Казанский (Приволжский) федеральный университет
Кафедра морфологии и общей патологии

2019-2020 уч.г.
ЛЕКЦИЯ №2

Тема: Молекулярно-генетические методы в клинической практике

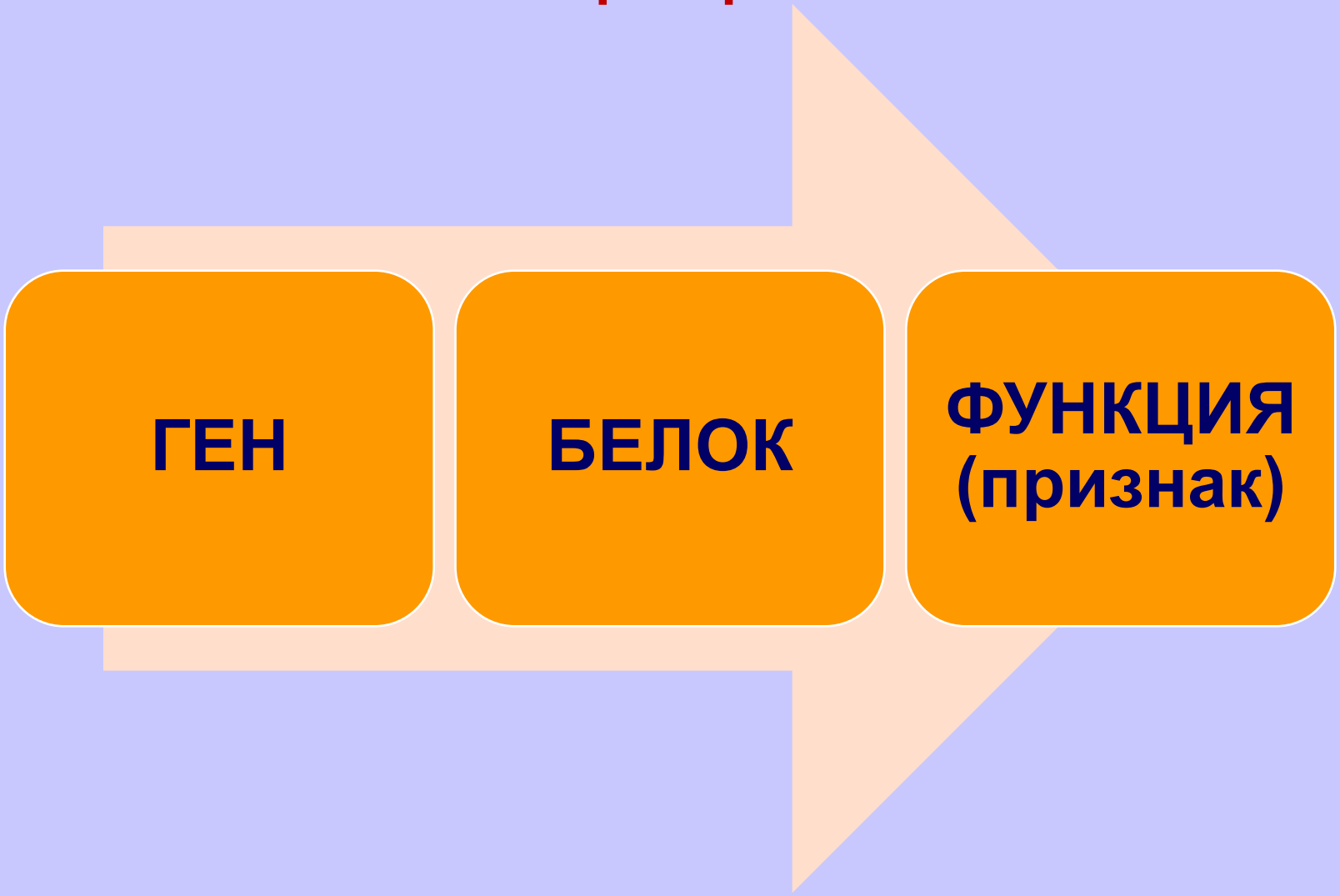
Подготовили: препод. Мавликеев М.О.
к.м.н. Р. Деев

План лекции:

- 1. Место молекулярно-генетической диагностики в современной клинической практике.
- 2. Кариотипирование.
- 3. FISH-диагностика
- 4. ПЦР-диагностика
- 5. Секвенирование

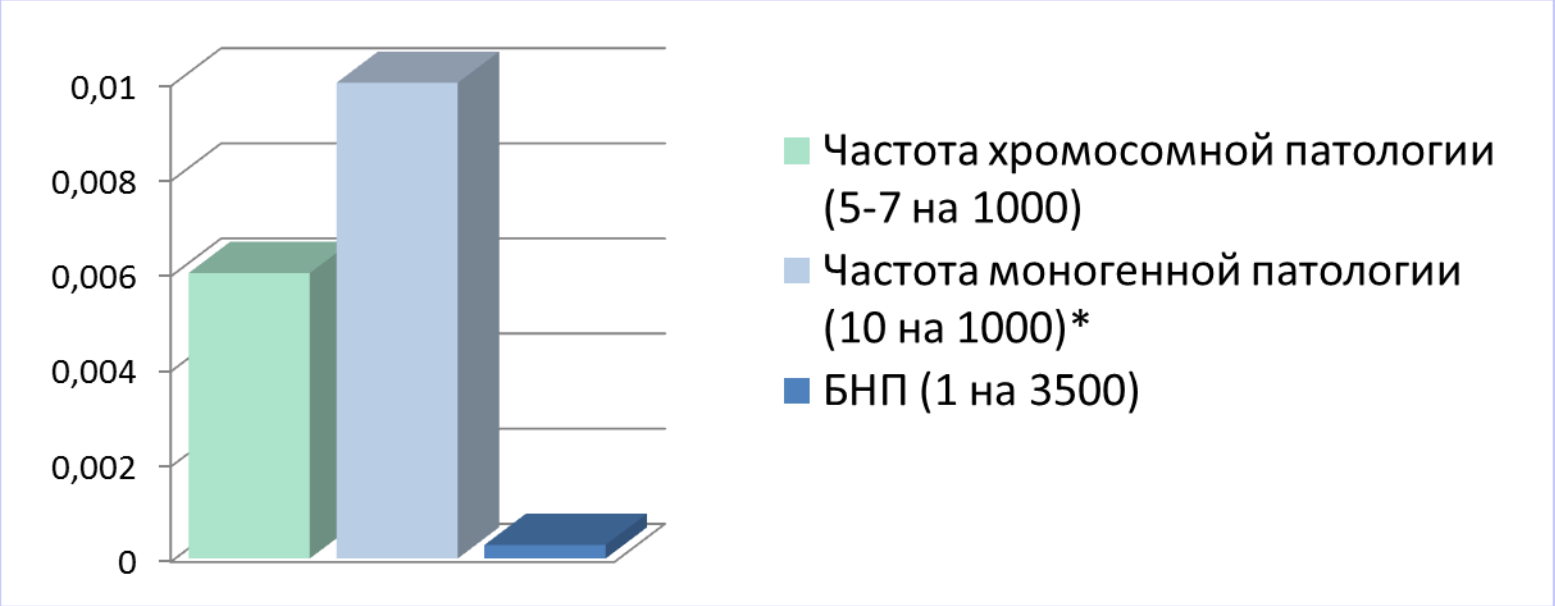
В лекции использованы слайды:
- А.С. Пушкина,
- С.Н. Бардакова,
- Е.А. Померанцевой,
- К.Г. Шевченко

Основная концепция м. биологии



Место наследственной и врождённой патологии в структуре заболеваемости населения

→ Частота врождённых аномалий - 3-4 на 100 новорождённых.



Каждый ЗДОРОВЫЙ человек является НОСИТЕЛЕМ 5-7 патологических мутаций

Частота моногенных заболеваний – 1/100

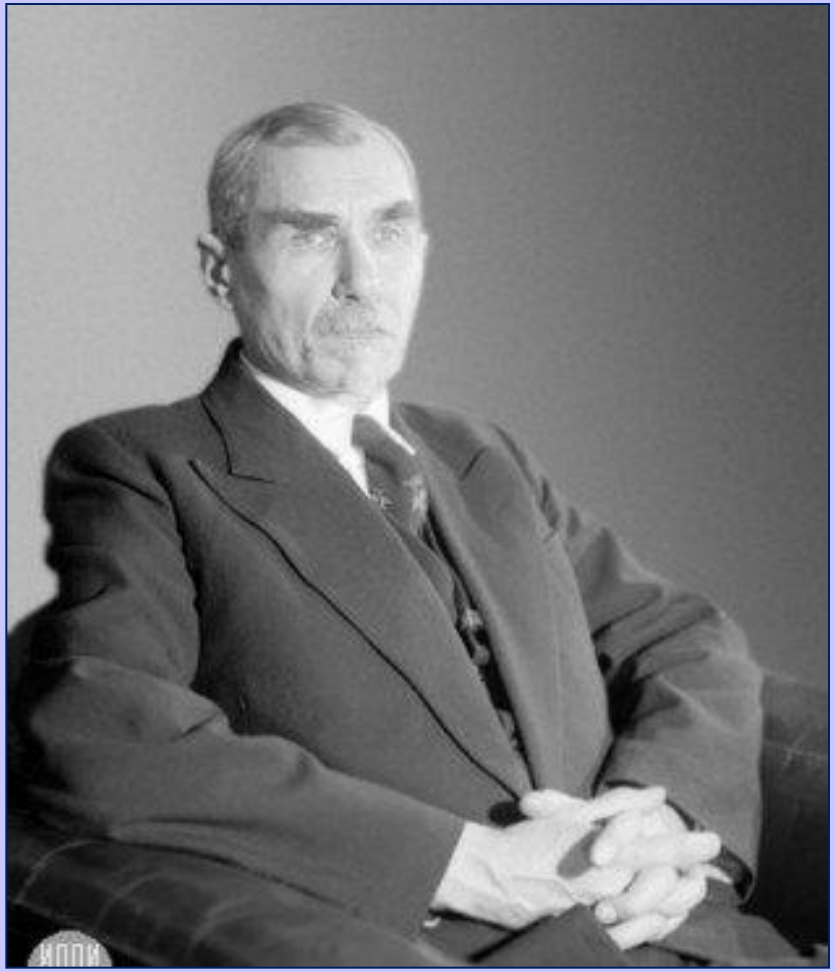
Частота синдрома Дауна – 1/700

*Community genetics services: report of a WHO consultation on community genetics in low- and middle-income countries. World Health Organization. 2011. ISBN 978 92 4 150114 9

Кариотип

- **Кариоти́п** — совокупность признаков (число, размеры, форма и т. д.) **полного набора хромосом,** присущая клеткам данного биологического вида (видовой кариотип), данного организма (индивидуальный кариотип) или линии (клона) клеток.
- Кариотипом иногда называют и визуальное представление полного хромосомного набора (*кариограммы*).

Кариотип



1878 - 1942

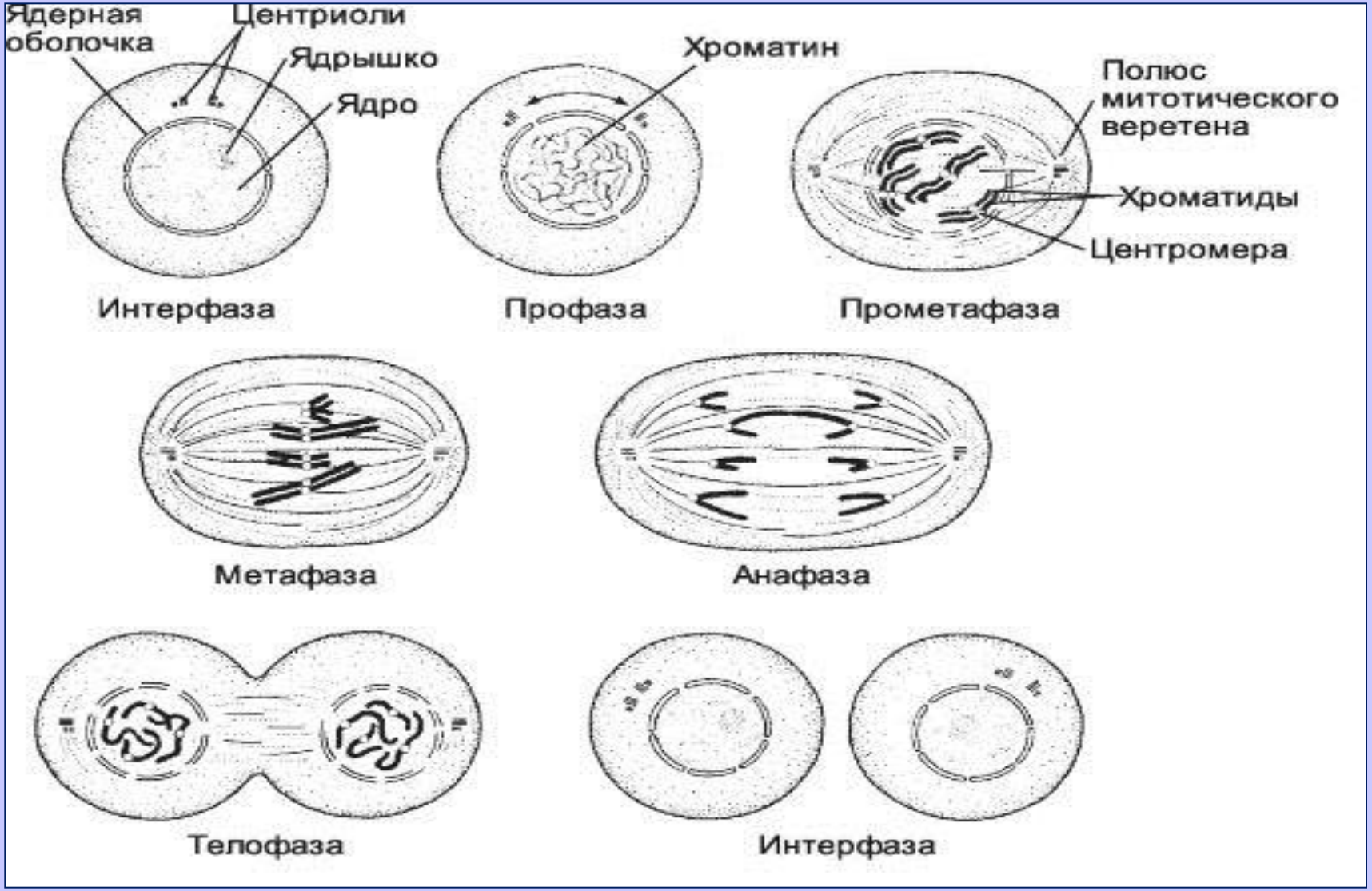
Термин «кариотип» был введён в 1924 году советским цитологом Григорием Андреевичем Левитским

Кариотип — статья из Большой советской энциклопедии (3-е издание)

Основные методы

- классический цитогенетический анализ (кариотипирование);
- флуоресцентная in situ гибридизация (FISH);
- хромогенная in situ гибридизация (CISH);
- метод полимеразной цепной реакции (ПЦР);
- Саузерн-блоттинг;
- анализ первичной последовательности ДНК (секвенирование);
- микрочипирование.

Кариотипирование

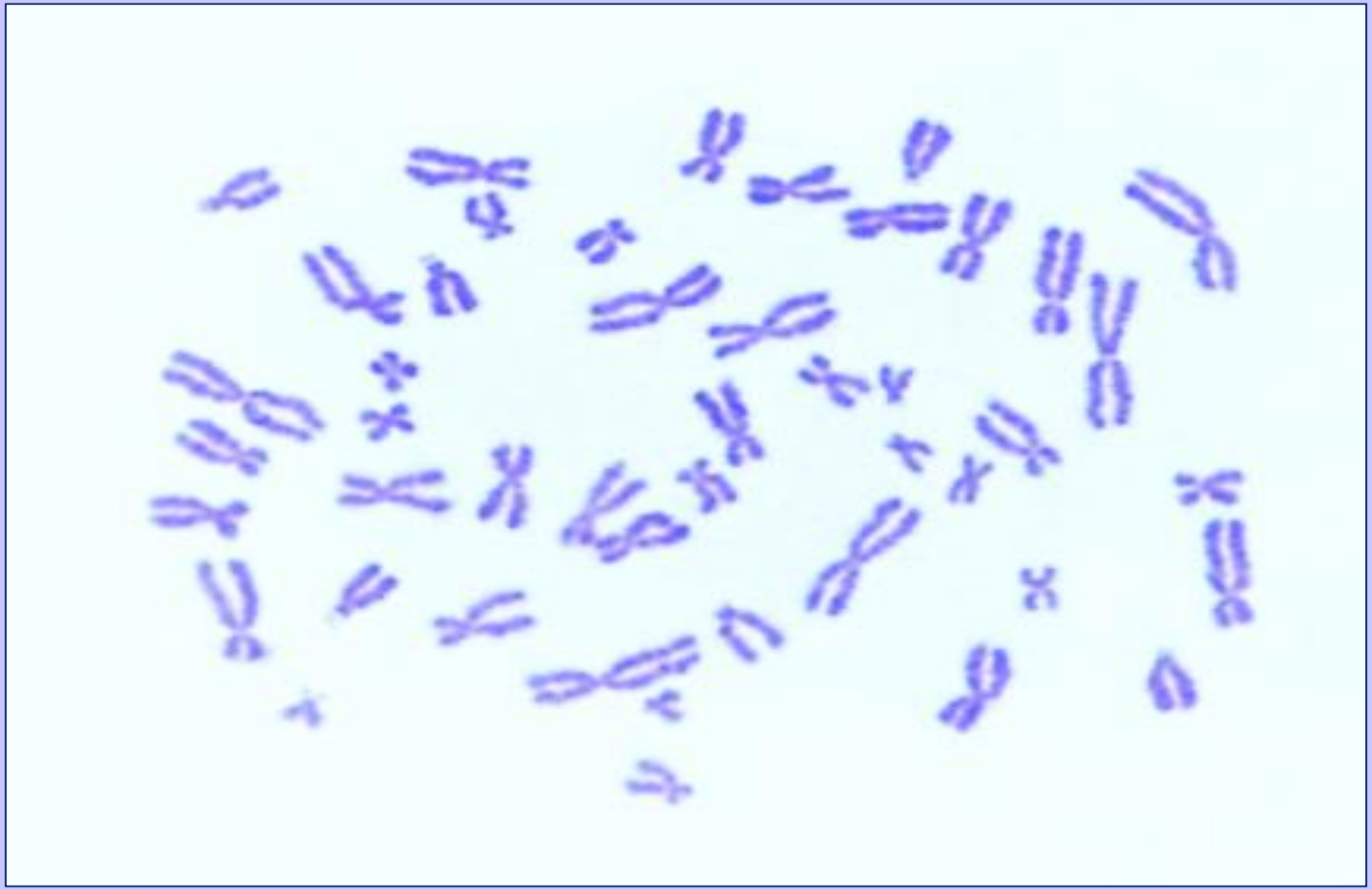


Улумбеков Г.Э. Гистология, эмбриология, цитология, 2007

Процедура определения кариотипа

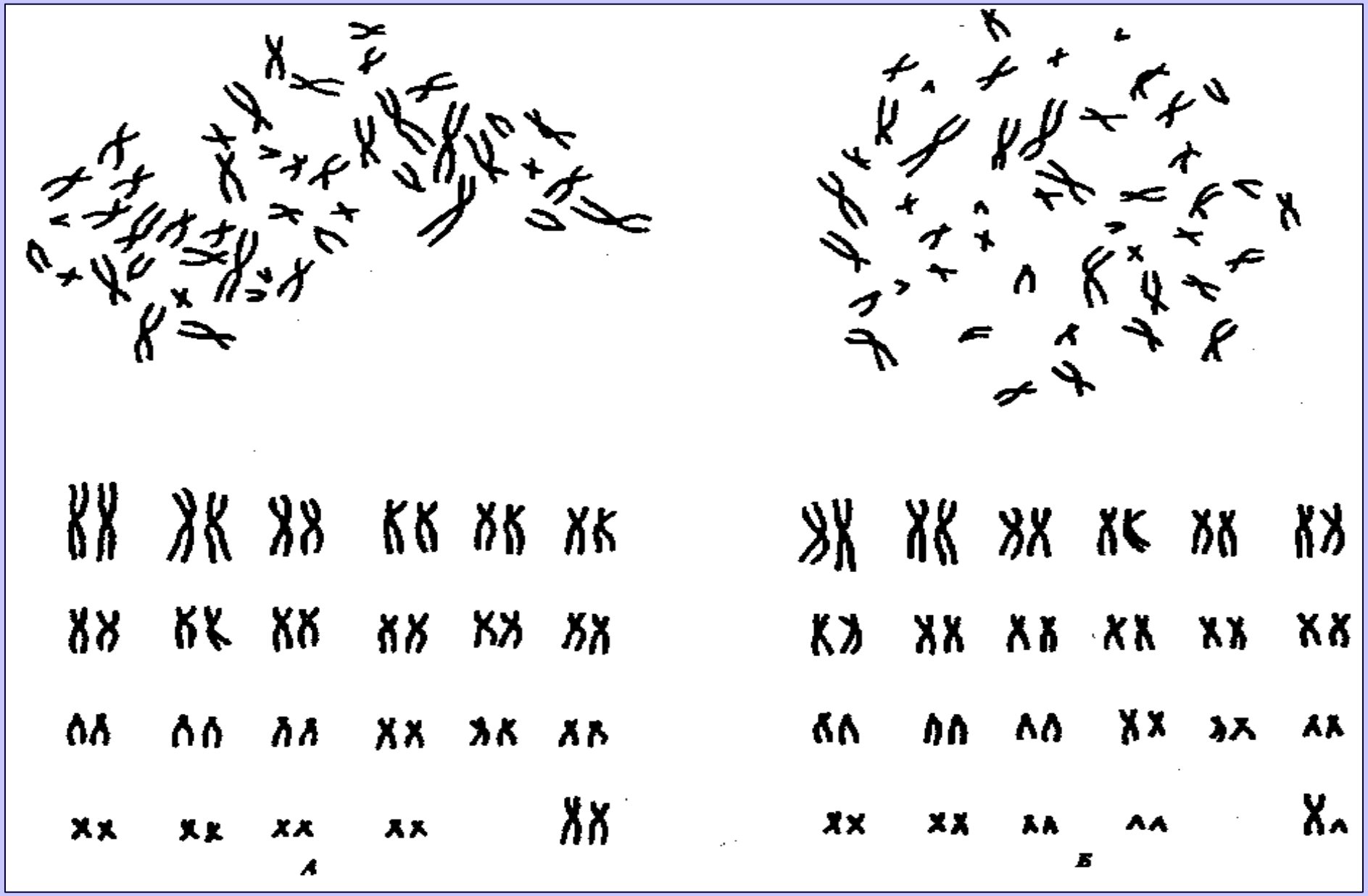
Бочков Н. П. Клиническая генетика, 2011

Недетализованный кариотип (окраска по Романовскому-Гимзе)

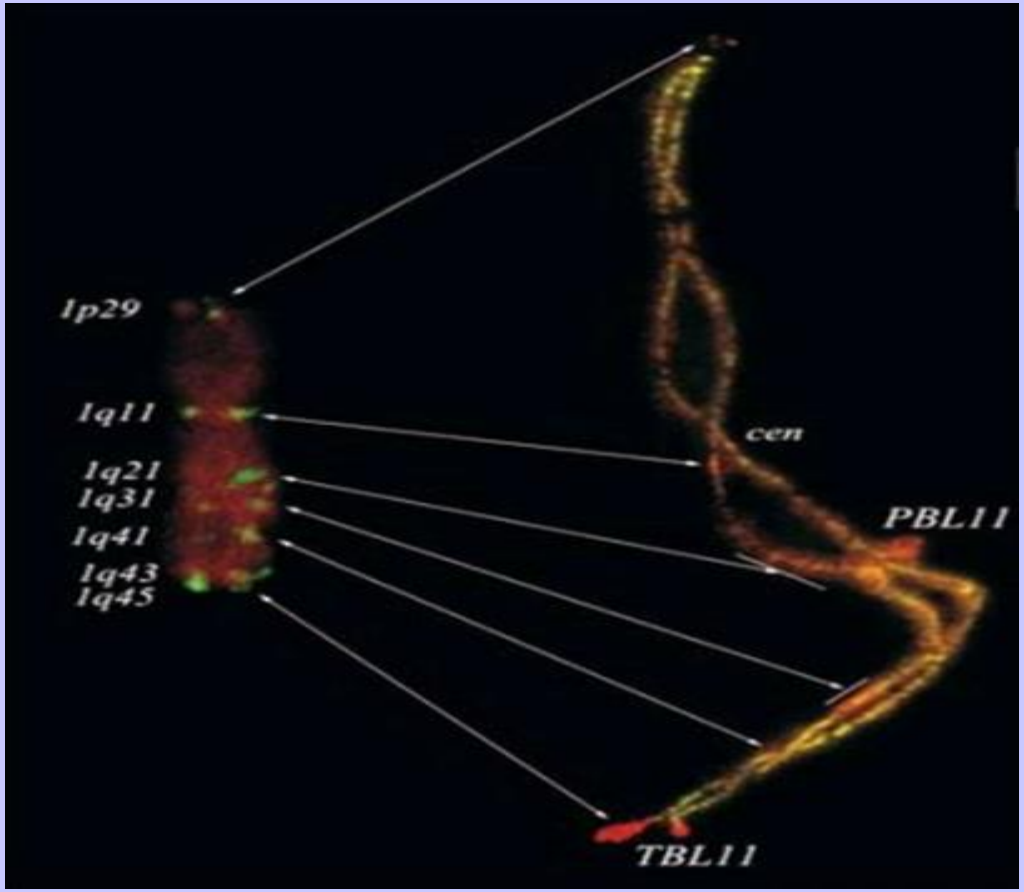


http://131.229.88.77/microscopy/home.html

Нормальный кариотип



Виды окрашивания

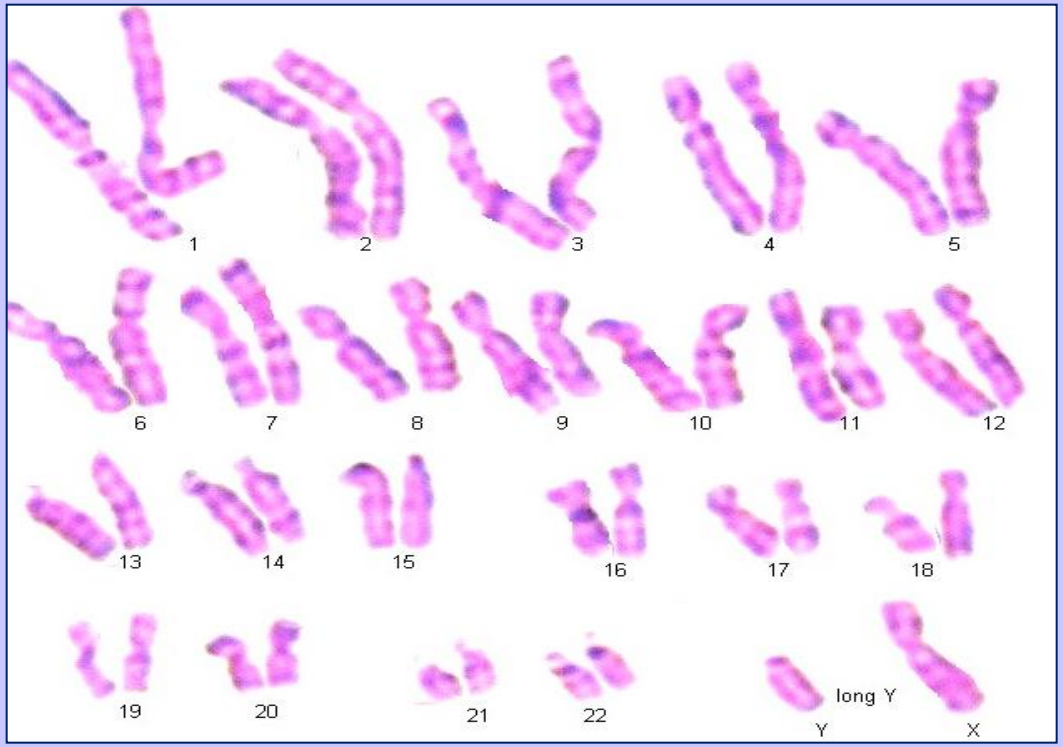


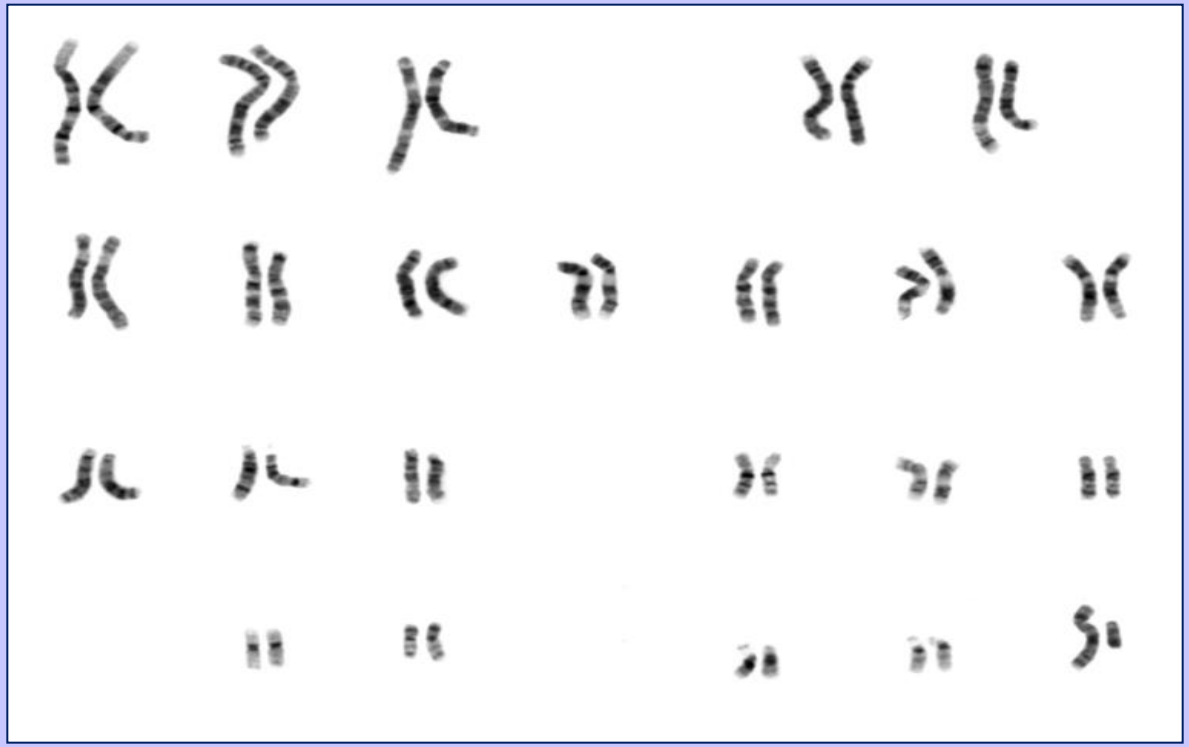
Q-banding

http://www.authorstream.com/Presentation/chhabra61-439811-chromosome-banding-techniques/

- **Q-окрашивание** — окрашивание по Касперссону **акрихин-ипритом** с исследованием под флуоресцентным микроскопом. Чаще всего применяется для исследования Y-хромосом (быстрое определения генетического пола, выявление транслокаций между X- и Y-хромосомами или между Y-хромосомой и аутосомами, скрининг мозаицизма с участием Y-хромосом)

Виды окрашивания





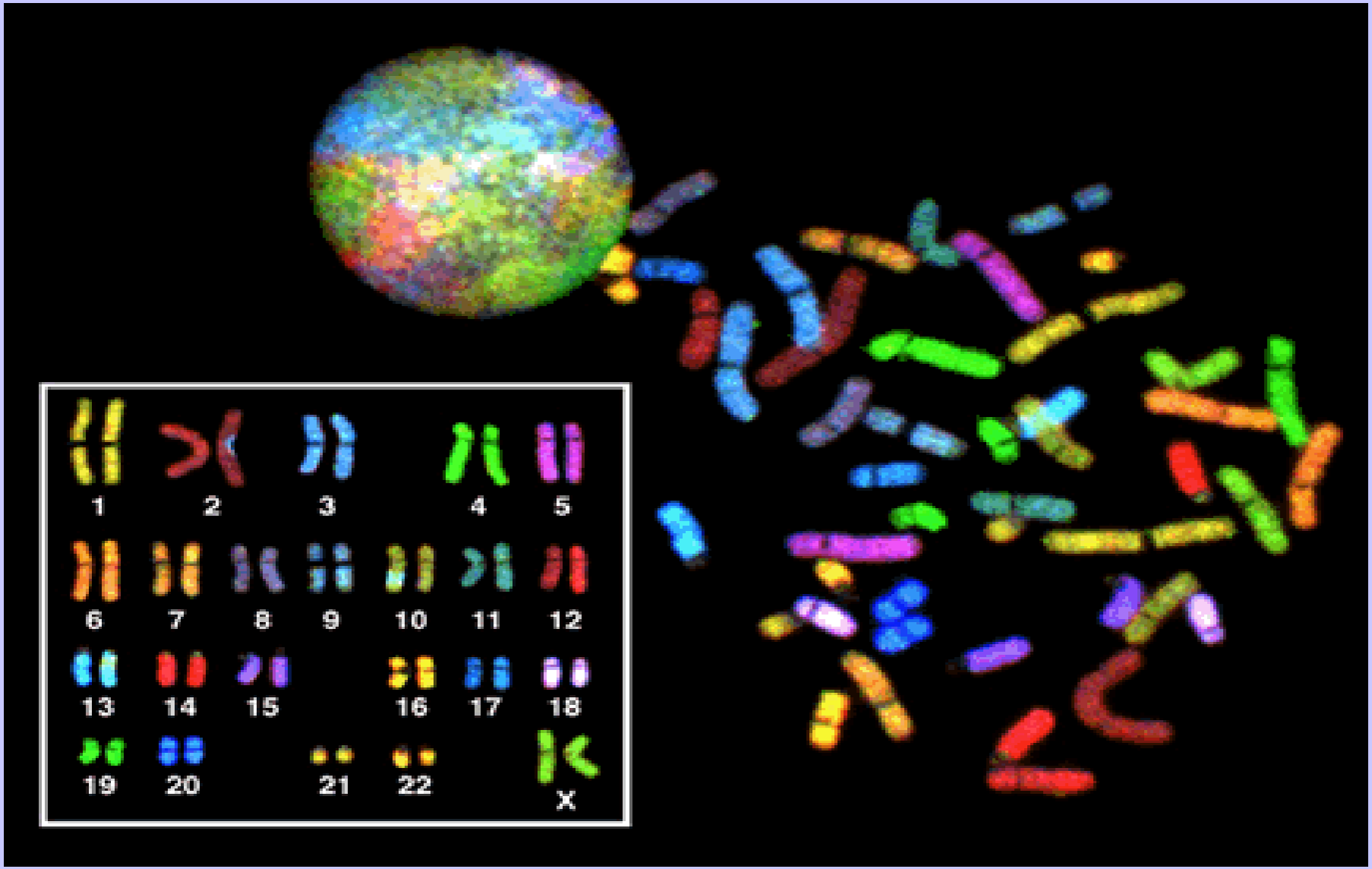
http://students.iitk.ac.in/projects/brain_karyotyping

G-окрашивание — модифицированное окрашивание **по Романовскому — Гимзе**. Чувствительность выше, чем у Q-окрашивания, поэтому используется как стандартный метод цитогенетического анализа. Применяется при выявлении небольших аберраций и маркерных хромосом (сегментированных иначе, чем нормальные гомологичные хромосомы)

Виды окрашивания

- **R-окрашивание** — используется **акридиновый оранжевый** и подобные красители, при этом окрашиваются участки хромосом, нечувствительные к G-окрашиванию. Используется для выявления деталей гомологичных G- или Q-негативных участков сестринских хроматид или гомологичных хромосом.
- **C-окрашивание** — применяется для **анализа центромерных районов** хромосом, содержащих конститутивный гетерохроматин и вариабельной дистальной части Y-хромосомы.
- **T-окрашивание** — применяют для **анализа теломерных районов** хромосом.

Спектральный кариотип (SKY - spectral karyotype)



Абберации

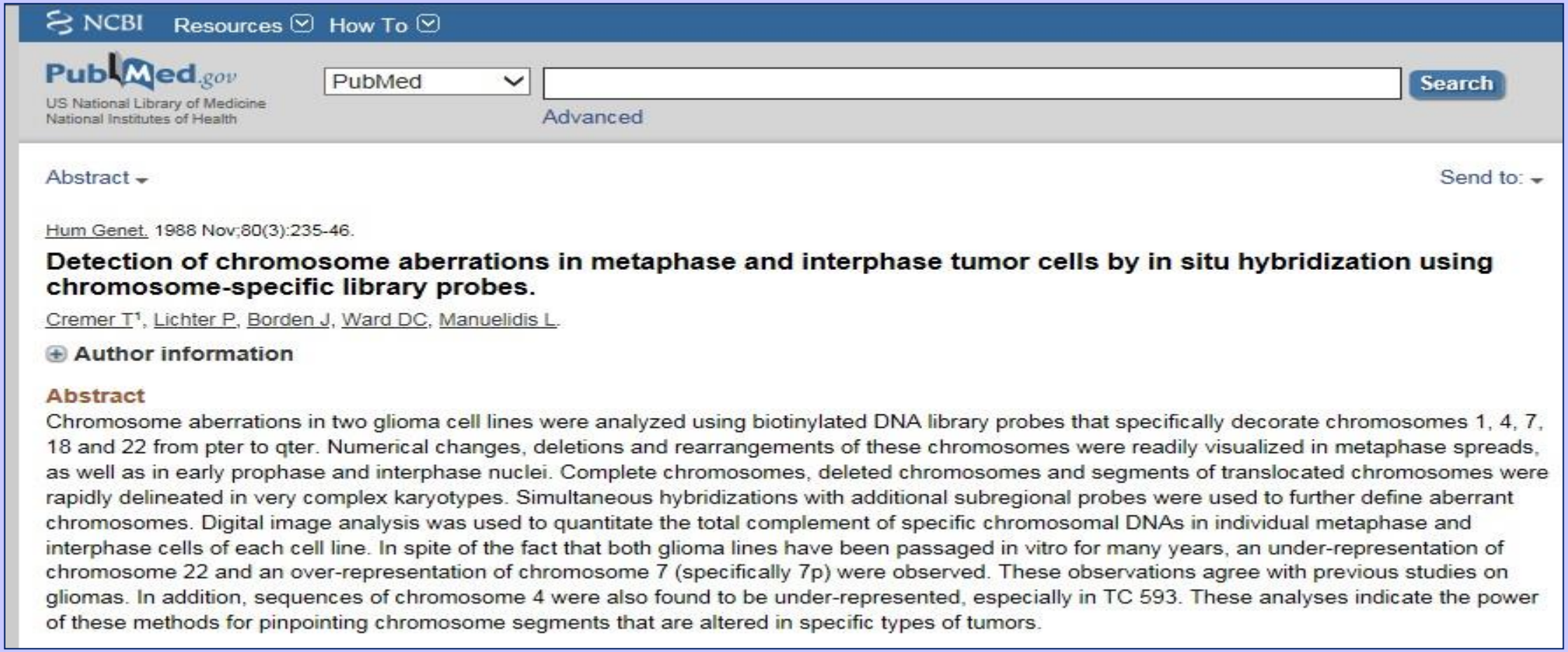
Хромосомные перестройки (хромосомные мутации, или хромосомные аберрации) — тип мутаций, которые изменяют структуру хромосом.

- делеции (утрата участка хромосомы);
- инверсии (изменение порядка генов участка хромосомы на обратный);
- дупликации (повторение участка хромосомы);
- транслокации (перенос участка хромосомы на другую);
- дицентрические и кольцевые хромосомы;
- изохромосомы (несущие два одинаковых плеча).

- внутрихромосомные (инверсии, делеции, дупликации, кольцевые хромосомы);
- межхромосомные (дупликации, транслокации, дицентрические хромосомы).

- Сбалансированные (без потери или добавления генетического материала при формировании, поэтому их носители, как правило, фенотипически нормальны;
- Несбалансированные (меняют дозовое соотношение генов, и, как правило, их носительство сопряжено с существенными отклонениями от нормы)

Цитогенетика в онкологии



NCBI Resources How To

PubMed.gov
US National Library of Medicine
National Institutes of Health

PubMed Search

Advanced

Abstract Send to:

Hum Genet. 1988 Nov;80(3):235-46.

Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes.

Cremer T[1], Lichter P, Borden J, Ward DC, Manuelidis L.

Author information

Abstract

Chromosome aberrations in two glioma cell lines were analyzed using biotinylated DNA library probes that specifically decorate chromosomes 1, 4, 7, 18 and 22 from pter to qter. Numerical changes, deletions and rearrangements of these chromosomes were readily visualized in metaphase spreads, as well as in early prophase and interphase nuclei. Complete chromosomes, deleted chromosomes and segments of translocated chromosomes were rapidly delineated in very complex karyotypes. Simultaneous hybridizations with additional subregional probes were used to further define aberrant chromosomes. Digital image analysis was used to quantitate the total complement of specific chromosomal DNAs in individual metaphase and interphase cells of each cell line. In spite of the fact that both glioma lines have been passaged in vitro for many years, an under-representation of chromosome 22 and an over-representation of chromosome 7 (specifically 7p) were observed. These observations agree with previous studies on gliomas. In addition, sequences of chromosome 4 were also found to be under-represented, especially in TC 593. These analyses indicate the power of these methods for pinpointing chromosome segments that are altered in specific types of tumors.

Fluorescence in situ Hybridization (FISH)

Гибридизация in situ – метод определения конкретных последовательностей нуклеиновой кислоты непосредственно на цитологических или гистологических препаратах.

Fluorescence in situ Hybridization (FISH)

MOLECULAR HYBRIDIZATION OF RADIOACTIVE DNA TO THE DNA OF CYTOLOGICAL PREPARATIONS

By Mary Lou Pardue and Joseph G. Gall

KLINE BIOLOGY TOWER, YALE UNIVERSITY

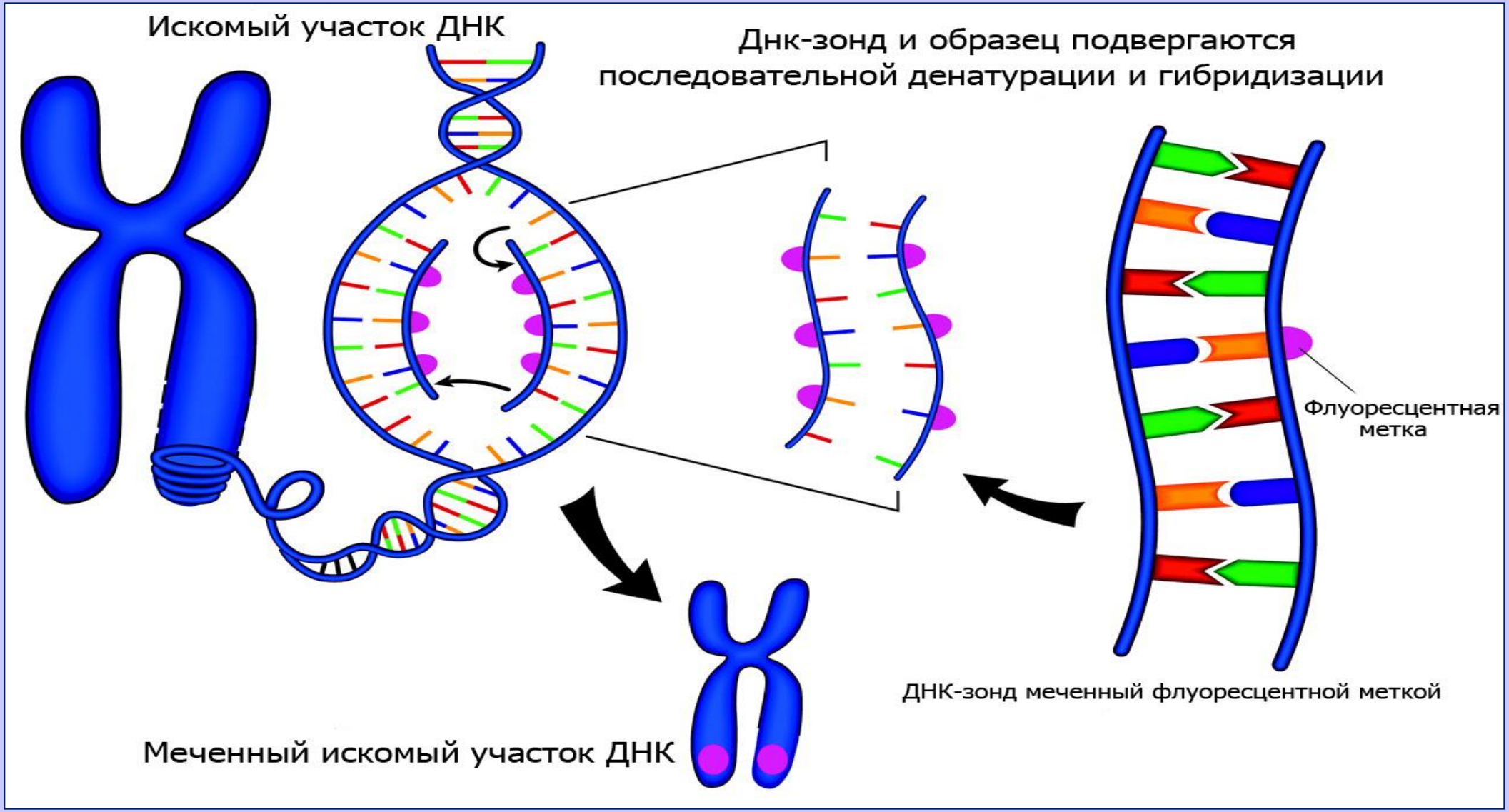
Communicated by Norman H. Giles, August 13, 1969

Abstract.—A method is presented for detecting the cellular location of specific DNA fractions. The technique involves the hybridization of a radioactive test DNA in solution to the stationary DNA of a cytological preparation. Sites of DNA binding are then detected by autoradiography. Experiments with DNA of the toad *Xenopus* are described.

The technique of DNA-DNA hybridization has been applied to a variety of genetic problems since its introduction by Schildkraut, Marmur, and Doty.[1] Hybridization of purified DNA has been used to investigate homologies between the DNA of phage and the DNA of the host bacterium,[2] to study genetic relationships among higher organisms,[3, 4] and to examine the relation of particular DNA fractions to the rest of the genome.[5] Reannealing kinetics have been used as a measure of genome complexity.[6, 7] Recently, substitutions and deletions in

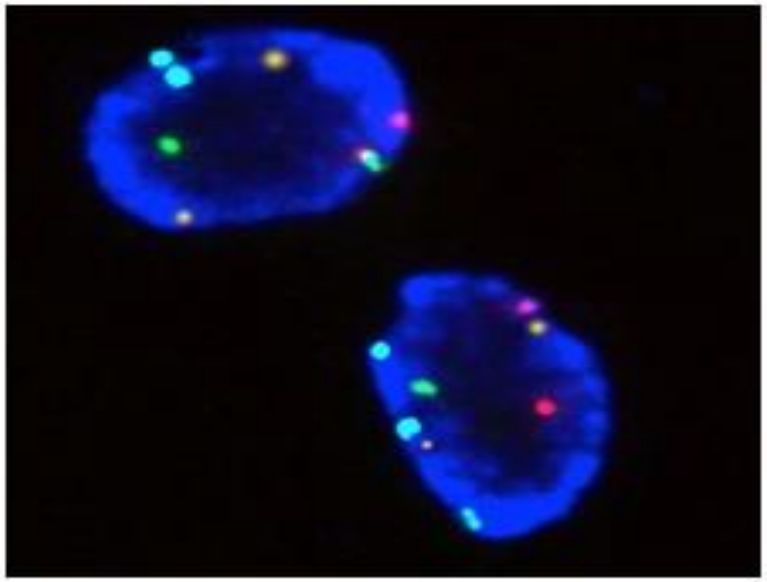
Впервые in situ гибридизация была описана Gall J. G., Pardue M. L. в 1969 году с использованием ^{32}P-меченного зонда.

Процедура метода

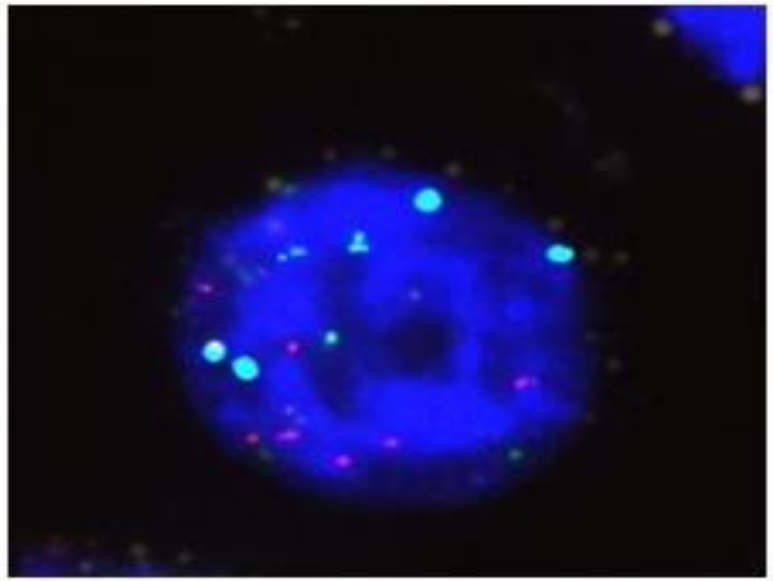


http://www.ajnr.org/content/28/3/406/F2.expansion.html

Микроскопическая картина нормальной и опухолевой клетки уротелия (UroVysion)



Норма

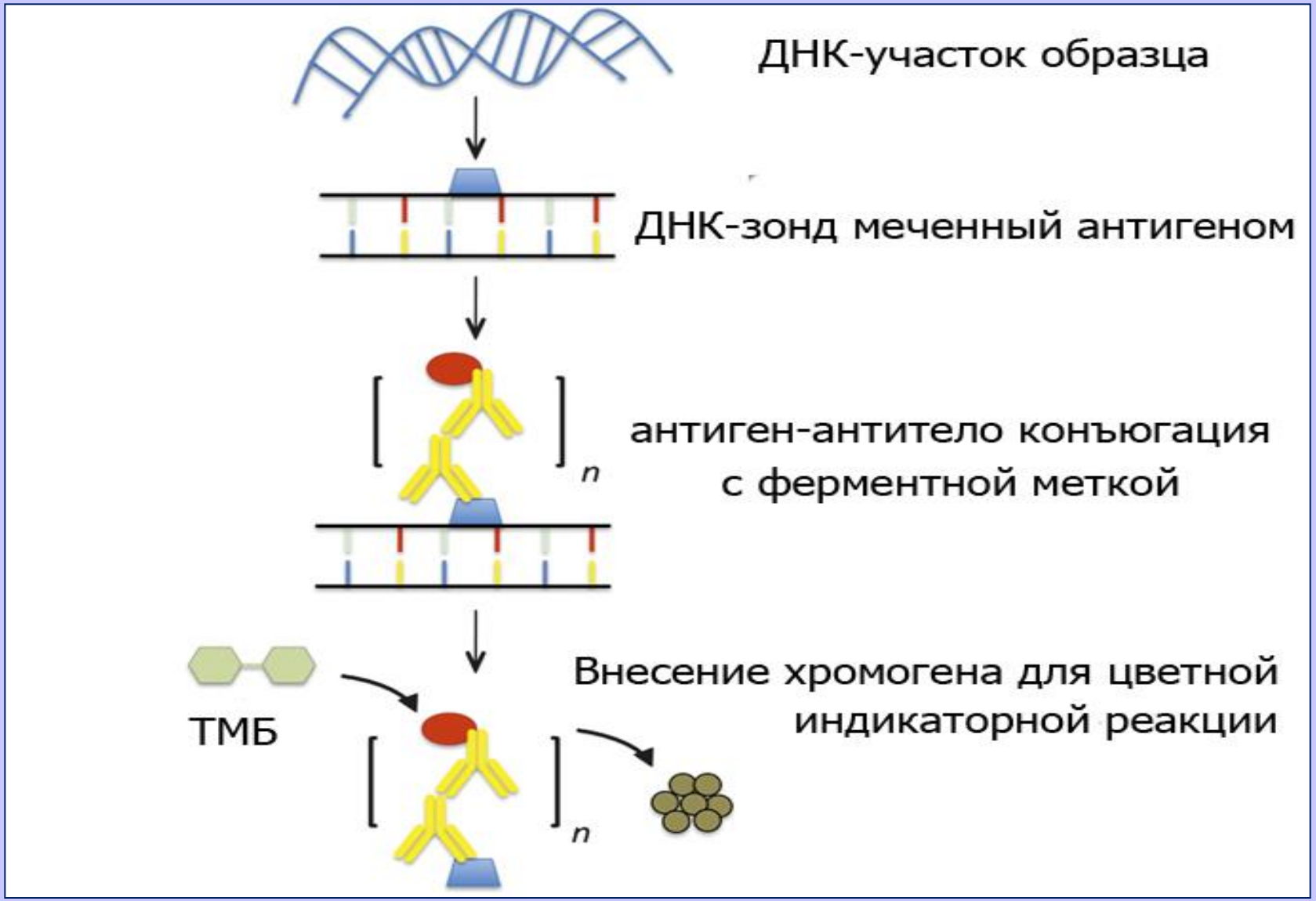


Патология

Применение FISH

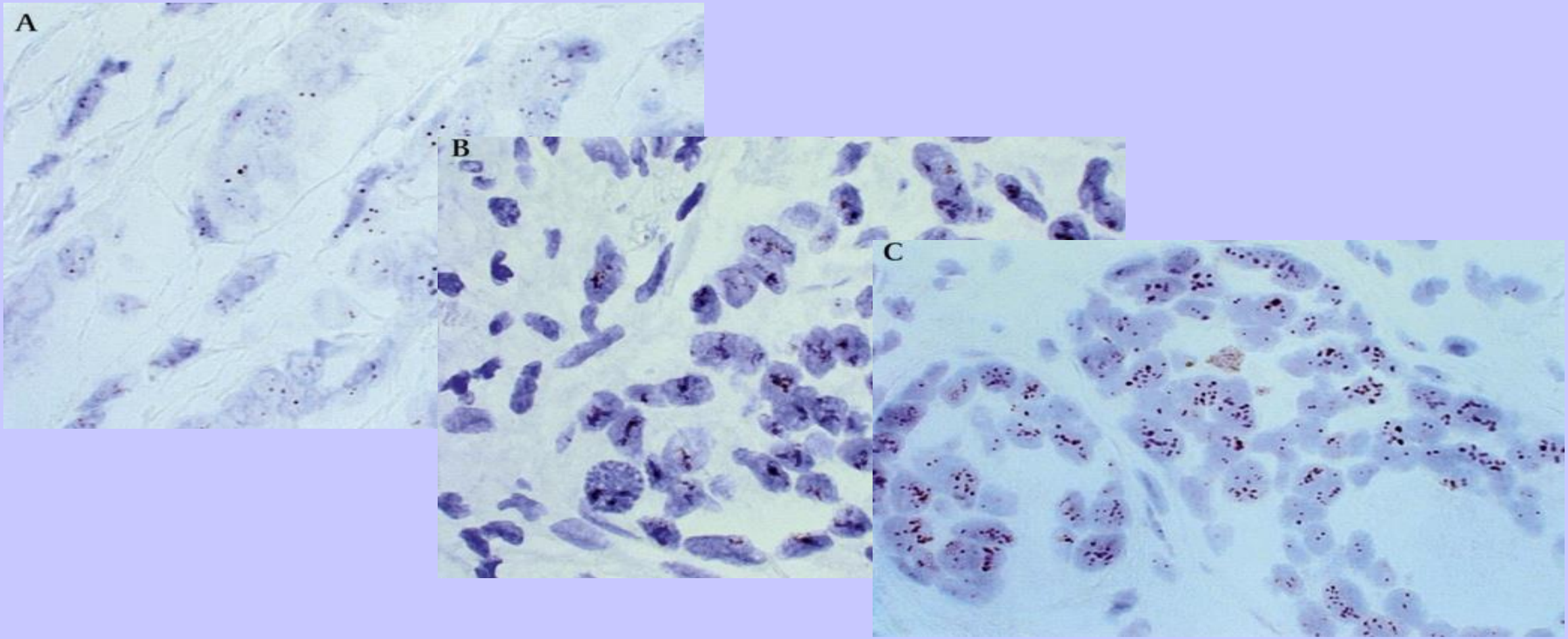
- диагностика солидных опухолей;
- диагностика гемобластозов;
- преимплатационная диагностика;
- пренатальная диагностика хромосомных аномалий.

Хромогенная in situ гибридизация (CISH)



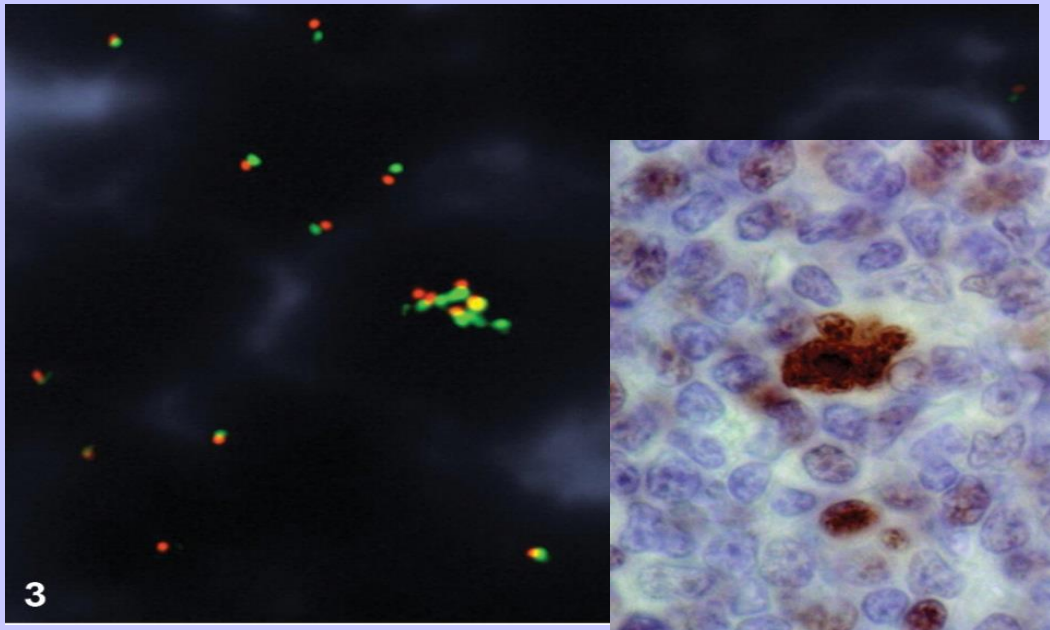
Aaron M. et al. Out of the darkness and into the light: bright field in situ hybridisation for delineation of ERBB2 (HER2) status in breast carcinoma, 2010

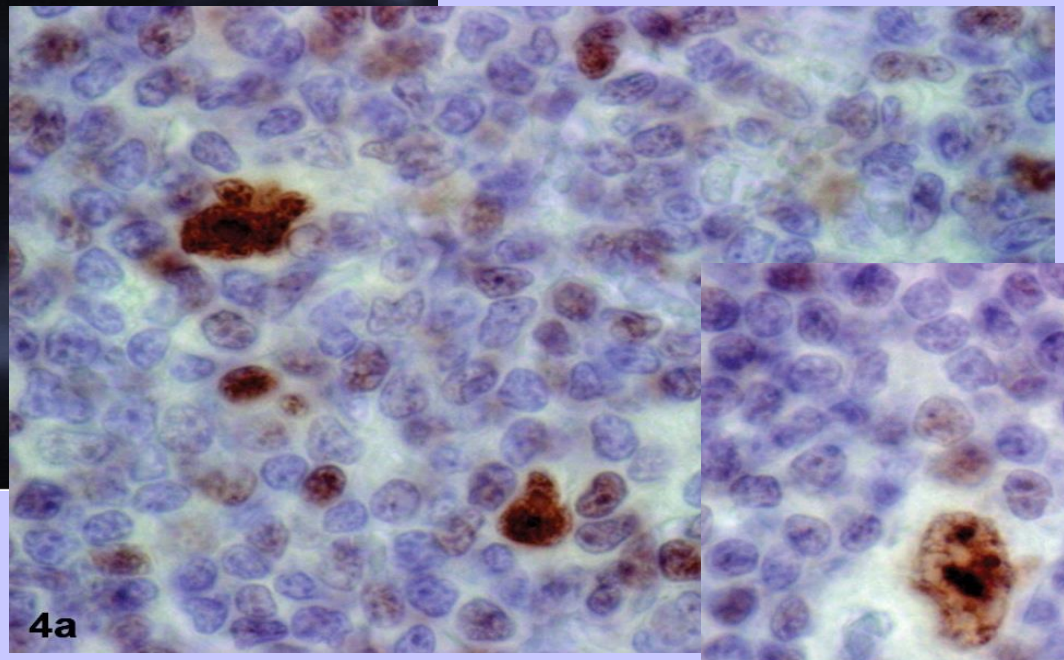
Хромогенная in situ гибридизация (CISH)

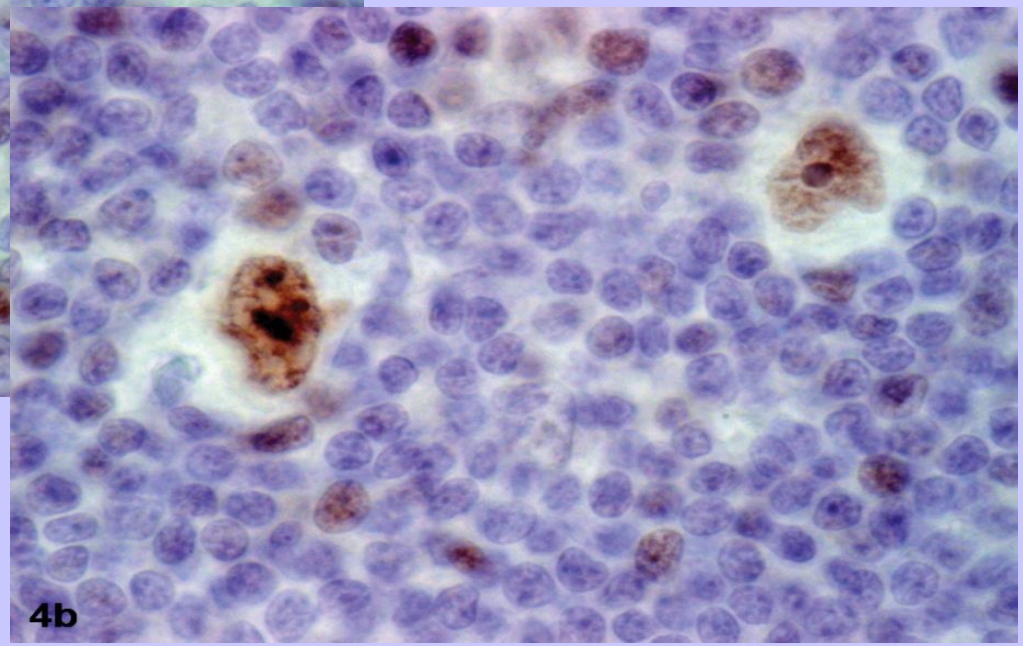


Aaron M. et al. Out of the darkness and into the light: bright field in situ hybridisation for delineation of ERBB2 (HER2) status in breast carcinoma, 2010

FICTION (fluorescence immunophenotyping and interfase cytogenetics as a tool for investigation of neoplasms)







Alexei G. et al. (*2014*). Archives of Pathology & Laboratory Medicine

ПЦР-диагностика

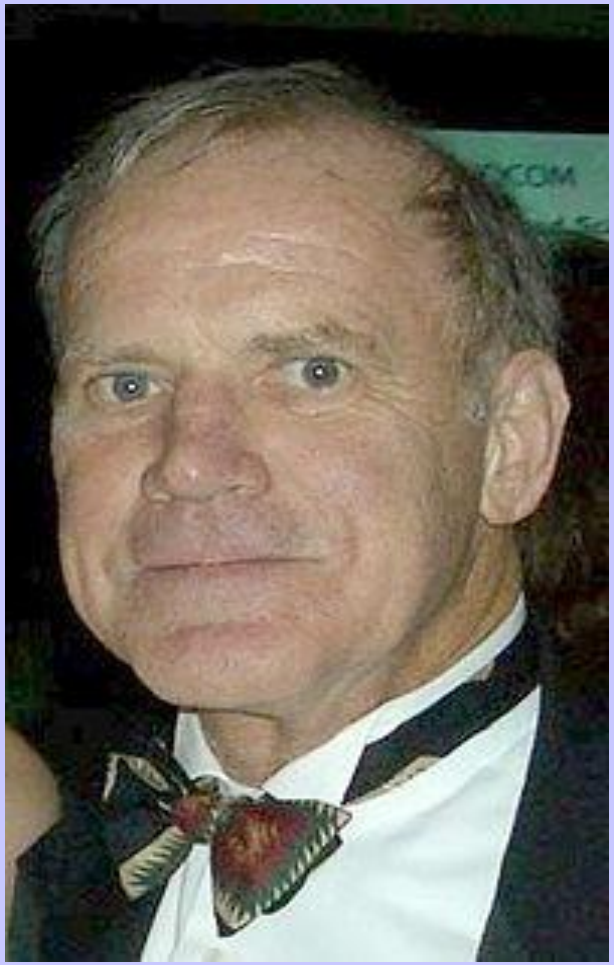
Полимеразная цепная реакция — искусственный процесс многократного копирования (амплификации) специфической последовательности ДНК, осуществляемый in vitro.

ПЦР-диагностика

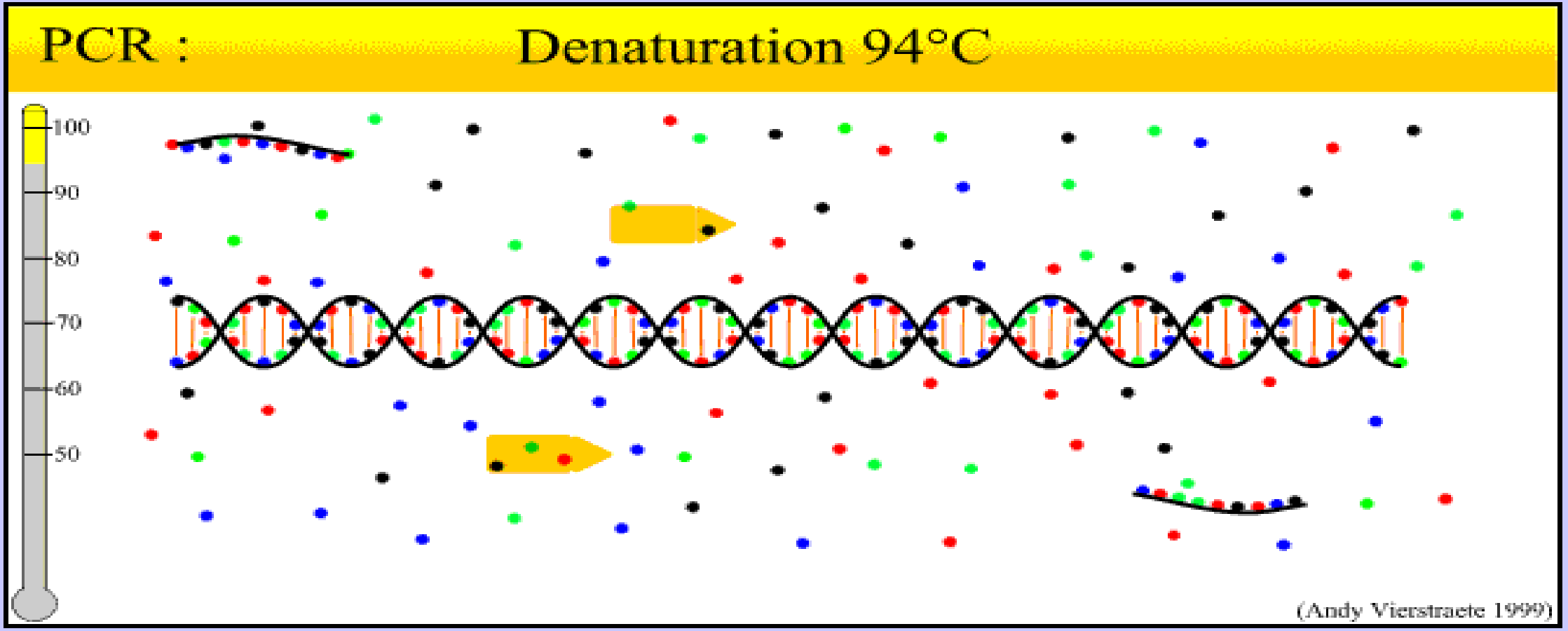
Принцип метода PCR был разработан Kary Mullis в 1983 году.

Открытие PCR стало одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии за последние десятилетия.

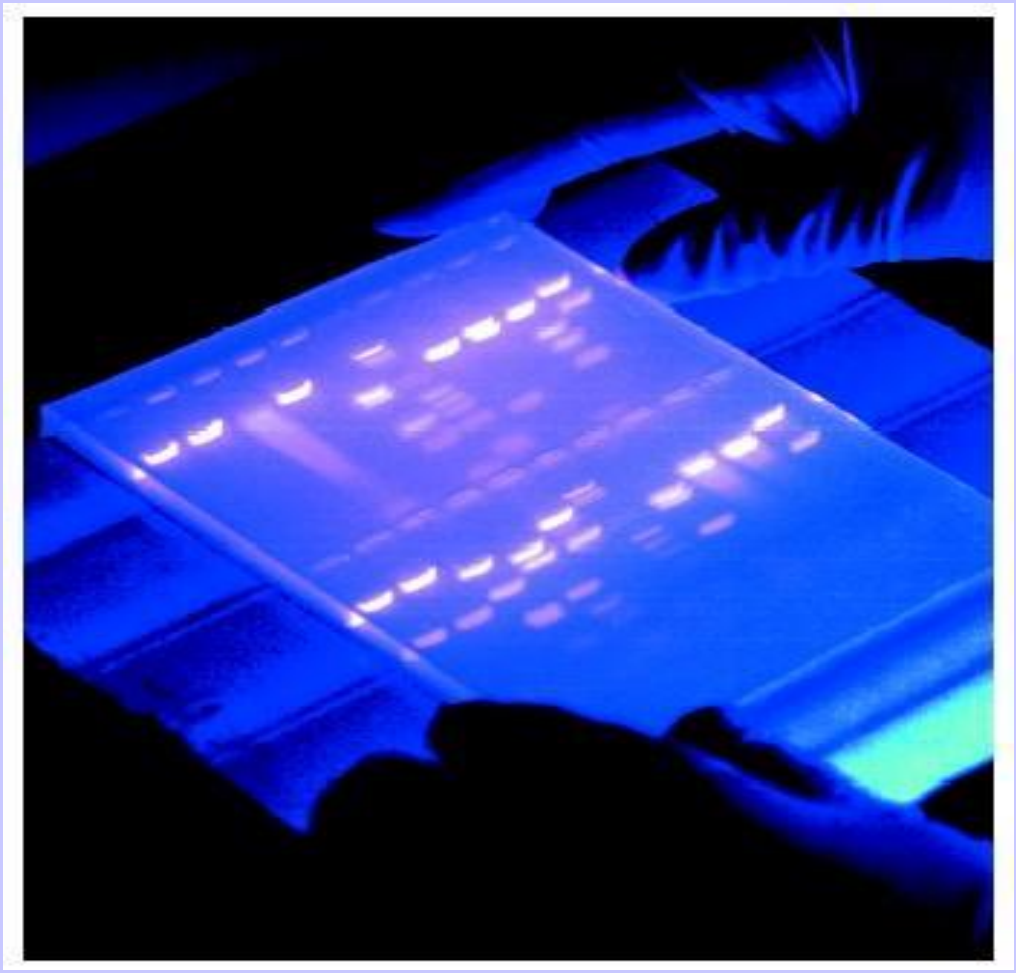
За разработку метода Kary Mullis в 1993 г. был удостоин Нобелевской премии в области химии.



Принцип метода



Детекция



http://www.mehanfamily.com/4/electrophoresis-gel

Real-time ПЦР

http://premiereflooring.com/pages/8/real-time-pcr-machine-price-list

Модификации ПЦР-анализа

- «гнездная» nested-PCR (nested-polymerase chain reaction);
- обратно-транскрипционная RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction);
- лонг-PCR (Long-PCR);
- LIPA-PCR — метод полимеразной цепной реакции с обратной дот-блот гибридизационной детекцией на стрипах;
- PCR in situ (PRIMS — polymerase reaction in situ);
- мультиплексная PCR (multi-polymerase chain reaction).

ПГД

Преимплантационная ГеноДиагностика

Процедура ЭКО позволяет получить сразу несколько эмбрионов , обычно 5-15. Встает вопрос – какие из эмбрионов лучше подходят для имплантации в матку. Морфологические критерии помогают оценить жизнеспособность эмбрионов, но не их качество с генетической точки зрения. Было показано, что эмбрионы с лишней 21-ой хромосомой (синдром Дауна) или с мутациями в генах кроветворной системы (гемофилия, талассемия, серповидно-клеточная анемия и др.) по морфологическим критериям неотличимы от здоровых эмбрионов.

ПГД позволяет оценить генетические особенности эмбрионов до переноса в матку и выбрать здоровые эмбрионы – с нормальным количеством хромосом и не унаследовавшие родительские мутации.

Из какого из этих эмбрионов получится ребенок, больной синдромом Дауна?

Секвенирование

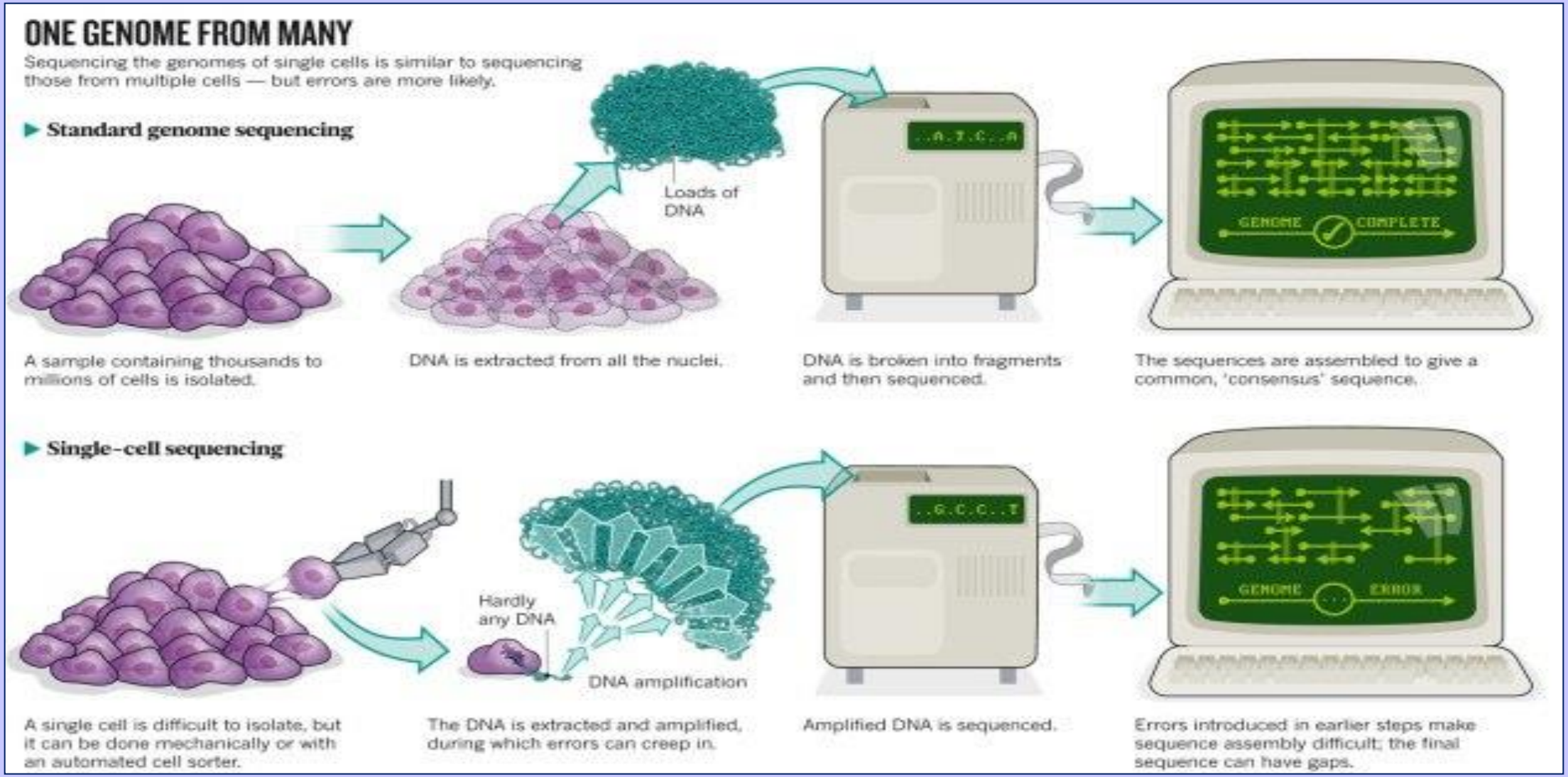
- Технологии ДНК-секвенирования, появившиеся благодаря работам ученых Уолтера Гилберта (Maxam A, Gilbert W, 1977) и Фредерика Сенгера (Sanger F, Coulson A, 1975) в 70-х годах прошлого века перевернули наше понимание о человеческой биологии.

- Непрерывное совершенствование этих технологий привело к тому, что проект по секвенированию человеческого генома, „Геном человека“ (Human Genome Project, HGP), был реализован за один год в 2001 году после десяти лет работы (Watson J, 1990; Venter J, et al, 2001).

- Ожидается, что секвенирование генома (sequencing, считывание информации с ДНК) предоставит человечеству преимущества в понимании здоровья людей и позволит перейти к индивидуальному лечению.

"Агентство по инновациям и развитию", http://www.innoros.ru/publications/articles/13/sovremennye-metody-polnogenomnogo-sekvenirovaniya-rasshifrovki-dnk-v-diagno

Секвенирование



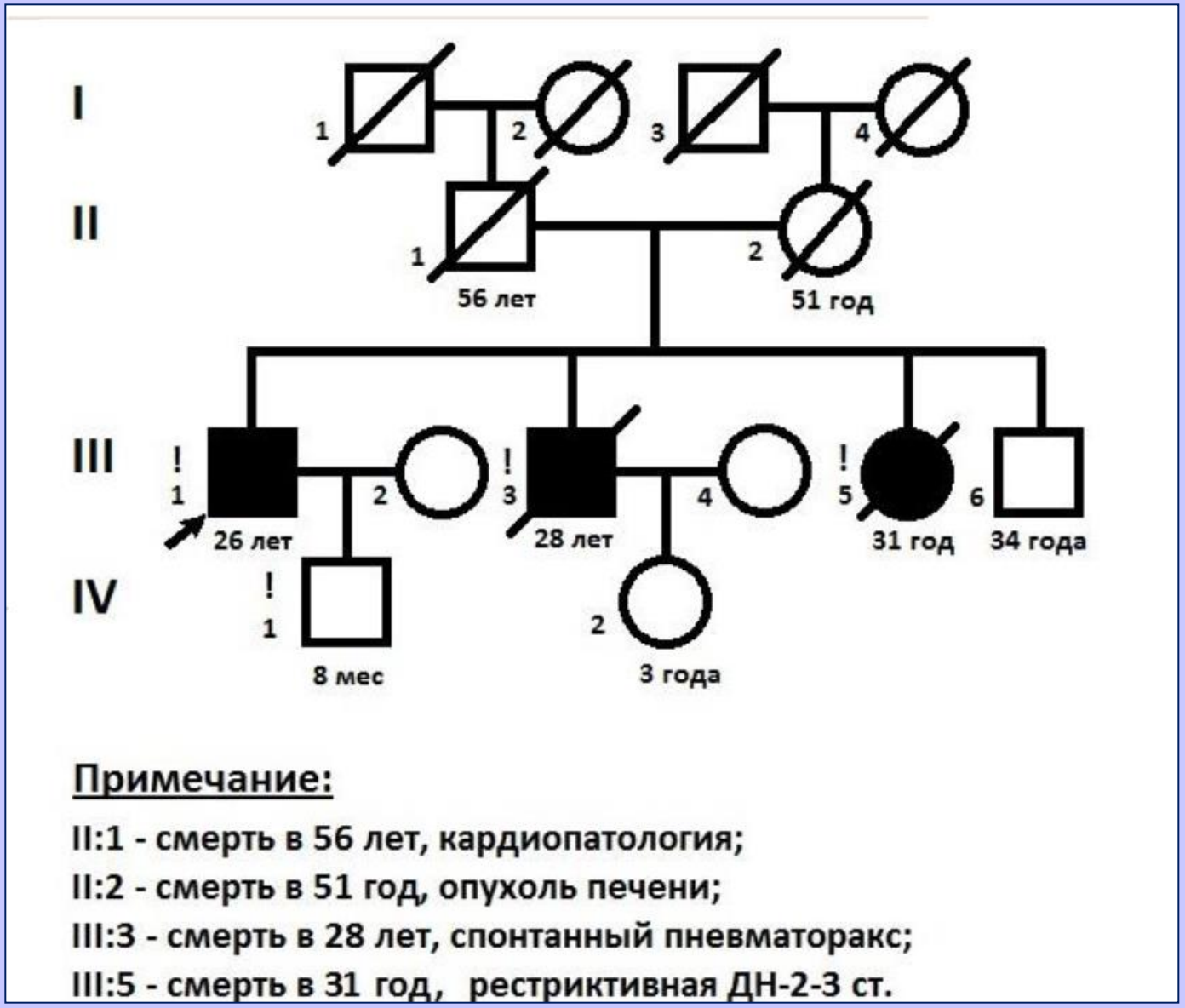
Применение секвенирования

- Персональная медицина
- Рак и генетическая диагностика
- Другие заболевания и генетическая диагностика (болезнь Альцгеймера, бесплодие и др.)
- Фармакогеномика и полногеномное секвенирование

Секвенирование в клинической онкологии

- молекулярной профилактики наследственно обусловленных заболеваний (рак молочной железы, яичников, неполипозный рак толстой кишки и др.);
- дифференциальной диагностики неоплазий (диагностика гастроинтестинальных опухолей желудочно-кишечного тракта по мутации гена C-kit, мутаций в гене EGFR при супратенториальных опухолях головного мозга и др.);
- определения мутаций в онкогенах и опухолевых супрессорах (p53, APC, PTEN и др.);
- определения микросателлитной нестабильности при раке легкого и толстой кишки для выбора тактики лечения и прогноза;
- оценки лекарственной устойчивости в мониторинге лечения онкологических пациентов.

Клинический случай



Примечание:

II:1 - смерть в 56 лет, кардиопатология;

II:2 - смерть в 51 год, опухоль печени;

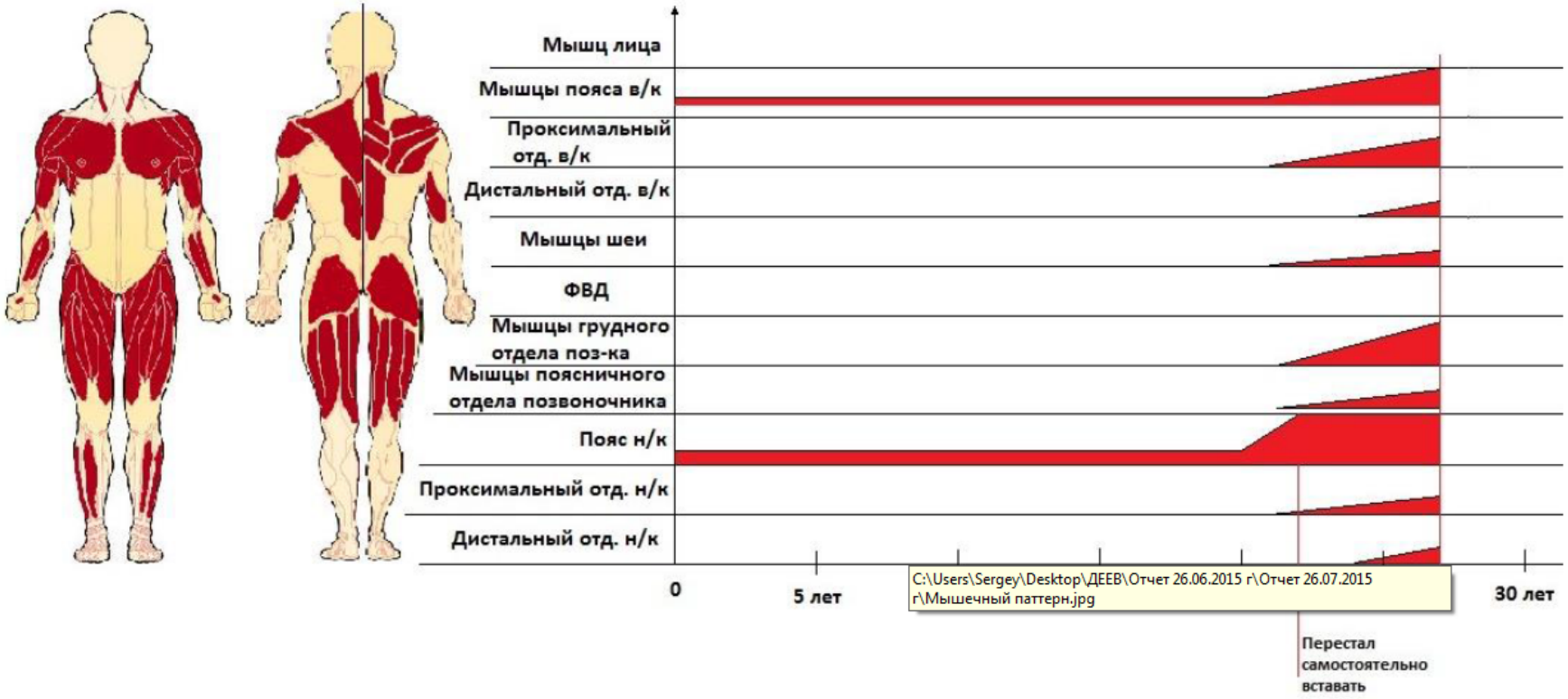
III:3 - смерть в 28 лет, спонтанный пневматоракс;

III:5 - смерть в 31 год, рестриктивная ДН-2-3 ст.

Клинический случай

Жалобы

Анамнез заболевания



Клинический случай

Неврологический статус

Объем активных движений

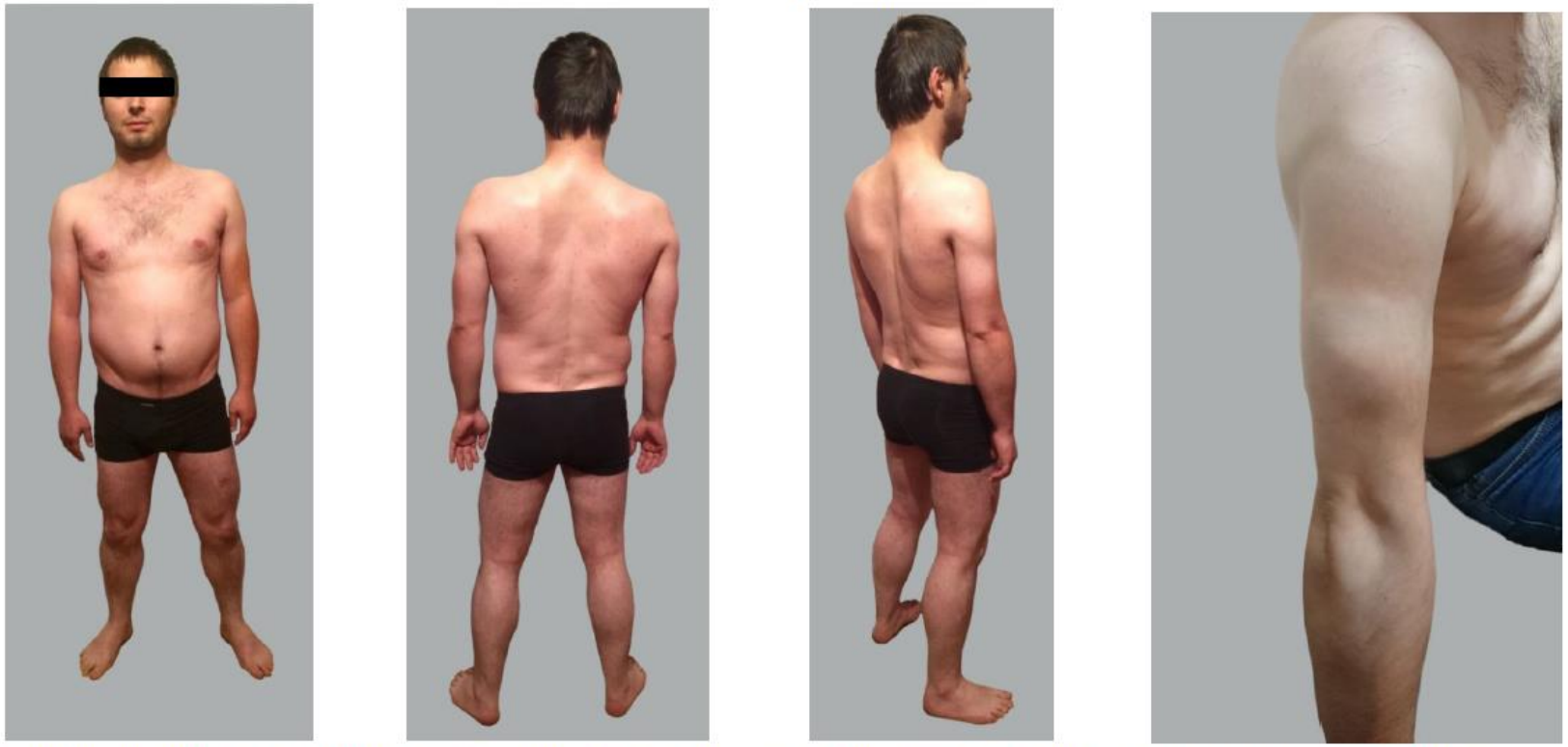
- **В верхних конечностях**: отведение в плечевых суставах 45◦, сгибание 30◦, разгибание 30◦;
- **В нижних конечностях**: сгибание в тазобедренных суставах сидя – рывковым движением кратковременно приподнимает бедро; лежа - самостоятельно невозможно, пассивное сгибание до 150◦ (норма); самостоятельное разгибание не возможно; приведение в тазобедренных суставах до 30◦.

- **Глубокие рефлексы** не вызываются.
- **Самостоятельная ходьба** до 30-50 метров.

Клинический случай

Неврологический статус

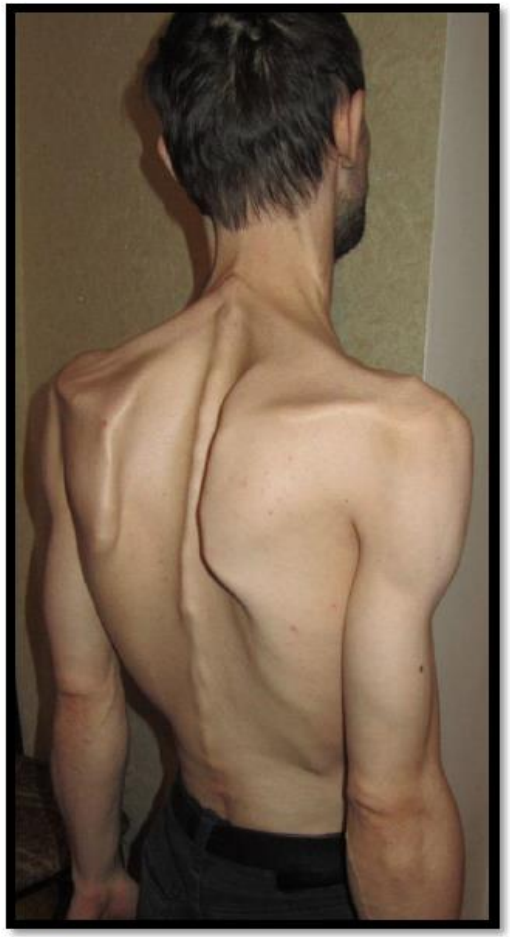
Амиотрофии



- **Выраженные атрофии** паравертебральных мышц грудного и поясничного отделов позвоночника.
- **Умеренные атрофии** в проксимальных отделах верхних конечностей (в большей степени бицепса плеча, в то время как дельтовидная мышца достаточного объема, а трицепс имеет гипертрофию латеральной головки).

Клинический случай

Сибсы



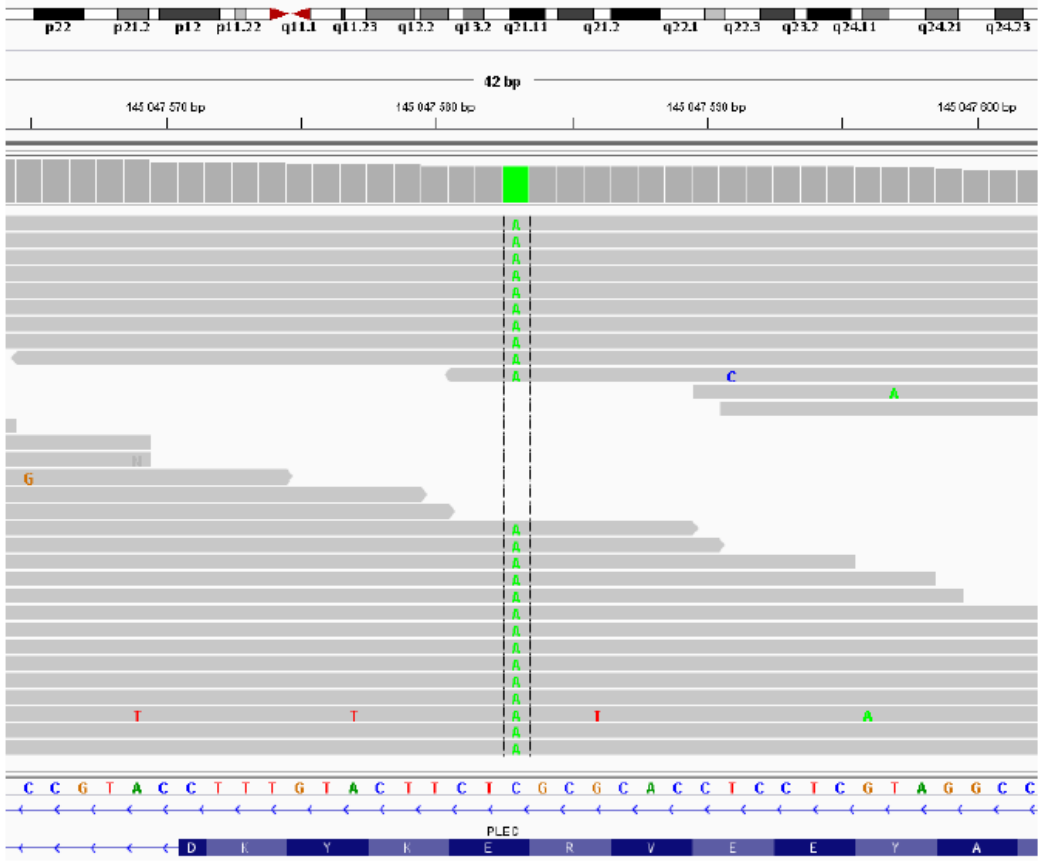
М. 29 лет, смерть от спонтанного пневмоторакса.

- А.31 год, смерть от прогрессирующей дыхательной недостаточности.

Клинический случай

Генетический анализ

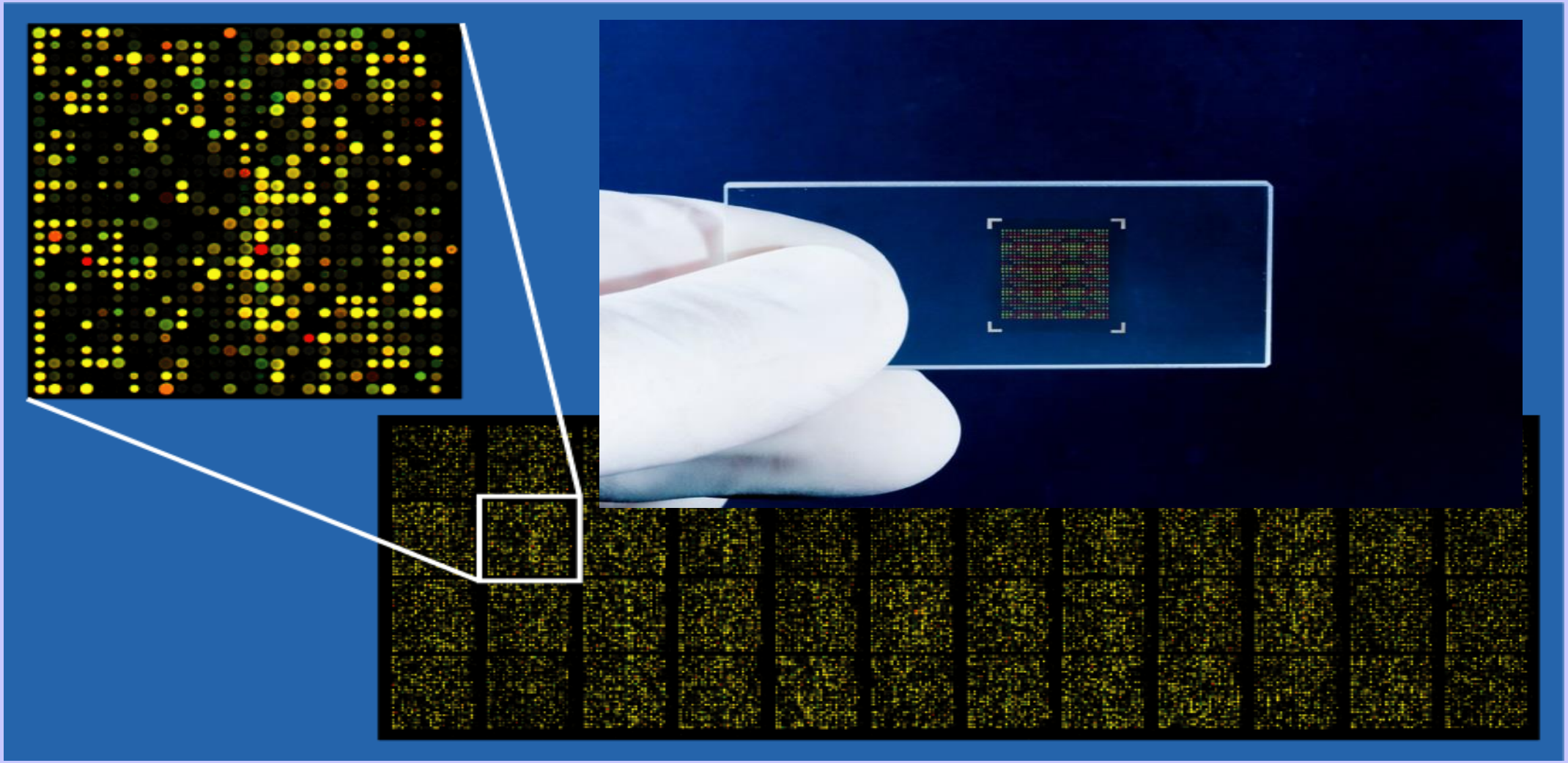
- С помощью NGS была обнаружена новая гомозиготная мутация chr8: 145047583C>A, Glu20ter в гене PLEC, изоформа 1f. (Биоинформационная обработка Ф. Коновалов, лаборатория Genetico, г. Москва (2014))
- Результат подтвержден референсным методом (секвенирование по Сэнгеру)



Микрочипы

- Биологические микрочипы – это набор молекул ДНК (реже – белков), упорядоченно размещенных на специальном носителе, так называемой «платформе».
- Платформой может служить пластинка из стекла, пластика,
- кремния, или полимерная мембрана.
- Размер диагностической поверхности микрочипа может варьировать от нескольких квадратных миллиметров до 50 квадратных сантиметров.
- На каждом микрочипе может располагаться от 30–50 до нескольких десятков и даже сотен тысяч упорядоченно нанесенных микротестов или проб.

Микрочипы



http://sgugenetics.pbworks.com/w/page/38184737/Methods%2520of%2520Pathogen%2520identification%2520using%2520molecular%2520methods&sa

Метод

Аналитическая ячейка микрочипа – это:

- микроскопическое количество молекул зонда, прикрепленное к поверхности носителя или помещенное внутрь него (как в случае с гелевыми чипами),
- флуоресцентно меченая ДНК зонда,
- набор реактивов для мечения, гибридизации и детекции сигнала.

Метод

Собственно микрочиповый анализ включает в себя следующие этапы:

- Пробоподготовка анализируемого материала:
  - - выделение и очистка анализируемой ДНК (или РНК) зонда;
  - - амплификация ДНК (или РНК) зонда с одновременным мечением флуоресцентным красителем.
- Гибридизация амплифицированного, флуоресцентномеченого зонда с ДНК(пробами, содержащимися на микрочипе.
- Детекция сигнала.
- Обсчет полученных данных.

Применение

Клиническая диагностика для определения:

- вирусов и микроорганизмов;
- гормонов;
- аллергенов;
- наркотиков;
- любых биоактивных веществ в любых малых концентрациях;
- онкологии;
- в криминалистике;
- для исследований в области экологии биобезопасности.

Классификация

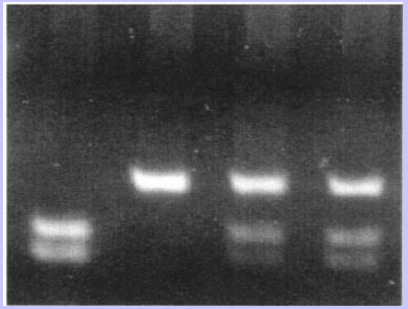
- По типу используемой платформы (стеклянная пластинка; пластиковая пластинка; кремниевая пластинка; нитроцеллюлозная мембрана; гелевая пластинка; кремниевые шарики).
- По количеству проб на одном чипе: от десятков и сотен проб – гелевые чипы и чипы на нитроцеллюлозных и нейлоновых мембранах, – до тысяч, десятков и сотен тысяч проб – чипы, «выращенные» на стекле и кремнии.

Классификация

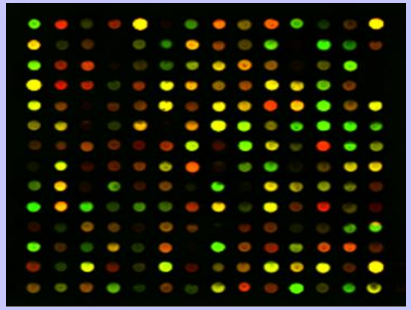
- По способу прикрепления зондов: нанесение на подложку уже готового зонда; выращивание молекул зонда на носителе (фотолитография); размещение молекул зонда внутри геля.
- По характеру наносимых на чип зондов: молекулы ДНК; белковые молекулы; молекулы ферментов.
- По способу детекции сигнала: детекция люминесценции с помощью микроскопа или лазерной сканирующей системы; измерение электропроводности гибридных молекул ДНК; измерение кривых плавления гибридных молекул ДНК.

Молекулярно-генетические методы скрининга наследственных заболеваний и их носительства

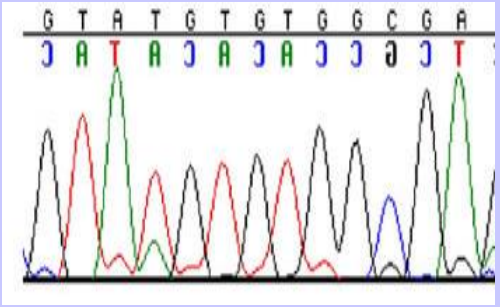
ПЦР



Микрочипы

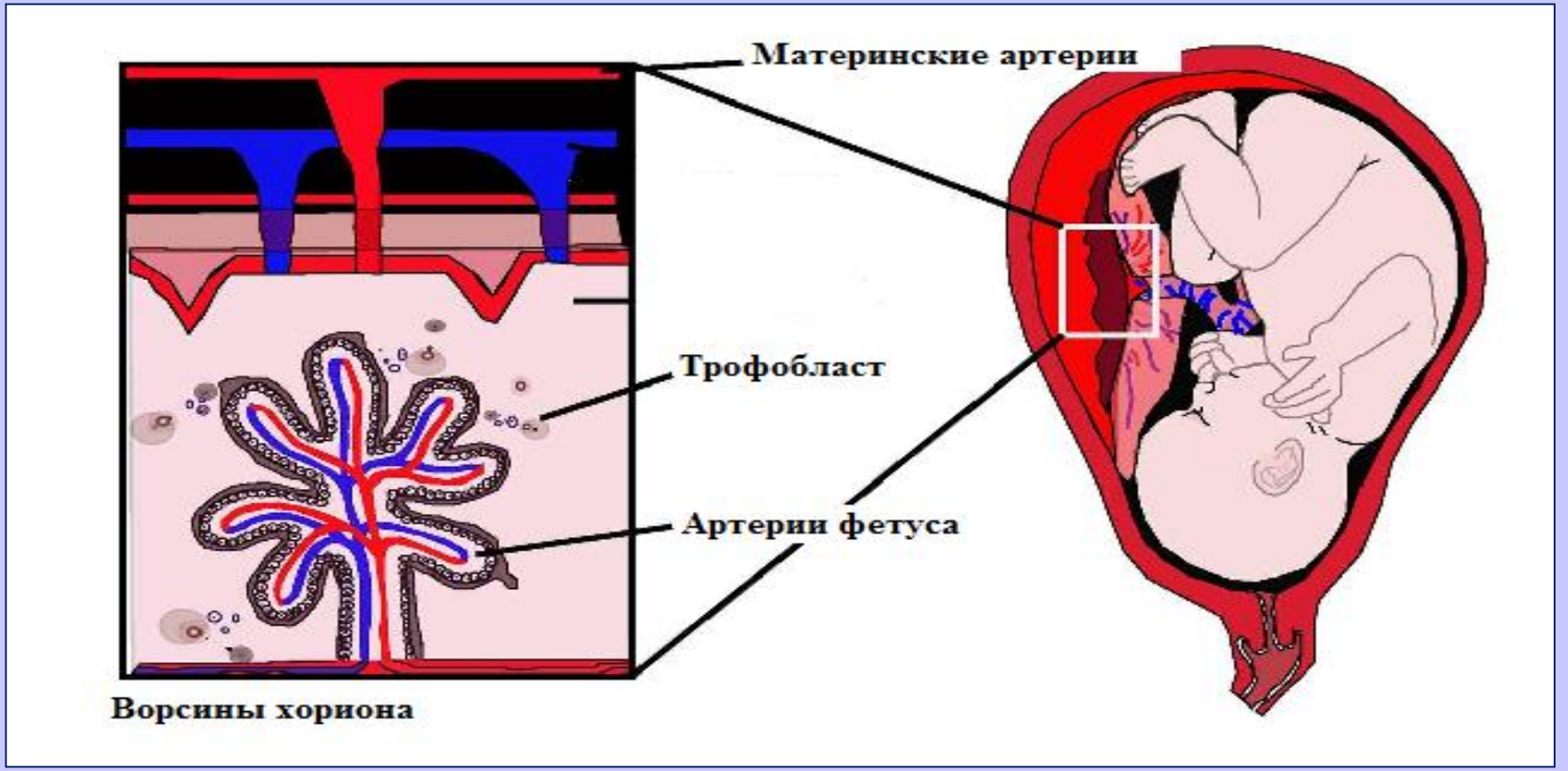


Секвенирование



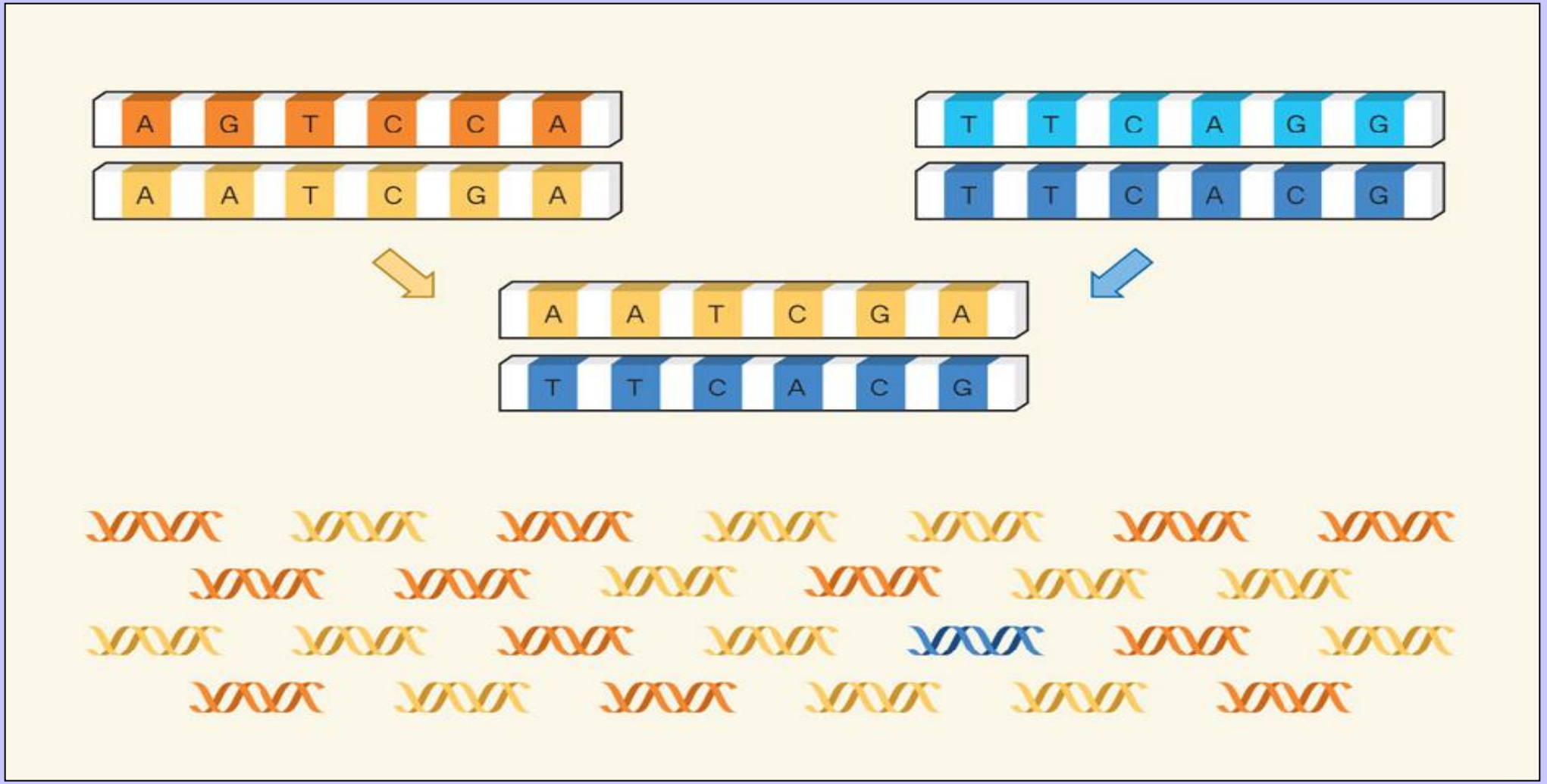
	ПЦР	Микрочипы	Секвенирование
Достоверность	Средняя	**Высокая**	**Очень высокая**
Стоимость	**Низкая**	Средняя	Высокая
Производительность	Низкая	**Высокая**	Средняя
Простота анализа	Высокая	Средняя	Низкая

Плодный ДНК-микрохимиризм



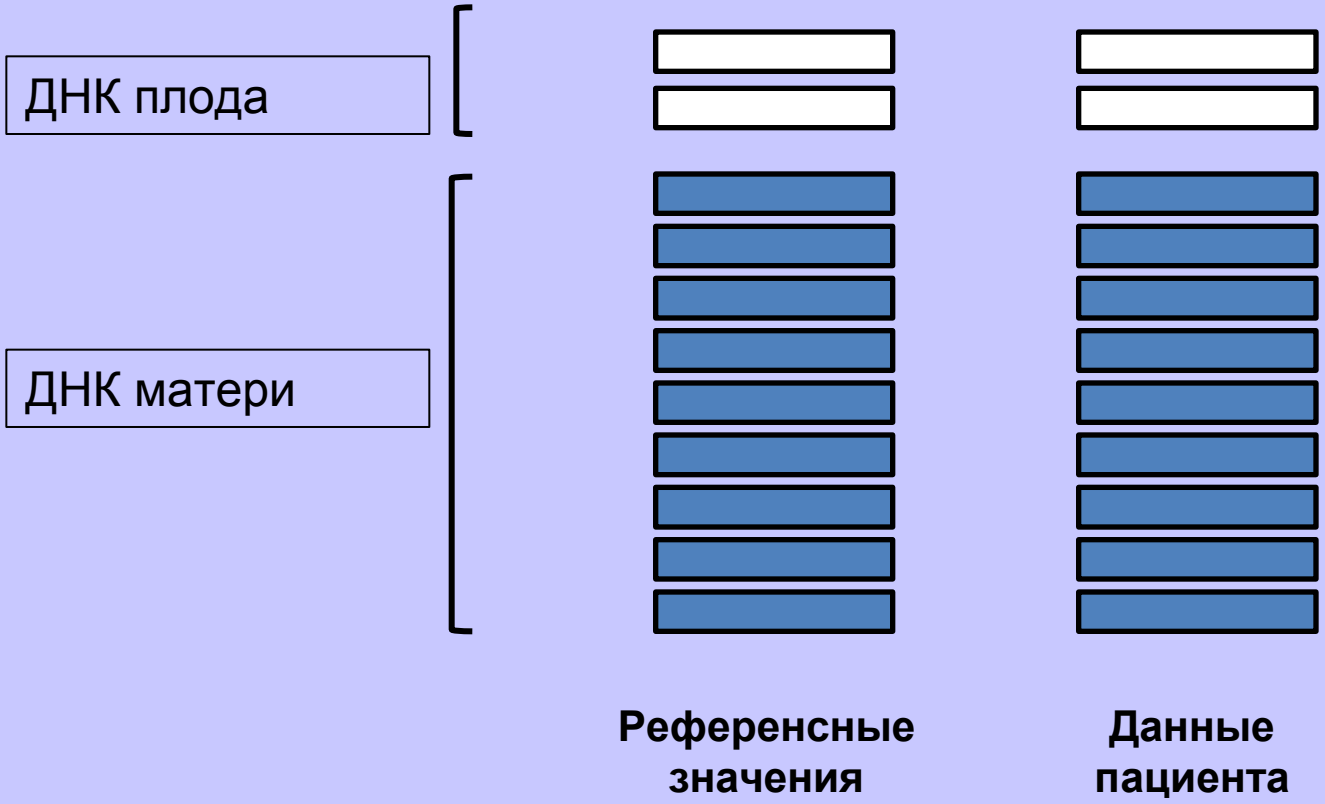
Детекция	с 4 недели беременности
Концентрация	0% - 40%
Объем	<80 геномов/мл крови
Время полужизни	16 минут
Средняя длина	193 п.н.

Технология NGS в НИПД



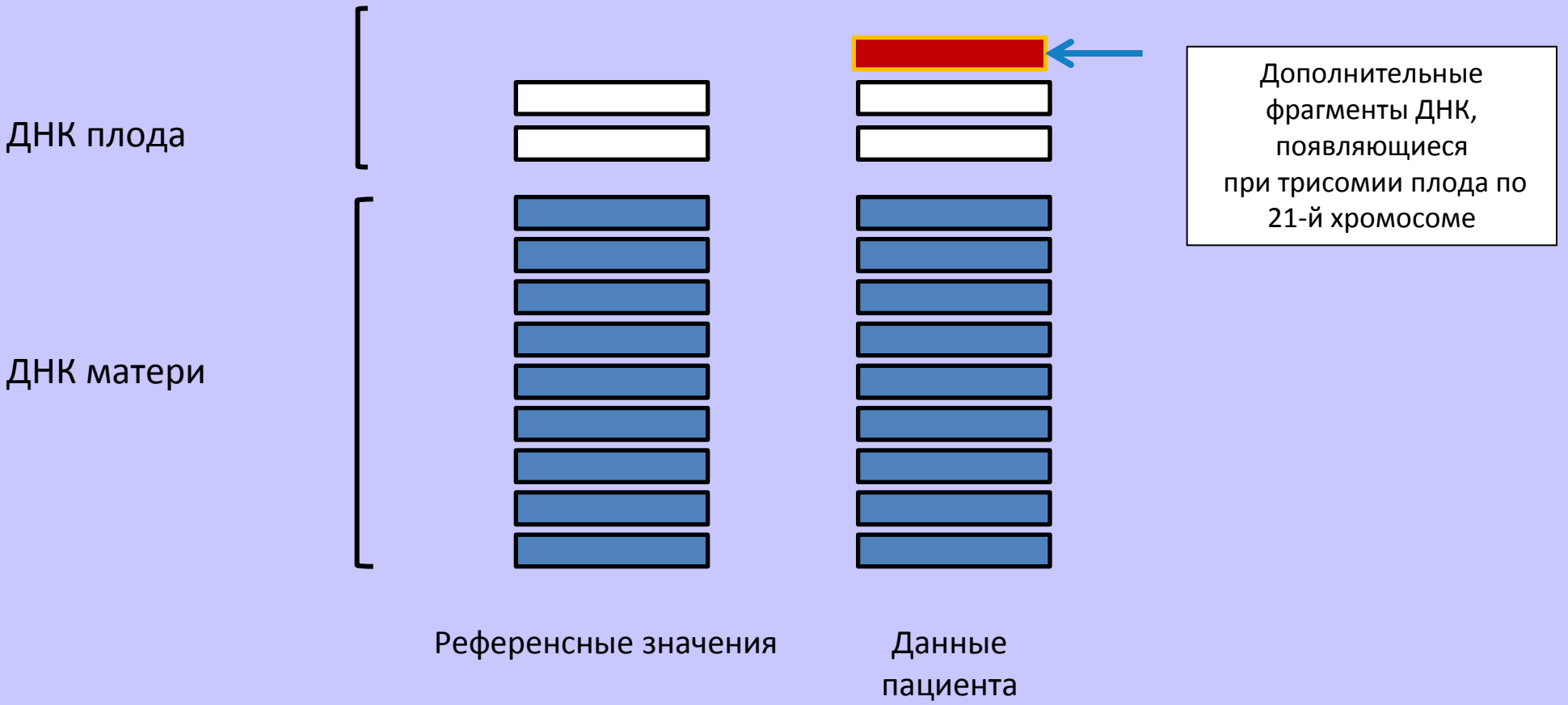
Свободно циркулирующая ДНК плазмы – случайная смесь молекул из разных организмов и разных хромосом.

Технология NGS в НИПД



Число фрагментов ДНК из 21 хромосомы

Технология NGS в НИПД



Число фрагментов ДНК из 21 хромосомы

Выводы: