

Практичне заняття № 7
МЕДИКО-ГЕНЕТИЧНЕ КОНСУЛЬТУВАННЯ ПРИ
МУЛЬТИФАКТОРІАЛЬНИХ ЗАХВОРЮВАННЯХ

МЕТОДИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ ГЕНЕТИКИ

1. Ознайомитись з особливостями мультифакторіальних захворювань на прикладі мультифакторіальних оро-фаціальних розщілин.

Найбільш поширеними спадковими вадами розвитку мовного апарату є незарощення (розщеплення) губи та/або піднебіння - оро-фаціальні розщілини. Розрізняють дві окремі групи патологій:

- розщеплення верхньої губи, ізольоване або сполучене з розщепленням піднебіння;
- розщеплення піднебіння при нормальній верхній губі.

Частота народження дітей з оро-фаціальними розщілинами становить 0,79:1000 для хлопчиків і 0,59:1000 для дівчаток. У чоловіків, як правило, зустрічаються більш важкі форми патології. В той же час, ізольоване розщеплення піднебіння частіше зустрічається у жінок.

Оро-фаціальні розщілини складають біля 87% всіх природжених вад розвитку обличчя. При цьому майже кожний п'ятий випадок пов'язаний з наявністю тяжкого спадкового синдрому. Описано більше 150 спадкових синдромів, одним із симптомів яких є розщеплення губи-піднебіння.

Деякі автори вважають, що кількість новонароджених з незарощенням губи та/або піднебіння збільшується і в найближчі роки стане вдвічі більшою, ніж сторіччя тому. В інших роботах прогноз не такий песимістичний, але в них також підкреслюється тенденція до зростання частоти цієї патології, постійного збільшення кількості подружніх пар, в яких хоча б один з батьків є носієм.

Переважає кількість оро-фаціальних розщілин мають спадкову природу. Приблизне співвідношення різних форм:

- моногенні форми: аутосомно-домінантні - 12,8%
- аутосомно-рецесивні - 6,7%
- Х-зчеплені - зустрічаються рідко
- хромосомні форми - 2,6%
- мультифакторіальні форми - 48,7%
- тератогенні форми - 16,4%
- форми з невстановленою етіологією - 12,8%

МУЛЬТИФАКТОРІАЛЬНІ форми оро-фаціальних розщеплень виникають при сполученні наявності генетичної схильності та впливу несприятливих факторів середовища, які сприяють реалізації схильності у ваді розвитку. Самі по собі несприятливі умови не здатні викликати появу таких синдромів. Характерною рисою є відмінність "порогу" для чоловіків і жінок. Загальний ефект генів, здатний викликати розвиток захворювання у

чоловіків, може виявитись недостатнім для жінок, тому й частота і тяжкість розщеплень мультифакторіального походження неоднакова для різних статей.

При мультифакторіальних оро-фаціальних розщепленнях у батьків хворого можуть бути виявлені мікроознаки - певні прояви дії аномальних генів. Для розщеплення губи (ізолюваного або сполученого з розщепленням піднебіння) - це коротке піднебіння, асиметрія крил носа, девіації осі носа, прогнатія, атипова форма зубів. Для розщеплення піднебіння - коротке піднебіння, атипова форма зубів, діастема, прогенія, розщеплення язичка.

Незалежно від форми розщеплення губи та/або піднебіння у дитини необхідне медико-генетичне консультування. При наявності оро-фаціальної розщелини мультифакторіальної природи або неясної етіології висновок про можливість народження хворої дитини базується на даних таблиць емпіричного ризику.

Ризик для родичів пробанда з розщепленням, %
(за даними Н.С.Демікової)

Ступінь спорідненості	Розщеплення	
	губи та/або піднебіння	тільки піднебіння
Діти пробанда	3-4	7
Сибси пробанда	3-5	2
Дядьки, тітки, племінники	1	1
Двоюрідні сибси	0,5	0,5
Сибси, при наявності розщеплення в одного з батьків	17	17
Сибси, якщо батьки здорові, але розщеплення мають двоє дітей	10	10

Треба пам'ятати, що люди з мікроознаками стоять ближче до "порогу" реалізації аномального фенотипу. Отже, вони мають більший ризик народження дитини з розщепленням, ніж інші представники популяції. Таким чином, звичайне стоматологічне обстеження може виявити групу ризику відносно оро-фаціальних розщелин, яку необхідно направити на медико-генетичне консультування.

2. Розв'язати задачу.

Пробанд – жінка з розщепленням піднебіння, була успішно прооперована, заміжня. Донька пробанда також має розщеплення піднебіння. Батьки і старший брат пробанда здорові. Брат пробанда одружений, дітей ще не має. Визначити: а) ризик повторного народження дитини з розщепленням піднебіння в сім'ї пробанда; б) народження хворої дитини у брата пробанда.

МЕТОДИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ ГЕНЕТИКИ

1. Виділення ДНК, її рестрикція. Електрофорез ДНК.
2. Синтез ДНК. Полімеразна ланцюгова реакція.
3. Гібридизація ДНК. Рекомбінантні ДНК. Клонування ДНК. Векторні системи.
4. Бібліотеки генів. Секвенування послідовностей ДНК. «Геном людини».
5. Виявлення генних мутацій. Генна терапія.

1. ВИДІЛЕННЯ ДНК, ЇЇ РЕСТРИКЦІЯ. ЕЛЕКТРОФОРЕЗ ДНК

Виділення ДНК

ДНК може бути виділена з будь-якого типу тканин і клітин, що містять ядра. З 1 г тканини або з 10^9 клітин отримують біля 2 мг ДНК. Етапи виділення: швидкий лізис клітин, видалення за допомогою центрифугування фрагментів клітинних органел і мембран, ферментативне руйнування білків і їх видалення з розчину, концентрування молекул ДНК в етанолі.

Для того, щоб ДНК вийшла у розчин, необхідно зруйнувати клітини та їх ядра. З тваринних клітин частину ДНК можна звільнити нагріванням, у рослинних клітин необхідно зруйнувати клітинну стінку.

У людини ДНК найчастіше виділяють зі слини або з лейкоцитів. Для руйнування клітин людини використовують лізисний буфер з детергентом SDS (лаурилсульфат натрію) – для слини або тіоціанатом гуанідину – для крові. Детергент руйнує мембрани, а буферний компонент розчину підтримує рН на оптимальному для ДНК рівні.

ДНК, яка знаходиться у розчині, необхідно звільнити від зв'язаних із нею білків. Одночасно з цим необхідно інактивувати ДНКазу – ферменти, які руйнують незахищену ДНК. Для руйнування клітинних білків до лізисного буферу вводять протеїназу К, фермент, отриманий з мікроскопічних грибів *Engyodontium album*.

Для проведення аналізу ДНК важливо очистити її від домішок, які пригнічують активність ферментів, необхідних для підготовки зразка. Найбільш поширені інгібітори в біологічних тканинах – гем у крові, колаген у кістках та сполучній тканині, меланін у волоссі та шкірі, міоглобін у м'язах. У слині аналізу заважають залишки їжі та консервант, який використовується для зберігання і перевезення зразка (містить SDS).

Для відділення ДНК від домішок використовують центрифугування розчину в пробірках з кремнієвою мембраною, яка зв'язується з ДНК і пропускає інші органічні речовини. Центрифугування багаторазово збільшує швидкість фільтрації через мембрану.

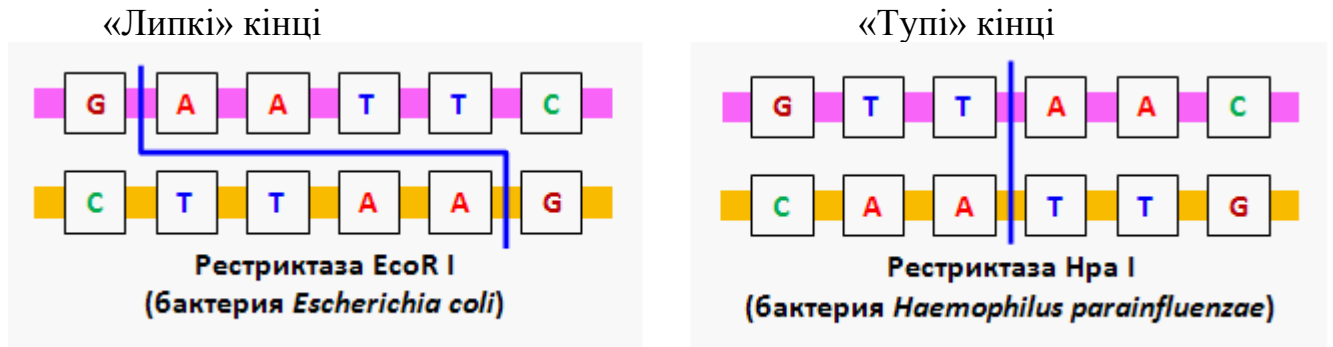
Після цього ДНК вимивають з мембрани буферним розчином. У такому розчині ДНК може зберігатись при -20°C протягом кількох років.

Рестрикція ДНК

Значно сприяло розвитку досліджень структури ДНК відкриття так званих рестриктаз (рестрикційних ендонуклеаз). Це бактеріальні ферменти,

які беруть участь у розпізнанні і знищенні чужорідної ДНК. Кожна рестриктаза впізнає специфічну послідовність нуклеотидів (4-6, рідше 8-12) в двонитковій ДНК і розрізає молекулу в цьому місці (воно називається сайт рестрикції). Відомо більше 500 рестриктаз, які називають трьома першими літерами з латинської назви бактерії та цифрою (номер за порядком відкриття).

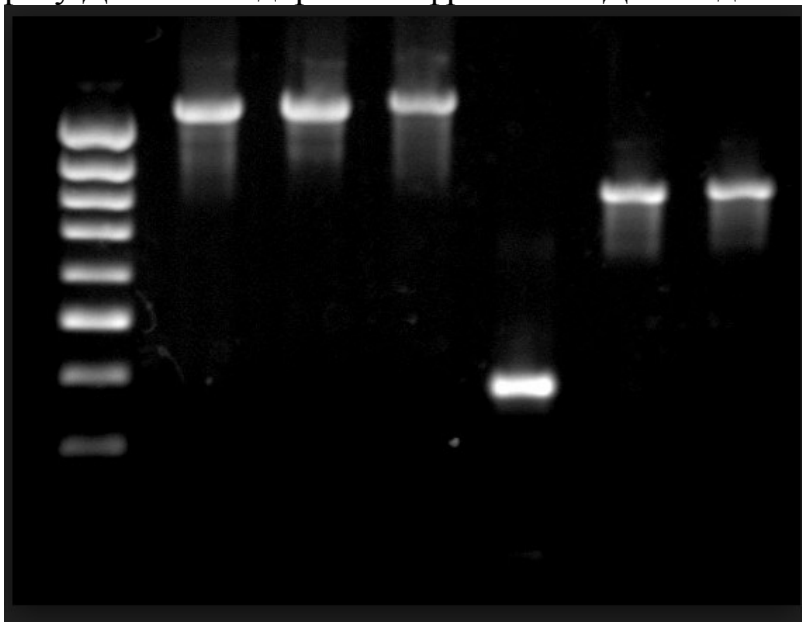
Розщеплення обох ниток ДНК рестриктазою може відбуватись двома шляхами – з утворенням дволанцюгових («тупих») або одностанцюгових («липких») кінців.



Дія кожної рестриктази на ДНК поділяє її на специфічний набір фрагментів. Ці фрагменти можна розподілити за довжиною шляхом електрофорезу. При використанні декількох рестриктаз з наступним електрофоретичним аналізом фрагментів ДНК можливе їх фізичне картування.

Електрофорез ДНК

Електрофорез ДНК – аналітичний метод, який застосовується для розділення фрагментів ДНК за довжиною. Він базується на тому, що фрагменти ДНК різної довжини (а отже, і маси) рухаються в спеціальному середовищі (найчастіше – агарозному гелі) під впливом електричного поля різної швидкості. Нижче наведено фотографію агарозного гелю після електрофорезу ДНК. Ліва доріжка – фрагменти ДНК відомої довжини.



2. СИНТЕЗ ДНК. ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ.

Синтез ДНК

Штучний синтез ДНК проводиться за участю ферментів ДНК-полімераз (є 3 різні форми). Для роботи ДНК-полімерази необхідні: одониткова матрична ДНК з двонитковою ділянкою на початку та суміш АТФ, ЦТФ, ГТФ, ТТФ. Хімічний синтез ДНК дозволяє на автоматичному синтезаторі отримувати одноланцюгові фрагменти ДНК із заданою послідовністю довжиною до 100 нуклеотидів.

Також можна синтезувати гени або їх фрагменти, використовуючи зворотні транскриптази – ферменти ретровірусів, які каталізують синтез ДНК на матриці мРНК (кДНК – комплементарна ДНК).

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) – метод ампліфікації, тобто отримання великої кількості копій певного гена або іншого фрагменту ДНК в умовах *in vitro*. *Див. рисунок на наступному аркуші.*

Реакційна суміш містить: досліджувану ДНК-матрицю, субстрати реакції (дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ), два праймери, Таq-полімераза (термостабільна ДНК-залежна-ДНК-полімераза бактерії *Thermus aquaticus*) і реакційний буфер, що містить іони Mg^{2+} в якості кофактора.

Праймери – це штучно синтезовані короткі одониткові ДНК (20-30 нуклеотидів), які виконують роль «затравок» при ферментативному синтезі ДНК. В ПЦР звичайно використовують два праймери, комплементарні 3'-кінцевим послідовностям ділянки, що ампліфікується, на обох нитках ДНК-матриці. Концентрація праймерів значно перевищує кількість ДНК-матриці у реакційній суміші. Відстань між праймерами визначає довжину фрагментів ДНК, які будуть синтезуватись в ході ПЛР.

Один цикл ПЛР складається з трьох етапів

- денатурація – вихідна суміш нагрівається до $94^{\circ}C$, при цьому руйнується дволанцюгова структура ДНК;
- відпал – температуру суміші знижують до $52-60^{\circ}C$, відбувається комплементарне зв'язування праймерів з нитками матриці ДНК;
- полімеризація – при температурі $72^{\circ}C$ Таq-полімераза каталізує подовження праймерів (з 3'-кінця) і синтез нових ланцюгів ДНК.

Тривалість кожного етапу циклу ПЛР визначається експериментально і звичайно становить 1-2 хвилини.

Ці етапи багаторазово повторюються в автоматичному приладі – ампліфікаторі (термоциклері), що дозволяє отримати величезну кількість копій певного фрагмента ДНК. Так, в результаті проведення 20 циклів ПЛР аналізована ділянка ДНК ампліфікується більш ніж у мільйон разів.

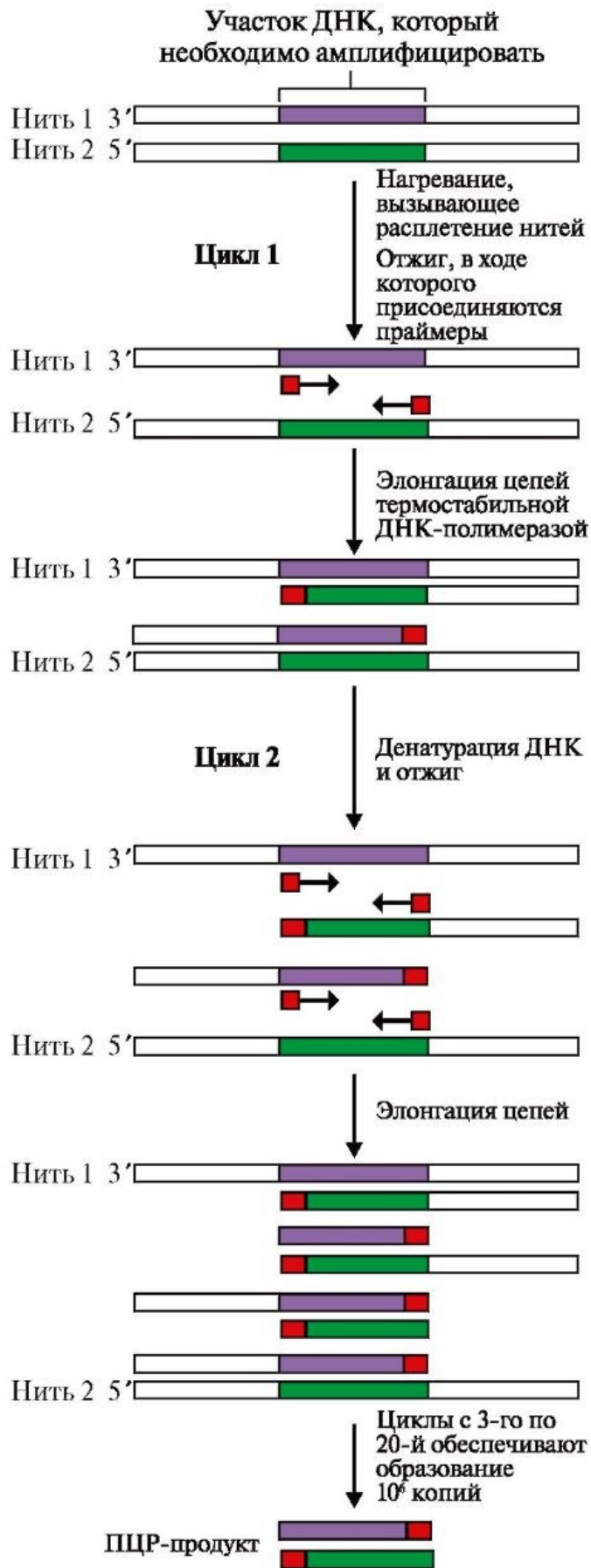


Схема полімеразної ланцюгової реакції.

3. ГІБРИДИЗАЦІЯ ДНК. РЕКОМБІНАНТНІ ДНК. КЛОНУВАННЯ ДНК. ВЕКТОРНІ СИСТЕМИ

Гібридизація ДНК.

Гібридизація ДНК – це з'єднання *in vitro* комплементарних одноланцюгових нуклеїнових кислот в одну молекулу. При повній комплементарності об'єднання відбувається швидко, а при частковій некомплементарності уповільнюється. Відповідно, за результатом гібридизації можна оцінити ступінь комплементарності двох зразків ДНК.

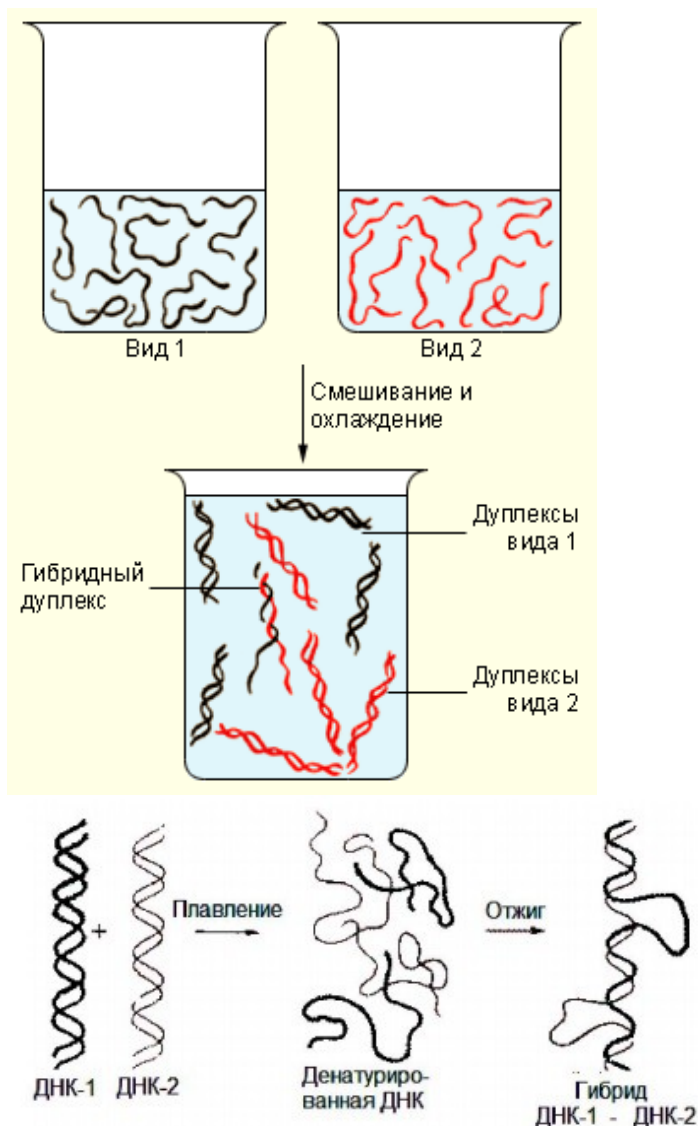


Рис. 1.6. Гібридизація між різними молекулами ДНК

Гібридизація досліджуваних молекул ДНК із ДНК-зондами, що містять радіоактивні мітки, дозволяє ідентифікувати відповідні фрагменти ДНК. ДНК-зондом може слугувати будь-яка одониткова ДНК обмеженого розміру, яка використовується для пошуку комплементарних послідовностей в молекулі більшого розміру або в суміші фрагментів ДНК. В якості зондів використовують штучно синтезовані олігонуклеотиди (звичайно не більше 30 нуклеотидів) або послідовності, виділені з геному.

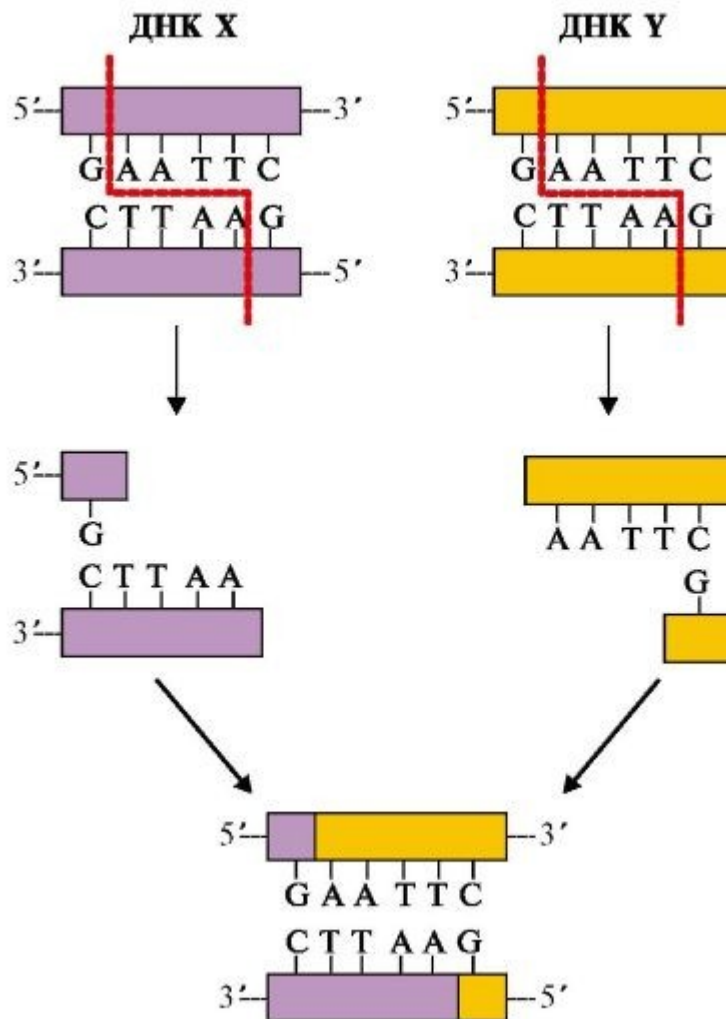
Гібридизувати можна ДНК, оброблену рестриктазами, або натуральну, в тому числі на гістологічних або хромосомних препаратах. Після гібридизації методом авторадіографії визначають положення радіоактивних ділянок.

В залежності від конкретної методики можна впізнавати ділянки розміром в десятки – тисячі п.о. (навіть 20 п.о.). На гістологічних препаратах – не менше 50 тис.п.о.

При вивченні ДНК у складі хромосом також застосовують мічення флюорохромами, що чітко проявляються на мікроскопічних препаратах після відповідної обробки.

Рекомбінантні ДНК

Утворені за допомогою рестриктаз фрагменти ДНК, що мають «липкий» кінець, можуть за принципом комплементарності взаємодіяти з «липким» кінцем іншого фрагмента ДНК, який може належати бактеріофагу, вірусу, бактерії і був отриманий під впливом тієї ж рестриктази. Фрагменти ковалентно з'єднуються за допомогою ДНК-лігази, таким чином утворюються рекомбінантні (або гібридні) ДНК.



Утворення рекомбінантної молекули з двох молекул ДНК, отриманих з різних джерел.

Механізм утворення рекомбінантних ДНК надає можливість:

- здійснювати клонування фрагментів ДНК в культурах бактерій;
- використовувати мікроорганізми в якості продуцентів необхідних для людини речовин: білкових гормонів (інсулін, гормон росту, соматостатин), біологічно активних пептидів, вакцин (наприклад, проти гепатиту С), факторів, що беруть участь у зсіданні крові (фактор VIII для лікування гемофілії).

Клонування ДНК. Векторні системи

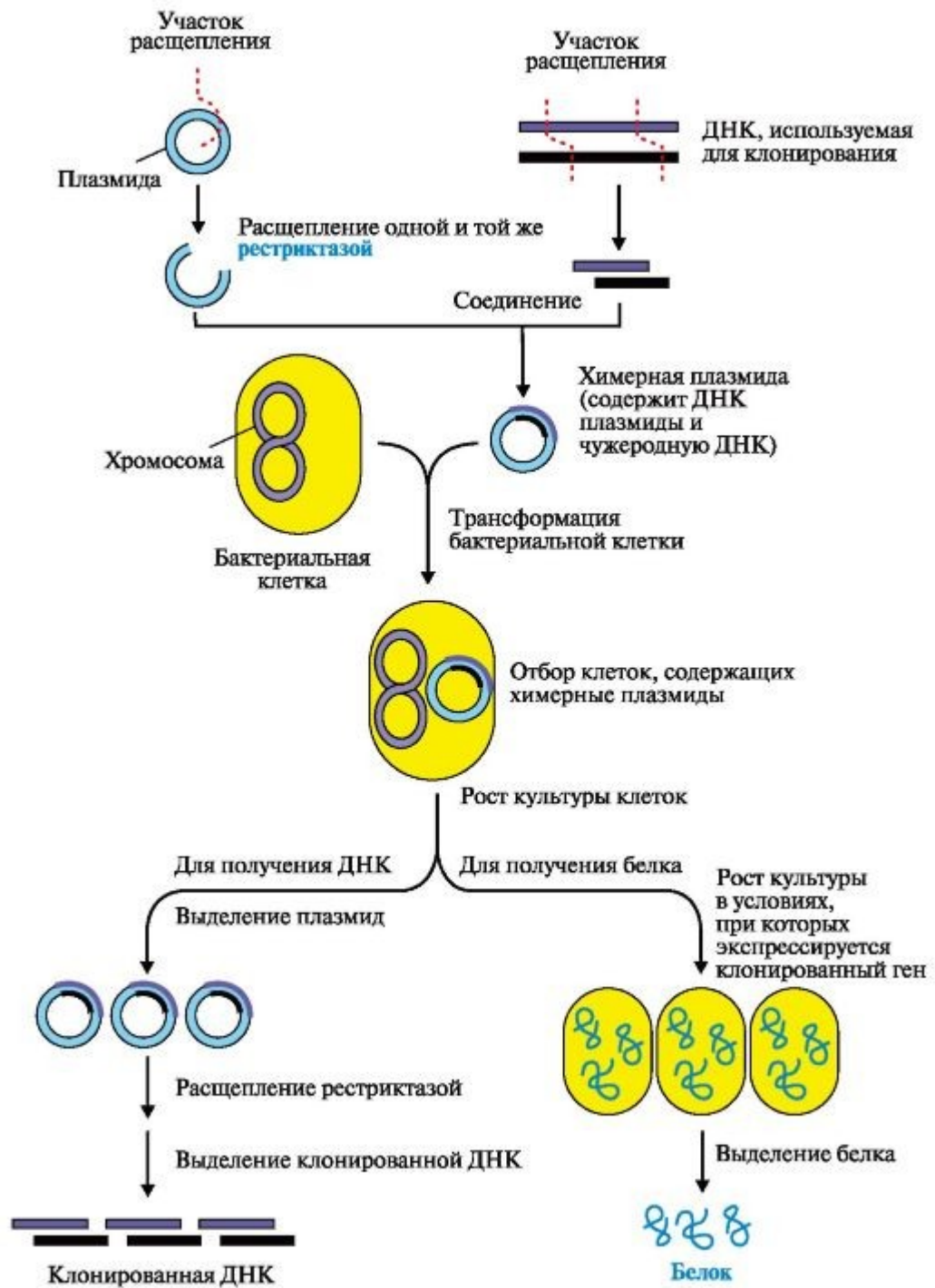
Клонування ДНК – це процес отримання багатьох копій певної послідовності ДНК *in vitro*. Для клонування використовують реплікаційні можливості одноклітинних організмів.

Клонування передбачає вбудовування чужорідної ДНК у так званий вектор, що забезпечує її проникнення в клітину-хазяїна. В якості векторів використовують плазміди, фаги, ретровіруси та інші генетичні конструкції. Об'єм ДНК, який може бути внесений в клітину, залежить від природи вектора. Так, косміди (об'єднують властивості фага та плазміди) можуть нести до 40-45 тис.п.о. Штучні хромосоми дріжджів – до сотень тисяч-мільйонів п.о.

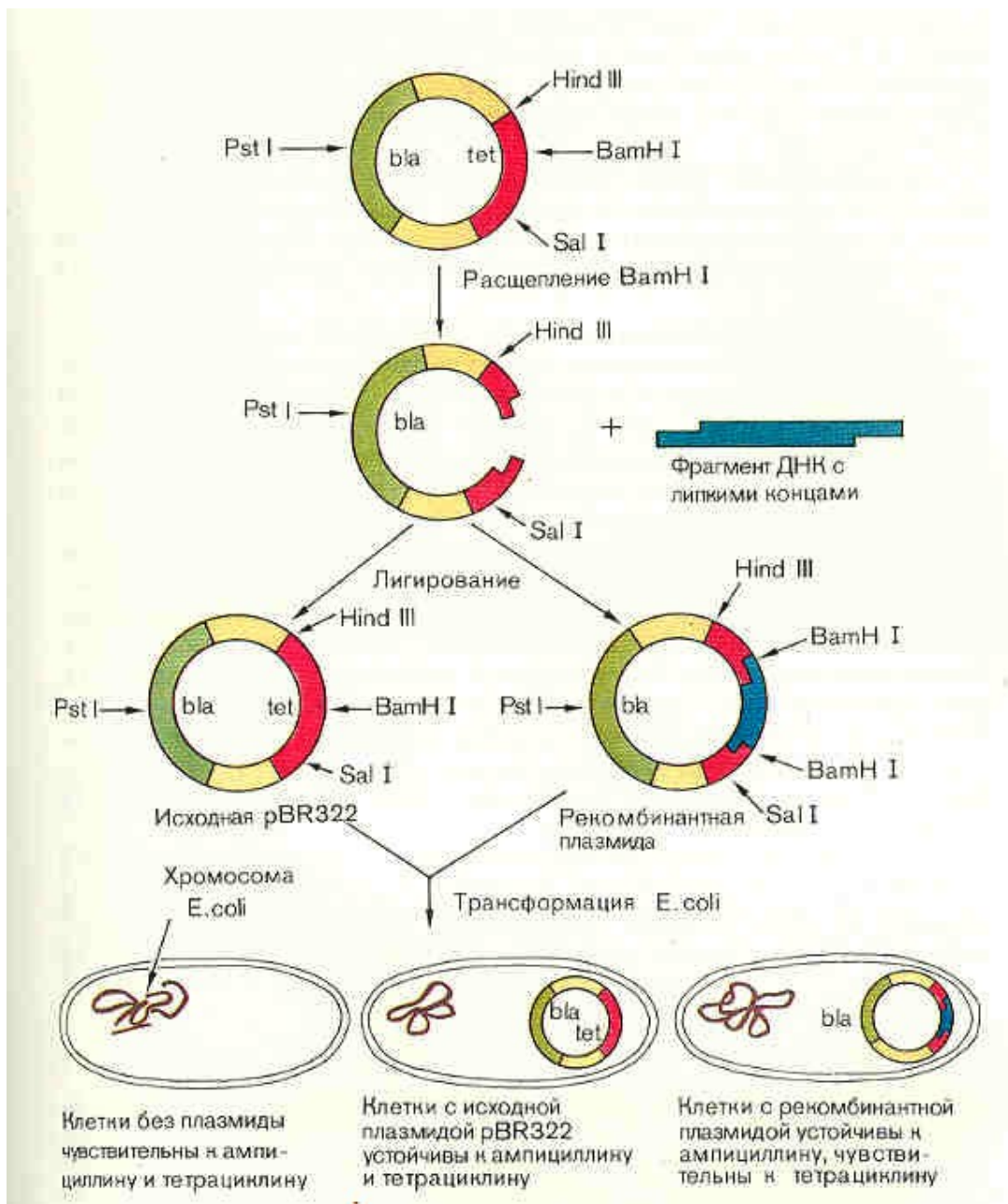
Внесення плазмід в бактеріальні клітини – трансформація, перенос за допомогою фага – трансдукція, введення ДНК в еукаріотичні клітини – трансфекція.

Для внесення векторів необхідне створення спеціальних умов (підвищення проникнення мембран – хімічне або електропорація).

Для відбору успішно трансформованих клітин використовують різні методи: селективні середовища (у векторі є ген стійкості до антибіотика), аналіз ДНК, виявлення генних продуктів.



Клонування ДНК у бактеріальній клітині.



4. БІБЛІОТЕКИ ГЕНІВ. СЕКВЕНУВАННЯ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ДНК. «ГЕНОМ ЛЮДИНИ»

Бібліотеки генів

Бібліотека генів – це повний набір клонуваних і таких, що перекриваються, фрагментів ДНК, отриманих в результаті рестрикції або механічного розрізання тотальної ДНК, виділеної з певного специфічного джерела.

Геномні бібліотеки – з ДНК, виділеної з тканин, клітинних культур, окремих хромосом або їх фрагментів.

Тканиноспецифічні (бібліотеки кДНК) – на основі тотальної мРНК з тканин або культури клітин.

Геномні бібліотеки містять не тільки кодуючі послідовності генів, але й інтрони, повторювані ділянки та ін. Для ссавців геномні бібліотеки містять

близько мільйона різних клонів. Найчастіше бібліотеки конструюють на основі фагів, космід або штучних хромосом дріжджів. (У людини загальна довжина гаплоїдного набору $3,5 \times 10^9$ п.о.).

Для пошуку в бібліотеці тих клонів, що містять необхідні гени, проводять скринінг за допомогою ДНК-зондів.

Секвенування послідовностей ДНК

Існують декілька методів визначення нуклеотидної послідовності ДНК. Один з них – метод Сенгера – полягає в наступному. Отримують одониткові молекули ДНК. Потім додають праймер (штучний олігонуклеотид, комплементарний відомій ділянці ДНК), ДНК-полімеразу, АТФ, ГТФ, ЦТФ, ТТФ (один з них радіоактивний), а також один з термінаторів (дідезоксинуклеотидфосфатів, вбудовування яких зупиняє синтез ДНК) – всього 4 пробірки. По завершенню синтезу ДНК денатурують на фрагменти, визначають їх довжину за допомогою електрофоретичного розділення і відповідно встановлюють положення кінцевого зміненого нуклеотиду в загальній молекулі (див. *рисунок на наступному аркуші*). Аналіз отриманих даних здійснюють спеціальні комп'ютерні програми.

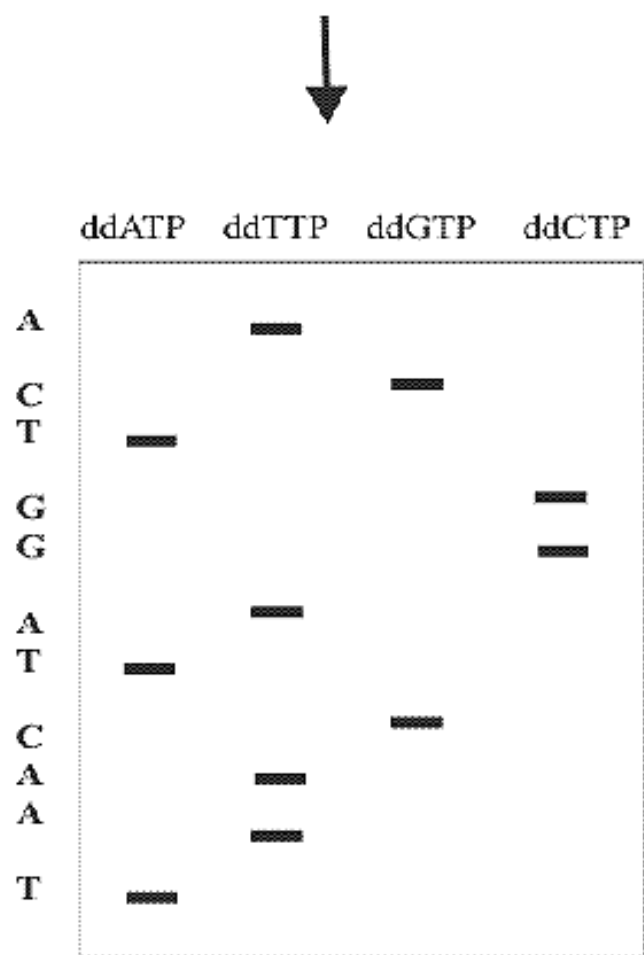
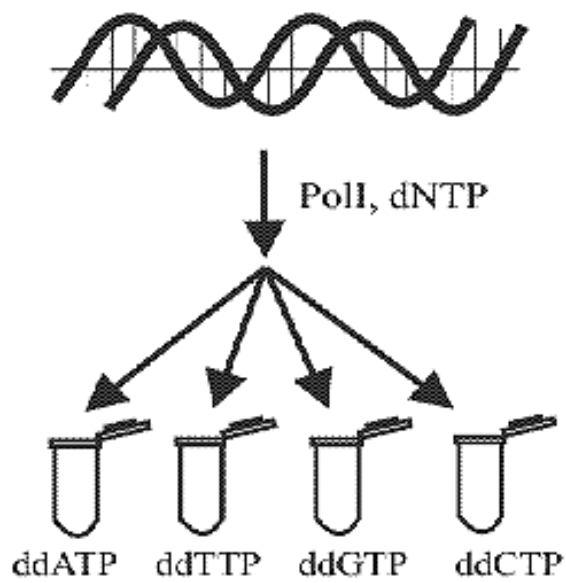
Автоматичне секвенування може проводитись, якщо дідезоксинуклеотиди мічені флюорохромами різних кольорів.

Так, за один тиждень роботи на 30 автоматичних секвенаторах фірми Applied Biosystems в 1994 р. можна було проаналізувати до 1 млн.п.о.

В подальшому технологія секвенування була вдосконалена за рахунок забезпечення можливості паралельного «читання» кількох ділянок геному. Секвенатори нового покоління стали набагато дешевшими і значно перевищують своїх попередників за ефективністю. Продуктивність деяких секвенаторів вимірюється вже сотнями мільярдів пар основ, що дозволяє сканувати індивідуальний геном людини всього за кілька днів.

Загальна схема роботи всіх секвенаторів спільна і передбачає такі етапи:

1. Створення бібліотеки випадкових послідовностей ДНК.
2. Ампліфікація фрагментів (ПЛР) з використанням мічених нуклеотидів.
3. Визначення первинної структури всіх фрагментів.



5' TAAGTCA 3'

«Геном людини»

Проект «Геном людини» – міжнародний науково-дослідний проект, метою якого є визначення послідовності нуклеотидів у ДНК людини та ідентифікація всіх генів. Проект було розпочато у 1990 р. під керівництвом Дж. Уотсона. У 2000 р. було підготовлено робочу чернетку структури геному, повний геном – у 2003 р., але ще зараз триває додатковий аналіз окремих ділянок (центромерних ділянок, теломер, які містять повторювані послідовності нуклеотидів, а також деяких мультигенних сімейств).

5. ВИЯВЛЕННЯ ГЕННИХ МУТАЦІЙ. ГЕННА ТЕРАПІЯ.

Виявлення генних мутацій

1. За поліморфізмом довжини рестрикційних фрагментів.

Заміни, делеції і вставки нуклеотидів викликають зміни у первинній структурі ДНК, а отже – і в розташуванні сайтів рестрикції. Після обробки рестриктазами ДНК, що зазнала мутації, утворюються фрагменти інших розмірів, чим у випадку аналізу нормальної ДНК. Цим користуються при обстеженні пацієнтів на носійство патологічних генів.

2. Визначення мутацій за допомогою алель-специфічних проб.

Синтезуються два коротких фрагменти ДНК, мічених ізотопом P^{32} , один з яких містить певну мутацію, а інший – ні. Ділянку ДНК пацієнта, що містить досліджуваний ген, ампліфікують за допомогою ПЛР. Отримані зразки обробляють міченими фрагментами. За допомогою радіоавтографії визначають, з якою з проб (з нормальною або мутантною послідовністю) переважно зв'язується ДНК пацієнта.

Генна терапія

Генна терапія – це лікування шляхом введення у тканини або клітини пацієнта смислових послідовностей ДНК.

На перших етапах генна терапія розглядалась як можливість виправлення дефекту в гені. Вважалось, що основним об'єктом такого лікування будуть моногенні спадкові хвороби, причому теоретично виявлялась ймовірною корекція генного дефекту як на соматичному рівні, так і на рівні зародкових (статевих) клітин.

Численні експерименти зі створення трансгенних тварин, які розпочались після 1980 р., а також дослідження на культурах клітин внесли істотні корективи в ці теоретичні уявлення. По-перше, виявилось набагато простіше не виправляти дефект у гені, а вводити в організм пацієнта кДНК повноцінного гена. По-друге, дослідження з генної терапії людини проводяться тільки на соматичних тканинах, в яких в нормі «працює» дефектний ген, а не на рівні статевих і зародкових клітин (виходячи з можливих серйозних наслідків для генофонду людства). По-третє, метод генної терапії виявився придатним для лікування не тільки моногенних спадкових захворювань, а й таких широко розповсюджених хвороб, як злоякісні пухлини, деякі тяжкі вірусні інфекції (в т. ч. СНІД), серцево-судинні та інші.

Виходячи з цього, генну терапію на сучасному етапі можна визначити як лікування спадкових, онкологічних, деяких вірусних та інших хвороб шляхом введення генів в клітини пацієнтів з метою спрямованої корекції генних дефектів або надання клітинам нових функцій.

Першою моногенною хворобою, до якої було застосовано метод генної терапії, був спадковий імунодефіцит внаслідок мутації гену аденозиндезамінази. 14 вересня 1990 р. в м. Бетезд (США) 4-річній дівчинці були пересаджені її власні лімфоцити, трансформовані відповідним ретровірусним вектором (ген АДА + ген нео + вектор). Лікувальний ефект спостерігався протягом кількох місяців, після чого процедура повторювалась. За 3 роки було проведено 23 введення лімфоцитів без негативного ефекту. В результаті пацієнтка могла вести нормальний спосіб життя, не боятися випадкових інфекцій.

Клінічні випробування методу генної терапії розпочаті для сімейної гіперхолестеринемії – у 1992 р., гемофілії В – у 1992 р., муковісцидозу – у 1993 р., хвороби Гоше – 1993 р. У 1995 р. таких проектів було вже біля 100, більшість з них (86) стосувались лікування онкологічних хвороб і СНІДу.

Стратегії генної терапії можна розділити на три великих блоки:

1. Якщо клітини втратили функцію певного гену, необхідно ввести в них цей ген.

2. Якщо хвороба викликається надлишковою функцією, не властивою нормальній клітині (наприклад, при злоякісній трансформації), треба цю функцію пригнітити.

3. Коли необхідно посилити імунну відповідь організму, вводять нову генетичну інформацію або в клітини, проти яких хочуть збільшити імунну відповідь, або в клітини імунної системи.

В той же час, слід пам'ятати, що введення в організм людини послідовностей ДНК, які не перебувають під контролем відповідних регуляторних елементів, може привести до непередбачуваних змін метаболічних процесів. Сучасних знань про структуру геному та його взаємодію з екзогенною ДНК може виявитись недостатньо для прогнозування можливих небажаних або неконтрольованих наслідків. Тому при розробці методів генної терапії принципове значення мають питання їх безпечності для самого пацієнта і популяції в цілому.