

Н. М. Гусак, Н. Г. Горovenko, Т. И. Бужиевская

ВЫЯВЛЕНИЕ НОНСЕНС МУТАЦИИ W1282X В ДВУХ СЕМЬЯХ С ВЫСОКИМ РИСКОМ МУКОВИСЦИДОЗА ИЗ УКРАИНЫ

Проведенное ранее в Украине изучение спектра мутаций в гене ТРБМ среди семей с высоким риском муковисцидоза показало, что наиболее распространенной мутацией является делеция F508 (55%). Другие виды мутаций (R553X, G551D, R334W и 1677delTA) в сумме составляют 2,6% от всех мутантных аллелей гена. Нами осуществлен ДНК-анализ 20-го экзона гена ТРБМ для 27 не Δ F508 CF-хромосом. Методом рестрикционного анализа исследовали продукт прямой амплификации ДНК из пятен крови. В результате выявлено двух больных с генотипом W1282X/ Δ F508 и клиническими проявлениями муковисцидоза средней тяжести. Один пациент имел еврейско-украинское происхождение, другой — русско-украинское. Мутацию W1282X следует учитывать при проведении молекулярной диагностики муковисцидоза в Украине.

Введение. Клонирование и секвенирование гена [1, 2], мутации в котором приводят к возникновению муковисцидоза (МВ), позволили предсказать структуру белка, названного трансмембранным регуляторным белком (ТРБМ). На основе выявленной значительной гомологии по аминокислотной последовательности и доменной структуре (два АТФ-связывающих домена, два трансмембранных домена и один уникальный для данного белка регуляторной домен) ТРБМ был отнесен к семейству белков, осуществляющих транспорт веществ через клеточные мембраны [3]. Работы последних лет [4—6] подтвердили это предположение и дали возможность утверждать, что ТРБМ сам является ионным каналом, по которому идет цАМФ-зависимый транспорт ионов хлора. Различные изменения в структуре ТРБМ, как правило, влекут за собой нарушения в процессе транспорта ионов хлора и натрия через клеточные мембраны экзокринных желез. Повышение концентрации электролитов в потовой жидкости больных МВ служит одним из важнейших критериев диагностики этого заболевания [7] наряду с типичной клинической картиной (недостаточность функции поджелудочной железы с развитием синдрома мальабсорбции, поражение дыхательной системы с обструкцией бронхов густой, вязкой слизью и последующим инфицированием, а также проявления вторичных изменений ряда органов и систем) [8]. Степень выраженности каждого симптома у больных МВ варьирует, формируя значительный клинический полиморфизм. Различия фенотипа в определенной мере отражают генотипическую гетерогенность МВ, хотя не всегда удается провести четкую корреляцию между генотипом больного и клиническими проявлениями заболевания. Только для небольшого количества из более чем 200 [9] идентифицированных в настоящее время мутаций гена ТРБМ (CF-мутаций) показана такая корреляция [10, 11].

Секвенирование гена и идентификация наиболее распространенных мутаций в нем, приводящих к развитию МВ, сделали актуальной проблему выявления мутантных аллелей гена ТРБМ не только в группах высокого риска, но и в популяции в целом. При этом большинство авторов считает, что массовый скрининг в популяции для обнаружения носителей CF-мутаций может быть экономически оправдан лишь в том случае, когда достигнутый уровень знаний и развитие методологии ДНК-диагностики позволят достоверно выявлять не менее 95% мутаций ТРБМ, характерных для конкретной популяции [12, 13]. Анализ

© Н. М. ГУСАК, Н. Г. ГОРОВЕНКО, Т. И. БУЖИЕВСКАЯ, 1994

результатов исследования в различных странах мира показал существенные популяционные отличия в спектре CF-мутаций [14]. Так, если в Северной Америке путем тестирования по 6—12 видам мутаций может быть выявлено 85—90 % мутантных аллелей, то в странах Азии, в Испании эта цифра не достигает 50 % [12]. У больных МВ из Украины до настоящего времени выявлено пять видов CF-мутаций, что в сумме составляет 57,4 % от общего числа мутантных аллелей гена. При этом наиболее распространенной мутацией является делеция F508 (частота

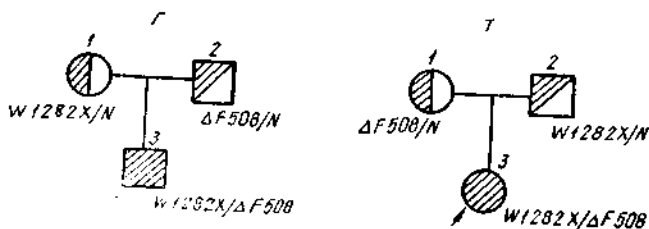


Рис. 1. Родословные семей с идентифицированной мутацией W1282X в гене ТРБМ. N — нормальный аллель гена ТРБМ

встречаемости 55 %), а остальные четыре мутации — R553X, G551D, R334W и 1677delTA — обнаружены в 0,5—0,9 % от всех CF-хромосом [15]. Все это обуславливает настоятельную необходимость проведения дальнейших исследований по идентификации спектра CF-мутаций, характерных для популяции Украины.

Ниже приведены результаты исследований по выявлению нонсенс мутации W1282X в двух семьях с высоким риском МВ из Украины.

Материалы и методы. Материалом для ДНК-анализа служили высушенные на бумаге пятна крови детей, больных муковисцидозом, и членов их семей. Анализировали 20-й экзон гена ТРБМ. Для этого проводили прямую амплификацию данного участка ДНК без предварительной экстракции ДНК из крови. В реакции амплификации использовали вырезанный из пятна крови диск диаметром 2 мм [16]. Полимеразную цепную реакцию осуществляли в автоматическом режиме на термоциклере Perkin-Elmer Thermal Cycler. Праймерами служили олигонуклеотиды, гомологичные последовательностям, фланкирующим 20-й экзон: 20i3, 20i5 [17]. В состав реакционной смеси объемом 100 мкл входили: буфер для амплификации [16], 20 мкмоль/л каждого из дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, 100 пмоль/л каждого из олигонуклеотидных праймеров (праймеры любезно предоставлены д-р Карсон, Канада), 2,5 ед. активности термостабильной ДНК-полимеразы (фирма «Perkin-Elmer Cetus»). Режим амплификации: денатурация ДНК — 94 °С в течение 6 мин; затем 30 циклов: 94 °С — 30 с, 55 °С — 30 с, 72 °С — 1 мин и пролонгированный синтез 72 °С — 7 мин.

Продукты амплификации гидролизовали с помощью эндонуклеаз рестрикции *MnlI* и *FokI*.

Продукты гидролиза разделяли электрофорезом в 10 %-м ПААГ, используя пластинки минигеля, TBE-буфер. Режим электрофореза: 200 В, 45 мин. Электрофореграммы окрашивали 5 %-м раствором бромистого этидия и просматривали на УФ-трансиллюминаторе.

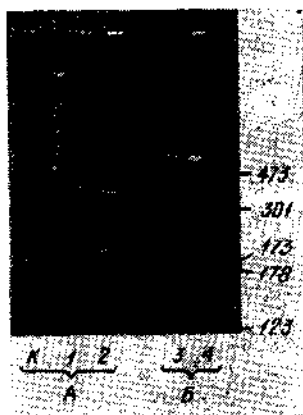
Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлены родословные двух семей, в которых больные МВ дети являются компаундными гетерозиготами по делеции F508 и нонсенс мутации W1282X. Мутацию ΔF508 анализировали по схеме, описанной в представленной в этом же номере журнала статье [16], а для идентификации мутации W1282X использовали рестрикционный анализ. Нонсенс мутация W1282X обусловлена заменой гуанина, занимающего положение 3978 в 20-м экзоне гена ТРБМ, на аденин. При этом происходит нарушение сайта расщепления ДНК эндонуклеазой *MnlI* [18]. Поскольку 20-й экзон содержит еще один сайт рестрикции для данного фермента, продукт амплификации (473 п. о.) этого экзона в отсутствие мутации W1282X расщепляет-

ся эндонуклеазой на три фрагмента — 178, 172 и 123 п. о.; при наличии же мутации — на два — 301 и 172 п. о. В случае гетерозиготного состояния мутации в гидролизате продукта амплификации выявляются четыре фрагмента — 301, 178, 172 и 123 п. о. (рис. 2).

Мутация W1282X является наиболее распространенной в популяции евреев-ашкенази (60 %) [19], в других же популяциях она встречается значительно реже. Средняя встречаемость данной мутации в мире составляет 1,6 % от всех хромосом, несущих CF-мутацию [20]. Для семей с высоким риском МВ из Украины эта мутация до настоящего времени не была описана. Ввиду использования нами небольшой выборки (27 не ΔF508 хромосом) делать выводы о частоте встречаемости мутации W1282X в Украине пока преждевременно, хотя можно предположить, что доля этой мутации среди не ΔF508 хромосом может быть существенной.

Следует отметить, что в описанных нами семьях родители больных детей — носители мутации W1282X имели различное происхождение: в первой — еврейское, во второй — русско-украинское.

Рис. 2. ДНК-анализ мутаций W1282X и R1283M в семье Г.: А — анализ мутации W1282X (1 — мать, 2 — проба́нд); Б — анализ мутации R1283M (3 — мать, 4 — проба́нд); К — маркер молекулярной массы 100 п. н. (GIBCO)



В работах последних лет [10, 11, 20—22] значительное внимание уделяется взаимосвязи между генотипом и клиническими проявлениями муковисцидоза, так как это позволяет приблизиться к пониманию функции ТРБМ и его роли в патогенезе муковисцидоза. По данным авторов, изучавших больных МВ в популяции евреев-ашкенази, компаундные гетерозиготы W1282X/ΔF508 по фенотипу близки к гомозиготам по ΔF508 и имеют тяжелую форму заболевания [19, 22, 23].

Оба же описанных нами случая по клиническим проявлениям могли быть охарактеризованы лишь как МВ средней тяжести (не отмечено меконияльного илеуса, панкреатическая недостаточность умеренная, соотношение веса к росту соответствует возрастным нормам, отсутствие деформации грудной клетки и концевых фаланг, средняя тяжесть поражения легких с умеренно выраженными нарушениями функции внешнего дыхания, установление диагноза в одном из случаев в возрасте четырех лет).

Исходя из этого мы считали необходимым исключить наличие другой, нежели W1282X, мутации в данном локусе гена ТРБМ. В литературе описана missens мутация R1283M [24], нарушающая тот же сайт рестрикции для эндонуклеазы *MnII*, что и мутация W1282X, но в отличие от последней наводящая сайт рестрикции для нуклеазы *FokI*. Продукт амплификации 20-го экзона гена ТРБМ, содержащего мутацию R1283M, расщепляется *FokI* на два фрагмента 308 и 165 п. о. [24]. Используя данный подход, мы подтвердили для обеих семей наличие именно нонсенс мутации W1282X в генах ТРБМ проба́нда и одного из родителей (рис. 2).

Тот факт, что в описанных нами случаях генотип соответствовал «умеренному» фенотипу, в отличие от данных других авторов [20—23], может быть объяснен двояко. Во-первых, клиническая картина развивающегося муковисцидоза, как и ряда других моногенных заболеваний, скорее всего, определяется не только видом мутации в гене ТРБМ, но и другими факторами — как внутригеномными (например, взаимодействия неаллельных генов), так и факторами среды. Во-вторых, могут существовать механизмы, корригирующие последствия нонсенс мутаций. Авторы работы [25] среди таких возможных механизмов называют

альтернативный сплайсинг транскрипта гена ТРБМ в отдельных тканях (в частности, в тканях легких) или явление супрессии нонсенс мутации.

Так или иначе, дальнейшие работы по изучению спектра CF-мутаций и выявлению взаимосвязи генотип — фенотип наряду с исследованиями особенностей регуляции гена ТРБМ [26] и экспрессии его в различных тканях [27] помогут пролить свет на функцию трансмембранного регуляторного белка муковисцидоза.

Выявленную нами нонсенс мутацию W1282X необходимо учитывать в стратегии молекулярной диагностики при медико-генетическом консультировании семей с высоким риском муковисцидоза из Украины.

Авторы выражают благодарность докторам Н. Карсон и Р. Гарбер за содействие в проведении данной работы.

Исследования финансировались Министерством здравоохранения Украины (ОК.91.276) и поддержаны Канадско-украинским проектом: «Чернобыльские дети».

Н. М. Гусак, Н. Г. Горовенко, Т. І. Бужієвська

ВІЯВЛЕННЯ НОНСЕНС МУТАЦІЇ W1282X У ДВОХ СІМ'ЯХ З ВИСОКИМ РИЗИКОМ МУКОВІСЦИДОЗА З УКРАЇНИ

Резюме

Проведеннями в Україні раніше дослідженнями спектра мутацій в гені ТРБМ серед сімей з високим ризиком муковісцидоза встановлено, що найбільш розповсюдженою мутацією є делеція F508 (55 %). Інші види мутацій (R553X, G551D, R334W та 1677delTA) в сукупності складають 2,6 % від усіх мутантних алелів гена. Нами здійснено ДНК-аналіз 20-го екзона гена ТРБМ для 27 не Δ F508 CF-хромосом. Методом рестрикційного аналізу вивчено продукт прямої ампліфікації ДНК з плям крові. В результаті виявлено двох хворих з генотипом W1282X/ Δ F508 та помірними клінічними проявами муковісцидоза. Один пацієнт був єврейсько-українського походження, другий — російсько-українського. Мутацію W1282X потрібно брати до уваги при проведенні молекулярної діагностики муковісцидоза в Україні.

N. M. Gusak, N. G. Gorovenko, T. I. Buzhievskaya

IDENTIFICATION OF THE NONSENSE MUTATION W1282X IN TWO CYSTIC FIBROSIS FAMILIES FROM UKRAINE

Summary

It was previously estimated that the most common CF mutation in patient from Ukraine is Δ F508 (55 % of CF mutation). Other four mutation (R553X, G551D, R334W and 1677delTA) were estimated to account for 2.6 % of CF mutations. We report one more mutation — nonsense mutation W1282X, wich has not been found in CF patients from Ukraine before. We have screened 27 non Δ F508 chromosomes for this mutation. We found that two patients were compound heterozygote, both having Δ F508/W1282X genotype and moderately affected. One patient was of Ashkenazi-Ukrainian origin, another one was of Russian-Ukrainian origin. The mutation W1282X must be taken into account when performing molecular diagnosis and carrier detection for cystic fibrosis in Ukraine.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Rommens J. M., Iannuzzi M. C., Kerem B. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping // Science.—1989.—245.—P. 1059—1065.
2. Riordan J. R., Rommens J. M., Kerem B. et al. Identification of cystic fibrosis gene: cloning and characterization of the complementary DNA // Ibid.—P. 1066—1073.
3. Hyde S. C., Emsley P., Hartshorn M. J. et al. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport // Nature.—1990.—346.—P. 362—365.
4. Bear C., Duguay F., Naismith A. L. et al. Cl-channel activity in *Xenopus oocytes* expressing the cystic fibrosis gene // J. Biol. Chem.—1991.—266.—P. 19142—19145.

5. Riordan J. R., Alon N., Grzelczak Z. et al. The CF gene product as a membrane transport (TM6-NBF) super family // *Adv. Exp. Med. and Biol.*—1991.—290.— P. 19—29.
6. Anderson M. P., Gregory R. J., Thompson S. et al. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity // *Science.*—1991.—253.— P. 202—205.
7. Quinton P. M. Cystic fibrosis: a disease an electrolyte transport // *FASEB J.*—1990.— N 4.— P. 2709—2717.
8. Mearns M. B. Cystic fibrosis: the first 50 years. A review of the clinical problems and their management // *Cystic Fibrosis — Current Topics.*—1993.— Vol. 1.— P. 217—250.
9. *Cystic fibrosis* // Eds. J. A. Dodge, D. J. Brock et al.— Chichester: John Wiley and sons, 1993.— Vol. 1.—338 p.
10. Kerem E., Corey M., Kerem B.-S. et al. The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis-analysis of the most common mutation ($\Delta F508$) // *New Engl. J. Med.*—1990.—323.— P. 1517.
11. Hamosh A., Cutting G. R. Genotype/phenotype relationships in cystic fibrosis // *Cystic Fibrosis — Current Topics.*—1993.— Vol. 1.— P. 69—92.
12. Statement of the American society of human genetic on cystic fibrosis carrier screening // *Amer. J. Hum. Genet.*—1992.—51.— P. 1443—1445.
13. Wilfond B. S., Fost N. The cystic fibrosis gene: medical and social implications for heterozygote deletion // *JAMA.*—1993.—20.— P. 2777—2783.
14. Tsui L.-Ch., Markiewicz D., Zielenski J. et al. Mutation analysis in cystic fibrosis // *Cystic Fibrosis — Current Topics.*—1993.— Vol. 1.— P. 27—44.
15. Кравченко А. С., Лившиц Л. А. Анализ мутаций в 7, 10, 11 экзонах и полиморфизм четырех нуклеотидных tandemных повторов 3' конца 6-го интрона гена ТРБМ в семьях с высоким риском муковисцидоза из Украины // *Цитология и генетика.*—1993.—27.— С. 72—77.
16. Гусак Н. М., Горovenko Н. Г., Хоменко Н. Л., Бужиевская Т. И. Методологические подходы к упрощению и ускорению процедуры идентификации мутации $\Delta F508$ в гене трансмембранного регуляторного белка муковисцидоза // *Биополимеры и клетка.*—1994.—10, № 3—4.— С. 58—62.
17. Zielenski J., Rozmahel R., Bozon D. et al. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene // *Genomics.*—1991.—10.— P. 214—228.
18. Vidaud M., Fanan P., Martin J. et al. Three point mutation in the CFTR gene in French cystic fibrosis patients: identification by denaturing gradient gel electrophoresis // *Hum. Genet.*—1990.—85.— P. 446—449.
19. Abeliowich D., Laron I. P., Lerer I. et al. Screening for live mutations detects 97 % of CF chromosomes and predicts a carrier frequency of 1 : 29 in the Jewish Ashkenazi population // *Amer. J. Hum. Genet.*—1992.—51.— P. 951—956.
20. Tsui L.-Ch. The spectrum of cystic fibrosis mutations // *Trends Genet.*—1992.—8.— P. 392—398.
21. Super M. The gene defect in cystic fibrosis and clinical applications of the knowledge // *J. Roy. Soc. Med.*—1992.—85, Suppl. 19.— P. 6—8.
22. Wine J. No CFTR: are CF symptoms milder? // *Nature Genet.*—1992.—1.— P. 10.
23. Shoshani T., Augarten A., Gazit E. et al. Association of a nonsense mutation (W1282X), the most common mutation in the Ashkenazi Jewish cystic fibrosis patients in Israel, with presentation of severe disease // *Amer. J. Genet.*—1992.—50.— P. 222—228.
24. Cheadle J., Meredith A., Al-Jader N. A new missense mutation (R1283M) in exon 20 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene // *Hum. Mol. Genet.*—1992.—1.— P. 123—125.
25. Gasparini P., Borgo G., Mastella et al. Nine cystic fibrosis patients homozygous for the CFTR nonsense mutation R1162X have mild or moderate lung disease // *J. Med. Genet.*—1992.—29.— P. 558—562.
26. Chou J.-L., Rozmahel R., Tsui L.-Ch. Characterization of the promoter region of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene // *J. Biol. Chem.*—1991.—266.— P. 24471—24476.
27. Rich D. P., Anderson M. P., Gregory R. J. et al. Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells // *Nature.*—1990.—347.— P. 358—363.

Киев. ин-т усовершенствования врачей МЗ Украины

Получено 08.02.94