



Патогенные варианты и механизмы их действия

Скоблов Михаил Юрьевич
заведующий лабораторией функциональной геномики
ФГБНУ "Медико-генетический научный центр"

Классификация мутаций

Точковые мутации

- Замена
 - Синонимичная
 - Миссенс
 - Нонсенс
- Делеция
- Инсерция
- Амплификация
тринуклеотидных
повторов

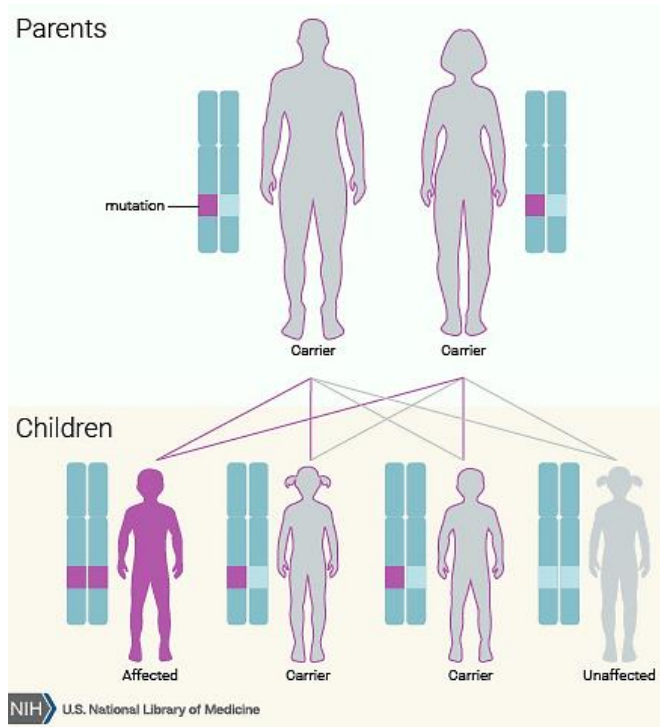
Хромосомные мутации

- Транслокация
- Делеция
- Инверсия
- Дупликация

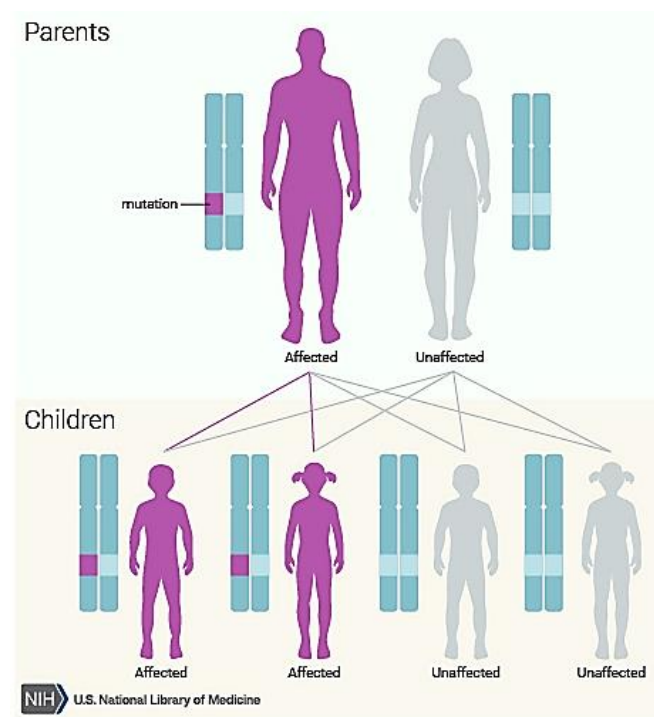
Геномные мутации

- Моносомия
- Трисомия

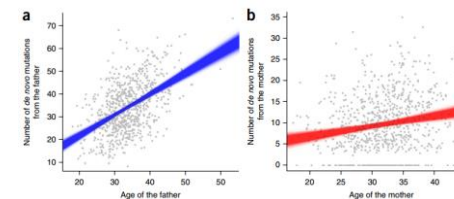
Наследственные заболевания будут «всегда»



- Каждый человек является носителем 8-10 и более мутаций для генов с аутосомно-рецессивными заболеваниями



- Каждый человек получает от 40 до 100 новых мутаций, которых нет у его родителей

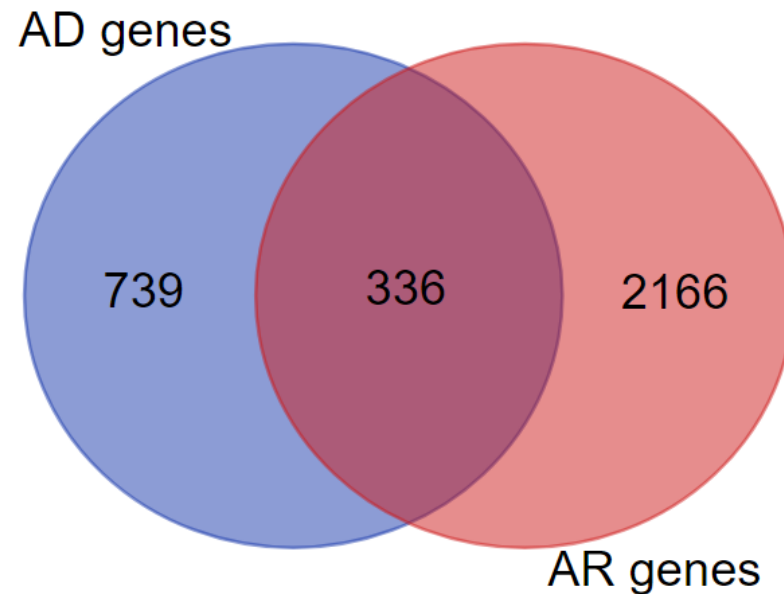


Наследственных заболеваний много и они разные

Number of Entries in OMIM (Updated June 18th, 2021) :

MIM Number Prefix	Autosomal	X Linked	Y Linked	Mitochondrial	Totals
Phenotype description, molecular basis known #	5,716	356	5	34	6,111
Phenotype description or locus, molecular basis unknown %	1,411	112	4	0	1,527
Other, mainly phenotypes with suspected mendelian basis	1,651	102	3	0	1,756

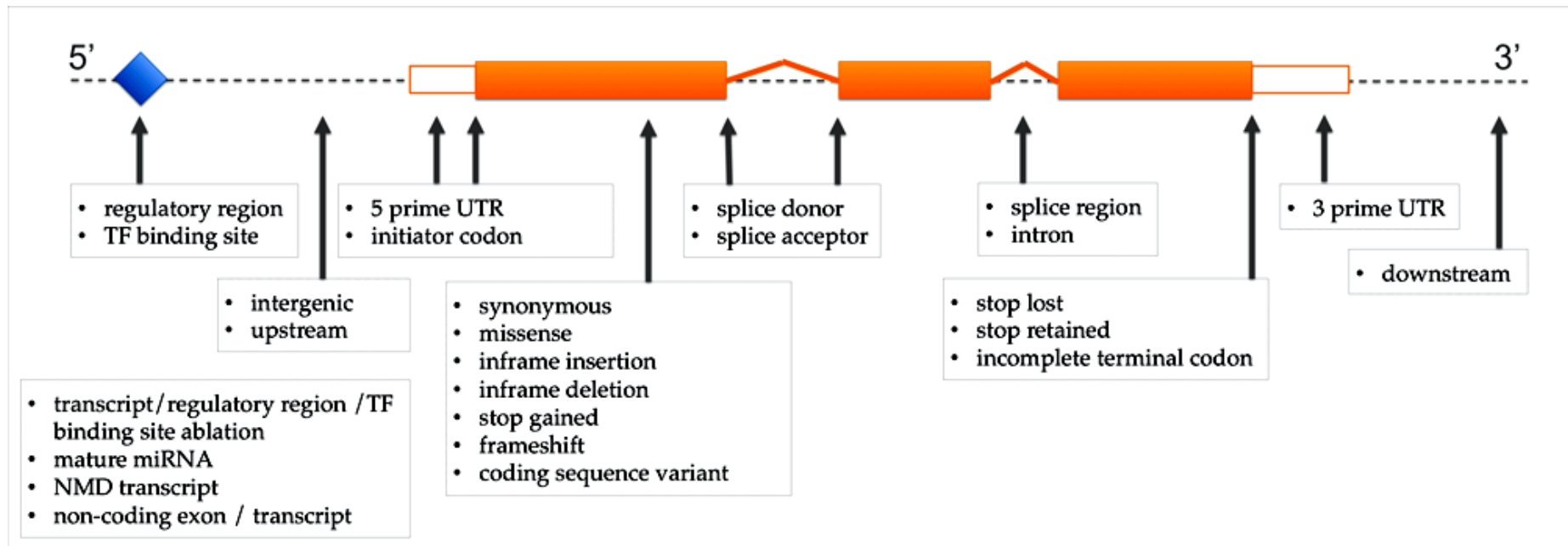
Механизмов патогенеза наследственных заболеваний тоже очень много и они разные



Distribution of Phenotypes across Genes (Updated June 18th, 2021) :

Number of genes with 1 phenotype	3,114
Number of genes with 2 phenotypes	812
Number of genes with 3 phenotypes	300
Number of genes with 4+ phenotypes	239

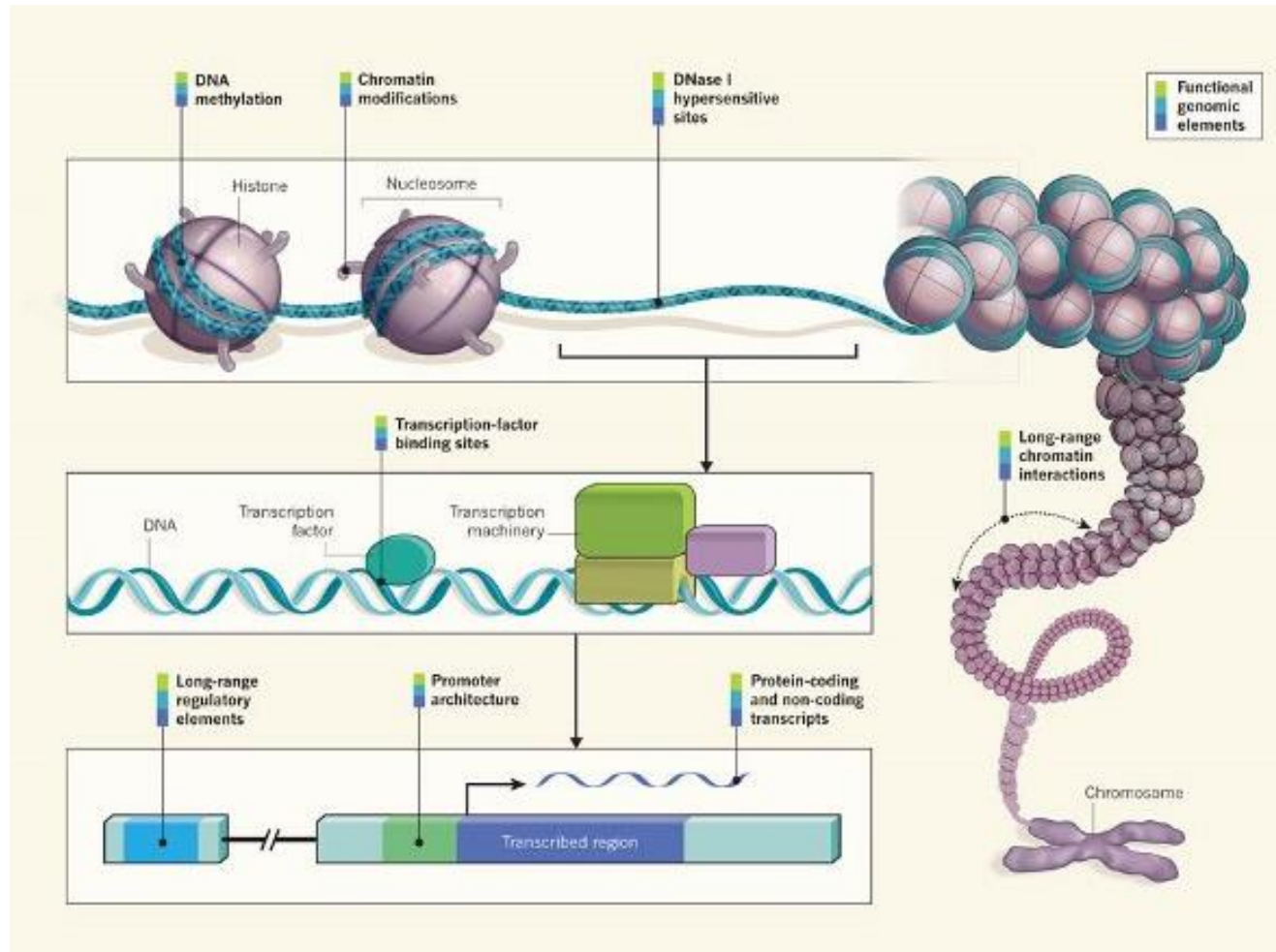
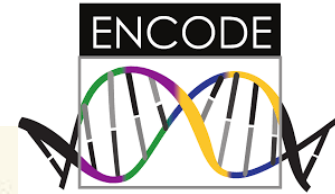
Где могут быть патогенные варианты?



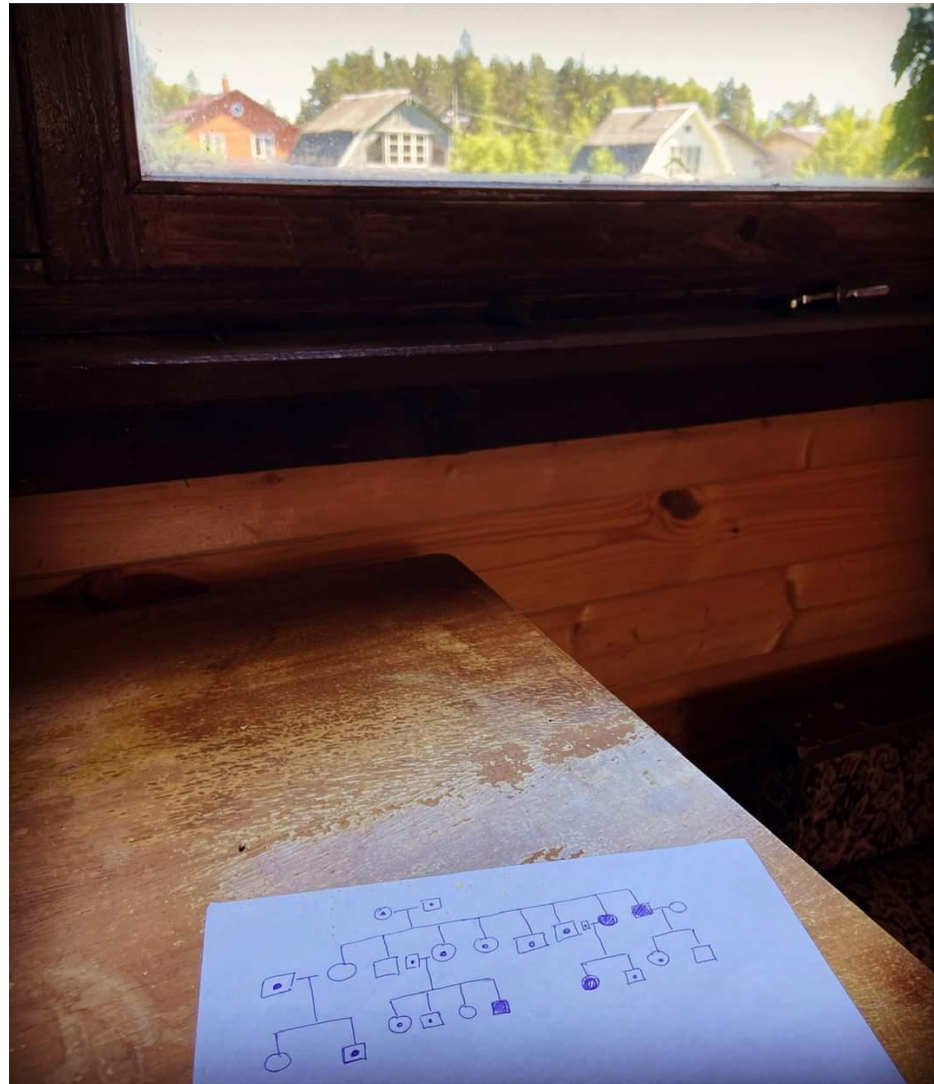
Механизм – это главное



ENCODE: Encyclopedia of DNA Elements



Родословная семьи больного



Родословная семьи больного

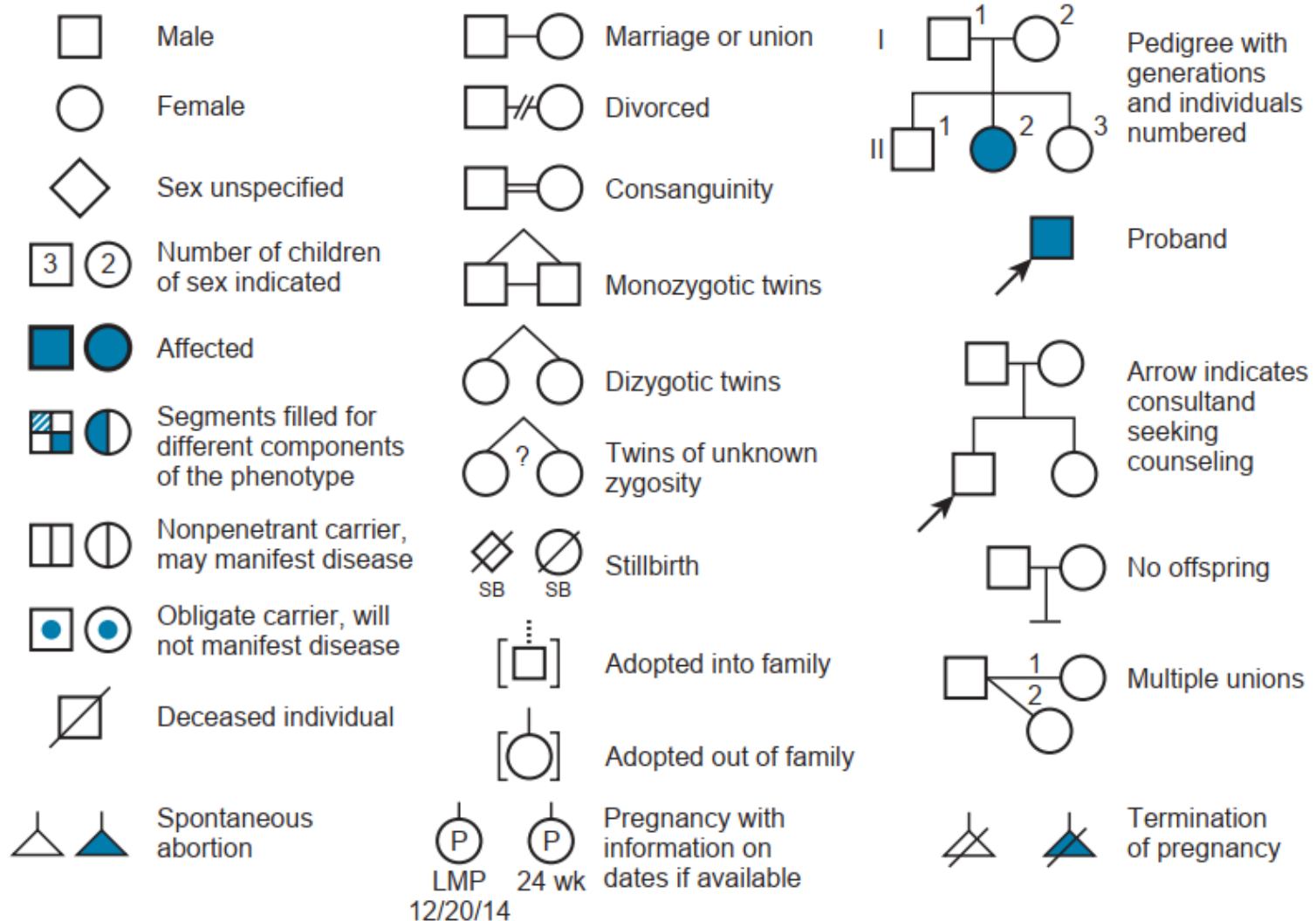
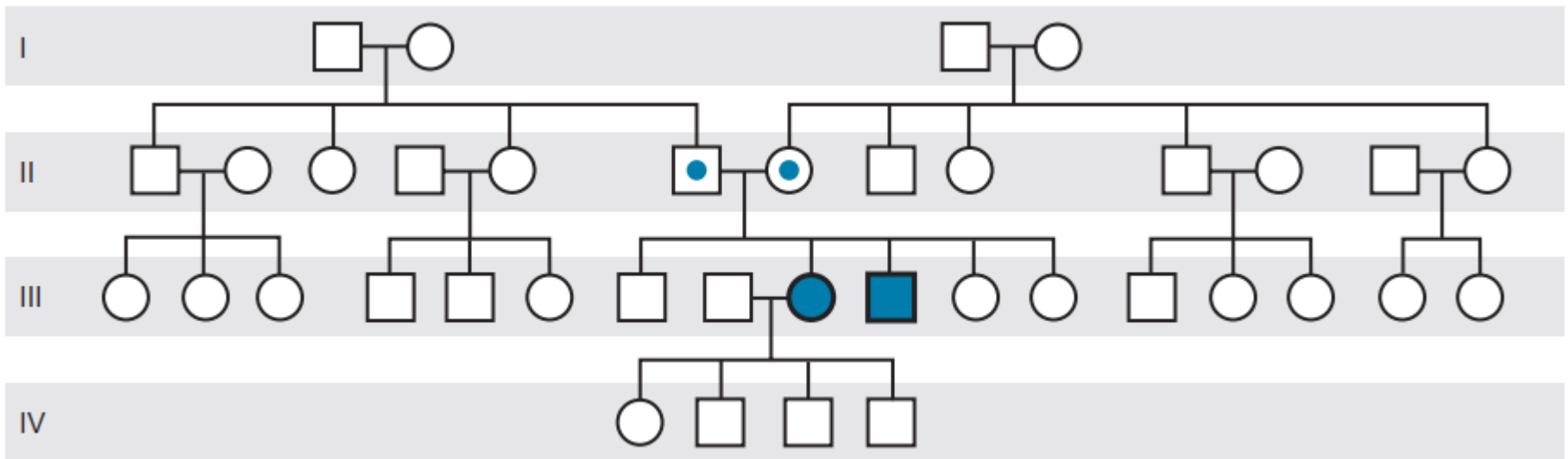
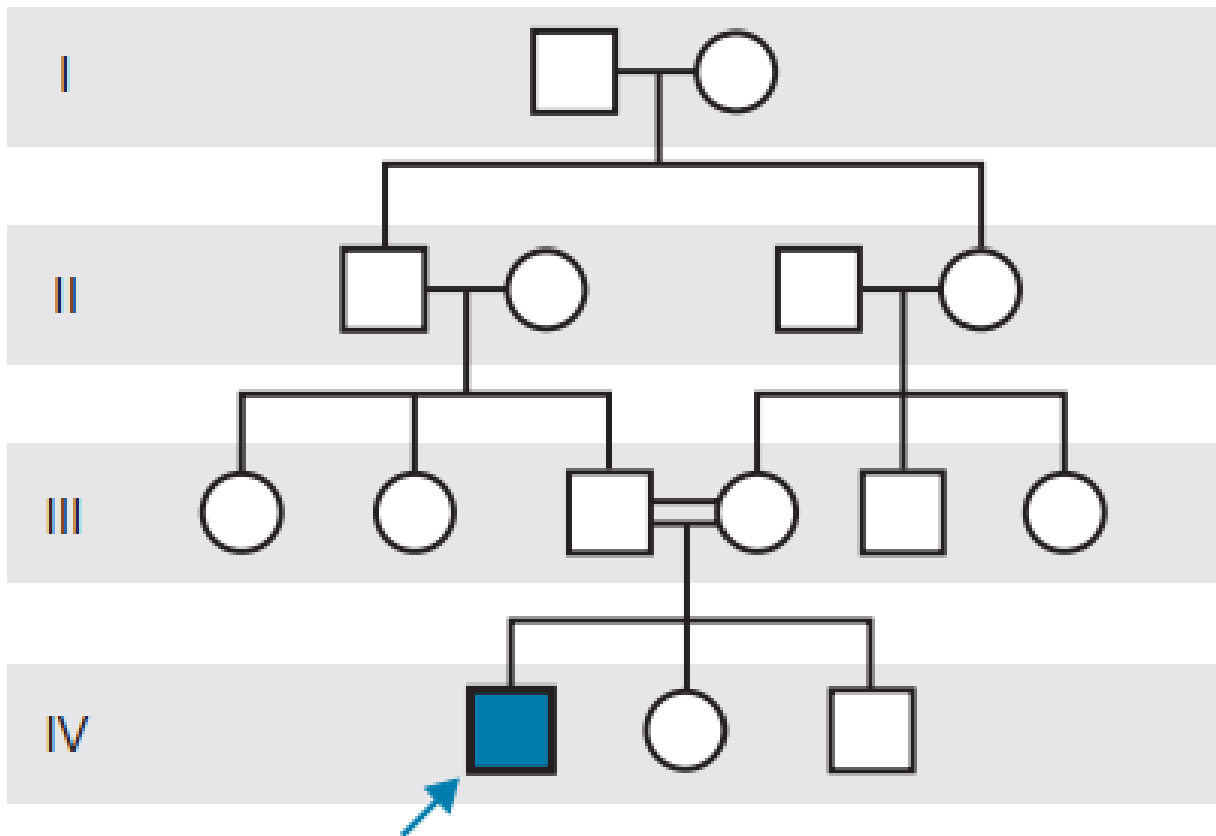


Figure 7-2 Symbols commonly used in pedigree charts. Although there is no uniform system of pedigree notation, the symbols used here are according to recent recommendations made by professionals in the field of genetic counseling.

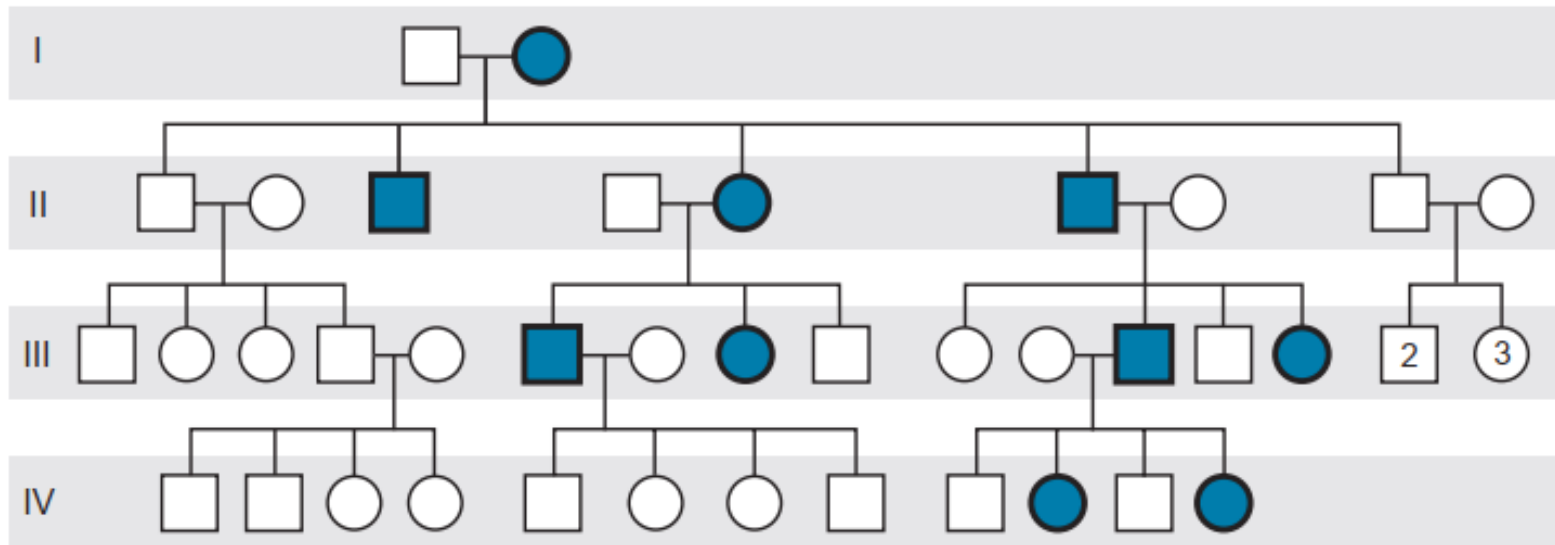
Аутосомно-рецессивный тип наследования



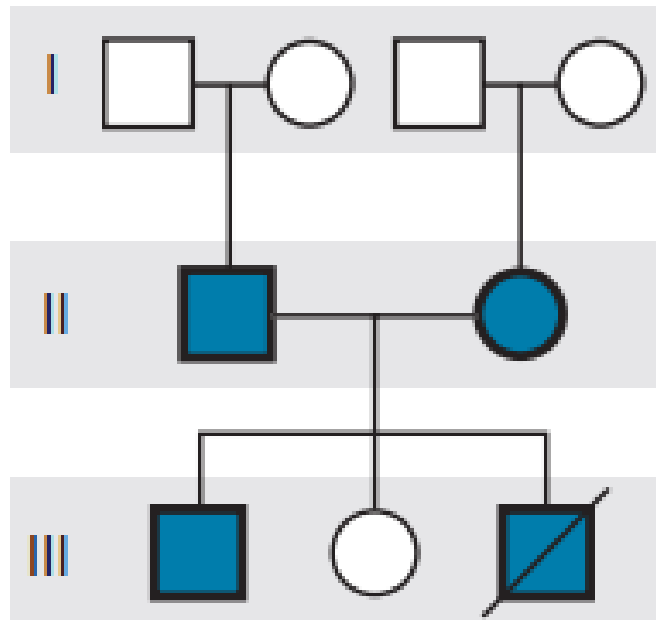
A pedigree chart illustrating four generations (I, II, III, IV) of a family. Generation I consists of an unaffected male and an unaffected female. Generation II shows two couples, both with one unaffected male and one unaffected female. Generation III shows the offspring of the first couple in Generation II, including two unaffected females, one affected male (shaded blue), and one unaffected female. Generation IV shows the offspring of the affected male in Generation III, including one affected male (shaded blue) and two unaffected females. A blue arrow points to the affected male in Generation IV.



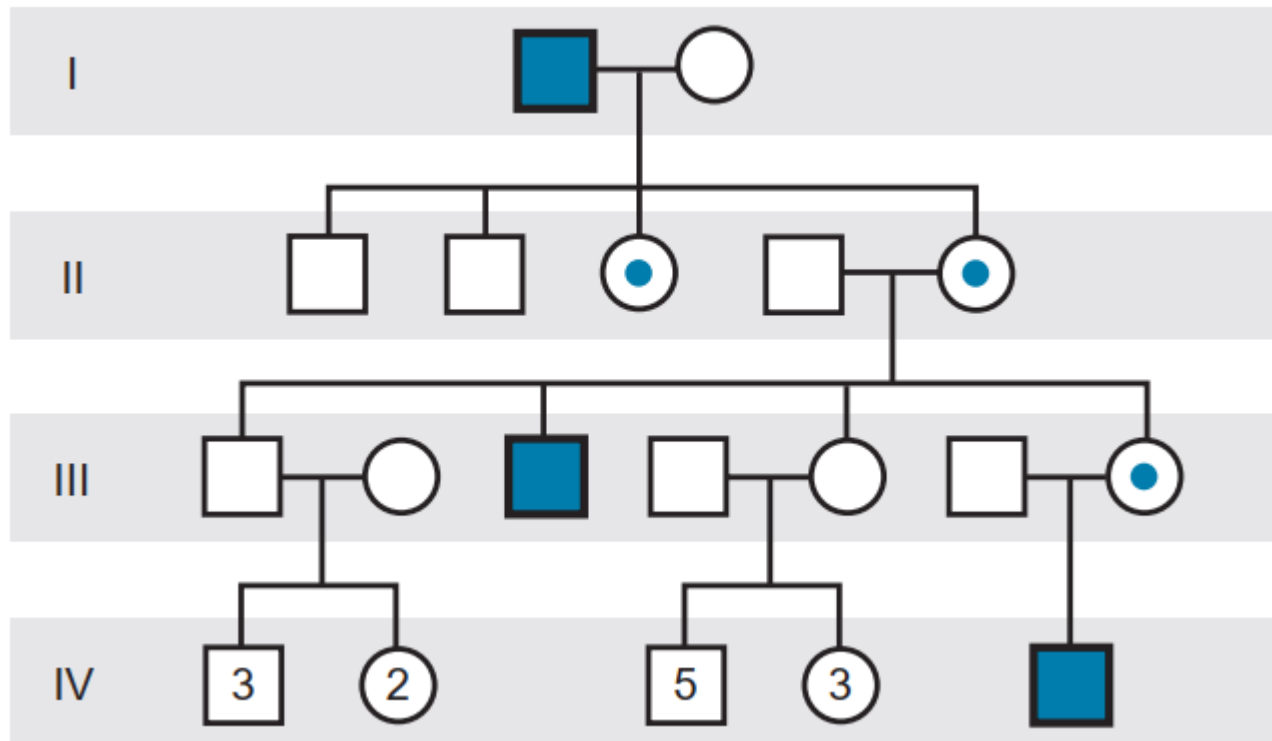
Аутосомно-доминантный тип наследования



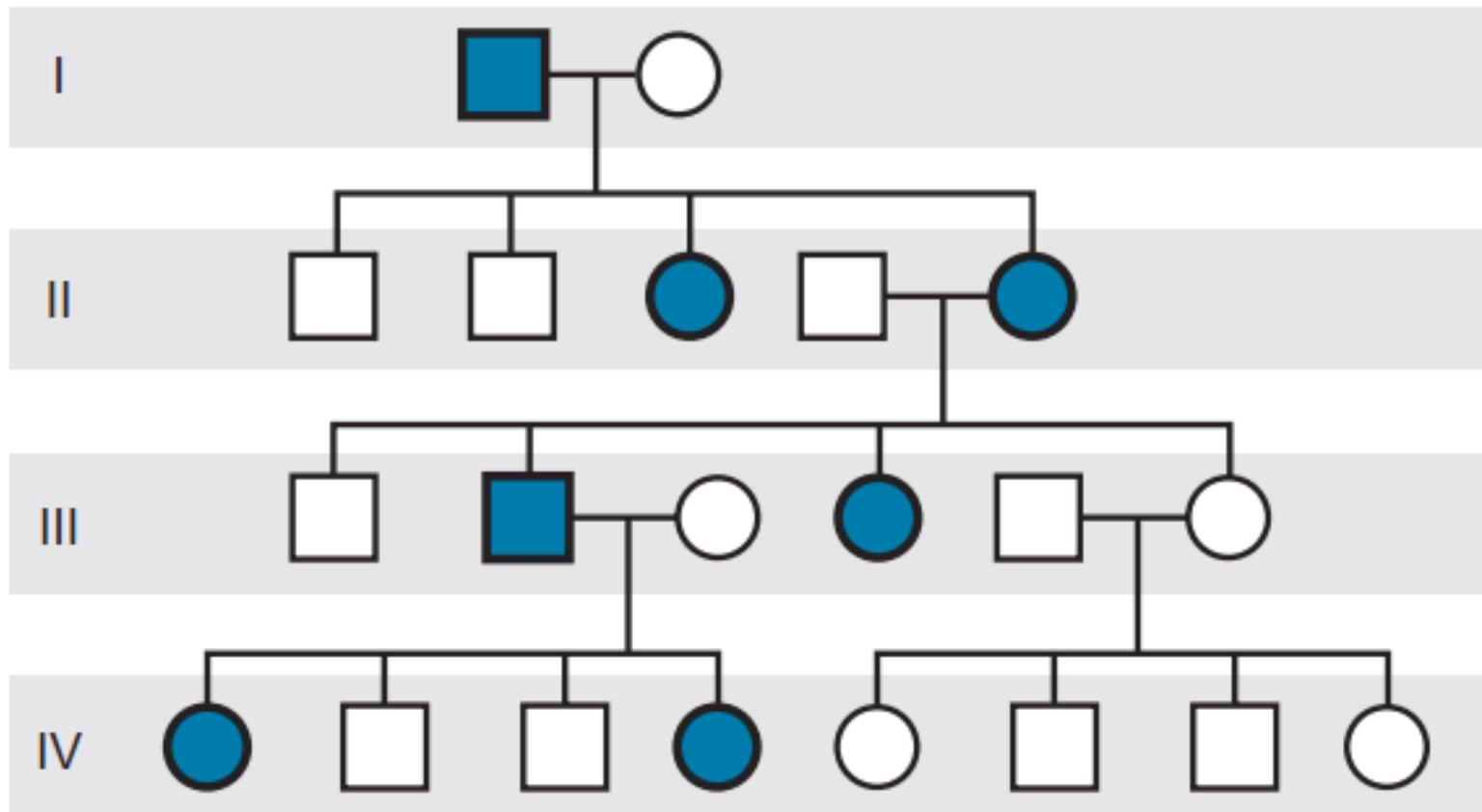
Аутосомно-доминантный тип наследования



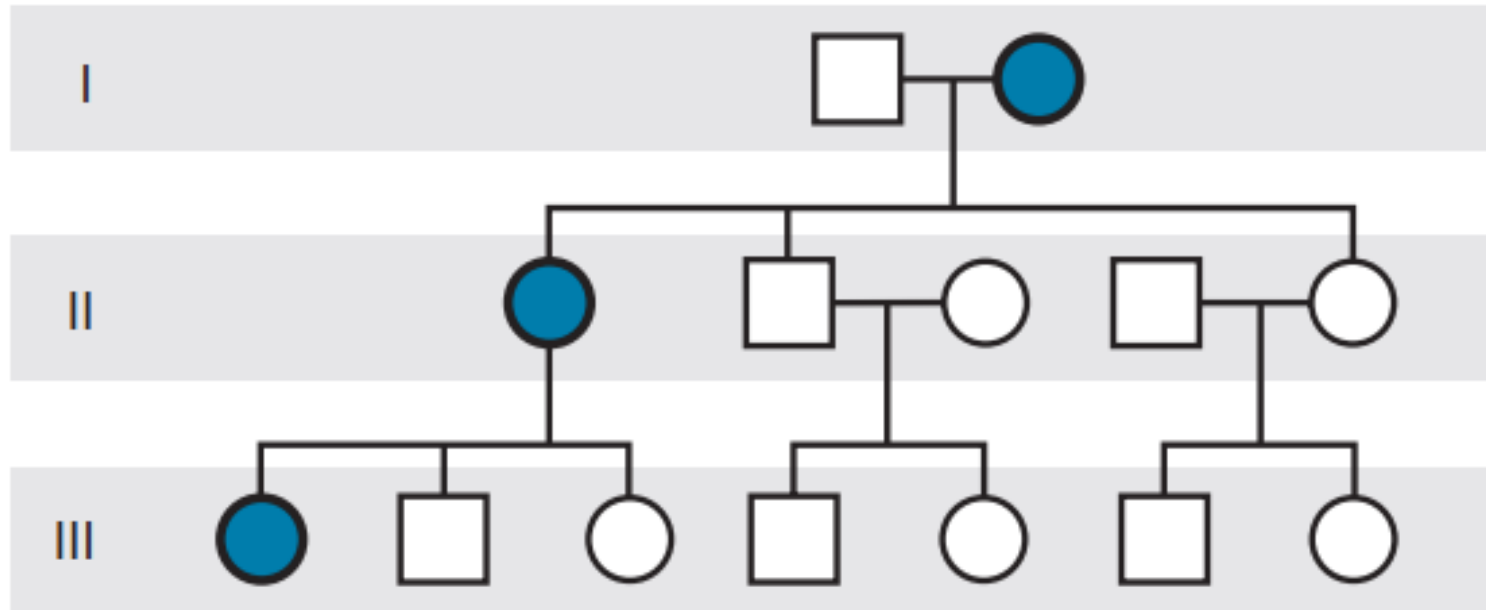
X-сцепленное рец. наследование

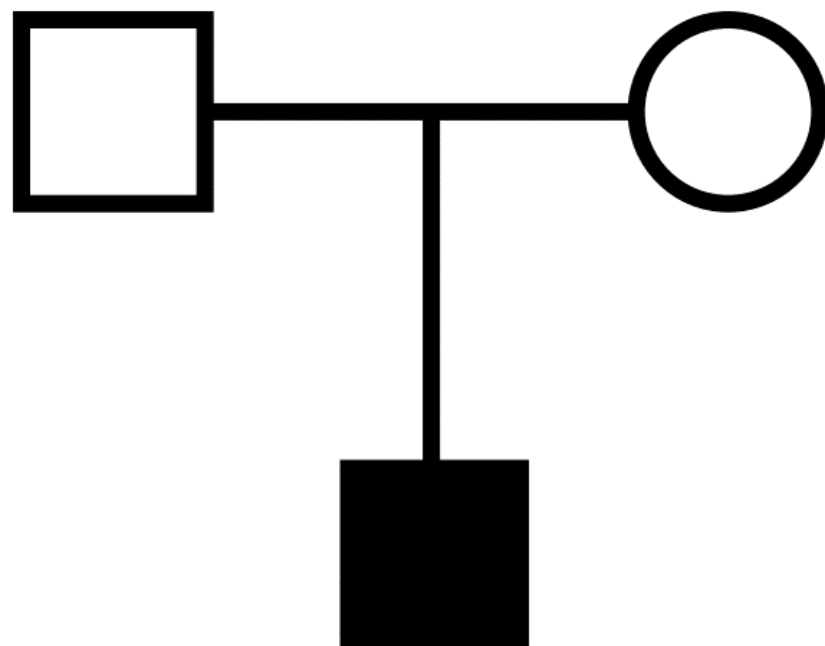


X-сцепленное дом. наследование



Х-сцепленное дом. наследование





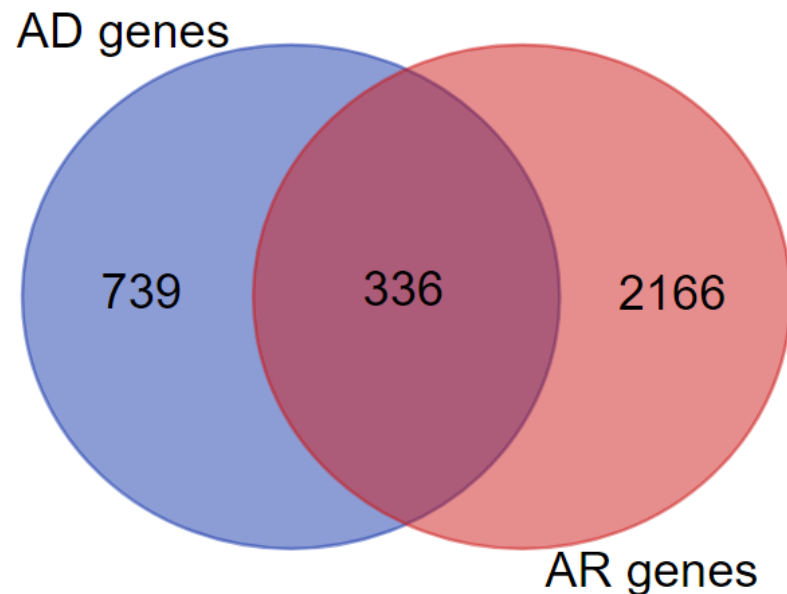
Молекулярные эффекты различных SNV

Теория Мёллера

- **аморфные (loss-of-function)** - мутация выглядит, как полная потеря функции гена
- **гиперморфные (gain-of-function аллели)** — приводят к увеличению активности продукта гена
- **антиморфные (dominant negative)** - мутантный признак изменяется, на противоположный
- **неоморфные** — аллели, функция которых изменилась кардинально
- **гипоморфные (reduction-of-function)** - измененные аллели с пониженной экспрессией или функцией
- **изоморфные аллели** - продукт гена с мутантного аллеля имеет ту же активность, что и с дикого типа.

Механизмов патогенеза наследственных заболеваний очень много и они разные

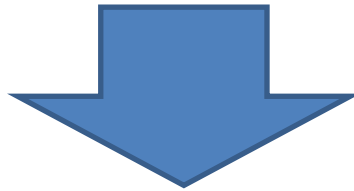
- **аморфные (loss-of-function)** - мутация выглядит, как полная потеря функции гена
- **гиперморфные (gain-of-function аллели)** — приводят к увеличению активности продукта гена
- **антиморфные (dominant negative)** - мутантный признак изменяется, на противоположный
- **неоморфные** — аллели, функция которых изменилась кардинально
- **гипоморфные (reduction-of-function)** - измененные аллели с пониженной экспрессией или функцией
- **изоморфные аллели** - продукт гена с мутантного аллеля имеет ту же активность, что и с дикого типа.



Loss-of-function variants

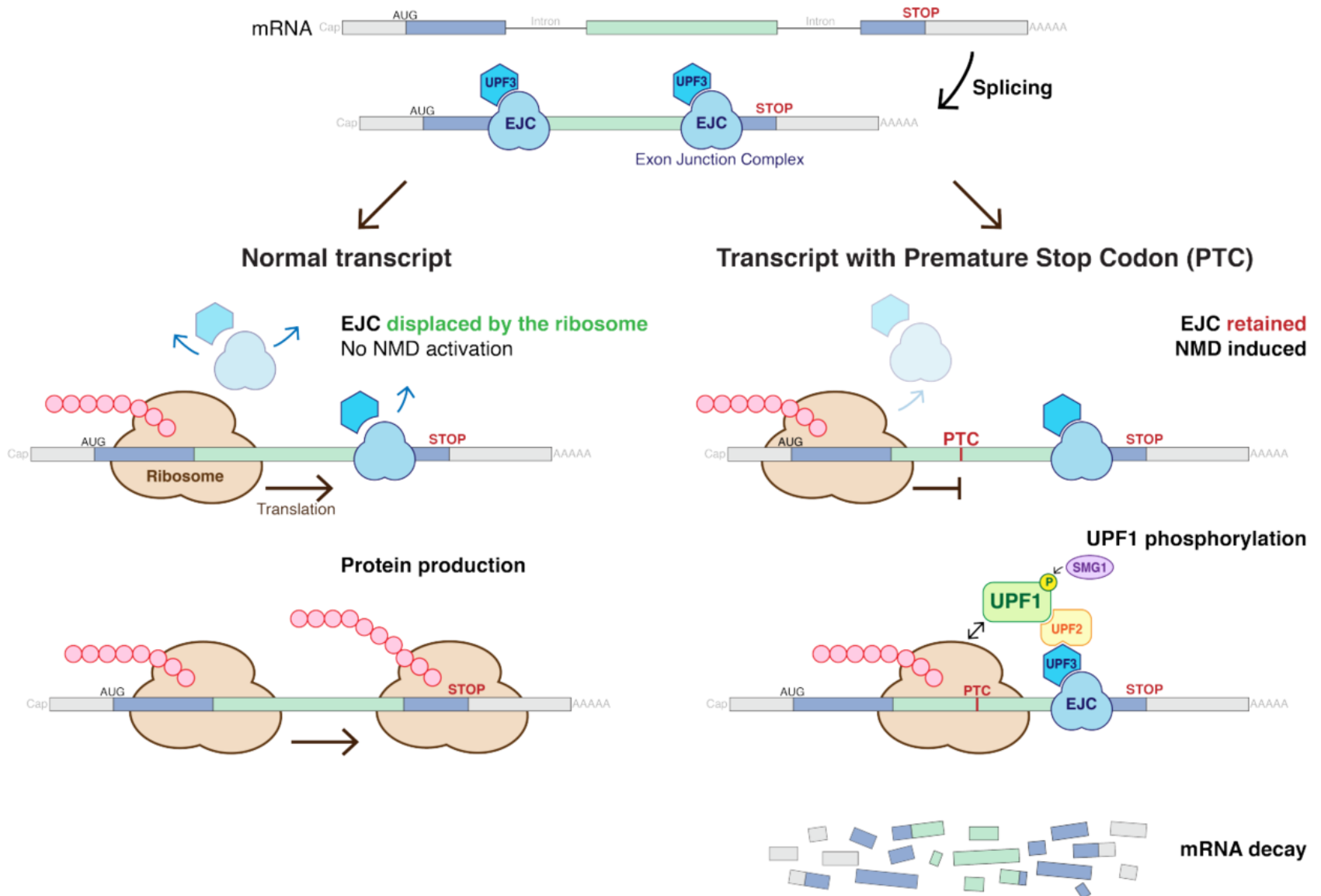
Loss-of-function variants

- Nonsense
- Splicing variants
- Frame-shifting indels
- Gross deletions

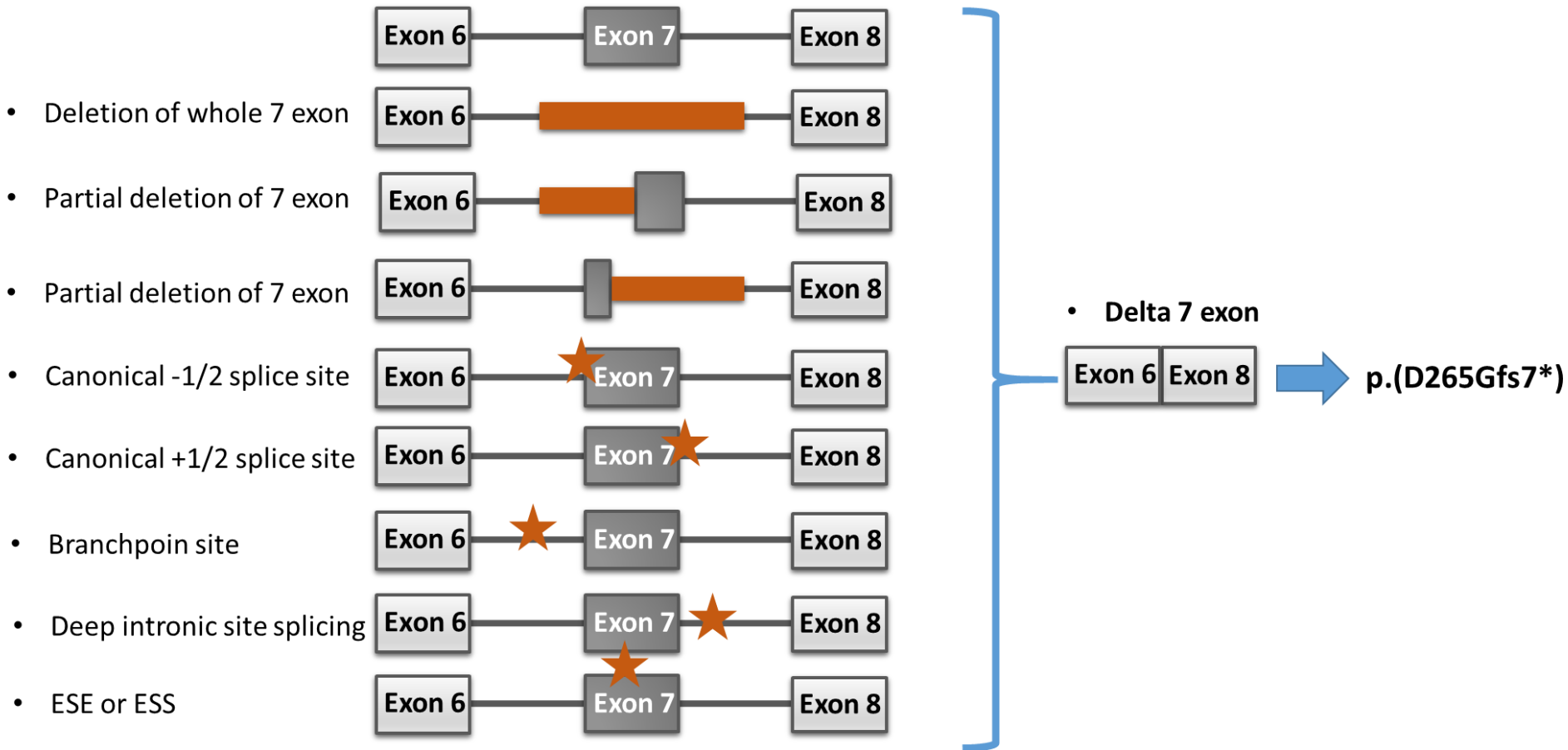


Преждевременный стоп-кодон

Nonsense-mediated decay



Loss-of-function variants

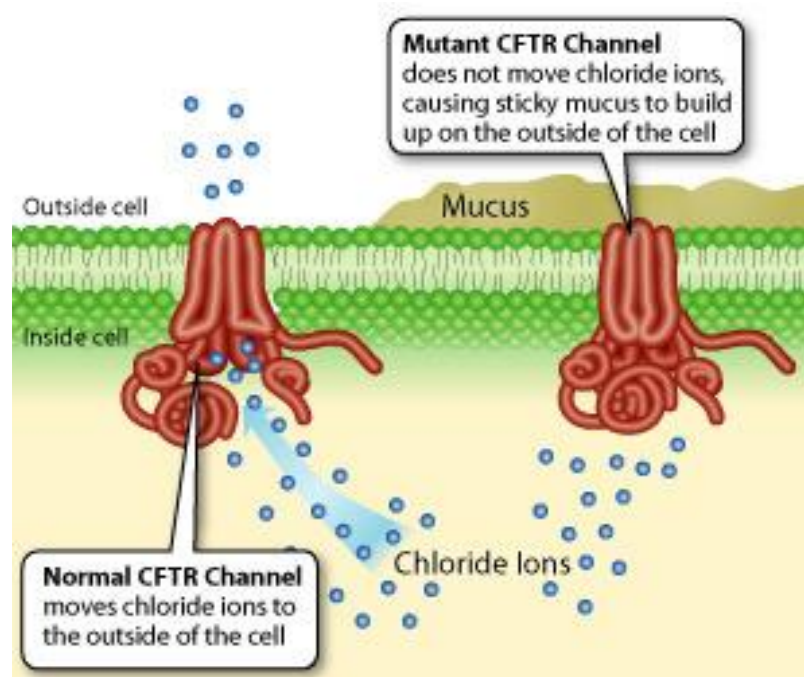


Loss-of-function variants

- Missense — если затрагивает активный центр белка, приводит к нарушению сплайсинга;
- Synonymous (silent) — если приводит к нарушению сплайсинга, нарушает фолдинг белка.

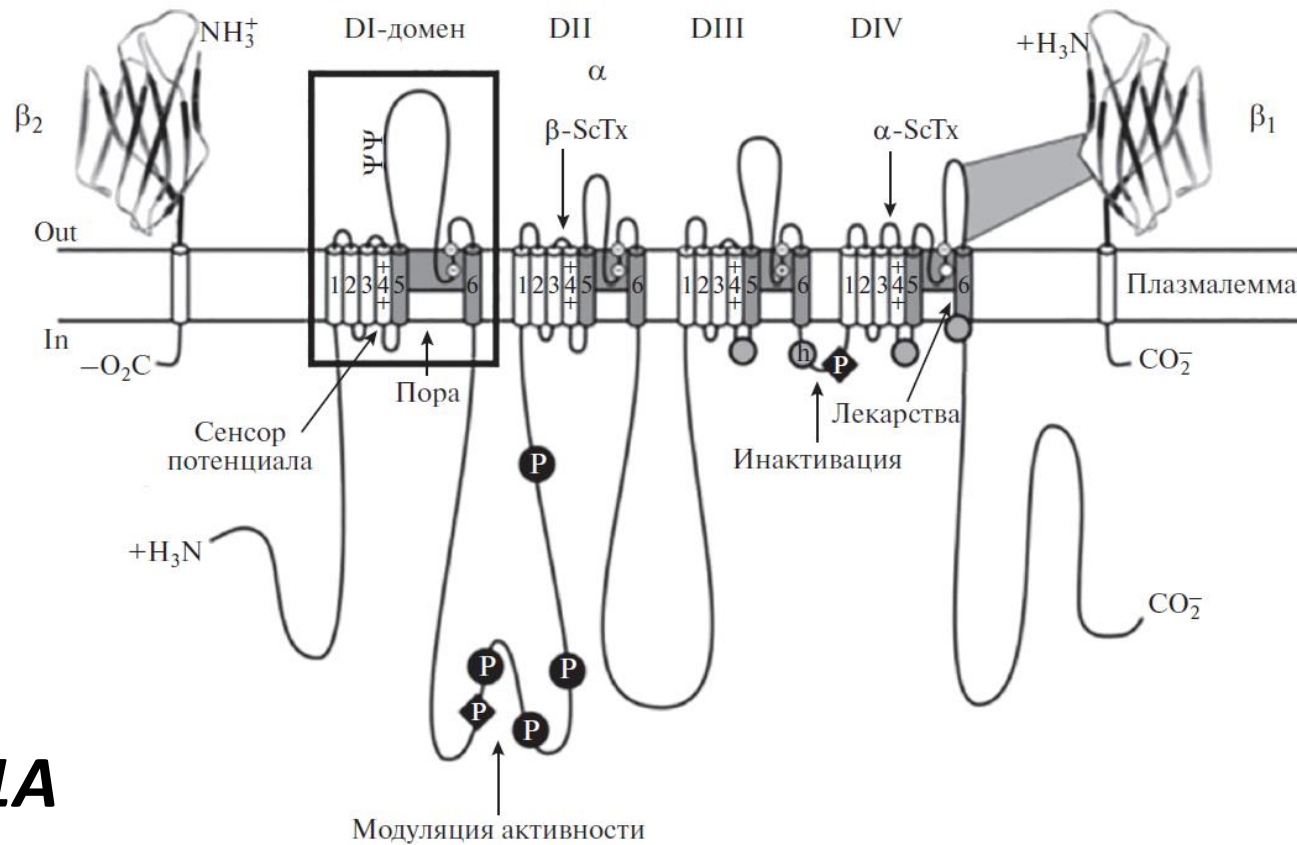
Последствия LoF вариантов

- Варианты с потерей функции в основном рецессивны, так как второй здоровой копии гена обычно хватает для выполнения нормальной функции
- Классический пример — муковисцидоз



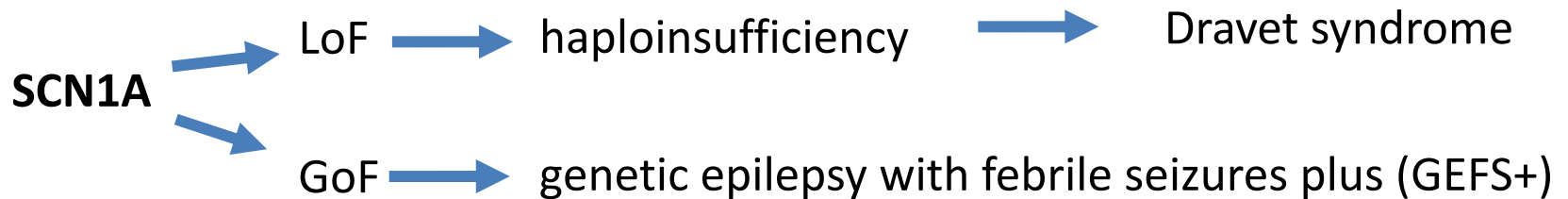
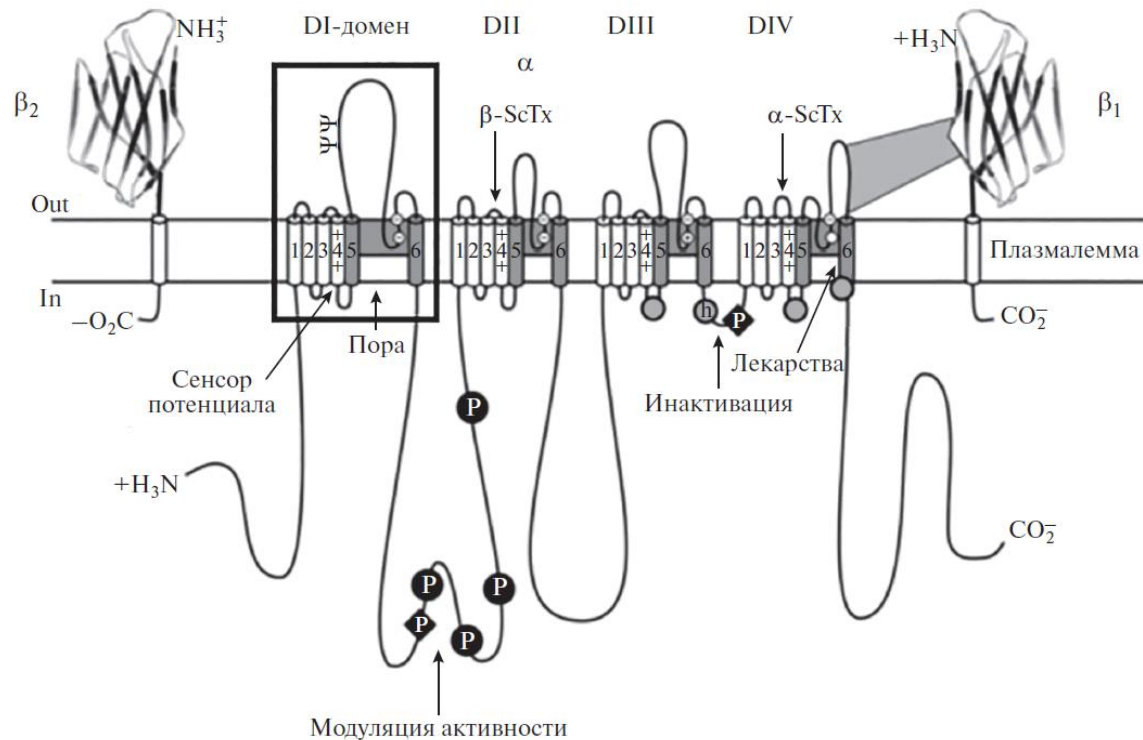
Исключения — гаплонедостаточность

- «одной копии не достаточно!»



SCN1A

Gain-of-Function



Метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp)

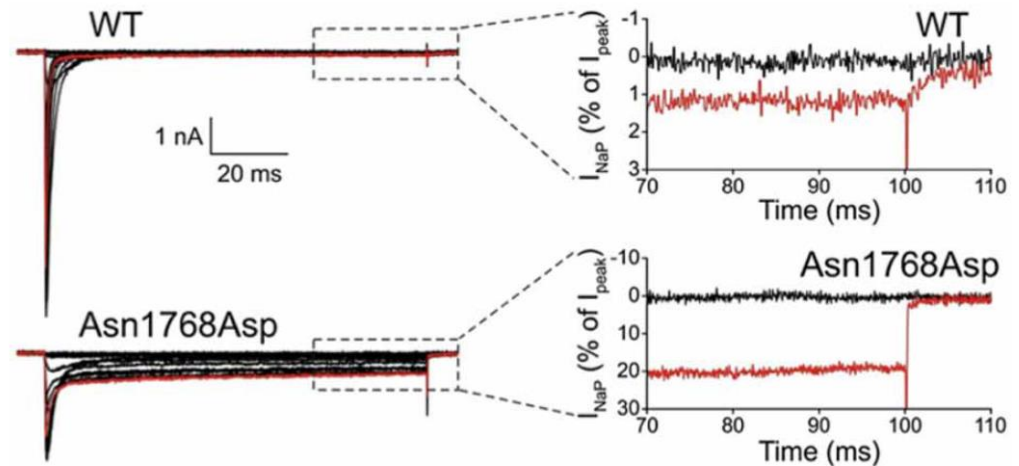
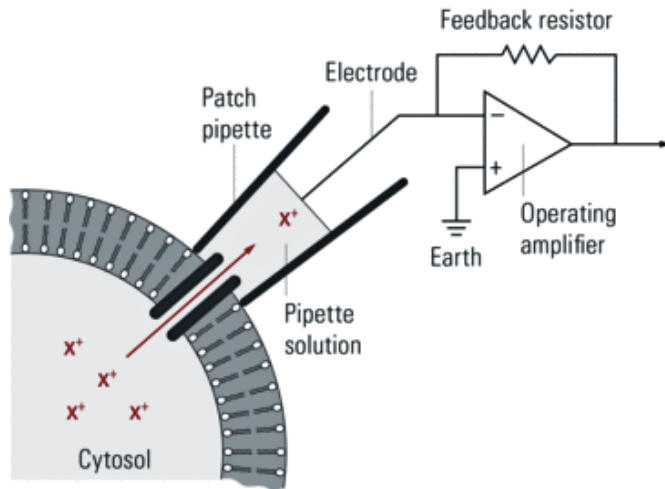


FIGURE 1 | Increased persistent current in *SCN8A*-p.Asn1768Asp mutant channel. Wildtype and mutant cDNAs were transiently transfected into the neuronal cell line ND7/23. At 100 ms after induction of an action potential, cells expressing the mutant cDNA had 20% persistent current compared with 1% in the wildtype. Cells were held at -120 mV, and a

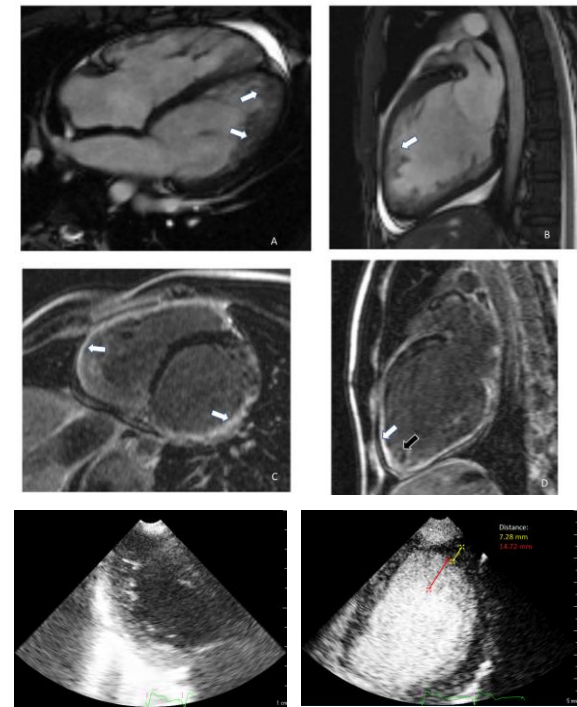
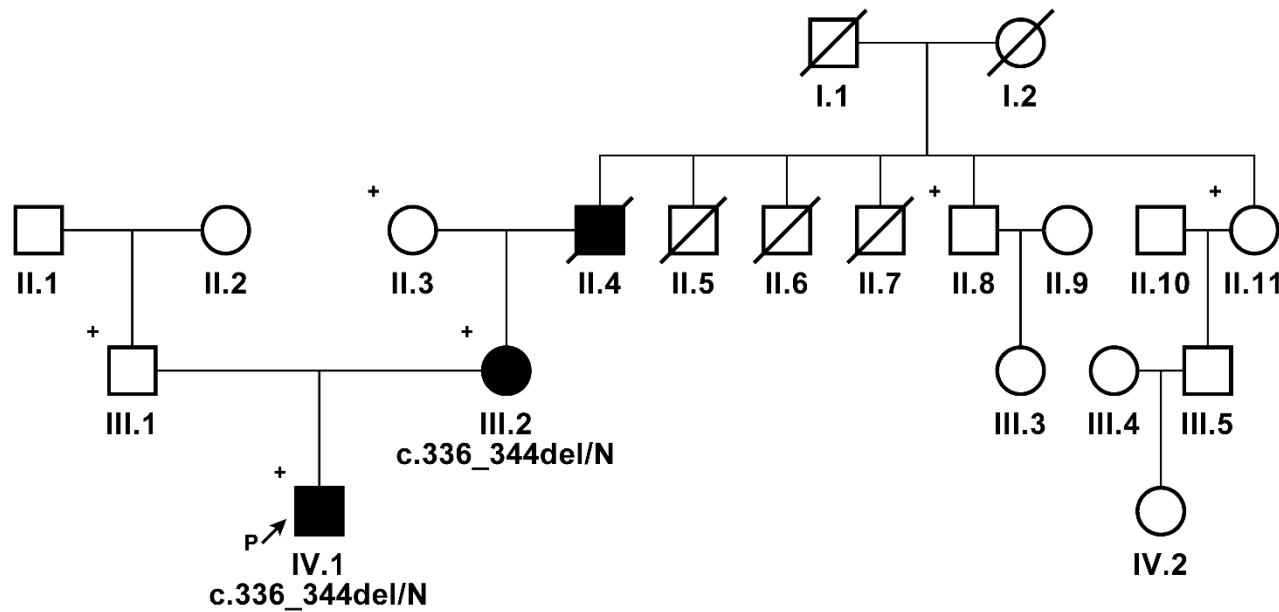
Gain-of-Function

Functional Effects of the *SCN1A* Sodium Channel Mutations that Cause GEFS+

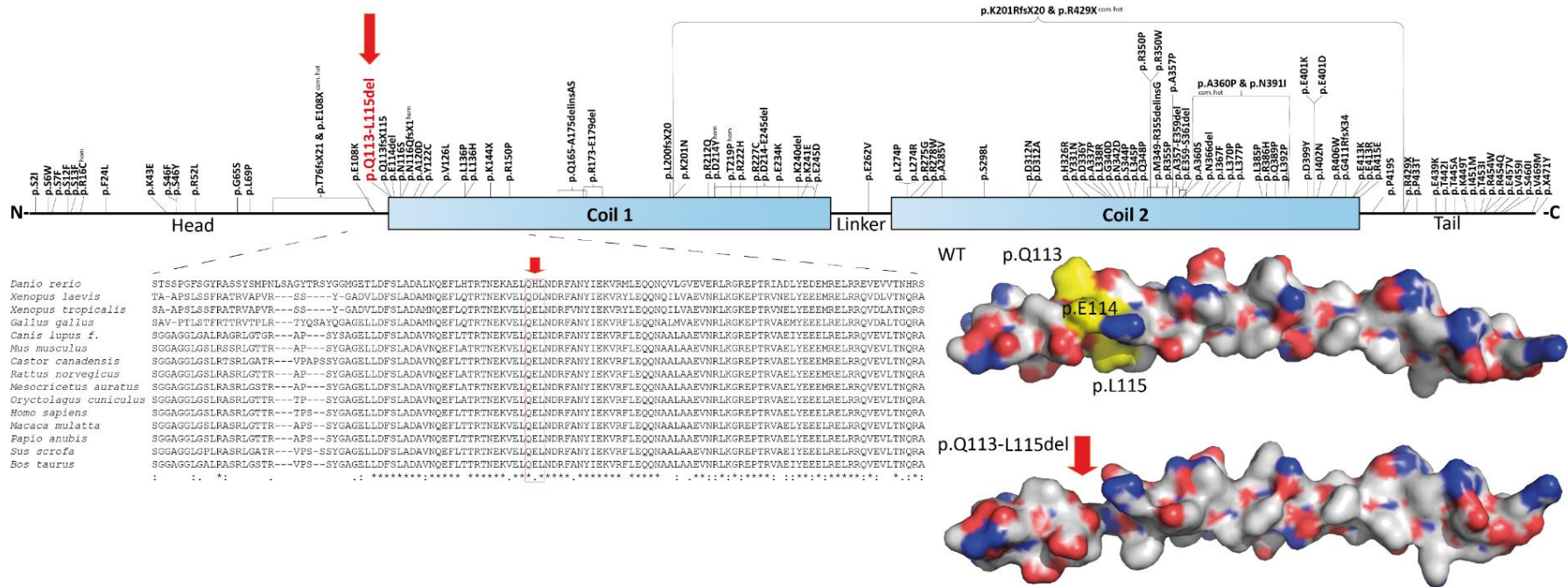
Increased Sodium Channel Activity			
Mutation	Channel	Cell Type	Effects
D188V	rNa _v 1.2	HEK	↓ Use-dependence, Faster recovery from slow inactivation
T875M	rNa _v 1.1	<i>Xenopus</i> oocytes	↑ Persistence
W1204R	rNa _v 1.1	<i>Xenopus</i> oocytes	Negative voltage-dependence
W1204R	hNa _v 1.1	tsA201	↑ Persistence
R1648H	rNa _v 1.1	<i>Xenopus</i> oocytes	↓ Use-dependence, Faster recovery
R1648H	hNa _v 1.1	tsA201	↑ Persistence
R1648H	hNa _v 1.4	tsA201	Faster recovery
R1648C	rNa _v 1.1	tsA201	↑ Persistence
D1866Y	rNa _v 1.1	<i>Xenopus</i> oocytes	↑ Persistence
Decreased Sodium Channel Activity			
Mutation	Channel	Cell Type	Effects
R859C	rNa _v 1.1	<i>Xenopus</i> oocytes	Positive Voltage-dependence, Slower recovery from slow inactivation, ↓ Current
T875M	rNa _v 1.1	<i>Xenopus</i> oocytes	↑ Slow inactivation
T875M	hNa _v 1.4	tsA201	↑ Fast and slow inactivation
V1353L	hNa _v 1.1	tsA201	No sodium current
I1656M	hNa _v 1.1	tsA201	Positive voltage-dependence
R1657C	hNa _v 1.1	tsA201	Positive voltage-dependence, ↓ Current
A1685V	hNa _v 1.1	tsA201	No sodium current

Gain of function (dominant negative effect)

- Пациентка с миофибриллярной миопатией

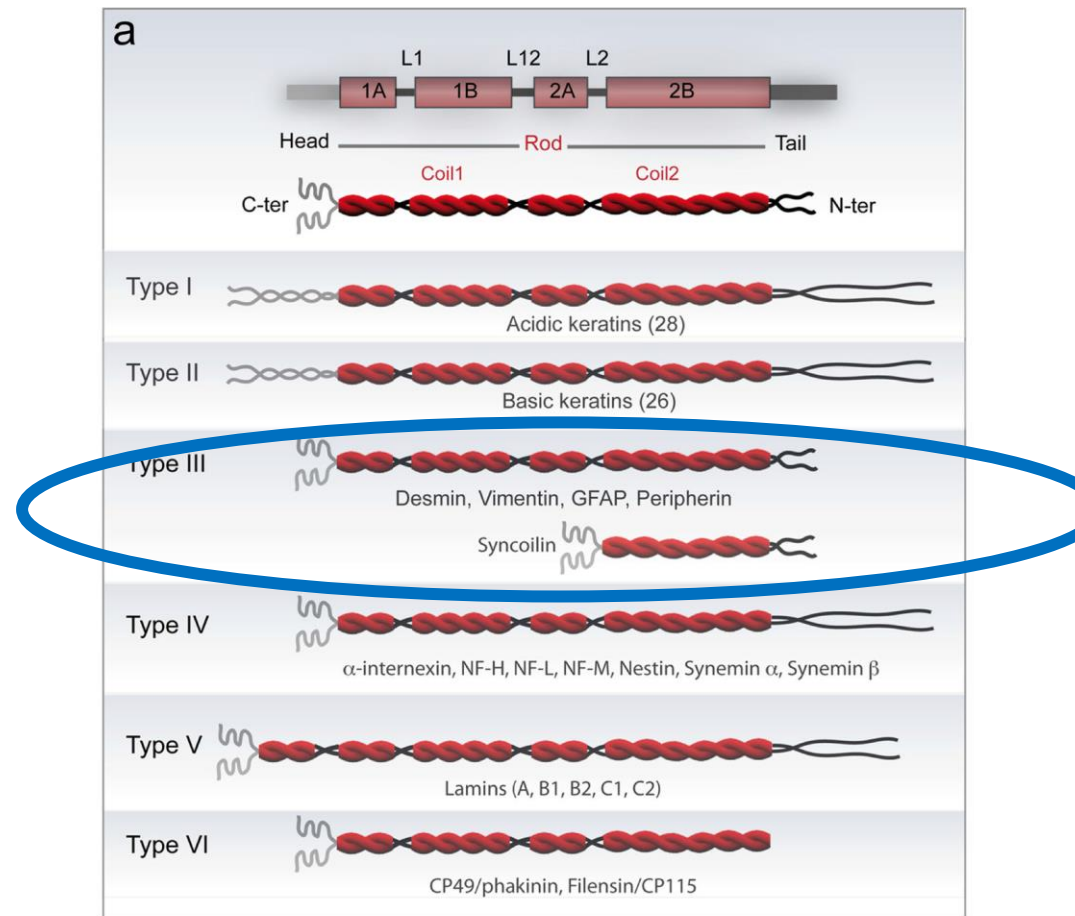
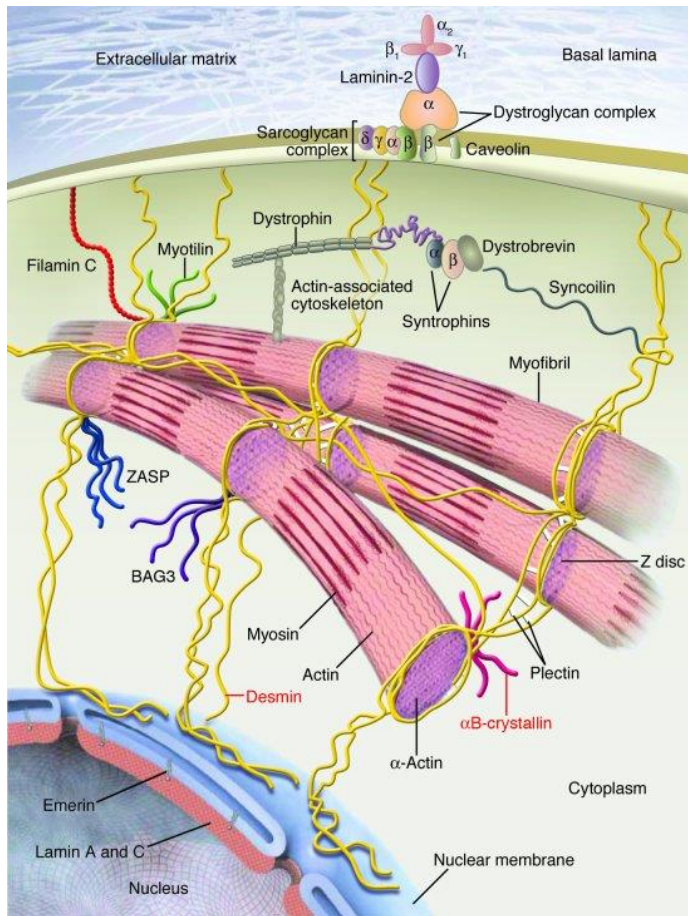


Gain of function (dominant negative effect)



Location	Phenotype	Phenotype MIM number	Inheritance	Phenotype mapping key	Gene/Locus	Gene/Locus MIM number
2q35	Myopathy, myofibrillar, 1	601419	AD, AR	3	DES	125660

Десмин — белок промежуточных филаментов



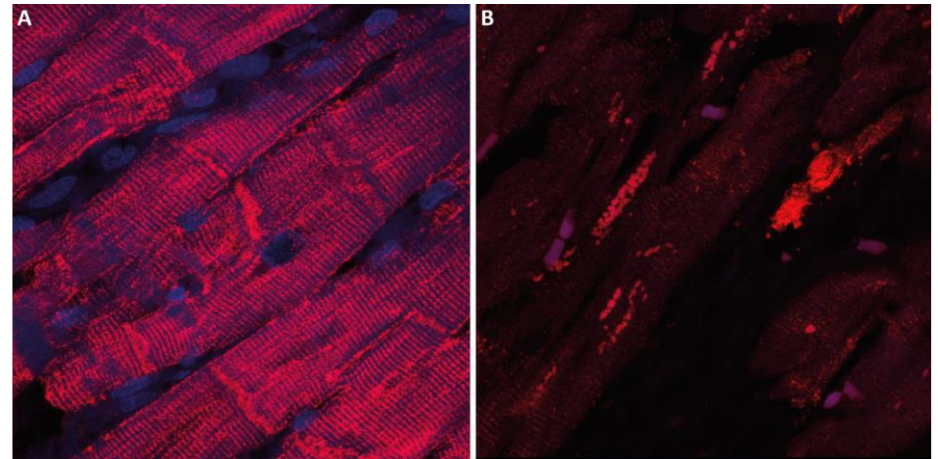
- Общая структура белков промежуточных филаментов и механизм полимеризации

Эффекты мутаций в гене DES

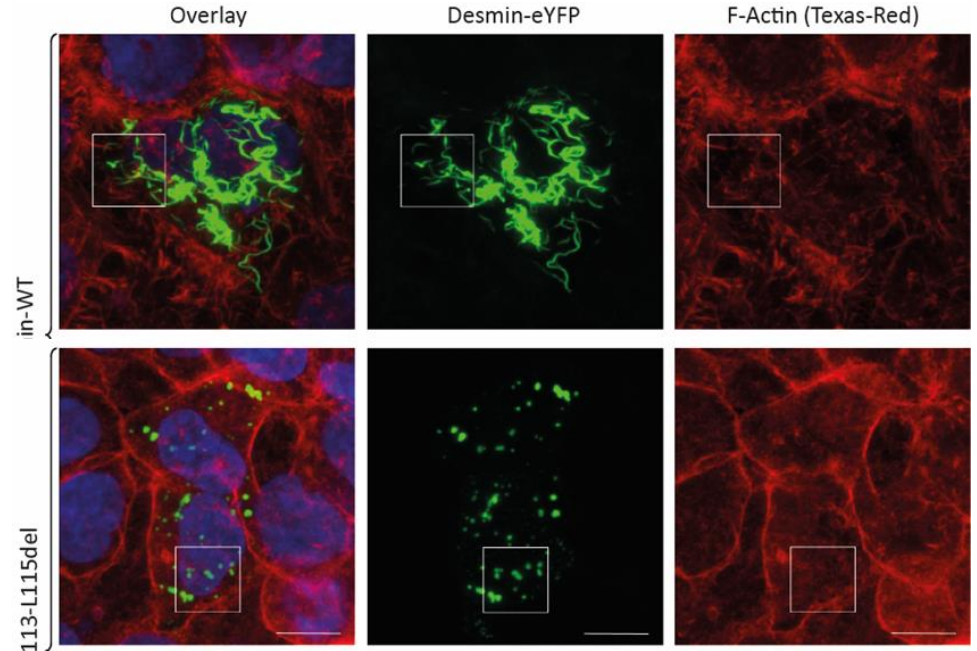
- Нарушение образования сети филаментов -> образование агрегатов в цитоплазме (->) приобретение токсического эффекта
 - нарушение образования вставочных дисков сердечной мышцы
 - нарушение распределение митохондрий в мышце
 - нарушение сократимости сердца

Functional study

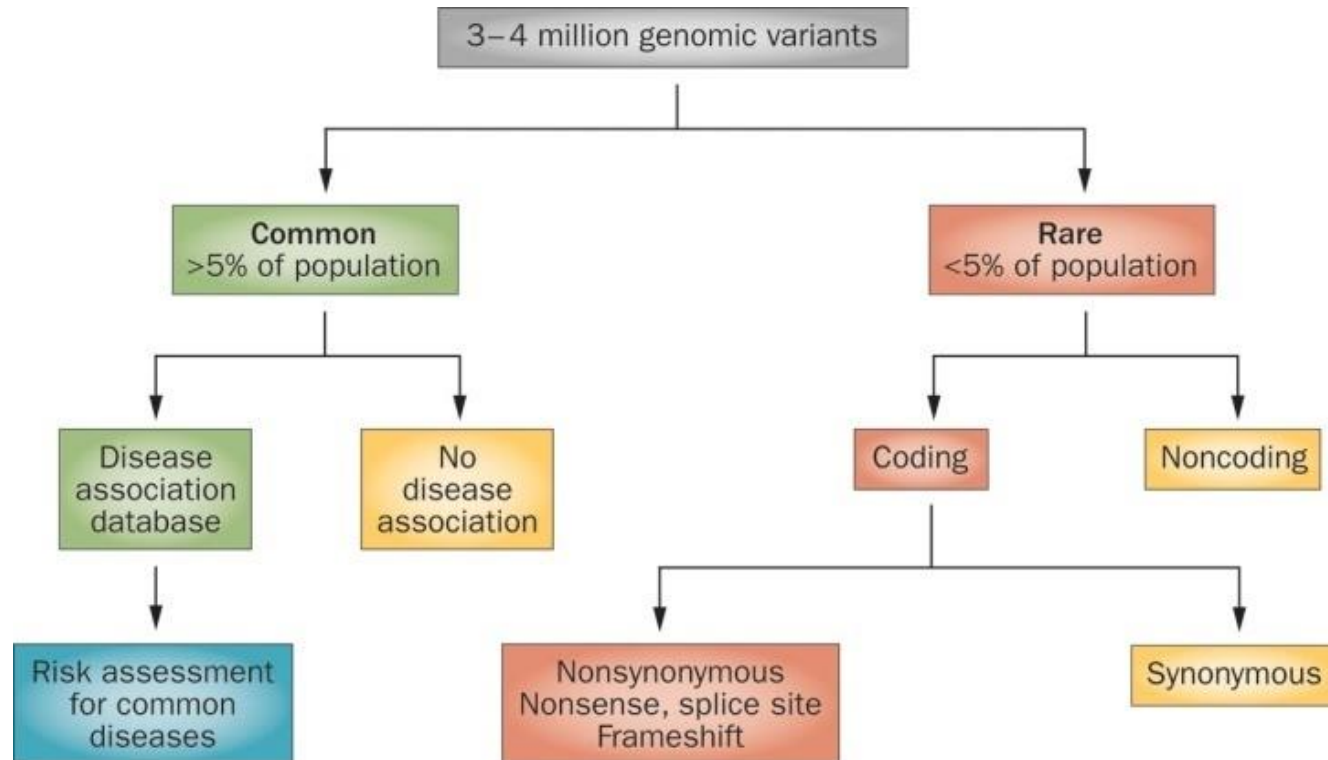
- Immunohistochemistry analysis of explanted myocardial tissue of a non-failing heart **(A)** and of the index patient IV.1 **(B)** using anti-desmin antibodies (red) and 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, blue).



- Cell transfection studies. Wild-type desmin (green) forms typical intermediate filaments, whereas the mutation DES-c.336_344del forms cytoplasmic aggregates of different shape and size. F-actin was labeled with phalloidin conjugated with Texas Red (red) and the nuclei were labelled with DAPI (blue).



Где мы ищем мутации в генах?



5' UTR

CDS

3' UTR

Как мы ищем мутации в генах?

(Original)

DNA sequence: A A T G C A T A T G C A
amino acid sequence: Leu -- Arg -- Ile -- Arg

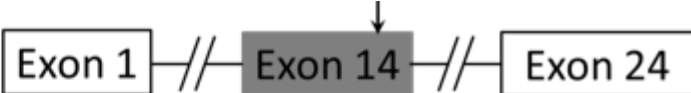
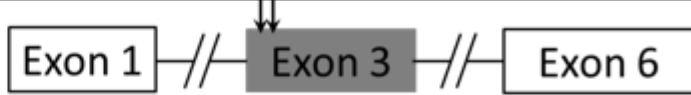
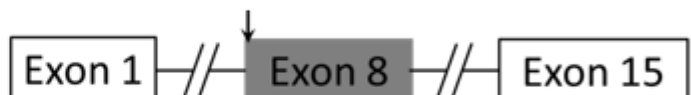
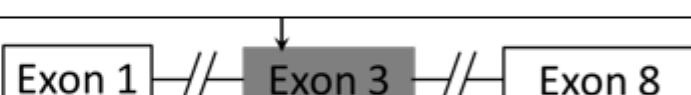
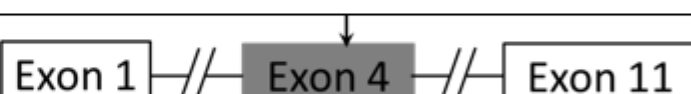
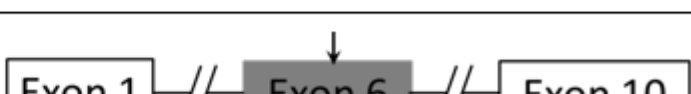

(Mutated)

DNA sequence: A A T T C A T A T G C A
amino acid sequence: Leu -- Ser -- Ile -- Arg

Синонимичные варианты нуклеотидной последовательности

I	C	I	K	A	L	V	L
Ile	Cys	Ile	Lys	Ala	Leu	Val	Leu
ATA	TGT	ATA	AAG	GCA	CTG	GTC	CTG
↓						↓	
ATC	TGT	ATA	AAG	GCA	CTG	GTA	CTG
Ile	Cys	Ile	Lys	Ala	Leu	Val	Leu

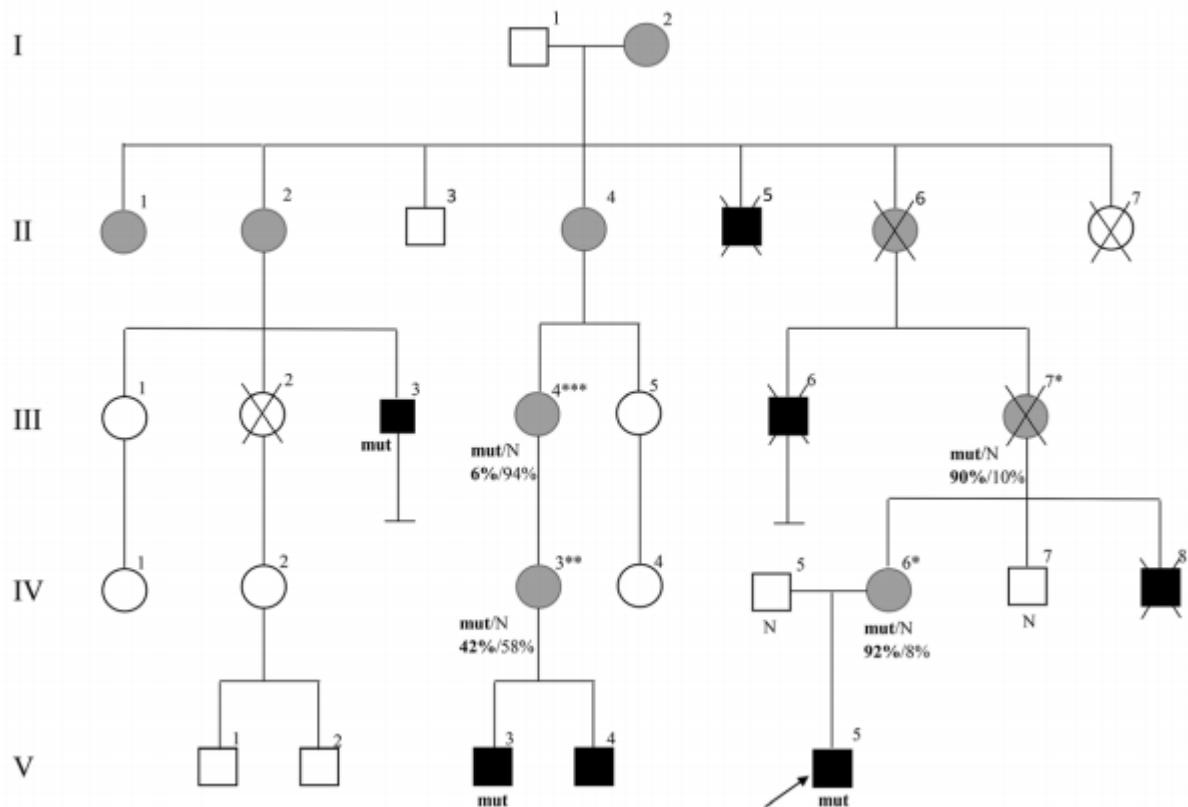
Патогенные синонимичные варианты нуклеотидной последовательности

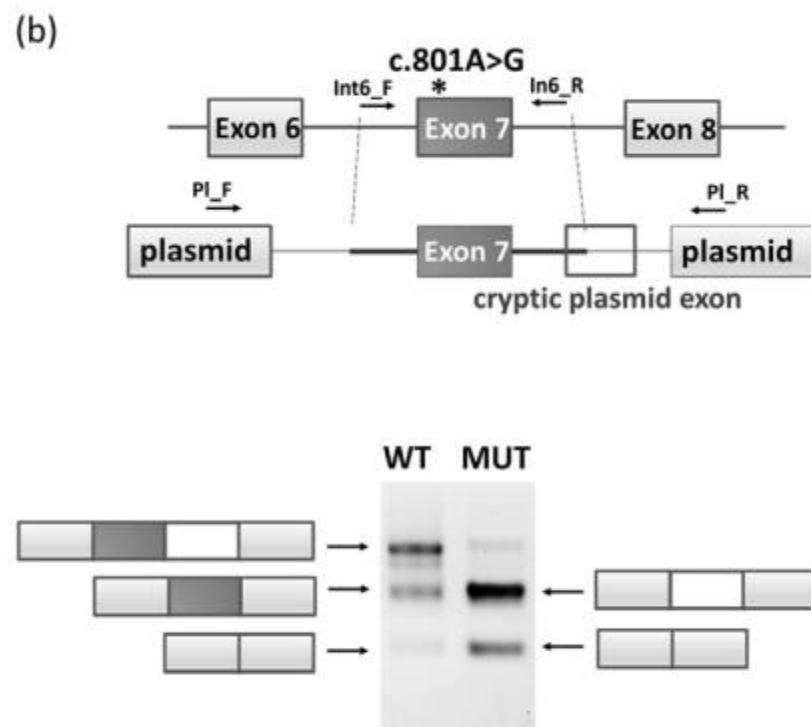
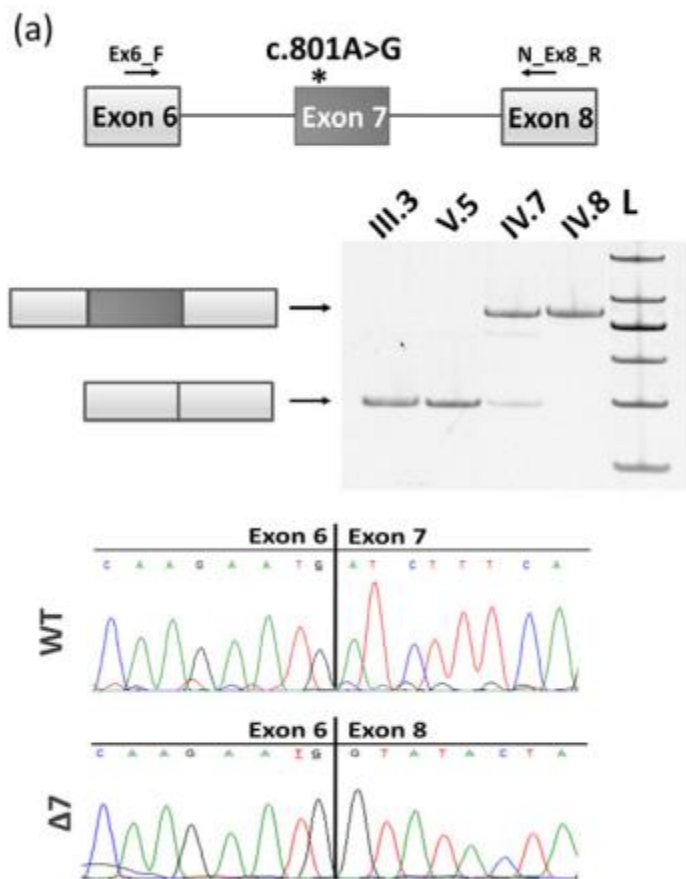
SMA	UBA1	
Болезнь Шарко-Мари-Тут тип 1В	MPZ	
<u>Поликистоз почек</u>	PDK2	
ТКИД	IL7R	
Синдром Барт	TAZ	
Дефицит <u>ацил-КоА-дегидрогеназы</u> коротких цепей	ACADS	
Синдром <u>Нагер</u>	SF3B4	

Механизмы патогеннетического действия синонимичных вариантов

- Влияние на сплайсинг
- Влияние на время жизни мРНК
- Влияние на формирование вторичной структуры РНК
- Влияние на функции белка

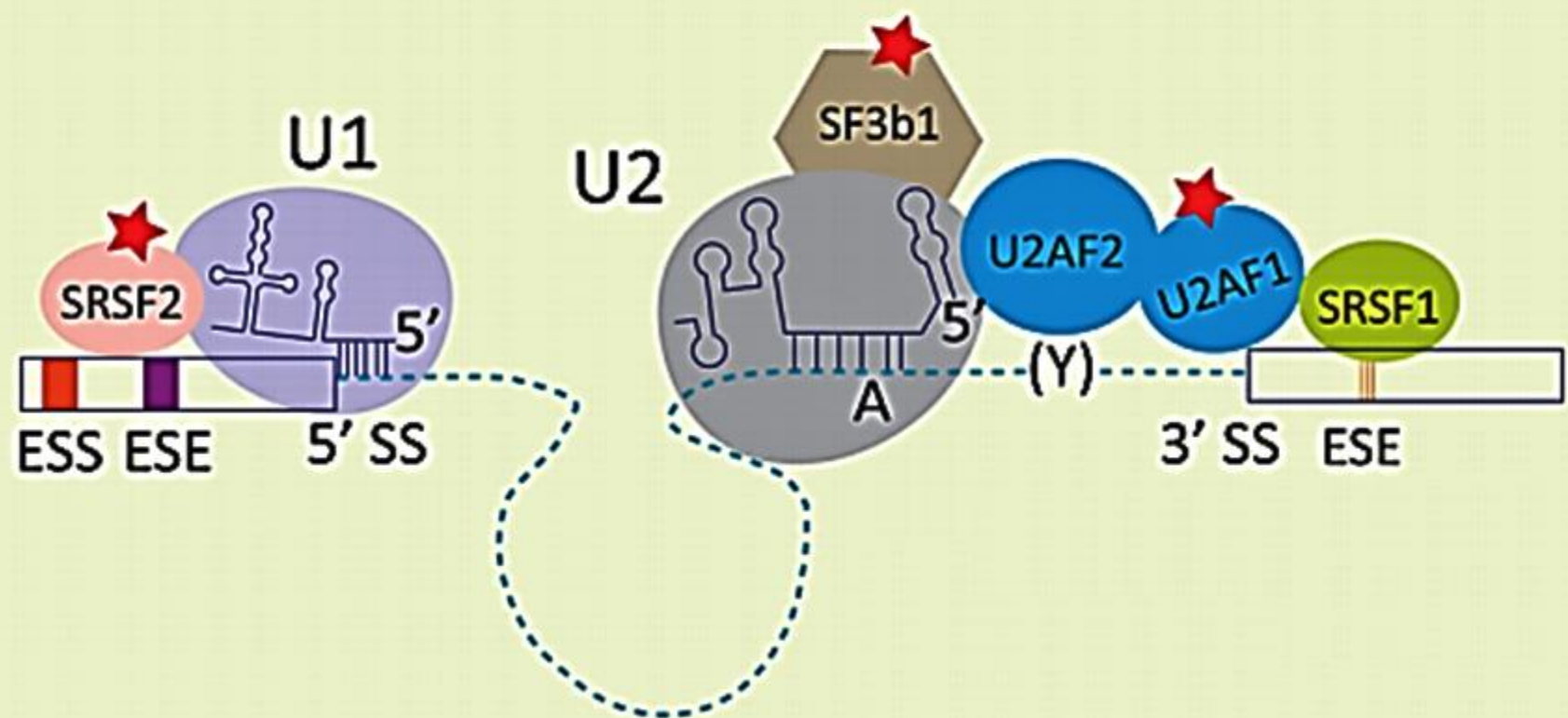
X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia: clinical and molecular genetic analysis of a large Russian family with a synonymous p.Ser267= (c.801A>G) splice site mutation



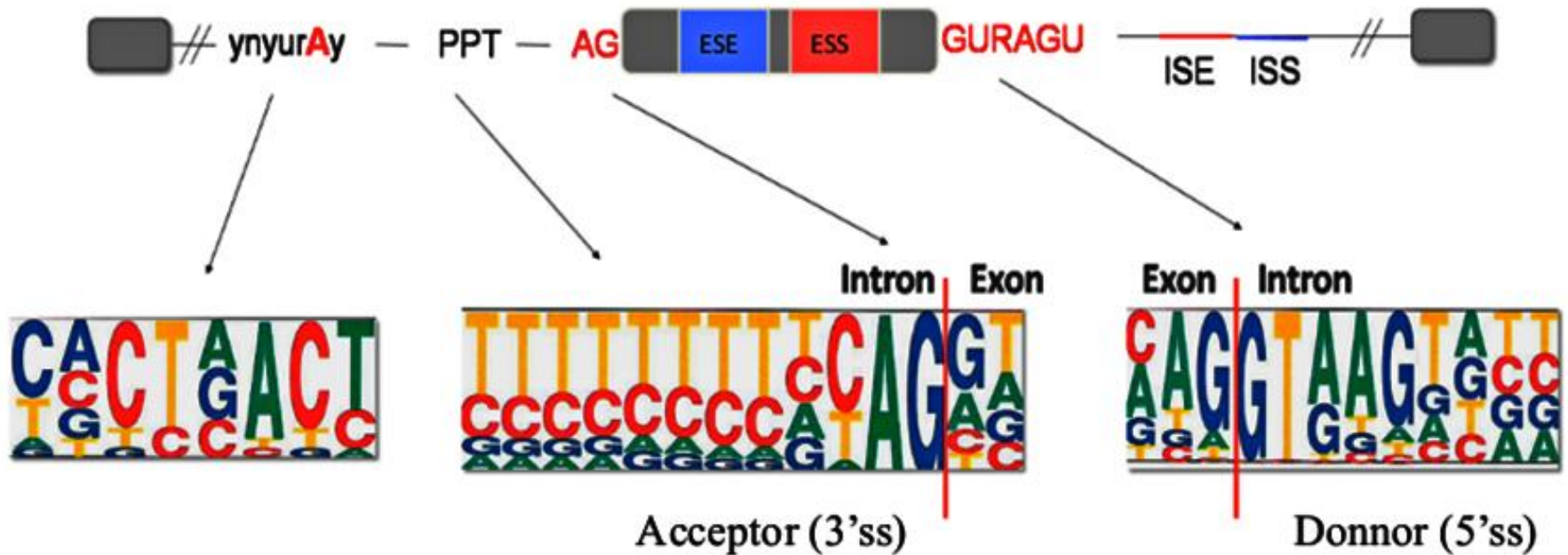


Варианты сплайсинга

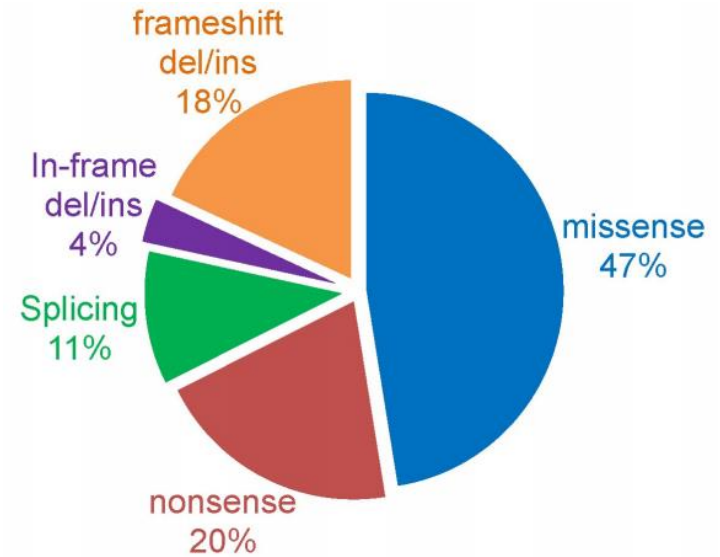
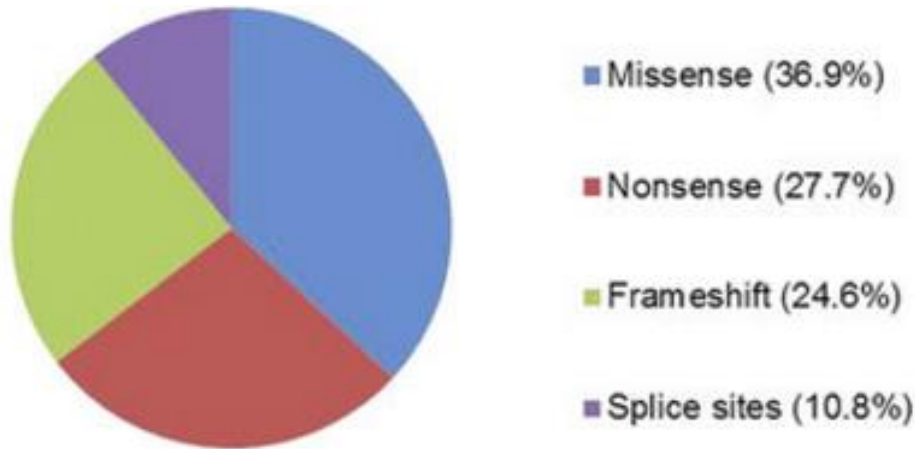
Major Spliceosome Assembly



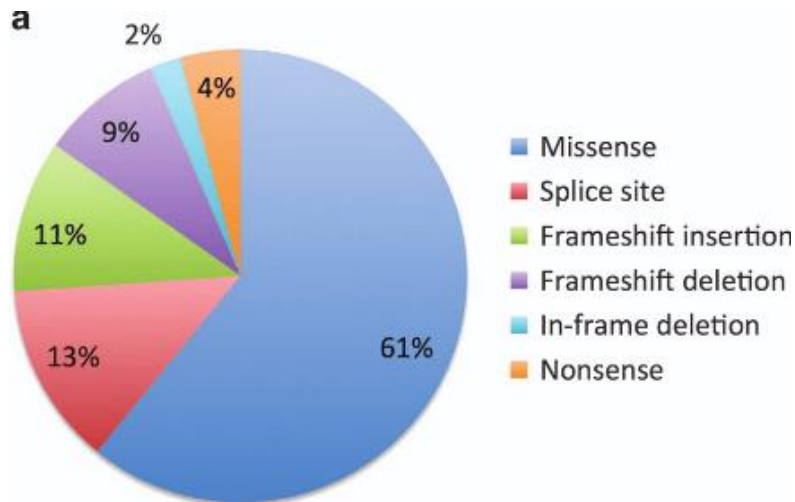
Важные участки влияющие на прохождения сплайсинга



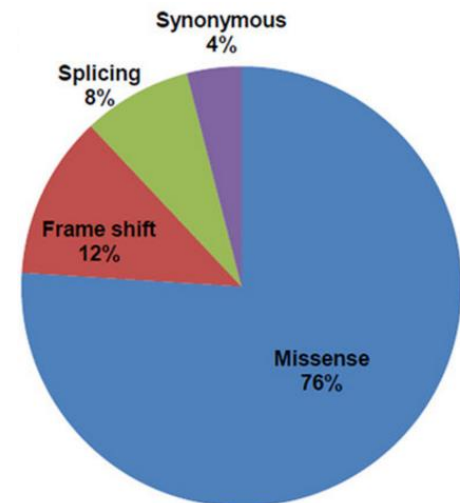
Мутации сплайсинга выявленные WES



doi:10.1038/nbt.3514

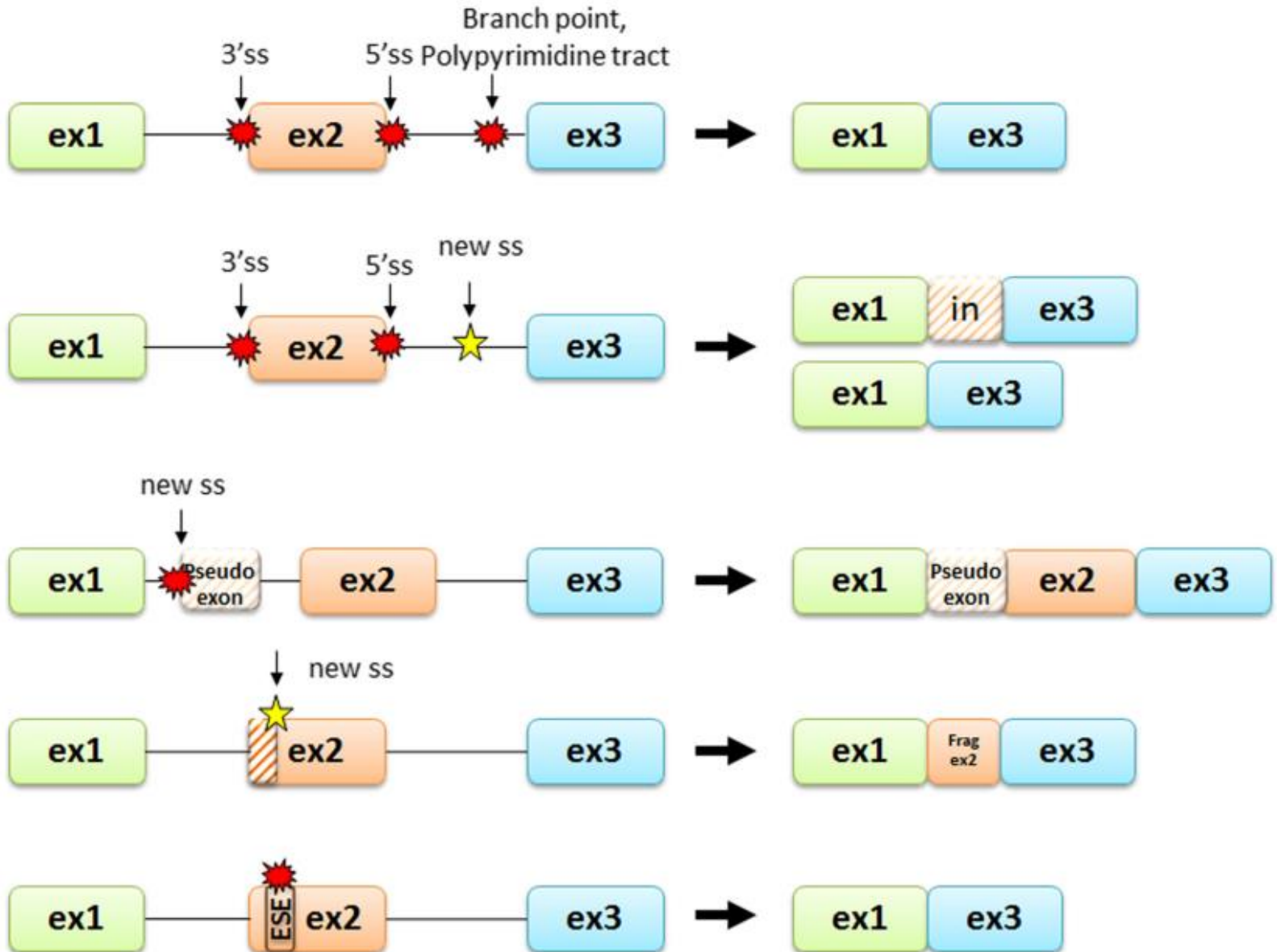


doi: 10.1038/modpathol.2017.21



doi:10.1038/srep29088

Как мутации могут влиять на сплайсинг



Loss-of-function variants

