

**ПЕРСПЕКТИВЫ ДНК-ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИИ
НА ПРИМЕРЕ ПЕРИОДИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ**

Т.Ф.Саркисян, А.С.Айрапетян, Е.О.Мнджоян, З.Р.Оганесян,
Т.С.Степанян, Д.Т.Бабибян

/Центр медицинской генетики Национальной Академии Наук РА/

Ключевые слова: периодическая болезнь, мутации гена MEFV, генотип, фенотип

Клонирование и локализация последовательностей кДНК генов человека создают принципиально новые возможности для диагностики наследственных заболеваний, основанные на исследовании мутантных аллелей у пациентов, членов их семей или предполагаемых гетерозиготных носителей патологических мутаций. Современные методы молекулярной диагностики, наряду с проведением пренатальной диагностики на самых ранних стадиях развития плода, позволяют определять риск возникновения заболевания до проявления его клинических симптомов. Во многих странах Западной Европы и Северной Америки налаженное массовое скринирование всей популяции на выявление носителей рецессивных мутаций является оправданным в плане организации профилактических мероприятий по предупреждению рождения больных детей.

Распределение и частота редких мутаций в различных этнических группах и популяциях зависят от мутагенных эффектов, действия факторов отбора, в частности, миграции, инбридинга, а также географической и этнической изолированности.

Во многих популяциях (чаще всего в изолятах и при высоком уровне инбридинга) широко распространены некоторые специфические рецессивные мутации, причем в определенных случаях высокая концентрация мутантных аллелей обусловлена селективным преимуществом гетерозигот.

В 1997 г. методами позиционного клонирования был идентифицирован ген MEFV, мутации которого вызывают развитие семейной средиземноморской лихорадки или периодической болезни (ПБ) [6,7,9,10]. Ген MEFV экспрессируется преимущественно в гранулоцитах и кодирует белок пирин/маренострин, состоящий из 781 аминокислоты [3,5]. Анализ аминокислотной последовательности белка свидетельствует о его экспрессии по типу ядерного фактора, регулирующего процессы транскрипции [4,5,10]. Ген MEFV, занимающий локус хромосомы 16p13.3, образован 10 экзонами, составляющими 14 кб геномной ДНК. Таким образом, с помощью идентификации мутаций разных экзонов гена MEFV стала возможной ранняя диагностика заболевания [1,2,8].

В связи с широкой распространенностью рецессивно наследуемой ПБ в Армении нами проводится молекулярная идентификация мутантных аллелей, при

помощи которых проводится успешное выявление генных мутаций у больных и гетерозиготных носителей.

В настоящей работе представлено молекулярно-генетическое исследование ДНК, полученной от 1000 пациентов, страдающих ПБ, а также членов их семей, с целью выявления носителей и определения частоты мутаций гена MEFV в армянской популяции.

Материал и методы

Молекулярно-генетический анализ проведен на 1000 больных ПБ в возрасте от 1 месяца до 70 лет (средний возраст 30,5 лет); из них 263 являлись членами неродственных 94 семей, в которых наблюдалась передача болезни по наследству от родителей детям. Всего исследовано 1775 независимых аллелей.

Клинические симптомы заболевания (амилоидоз почек, артрит, лихорадка, перитонит, плеврит, рожистое воспаление кожи, диарея) до проведения лечения колхицином отмечали в специально разработанных анкетах, применяемых в клиниках Франции и США.

Контрольной группой служили 650 здоровых лиц армянской национальности.

Геномную ДНК выделяли из периферической крови по стандартной методике. Для скрининга мутаций гена MEFV использовали несколько методов (рис.1). Геномную ДНК амплифицировали с помощью соответствующих праймеров с получением продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Полученные продукты ПЦР подвергали электрофорезу в агарозном или полиакриламидном геле. Эксперименты проводили с целью скрининга изменений в последовательностях большей части 10-го экзона, а также 2, 3 и 5-го экзонов. Условия экспериментов ПЦР и анализа фрагментов рестрикции

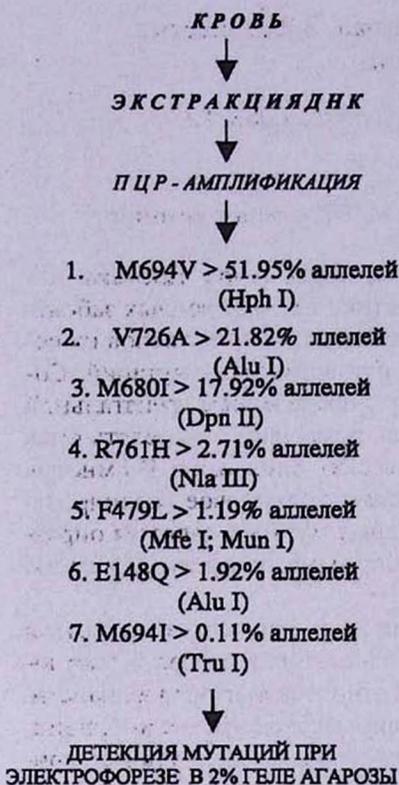


Рис.1. Стратегия, используемая для скрининга мутаций гена MEFV

определяли с помощью компьютерных программ MEE87 и SQNTX. Продукты ПЦР, в которых изменения не были выявлены, последовательно смешивали с продуктами ПЦР, полученными от нормального контроля, после чего их подвергали циклу плавления и воссоединения, создавая гетеродуплексы с целью уточнения результатов рестрикционного анализа.

Результаты и обсуждение

Впервые в армянской популяции нами проведен молекулярно-генетический анализ в группе больных ПБ. В образцах геномной ДНК определены 7 - 12

различных мутантных последовательностей гена MEFV: E148Q (2 экзон), P369S, R408Q (3 экзон), F491L (5 экзон), M680I, V726A, M694V, R761H, K695R, M694I, A744S, R42W (10 экзон). Первоначально исследования проводились совместно с двумя научными центрами США и Франции (Dr.Kastner, NIH, Bethesda; Prof. S.Amselem, Paris); в последующем с 1999г. вся работа стала проводиться непосредственно в Центре медицинской генетики НАН РА.

Молекулярно-генетический анализ 200 независимых хромосом первой группы позволил установить, что позитивной по панели из 13 мутаций оказалась у наибольшей части из 111 больных ПБ (91,0%). Из них 80,6% явились носителями одной из трех мутаций, встречаемых со следующей частотой: M694V – 50,4%, V726A – 23,4%, M680I – 20,4%. Наиболее высокой пенетрантностью обладала мутация M680I. Вне экзона 10 (в экзонах 2,3,5) наиболее высокая степень пенетрантности (90,8%) отмечена среди носителей мутации F479L экзона 5. Исходя из данных по частоте трех мутаций экзона 10, обладающих наибольшей пенетрантностью (M680I, V726A, M694V), частота больных среди армян теоретически может достигнуть соотношения 1:25 [11]. При сравнении полученных данных с популяционными исследованиями 1993 г., выявившими частоту больных в армянской популяции, равную 1,13%, предполагается, что, вероятно, даже указанные три мутации характеризуются неполной пенетрантностью [11].

В последующем для уточнения закономерностей распределения мутантных аллелей гена MEFV в армянской популяции была исследована большая группа из 214 больных ПБ. При анализе 278 независимых аллелей мутации гена MEFV наблюдались у 93%; среди обследованных лиц была впервые обнаружена новая мутация E230K (экзон 2). Следует отметить, что среди больных ПБ частота мутаций вне экзона 10 оказалась равной 9%. Мутационный анализ, проведенный среди больных и здоровых лиц, подтвердил предположение о неполной пенетрантности мутаций, локализованных вне экзона 10.

В контрольной группе, состоящей из 250 здоровых лиц, при анализе 288 независимых хромосом общая частота носителей всех изученных мутаций гена MEFV составила 0,37; в отношении мутаций в 10 экзоне данная величина равна 0,25 [11].

Интересным феноменом явилось обнаружение носителей двух мутаций гена MEFV среди 43 лиц контрольной группы, не имеющих каких-либо симптомов ПБ. При этом закономерным явилось наличие в половине из 86 аллелей одной из двух последовательностей: E148Q или P369S.

В контрольной группе нами обнаружены десять генотипов с комплексными 3–4 аллелями, девять из которых явились носителями мутации P369S (табл. 1). На основании наших наблюдений, предполагается протекторный эффект мутации P369S (3 экзон), которая в отличие от всех остальных оказалась наиболее характерной для контрольной группы (9,95% среди 392 изученных хромосом) в сравнении с группой больных индивидов (2,0% среди 200 проанализированных аллелей).

Таким образом, при молекулярном анализе гена MEFV по 9 мутациям совместно с Национальным институтом здоровья США были получены предварительные результаты общей частоты носителей мутаций (2 рq), составившие 2:1 среди обследованных лиц. Поскольку эти данные несколько превысили ожидаемые, в настоящее время нами вновь была отобрана группа здоровых из 160 человек, в

основном состоящая из доноров. Ожидаемые результаты по установлению окончательной частоты бессимптомных гетерозиготных носителей в армянской популяции позволят оценить степень генетического риска для такой распространенной в Армении патологии как ПБ.

Таблица 1

Выявление 10 носителей трех и более мутаций гена MEFV (31 аллель)

Генотип	Число индивидов
P369S/M694V/V726A	3
E148Q/M694V/P369S	1
M694V/M694V/E148Q	1
M694V/M694V/P369S	1
P369S/R408Q/M694I	1
E148Q/P369S/M680I	1
M694V/M694V/M680I/P369S	1
V726A/V726A/P369S	1
Всего	10

Пополнение результатов исследования новыми данными позволило сформировать наиболее полноценную группу из 1000 больных ПБ, проживающих в разных регионах Армении. Идентифицированы 7–12 мутаций гена MEFV при анализе 1775 независимых аллелей. Полученные результаты по распределению спектра мутаций гена MEFV подтвердили установленные ранее закономерности. Наиболее распространены в армянской популяции три мутации: M694V (51,95%), V726A (21,82%), M680I (17,92%). Наиболее редкие мутации: R761H (2,71%), E148Q (1,92%), F479L (1,19%), M694I (0,45%), R408Q (0,06%) и др. Результаты молекулярно-генетического анализа спектра мутаций гена MEFV представлены в табл. 2.

Таблица 2

Спектр мутаций гена MEFV у 1000 больных ПБ из Армении

Мутации	Число независимых аллелей	%
M694V	919	51.95
V726A	386	21.82
M680I	317	17.92
R761H	48	2.71
P369S	36	2.04
E148Q	34	1.92
F479L	21	1.19
A744S	2	0.11
R42W	2	0.11
M694I	8	0.45
K695R	1	0.06
R408Q	1	0.06
Всего	1775	100

Общее число больных ПБ с двумя мутациями составило 696 (1388 независимых аллелей). Гомозиготы по мутации M694V составляли 24,57%; частота генотипов: M694V/V726A – 23,71%; M694V/M680I – 16,24%. Частота генотипов, мажорных для других популяций: V726A/M680I – 12,36%; V726A/V726A – 3,59%; M680I/M680I – 3,74% (табл. 3).

Таблица 3

Генотипы локуса MEFV у 696 больных ПБ (1388 аллелей по две мутации)

Генотип	Число	%
M694V/M694V	171	24.57
M694V/V726A	165	23.71
M694V/M680I	113	16.24
M680I/V726A	86	12.36
M680I/M680I	26	3.74
M694V/R761H	21	3.02
V726A/V726A	25	3.59
M694V/E148Q	23	3.30
M680I/R761H	10	1.44
V726A/R761H	8	1.15
V726A/F479L	10	1.44
M694V/P369S	5	0.71
V726A/P369S	3	0.43
M680I/P369S	3	0.43
M680I/E148Q	4	0.57
M680I/F479L	2	0.29
E148Q/E148Q	1	0.14
F479L/F479L	1	0.14
M694I/E148Q	2	0.29
P369S/R408Q	1	0.14
P369S/R761H	1	0.14
M694I/E148Q	1	0.29
M694V/F479L	1	0.14
E148Q/R42W	1	0.14
V726A/R42W	1	0.14
E148Q/P369S	2	0.43
M694I/V726A	2	0.29
M694V/M694I	1	0.14
V726A/E148Q	2	0.29
M680I/M694I	2	0.29
Всего	696	100

Можно заключить, что в результате проведенного молекулярно-генетического исследования мутаций гена MEFV выявлена достоверная частота мутантных аллелей и генотипов, характерная для армянской популяции.

Проведен молекулярно-генеалогический анализ в группе из 263 больных ПБ, являющихся членами 94 неродственных семей. Наследование фенотипических признаков заболевания от родителей детям обусловлено наличием двух (реже одной) мутантных аллелей. Сравнительный анализ результатов спектра мутаций гена MEFV по родословным в семьях больных продемонстрировал передачу мутаций от родителей детям при наличии двух мутантных аллелей гена MEFV у большого родителя, а также одной из мутантных аллелей у здоровых родителей. Генеалогическое исследование во всех семьях больных свидетельствует о высоком риске наследования мутаций гена MEFV. Молекулярный анализ был возможен не для всех членов исследованных семей и был осуществлен: у пробанда и обоих родителей – в 9 семьях; пробанда, обоих родителей и сибсов – в 9 семьях; пробанда и одного из родителей – в 34 семьях; пробанда и сибсов – в 22 семьях; пробанда, одного из родителей и сибсов – в 11 семьях.

Интерпретация полученных результатов позволила выявить следующие закономерности:

1. Подтвержден аутосомно-рецессивный тип наследования мутаций гена MEFV: пробандом от обоих родителей, являющихся носителями одной из мутаций (в 17 семьях);
2. В некоторых случаях (в 8 семьях) обнаружен псевдо-доминантный тип наследования двух мутаций от одного из родителей;
3. Передача одной из мутаций от одного родителя пробанду и сибсам показана в 36 семьях;
4. Наследование двух мутаций пробандом и сибсами без анализа генотипов родителей выявлено в 21 семье;
5. Неполная ценетрантность при анализе фенотипа заболевания описана в 9 семьях.

Полученные результаты анализа мутаций у больных из разных регионов Армении свидетельствуют о наличии популяционных отличий в частоте и спектре мутаций гена MEFV, а также о зависимости тяжести и формы заболевания от молекулярной структуры гена MEFV.

Поступила 20.03.01

ԺԱՌԱՆԳԱԿԱՆ ԱՆՏԱՐԱՆՈՒԹՅԱՆ ԳՆԹ ԱՆՏՈՐՈՇՄԱՆ ՀԵՌԱՆԿԱՐՆԵՐԸ
ՊԱՐԱԲԵՐԱԿԱՆ ՀԻՎԱՆԴՈՒԹՅԱՆ ՕՐԻՆԱԿՈՎ

Թ.Ֆ. Սարգսյան, Հ.Ս. Հայրապետյան, Ե.Հ. Մնջոյան, Ջ.Ռ. Հովհաննիսյան,
Տ.Ս. Ստեփանյան, Դ.Տ. Բարիկյան

Պարբերական հիվանդությամբ փառապող 1000 և 650 առողջ անձանց մոտ կարարված MEFV գենի մուրացիաների սկրինինգի համաձայն մուրանք պելների ավելի քան կեսը կրում են M694V մուրացիան, իսկ ազգությամբ հայ հիվանդների մոտ ամենաբարձր հաճախականությամբ հանդիպում են M694V/ M694V, M694V/ V726A և M694V/ M680I գենոտիպերը, իսկ որոշ հազվագյուտ գենոտիպեր հայտնաբերվել են նաև մեկական անձանց մոտ:

Մուրացիաների հաճախականության փարբերությունը հիվանդների և առողջ անձանց միջև ապացուցում է պենետրանության կախվածությունը 2 մուրացիաների ձևերից, օրինակ P369S մուրացիայի առկայությունը, կանխում է պարբերական հիվանդության ֆենոտիպի զարգացումը:

Միևնույն ժամանակ ՊՆ 94 ընդանիքների փոխաբանական ուսումնասիրությունը ապացուցում է մուրացիաների և ֆենոտիպի ժառանգումը ծնողներից սերունդներին:

**PERSPECTIVES OF DNA-DIAGNOSTICS OF HEREDITARY PATHOLOGY
ON THE EXAMPLE OF PERIODIC DISEASE**

**T.F.Sarkisian, H.S.Ayrapetyan, E.H.Mndjoyan, Z.R.Oganesyan,
T.S.Stepanyan, D.T. Babikyan**

In a group of 1000 Armenian patients suffering with Familial mediterranean fever (FMF) the mutations of MEFV gene have been identified. The results of screening of MEFV mutations in Armenian FMF patients and healthy individuals give the information of carrier frequency of MEFV mutations in Armenians. The most frequent mutations and genotypes revealed in Armenian population were M694V substitutions are found in more than half of mutant alleles. The most frequent genotypes are M694V, followed by M694V/V726A and M694V/M680I. Some rare genotypes were found only in one patient each. The differences between frequency of mutations among patients and controls in Armenian population suggest that the penetrance depends on the type of mutation. The genotypes with P369S mutation were not associated with clinical features of FMF. The data of pedigree analysis of 94 families suggest the parent-to-offspring transmission of the mutations, and the disease phenotype is explained by the presence of one or two mutant alleles.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Cazeneuve C., Sarkisian T., Ajrapetyan H., Amselem S. et al. Am.J.Hum.Genet., 1999 65:88.*
2. *Cazeneuve C., Sarkisian T., Ajrapetyan H., Babloyan A. et al. Am.J.Hum.Genet., 2000, 67:1136.*
3. *Dipple K.M., McCabe E.R.B. Am.J.Hum.Genet., 2000, 66:1729.*
4. *Feingold J. Medecine/sciences, 2000, 16:1-Y.*
5. *Kisilevsky R. Nat. Med., 2000, 6:633.*
6. *The French FMF Consortium Nat.Genet., 1997, 17:25-31.*
7. *The International FMF Consortium Cell, 1997, 90:797.*
8. *Bernot A., da Silva C., Dode C., Touitou I. et al. Hum.Mol.Genet., 1998, 7:1317.*
9. *Booth D.R., Gillmore J.D. et al. QJM, 1998, 91:603.*
10. *Kluve-Beckerman B., Yamada T. et al. Biochem. J., 2000, 332:663.*
11. *Torosyan Y., Aksentijevich I., Sarkisian T., Ajrapetyan H. et al. Am.J.Hum.Genet., 2000, 67:4-2265.*