

УДК 577.213.3

С. Г. Малавчук, Л. А. Лившиц, А. М. Бычкова, С. А. Кравченко

Полиморфизм тринуклеотидных CGG-повторов гена FMR-1 у здоровых женщин и матерей больных с синдромом Мартина — Белла из Украины

Проведен анализ вариации CGG-повторов в 5'-нетранслируемой области гена FMR-1 у 18 матерей пробандов с синдромом Мартина — Белла и в группе 46 здоровых женщин из Украины. Показано, что число CGG-повторов варьирует в пределах от 23 до 35 копий у здоровых женщин. У двух матерей пробандов определено наличие аллелей с экспансией данных тринуклеотидов, соответствующих состоянию премутации.

Введение. Синдром Мартина — Белла, или ломкой X-хромосомы, является наиболее распространенной формой умственной отсталости с X-сцепленным типом наследования и неполной пенетрантностью [1]. Частота встречаемости составляет приблизительно 1 на 1500 мужчин и 1 на 2500 женщин [2]. В 1991 г. основной вид мутаций, ответственных за синдром Мартина — Белла, был охарактеризован как увеличение количества CGG-повторов в 5'-нетранслируемой области гена FMR-1 (fragile X mental retardation 1) [3]. Такой класс мутаций, связанный с нестабильностью данных повторов, некоторые авторы называют динамическими мутациями [4]. С каждым годом растет список наследственных заболеваний человека, обусловленных динамическими мутациями вследствие увеличения количества тринуклеотидных повторов. На сегодняшний день уже установлено, что эти мутации являются причиной таких наследственных заболеваний человека, как мнотоническая дистрофия, спинocereбральная атаксия типа 1, болезнь Гентингтона [5].

Ранее было показано, что количество CGG-повторов полиморфно в нормальной популяции человека и варьирует в пределах от 6 до 52 повторов [6]. В случае, если аллель содержит более 50 повторов, наблюдается так называемая нестабильность, что выражается в изменении количества копий от поколения к поколению.

Определяют два основных типа мутаций: 1) полная мутация, при которой больные с синдромом Мартина — Белла имеют множественную амплификацию количества CGG-повторов — более 230 копий; 2) премутация: число данных повторов варьирует от 50 до 230 [6].

ДНК-диагностика названного синдрома состоит в установлении количества повторов в гене FMR-1 и проводится в настоящее время с помощью методов блот-гибридизации и полимеразной цепной реакции (ПЦР). Последний метод является наиболее эффективным в определении нормального количества повторов, а также аллелей в состоянии премутации [7].

В настоящей работе представлены результаты изучения варьирования количества CGG-повторов в семьях с синдромом Мартина — Белла и в группе здоровых женщин из Украины с использованием метода ПЦР.

Материалы и методы. Материалом для проведения исследований служили препараты ДНК, выделенной из лейкоцитов периферической крови матерей детей с синдромом Мартина — Белла, которые проходили клиническое обследование и медико-генетическое консультирование в Украинском научном центре медицинской генетики, Киевском НИИ ПАГ МЗ

Украины и Киевском медико-генетическом центре, а также здоровых женщин-доноров. Препараты ДНК выделяли и очищали по методу [8]. Для анализа количества CGG-повторов проводили амплификацию ДНК *in vitro* с помощью ПЦР и с последующей блот-гибридизации, применяя в качестве зонда синтетический олигонуклеотид 5'-(CGG)₁₅-3', по методу [9]. Олигонуклеотидные праймеры, гомологичные нуклеотидным последовательностям, фланкирующим область CGG-повторов (праймеры 1 и 3) [9], были синтезированы в АО «Экотур» (Вильнюс, Литва). ПЦР осуществляли в автоматическом режиме на термоциклере «Perkin Elmer» (США) по схеме: иницирующая денатурация — 98 °С, 4 мин, затем 30 циклов: денатурация — 97 °С, 50 с, отжиг и элонгация — 75 °С, 45 с и заключительный цикл — 75 °С, 5 мин. Термостабильная полимеразы производства фирмы «Perkin Elmer».

Продукты амплификации разделяли электрофорезом 6 %-м денатурирующем акриламидном геле и затем переносили на положительно заряженный нейлоновый фильтр фирмы «Amersham» (Англия) [10].

Синтетический олигонуклеотид 5'-(CGG)₁₅-3', меченный щелочной фосфатазой, раствор для детекции «LumiPhos 530» и растворы для гибридизации, использованные в работе, входили в набор фирмы «Lifecodes Inc». Экспонировали рентгеновской пленкой фирмы «Kodak» при 37 °С в течение 0,5–2 ч.

При статистической обработке полученных результатов использовали общепринятые методы вариационной статистики [11].

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлены примеры вариантов анализа CGG-повторов, найденные при обследовании у 46 неродственных здоровых женщин из Украины. В рассмотренных образцах ДНК были выявлены аллельные варианты, соответствующие наличию от 23 до 35 копий CGG-повторов, размер которых составлял от 131 до 167 п.н. соответственно. Всего в исследованной нами выборке определено 13 вариантов аллелей.

В таблице приведены результаты анализа распределения аллельных вариантов CGG-повторов. Наиболее частым был аллель Н, соответствующий наличию 30 CGG копий, тогда как реже всего встречались аллели: F, I, K (28, 32 и 33 повтора соответственно).

Оценка распределения аллелей в данной выборке свидетельствует о том, что обнаруженные аллельные варианты распределены нормально ($G = 5.945$, $d.f. = 6.3868$, $P > 0.05$).

В исследуемой группе здоровых женщин были выявлены следующие генотипы: АН, АJ, ВD, ВH, СF, СG, СH, DН, DJ, EЕ, EJ, GJ, НH, НI, НL, НK, НM, JJ, JL. Наиболее часто встречающимся является генотип НH

Распределение аллельных вариантов CGG-повторов у неродственных здоровых женщин

Аллель	Количество CGG-повторов	Частота встречаемости ± в.т.
A	23	0,0217±0,0152
B	24	0,0543±0,0236
C	25	0,0543±0,0236
D	26	0,0543±0,0236
E	27	0,0435±0,0213
F	28	0,0109±0,0108
G	29	0,0217±0,0152
H	30	0,5217±0,0521
J	31	0,1522±0,0374
I	32	0,0109±0,0108
K	33	0,0109±0,0108
L	34	0,0217±0,0152
M	35	0,0217±0,0152

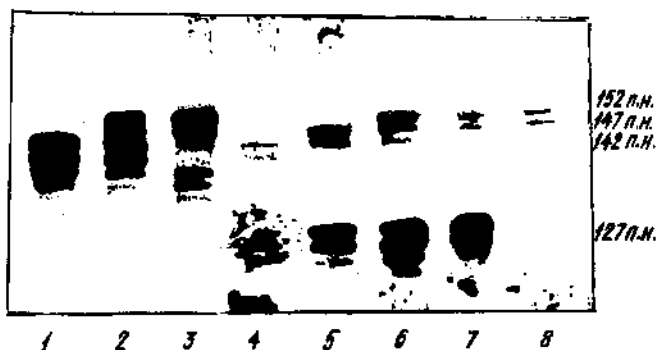


Рис. 1. Анализ аллельного полиморфизма CGG-повторов в гене FMR-1 в группе здоровых женщин. Генотипы: 1 — GG; 2 — HH; 3 — FH; 4 — CF; 5 — CG; 6 — CH; 7 — CH; 8 — HH

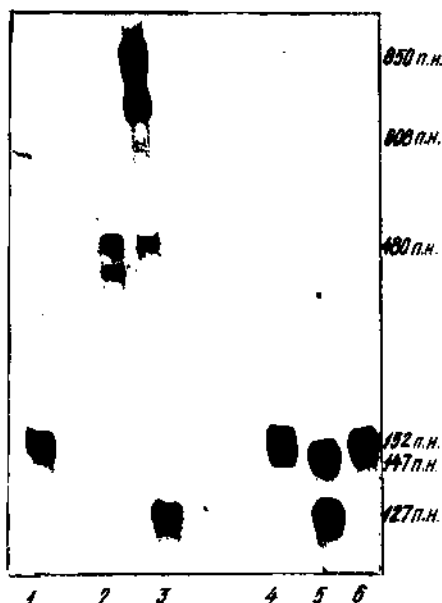


Рис. 2. Анализ продуктов ПЦР CGG экспансии у матерей больных с синдромом Мартина — Белла: 1 — гетерозигота с аллелем с премутацией (~120 копий) и нормальным аллелем (31 повтор) (семья Б.); 2 — женщина с двумя премутационными аллелями (~90—100 повторов), в качестве маркера в данном исследовании использовали продукт амплификации ДНК матери — носительницы премутации, предоставленный д-ром В. Вертелецким (Университет Ю. Алабамы, США); 3 — гетерозигота-мозаик с наличием трех аллелей с премутациями размером ~90, 150 и 180 повторов и нормальным аллелем с 25 копиями (семья В.); 4, 5, 6 — здоровые женщины с генотипами HH, CG, HH соответственно

(12,52 %), тогда как генотипы CG, CF, GJ, JL, HL, HK, AH, HI, AJ, EE, DJ и BD отмечены лишь в единичных случаях.

В данном исследовании был проведен также анализ варьирования CGG-повторов у 18 матерей больных с синдромом Мартина — Белла. У двух матерей пробандов из неродственных семей Б. и В. были обнаружены аллели с премутациями (рис. 2). В семье Б. у матери выявлены два аллеля: один — с нормальным количеством копий (31), другой — с премутацией (приблизительно 120 повторов). В семье В. у матери пробанда наблюдался так называемый мозаицизм, т. е. наличие нормального аллеля (25 копий) наряду с аллелями с премутацией с различным количеством повторов — приблизительно 90, 150 и 180. Наличие продуктов амплификации разной длины свидетельствует о том, что в кровотоке данной женщины циркулируют лимфоциты, X-хромосомы которых содержат разное число повторов. Этот факт подтверждает возможность динамических мутационных процессов, происходящих в данном локусе, не только на мейотическом, но и на митотическом уровнях. В ходе исследования пробандов из данных семей не удалось идентифицировать продукты амплификации. Из этого следует, что, возможно, на их хромосомах содержится обширная область повторов в данном регионе гена (более 230). Последнее делает невозможным успешное

проведение реакции амплификации *in vitro*. Поэтому для дополнительного изучения образцов ДНК пробандов будет осуществлен анализ с помощью метода блот-гибридизации и с использованием геномных зондов из данного региона.

Таким образом, проведенные исследования показывают, что количество повторов в группе здоровых женщин варьирует от 23 до 35 копий, тогда как в случае выявленных премутаций гена FMR-1 CGG-экспансия колеблется в пределах от 90 до 180 копий.

Работа выполнена в рамках проектов N 5.3/9 и N 1.01.01./055-92 ГКНТ при Кабинете Министров Украины.

С. Г. Миярчук, Л. А. Лившиць, А. М. Бичкова, С. О. Кравченко

ПОЛІМОРФІЗМ ТРИНУКЛЕОТИДНИХ CGG-ПОВТОРІВ ГЕНА FMR-1 У ЗДОРОВИХ ЖІНОК І МАТЕРІВ ХВОРИХ З СИНДРОМОМ МАРТИНА — БЕЛЛА З УКРАЇНИ

Резюме

Здійснено аналіз варіації CGG-повторів у 5'-нетрансльованій області, що не трансльовуються, гена FMR-1 у 18 матерів пробандів з синдромом Мартина — Белла і в групі 46 здорових жінок з України. Показано, що число CGG-повторів варіює у межах від 23 до 35 копій у здорових жінок. У двох матерів пробандів визначено наявність алелів з експансією агаданих тринуклеотидів, які відповідають стану премутації.

S. G. Malarchuk, L. A. Livshits, A. M. Bychkova, S. A. Kravchenko

CGG REPEATS POLYMORPHISM OF FMR-1 GENE IN HEALTHY WOMEN AND MOTHERS OF PROBANDS WITH FRAGILE X SYNDROME FROM UKRAINE

Summary

The analysis of CGG repeats polymorphisms from 5'-untranslated region of the FMR-1 gene in 18 mothers of probands with fragile X syndrome and among 46 healthy women from Ukraine was performed. Number of CGG repeats in healthy women is shown to vary in range from 23 to 35 repeats. The alleles with CGG expansion corresponding to premutation were revealed in two mothers of probands.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. McKusick V. A., Francomano C. A., Antonarakis S. E. Mendelian Inheritance in man: Catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive, and X-linked phenotypes. — Baltimore: The Johns Hopkins Univ. press, 1990. — P. 1670—1673.
2. Webb T. P., Bunday S. E., Thake A. I., Todd J. Population incidence and segregation ratios in the Martin — Bell syndrome // Amer. J. Med. Genet.—1986.—23.—P. 573—580.
3. Verkerk A., Pieretti M., Sutcliffe J. et al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome // Cell.—1991.—65, N 5.—P. 905—914.
4. Richards R. I., Sutherland G. R. Dynamic mutations: a new class of mutations causing human disease // Ibid.—1992.—70.—P. 709—712.
5. Willems P. J. Dynamic mutations hit double figures // Nature Genetics.—1994.—8, N 3.—P. 213—215.
6. Fu Y. H., Kuhl D. P., Pizzuti A. et al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox // Cell.—1991.—67.—P. 1047—1058.
7. Warren S. T., Nelson D. L. Advances in molecular analysis of fragile X syndrome // JAMA.—1994.—271, N 7.—P. 536—542.
8. Wehnert M., Herrmann F. H., Metzke H. et al. Erste ergebnisse bei der genomischen Carrierdiagnostik in Risikostippen mit Haemophilie A und B in der DDR // Z. gesamte inn. Med.—1988.—43, N 16.—P. 441—444.
9. Brown W. T., Houck G. E., Jeziorowska A. et al. Rapid fragile X carrier screening and prenatal diagnosis using a nonradioactive PSR test // JAMA.—1993.—270, N 13.—P. 1569—1575.
10. Маниатис Т., Фрич Е. Е., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1985.—420 с.
11. Животовский Л. А. Статистические методы анализа частот генов в природных популяциях // Теор. популяцион. генетика. — М.: ВИНТИ, 1983.—С. 76—104 (Итоги науки и техники. Сер. Общ. генетика; т. 8).

Ин-т молекуляр. биологии и генетики НАН Украины, Киев
Укр. науч. центр мед. генетики МЗ Украины, Киев

Поступила в редакцию
08.06.95