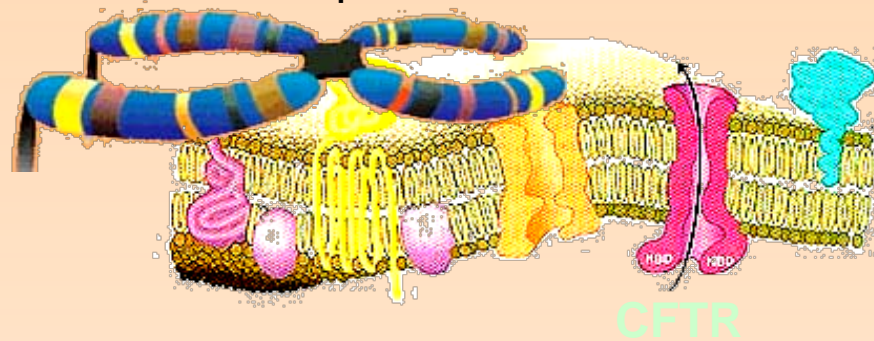


7q 21-24



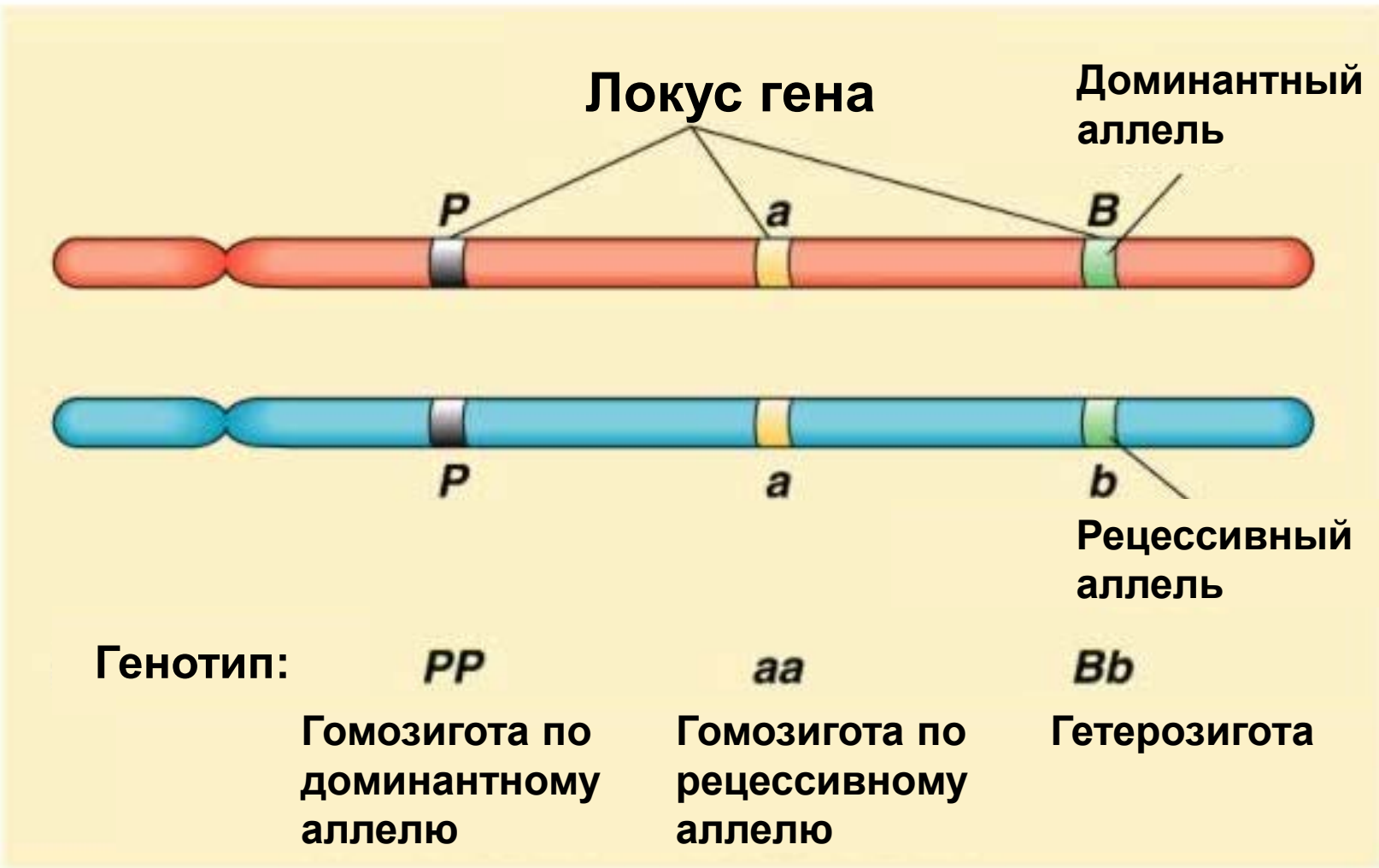
# ЛИКБЕЗ ПО ВОПРОСАМ ГЕНЕТИКИ, СОВРЕМЕННАЯ ФОРМУЛИРОВКА ТЕРМИНОВ, КАСАЮЩИХСЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ

ФГБНУ «НИИ медицинской  
генетики»

профессор Назаренко Л.П

# СЛОВАРЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТЕРМИНОВ

- ▶ Локус - специфическое расположение определенного гена на хромосоме
- ▶ Аллель - альтернативные формы гена
- ▶ Генотип - аллельная или генетическая конституция индивида



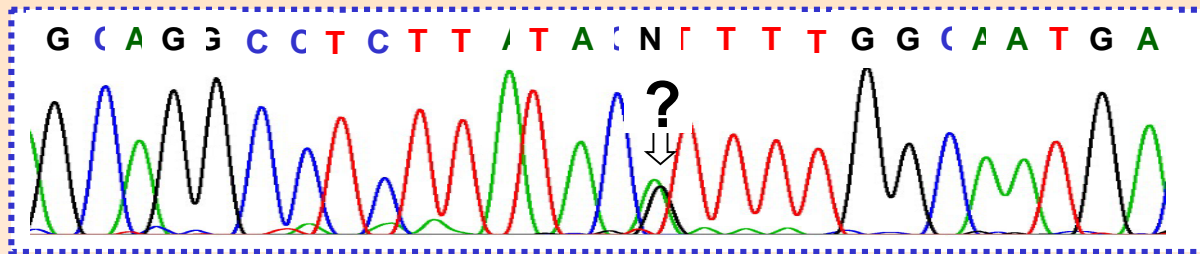
# СЛОВАРЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТЕРМИНОВ

## Мутации

- ненаправленные
- случайные изменения генетического материала,
- происходящие спонтанно или под влиянием факторов различной природы

## Полиморфизм

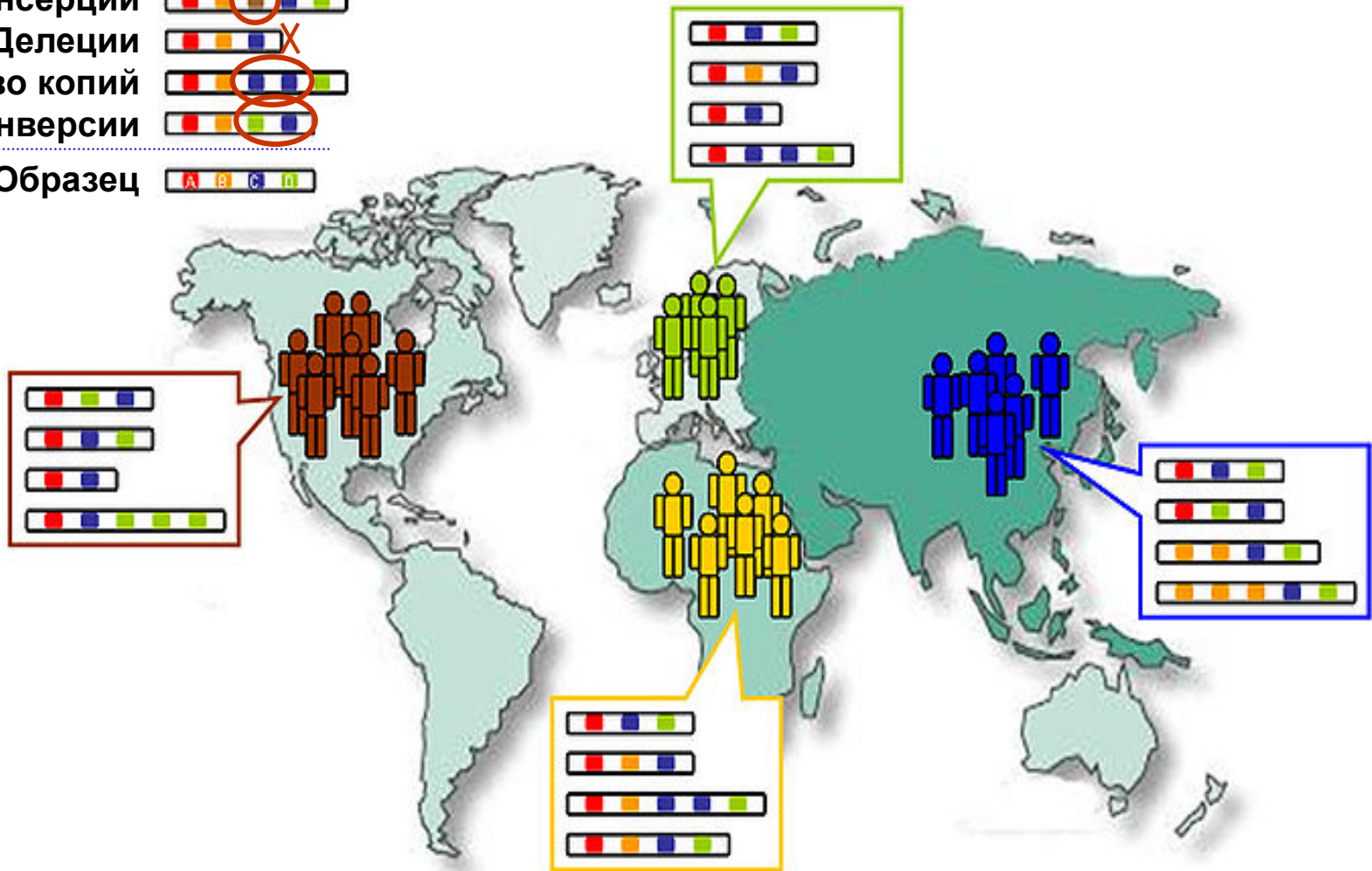
- поддержание в популяции нескольких аллельных форм гена



Характеристика	Точечная мутация	Однонуклеотидный полиморфизм (SNP)
Частота «редкого» аллеля в популяции	Низкая (<1%)	Высокая (>1%)
Функциональные последствия	<ul style="list-style-type: none"> <li>• «нейтральные» (нет изменений в метаболических или фенотипических характеристиках)</li> <li>• «функциональные», связанные с нарушением свойств продукта гена или нарушением регуляции гена</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• « - »</li> </ul>

# СЛОВАРЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТЕРМИНОВ

- Изменения в количестве и последовательности генов (A-D) представляют генетическое разнообразие внутри и между популяциями:

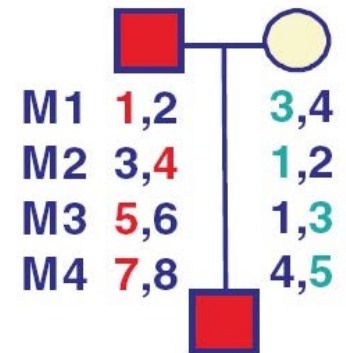


# СЛОВАРЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТЕРМИНОВ

- **Маркер** — ген или участок ДНК с известной локализацией на хромосоме и определенным фенотипом, проявляющимся как свойства организма или самой молекулы ДНК. Например, часто используются короткие тандемные повторы (STRs) или однонуклеотидные полиморфизмы (SNPs).
- **Гаплотип** — набор тесно сцепленных генетических маркеров, расположенных на одной хромосоме и наследуемых вместе.



Формирование гаплотипа из 4 маркеров



GATATTTCGTACGGATT  
GATGTTTCGTACTGAAT  
GATATTTCGTACGGATT  
GATATTTCGTACGGAAAT  
GATGTTTCGTACTGAAT  
GATGTTTCGTACTGAAT



AGT  
GTA  
AGA

SNPs

A/G

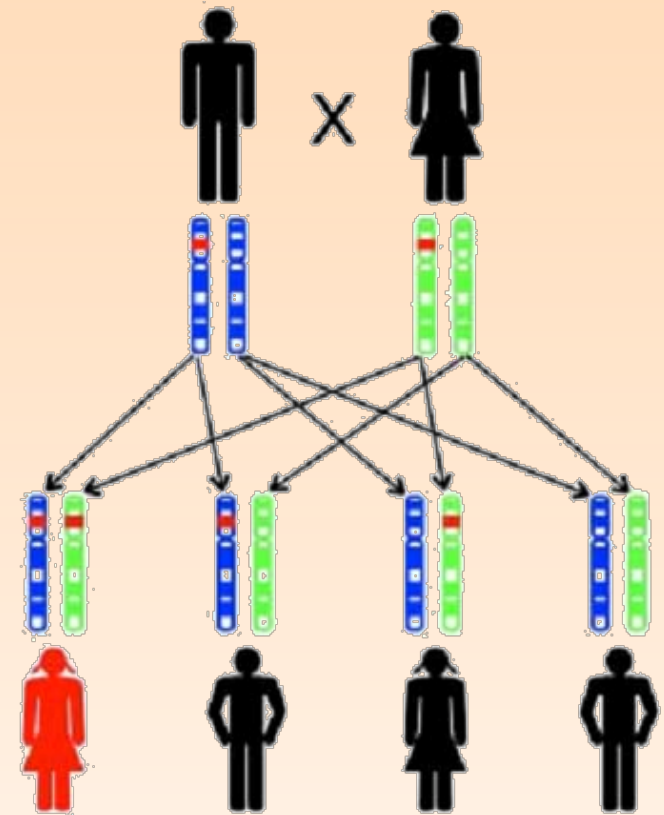
Гаплотипы

M1 1,3  
M2 4,1  
M3 5,3  
M4 7,5

# Муковисцидоз (Cystic fibrosis)

Тяжелое, прогрессирующее, мультиорганное наследственное заболевание:

- тип наследования - аутосомно-рецессивный;
- мутация единичного гена на длинном плече хромосомы 7 область q 21-24;
- нарушение функции каналов ионов хлора;
- поражение системы бронхов, желудочно-кишечного тракта и репродуктивной системы



Проявление моногенного заболевания на 100% связано с мутациями в одном гене. Риск болезни в семьях с этой мутацией одинаков.

# Муковисцидоз – мутация (ген *CFTR*)

Ген содержит

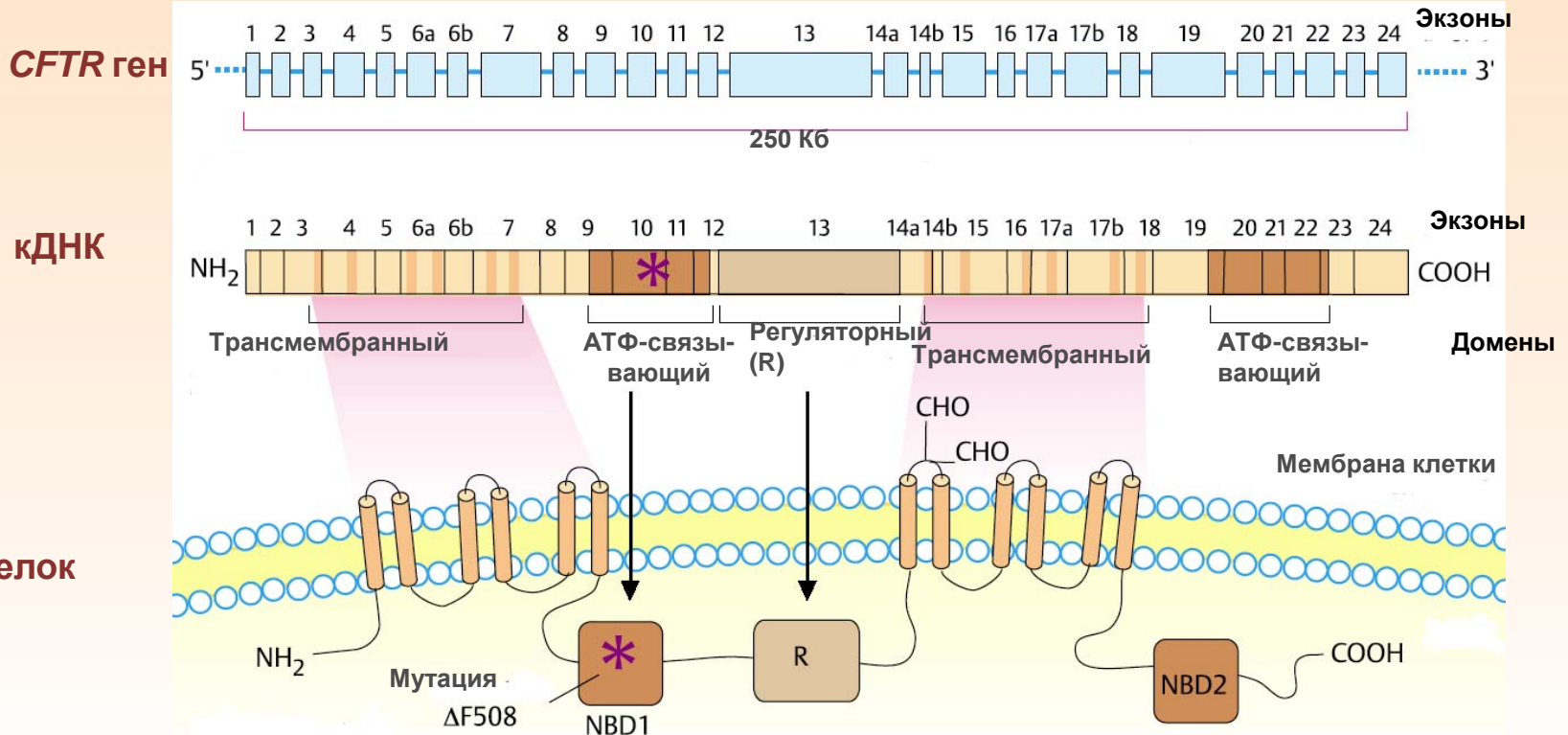
27 экзонов, включает  
250.000 пар оснований  
нуклеотидов



Белковый продукт гена

трансмембранный регуляторный  
белок муковисцидоза (*CFTR*)

белковая цепь состоит из 1480  
аминокислот



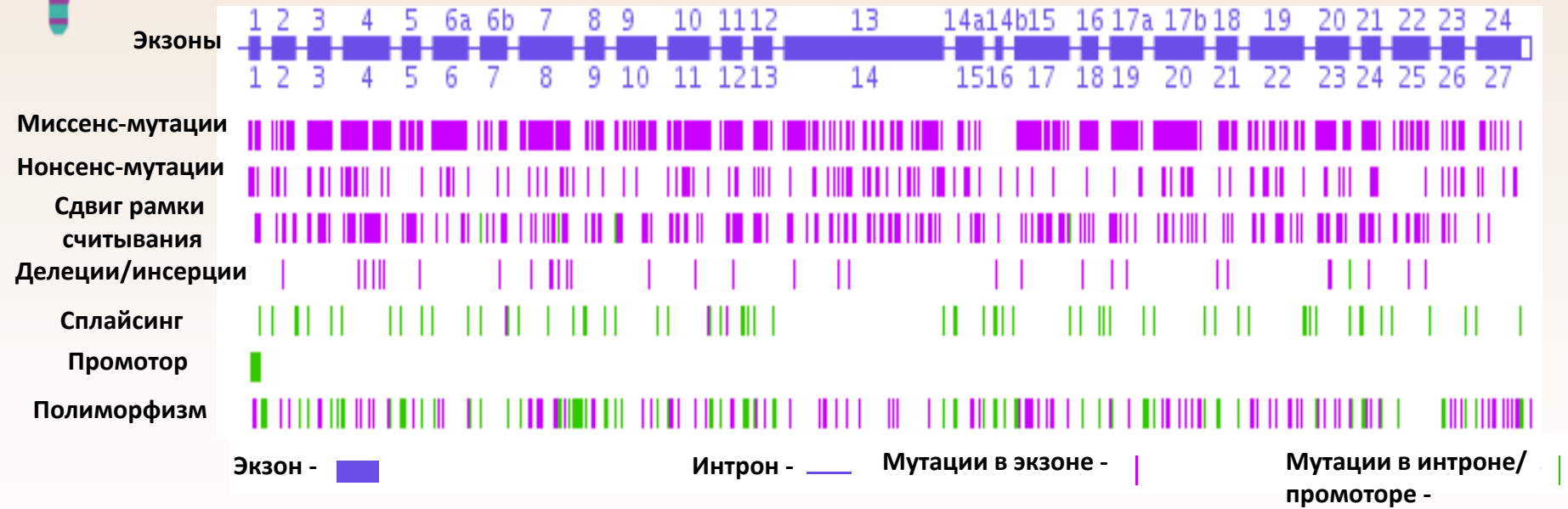
# Спектр мутаций в гене *CFTR*



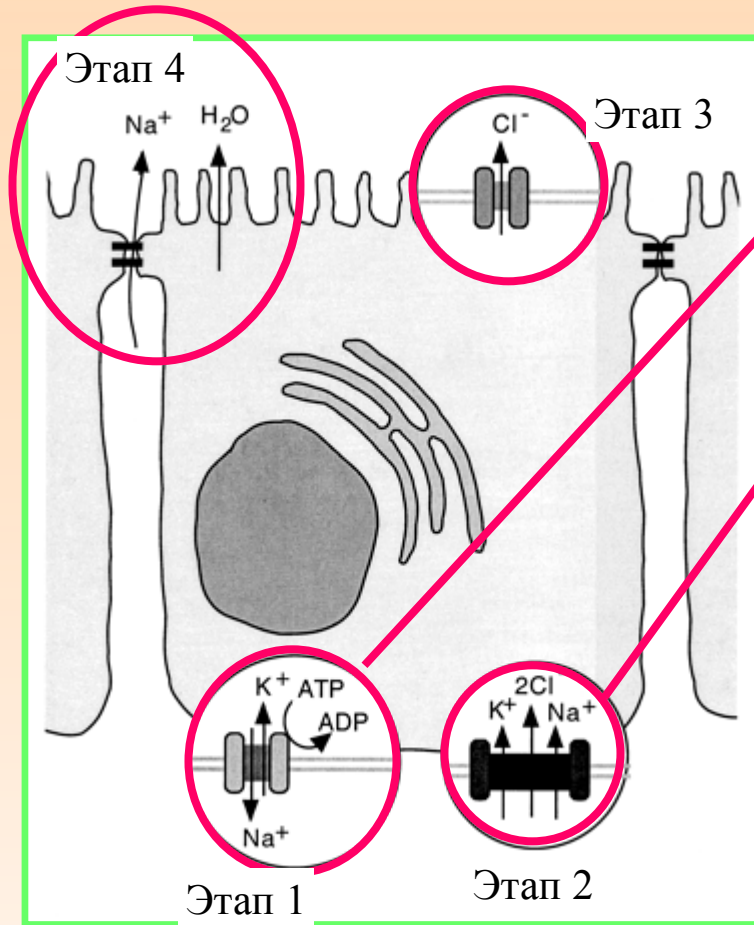
CFTR  
7q31.2



Всего идентифицировано 1910 мутаций



# Схема транспорта жидкости и электролитов в эпителиальных клетках



- **Этап 1** Na<sup>+</sup> активно выходит из клетки с использованием АТФ.
- **Этап 2** Na<sup>+</sup> (K<sup>+</sup> / Cl<sup>-</sup>) путем диффузии проходят в клетку.
- **Этап 3** Когда происходит секреция, канал для Cl<sup>-</sup> открыт, давая ионам выйти из клетки.
- **Этап 4** Na<sup>+</sup> и H<sub>2</sub>O следуют за Cl<sup>-</sup>.

Таким образом, обязательным этапом секреции жидкости является прохождение Cl<sup>-</sup> через регуляторные каналы

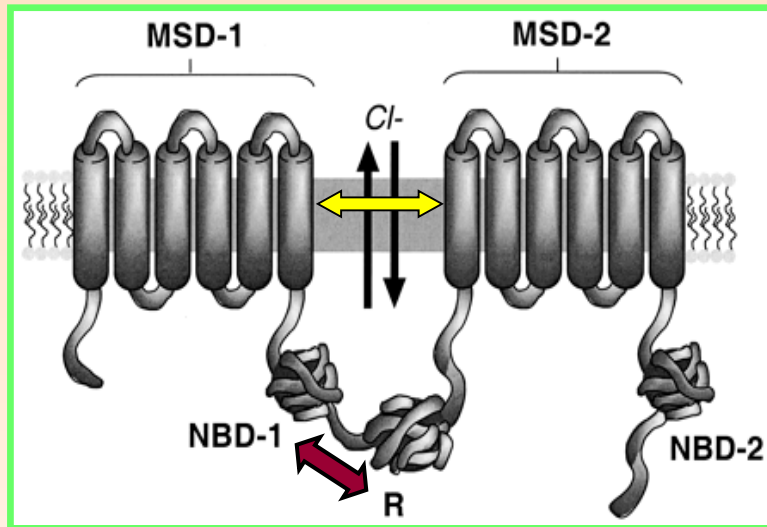
**В нормальных потовых железах**, ионы хлора обратно реабсорбируются из пота, и **нормальный** трансмембранный регуляторный **белок** в этом случае обеспечивает **«гипотонию пота»**.

**При муковисцидозе**, абсорбция ионов хлора зависит от патологически измененного белка и **концентрация Cl<sup>-</sup>** в поте высокая.

# Функционирование CFTR, как ионного канала хлора

Трансмембранный регуляторный белок муковисцидоза

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)



MSD = мембранный комплекс

NBD = АТФ-связывающий (энергетический) комплекс (АТФ)

R = регуляторный комплекс

- **NBD-1**: связывает 1 молекулу АТФ и открывает канал для ионов хлора.
- **NBD-2**: связывает 1 молекулу АТФ и закрывает канал для ионов хлора.
- Когда R-комплекс находится в нефосфорилированном состоянии, он связывается с NBD-1 и блокирует присоединение АТФ (канал закрыт).
- Когда R-комплекс фосфорилирован, он облегчает связывание АТФ с NBD-1 (канал открыт).

# Классификация муковисцидоза



Класс

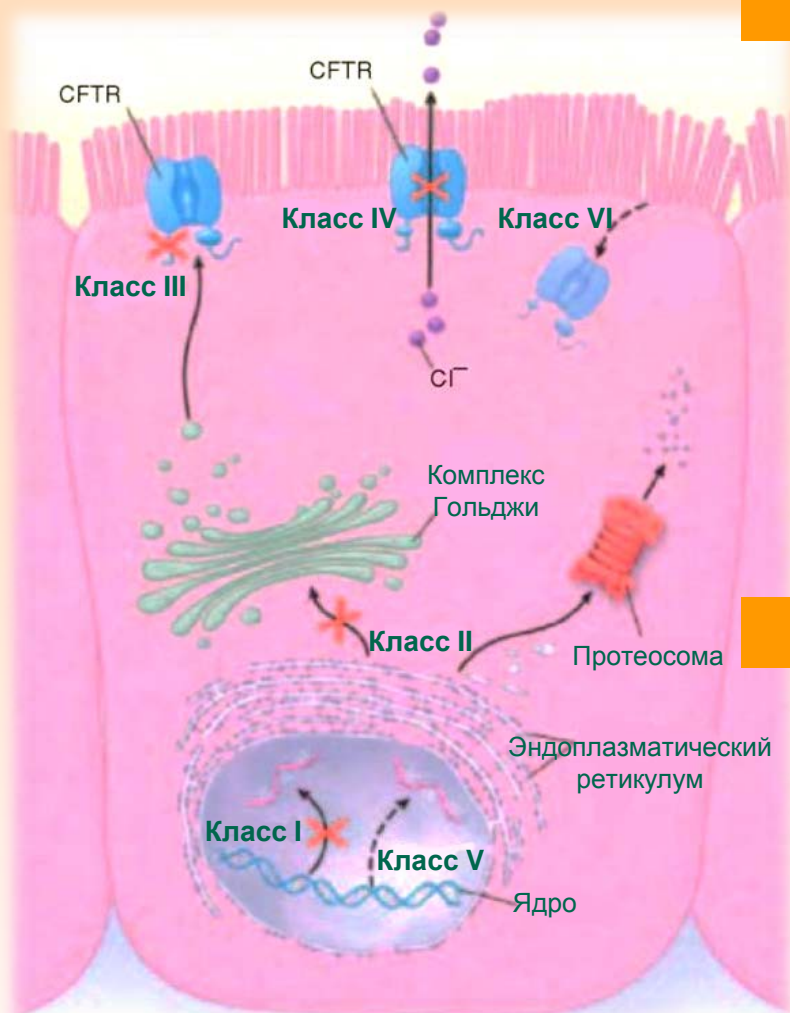
Результат мутации

## Классический (типичный) «тяжелые мутации»

- I CFTR не синтезируется (G542X, W1282X, R553X, 621+1C-T, 2143delT, 1677delTA)
- II CFTR синтезируется, но в аномальной форме, что препятствует его освобождению из эндоплазматического ретикулума (F508del, N1303K, I507del, S549I, S549R)
- III CFTR синтезирует и транспортируется в клетку, но нарушается его активация и регуляция на клеточной мембране (G551D, G1244E, S1255P)

## Неклассический (атипичный) «легкие мутации»

- IV CFTR синтезируется и экспрессируется на клеточной мембране, но проводимость ионов хлора в снижена (R334W, R347P, R117H)
- V Нарушен синтез или посттрансляционная модификация CFTR (3849+10kbC-T, A455E, IVS8(5T), 1811+1,6kbA-G)
- VI Нарушение стабильности CFTR (Q1412X, 4326delTC, 4279insA, 4271delC, S1455X)



# Генотип-фенотип корреляции при муковисцидозе

Генотип		Вариабельность фенотипа
Первый аллель	Второй аллель (или гомозигота)	
▲	▲	Классический >> неклассический
◆	или	Неклассический > классический
R117H / 5T	◆ или ▲	Неклассический > классический
R117H / 7T	◆ или ▲	Бессимптомный (женщины) или обструктивная азооспермия (мужчины) > неклассический
5T/TG13 или TG12	◆ или ▲	Обструктивная азооспермия (мужчины) или неклассический >> бессимптомное носительство
5T / TG11	◆ или ▲	Бессимптомное носительство > обструктивная азооспермия (мужчины) или неклассический
7T или 9T	◆ или ▲	Бессимптомное
7T или 9T	◆ 7T или 9T ▲	Бессимптомное

▲ Мутации I-III класса, например  $\Delta F508$     ◆ Мутации IV-VI класса

В дополнение к мутациям внутри самого гена *CFTR*, полиморфизм в других генах может также изменить тяжесть заболевания. Например, генетические вариации в гене, кодирующий трансформирующий фактор роста (TGF $\beta$  1) были связаны с более тяжелым легочным фенотипом. Полиморфизм в гистона-деацетилаз-зависимой транскрипции совместного регулятора, IFRD1, показано, что патогенез болезни легких при МВ модулирует с регулированием метаболической и фагоцитарной активностью полиморфно-ядерных нейтрофилов.

# Основные факторы, определяющие влияние мутаций на фенотип

Фактор	Влияние
<b>Тип мутации</b>	<p>Мутации, которые приводят к нарушению синтеза или образованию измененного, нестабильного и нефункционального CFTR, связаны с более тяжелыми фенотипическими проявлениями.</p> <p>Влияние мутаций, которые вызывают минимальные нарушения CFTR, варьирует от «мягкого» до «тяжелого», т.к. зависит от других факторов.</p>
<b>Молекулярный механизм (класс мутации)</b>	<p>Непосредственное влияние мутаций на синтез, посттрансляционные модификации, транспортировку к мембране, стабильность и функционирование CFTR.</p>
<b>Позиция в гене (белке)</b>	<p>Изменения в структурно (функционально) критичных или консервативных регионах белка приводят к «тяжелым» фенотипическим проявлениям.</p>
<b>Общий молекулярный эффект</b>	<p>На апикальной мембране секреторных эпителиальных клеток имеется остаточное количество функционального CFTR. В связи с этим, продукция даже малого количества функционального белка (IV-VI классы мутаций) может быть достаточным для предотвращения тяжелого течения заболевания.</p>

# Основные факторы, определяющие влияние мутаций на фенотип

Фактор	Влияние
Внутригенные модуляторы (комплексные аллели)	Полиморфные варианты могут модулировать фенотипическое проявление мутаций. Например, сочетание мутации R117H и варианта 5T приводит к заболеванию с сохранной функцией поджелудочной железы и обструктивной азооспермией (мужчины), а сочетание мутации R117H и варианта 7T связано с бессимптомным фенотипом (женщины).
Влияние второй мутации	«Тяжелая» мутация на одном аллеле, ассоциирована с экзокринной недостаточностью поджелудочной железы, только если вторая мутация на другом аллеле тоже «тяжелая». Одна «мягкая» мутация достаточна для сохранения функции поджелудочной железы, вне зависимости от мутации на другом аллеле.
Место экспрессии мутации/ патофизиология органа/ вторичное модулирование	Генотип <i>CFTR</i> тесно коррелирует с тяжестью нарушения экзокринной функции поджелудочной железы. Первичный эффект определенного генотипа существенно модулируется вторичными генетическими и средовыми факторами в отношении развития хронической обструктивной болезни легких.

# Спектр фенотипов, ассоциированных с мутациями в гене *CFTR*

## Муковисцидоз

## Синдром муковисцидоза

Недостаточность экзокринной функции поджелудочной железы

Сохранная функция поджелудочной железы

Атипичное проявление муковисцидоза

Модификатор астмы ?

Моносимптомное заболевание

фенотип

тяжесть

Заболевания нет

CFTR генотип

wt wt	wt другой	Поливариантный гаплотип ? другой	«очень мягкий» другой	«мягкий» другой	«мягкий» «мягкий»	«мягкий» «тяжелый»	«тяжелый» «тяжелый»
----------	--------------	-------------------------------------	--------------------------	--------------------	----------------------	-----------------------	------------------------

# Основные клинические проявления заболевания



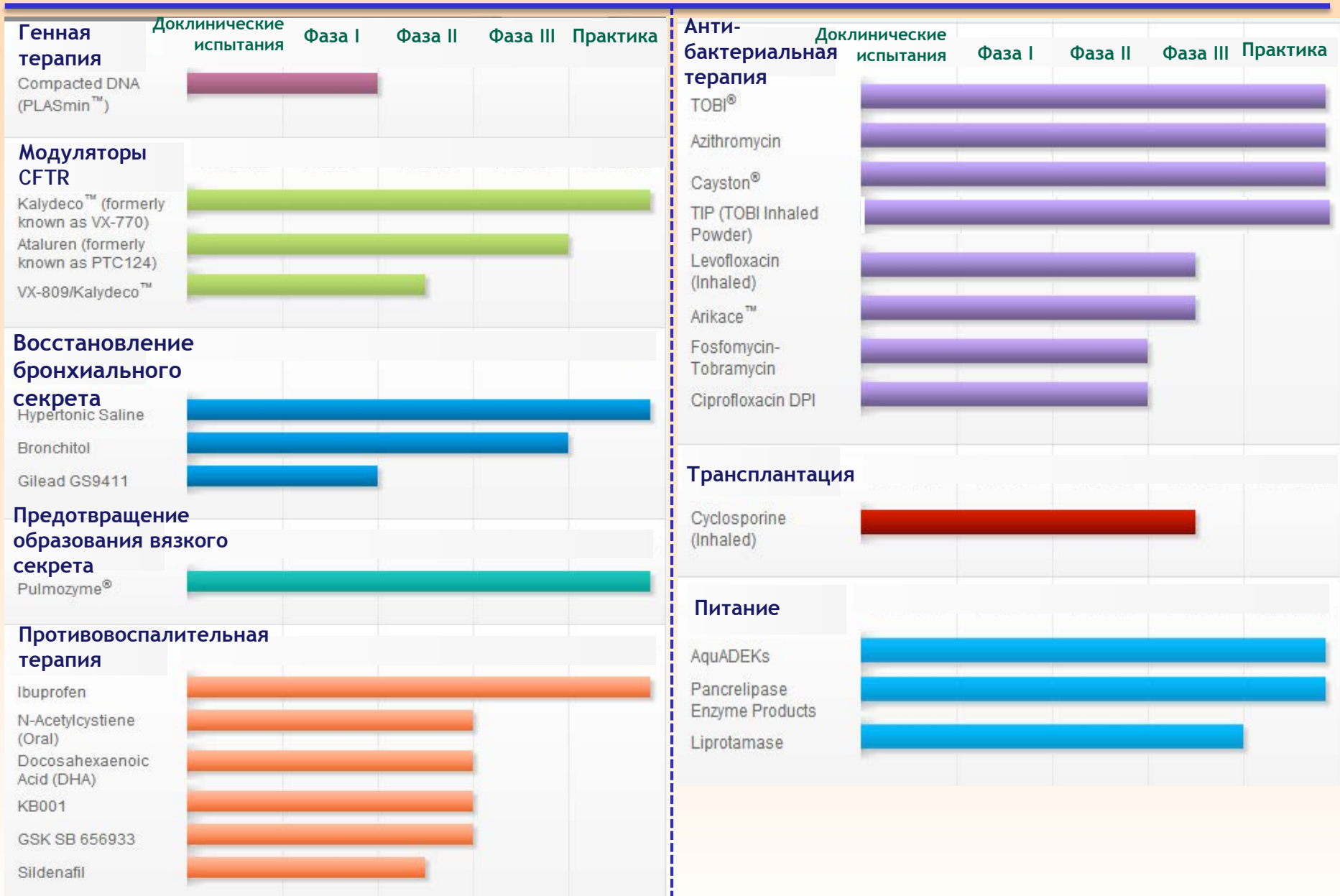
Потеря солей  
(увеличение содержания электролитов в поте (>80 ммоль/л) – диагностический тест)

Патология бронхолегочной системы  
(хроническая инфекция, воспаление, обструкция дыхательных путей)

Патология желудочно-кишечного тракта  
(ферментная недостаточность поджелудочной железы, мальабсорбция)

Другие клинические проявления  
(цирроз, диабет, бесплодие и др.)

# Лечение муковисцидоза: стадии исследования препаратов



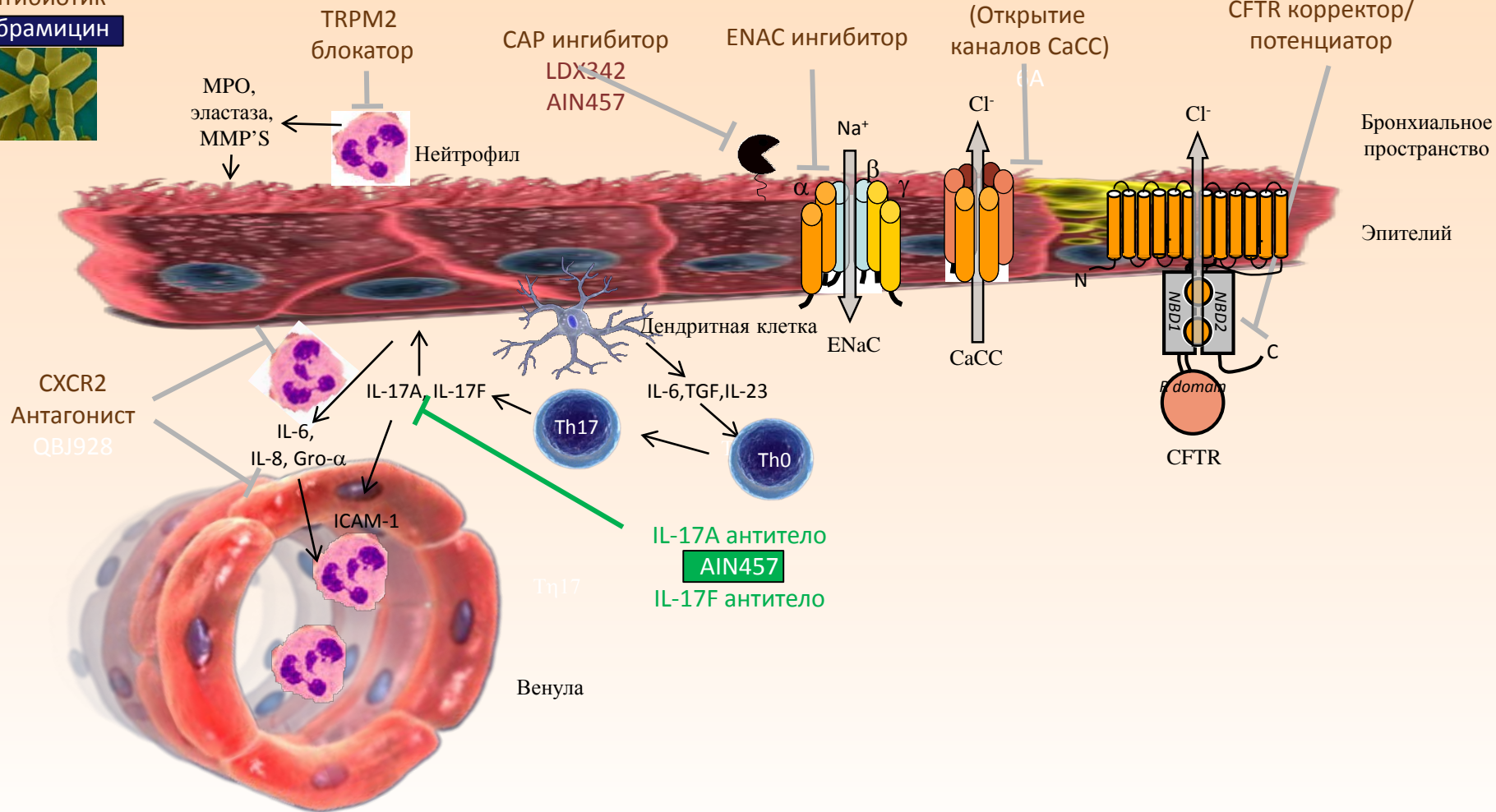
# ИССЛЕДУЕМЫЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МУКОВИСЦИДОЗА

## Противовоспалительные

## Увеличение мукоциллиарного клиренса

Антибиотик

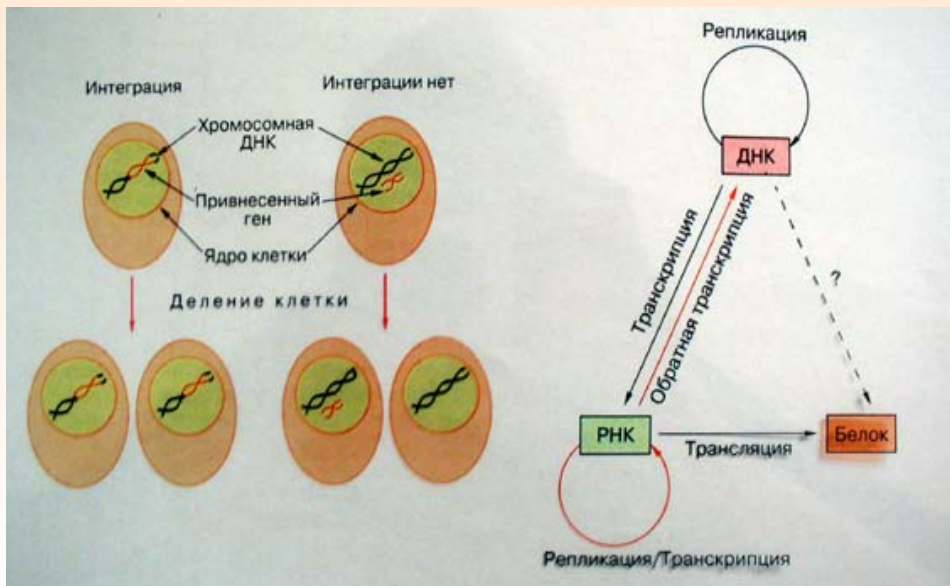
Тобрамицин



# Этиологическое лечение

**Генная терапия** – лечение путем введение в ткани или клетки пациентов смысловых последовательностей ДНК

- I. Проще исправить не сам дефект в гене, т.е. заменять весь мутантный ген или его мутированный фрагмент на нормальный, а вести коррекцию путем введения в организм пациента полностью работающего гена (обычно – его кДНК)
- II. Исследования по генной терапии у человека осуществляются исключительно на соматических тканях, в которых в норме происходит экспрессия дефектного гена. Генная терапия на уровне половых и зародышевых клеток человека, введу возможных серьезных последствий для генофонда человечества, представляется весьма проблематичной на данном этапе познаний – нереальна.



# **Этиологическое лечение**

## **ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ**

- 1) Создание вводимой генетической конструкции, которая может включать несколько генов, один ген или его фрагменты, чаще всего кодирующую часть гена – кДНК;**
- 2) Определение типа клеток, нуждающихся в генетической модификации;**
- 3) Разработка способа введения чужеродной ДНК в патологические клетки;**
- 4) Обеспечение адресности доставки вводимого генетического материала;**
- 5) Обеспечение устойчивости и экспрессии введенной ДНК-конструкции;**
- 6) Оценка количества клеток, модификация которых необходима для получения клинического эффекта;**
- 7) Разработка методов контроля попадания и экспрессии введенного генетического материала;**
- 8) Оценка длительности экспрессии и периодичности введения чужеродной кДНК;**
- 9) Прогнозирование клинического эффекта и возможных побочных эффектов, связанных с проведением генотерапевтической процедуры.**

# Этиологическое лечение при муковисцидозе

## ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ

- 1) **Создание вводимой генетической конструкции:**
  - **Рекомбинантный аденовирусный вектор**
  
- 2) **Определение типа клеток, нуждающихся в генетической модификации;**
  - **тканью-мишенью является респираторный эпителий**
  
- 3) **Разработка способа введения чужеродной ДНК в патологические клетки;**
  - **Аденоассоциированные вирусные векторы (парновирусы); катионный липидный комплекс (липосомы)**
  
- 4) **Обеспечение адресности доставки вводимого генетического материала;**
  
- 5) **Обеспечение устойчивости и экспрессии введенной ДНК-конструкции;**
  - **Низкий уровень переноса генной конструкции в эпителиальные клетки, невысокий уровень экспрессии гена.**
  
- 6) **Оценка количества клеток, модификация которых необходима для получения клинического эффекта;**

**В настоящее время замена мутантного гена нормальной копией невозможна**

# Лечение пациентов с муковисцидозом малыми молекулами , способные модифицировать мутантный белок CFTR

## **КЛАСС I** Нарушение синтеза белка

Мутации гена CFTR - Наиболее распространенными являются Gly542X (ранее G542X) и Trp1282X (ранее W1282X) 5-10% среди больных в Европе и около 60% среди больных в Израиле.

Это мутации, приводящие к преждевременному стоп-кодону в мРНК и, как следствие, короткий, нефункционирующий белок. Это нонсенс-мутации, мутации сдвига рамки вследствие делеций и мутации, приводящие к альтернативному сплайсингу мРНК. **Для этой группы характерны серьезные фенотипические проявления, поскольку синтез белка полностью нарушен.** Укороченные молекулы белка обычно нестабильны, узнаются белками-шаперонами в эндоплазматическом ретикулуме и быстро деградируют.

### **Что предпринято по лечению:**

Несколько лет назад, было обнаружено, что гентамицин обладает способностью маскировать эти ПТК, вставив случайная аминокислоту, которая позволила рибосоме прочесть и привело к производству полнотражного белка. До 35% функция белка CFTR была восстановлена в ходе исследований в пробирке данный подход был успешным в модели мыши Gly542X. Но профиль токсичности аминогликозидов является неблагоприятным, **поиск синтетических альтернатив.** Один из таких агентов, **Ataluren (Аталурен) III** фаза многоцентрового исследования.

# Лечение пациентов с муковисцидозом малыми молекулами , способные модифицировать мутантный белок CFTR

**КЛАСС II** Нарушение созревания белка. Phe508del (ранее ΔF508) осуществляется примерно 90% населения CF, 50% гомозиготных быть и 40% гетерозиготных.

**Корректоры – лекарственные вещества, позволяющие мутантному белку пройти через систему внутриклеточного контроля качества.**

В 1980-х годах было отмечено, что низкие температуры и глицерин стабилизировали неправильно упакованный белок. Глицерин является высокотоксичным и не может применяться. Тем не менее, клинические испытания проводились на второе соединение, натрия-4-фенилбутират, было безопасно и хорошо переносится.

Vertex Pharmaceuticals Inc., определили перспективную малую молекулу под названием VX-809. VX-809 улучшает прохождение белка к клеточной поверхности (14%).

комбинируя VX-809 с ivacaftor вдвое транспорта хлоридов сравнению с только VX-809.

Вершина Pharmaceuticals Inc. также разрабатывает альтернативный корректор, VX-661. Он обладает возможное преимущество над VX-809

VX-770 (ivacaftor) - значительно улучшает движение ионов через клеточную мембрану

Корректор разработан с целью улучшения функции Phe508del, Corr4, было установлено, что минимальный или нулевой эффект на таких CF клеток. Тем не менее, это имело огромное влияние на редкого класса II мутации,

Val23Asp, улучшение неправильного фолдинга и позволяет достичь нормального уровня.

# Лечение пациентов с муковисцидозом малыми молекулами , способные модифицировать мутантный белок CFTR

## **КЛАСС III.** Нарушение регуляции хлорного канала.

Gly551Asp (ранее назывался G551D), которая осуществляется с помощью примерно 4% пациентов с МВ. Другие мутации класс III редкие и вместе составляют 1% больных. Потенциаторы - направлены на восстановление функции ионного канала – Генистин; VX -770 (Калидеко).

VX-770 (ivacaftor) - значительно улучшает движение ионов через клеточную мембрану.

## **КЛАСС IV** Нарушение проводимости хлорного канала.

Миссенс мутации, наиболее распространенные из которых является Arg117His (ранее R117H), встречается у 3% больных муковисцидозом в США.

Мало что было сделано на сегодняшний день по конкретным лечения для этого класса мутаций. В то время как нет лечения в настоящее время не изыскиваются исключительно для этого класса мутаций, CFTR потенциаторов может быть полезным.

## **КЛАСС V** Снижение количества функционирующего белка

## **КЛАСС VI** Снижение стабильности белка



Лекарственный препарат, влияющий на причину, а не на симптомы муковисцидоза



февраль, 2012 г. - FDA одобрила использование Калидеко, «Vertex Pharmaceuticals».



**Потенциаторы** (Калидеко) - класс лекарственных препаратов, которые корректируют работу каналов, что позволяет улучшить транспорт ионов хлора.



**Корректоры** (VX-809) - класс лекарственных препаратов, которые позволяют аномальной форме белка CFTR пройти через внутриклеточную систему контроля качества и занять правильное расположение на поверхности мембраны.

# Благодарю за сотрудничество:

Руководителей и коллективы медико-генетических консультаций и центров муковисцидоза Сибирского Федерального округа:



Омская обл.

Алтайский край

Томская обл.

Тюменская обл.

Красноярский край



Отдельная благодарность  
Благотворительному фонду  
«Острова» за возможность  
работы по программе «Наука» и  
проведения образовательной  
деятельности среди врачей и  
пациентов

# Прямой метод ДНК-диагностики при муковисцидозе

используются в тех случаях, когда известен ген, ответственный за возникновение наследственного заболевания и основные типы его патологических мутаций.

Преимущество прямого метода	Недостаток прямых методов
<ul style="list-style-type: none"><li>• точность диагностики (100%) и отсутствие необходимости ДНК-анализа всех членов ядерной семьи. Обнаружение мутации в соответствующем гене позволяет абсолютно точно подтвердить диагноз наследственного заболевания и определить генотип всех членов отягощенной семьи.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Требуется знание точной локализации патологического гена в геноме, его экзон-интронной структуры и спектра мутаций.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• возможность выявления гетерозиготного носительства патологических мутаций у родителей умершего больного и его родственников, что особенно актуально для аутосомно-рецессивных заболеваний.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Неполная информативность, что связано с наличием широкого спектра патологических мутаций в одном и том же гене, обуславливающих развитие наследственного заболевания. В зависимости от объема спектра мутаций в определенном гене, эта информативность может широко варьировать. Часть семей в этом случае остается не информативной для диагностики.</li></ul>

# Косвенный метод ДНК-диагностики при муковисцидозе

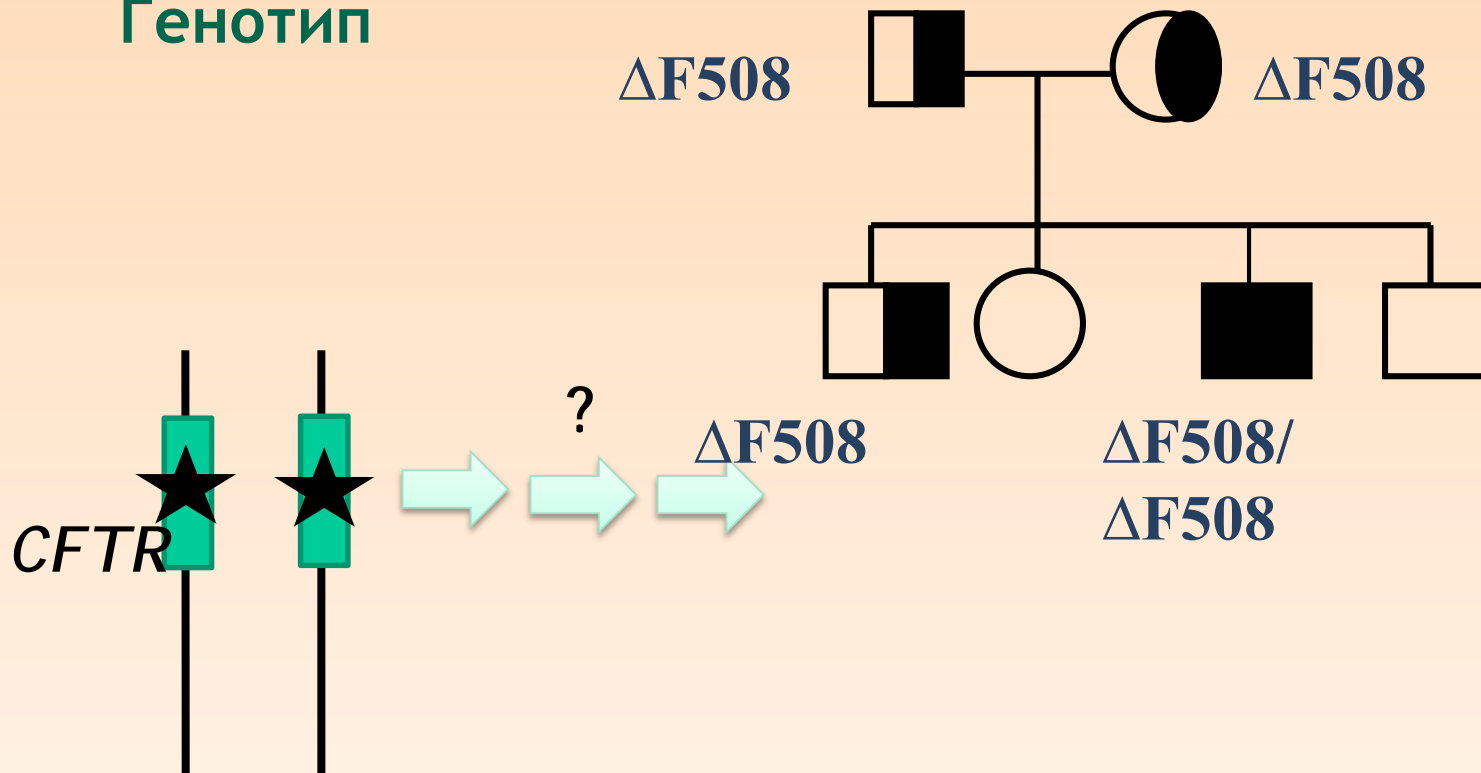
Ген, повреждение в котором приводит к заболеванию, не идентифицирован, а лишь локализован на определенной хромосоме, или когда методы прямой ДНК-диагностики не дают результата.

Метод основан на анализе сегрегации в семье аллелей полиморфных маркеров, находящихся в том же хромосомном регионе или тесно сцепленных с локусом заболевания.

Преимущество косвенного метода	Недостаток косвенных методов
<ul style="list-style-type: none"><li>• Не требуют знания структуры гена и спектра мутаций в нем. Необходимо только иметь сведения о его локализации.</li><li>• Информативны практически для всех обратившихся семей, поскольку всегда есть возможность среди полиморфных маркеров, сцепленных с локусом заболевания, найти информативный для данной семьи.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Точность не 100%. Ошибка обусловлена вероятными рекомбинациями между изучаемым полиморфным локусом и повреждением в гене, а величина этой ошибки определяется двумя факторами: генетическим расстоянием между полиморфным локусом и мутацией, приводящей к заболеванию, и генетическим размером самого гена. Очевидно, что для уменьшения ошибки необходимо использовать маркеры расположенные непосредственно вблизи гена или даже внутри него.</li></ul>
	<ul style="list-style-type: none"><li>• Необходимость семейного анализа и обязательную уверенность в клиническом диагнозе, так как ни подтвердить, ни опровергнуть его при использовании этих методов (в отличие от прямых) невозможно.</li></ul>

# Муковисцидоз

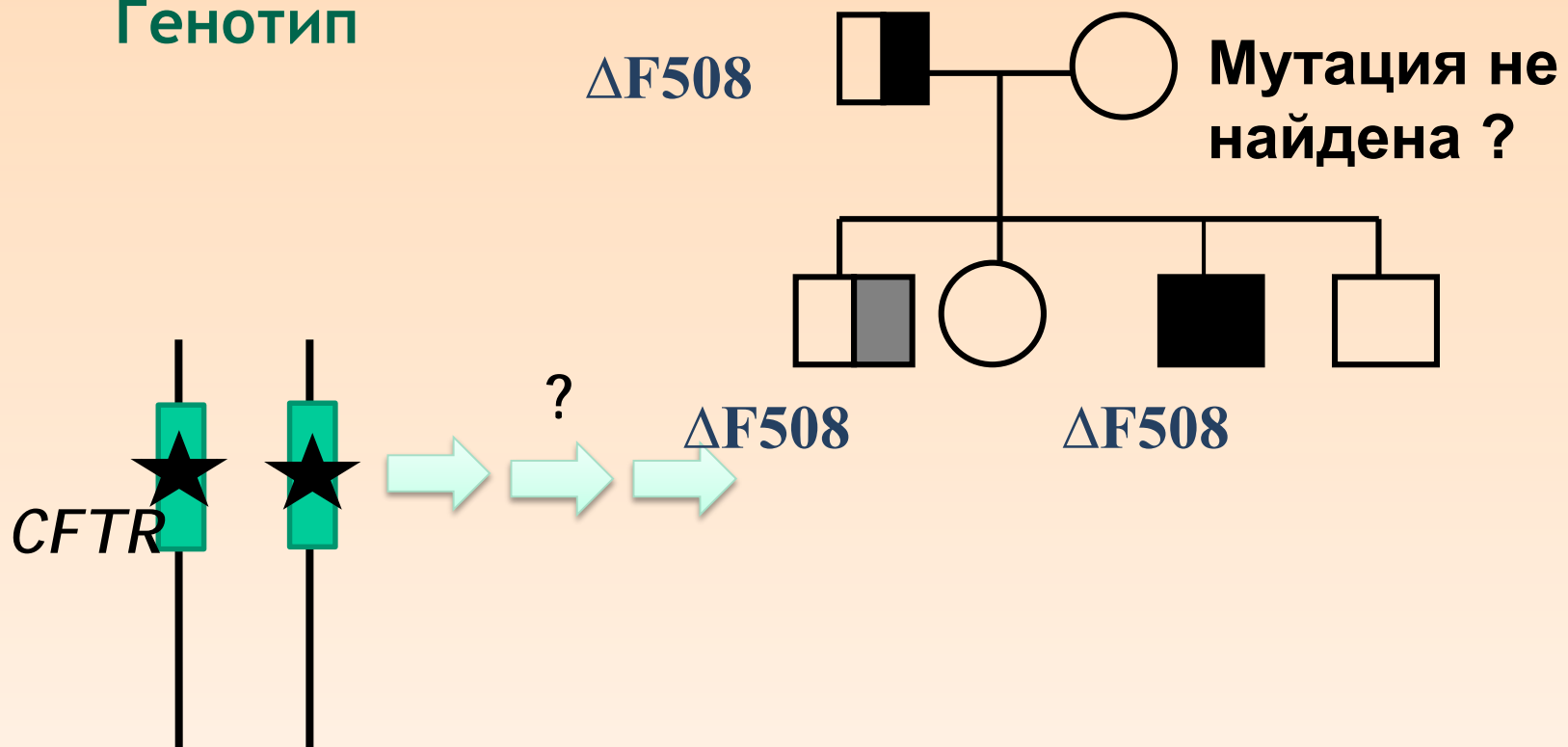
## Генотип



**Золотой стандарт ДНК-диагностики** на сегодняшний день - комплексное использование и прямых и косвенных методов в каждом конкретном случае: подтверждение результатов косвенной диагностики результатами прямой, и наоборот. Такой подход позволяет получить наиболее точный и адекватный результат.

# Муковисцидоз

Генотип



**Золотой стандарт ДНК-диагностики** на сегодняшний день - комплексное использование и прямых и косвенных методов в каждом конкретном случае: подтверждение результатов косвенной диагностики результатами прямой, и наоборот. Такой подход позволяет получить наиболее точный и адекватный результат.

**Спасибо за  
внимание!**

