

Н.В. ГРИЩЕНКО¹, А.М. КУЧЕРЕНКО²,
Е.Й. ПАЦКУН³, Л.А. ЛІВШИЦЬ¹

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

² Київський національний університет імені Тараса Шевченка

³ Інститут спадкової патології АМН України, Львів

ДОСЛІДЖЕННЯ АСОЦІАЦІЇ ГЕНОТИПУ ТА ФЕНОТИПОВИХ ПРОЯВІВ ПАТОГЕНЕЗУ ХОРЕЇ ГЕНТИНГТОНА



Проведено прямий молекулярно-генетичний аналіз області CAG- та CCG-повторів гена IT15 37 пацієнтам із клінічним діагнозом хорея Гентингтона. Аallel із експансією CAG-повторів в гетерозиготному стані виявлено у 33 хворих, в 4 випадках ДНК-аналіз не підтвердив клінічного діагнозу. Обстежено 20 можливих безсимптомних носіїв, 11 із них успадкували мутантну хромосому. Виявлено нерівновагу за зчепленням аallelного варіанта (CGG)₁₀ із аallelами з експансією CAG-повторів гена IT15 в групі хворих з України. Виявлено достовірну різницю у характері нестабільності CAG-повторів при передачі по батьківській та материнській лініях. Досліджено генетичні чинники, асоційовані із варіабельністю віку початку захворювання.

© Н.В. ГРИЩЕНКО, А.М. КУЧЕРЕНКО, Е.Й. ПАЦКУН,
Л.А. ЛІВШИЦЬ, 2009

Вступ. Хорея Гентингтона (ХГ) — це важке прогресуюче нейродегенеративне аутосомно-домінантне захворювання із маніфестацією у дорослому віці. Згадана патологія характеризується поширеними хореїчними гіперкінезами, прогресуючим зниженням інтелекту, що призводить до глибокої деменції та смерті впродовж 10–15 років від початку захворювання [1]. Частота цього захворювання значно коливається в різних популяціях світу, для європейських популяцій в середньому становить 1:10 000.

Розвиток ХГ пов'язаний з порушенням гена *IT15*, локалізованого в локусі 4p16.3. Даний ген кодує білок гентингтин, який залучений у регуляцію транскрипції [2].

В 5'-області гена *IT15* міститься високополіморфна послідовність CAG-повторів, що характеризується нестабільністю. Генетичний дефект, що призводить до фенотипових проявів ХГ, обумовлений експансією даного повтору, який транслюється як аномально подовжений поліглутаміновий тракт. Внаслідок цього мутантний гентингтин у ядрі та цитоплазмі компетентних нервових клітин не підлягає убіквітин-залежному протеолізу, поступово накопичується та виконує роль супресора транскрипції, викликаючи дегенерацію клітин головного мозку [3, 4].

В основі самої динамічної мутації, а також феноменів антиципації та геномного імпринтингу, які є характерними для ХГ, лежать специфічні молекулярно-генетичні механізми реплікації ДНК у ділянці тринуклеотидних повторів. Доведено, що кількість CAG-повторів є високоспецифічним маркером для постановки діагнозу ХГ. Так, у здорових людей виявляють 9–35 CAG-повторів, а у пацієнтів з ХГ 36–121 [5]. Показано, що експансії *de novo*, які ведуть до розвитку ХГ, походять від проміжних алелів, кількість CAG-повторів в яких становить 29–35 і які асоційовані з неповною пенетрантністю або із маніфестацією захворювання у дуже пізньому віці [6, 7].

Важкість перебігу даного захворювання, його пізня маніфестація, високий ризик передачі мутації дітям хворих на ХГ, відсутність ефективного лікування висувають на перший план розробку ефективних методів точної ДНК-діагностики, включаючи пренатальну. З метою оптимізації медико-генетичного консультування родин хворих на ХГ ведеться активний по-

шук генетичних модифікаторів клінічного фенотипу, що є важливим для прогнозу віку початку захворювання та важкості його перебігу.

Метою даної роботи було дослідження розподілу алельних варіантів CAG-повторів на нормальних та мутантних хромосомах в популяції хворих із України, аналіз алельного поліморфізму CCG-повторів і мутації del2642 в гені *IT15* та виявлення закономірностей нестабільності CAG-повторів, а також дослідження асоціації мутантного генотипу із фенотиповими проявами.

Матеріали та методи. Матеріалом для дослідження були зразки периферичної крові хворих із клінічним діагнозом ХГ та членів їх сімей з України. Від усіх хворих та/або їх родичів було отримано інформовану згоду на участь в даному дослідженні.

ДНК із зразків крові виділяли з використанням методів, які були описані раніше [8].

Для ампліфікації *in vitro* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) ділянок CAG-, CCG-повторів та мутації del2642 використовували праймери, запропоновані низкою авторів [9, 10] із власними модифікаціями. ПЛР досліджуваних ділянок проводили за розробленими нами протоколами. Для аналізу зчеплення CAG-, CCG-повторів використовували три пари праймерів, які фланкували кожен із поліморфних ділянок, а також весь регіон в цілому.

Електрофоретичне розділення ПЛР-продуктів для аналізу мутації del2642 проводили

в 12%-ному неденатуруючому поліакриламідному гелі (співвідношення акриламіду та бісакриламіду 29 : 1, в 0,5 × TBE при 200 В впродовж 5 год).

Для встановлення точних розмірів продуктів ампліфікації конкретних алелів CAG-, CCG-повторів аналіз проводили в 7%-ному неденатуруючому поліакриламідному гелі на автоматичному лазерному флуориметрі ALF-expressII («Amersham Pharmacia Biotech», Швеція) за схемою, що була аналогічною раніше описаній нами [11]. ALF-гель обробляли за допомогою програми FM2.1 (Fragment Manager Software V2.1, Pharmacia).

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою комп'ютерного програмного забезпечення GENEPOP. Для оцінки різниці в характері успадкування експансованих CAG-повторів по батьківській та материнській ліній використовували непараметричний ранговий критерій Манна-Вітні.

Результати досліджень та їх обговорення. В ході дослідження створено банк ДНК хворих на ХГ та членів їх родин, який налічує 74 зразки ДНК із 43 родин високого ризику ХГ, що проживають в Україні.

Проведено прямиий молекулярно-генетичний аналіз області CAG- та CCG-повторів гена *IT15* 37 пацієнтам із клінічним діагнозом ХГ. Алель із експансією CAG-повторів (більше 36 повторів) в гетерозиготному стані виявлено у 33 хворих, в 4 випадках ДНК-аналіз не підтвердив клінічного діагнозу ХГ.

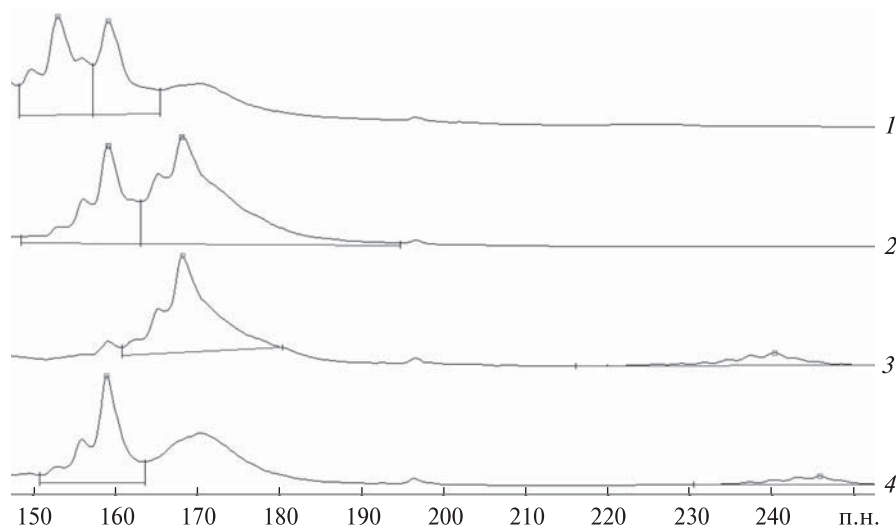


Рис. 1. Прямий аналіз CAG-повторів в гені *IT15* (родина Г.): 1 – мати пробанда (здорова); 2 – хоріон; 3 – батько пробанда (хворий); 4 – пробанд (хворий)

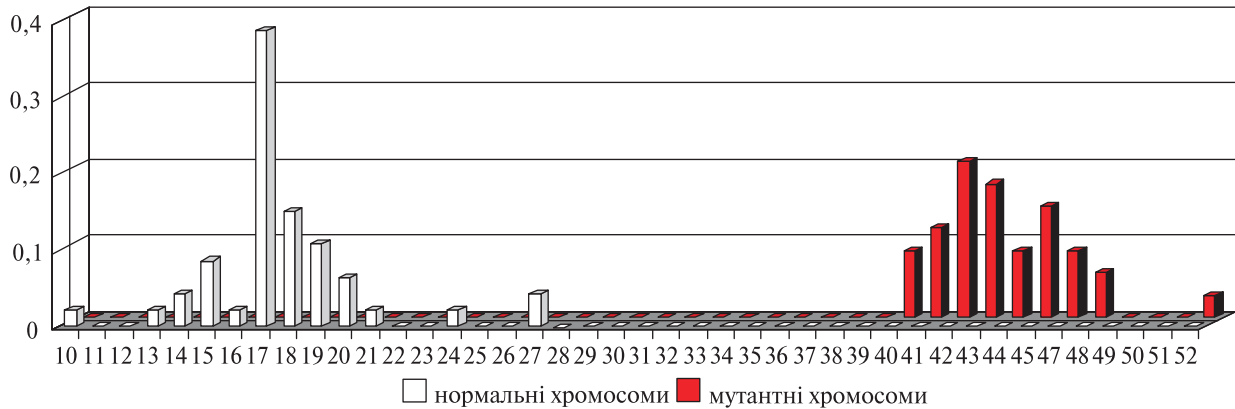


Рис. 2. Розподіл частот алельних варіантів CAG-повторів гена *IT15* в групі хворих на ХГ з України: по вертикалі – частота аеля; по горизонталі – кількість повторів

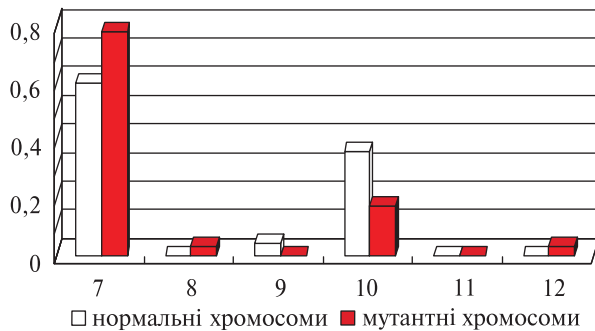


Рис. 3. Розподіл частот алельних варіантів CCG-повторів гена *IT15* в групі хворих на ХГ з України: по вертикалі – частота аеля; по горизонталі – кількість повторів

Серед 20 можливих безсимптомних носіїв аеля із експансією CAG-повторів мутантний варіант із повною пенетрантністю виявлено у 11 осіб.

В родинях високого ризику ХГ проведено три пренатальні діагностики, в одному випадку у плода виявлено мутантний варіант гена ХГ. Приклад пренатальної діагностики ХГ представлено на рис. 1.

Проведено аналіз розподілу алельних варіантів та аналіз зчеплення CAG- та CCG-повторів гена *IT15* в групі хворих на ХГ на нормальних та мутантних хромосомах. Розподіл алелів цих поліморфних локусів представлено на рис. 2 та 3.

Кількість CAG-повторів на мутантних хромосомах варіювала від 41 до 52 повторів. У жодного пацієнта не виявлено алелів із неповною пенетрантністю (36–40 повторів). Проте на нор-

мальних хромосомах виявлено алельні варіанти із 27 повторами (частота 6%), які за літературними даними [6, 7] належать до алелів із підвищеною нестабільністю, в результаті чого може утворитись мутантний алель із повною пенетрантністю (більше 40 повторів) вже в наступному поколінні.

Нами проведено аналіз зчеплення CAG- та CCG-повторів на нормальних та мутантних хромосомах. Частота алельного варіанта (CCG)₁₀ на хромосомах з експансією CAG-повторів (36%) була статистично достовірно вищою, ніж на нормальних хромосомах (17%) ($p < 0,05$). Отримані дані можуть свідчити про те, що мутантний алель із експансією CAG-повторів в українській популяції вперше виник на хромосомі, маркованій сімома CCG-повторами.

В ході роботи нами проведено дослідження генетичної нестабільності експансованих CAG-повторів при вертикальній передачі мутантного варіанта.

Оскільки ДНК-діагностика ХГ для безсимптомних можливих носіїв пов'язана зі складностями етичного характеру, нами було зафіксовано лише 10 випадків передачі мутантного аеля від хворих батьків їх дітям, з яких 4 – передача від батька, а 6 – від матері. Експансія CAG-повторів гена *IT15* – це кількісний та якісний показник, який характеризується декількома параметрами: нестабільністю, абсолютним значенням (числом повторів, на яке змінився вихідний алельний варіант при вертикальній передачі), а також вектором цієї зміни (в бік збільшення або зменшення). Таким чи-

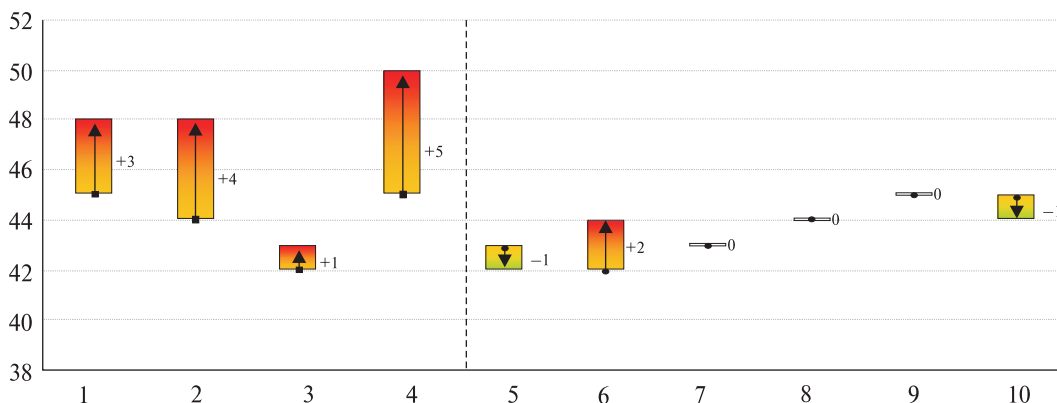


Рис. 4. Дослідження нестабільності CAG-повторів гена *IT15* при вертикальній передачі: по вертикалі – число CAG-повторів; по горизонталі – 1–4 – випадки передачі по чоловічій лінії; 5–10 – випадки передачі по жіночій лінії

ном, при розрахунках ми враховували всі ці показники. В усіх випадках передачі по чоловічій лінії відбулась динамічна мутація, причому у бік значного збільшення кількості CAG-повторів (до 5 повторів). При передачі по жіночій лінії в половині випадків кількість повторів залишилась сталою, в двох випадках – зменшилась і лише в одному – збільшилась на 2 повтори (рис. 4). Різниця в передачі експансованих CAG-повторів (абсолютне значення та вектор) по чоловічій та жіночій лініях, розрахована за критерієм Манна-Вітні, була статистично достовірною ($U = 1$). Крім того, наші дані свідчать про те, що мутантні алелі більш стабільні в жіночому гаметогенезі. Таким чином, отримані результати пояснюють феномени антиципації та геномного імпринтингу, які спостерігаються при хорей Гентингтона.

Відомо, що початок маніфестації хорей Гентингтона знаходиться у досить широкому діапазоні від дитячого віку до 80 років із середнім значенням 40–45 років [1]. В багатьох дослідженнях виявлено досить сильну зворотну кореляцію віку початку маніфестації захворювання із кількістю експансованих CAG-повторів гена *IT15*, проте у значній кількості випадків така кореляція не спостерігається. Таким чином, пошук модифікаторів клінічного фенотипу при вказаній патології продовжується.

З метою пошуку асоціації мутантного генотипу із фенотипічними проявами хорей Гентингтона нами проведено аналіз залежності віку маніфестації захворювання із розміром експан-

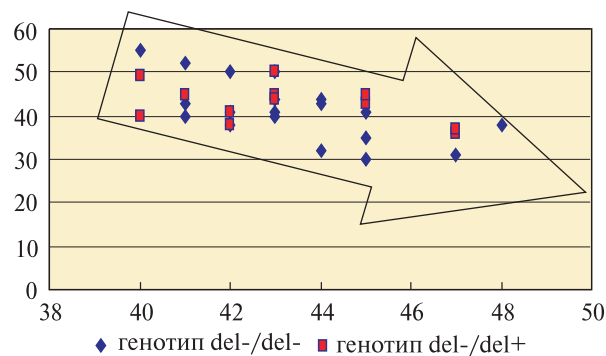


Рис. 5. Аналіз залежності віку маніфестації ХГ від генотипу хворих: по вертикалі – вік маніфестації; по горизонталі – кількість CAG-повторів; генотипування за поліморфізмом *del2642*

сованого алеля, а також досліджено поліморфізм *del2642* гена *IT15*.

Виявлено тенденцію до зменшення віку маніфестації ХГ у хворих із більш протяжною експансією CAG-повторів (рис. 5).

Поліморфізм *del2642* – це тринуклеотидна делеція/інсерція в 58-му екзоні гена *IT15* в положенні 2642–2645, в результаті чого втрачається глутамін. При аналізі даного поліморфізму встановлено, що в групі хворих на ХГ частота алельного варіанту із мутацією *del2642* ($n = 35,21\%$) статистично достовірно вища ($p < 0,05$), ніж в контрольній групі ($n = 64,9\%$). Крім того виявилось, що у більшості хворих із мутацією *del2642* захворювання починалось пізніше, ніж у хворих із відсутністю досліджуваної мутації (рис. 5).

Прийнявши гіпотезу про модифікуючий вплив мутантного варіанта даного поліморфізму в бік пролонгації безсимптомного періоду у хворих на ХГ, можна пояснити випадки розбіжності у віці маніфестації захворювання у досліджуваних нами хворих із однаковою кількістю експансивних CAG-повторів. Аналіз кореляції поліморфного варіанту del2642 із віком маніфестації ХГ проведено не було, оскільки в переважній більшості випадків в досліджуваній групі хворих не було можливості встановити фазу зчеплення поліморфних варіантів del2642 із хромосомами з експансією CAG-повторів.

Висновки. Розроблено метод прямого аналізу алельного поліморфізму CAG- та CCG-повторів гена *IT15* для ДНК-діагностики хореї Гентингтона. Частота алельного варіанта (CGG)₁₀ на хромосомах з експансією CAG-повторів була статистично достовірно вищою, ніж на нормальних хромосомах ($p < 0,05$). Встановлено, що із збільшенням кількості CAG-повторів спостерігається тенденція до початку маніфестації захворювання в більш молодшому віці. Досліджено асоціацію між наявністю тринуклеотидної делеції в положенні 2642–2645 гена *IT15* на хромосомі із експансією CAG-повторів та більш пізньою маніфестацією захворювання.

Таким чином, розмір експансованого CAG-мотиву у поєднанні із результатами генотипування за поліморфним маркером del2642 може бути діагностичним маркером перебігу захворювання. Встановлено різницю у характері успадкування CAG-повторів по батьківській та материнській лінії: при успадкуванні мутантного варіанта від матері спостерігається стабільність або зменшення CAG-експансії, в той час як при успадкуванні мутантного варіанту від батька відбувається динамічна мутація, при якій спостерігають збільшення CAG-мотиву.

Розроблений метод аналізу може бути впроваджений для добровільного генетичного тестування населення не тільки в родинах високого ризику ХГ, а і в загальній популяції — з метою виявлення нестабільних алелів високого ризику (≥ 27 CAG-повторів) та рекомендації проведення пренатальної діагностики носіям таких мутантних варіантів.

*N.V. Gryshchenko, A.M. Kucherenko,
E.I. Patscun, L.A. Livshits*

STUDY OF THE ASSOCIATION OF GENOTYPE AND PHENOTYPICAL FEATURES OF THE PATHOGENESIS OF HUNTINGTON'S CHOREA

Direct molecular-genetic analysis of CAG- and CCG-polymorphism has been carried out in 37 patients with Huntington disease (HD) clinical diagnosis. Heterozygote expanded HD alleles were found in 33 patients, in 4 cases DNA-analysis did not confirm the preliminary clinic diagnosis. Twenty asymptomatic high risk carriers were analyzed, 11 individuals inherited HD chromosome. Linkage disequilibrium between expanded CAG-alleles and the (CGG)₁₀-allele of *IT15* gene in the group of HD-patients from Ukraine has been displayed. The significant differences in CAG-repeat sex-determined instability inheritance have been revealed. The genetic factors associated with the HD age of onset have been analyzed.

*Н.В. Грищенко, А.М. Кучеренко,
Э.И. Пацкун, Л.А. Лившиц*

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИИАЦИИ ГЕНОТИПА И ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ ПАТОГЕНЕЗА ХОРЕИ ГЕНТИНГТОНА

Проведен прямой молекулярно-генетический анализ области CAG- и CCG-повторов гена *IT15* 37 пациентам с клиническим диагнозом хорея Гентингтона. Аллель с экспансией CAG-повторов в гетерозиготном состоянии выявлен у 33 больных, в 4 случаях ДНК-анализ не подтвердил клинического диагноза. Обследовано 20 вероятных бессимптомных носителей, 11 из них унаследовали мутантную хромосому. Выявлено неравновесие по сцеплению алельного варианта (CGG)₁₀ с аллелями с экспансией CAG-повторов гена *IT15* в группе больных с Украины. Выявлены достоверные различия в характере нестабильности CAG-повторов при передаче по отцовской и материнской линии. Исследованы генетические факторы, ассоциированные с вариабельностью возраста начала заболевания.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Scott D., Heathfield K., Toone B., Margerison J. The EEG in Huntington's chorea: a clinical and neuropathological study // J. Neurol. Neurosurg Psych. — 1972. — 35, № 1. — P. 97–102.
2. Nucifora F., Sasaki M., Peters M. et al. Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp mediated transcription leading to cellular toxicity // Science. — 2001. — 291. — P. 2423–2428.
3. Davies J., Sarkar S., Rubinsztein D. The ubiquitin proteasome system in Huntington's disease and the spin-

- ocerebellar ataxias // BMC Biochem. – 2007. – 8(Suppl 1): S2.
4. Seo H., Sonntag K., Kim W. et al. Proteasome activator enhances survival of Huntington's disease neuronal model cells // PLoS ONE. – 2007. – 2, № 2. –: e238.
 5. McNeil S., Noveletto A., Srinidhi J. et al. Reduced penetrance of the Huntington's disease mutation // Human Mol. Genet. – 1997. – 6, № 5. – P. 775–780.
 6. Goldberg, Y., McMurray C., Zeisler J. et al. Increased instability of intermediate alleles in families with sporadic Huntington disease compared to similar sized intermediate alleles in the general population // Human Mol. Genet. – 1995. – 4. – P. 1911–1918.
 7. Chong S., Almqvist E., Telenius H. et al. Contribution of DNA sequence and CAG size to mutation frequencies of intermediate alleles for Huntington disease: evidence from single sperm analyses // Human Mol. Genet. – 1997. – 6, № 2. – P. 301–309.
 8. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. – Cold Spring Harbor Lab., 1982. – 545 p.
 9. Кутуев И.А., Хусаинова Р.И., Хидиятова И.М., Магжанов Р.В., Хуснутдинова Э.К. Анализ гена IT15 в семьях больных хореей Гентингтона // Генетика. – 2004. – 40, № 8. – С. 1123–1130.
 10. Goldberg Y., Andrew S., Clarke L. et al. A PCR method for accurate assessment of trinucleotide repeat expansion in Huntington disease // Human Mol. Genet. – 1993. – 2, № 6. – P. 635–636.
 11. Грищенко Н.В., Бичкова А.М., Пичкур Н.О., Скибан Г.В., Дмитренко В.В., Лівшиць Л.А. Дослідження дуплікації хромосомної ділянки 17p11.2–12 у хворих із спадковою мотосенсорною невропатією типу 1А // Цитология и генетика. – 2003. – 37, № 6. – С. 55–59.

Надійшла 26.11.08