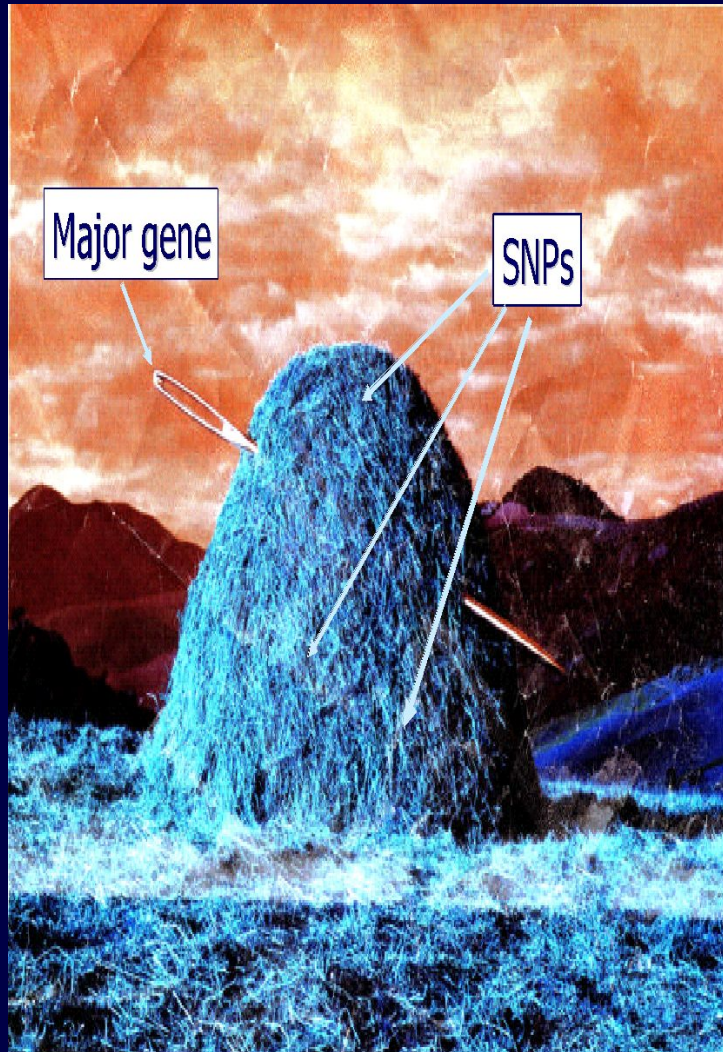
у больных (обозначаем M_c – «с» – означает случай) и

у здоровых (обозначаем M_k – «к» – означает контроль).

Например, M^1 – наличие нормального аллеля изучаемого гена,
 M^2 – наличие мутантного аллеля.

Соответственно можно определить во сколько раз (или на сколько процентов) возрастает шанс заболеть у носителей мутантного аллеля.

ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ АССОЦИАЦИЙ МНОГОФАКТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ (GWAS – genome-wide association study)



- Проводят поиск связей между различными SNP (не менее 300, распределенных по всему геному) и конкретным заболеванием.
- Большинство известных полиморфных вариантов генов предрасположенности к сложным фенотипам оказывают слабо или средне-выраженный эффект (1-2%).
- Многие локусы, ассоциированные с фенотипами, не являются функционально значимыми.

САХАРНЫЙ ДИАБЕТ 1 ТИПА

- 1) Ассоциация с изменениями в различных генах (IDDM – insulin-dependent diabetes mutations), главным образом в HLA (6p21.3): HLA-DRB1, DQA-1, DQB-1, DPB-1.
- 2) Ассоциация с VNTR (variable number tandem repeats 11p15.5) в 5'-UTR гена инсулина.

Молекулярная диагностика СД1 применяется для дифференциальной диагностики, определения риска развития болезни в семьях с повышенным риском (при наличии СД1 у кровных родственников).

САХАРНЫЙ ДИАБЕТ 2 ТИПА

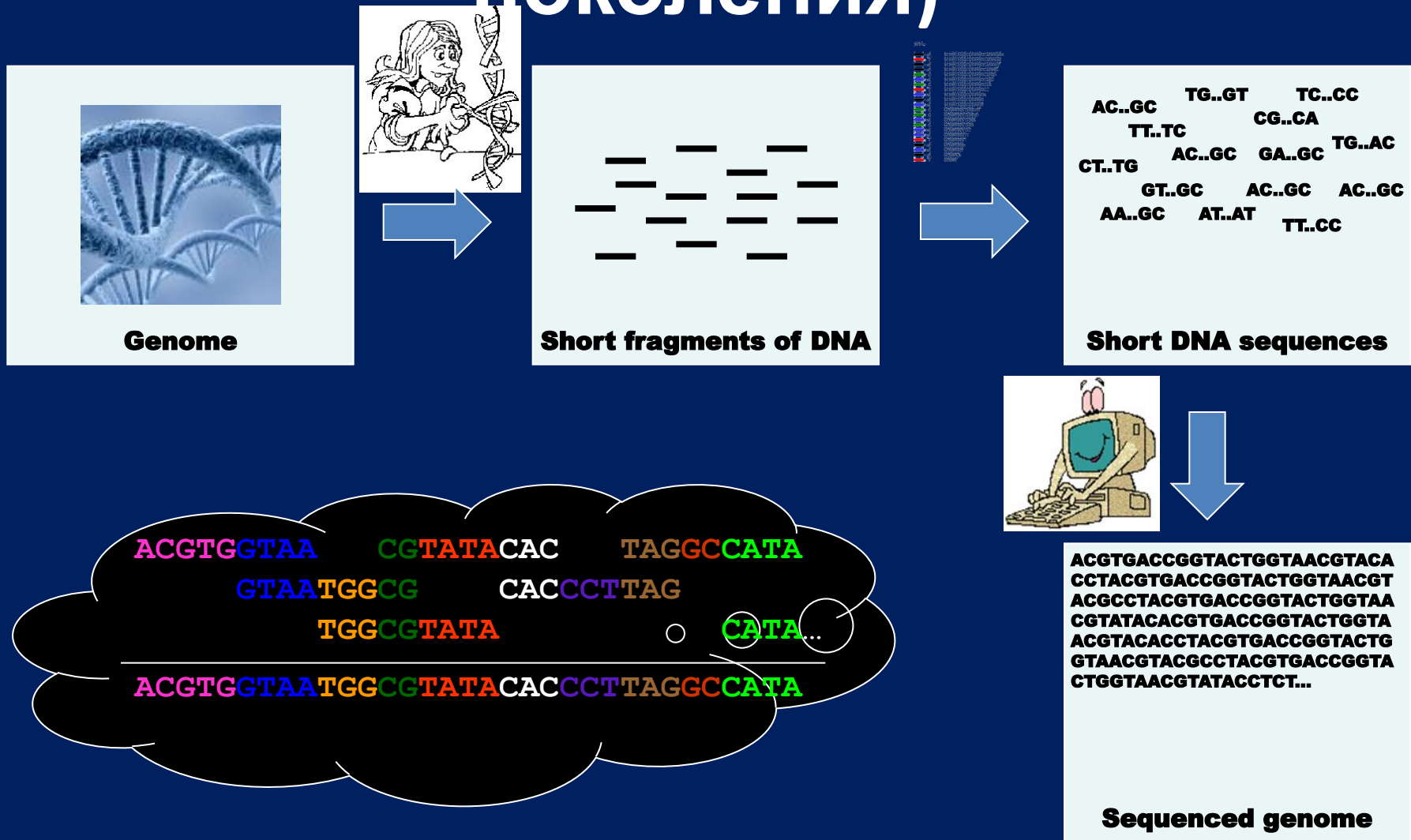
Ассоциация с генами MODY (maturity onset diabetes of the young – начало диабета зрелых у молодых). Гены инсулинрезистентности: PPAR γ (3p25.2, кодирует рецептор, активируемый пролифераторами пероксисом- участвует в метаболизме углеводов и жиров), KLF14 (кодирует Круппель-подобный транскрипционный фактор).

Выявляют ассоциацию выявленных полиморфизмов с прогнозом эффективности применяемой диеты, а также для прогнозирования развития СД2 у людей с факторами риска.

БРОНХИАЛЬНАЯ АСТМА

- 1) Ассоциация с генами, расположенными на 5q23-24 – кластер генов семейства интерлейкинов 3, 4, 5, 13. Данные гены связаны с Т-хелперами.
- 2) Ассоциация с генами функционирования дыхательной системы (ADRB2 – 5q32, кодирует бета-2-адренергический рецептор;
GSTM1 – кодирует глутатион S-трансферазу Mu1 – 1p13.3, фермент детоксикации ксенобиотиков;
GSTP1 – глутатион-S-трансфераза P – 11q13.2;
LTA – 6p21.33 – кодирует лимфотоксин-альфа (синоним – фактор некроза опухоли бета);
NOS1 – 5 хромосома, кодирует синтетазу оксида азота1.
- 3) Ассоциация с генами врожденного иммунитета (IL10, TLR2 и TLR4 – кодирует толл-подобный рецептор 2 или 4, обеспечивающий функционирование врожденного иммунитета).

Next Generation Sequencing (Секвенирование нового поколения)





Основные преимущества NGS

Возможность идентификации новых вариантов

Высокая производительность

Возможно тестирование сразу нескольких генетических заболеваний у нескольких десятков пациентов за одну реакцию секвенирования, что значительно снижает себестоимость проводимого анализа.

Чувствительность

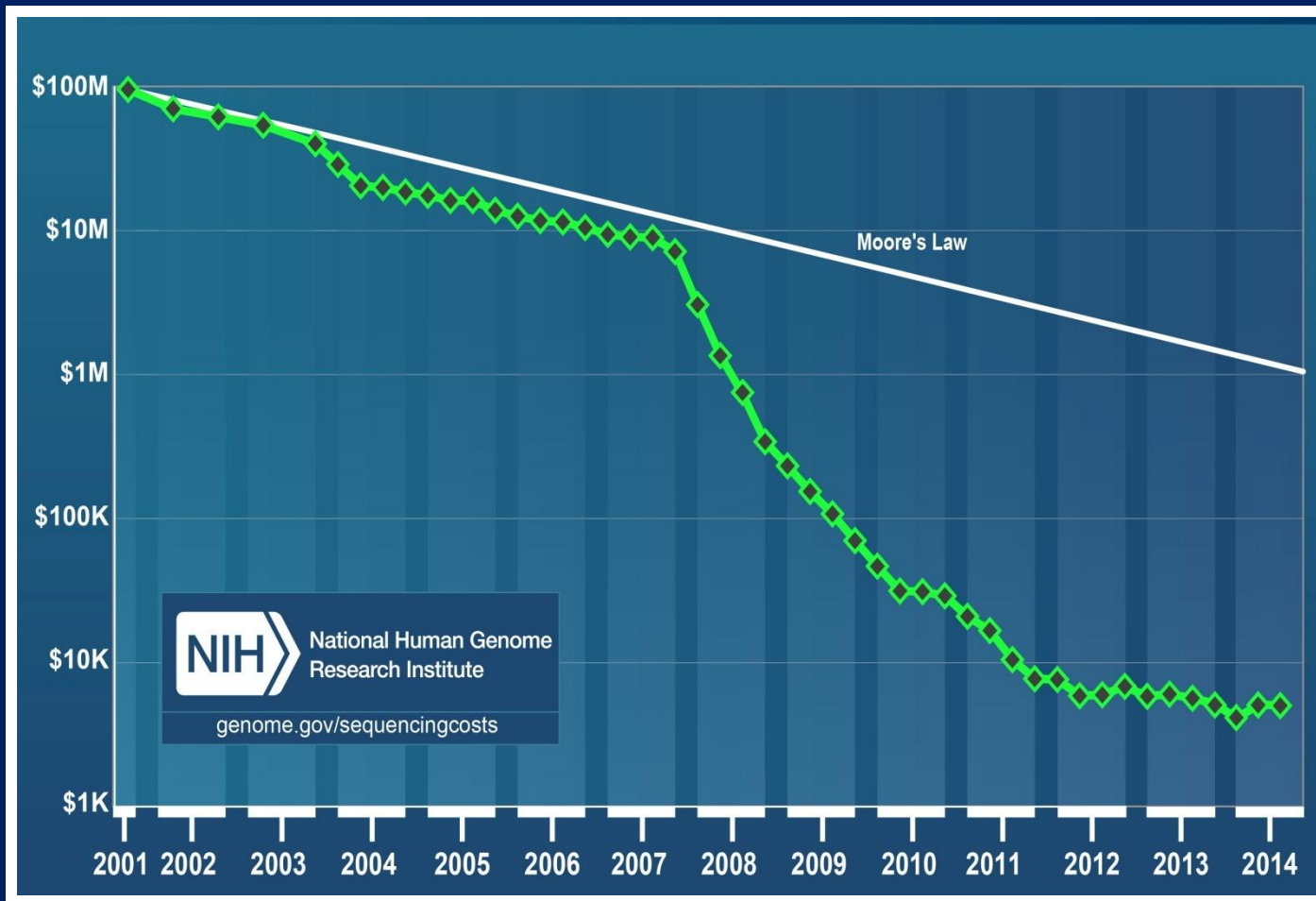
Позволяет находить мутации, представленные лишь в небольшой популяции клеток анализируемого биоматериала.

Короткая продолжительность рабочего цикла

Основные технологии NGS

Фирмы	Технология секвенирования	Производительность	Продолжительность рабочего цикла
 	Биолюминесцентная	~ 1 Gb	≤ 23 ч
	Флуоресцентная ДНК-полимеразная	200...500 Gb	5...10 дней
	Флуоресцентная ДНК-лигазная	200 Gb	5...10 дней
 	Полупроводниковая	200 Mb	2...4 ч

Динамика стоимости секвенирования генома



Дата	Стоимость за Мб	Стоимость за геном
Sep-01	\$5 292.39	\$95 263 072
Mar-02	\$3 898.64	\$70 175 437
Sep-02	\$3 413.80	\$61 448 422
Mar-03	\$2 986.20	\$53 751 684
Oct-03	\$2 230.98	\$40 157 554
Jan-04	\$1 598.91	\$28 780 376
Apr-04	\$1 135.70	\$20 442 576
Jul-04	\$1 107.46	\$19 934 346
Oct-04	\$1 028.85	\$18 519 312
Jan-05	\$974.16	\$17 534 970
Apr-05	\$897.76	\$16 159 699
Jul-05	\$898.90	\$16 180 224
Oct-05	\$766.73	\$13 801 124
Jan-06	\$699.20	\$12 585 659
Apr-06	\$651.81	\$11 732 535
Jul-06	\$636.41	\$11 455 315
Oct-06	\$581.92	\$10 474 556
Jan-07	\$522.71	\$9 408 739
Apr-07	\$502.61	\$9 047 003
Jul-07	\$495.96	\$8 927 342
Oct-07	\$397.09	\$7 147 571
Jan-08	\$102.13	\$3 063 820
Apr-08	\$15.03	\$1 352 982
Jul-08	\$8.36	\$752 080
Oct-08	\$3.81	\$342 502
Jan-09	\$2.59	\$232 735
Apr-09	\$1.72	\$154 714
Jul-09	\$1.20	\$108 065
Oct-09	\$0.78	\$70 333
Jan-10	\$0.52	\$46 774
Apr-10	\$0.35	\$31 512
Jul-10	\$0.35	\$31 125
Oct-10	\$0.32	\$29 092
Jan-11	\$0.23	\$20 963
Apr-11	\$0.19	\$16 712
Jul-11	\$0.12	\$10 497
Oct-11	\$0.09	\$7 743
Jan-12	\$0.09	\$7 666
Apr-12	\$0.07	\$5 901
Jul-12	\$0.07	\$5 985
Oct-12	\$0.07	\$6 618
Jan-13	\$0.06	\$5 671
Apr-13	\$0.06	\$5 826
Jul-13	\$0.06	\$5 550
Oct-13	\$0.06	\$5 096
Jan-14	\$0.04	\$4 008
Apr-14	\$0.05	\$4 920
Jul-14	\$0.05	\$4 905

Data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP) (<http://www.genome.gov/sequencingcosts/>)

Подходы для открытия новых генов многофакторных болезней:

Экзом — часть генома, представляющая экзоны, т. е. последовательности, которые транскрибируются на матричную РНК после того, как интроны удаляются в процессе сплайсинга РНК.



Полноэкзомное секвенирование:

- Анализ 1.2 - 1.5% всего генома, состоит из 230 000 экзонов;
- Обеспечивает покрытие более чем 95% экзонов, которые содержат примерно 85% мутаций наследственных болезней и SNP многих МФЗ.
- Freeman-Sheldon syndrome, *MYH3* (Ng SB et al., 2009)
- Miller syndrome, *DHODH* (Ng SB et al., 2010)
- Schinzel-Giedion syndrom, *SETBP1* (Hoishen A. et al., 2010)

Близнецовый метод

введен в медицинскую практику Ф. Гальтоном в 1875г.

- основан на явлении многоплодной беременности у человека и позволяет определить соотносительную роль генотипа и среды в проявлении признаков.
- Различают монозиготных и дизиготных близнецов.
- Частота появления близнецов у людей составляет около 1% (1/3 монозиготных, 2/3 дизиготных).



Процент сходства близнецов по изучаемому признаку называется **конкордантностью**, а процент различия - **дискордантностью**. При сопоставлении монозиготных и дизиготных близнецов определяют коэффициент парной конкордантности, указывающий на долю близнецовых пар, в которых изучаемый признак проявился у обоих партнеров. Этот коэффициент выражается в процентах или в долях единицы и определяется по формуле: $K = C / C + D$, где C – число конкордантных пар, D – число дискордантных пар.

Так как монозиготные близнецы имеют одинаковый генотип, то конкордантность у них выше, чем у дизиготных.

Признаки	Конкордантность, %	
	МБ	ДБ
Группа крови (AB0)	100,0	46,0
Цвет волос	97,0	23,0
Цвет глаз	99,5	28,0
Папиллярные узоры	92,0	40,0
Шизофрения	67,0	12,1
Сахарный диабет	84,0	37,0
Косолапость	45,5	18,2
Туберкулез	66,7	23,0
Корь	97,4	95,7
Бронхиальная астма	19,0	4,8

- Для количественной оценки роли наследственности и среды в развитии того или иного признака обычно используется коэффициент наследуемости, вычисляемый по формуле Хольцингера:

$$H = \frac{K_{\text{МБ}}(\%) - K_{\text{ДБ}}(\%)}{100\% - K_{\text{ДБ}}(\%)}$$

- где H – коэффициент наследуемости, $K_{\text{МБ}}$ - конкордантность монозиготных близнецов, $K_{\text{ДБ}}$ - конкордантность дизиготных близнецов. Если результат расчетов по формуле Хольцингера приближается к единице, то основная роль в развитии признака принадлежит наследственности, и наоборот, чем ближе результат к нулю, тем больше роль средовых факторов.
- **Доля среды в формировании признака (болезни):**
 - $C = 1 - H$

БЛИЗНЕЦОВЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Конкордантность МЗБ (Кмб) по болезням:

Для мультифакториальных = 10 – 60%

(Ревматизм и ГБ=26%, инсульт=22%, инфаркт миокарда=20%),

Для моногенных = 100%.

Конкордантность для ДЗБ (Кдб) по болезням:

Для мультифакториальных = 4 – 18%

(Ревматизм и ГБ=10%, инсульт=10%, инфаркт миокарда=15%),

Для АД типа наследования = 50%,

Для АР типа наследования = 25%

Семейное накопление МФЗ

- Метод случай-контроль: сравнивают частоту, с которой болезнь обнаруживают в родословной больных, с таковой в специально подобранных контрольных группах или с заболеваемостью в общей популяции;
 - Общее свойство МФЗ – склонность к более ранней манифестации первых признаков болезни, более тяжелому течению и исходам у пациентов с отягощенной наследственностью по конкретному заболеванию в сравнении с людьми с благоприятной наследственностью.
- Клиническая характеристика ИБС у больных с отягощенным (I) и неотягощенным анамнезом (II)**

Показатель	Группа	
	I	II
Возраст (годы):		
– начала заболевания;	43,8	52,2
– средний	53,5	61,6
Первые признаки ИБС:		
– стенокардия;	66,6	51,8
– инфаркт	16,7	5,3
Характер поражения миокарда:		
– инфаркт крупноочаговый;	28,6	19,6
– инфаркт рецидивирующий	23,8	7,1
Частота поражения сосудов:		
– головного мозга;	30,9	11,1
– нижних конечностей;	21,4	5,5
– мезентериальных	14,3	12,5

Семейное накопление МФЗ

λ – относительный коэффициент риска – мера семейного накопления

$$\lambda = \frac{\text{Распространенность болезни среди родственников больного}}{\text{Распространенность в популяции}}$$

$\lambda = 1$ – вероятность развития болезни у родственников больного не выше, чем в общей популяции;

$\lambda > 2$ – генетический вклад в болезнь значителен.

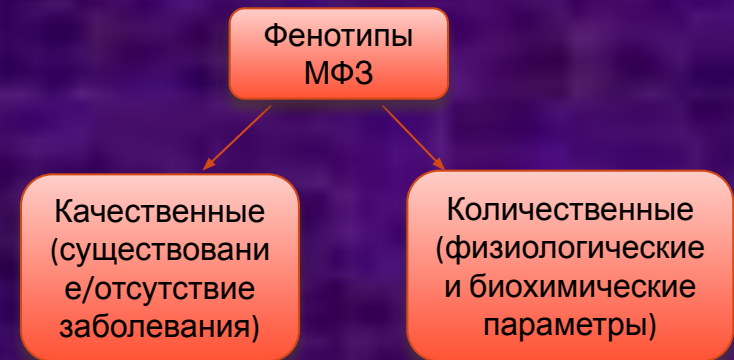
Болезни	λ
С наследственной предрасположенностью	
Болезнь Альцгеймера	3–4
Диабет 1 типа	15
Диабет 2 типа	3–4
Шизофрения	8–9
Рассеянный склероз	20–30
Аутизм	75–150
Моногенные	
Муковисцидоз	500
Хорея Гентингтона (доминантная форма)	5000

Генетика количественных признаков МФЗ

- **Корреляция (r)** – степень сходства между родственниками по количественному признаку;
- Если корреляция между родственниками соответствует пропорции общих генов – признак полностью детерминирован наследственностью;
- Для количественных признаков r редко совпадает с теоретически ожидаемыми величинами;
- Корреляция конкретного физиологического показателя между родственниками отражает влияние как наследственности, так и общих внешнесредовых факторов;
- **Наследуемость (h^2)** – доля общей фенотипической изменчивости количественного признака, обусловленной вкладом генетических факторов:
 $h^2 = 2r$ – для родственников I степени родства
 $h^2 = 4r$ – для родственников II степени родства

Признак (болезнь)	h^2 , %
Бронхиальная астма	60
Артериальное давление	40–70
Минеральная плотность кости	60–80
Дегенерация межпозвонковых дисков	60–80
Сахарный диабет 2-го типа	70
Ожирение	50–90
Остеоартрит	50–70
Ревматоидный артрит	60
Язвенный колит	50
Алкоголизм	50–70
Наркомания (героин)	50

$$h^2 = \frac{\text{изменчивость у ДБ} - \text{изменчивость у МБ}}{\text{изменчивость у ДБ}}$$



ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МФЗ ПОЗВОЛЯЮТ:

1. Использовать генетические маркеры в дифференциальной диагностики разных заболеваний и их форм.
2. Разрабатывать способы профилактики болезни в каждом конкретном случае (персонализированная медицина).
3. Использовать генетические маркеры для предсказания риска развития болезни (например, по мутациям в гене BRCA – риск развития РМЖ у женщин).
4. Использовать маркеры для правильного назначения лечения (мутации в BRCA – радикальная мастэктомия вместо консервативного).
5. Разрабатывать новые способы патогенетического лечения лекарственными препаратами на основе новых данных о патогенезе.
6. Прогнозировать эффективность лекарства (токсичность или резистентность в фармакогенетике).
7. Разрабатывать генноинженерные способы лечения МФЗ.
8. Определить средовые факторы риска с целью их коррекции.

Диагностика онкологических заболеваний

В России стоят на учете 2,9 млн. онкопациентов, ежегодно выявляется более 500 000 новых случаев

В 2020 году количество вновь диагностированных онкопациентов во всем мире может достигнуть 17 млн.

У 10-20% пациентов терапия неэффективна с начала лечения (первичная устойчивость)

50-70% пациентов впоследствии приобретают вторичную устойчивость

Всего в мире на онкопрепараты в 2013 году потрачено порядка 90 млрд.долл, из них лишь ~25% - на эффективные препараты

Диагностика маркеров, связанных с лечением

Диагностика маркеров начала опухолевого процесса

Диагностика наследственных форм рака

Диагностика микрометастазов

Диагностика маркеров прогноза и клинических маркеров

Внедрение диагностических услуг многофакторных заболеваний



**Выявить
маркеры начала и
прогноза
заболевания**



**Избегать подбора
лекарств методом
проб и ошибок**



**Исключить
затраты на
заведомо
неэффективную
терапию**

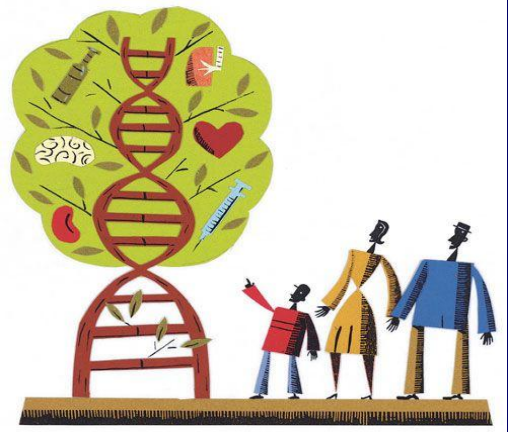


**Повысить
эффективность
лечения
многофакторных
заболеваний**

← Разработать персонализированное лечение →

Диагностические услуги могут предоставляться в виде версий, различных по стоимости и типу диагностики, из которых пациент сможет выбрать наиболее подходящую

Генетические исследования сегодня дают возможность:



- **Выяснить особенности наследственной предрасположенности к болезням**
- **Проводить пренатальную и пресимптоматическую ДНК диагностику НЗ**
- **Оценить особенности индивидуальной чувствительности к лекарствам**
- **Разработать варианты «Генетического паспорта»**
- **Предсказать ответ на терапию**
- **Подобрать оптимальную генетически оправданную диету**

В ИТОГЕ – помочь человеку жить в гармонии со своими генами и достичь максимума активного долголетия!