

ТРЕТЯК Б.І., ЗАСТАВНА Д. В., МАКУХ Г. В.

ДУ «Інститут спадкової патології АМНУ»

Україна, 79000, Львів, вул. Лисенка, 31а, e-mail: irynej@ukr.net

ДЕЛЕЦІЙНИЙ АНАЛІЗ ГЕНІВ SMN ТА NAIP У ПАЦІЄНТІВ З РІЗНИМИ ТИПАМИ СПІНАЛЬНОЇ М'ЯЗОВОЇ АТРОФІЇ ІЗ ЗАХІДНОГО РЕГІОНУ УКРАЇНИ

Спинальна м'язова атрофія (СМА) – це поліморфна група найбільш частих нервово-м'язових хвороб, які характеризується дегенерацією мотонейронів передніх рогів спинного мозку. Клінічні форми СМА визначаються за критеріями глибини порушень функцій руху та часу маніфестації хвороби. Міжнародний консорціум затвердив наступну класифікацію СМА: тип I – хвороба Вердніга-Гоффмана, це – найважчий тип СМА, проявляється в перші 6 місяців життя і призводить до смерті протягом перших двох років життя; тип II – проміжна форма, дебют хвороби відбувається до 18 місяців життя, пацієнти можуть сидіти, але не можуть стояти та ходити і живуть більше чотирьох років; тип III – хвороба Кугельберга-Веландера – найм'якший тип СМА, коли прогресуюча м'язова слабкість проявляється після двох років життя.[1]. Щодо III типу СМА, то час її маніфестації може коливатися в діапазоні від двох до 30 років і старше. Тому, за пропозицією *K. Zerres*. [2] СМА III типу можна умовно розділити на дві підгрупи: на підгрупу А з маніфестацією хвороби до трьох років і підгрупу В з маніфестацією хвороби від трьох до тридцяти років, а також створити в класифікації новий тип СМА – СМА IV типу при маніфестації хвороби старше 30 років.

СМА – це спадкова хвороба з аутосомно-рецесивним типом успадкування. Середня частота усіх форм СМА складає 1:6000 - 1:10000 дітей. Виключення складають регіони, в яких описано виражене накопичення СМА, до них належать популяції з високими показниками інбридінгу: Бенгазі, Лівія, караїми в Ізраїлі, араби в Кувейті і популяції, в яких підвищення частоти СМА зумовлено ефектом родоначальника. Так у Канаді і на о. Реюньйон, де від однієї пари європейців походять 13 сімей, виявлено 38 пацієнтів з хворобою Вердніга - Гоффмана [3,4,5].

При СМА всіх типів виявляються делеції (чи інші зміни) в декількох генах в ділянці 5q13. Серед цих генів найбільш вивченими є гени SMN та NAIP[6]. Ген SMN (survival motor neurons), картованого в локусі D5S125(5q13), ідентифіковано методом позиційного клонування. Він має розмір 20000 п.н., складається з 8 екзонів, мРНК гена містить 1700 п.н. і кодує білок із 294 амінокислотних залишків з молекулярною вагою 32 КілоДальтони. Делеції у гені SMN були виявлені у хворих на СМА з частотою 80-98%, в залежності від типу СМА та етнічного походження пацієнтів [7]. Ген SMN включає ген SMN1 і його високогомологічну центромерну копію SMN2, яку ще називають геном sBCD541. Виявлено всього п'ять відмінностей між генами SMN1 та sBCD541. Дані два гени можна розрізнити шляхом ампліфікації 7-го та 8-го екзонів з подальшим використанням методу SSCP аналізу, або ж розщеплення продуктів ПЛР ендонуклеазами рестрикції. Поблизу теломерного кінця гена SMN ідентифікований ген NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein), який кодує білок інгібітор неврального апоптозу [7]. Гомозиготні делеції 5 та 6 екзонів гена NAIP були виявлені із частотою 27-37% у хворих на СМА. Здебільшого дані делеції зустрічались у хворих на важкий тип I СМА – хворобу Вердніга-Гоффмана. [7].

Метою даної роботи було проведення делеційного аналізу генів SMN1 та NAIP у пацієнтів з спинальною м'язовою атрофією із західного регіону України.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження були зразки ДНК, виділені з лейкоцитів периферійної крові дітей хворих на спинальну м'язову атрофію, що проходили медико-

генетичне консультування у Львівському ММГЦ ДУ «Інституту спадкової патології АМН України». Виділення та очистку ДНК із лейкоцитів периферійної крові проводили методом ферментативного розщеплення та подальшої фенольної екстракції, або методом висолювання. Молекулярно-генетичний аналіз делецій проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) на приладі “Терцик” (“ДНК-технологии”, Росія) з використанням реактивів, олігонуклеотидних послідовностей та ендонуклеази рестрикції (“МВІ Fermentas”). Для отримання продукту ампліфікації нами були використані олігонуклеотидні праймери: для 7-го екзона гена SMN - R111 541 та X7-Dra; для 8-го екзона гена SMN - 541 C960 та 541 C1120 ; для ампліфікації послідовності 5 екзона гена NAIP – 1863 і 1864. [8] У випадку аналізу делецій 7-го та 8-го екзонів гена SMN після закінчення ПЛР відбиралось 5 мкл проби, і аналізували на наявність продуктів ампліфікації за допомогою електрофорезу в 1,5% агарозному гелі. У випадку наявності ПЛР продукту до зразка додавали по 10 о.а. ендонуклеази рестрикції DraI (для аналізу делеції 7-го екзону) чи DdeI (для аналізу делеції 8-го екзону) та інкубували при 37 С на протязі ночі. Продукти гідролізу ампліфікованих послідовностей аналізували за допомогою електрофорезу в 1,5% агарозному гелі. Продукти ампліфікації 5-го екзона гена NAIP аналізували з допомогою мультилокусної ПЛР та подальшого електрофорезу в 2 % агарозному гелі, в якості контролю використовували продукт ампліфікації 13-го екзона гена NAIP .

Результати та обговорення

Делеційний аналіз генів SMN та NAIP проводили у 35 хворих на СМА. За клінічними проявами та часом маніфестації хвороби пацієнти були розділені на три групи. В першу групу увійшло 9 дітей до 2-х років із хворобою Верднига-Гоффмана (СМА I типу), в другу – 23 дітей 2-4-річного віку зі СМА II типу, в третю – 3 пацієнти 12-,20- та 27 - річного віку з пізньою маніфестацією СМА III типу.

Перш за все слід зазначити, що продукти ампліфікації 7-екзона генів SMN1 та cBCD541 (т.з. псевдоген) мають однаковий розмір. Відрізнити їх можна завдяки тому, що у продукті ампліфікації 7-го екзона гена cBCD541 наявний сайт впізнавання рестрикції рестриктази DraI, який утворюється олігонуклеотидним праймером X7-Dra з одним помилковим нуклеотидом [9] і розщепляється даною рестриктазою на два фрагменти. Ці два фрагменти відрізняються між собою на 12 п.н. У зразках ДНК хворих на СМА з гомозиготною делецією 7-го екзона гена SMN візуалізується тільки рестрикційний фрагмент, який відповідає 7-му екзону гена cBCD541. У пробандів, в яких є хоч по одній копії генів SMN1 та cBCD541, візуалізуються як рестрикований 176 п.н., так і не рестрикований 188 п.н., продукти ампліфікації. Тобто, при застосуванні даного методу делеційного аналізу ми оцінювали як ген SMN1, так і його високогомологічну центромерну копію псевдоген cBCD541. В усіх обстежених пацієнтів виявлено cBCD541-псевдоген. Нище в таблиці приводяться результати виявлених делецій екзону 7 гена SMN як окремо, так і в компаунді з делецією екзона 8 гена SMN1 і в компаунді з делецією екзона 8 та екзона 5 гена NAIP.

Таблиця

Делеційний аналіз генів SMN1 та NAIP у пацієнтів зі СМА.

| Генотип | Клінічний тип СМА | | |
|--|-------------------|-------------|-------------|
| | I (n-9) | II (n-23) | III (n-3) |
| Делеції екзонів 7, 8 SMN1 та екзона 5 NAIP | 4* (44,4 %**) | 0 (0 %) | 1 (33,3 %) |
| Делеції екзонов 7, 8 SMN1 | 3 (33,3 %) | 5 (21,7 %) | 0 (0 %) |
| Делеції екзона 7 SMN1 | 1 (11,1 %) | 0 (0 %) | 0 (0 %) |
| Делецій не виявлено | 1 (11,1 %) | 18 (78,3 %) | 2 (66,7 %) |

Примітки: *- абсолютні значення,

** - відсоток виявлених делецій в даній досліджуваній групі.

Отже, отримані результати засвідчили, що серед 35 пробандів делецію 7 екзона гена SMN1 у гомозиготному стані виявлено у 13 пробандів, що складає 40%. Гомозиготну делецію 8 – екзона гена SMN1 виявляли тільки у компаунді з делецією 7 екзона, і це стосувалося 7 пацієнтів зі СМА типу I, 5 пацієнтів зі СМА типу II та одного пацієнта зі СМА типу III. Тобто, делецію екзона 8 гена SMN1 назагал виявлено у 37% обстежених пацієнтів. А делеція екзону 5 гена NAIP була виявлена лише у компаунді з делеціями 7-го та 8-го екзонів гена SMN1 і її частота складала 14%.

Підсумовуючи отримані результати, очевидно, що біля 89% пацієнтів із хворобою Вердніга-Гоффмана, або СМА I типу, мають делеції 7,8 екзонів гена SMN1 та екзона 5 гена NAIP, які знаходяться в ділянці q13 хромосоми 5. При спінальній м'язовій атрофії II і III типів такі делеції у районі 5 q13 виявлені у 23% пацієнтів. Тобто, виявлені делеції асоційовані з особливо важкими проявами СМА. Отримані результати молекулярно-генетичного дослідження пацієнтів з підозрою на СМА із західного регіону України принципово співпадають із результатами інших досліджень.

Висновки:

1. Делеційний аналіз мутацій генів SMN1 та NAIP регіону 5q13 забезпечує коректну молекулярно-генетичну діагностику спінальної м'язової атрофії.
2. Отримані результати показали, що делеції 7,8 екзонів гена SMN1 та екзона 5 гена NAIP супроводжуються важкими клінічними проявами СМА.

Роботу виконано при фінансовому сприянні Західно-Українського Біо-Медичного Дослідницького Центру підтримки молодих вчених (WUBMRC).

Література

1. Munsat TL, Davies KE. Workshop report: International SMA consortium meeting.// *Neuromuscul Disord.* -1992. № 2. – P. 423-428.
2. Zerres K, Rudnik-Schoneborn S. Natural history in proximal spinal muscular atrophy. Clinical analysis of 445 patients and suggestions for a modification of existing classifications.// *Arch Neurol.* -1995. – vol. 52, № 5. – P.518-23.
3. Fried K, Mundel G. High incidence of spinal muscular atrophy type I (Werdnig-Hoffmann disease) in the Karaite community in Israel.// *Clin Genet.* -1977. - vol.12, № 4. - P.250-1.
4. Teebi AS. Autosomal recessive disorders among Arabs: an overview from Kuwait. // *J Med Genet.* -1994.-vol 31, № 3.- P.224-33.
5. Pascalet-Guidon MJ, Bois E, Feingold J, Mattei JF, Combes JC, Hamon C. Cluster of acute infantile spinal muscular atrophy (Werdnig-Hoffmann disease) in a limited area of Reunion Island.// *Clin Genet.* -1984. –vol.26, № 1.-P.39-42.
6. Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. // *Cell.* -1995.- vol.80, № 1.- P.55-65.
7. Roy, N., Mahadevan, M.S., McLean, M., Shutler, G., Yaraghi, M., Farahani, R., Baird, S., Besner-Johnston, A., Lefebvre, C., Kang, X., et al.,. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy.// *Cell.* -1995.- vol 80. № 1.-P.167-178.
8. Экишиян А.Ю., Лившиц Л.А., Бычкова А.М. Молекулярно-генетический анализ спинальной мышечной атрофии (СМА) в семьях высокого риска из разных регионов Украины. *Циология и генетика.*– Киев.-1997.-Т 31. №6. -75-80.
9. Van der Steege, G., Draaijers, T.G., Grootsholten, P.M., Osinga, J., Anzevino, R., Velonà, I., Den Dunnen, J.T., Scheffer, H., Brahe, C., van Ommen, G.J.B. and Buys, C.H.C.M. A provisional transcript map of the spinal muscular atrophy (SMA) critical region.// *Eur. J. Hum. Genet.* -1995. - vol. 3. – P.87-95.

Резюме

Наведено результати делеційного аналізу 7-го та 8-го екзонів гена SMN1 і 5-го екзона гена NAIP у пробандів з I,II, III типами СМА із західного регіону України.

Результати досліджень показали, що делеції 7,8 екзонів гена SMN та ексона 5 гена NAIP супроводжуються важкими клінічними проявами СМА.

Приведены результаты делеционного анализа 7-го и 8-го экзонов гена SMN и 5-го экзона гена NAIP в пробандов с I, II, III типами СМА из западного региона Украины. Результаты исследований показали, что делеции 7,8 экзонов гена SMN и экзона 5 гена NAIP сопровождаются тяжелыми клиническими проявлениями СМА.

It is shown the results of 7 and 8 exons of SMN gene and 5 exon of NAIP gene deletion analysis among probands with I, II, III types of SMA from the west Ukrainian region. The results revealed that deletions of the SMN gene 7 and 8 exons and 5 exon of NAIP gene were detected among the patients with heavy clinical symptoms of SMA.

**ТЫЖНЕНКО Т.В.¹, КАРАЧЕНЦЕВ Ю.И.¹, ПОЧЕРНЯЕВ А.К.¹,
ГОРШУНСКАЯ М.Ю.², АТРАМЕНТОВА Л.А.^{1,3}, КРАВЧУН Н.А.¹ ПОЛТОРАК В.В.¹**

¹ ГУ “Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я. Данилевского АМН Украины”, Украина, 61002, Харьков, ул. Артёма, 10;

² Харьковская медицинская академия последипломного образования Украина, 61176, Харьков, ул. Корчагинцев, 58;

³ Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина Украина, 61077, Харьков, пл.Свободы, 4. E-mail: wshkoda23@rambler.ru

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОТИПОВ ПО ЛОКУСАМ *PON1* И *APM1* В ГРУППЕ ДОНОРОВ НАСЕЛЕНИЯ ХАРЬКОВА

Эндокринные и сердечно-сосудистые заболевания являются наиболее многочисленными в группе так называемых «болезней цивилизации», поэтому поиск их маркеров и кандидатных генов – актуальная задача медицинской генетики. В связи именно с этой проблемой интенсивно исследуются полиморфизмы гена параоксоназы *PON-1* и гена адипонектина *APM1*.

Ген параоксоназы локализован на седьмой хромосоме (7q21–22) [1]. Его продукт – фермент параоксоназа проявляет активность по отношению к широкому спектру субстратов, участвуя в детоксикации органофосфатов, предупреждая атерогенные модификации липопротеинов низкой и высокой плотности [2-4]. Известны различные полиморфизмы *PON-1*, приводящие к изменению активности параоксоназы. Один из них – однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism, SNP) *PON-1* представляет собой несинонимическую замену Q192R SNP в Region Ex6+78A>G [1]. Полиморфизм *PON-1* 192 неодинаково представлен в разных популяциях и по-разному ассоциирован с сердечно-сосудистыми и эндокринными заболеваниями [5-7].

Ген адипонектина *APM1*, находится на третьей хромосоме в локусе 3q27 [8, 9, 10]. Ему отводится роль кандидатного гена сахарного диабета 2-го типа [11], так как продукт этого гена – гормон адипонектин, модулируя чувствительность к инсулину, участвует в регуляции инсулинорезистентности [8, 12–14]. Как показано на ряде этнических групп и популяций, однонуклеотидный полиморфизм, представляющий собой замену гуанина (G) на тимин (T) во втором интроне (SNP +276G>T (регион IVS2+62G>T)), наиболее тесно, ассоциирован с заболеванием.

Несовпадение результатов относительно ассоциаций генов с заболеваниями [12, 15-18] вызывает дискуссии среди учёных, в которых высказываются различные соображения относительно источников разногласий. Одной из причин несогласованности результатов называют статистическую флуктуацию, связанную с размером выборок, статистические погрешности, связанные с эффектом множественных сравнений, работой на смещённых выборках. В качестве другой