

УДК 577.213.3

А. Ю. Экциян, Л. А. Лившиц, С. А. Кравченко,
В. В. Мельник, С. И. Мусиенко, В. И. Гришко

Аллельный полиморфизм TTGA-тетрануклеотидных тандемных повторов гена дистрофина в региональных популяциях здорового населения Украины и в семьях с высоким риском мышечной дистрофии Дюшенна

Проведен анализ полиморфизма TTGA-тетрануклеотидных тандемных повторов гена дистрофина в двух региональных популяциях Украины. Получены данные о распределении аллельных вариантов TTGA-тандемных повторов в изученных региональных популяциях. Выявлен новый редкий аллельный вариант, предположительно соответствующий наличию трех TTGA-повторов. Для определения диагностической информативности данной полиморфной системы осуществлен ДНК-анализ в 47 семьях с высоким риском МДД из разных регионов Украины. Система оказалась диагностически информативной в 15 семьях.

Введение. Одним из важнейших направлений в изучении генома человека является анализ индивидуальной изменчивости нуклеотидной последовательности ДНК [1]. Подобные исследования в настоящее время органично дополняют широко развернувшиеся во всем мире работы по тотальному секвенированию генома человека. Анализ индивидуального полиморфизма ДНК генома (и особенно его некодирующих областей) в популяциях представляет большой интерес для ответа на вопрос о том, какая доля генетической гетерогенности популяции определяется действием таких процессов, как отбор, миграция и случайный дрейф. В этом аспекте особенно существенно изучение полиморфизма последовательностей такого гигантского гена, как ген дистрофина. К настоящему времени описано очень большое количество полиморфных участков ДНК этого гена. К их числу относятся многочисленные внутригенные и фланкирующие маркеры полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДФ-маркеры), высокополиморфные внутригенные динуклеотидные CA-повторы, полиморфные варианты различных коротких тандемных повторов в нетранслируемых последовательностях гена дистрофина [2—5]. Особенно важным представляется тот факт, что благодаря успехам в картировании и изучении гена дистрофина точная локализация и функциональная значимость этих последовательностей достаточно подробно изучены и, таким образом, это позволяет в ходе популяционных исследований оценить, какие из функционально различных по своему значению последовательностей могут находиться под действием отбора, а какие представляют собой так называемые «нейтральные» вариации.

Кроме того, анализ полиморфизма последовательностей гена дистрофина важен также при обследовании семей с высоким риском мышечной дистрофии Дюшенна (МДД). В настоящее время разработаны эффективные

системы диагностики этого заболевания, основанные на сцеплении определенных вариантов полиморфных маркеров с мутантными фенотипами. Существенной характеристикой информативности таких диагностических систем является частота гетерозиготных генотипов по маркерным локусам, поскольку при X-сцепленных заболеваниях можно проследить передачу той или иной X-хромосомы больному ребенку от матери и, следовательно, определить, какая из них несет МДД-мутацию, только когда мать пробанда имеет гетерозиготный генотип, т. е. ее X-хромосомы маркированы разными аллельными вариантами изучаемой последовательности.

Ранее проведенный нами анализ ПДРФ последовательностей внутригенного *pERT*-локуса гена дистрофина в системах *pERT87-15 — BamHI*, *pERT87-8 — TaqI*, *pERT87-15 — XmnI* в семьях с высоким риском МДД из разных регионов Украины показал высокую эффективность его использования для диагностики данного заболевания [6]. Но, учитывая высокую вероятность кроссинговера между этими полиморфными маркерами и МДД-мутациями вследствие гигантского размера гена дистрофина, ДНК-анализ по ПДРФ-маркерам, находящимся в центральной области гена, должен быть дополнен анализом полиморфизма последовательностей, локализуемых в 5'- и 3'-нетранслированных областях гена.

Целью данной работы было изучение полиморфизма ТТГА-тетрануклеотидных tandemных повторов из 3'-нетранслируемой области гена дистрофина в популяции здорового населения Украины и в семьях с высоким риском МДД.

Материалы и методы. Материалом для проведения исследований служили препараты ДНК, полученные из лейкоцитов периферической крови здоровых доноров и матерей больных МДД. Выделение и очистку препаратов ДНК осуществляли по методу, изложенному в работе [7]. Для анализа полиморфизма ТТГА-тетрануклеотидных tandemных повторов гена дистрофина проводили амплификацию ДНК *in vitro* с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Олигонуклеотидные праймеры [4], томологичные нуклеотидной последовательности, фланкирующей исследуемый локус, синтезированы в АО «Экотур» (Вильнюс, Литва). Термостабильная полимеразы производства НПО «Биопол» (Москва, Россия). ПЦР проводили в автоматическом режиме на термоциклере «Perkin Elmer» (фирма «Cetus», США) по следующей схеме: денатурация ДНК — 0,5 мин, 93 °С; отжиг праймеров — 0,7 мин, 55 °С; элонгация — 1 мин, 71 °С. Продукты ПЦР анализировали после их электрофоретического разделения в 12 %-м полиакриламидном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием и сканированием на УФ-трансиллюминаторе. В качестве маркеров молекулярной массы фрагментов использовали ДНК плазмиды *pBR322*, гидролизованную эндонуклеазой рестрикции *HaeIII*. При статистической обработке полученных результатов применяли общепринятые методы вариационной статистики [8].

Результаты и обсуждение. В настоящем исследовании нами был проведен анализ частот аллельных вариантов полиморфизма ТТГА-тандемных тетрануклеотидных повторов из 3'-нетранслируемой области гена дистрофина среди здоровых женщин из киевской и алчевской (Луганская обл.) популяций Украины. Было проанализировано соответственно 51 и 62 образца ДНК.

В ходе анализа выявлены два основных варианта амплифицированных последовательностей: Т1 — размером 80 п. н., соответствующий наличию пяти ТТГА-тетрануклеотидных повторов в 3'-нетранслируемой области гена дистрофина, и Т2 — размером 84 п. н., соответствующий наличию шести вышеуказанных повторов (рис. 1). Кроме основных продуктов амплификации, у гетерозигот по данному полиморфизму при электрофоретическом разделении фрагментов обнаруживались гетеродуплексы, имевшие

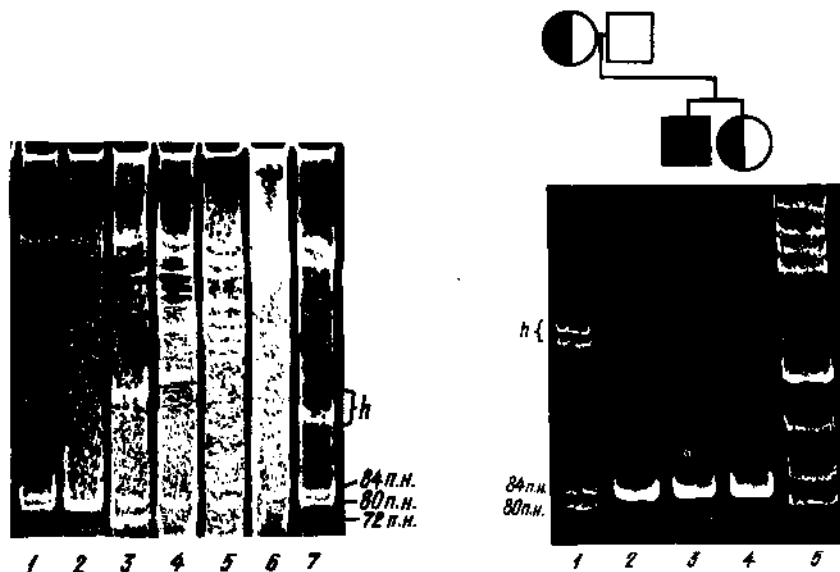


Рис. 1. Анализ полиморфизма ТТГА-тандемных повторов гена дистрофина в популяции здорового населения Украины (12 %-й ПААГ): 1, 7 — генотип Т1Т2; 2, 4 — Т1Т1; 3 — Т1Т3; 6 — генотип Т2Т2; 5 — маркер молекулярной массы — ДНК плазмиды *pBR322*, гидролизованная эндонуклеазой рестрикции *HaeIII*; *h* — гетеродуплексы

Рис. 2. Анализ полиморфизма ТТГА-тандемных повторов гена дистрофина в семье А. (12 %-й ПААГ): 1 — генотип Т1Т2; 2, 3 — Т2; 4 — Т2Т2; 5 — маркер молекулярной массы — ДНК плазмиды *pBR322*, гидролизованная эндонуклеазой рестрикции *HaeIII*; *h* — гетеродуплексы

меньшую электрофоретическую подвижность (см. рис. 1). Среди образцов ДНК доноров из Алчевска в одном случае был обнаружен ранее не описанный третий аллельный вариант ТТГА-тандемных повторов. По предварительной оценке, размер амплифицированного фрагмента, который соответствует этому аллелю, названному Т3, составляет ориентировочно 72 п. н., т. е. наиболее вероятно, что в его состав входят три ТТГА-тетрануклеотидных повтора (см. рис. 1).

Данные распределения частот полиморфных аллелей приведены в таблице. Как видно, в обеих исследованных региональных популяциях Украины наблюдалось преобладание X-хромосом с аллельным вариантом, содержащим пять ТТГА-тандемных повторов. В аналогичном исследовании полиморфизма вышеназванных повторов в популяции англичан была выявлена следующая частота аллелей: Т1 — 0,88; Т2 — 0,12 [4].

У проанализированных здоровых женщин из региональных популяций Украины было выявлено четыре варианта генотипов: Т1Т1, Т1Т2, Т2Т2, Т1Т3.

Частоты полиморфных вариантов ТТГА-тандемных повторов в региональных популяциях Украины

Популяция	Т1	Т2	Т3
Киев	0,76	0,24	0,00
Алчевск	0,79	0,20	0,01

Примечание. Т1, Т2, Т3 — аллели с пятью, шестью и тремя ТТГА-тандемными повторами соответственно.

Для даної поліморфної системи в обох досліджуваних нами популяціях не було обнаружено достовірних різниць між спостережуваним і очікуваним (в відповідності з рівновагою Харді — Вайнберга) розподілом генотипів (для київської популяції — $\chi^2 = 0,2$; $d.f = 1$; для луганської — $\chi^2 = 0,46$; $d.f = 2$). Гетерозиготність в київській популяції становить 35,3%, в луганській — 35,5%.

Аналіз поліморфізму ТТГА-тандемних повторів був проведений також в 47 родин з високим ризиком МДД із різних регіонів України. Данна поліморфна система виявилася діагностично інформативною в 15 родин. В родині А. стало можливим проведення ДНК-аналізу для встановлення носійства сибсом жіночого пола МДД-мутаций (рис. 2). Було встановлено, що дівчинка успадкувала від матері Х-хромосому з гаплотипом Т2 (наличие шести ТТГА-тандемних повторів в гені дистрофіну), який в даній родині асоційований з МДД-мутацией. Тому було зроблено висновок, що дівчинка отримала від матері Х-хромосому з МДД-мутацией і є носієм.

Таким чином, рівень гетерозиготності по даному поліморфізму становить близько 35%, що робить його зручним маркером для внутрішньорідинної ДНК-діагностики МДД в Україні.

Раніше нами був проведений аналіз поліморфізму GTAA-тандемних повторів із 3'-нетранслюованої області гена дистрофіну серед здорових жінок із регіональних популяцій України, який показав більш низький рівень гетерозиготності (6%) по даному поліморфному локусу [9] в порівнянні з рівнем гетерозиготності по ТТГА-тандемним повторам. З урахуванням цього представляється цілком доцільним використовувати для внутрішньорідинної діагностики МДД тільки аналіз поліморфізму ТТГА-тандемних повторів.

Робота виконана в рамках проекту № 5.3/9 ГКНТ при Кабінеті Міністрів України.

*О. Ю. Екшиян, Л. А. Лівшиць, С. А. Кравченко,
В. В. Мельник, С. І. Мусієнко, В. І. Гришко*

АЛЕЛЬНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ТТГА-ТЕТРАНУКЛЕОТИДНИХ ТАНДЕМНИХ ПОВТОРІВ ГЕНА ДИСТРОФІНУ В РЕГІОНАЛЬНИХ ПОПУЛЯЦІЯХ ЗДОРОВОГО НАСЕЛЕННЯ УКРАЇНИ І В СІМ'ЯХ З ВИСОКИМ РИЗИКОМ М'ЯЗОВОЇ ДИСТРОФІЇ ДЮШЕННА

Резюме

У двох регіональних популяціях України здійснено аналіз поліморфізму ТТГА-тетрануклеотидних тандемних повторів гена дистрофіну. Отримано дані щодо розподілу алельних варіантів ТТГА-тандемних повторів у вивчених регіональних популяціях. Виявлено новий рідкісний алельний варіант, який найімовірніше відповідає наявності трьох ТТГА-повторів. З метою визначення діагностичної інформативності даної поліморфної системи проведено ДНК-аналіз у 47 родин з високим ризиком МДД із різних регіонів України. Система виявилася діагностично інформативною у 15 родин.

*A. Yu. Ekshiyun, L. A. Livshits, S. A. Kravchenko,
V. W. Melnik, S. I. Musienko, V. I. Grishko*

TTGA-TANDEM REPEATS ALLELIC POLYMORPHISM OF DYSTROPHIN GENE AMONG HEALTHY VOLUNTEERS FROM DIFFERENT REGIONS OF UKRAINE AND IN DMD-FAMILIES

Summary

The analysis of polymorphisms TTGA-tandem repeats in 3'-untranslated region of dystrophin gene was performed among healthy population of Kiev and Lugansk regions and in 47 DMD-families from

different regions of Ukraine as well. The distribution of the TTGA-tandem repeats allelic variants was obtained. Unknown allelic variant of the TTGA-tandem repeats (presumable three TTGA-units) was found. This system was diagnostically informatived for 15 DMD-families

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cavalli-Sforza L. L. Opinion: How can one study individual variation for 3 billion nucleotides of the human genome? // Amer. J. Hum. Genet.—1990.—46.—P. 649—651.
2. Prior T. W., Friedman K. J., Silverman L. M. RFLP for *HindIII* at the Duchenne muscular dystrophy gene // Nucl. Acids Res.—1989.—17.—P. 2167—2168.
3. Bakker E., Bonten E. J., De Lange L. F. et al. DNA probe analysis for carrier detection and prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy: a standard diagnostic procedure // J. Med. Genet.—1986.—23, N 6.—P. 573—580.
4. Roberts R. G., Montandon A. J., Bobrow M. et al. Detection of novel genetic markers by mismatch analysis // Nucl. Acids Res.—1989.—17, N 15.—P. 5961—5971.
5. Chakraborty R., Zhong Y., De Andrade M. et al. Linkage disequilibrium among $(CA)_n$ polymorphisms in the human dystrophin gene and their implications in carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and becker muscular dystrophies // Genomics.—1994.—21, N 3.—P. 567—570.
6. Гришко В. И., Мазярчук С. Г., Лившиц Л. А. Полиморфизм последовательностей *pERT*-локуса гена дистрофина в семьях с высоким риском мышечной дистрофии Дюшенна и среди здоровых женщин Украины // Биополимеры и клетки.—1993.—9, № 4.—С. 104—107.
7. Wehnert M., Herrmann F. H., Metzke H. et al. Erste ergebnisse bei der genomischen Carrierdiagnostik in Risikosippen mit Haemophilie A und B in der DDR // Z. Geburtsh. u. Med.—1988.—43, N 16.—P. 441—444.
8. Животовский Л. А. Статистические методы анализа частот генов в природных популяциях // Теорет. популяцион. генетика. — М.: ВИНТИ, 1983.—С. 76—104.— (Итоги науки и техники. Сер. Общая генетика; Т. 8).
9. Лившиц Л. А., Гришко В. И., Мазярчук С. Г., Кравченко С. А. Полиморфизм тандемных повторов гена дистрофина в популяции населения Украины // Цитология и генетика.—1994.—28, № 3.—С. 79—85.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики
НАН Украины, Киев

Поступила в редакцию
05.06.95