



Інститут молекулярної біології і генетики
Національна академія наук України

Institute of Molecular Biology and Genetics
National Academy of Sciences of Ukraine

Від досліджень геному до персоналізованої ДНК-діагностики захворювань в Україні

Зав. відділу геноміки людини

Д.б.н., проф. Лівшиць Л.А.

E-mail: livshits@imbg.org.ua

Форум «Наука. Інновації. Технології – 2012»

Київ, 25-26 вересня



Проект “Геном людини”- Human Genome



Розшифровка нуклеотидної послідовності геному людини
1990-2003 р.р. (Дж. Уотсон);
1998-2003 р.р. (К. Вентер)

Національні програми "Геном людини"
(Велика Британія , Франція , Німеччина , Італія , СРСР)

Проект “Різноманіття геному людини”(Human Genome Diversity Project - HGDP) – дослідження поліморфізму геному людини в різних етнічних групах



(L. Luca Cavalli-Sforza, 1994 – 2005 р.р.)



Проект “НарМар” (haplotype map of the human genome – гаплоїдний геном) – повногеномне дослідження асоціації частих генетичних варіантів в нормі та при мультифакторних патологіях (Genome-Wide Association Study - GWAS)

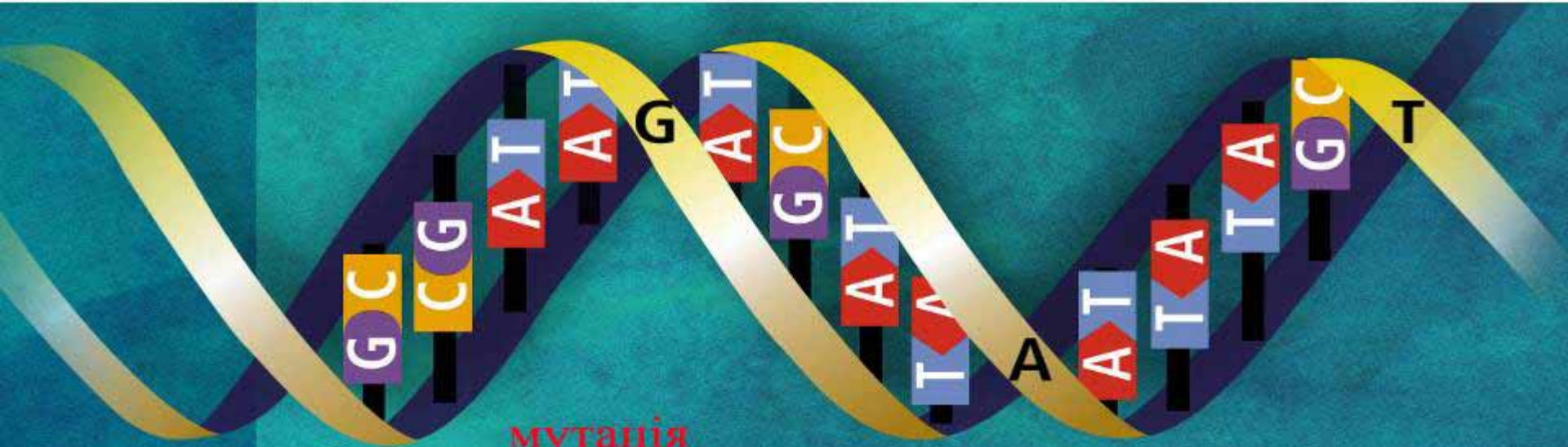
2002р.- теперішній час



Проект “1000 геномів” (1000 genomes) – дослідження генетичного різноманіття за допомогою повногеномного секвенування (Next Generation Sequencing - NGS) великої кількості індивідів із різних популяцій світу

2008р. – теперішній час





мутация

GCA	AGA	GAT	AAT	TGT	..
GCA	ACA	GAT	AAT	TGT	..

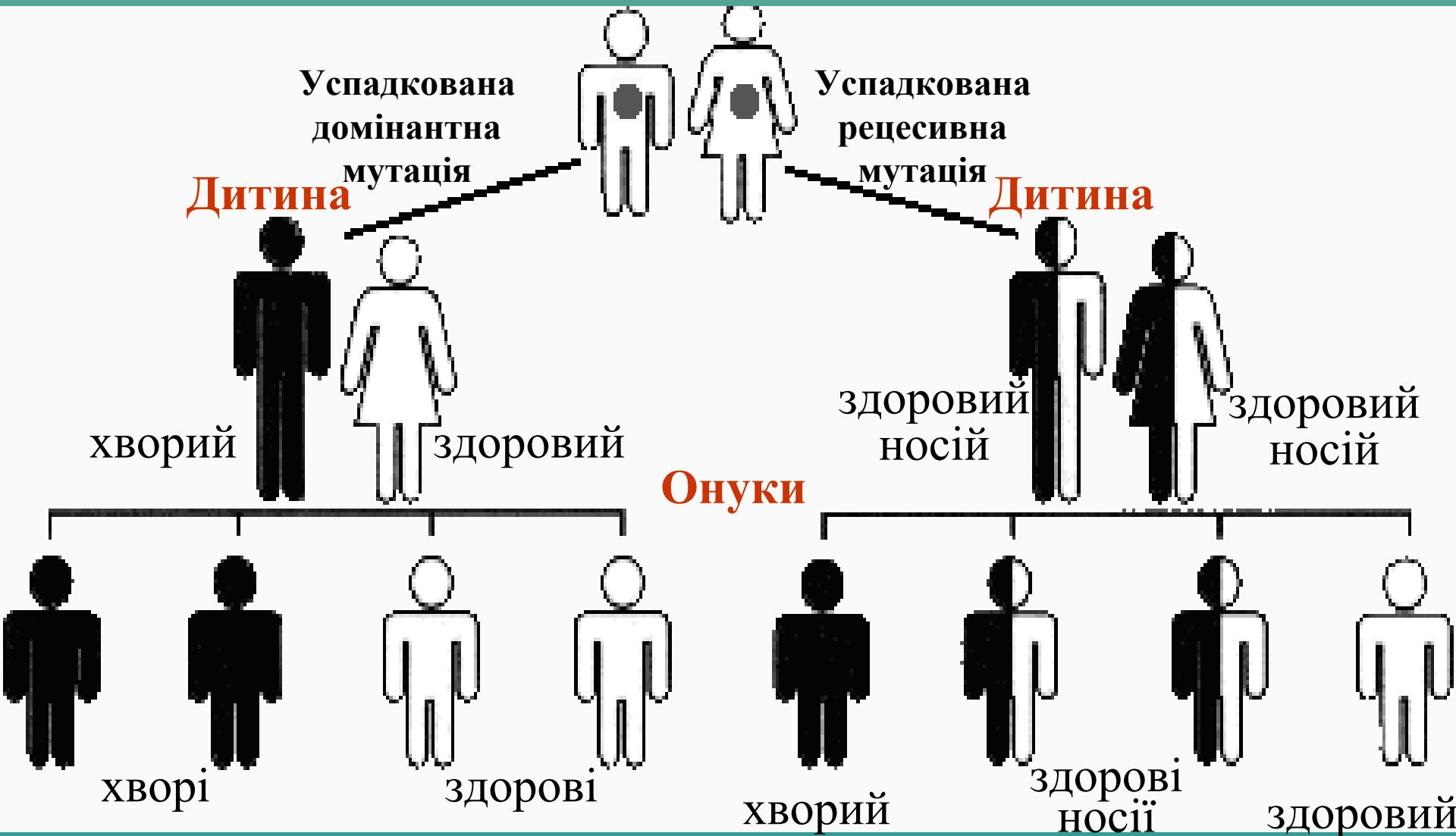
Ala	Arg	Asp	Asn	Cys	..
Ala	Thr	Asp	Asn	Cys	..

нормальний білок

мутантний білок

ПАТОЛОГІЯ

Здорові батьки, у яких виникла мутація у статевих клітинах (яйцеклітинах, сперматозоїдах)



Муковісцидоз



М'язова дистрофія Дюшена



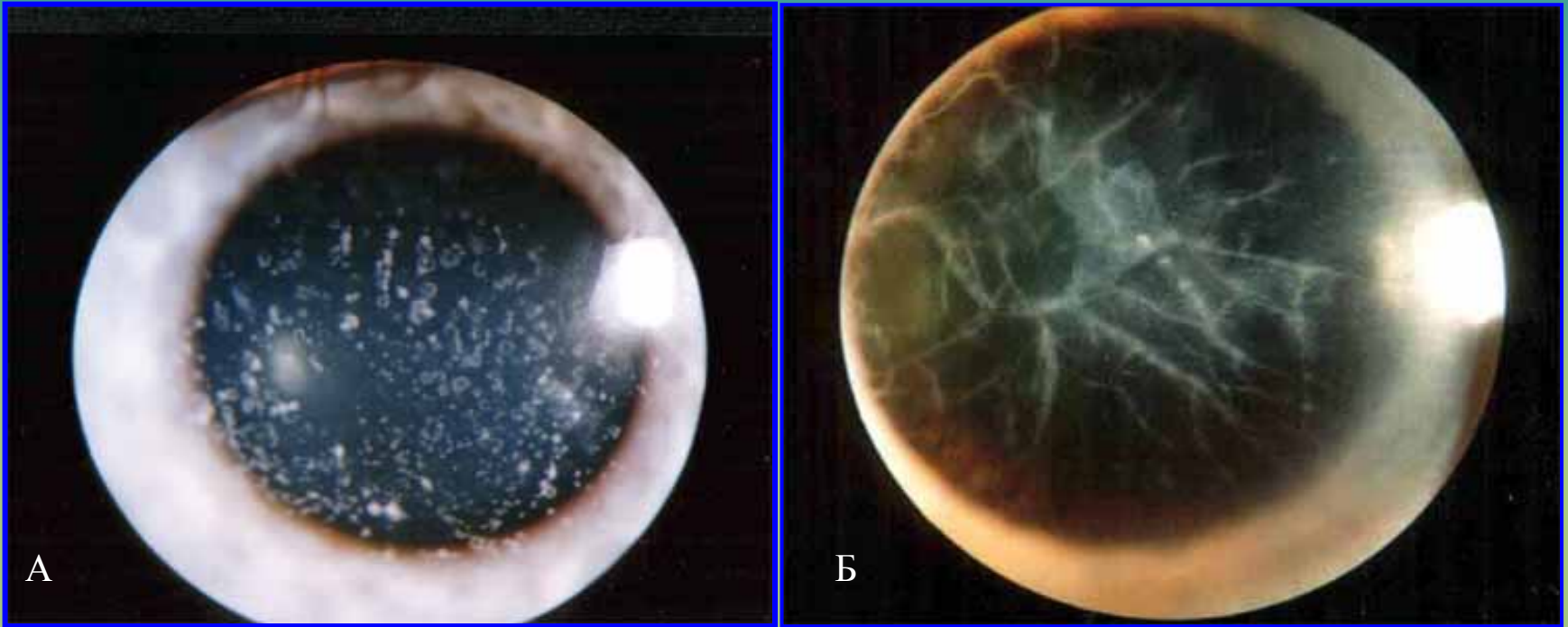
**Спінальна
м'язова атрофія**



синдром Мартіна-Белла



Спадкові дистрофії рогівки



Світлова біомікроскопія рогівки:

А – пацієнта з вузликовою дистрофією стромі рогівки (тип I);

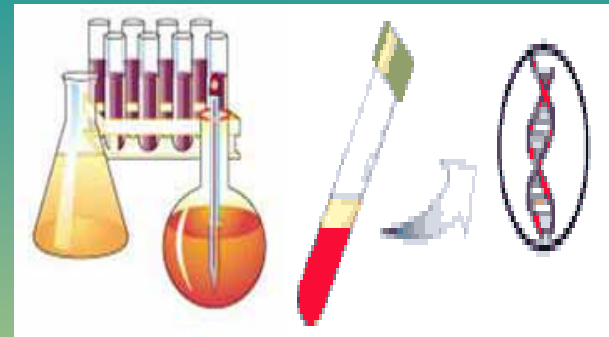
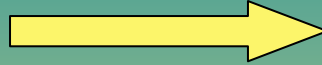
Б – пацієнта з гратчастою дистрофією рогівки (тип IIIA)

Захворювання та їх розповсюдженість	Ген	Основний тип мутацій
X-зчеплені		
Міодистрофія Дюшена (1:3500 хлопчиків)	<i>DMD</i>	Делеції
Синдром ламкої X-хромосоми (1:1500 хлопчиків, 1:2500 дівчат)	<i>FMR1, FMR2</i>	CGG-експансія та метилювання локусів FraXA, FraXE, FraXF
Гемофілія А (1:6500 хлопчиків)	<i>F8C</i>	Інверсія 22-го інтрону, точкові мутації
Хвороба Шарко-Марі-Тус тип X1 (1: 10000)	<i>Cx32</i>	Точкові мутації
Аутосомно-домінантні		
Дистрофії строми рогівки (немає даних)	<i>TGFBI</i>	Точкові мутації
Хвороба Шарко-Марі-Тус тип 1А (1: 6500)	<i>PMP22</i>	1.5-Мб дуплікація хромосомної ділянки 17p11.2
Хорея Гентінгтона (1: 25000)	<i>HD</i>	CAG-експансія
Аутосомно-рецесивні		
Муковісцидоз (1:2200)	<i>CFTR</i>	Точкові мутації, делеції
Фенілкетонурія (1:8300)	<i>PAH</i>	Точкові мутації
Спінальна м'язова атрофія (1:6000)	<i>SMN1, SMN2, NAIP</i>	Делеції, гібридний ген SMN1/SMN2
Адреногенетальний синдром (1:10000)	<i>CYP21A2</i>	Делеції, точкові мутації
Спадковий гемохроматоз (1:1000)	<i>HFE</i>	Точкові мутації

Схема ДНК-аналізу



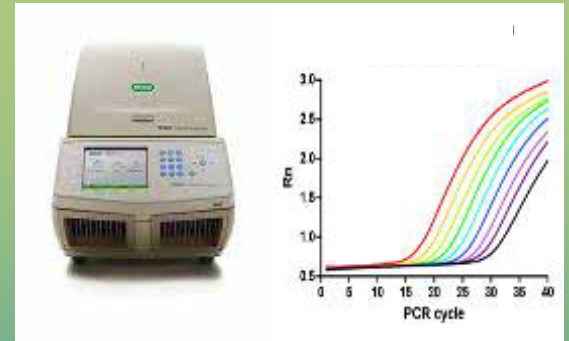
Отримання біологічного зразку



Виділення ДНК



Ампліфікація *in vitro* послідовності ДНК мішені:



за допомогою полімеразної ланцюгової реакції із детекцією у кінцевій точці

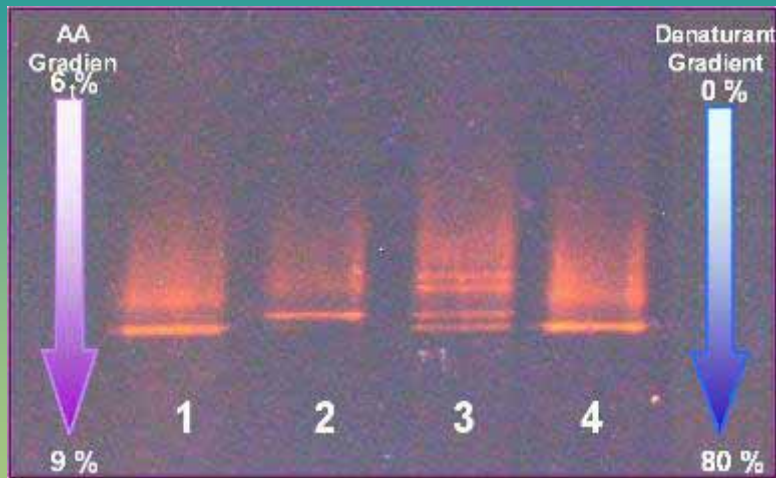
за допомогою полімеразної ланцюгової реакції із детекцією у реальному часі



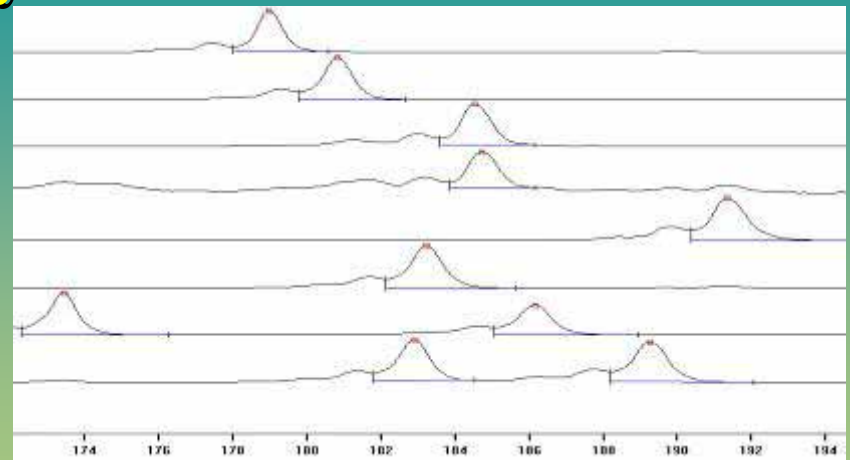
Аналіз ампліфікованої послідовності

Аналіз мутацій

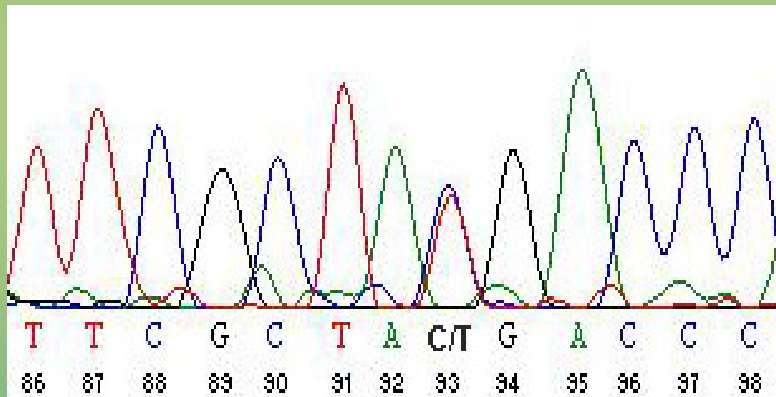
1



2



3



4



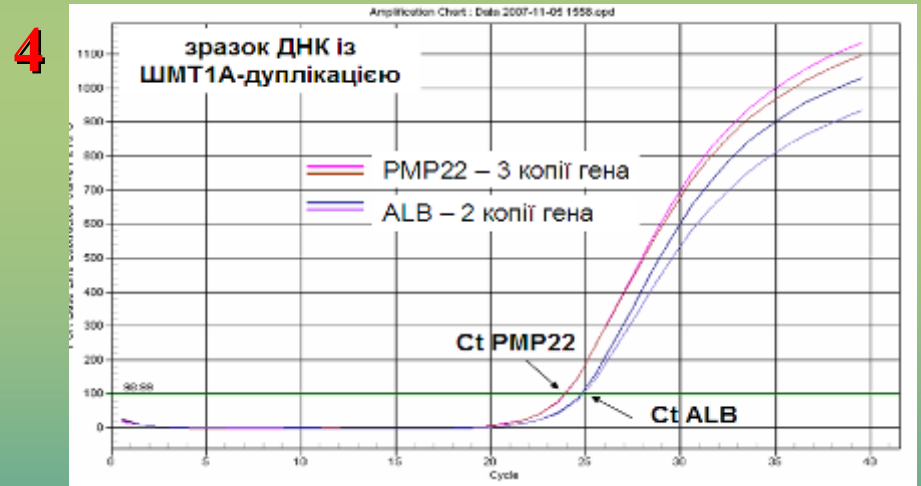
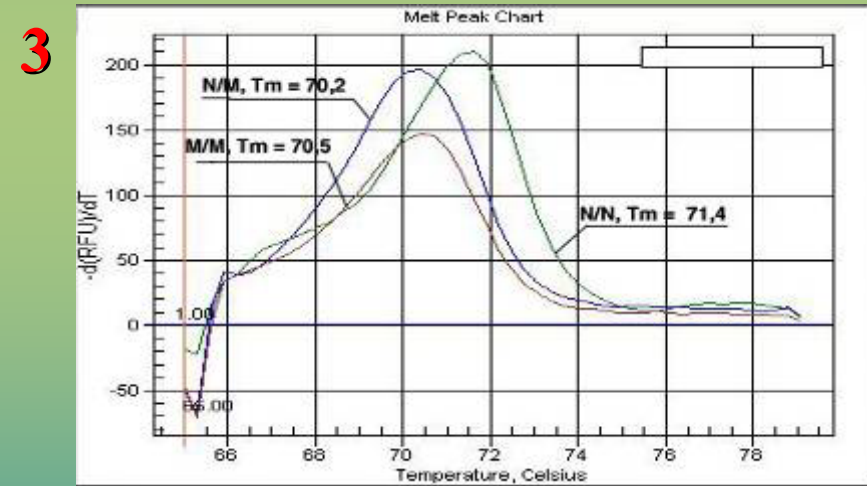
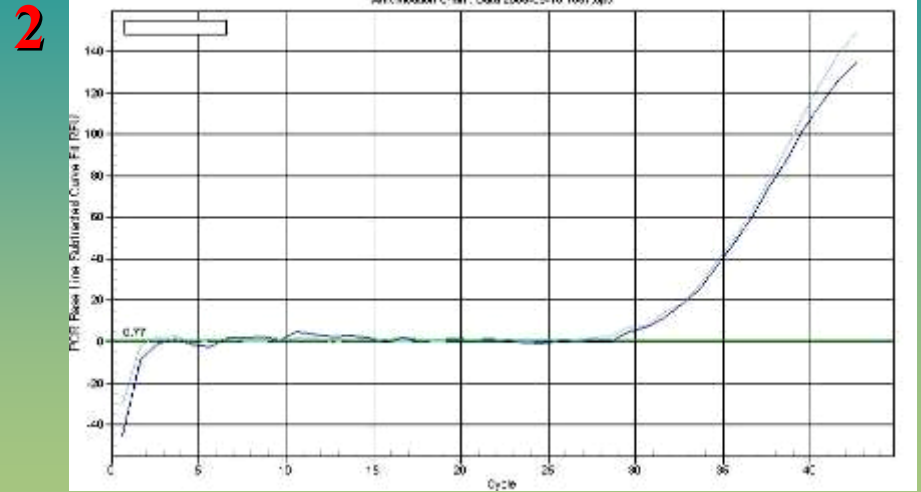
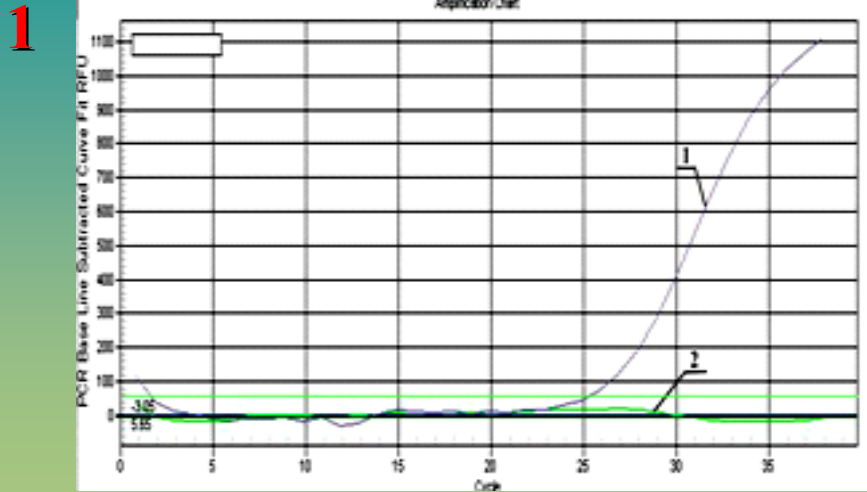
1 - метод DGGE;

2 – фрагментний аналіз;

3 - метод капілярного сиквенсу;

4 – метод рестрикційного аналізу.

Аналіз мутацій із використанням ПЛР в реальному часі

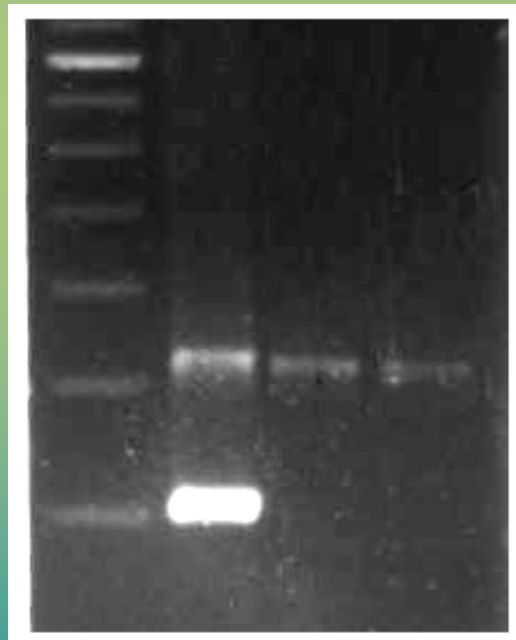


- 1) – аналіз мутацій із використанням алель-специфічних TaqMan-зондів,
- 2) – аналіз мутацій із використанням алель-специфічної ПЛР із SybrGreen-барвником;
- 3) – аналіз мутацій із використанням кривих плавлення продуктів ПЛР;
- 4) – аналіз кількості копій досліджуваного гена

**Створені прототипи
тест-систем для аналізу
62 мутацій у генах-
детермінаторах 12
найпоширеніших в Україні
моногенних патологій та
алельного поліморфізму 24
локусів, які зчеплені із
генами цих захворювань**

**У хворих на муковісцидоз ідентифіковано
нову мутацію в гені *CFTR*, яка є
розповсюджена лише в країнах із населенням
слов'янського походження**

Аналіз протяжної делеції
CFTRdel2,3 (2,1 kb).



М 1 2 3

309 п.н.

207 п.н.

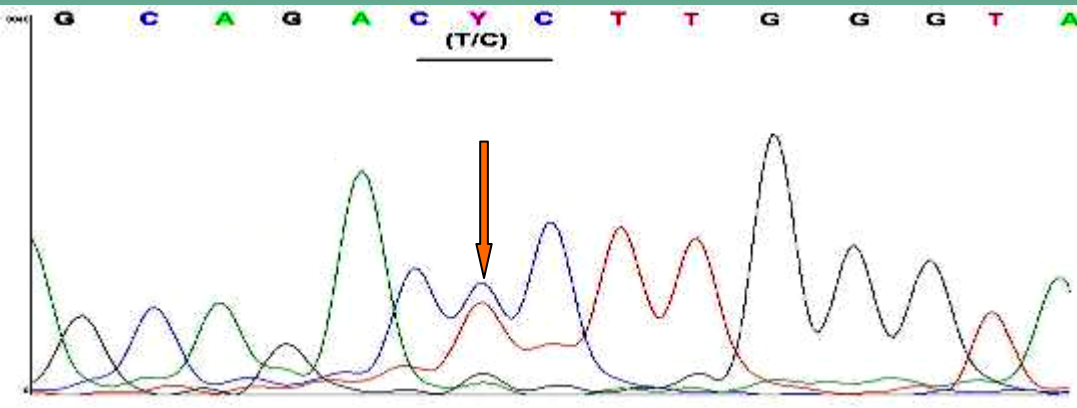
1,8%-ий агарозний гель:

М – маркер молекулярної маси

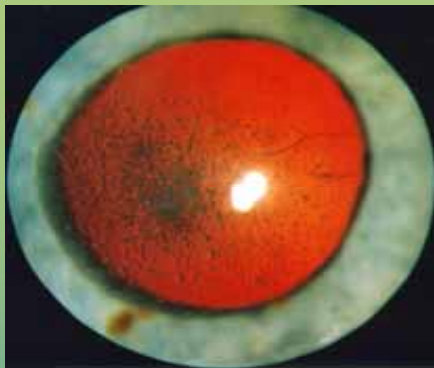
1 – носій мутації;

2, 3 – здорові індивіди.

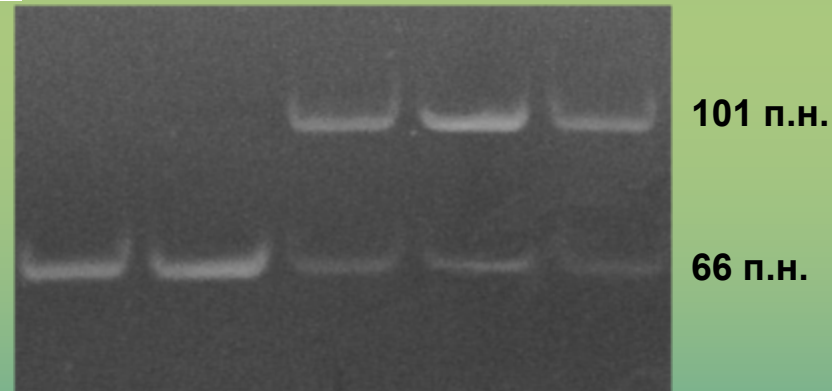
Ідентифіковано нову мутацію в гені *TGFBI* та описано нову атипову клінічну форму дистрофії стріми рогівки, яка зумовлена даною мутацією



Хроматограма секвенування екзона 12 гена *TGFBI*, що охоплює область навколо кодона 558, ілюструє гетерозиготну транзицію Т на С (мутація **Leu558Pro**).

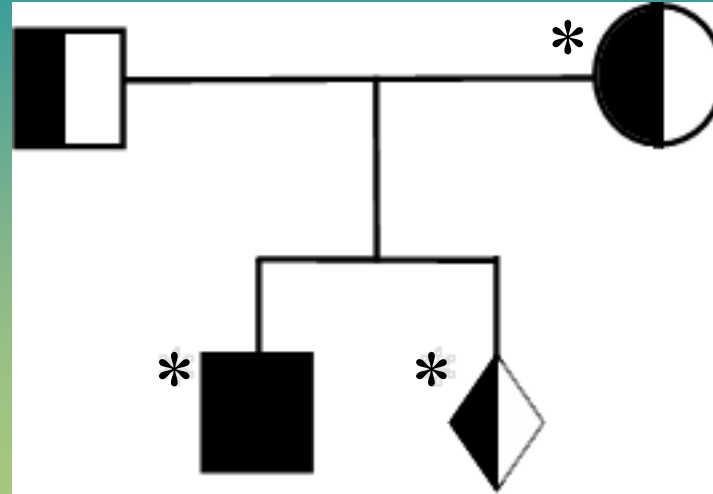
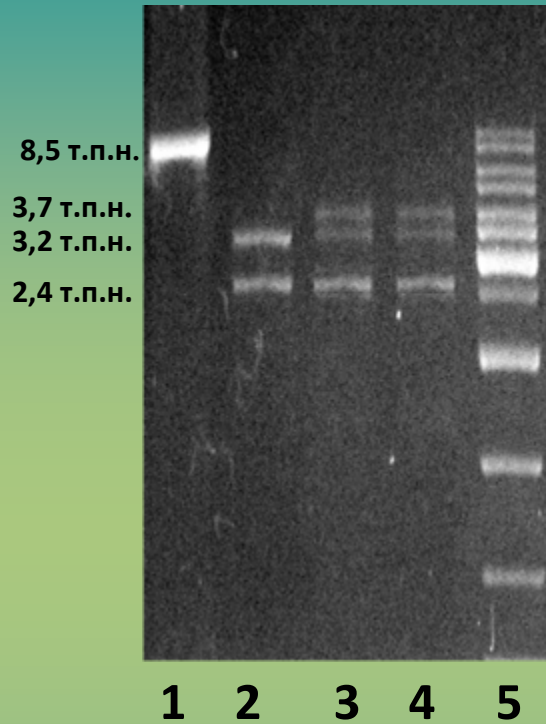


Біомікроскопія рогівки у хворого на атипову дистрофію рогівки із мутацією Leu558Pro (формування поліморфних патологічних депозитів у середніх та глибоких шарах рогівки).



Швидкий метод аналізу мутації Leu558Pro в екзоні 12 гена *TGFBI* у хворих з атиповою дистрофією рогівки (ПЛР + Hinf.I; 10% ПААГ):
1,2 – здорові особи;
3,4,5 – хворі особи

Пренатальна ДНК-діагностика в родині високого ризику адреногенітального синдрому



Родовід родини.

*- зразки індивідів, надані для обстеження

Електрофореграма гідролізованих продуктів ПЛР ділянки гена *CYP21A2*, що утворились після гідролізу специфічною ендонуклеазою рестрикції *TaqI* в 1,2% агарозному гелі.

1 – негідролізований фрагмент 8.5 т.п.н.;

2 – пробанд з делецією гена *CYP21A2* в гомозиготному стані;

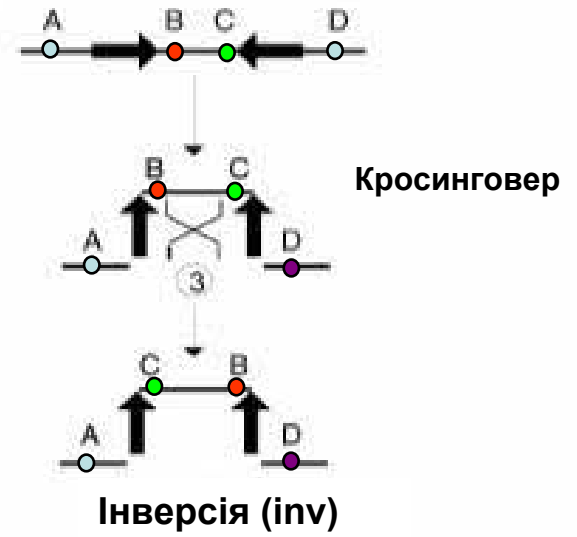
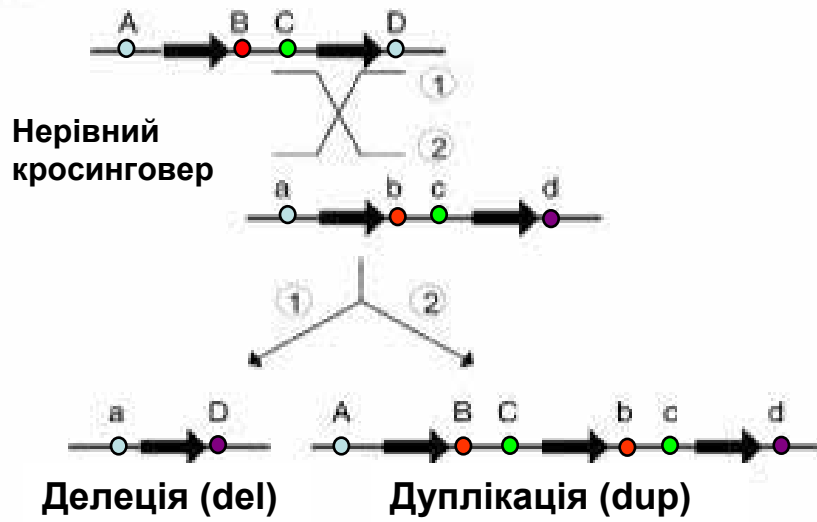
3 – плід - носій делеції гена *CYP21A2* в гетерозиготному стані;

4 – мати - носій делеції гена *CYP21A2* в гетерозиготному стані;

5 – маркер молекулярної маси (100-10000 п.н.)

Геномні реорганізації

Неалельна гомологічна рекомбінація

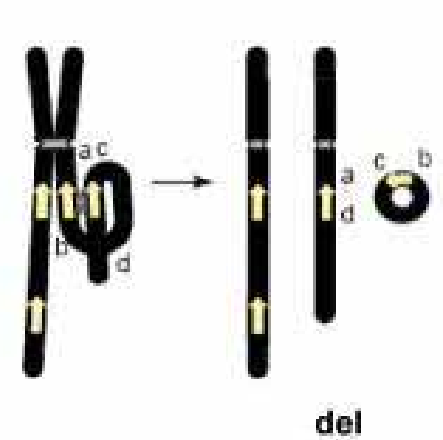
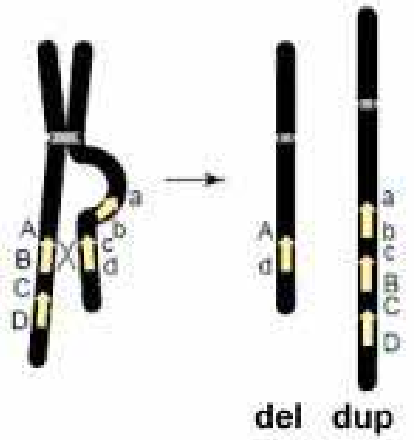
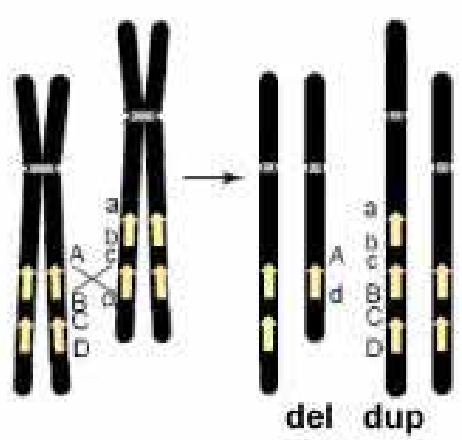


Типи реорганізацій

між гомологічними хромосомами

між хроматидами

всередині хроматида





Поліпшення діагностики розумової відсталості у дітей Центральної та Східної Європи і Центральної Азії шляхом генетичної характеристики та біоінформатики/статистики



Improving Diagnoses of Mental Retardation in Children in Central Eastern Europe and Central Asia through Genetic Characterisation and Bioinformatics/Statistics

Проект сьомої рамкової програми

Галузь дослідження: HEALTH-2007-2.2.1-10

Акронім проекту: CHERISH

Дата початку проекту: 2009-02-01

Тривалість проекту: 36 місяців

Мета проекту:

визначення розповсюдженості та клінічної значимості генетичних порушень в етіології розумової відсталості в країнах Центральної і Східної Європи та Центральної Азії.



№ учасника	Назва організації-учасника	Скорчена назва учасника	Країна
1 (координатор)	Alma Mater Studiorum - Università di Bologna	UNIBO	Італія
2	Tartu Ülikool	UTARTU	Естонія
3	Vilniaus Universitetas	DHMG-VU	Литва
4	Univerzita Karlova V Praze	CUNI	Чеська Республіка
5	Akademia Medyczna Im Karola Marcinkowskiego*Uniwersytet Medyczny Im Karola Marcinkowskiego W Poznaniu	PUMS	Польща
6	Інститут молекулярної біології і генетики НАН України	IMBG	Україна
7	The Cyprus Foundation for Muscular Dystrophy Research	CING	Кипр
8	НИИ медицинской генетикиТомского научного центра Сибирского отделения Российской АМН	IMG	Російська Федерація
9	Center of Medical Genetics and Primary Health Care	CMG	Арменія
10	Molecular Stamping s.r.l	MS	Італія
11	European Genetics Foundation	EGF	Італія

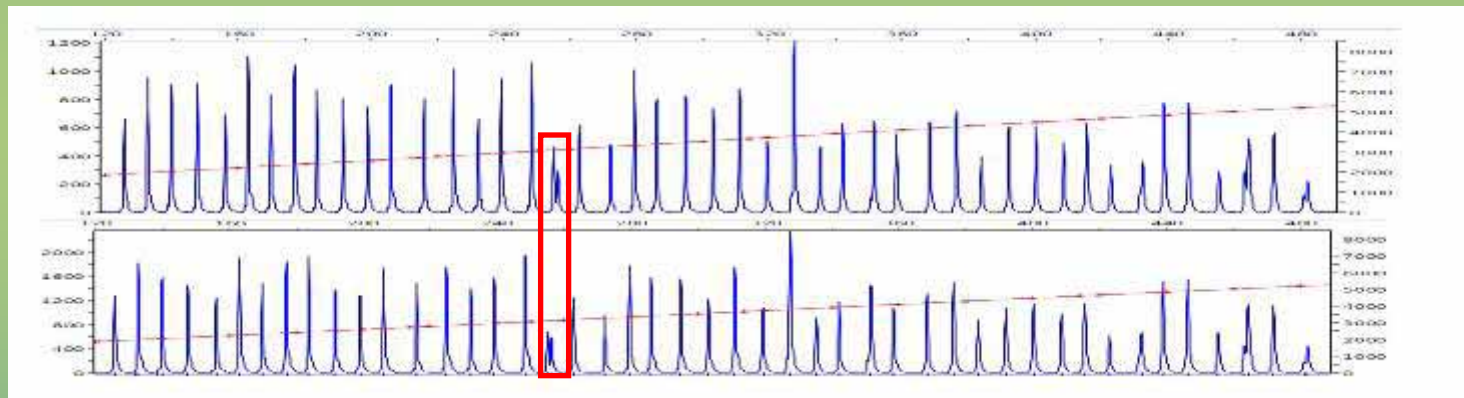
Дослідження геномних перебудов, асоційованих із розумовою відсталістю (РВ) методом мультиплексної лігазної пробозалежної ампліфікації (MLPA)

SALSA MLPA kit P070 telomere-5 та **SALSA MLPA kit P245 A-2 microdeletion syndromes-1** містять зонди для виявлення мікрохромосомних делецій/дуплікацій субтеломерних регіонів, а також відомих мікрodelеційних синдромів, які асоційовані з розумовою відсталістю.

Виявлення дуплікації області 18p методом MLPA

Зразок з 18p-
дуплікацією

Нормальний
зразок



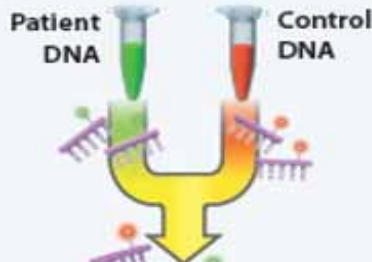
31 пацієнту з РВ було проведено аналіз субтеломерних перебудов типу делеції/дуплікації за допомогою MLPA. У **6** пацієнтів виявлено різні хромосомні перебудови.

30 пацієнтам з РВ було проведено аналіз мікрodelеційних синдромів за допомогою MLPA. У **12** пацієнтів виявлено різні хромосомні реорганізації. У **3** пацієнтів було виявлено дуплікацію в гені **MECP2**, що було підтверджено¹⁷ незалежними методами (qPCR).

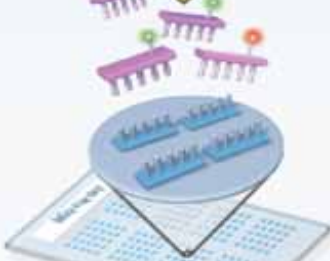
Дослідження мікрохромосомних перебудов за допомогою CGH-аналізу високої роздільної здатності

Microarray Comparative Genomic Hybridization (Array-CGH)

Step 1 Patient DNA **Step 2** Control DNA

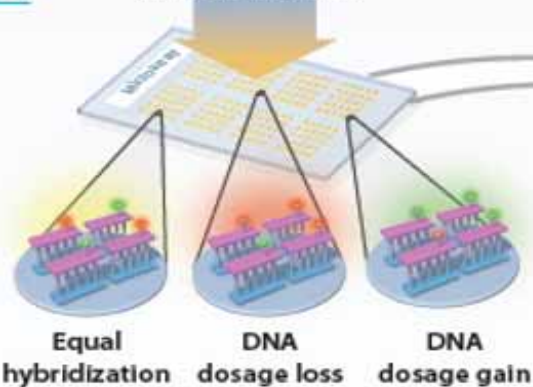


Step 3



Step 4

HYBRIDIZATION



Array CGH: The Complete Process

Steps 1-3 Patient and control DNA are labeled with fluorescent dyes and applied to the microarray.

Step 4 Patient and control DNA compete to attach, or hybridize, to the microarray.

Step 5 The microarray scanner measures the fluorescent signals.

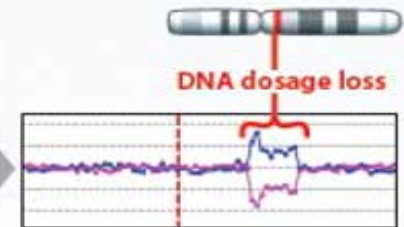
Step 6 Computer software analyzes the data and generates a plot.

Step 5



COMPUTER SOFTWARE

Step 6

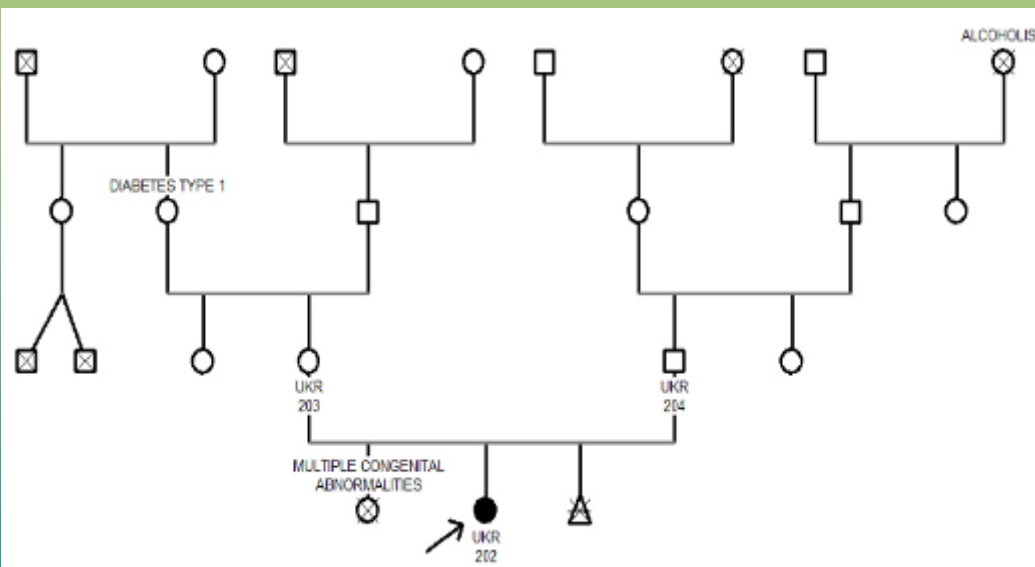


Фенотип пацієнтки UKR202 із розумовою відсталістю



Батьки здорові. У сестри пацієнтки виражені множинні вроджені дефекти (померла), третя вагітність перервана через множинні вади розвитку.

Родовід пацієнтки UKR202

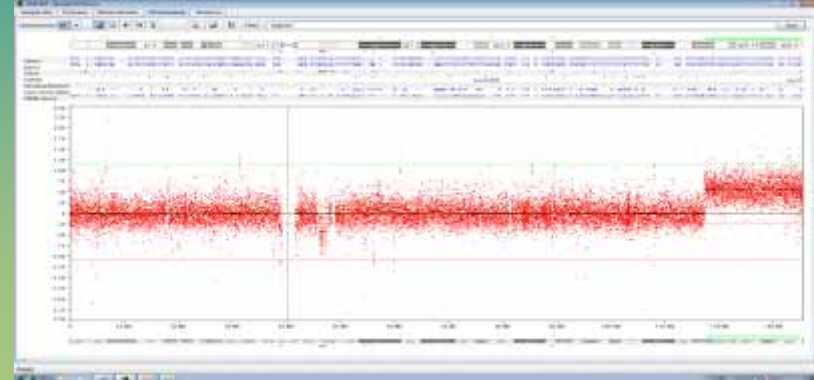
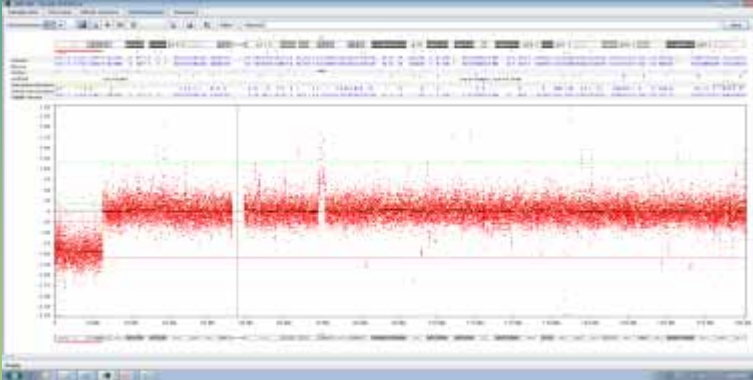


На момент обстеження пацієнтці 19 р., важка розумова відсталість (**IQ – 18**, ступень імбецильності). Виражені рухові стереотипії та фенотипові аномалії.

Результати аналізу зразку пацієнтки UKR202 за допомогою 400K array-CGH мікрочипа:

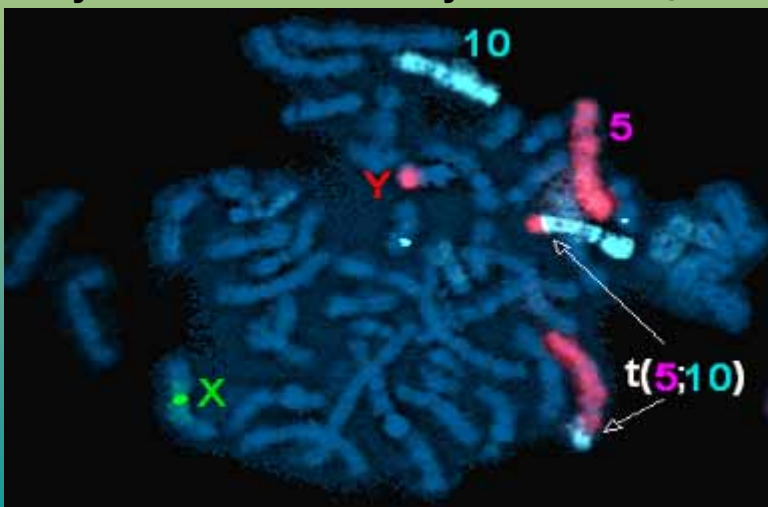
del 5p15.2 (делеція)

dup 10q25.3-26.3 (дуплікація)

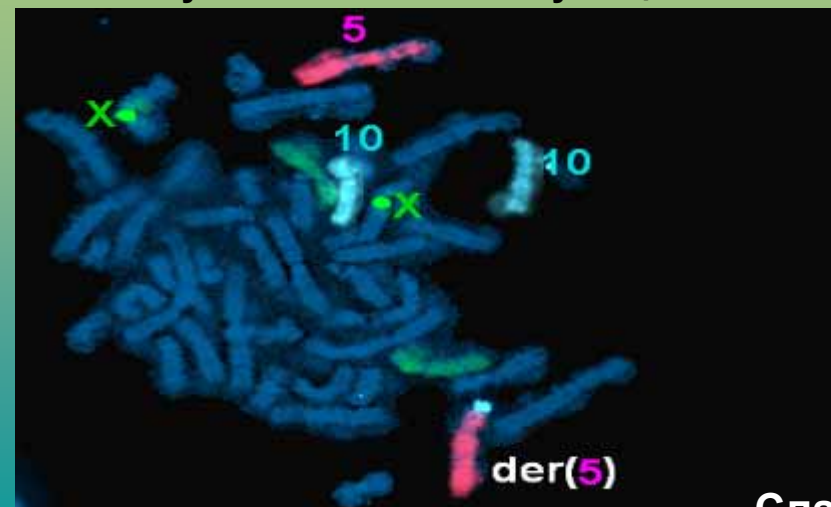


Результати 400K CGH пробанда співпали з результатами пробанда, отриманими на 44K CGH можуть бути пояснені наявністю у пробанда незбалансованих хромосомних перебудов. Дана гіпотеза перевірена за допомогою регіон-специфічного FISH-аналізу.

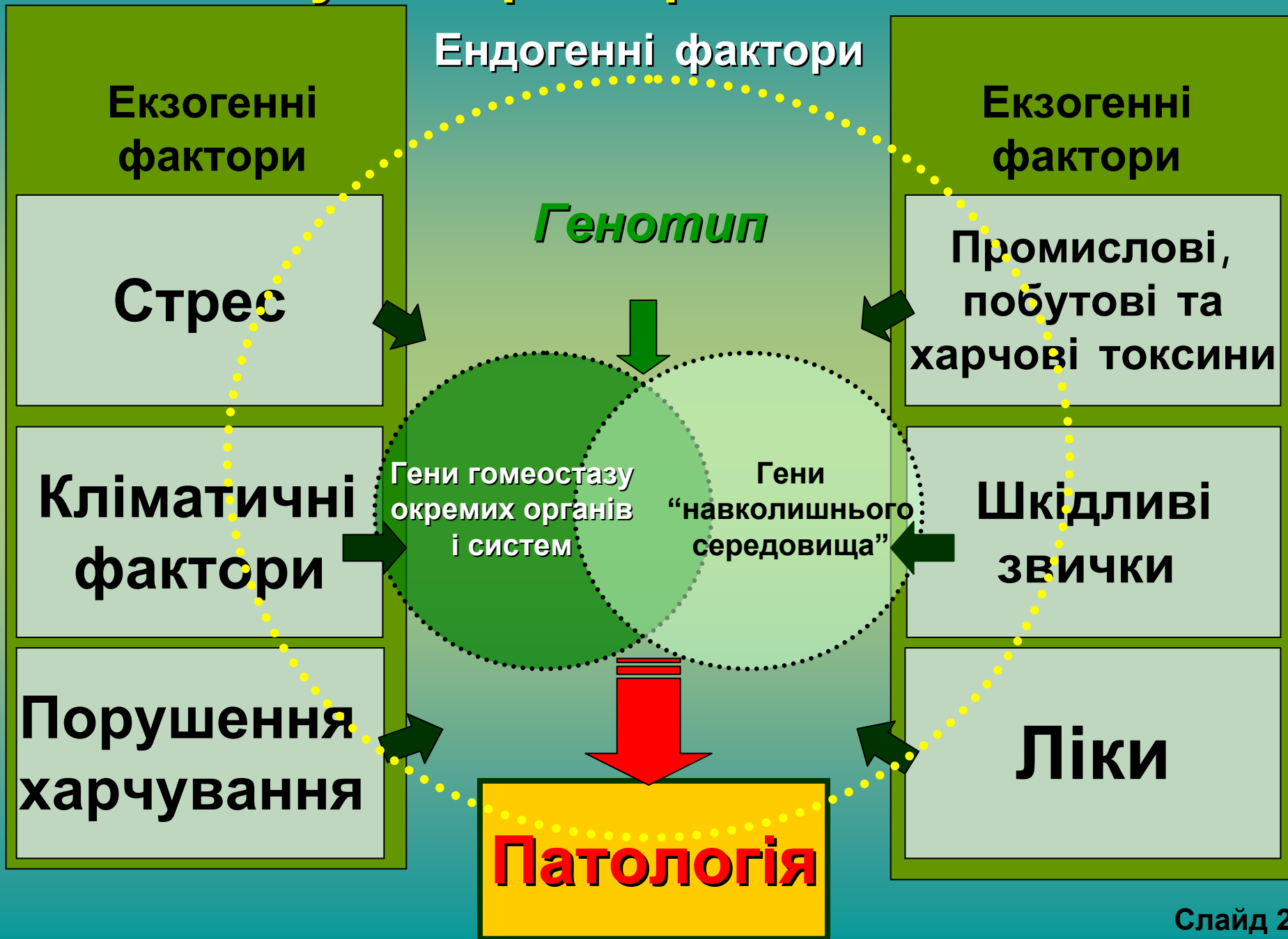
Результати FISH аналізу батька пацієнтки



Результати FISH аналізу пацієнтки



Мультифакторні патології



За результатами аналізу асоціації окремих поліморфних варіантів досліджуваних генів із мультифакторними патологічними станами розроблені панелі діагностичних маркерів для генетичного тестування спадкової схильності до розвитку наспупних патологій

Генетично обумовлені репродуктивні втрати:

- **Порушення сперматогенеза** (*Y-del, CFTR*(специф.), *FSHR, AR*)
- **Порушення оогенеза** (*ING α , FSHR, ESR1, FMR1, GSTP1,*)
- **Невиношування вагітності** (*GSTP1, CYP1A1, F2, F5, F7, MTHFR, GP1A, ACE, eNOS, ESR1, ADRB2, IL6, IL8, IL10*)

Соціально значущі патології:

- **Бронхіальна астма у дітей** (*GSTP1, ADRB2*)
- **Ішемічний інсульт** (*F2, F5, F7, MTHFR, GP1A, ESR1, ACE, eNOS*)

Фармакогенетичні підходи до лікування

Вірусом гепатиту С вражені близько **3%** населення планети, в тому числі і жителів України. Стандартним методом лікування даної вірусної інфекції є терапія за допомогою інтерферону альфа та рибавірину.

Встановлено, що пацієнти із мутацією в гені ***IFN-λ-3 (IL28B)*** мають стійку вірусологічну відповідь на стандартне лікування.

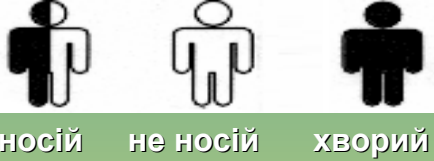
Розроблено **простий метод** для генотипування за геном ***IFN-λ-3 (IL28B)*** хворих на гепатит С, яке може бути застосоване **для прогнозу відповіді пацієнта на лікування** з урахуванням генотипу вірусу С та вірусного навантаження.

При стандартному методі лікування у багатьох пацієнтів спостерігається рибавірин-індукована гемолітична анемія. Результати досліджень свідчать, що носії мутацій в гені ***ITPA*** більш захищені від гемолізу.

Розроблено **метод детекції** мажорних мутацій 94C>A та IVS2 _ 21A>C гену ***ITPA*** для скринінгу хворих на гепатит С **з метою підбору оптимальної тактики лікування гепатиту С.**

На основі сучасних біотехнологій аналізу мутацій розробляються прототипи тест-систем для ДНК-діагностики

Скринінг новонароджених



Підтвердження діагнозу



Скринінг носіїв



Досимптоматичний скринінг

Розвиток захворювання у дорослому віці



Скринінг груп ризику

Гени спадкової схильності



Медико-генетична консультація

Пренатальна ДНК-діагностика



Фармакогеноміка

Індивідуальна відповідь на лікування



Вибір стратегії лікування



Дякую
за
увагу!

