

ЗАДАЧИ ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ГЕНЕТИКЕ ДЛЯ СТУДЕНТОВ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ СПЕЦИАЛЬНОСТЕЙ

В.Н. Зиновьева

Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия,
e-mail: vzinovjeva@yandex.ru

В работе представлены новые задачи по медицинской генетике, необходимость разработки которых возникла в последние годы в связи с успехами в изучении генома человека. Задачи по методам ДНК-диагностики и на знание современной номенклатуры генных мутаций могут способствовать лучшему пониманию этиологии моногенных заболеваний и подходов к их выявлению, а также развитию у студентов навыков работы с научной генетической литературой.

Ключевые слова: преподавание медицинской генетики, задачи, ДНК-диагностика, номенклатура генных мутаций.

Успехи в исследовании генома человека позволили внести коррективы в программу обучения медицинской генетике студентов высшей школы, превратив эту дисциплину в раздел молекулярной медицины. В последние годы созданы генетические технологии, которые служат для выявления вариаций в структуре генов (ДНК-диагностика). Клиническими приложениями этих технологий стали подтверждающая и пресимптоматическая диагностика наследственных болезней, пренатальная и предимплантационная диагностика, диагностика гетерозиготного носительства и фармакологических реакций (Гинтер, 2003; Бочков, 2005). Проведение генодиагностики возлагается, прежде всего, на выпускников медико-биологических факультетов медицинских университетов, получающих специальность «врач–лаборант–биохимик» и «врач–лаборант–генетик». В связи с этим в ходе преподавания медицинской генетики студентам медико-биологического факультета Волгоградского медицинского университета особое внимание уделяется изучению молекулярно-генетических методов, а для лучшего их понимания разработаны новые задачи, не входящие в существующие сегодня учебные пособия. Некоторые из задач, использование которых на практических занятиях по медицин-

ской генетике в существенной степени будет зависеть от особенностей лекционного курса и методической базы, предлагаем вниманию читателя.

Задачи по методам ДНК-диагностики

На практическом занятии по теме «Молекулярно-генетические методы медицинской генетики» студентам предлагаются задачи по методам ДНК-диагностики, как прямой, так и косвенной (Зиновьева, 2006). В первом случае вызывают интерес задачи, позволяющие проверить понимание студентами особенностей секвенирования по методу Сэнгера, а также метода выявления генных мутаций с помощью рестрикционного анализа.

Задача 1. По данным электрофореграмм (рис. 1), полученных при проведении секвенирования участка гена дистрофина у здорового индивида (а) и у пациента с мышечной дистрофией Дюшенна (б), установите: а) последовательность нуклеотидов в этом участке в норме и при патологии; б) тип мутации патологического гена.

Решение. Последовательность нуклеотидов данного участка у здорового индивида АСGAGACTGAATTCGTA, у пациента – АСGAGACTGAATCCGTA. Произошла мута-

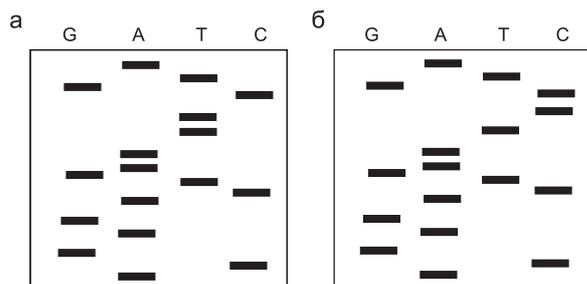


Рис. 1.

ция замены нуклеотидов (тимин в положении 13 заменен на цитозин).

Задача 2. Проанализируйте последовательности нуклеотидов, определенные в предыдущей задаче, используя для этого таблицу с сайтами рестрикции ряда эндонуклеаз, которые заведомо отсутствуют в других участках исследуемого фрагмента ДНК. Предложите еще один способ диагностики заболевания (помимо секвенирования), если выявленная мутация является мажорной (самой распространенной в данной популяции), расстояние до нее от правого конца фрагмента ДНК составляет 160 п.н., от левого конца – 210 п.н.

Решение. В последовательности нуклеотидов здорового индивида есть сайт рестрикции для рестриктазы *EcoRI*; мутация приводит к его исчезновению. В этом случае после проведения рестрикции на электрофореграмме в норме будет обнаружено два фрагмента ДНК размером 160 и 210 п.н., при патологии – один фрагмент размером 370 п.н. Если эта мутация является мажорной в популяции, метод рестрикционного анализа экономически выгоднее, чем секвенирование.

Таблица сайтов рестрикции

Рестриктаза	Сайт рестрикции
<i>BamHI</i>	G↓GATTC
<i>MspI</i>	C↓CGG
<i>EcoRI</i>	G↓AATTC
<i>AluI</i>	AGC↓T

Косвенные методы ДНК-диагностики более сложны для усвоения студентами, однако понимание их сути поможет в дальнейшем при изучении метода картирования генов на-

следственных заболеваний. Понятие косвенной ДНК-диагностики связано с понятием генетического ДНК-маркера. В широком смысле ДНК-маркеры – это участки генома, выявляемые каким-либо образом и представляющие прямой или косвенный интерес для исследования. Если подобрать полиморфный ДНК-маркер, сцепленный с интересующим исследователя геном, то возможны случаи соответствия определенных вариантов ДНК-маркера определенным вариантам изучаемого гена. Тесное сцепление маркера с изучаемым геном означает, что они как единое целое передаются потомству и, следовательно, анализируя маркер у членов родословной, можно проследить наследование в ряду поколений вариантов гена, вызывающих заболевание. При этом электрофореграмму маркерных участков ДНК от каждого из членов родословной помещают под значком родословной, соответствующим этому члену.

Задача 3. На рис. 2 приведены родословная семьи с аутосомно-доминантным заболеванием и результаты косвенной ДНК-диагностики. Ген заболевания имеет полную пенетрантность, болезнь манифестирует в разные сроки. Каков тип полиморфизма исследованного маркера? С каким вариантом маркера сцеплен ген заболевания? Может ли заболевание проявиться у здоровых индивидов 3-го поколения родословной? Почему данная родословная пригодна для проведения косвенной ДНК-диагностики?

Решение. Исследован микросателлитный маркер – фрагмент ДНК, имеющий разное число нуклеотидов (возможно, копий динуклеотидных повторов). Поскольку у членов II поколения родословной маркер размером 210 п.н.

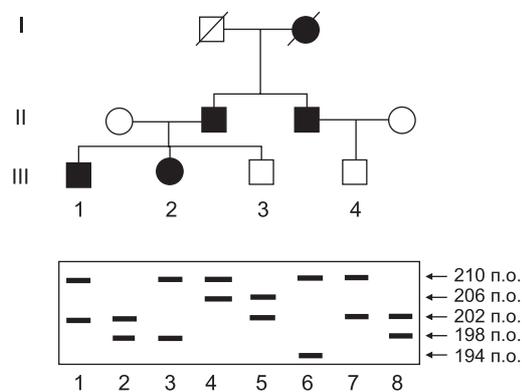


Рис. 2.

обнаруживается только в ДНК больных (дорожки 4, 6), можно сделать вывод, что ген заболевания сцеплен с ним. Больные в III поколении (дорожки 1, 3) получили маркер вместе с патологическим геном от своего больного отца. Больной брат отца также имеет маркер, который он передал сыну (III-4), на данный момент здоровому. Поскольку вместе с маркером индивид III-4 унаследовал патологический ген, заболевание проявится у него позднее. Индивид III-3 не унаследовал вариант маркера, сцепленный с геном заболевания, и в будущем этой патологией не заболеет. Родословная пригодна для диагностики, поскольку родители больных детей не имеют одинаковых аллелей маркера, т. е. соблюдается обязательное условие косвенной диагностики – гетерозиготность ведущих членов родословной по маркеру.

Задача 4. Родословная семьи и результаты косвенной ДНК-диагностики X-сцепленного рецессивного заболевания приведены на рис. 3. В ходе диагностики проведена рестрикция амплифицированного фрагмента ДНК рестриктазой *VamHI*. Кто из членов семьи является носителем патологического гена? С каким вариантом маркера он сцеплен? Кому из дочерей понадобится в будущем пренатальная ДНК-диагностика для выявления наследственной патологии плода? Чем можно объяснить возможность ошибки при диагностике заболевания этим методом?

Решение. Сыновья в семье могли унаследовать патологический ген только от матери, которая является гетерозиготной носительницей. Судя по электрофореграмме, она имеет как разрезаемый рестриктазой маркерный фрагмент ДНК, так и неразрезаемый (ПДРФ-полимор-

физм маркера). Сыновья унаследовали первый вариант маркера, значит, именно с ним сцеплен ген заболевания. Все дочери унаследовали от отца X-хромосому с разрезаемым рестриктазой маркером, но только четыре из них получили от матери такой же вариант маркера, а с ним и ген заболевания. Поэтому в будущем им показана пренатальная генодиагностика для решения вопроса о передаче патологии сыновьям. Одна дочь (II-5) не унаследовала от матери вариант маркера, с которым сцеплен ген болезни, ее сыновья будут здоровы. Возможность ошибки связана с вероятностью нарушения сцепления между геном и маркером, если расстояние между ними недостаточно мало.

Задача 5. Проанализируйте родословную семьи с аутосомно-рецессивным заболеванием и электрофореграмму, приведенные на рис. 4. Какой вид ДНК-диагностики проведен? Какой тип полиморфизма имеет исследованный фрагмент ДНК? Могут ли родиться больные дети, если женщина III поколения вступит в брак с кузеном III-1 (в семье ее матери и деда со стороны отца случаи заболевания не известны)? Каков прогноз, если брак будет заключен с кузеном III-2?

Решение. Проведена косвенная ДНК-диагностика. Размер маркеров варьирует, отличие составляет несколько пар нуклеотидов, что указывает на микросателлитный тип полиморфизма. С заболеванием сцеплен вариант маркера размером 190 п.н. У больного он находится в гомозиготе, родители больного гетерозиготны по этому варианту маркера и по сцепленному с ним гену. Одну копию этого варианта маркера имеют также члены родословной III-1 и III-4,

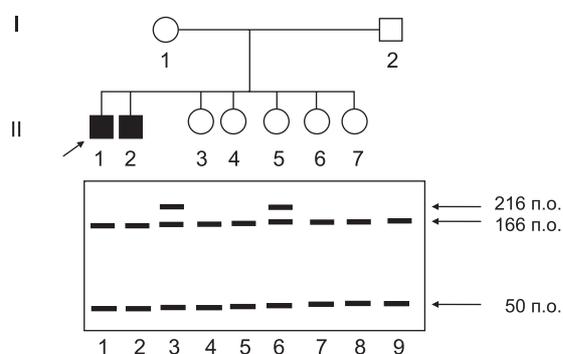


Рис. 3.

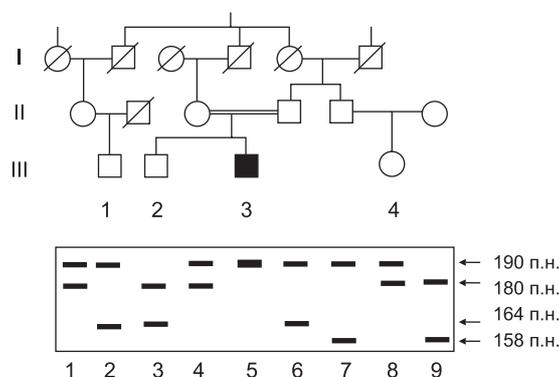


Рис. 4.

значит, они гетерозиготны по гену заболевания; в их браке вероятность рождения больного ребенка составит 25 %. В браке индивидов III-4 и III-2 дети будут здоровы, поскольку индивид III-2 не унаследовал вариант маркера размером 190 п.н. и патологический ген.

Задачи на знание номенклатуры генных мутаций

Результаты ДНК-диагностики отражаются в записях генотипа протестированного индивида. Для этого используют общепринятую номенклатуру генных мутаций человека (Иллариошкин и др., 2002). Знакомство с номенклатурой поможет студентам при изучении этиологии наследственных болезней и при работе с научными публикациями по медицинской генетике. На практических занятиях по теме «Общая характеристика генных болезней: этиология и механизмы патогенеза» мы предлагаем задачи, при решении которых студенты должны также вспомнить основные законы наследования (Зиновьева, 2007).

Задача 6. У индивида в гене одной из хромосом обнаружена экспансия CAG-повтора начиная с 234-го нуклеотида (их число достигло 104). В 10-м кодоне (ACG) такого же гена гомологичной хромосомы аденин заменен на гуанин. Запишите мутации согласно общепринятой номенклатуре. К какому типу их можно отнести? Если ген отвечает за аутосомно-рецессивное заболевание, проявится ли оно?

Решение. [234(CAG)₁₀₄ + 28A → G].

Первая мутация относится к структурным генным мутациям (изменение затронуло более двух нуклеотидов), вторая представляет собой точковую мутацию замены пары оснований. Заболевание проявится, так как оба аллеля гена мутировали.

Задача 7. В приведенной ниже последовательности одного из генов произошло выпадение 9-го нуклеотида, а 13-й нуклеотид был заменен на тимин.

A-A-C-T-G-G-C-A-T-A-A-C-G-C

Запишите мутации согласно общепринятой номенклатуре. К какому типу их можно отнести? Если изменения произошли в гене аутосомно-рецессивного заболевания, проявится ли оно?

Решение. [9delT ; 13G→T].

Обе мутации относятся к точковым, первая – сдвиг рамки считывания, вторая – замена пары оснований. Если обе мутации произошли в гене только одной из гомологичных хромосом, а второй аллель гена не поврежден, аутосомно-рецессивное заболевание не проявится.

Задача 8. В одной хромосоме ген имеет мутацию, приведшую к утрате в белке 21-й по счету аминокислоты триптофана. В гомологичной хромосоме в таком же гене заменен 714-й нуклеотид (гуанин на цитозин). Запишите мутации. Как можно назвать данный гетерозиготный организм? Каковы особенности генодиагностики в этом случае?

Решение. [delTrp21 + 714G→C].

Такая гетерозигота называется компаундом. Если не проводить секвенирование, то могут понадобиться разные методы диагностики: первую мутацию при условии высокого качества электрофореза легко обнаружить по изменению размера амплифицированного участка гена, для выявления второй нужны другие способы.

Задача 9. В гене одной из гомологичных хромосом тимин в 38-м положении заменен на цитозин, что не приводит к изменению последовательности аминокислот в белке, в таком же гене другой хромосомы мутация в 245-м кодоне стала причиной замены пролина на серин. Запишите мутации. Если мутирован ген аутосомно-рецессивного заболевания, проявится ли оно?

Решение. [38T/C + Pro245Ser].

Поскольку первое изменение представляет собой полиморфизм, не влияющий на активность продукта гена, а второе изменение (мутация) произошло только в одном аллеле гена, аутосомно-рецессивное заболевание не проявится.

Задача 10. Запишите мутацию замены тимина на гуанин во втором положении интрона, примыкающего к 97 нуклеотиду экзона слева. Каков возможный результат мутации?

Решение. 97 – 2t→g.

Поскольку мутация произошла на стыке экзона и интрона, она может нарушить сплайсинг мРНК, что вызовет или изменение количества белкового продукта гена в клетке или снижение (утрату) его активности.

Задача 11. Расшифруйте следующую запись: 702del21. Каков предполагаемый результат мутации?

Решение. Произошло выпадение 21 нуклеотида в промоторной части гена начиная с 702 нуклеотида. Такая мутация может нарушить экспрессию гена и снизить количество его продукта в клетке.

Задача 12. Расшифруйте следующую запись: [301del8 + 348Leu/Val]. Проявится ли патология, если ген отвечает: а) за аутосомно-доминантное заболевание; б) за аутосомно-рецессивное заболевание?

Решение. В гене одной из хромосом произошло выпадение 8 нуклеотидов начиная с 301 нуклеотида, в таком же гене гомологичной хромосомы в 348 кодоне обнаружен полиморфизм, который стал причиной замены в белке лейцина на валин. Поскольку замена аминокислоты в данном случае не влияет на активность продукта гена, патология проявится, если ген отвечает за аутосомно-доминантное заболевание.

Задача 13. Расшифруйте следующую запись: [23-24insAT ; 59G→A]. В каком случае проявится патология, если ген отвечает: а) за аутосомно-доминантное заболевание; б) за аутосомно-рецессивное заболевание?

Решение. В гене одной из хромосом произошла вставка аденина и тимина между 23 и 24 нуклеотидами и замена гуанина в положении 59 на аденин. Если обе мутации затронули ген только одной из гомологичных хромосом, аутосомно-доминантное заболевание проявится, а аутосомно-рецессивное – нет. Если повреждены оба аллеля гена, проявится и аутосомно-рецессивное заболевание.

Задача 14. Расшифруйте следующую запись: 216 + 7(cag)28. К какому типу ее можно отнести? Каков возможный результат мутации?

Решение. В гене произошла вставка 28 копий последовательности из трех нуклеотидов: цитозина, аденина и гуанина в положении 7 интрона, примыкающего к 216 нуклеотиду экзона справа. Такие структурные генные мутации называют динамическими, так как здесь имеет место экспансия тринуклеотидных повторов. Поскольку мутация возникла в интроне, она может привести к нарушению сплайсинга и повлиять на транскрипцию гена.

Предлагаемые задачи могут служить основой для разработки задач, которые касаются конкретных, изучаемых на занятиях, заболеваний. В качестве примера приводим задачу на

знание этиологии и принципа генодиагностики аутосомно-рецессивной болезни с нарушением обмена.

Задача 15. ДНК-тестирование болезни Вильсона–Коновалова на ранних стадиях заболевания оказалось надежнее других методов диагностики. Поскольку ген, кодирующий медьтранспортирующую АТФазу, имеет большие размеры, поиск мутаций начинают с секвенирования экзонов, в которых встречаются мажорные мутации. Для славян мажорной мутацией является замена Н1069Q в 14 экзоне. При этом в ДНК цитозин заменен на аденин. Ниже приведен генотип больных индивидов, однако у некоторых из них при секвенировании в сайте мутации обнаруживаются и аденин, и цитозин. У каких именно и почему? Дайте расшифровку мутаций.

- А) Н1069Q + Н1069Q;
- Б) Н1069Q + W917X;
- В) Н1069Q + 3400delC;
- Г) Н1069Q + 4121–4122insG.

Решение. Индивиды Б, В и Г являются компаундами, поскольку только один из аллелей гена у них имеет мутацию Н1069Q, второй аллель имеет другие мутации, а значит в его 1069 кодоне цитозин не заменен на аденин. Этот аллель у индивида Б несет в 917 кодоне, кодирующем в норме триптофан, нонсенс-мутацию, которая приводит к обрыву трансляции белка. У индивида В во втором аллеле произошло выпадение цитозина в положении 3400, в результате чего возникла мутация сдвига рамки считывания. Индивид Г во втором аллеле гена также имеет мутацию сдвига рамки считывания, которая является следствием вставки гуанина между 4121 и 4122 нуклеотидами. Индивид А – гомозигота по мажорной миссенс-мутации в кодоне 1069, приводящей к замене гистидина на глутамин.

Заключение

Методы молекулярной генетики стали важнейшим инструментом изучения и выявления генных болезней, частота которых среди новорожденных в целом составляет в популяциях примерно 1 % (Бочков, 2001). Методы генодиагностики не менее значимы и при исследовании полиморфизма генов человека,

который определяет предрасположенность индивида к самым распространенным на сегодняшний день болезням: сахарному диабету, онкологическим заболеваниям, болезням сердечно-сосудистой системы, остеопорозу, эндометриозу и др. Составление генетического паспорта человека ведется во многих странах (Баранов и др., 2000). Без сомнения, важную роль ДНК-диагностика будет играть также в новом профилактическом направлении медицинской науки, ставящей своей задачей замедлить процесс старения (anti-aging medicine). В связи с этим при подготовке специалистов медицинского профиля, в особенности врачей-лаборантов, необходимо уделять больше внимания изучению современных методов генодиагностики, для лучшего понимания которых представлены здесь задачи можно рекомендовать к использованию на практических занятиях по генетике.

Литература

- Баранов В.С., Баранова Е.В., Ивашенко Т.Э., Асеев М.В. Геном человека и гены «предрасположенности». Введение в предиктивную медицину. СПб.: Интермедика, 2000. 272 с.
- Бочков Н.П. Клиническая генетика: Учебник. 2-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-МЕД., 2001. 448 с.
- Бочков Н.П. Место генодиагностики и генотерапии в современной медицине // Молекуляр. медицина. 2005. № 3. С. 12–17.
- Гинтер Е.К. Медицинская генетика: Учебник. М.: Медицина, 2003. 448 с.
- Зиновьева В.Н. Методы медицинской генетики: Уч. пособие. Волгоград: ВолГМУ, 2006. 89 с.
- Зиновьева В.Н. Наследственная патология человека: Рабочая тетрадь по медицинской генетике. Ч. 1. Волгоград: ООО «Бланк», 2007. 55 с.
- Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование в неврологии. М.: Мед. информ. агентство, 2002. 591 с.

THE TASKS IN MOLECULAR AND MEDICAL GENETICS FOR STUDENTS SPECIALIZING IN MEDICINE AND BIOLOGY

V.N. Zinov'eva

Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia, e-mail: vzinovjeva@yandex.ru

Summary

New medical genetics tasks that are necessary now because of success of human genome investigations are presented in the paper. The tasks concern DNA diagnostics tests and knowledge of gene mutations modern nomenclature. They may help students to understand the etiology of monogenic diseases and methods of their better search. The tasks may develop skill to study scientific literature in the field of genetics also.