

На правах рукописи



ФАТТАХОВА АЛЬФИЯ ХАЙДАРОВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО - ГЕНЕТИЧЕСКИХ
ОСНОВ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ИДИОПАТИЧЕСКОЙ
ЭПИЛЕПСИИ**

03.00.15 - генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Уфа – 2005

Работа выполнена в Институте биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Хуснутдинова Эльза Камилевна

Научный консультант: доктор медицинских наук, профессор
Борисова Нинель Андреевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Спицын Виктор Алексеевич

доктор биологических наук
Мустафина Ольга Евгеньевна

Ведущая организация: Московская государственная медицинская академия
имени И.М.Сеченова

Защита диссертации состоится « 17 » ноября 2005 г. в 14 - 00 час на заседании
Регионального диссертационного совета КМ 002.133.01 при Институте
биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054, г.
Уфа, просп. Октября, 71

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Уфимского
научного центра РАН

Автореферат разослан « 15 » октября 2005 г.

Ученый секретарь

Регионального диссертационного совета,

кандидат биологических наук

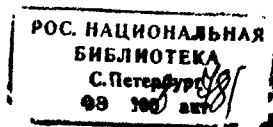
Бикбулатова Светлана Магнитовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы Эпилепсия представляет собой хроническое заболевание головного мозга, характеризующееся спонтанными приступами нарушений двигательных, чувствительных, вегетативных, мыслительных или психических функций, возникающих вследствие чрезмерных нейронных разрядов. Данная патология является серьезной медико-социальной проблемой в связи с ее высокой распространенностью среди всех возрастных групп населения. Показатель заболеваемости в мире колеблется в пределах 40-70 человек на 100 000 населения (Epidemiology, 2001), в России - 130 – 560 человек на 100 000 населения, а в Республике Башкортостан - 137 на 100 000 человек (Борисова Н.А., 2003).

Эпилепсия характеризуется чрезвычайным полиморфизмом эпилептических приступов, отличающихся друг от друга этиологией, характером приступов, течением и прогнозом. Согласно Международной классификации эпилепсии, эпилептических синдромов и схожих заболеваний (Нью-Дели, 1989), основывающейся на достижениях нейрорадиологических методов диагностики, видео-ЭЭГ-мониторинга, по анатомическому признаку и характеру приступов эпилепсии делятся на генерализованные и локально-обусловленные (фокальные) формы; по этиологическому признаку - на симптоматические, криптогенные и идиопатические.

Современная гипотеза этиопатогенеза эпилепсии предполагает многофакторную и полигенную природу данного заболевания, а также сложный характер взаимодействия генетической предрасположенности к судорожной активности с факторами среды. Наиболее интересными с точки зрения генетики являются идиопатические формы эпилепсии (ИЭ), представляющие собой самостоятельное заболевание, не связанное с органическим поражением мозга или другими заболеваниями. Они традиционно рассматриваются как случаи с высокой наследственной предрасположенностью, о чем свидетельствуют наследственная отягощенность и высокая степень конкордантности среди монозиготных близнецов (65%) по сравнению с гетерозиготными (12%) (Kjeldsen M.J. et al., 2003). На основании данных, полученных при молекулярно – генетических исследованиях семей, страдающих различными моногенными формами ИЭ, а также принимая во внимание современные представления о патофизиологических механизмах



идиопатической эпилепсии, можно выделить следующие группы генов, участвующих в развитии ИЭ: гены потенциал – зависимых ионных каналов (натриевого, кальциевого, хлорного); гены рецепторов и переносчиков нейромедиаторов торможения и возбуждения (гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), серотонина, глутамата) и др. (De Fusco, M. et al., 2000; Sugawara, T. et al., 2002; Ohmori, I. et al., 2002; Harkin, L.A. et al., 2002; Wallace, R.H. et al., 2003; Naug, K. et al., 2003). Нарушения в этих генах могут прямым или косвенным образом приводить к аномальному повышению возбудимости нейронов.

Наиболее распространенными по сравнению с моногенными формами эпилепсии являются сложнаследуемые формы, для которых на сегодняшний день картирован ряд локусов сцепления: 8q24, 14q23, 3q26, 16p13, 6p21, 15q14 (Liu A.W. et al., 2000; Sander, T. et al., 2000; Durner M. et al., 2001; Robinson, R. et al., 2002). В процессе развития заболевания предполагается участие нескольких взаимодействующих между собой генов, расположенных в данных областях. Вклад каждого из них в риск развития эпилепсии может быть небольшим, но, тем не менее, приводящим к наследуемым изменениям, предрасполагающим к судорожной активности.

Принципиально важным при исследовании ассоциаций полиморфных локусов генов-кандидатов с риском развития ИЭ является учет этнической принадлежности обследованных лиц. Разные народы мира имеют особенности генетической структуры и могут характеризоваться различным набором и соотношением факторов риска заболевания (Kamboch M. et al., 1999), ассоциации, обнаруженные в одних этнических группах, не всегда встречаются в других (Bishop, Sham et al., 2003).

В рамках проблемы выявления факторов, определяющих наследственную предрасположенность к идиопатической эпилепсии у больных из Республики Башкортостан, весьма актуальным является изучение полиморфных вариантов генов-кандидатов, белковые продукты которых оказывают влияние на процессы нейрональной возбудимости.

Целью данной работы явилась оценка роли генов ионных каналов, глутаматэргической и дофаминэргической систем в развитии идиопатической эпилепсии в Башкортостане.

В соответствии с целью исследования были поставлены следующие *задачи*

1. Провести анализ распределения частот аллелей и генотипов

полиморфных ДНК-локусов *D2S2330*, *D2S124*, сцепленных с геном $\alpha 1$ - субъединицы нейронального натриевого канала (*SCN1A*), у больных идиопатической эпилепсией и здоровых доноров.

2. Провести анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфных ДНК-локусов *D5S422*, *D5S402*, сцепленных с геном $\gamma 2$ - субъединицы рецептора гамма - аминокислотной кислоты (*GABRG2*), у больных идиопатической эпилепсией и здоровых доноров.

3. Провести поиск мутаций и полиморфизмов в генах *SCN1A* и *GABRG2* у пациентов с идиопатической эпилепсией, проживающих в Башкортостане.

4. Провести анализ ассоциации полиморфных вариантов *315C>T*, *588C>T* гена *GABRG2* с идиопатической эпилепсией.

5. Провести анализ ассоциаций полиморфных вариантов гена *R5* - субъединицы каннатного рецептора глутамата *GRIK1* (*STR*, *522A>C*) у больных идиопатической эпилепсией.

6. Провести анализ ассоциаций полиморфных вариантов гена *D2* рецептора дофамина *DRD2* (*TagIA*, *NcoI*) и гена переносчика дофамина *SLC6A3* (*VNTR*, *MspI*) с идиопатической эпилепсией.

Научная новизна исследования Впервые в Республике Башкортостан создана коллекция ДНК больных идиопатической эпилепсией. Проведен поиск мутаций и полиморфизмов в гене *SCN1A* у пациентов с ИЭ, в результате которого обнаружена мутация *G396A* и два изменения нуклеотидной последовательности (*1212G>A*, *2817G>C*), последний из которых ранее не описан в литературе. Выявлены два полиморфных варианта гена *GABRG2* (*315C>T*, *588C>T*), для которых показана ассоциация с риском развития идиопатической эпилепсии. Впервые проведен анализ ассоциаций полиморфных локусов *D2S2330*, *D2S124*, сцепленных с геном *SCN1A*, и *D5S422*, *D5S402*, сцепленных с геном *GABRG2*, с идиопатической эпилепсией. Обнаружены достоверные различия в распределении частот аллелей и генотипов данных полиморфных маркеров между больными ИЭ и здоровыми донорами различного этнического происхождения, проживающими в Башкортостане (русскими, татарами и башкирами), а также выраженные межэтнические отличия. Получены данные об ассоциации полиморфных локусов генов рецепторов глутамата (*GRIK1*) и дофамина (*DRD2*), а также переносчика дофамина (*SLC6A3*) с риском развития идиопатической эпилепсии.

Научно-практическая значимость работы Результаты исследования вносят вклад в понимание молекулярно-генетических основ возникновения идиопатической эпилепсии, позволяют выявить генетические маркеры, ассоциированные с повышенным/пониженным риском развития заболевания. Полученные данные могут быть использованы при чтении спецкурсов на факультетах биологии, в медицинских ВУЗах, на курсах повышения квалификации медицинских работников.

Положения, выносимые на защиту

1. Маркеры повышенного риска развития идиопатической эпилепсии по полиморфным ДНК-локусам *D2S2330* и *D2S124*, сцепленным с геном $\alpha 1$ - субъединицы нейронального натриевого канала *SCN1A*: у русских – аллели *D2S2330*9*, *D2S124*4*, *D2S124*5*, генотип *D2S124*3/*5*, у татар – аллель *D2S124*5* и генотип *D2S124*4/*5*, у башкир – аллель *D2S124*4*.
2. Идентификация мутации *G396A* и двух полиморфных вариантов *1212G>A*, *2817G>C* гена $\alpha 1$ - субъединицы нейронального натриевого канала *SCN1A* у больных с идиопатической эпилепсией из Башкортостана.
3. Ассоциация аллеля *D5S422*10* полиморфного ДНК-локуса *D5S422*, сцепленного с геном $\gamma 2$ - субъединицы рецептора гамма-аминомасляной кислоты *GABRG2*, с развитием идиопатической эпилепсии у татар; аллеля *D5S422*1* – у русских.
4. Увеличение риска развития идиопатической эпилепсии при наличии аллелей *315*С* и *588*С*, гомозиготных генотипов *315*С/*С* и *588*С/*С*, а также сочетания генотипов *315*С/*С* - *588*С/*С* по полиморфным вариантам *315С>Т*, *588С>Т* гена $\gamma 2$ - субъединицы рецептора гамма-аминомасляной кислоты *GABRG2*.
5. Ассоциация генотипа *522*А/*А* полиморфного варианта *522А>С* гена *R5* - субъединицы каинатного рецептора глутамата *GRIK1* с риском развития идиопатической эпилепсии у башкир.
6. Генетический маркер повышенного риска развития идиопатической эпилепсии у татар – генотип *SLC6A3*G/*G* *MspI*-полиморфизма гена переносчика дофамина (*SLC6A3*).

Апробация диссертации Результаты исследования были представлены на Всероссийской конференции Вавиловского общества генетиков и селекционеров «Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы

развития» (Москва, 2004), на Европейском обществе генетиков человека (Мюнхен, Германия 2004), на конференции «Н.И. Вавилов и современная генетика» (Уфа, 2004), на научной конференции молодых ученых РБ «Медицинская наука – 2004» (Уфа, 2004), на 3-ем Международном конгрессе психиатрии (Каир, Египет 2005), на 5-ом съезде Российского общества медицинских генетиков (Уфа, 2005).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ.

Структура и объем диссертации. Работа изложена на 198 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и библиографического списка (включает 162 работы отечественных и зарубежных авторов). Диссертация иллюстрирована 44 рисунками и 67 таблицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы исследования В работе использованы образцы ДНК 137 больных с клиническим диагнозом идиопатическая эпилепсия. При обследовании учитывались пол, возраст, данные семейного анамнеза, результаты электроэнцефалографического обследования, а также магниторезонансной томографии. Диагноз заболевания был поставлен в соответствии с международной классификацией болезней нервной системы (МКБ - 10). По этнической принадлежности больные распределились следующим образом: 47 башкир, 42 русских, 40 татар, 8 пробандов происходили из межнациональных браков. Объем выборки здоровых доноров башкирской этнической группы составил 74 человека, татарской - 70 человек, русской - 61 человек. Группы сравнения соответствовали друг другу по возрастным, этническим и половым признакам.

Методы исследования ДНК была выделена из лимфоцитов периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции (Mathew C. et al., 1984). Для анализа полиморфных вариантов генов *SCN1A*, *GABRG2*, *GRIK1*, *DRD2*, *SLC6A3*, а также микросателлитных ДНК-локусов *D2S2330*, *D2S124*, *D5S422*, *D5S402* были применены методы полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК, полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. ПЦР проводилась на амплификаторе производства компании «ДНК-технология» с использованием ДНК-полимеразы *Termus aquaticus* производства фирмы «Силекс». Для

определения нуклеотидных замен ПЦР-продукты расщепляли соответствующими рестриктазами *TspEI*, *NcoI*, *MjaIV*, *BtgI*, *MspI*, *TagIA*. Исследование образцов ДНК на наличие мутаций и полиморфизмов в генах *SCN1A* и *GABRG2* проводили методом анализа конформационного полиморфизма однонитевой ДНК (SSCP-анализа) (Orita M. et al., 1989). Секвенирование образцов ДНК с измененной подвижностью проводилось на автоматическом секвенаторе Perkin-Elmer ABI 377 с использованием DYEnamic ET kit (Amersham Pharmacia Biotech).

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программного обеспечения MS Excel (Microsoft) и программы RxC (Roff and Bentzen, 1989). При попарном сравнении частот аллелей и генотипов в группах больных и здоровых лиц использовался критерий χ^2 (p) для таблиц сопряженности 2x2 с поправкой Йейтса на непрерывность. Силу ассоциаций оценивали в значениях показателя соотношения шансов Odds Ratio (OR) (Schlesselman J. et al., 1982).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфных ДНК-локусов *D2S2330* и *D2S124*, сцепленных с геном $\alpha 1$ -субъединицы нейронального натриевого канала, у больных идиопатической эпилепсией и здоровых доноров из Башкортостана

Последние достижения в генетике идиопатических эпилепсий показали, что нарушения процессов возбудимости в ингибирующих нейронах, вызванные мутациями в генах натриевых каналов, обуславливают развитие таких форм идиопатической эпилепсии, как генерализованная эпилепсия с фебрильными судорогами плюс и миоклоническая эпилепсия младенцев (Escayg A. et al., 2001; Sugawara T. et al., 2001; Wallace R. et al., 2001; Claes L. et al., 2003). Ранее было сообщено о сцеплении полиморфного ДНК-локуса *D2S2330* с мутацией *D1742G* (LOD=2,83 при $\theta=0$) в гене *SCN1A* у больных генерализованной эпилепсией с фебрильными судорогами из Колумбии (Pineda-Trujillo N. et al., 2005).

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов данного локуса не выявил достоверных различий между объединенными выборками больных ИЭ и здоровых доноров из Башкортостана. Однако попарное

сравнение частот аллелей показало, что аллель *9 чаще встречался у больных русской этнической принадлежности (на 14,3% хромосом) по сравнению с контролем (3,75%) ($OR=4,27$; $CI95\%$ 1,1-19,9; $\chi^2=4,28$; $p=0,04$), тогда как аллель *10 был более распространен у здоровых доноров (15%), чем у пациентов (3,75%) ($OR=0,21$; $CI95\%$ 0,5-0,84; $\chi^2=5,14$; $p=0,02$).

При анализе полиморфного ДНК-локуса *D2S124* установлена его ассоциация с риском развития идиопатической эпилепсии во всех изученных этнических группах (рис. 1). У больных русской этнической принадлежности генетическими маркерами риска являлись аллель *4, определенный на 34,5% хромосом по сравнению с 20,4% среди здоровых лиц ($OR=2,06$; $CI95\%$ 1-4,2; $\chi^2=4,15$; $p=0,04$) и аллель *5 (17,9% по сравнению с 5,6%; $OR=3,69$; $CI95\%$ 1,3-11; $\chi^2=6,13$; $p=0,01$). Генотип *3/*5 достоверно чаще встречался в группе больных ИЭ (14,3% против 1,9%) ($\chi^2=3,72$; $p=0,05$), однако широкий доверительный интервал значения отношения шансов ($OR=8,83$; $CI95\%$ 0,97-173) не позволил однозначно отнести данный генотип к маркерам повышенного риска развития ИЭ.

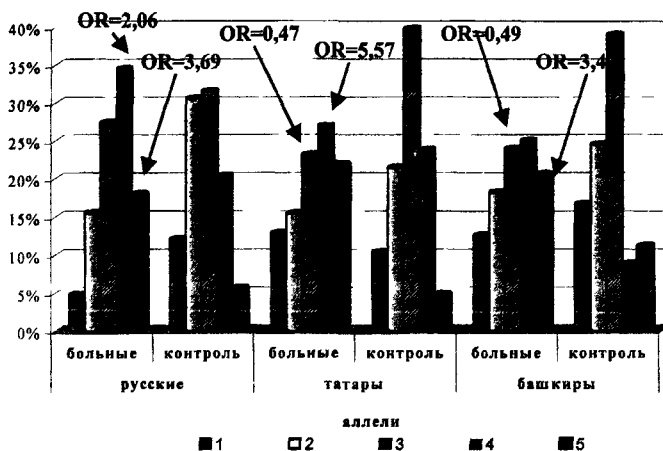


Рис. 1. Распределение частот аллелей полиморфного ДНК-локуса *D2S124* у больных ИЭ и здоровых доноров различной этнической принадлежности

В выборке больных татарской этнической принадлежности с риском развития ИЭ ассоциированы аллель *5, обнаруженный на 21,8% хромосом у больных ИЭ по сравнению с 4,8% в контрольной группе ($OR=5,57$; $CI95\%$ 1,9-

16,8; $\chi^2=12,3$; $p=0,001$) и генотип *4/*5 (20,5% относительно 3,2%; $OR=7,87$; $CI_{95\%}$ 1,4-57,4; $\chi^2=6,35$; $p=0,01$). В группе больных ИЭ башкирской этнической принадлежности частота аллеля *4 превышала таковую (25%) в соответствующем контроле (8,9%) ($OR=3,4$; $CI_{95\%}$ 1,3-8,98; $\chi^2=7,1$; $p=0,008$).

В связи с тем, что анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфных локусов *D2S2330* и *D2S124*, сцепленных с геном $\alpha 1$ -субъединицы нейронального натриевого канала, выявил ассоциацию полиморфных вариантов данных локусов с повышенным риском развития ИЭ, для проведения молекулярной диагностики заболевания актуальным является поиск мутаций и полиморфизмов в гене *SCN1A*.

Поиск мутаций и полиморфизмов в гене $\alpha 1$ -субъединицы нейронального натриевого канала (*SCN1A*)

Для выявления мутаций и полиморфизмов у больных идиопатической эпилепсией из Башкортостана проведен SSCP-анализ 5, 9 и 15-го экзонов гена *SCN1A*, кодирующих важные функциональные трансмембранные сегменты ионного канала. Изменения подвижности одонитевой ДНК обнаружены в 9-м и 15-м экзонах гена *SCN1A*.

В девятом экзоне гена *SCN1A* зафиксировано два типа изменения подвижности одонитевой ДНК. При секвенировании образцов ДНК с измененной подвижностью одонитевой ДНК была выявлена замена аденина на гуанин в 1212 основании в гомо- и гетерозиготном состояниях. Впервые данный аллельный вариант гена *SCN1A* описан в выборке больных идиопатической эпилепсией из Австралии ($N=165$) (Escaug A. et al., 2000), где преобладающим был аллель *1212*G* (67%). У больных эпилепсией из Башкортостана анализ аллельного полиморфизма показал, что оба аллеля встречаются с почти равной частотой (*1212*G* – 49,5% и *1212*A* – 50,5%).

У одной из больных русской этнической принадлежности, носительницы гетерозиготного генотипа *1212*A>G* полиморфного варианта гена *SCN1A*, при секвенционном анализе девятого экзона в гетерозиготном состоянии была выявлена не описанная ранее одонуклеотидная замена гуанина на цитозин в 1178 основании (*1178G>C*), приводящая к замене глицина на аланин в 396 положении белка (*G396A*). Данная мутация находится в участке гена, кодирующем шестой сегмент первого домена нейронального натриевого

канала, ответственного не только за структуру поры канала, но и за селективную проницаемость ионов натрия. Мутации в гомозиготном состоянии, нарушающие уникальную белковую последовательность данного сегмента, приводят к серьезному нарушению деятельности канала (Meisler M. et al., 2005). По данным литературы, они вызывают тяжелые формы миоклонической эпилепсии у младенцев (Claes L. et al., 2003; Nabbout R. et al., 2003; Fukuma G. et al., 2004; Ebach K. et al., 2005). У больной с мутацией *G396A* из Башкортостана наблюдались полиморфные генерализованные приступы (абсансы и тонико-клонические судороги), а также выраженное слабоумие.

При секвенировании 15-го экзона гена *SCN1A* у больного с измененной подвижностью одонитевой ДНК было определено ранее неописанное изменение нуклеотидной последовательности (замена гуанина на цитозин в 2817 основании, *2817G>C*), в результате которого кодон GGG заменялся кодоном GGC, что не приводило к замене аминокислоты, так как оба эти кодона кодируют глицин.

Согласно литературным данным, мутации и полиморфизмы в гене $\alpha 1$ субъединицы нейронального натриевого канала приводят к увеличению времени восстановления активности канала после инактивации и, как следствие, провоцируют гипервозбудимость нейрона. Обнаруженные нами изменения нуклеотидной последовательности гена *SCN1A* могут вносить определенный вклад в развитие предрасположенности к ИЭ (Escaug A. et al., 2001; Wallace R.H. et al., 2001; Sugawara T., et al., 2001; Fujawara T., et al., 2003; Nagao Y., et al., 2005; Pineda-Trujillo N. et al., 2005).

Анализ ассоциаций полиморфных ДНК-локусов *D5S422* и *D5S402*, сцепленных с геном $\gamma 2$ -субъединицы рецептора гамма - аминокислоты, с идиопатической эпилепсией

Учитывая данные литературы о том, что при полногеномном скрининге семей с ИЭ выявлено сцепление заболевания с областью 5q34, в которой расположен кластер генов, кодирующих субъединицы рецептора ГАМК (Baulac S. et al., 2001), нами был проведен анализ ассоциаций полиморфных ДНК-локусов *D5S422*, *D5S402*, сцепленных с геном $\gamma 2$ – субъединицы рецептора ГАМК (*GABRG2*) у больных идиопатической эпилепсией и здоровых доноров из РБ.

При анализе распределения частот аллелей полиморфного ДНК-локуса *D5S422* в группах больных ИЭ различного этнического происхождения из Башкортостана было выявлено, что пациенты с идиопатической эпилепсией русской и татарской этнической принадлежности достоверно отличались от соответствующих контрольных групп (рис 2). У русских среди пациентов была значительно выше частота аллеля *1 (11,3% по сравнению с 1,8%; OR=6,9; CI95% 1,34-48,3; $\chi^2=6,08$; $p=0,01$) и ниже частота встречаемости аллеля *10 (7,5% относительно 18,8%; OR=0,35; CI95% 0,12-0,89; $\chi^2=4$; $p=0,04$). В группе больных татарской этнической принадлежности частота аллеля *12 была достоверно выше (10,8%), чем в соответствующей группе контроля (1,9%) (OR=6,18; CI95% 1,2-43,6; $\chi^2=4,87$; $p=0,03$).

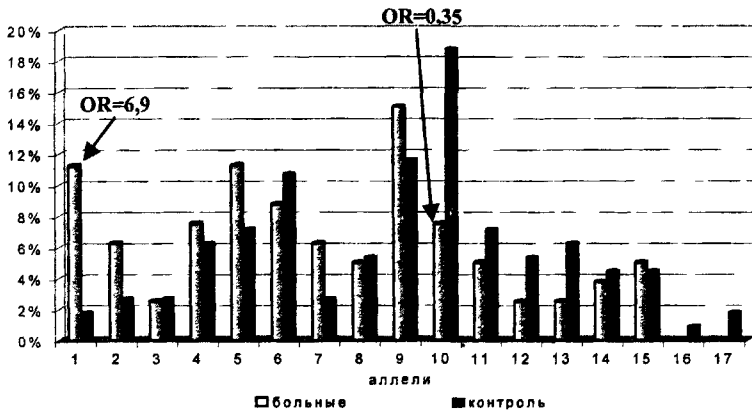


Рис. 2. Распределение частот аллелей полиморфного ДНК-локуса *D5S422* у больных ИЭ и здоровых доноров русской этнической принадлежности

Анализ распределения частот аллелей и генотипов локуса *D5S402* в целом не выявил выраженных отличий между группами больных ИЭ и здоровых доноров, однако при попарном сравнении было обнаружено, что аллель *4 (OR=0,44; CI95% 0,2-0,9; $\chi^2=4,2$; $p=0,04$) является генетическим маркером пониженного риска развития ИЭ (частота у больных ИЭ 4,1% по сравнению с 8,8% у здоровых доноров).

В связи с тем, что полиморфные локусы *D5S422* и *D5S402*, сцепленные с геном $\gamma 2$ – субъединицы рецептора ГАМК, ассоциированы с повышенным риском развития ИЭ, а также то, что уже описаны мутации в гене *GABRG2*, вызывающие различные формы идиопатической эпилепсии, актуальным

является поиск мутаций и полиморфизмов в этом гене у больных ИЭ из Башкортостана (Wallace R. et al., 2001; Harkin L. et al., 2002; Kananura C. et al., 2002; Ching-Chou I. et al., 2003).

Поиск мутаций и полиморфизмов в гене $\gamma 2$ – субъединицы рецептора гамма – аминокислотной кислоты

Для выявления мутаций и полиморфизмов у всех изучаемых больных ИЭ из Башкортостана нами проведен SSCP-анализ 3, 5 и 8-го экзонов гена *GABRG2*. Изменения подвижности однонитевой ДНК обнаружены в третьем и пятом экзонах гена *GABRG2*.

При секвенировании образцов ДНК с измененной подвижностью 3-го экзона было показано, что оно обусловлено ранее описанной заменой цитозина на тимин в 315 основании, не приводящей к замене аминокислоты – аспарагина (Lu J. et al., 2002). Результаты секвенирования были подтверждены анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Для определения ассоциации этого полиморфного локуса с идиопатической эпилепсией был проведен анализ распределения частот аллелей и генотипов у здоровых доноров (табл. 1). Согласно полученным данным, генотип $315^*C/^*C$ и аллель 315^*C полиморфного локуса $315C>T$ гена *GABRG2* ассоциированы с риском развития эпилепсии во всех изученных этнических группах Башкортостана (рис. 3).

Таблица 1

Распределение частот аллелей и генотипов $315C>T$ полиморфизма гена *GABRG2* у больных ИЭ и здоровых доноров различной этнической принадлежности, %

Группы сравнения		*C	*T	*C/*C	*C/*T
Русские	больные ИЭ	96,1	3,95	92,1	7,9
	контроль	84,7	15,3	69,4	30,6
		$\chi^2=4,79$ **		$\chi^2=5,4$ **	$\chi^2=5,4$ **
Татары	больные ИЭ	98,7	1,32	97,4	2,63
	контроль	83,3	16,67	71,1	24,4
		$\chi^2=9,46$ ***		$\chi^2=8,3$ **	$\chi^2=6,3$ **
Башкиры	больные ИЭ	94,1	5,9	88,1	11,9
	контроль	80,4	19,6	65,2	30,4
		$\chi^2=6,01$ **		$\chi^2=5,1$ **	$\chi^2=3,4$ *

Примечание: разница между группами сравнения достоверна при: * - $p<0,1$;

** - $p<0,05$; *** - $p<0,01$; **** - $p<0,001$.

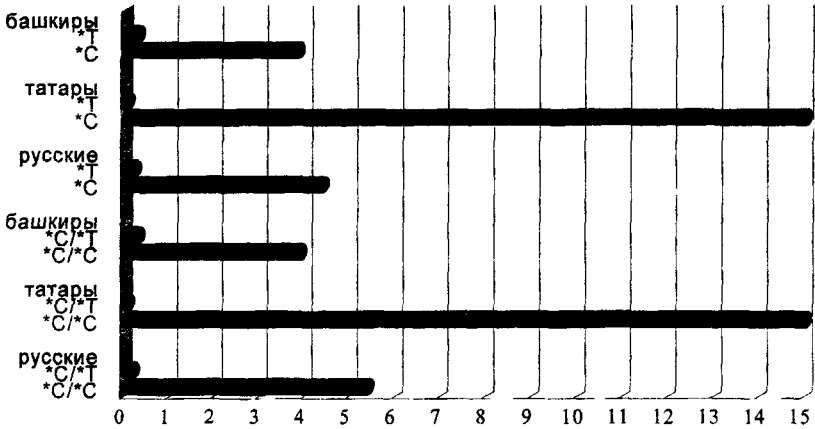


Рис. 3. Значения величин отношения шансов (OR) риска развития ИЭ по полиморфному локусу $315C>T$ гена *GABRG2* в исследованных группах

Результаты исследования согласуются с данными ряда авторов о преобладании аллеля 315^*C гена *GABRG2* у больных такими формами идиопатической эпилепсии, как детская абсансная эпилепсия, фебрильные судороги (Nakayama J, et al., 2000; Ching-Chou I. et al., 2003).

При проведении SSCP-анализа 5 экзона гена *GABRG2* было обнаружено два типа изменения подвижности одонитевой ДНК. У образцов ДНК с данными изменениями подвижности при секвенировании выявлена ранее описанная замена цитозина на тимин в 588 основании в гетеро- и гомозиготном состоянии ($588C>T$), не приводящая к замене аминокислоты (аспарагина) в 196 положении белка (Baulac S., et al., 2001). Для подтверждения результатов секвенирования, а также для изучения характера распределения частот аллелей и генотипов данной однонуклеотидной замены в группах здоровых доноров был проведен ПДРФ-анализ (табл. 2).

Согласно результатам исследования полиморфизма $588C>T$ гена *GABRG2*, генотип $588^*C/^*C$ и аллель 588^*C являются маркерами повышенного риска, а генотип $588^*C/^*T$ и аллель 588^*T - маркерами пониженного риска развития идиопатической эпилепсии в Башкортостане вне зависимости от этнического происхождения (рис. 4).

Распределение частот аллелей полиморфного локуса 588C>T гена *GABRG2* у больных идиопатической эпилепсией из Башкортостана оказалось сходным с таковым для больных генерализованной эпилепсией с фебрильными судороми плюс из Франции и достоверно отличалось от больных детской абсансной эпилепсией из Германии (Baulac S. et al., 2001; Kapanura C. et al., 2002;).

Таблица 2

Распределение частот аллелей и генотипов 588C>T полиморфизма гена *GABRG2* у больных ИЭ и здоровых доноров разной этнической принадлежности, %

Группы сравнения		*C	*T	*C/*C	*C/*T
Русские	больные ИЭ	95,1	4,9	90,24	9,76
	контроль	69,4	30,6	51	36,7
		$\chi^2=17,65$ ****		$\chi^2=14,25$ ****	$\chi^2=7,39$ ***
Татары	больные ИЭ	92,5	7,5	85	15
	контроль	78,6	21,4	63,3	30,7
		$\chi^2=5,6$ **		$\chi^2=4,24$ **	$\chi^2=2,17$ *
Башкиры	больные ИЭ	93,3	6,7	86,7	13,3
	контроль	78,1	21,9	62,5	31,3
		$\chi^2=7,48$ ***		$\chi^2=7,03$ ***	$\chi^2=3,3$ *

Примечание: разница между группами сравнения достоверна при : * - $p<0,1$; ** - $p<0,05$; *** - $p<0,01$; **** - $p<0,001$.

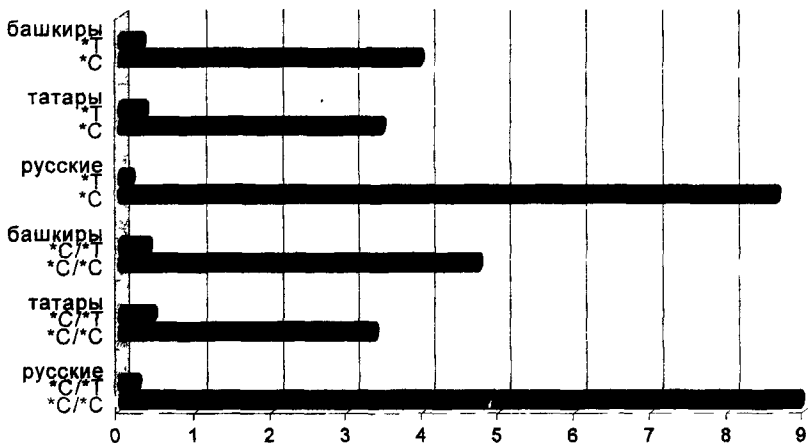


Рис. 4. Значения величин отношения шансов (OR) риска развития ИЭ по полиморфному локусу 588C>T гена *GABRG2* в исследованных группах

Проведен анализ распределения частот сочетаний генотипов двух полиморфных вариантов $315C>T$, $588C>T$ гена $\gamma 2$ - субъединицы рецептора ГАМК у больных ИЭ и здоровых доноров из Башкортостана (табл. 3).

Таблица 3

Распределение сочетаний генотипов $315C>T$ и $588C>T$ полиморфизма гена $GABRG2$ у больных ИЭ и здоровых доноров разной этнической принадлежности, %

Группы сравнения		$*C/*C- *C/*C$	$*C/*C- *C/*T$	$*C/*T- *C/*C$
Русские	больные ИЭ	83,8	8	8
	контроль	40	12,5	22,5
		$\chi^2=13,7$ ****	$\chi^2=0,07$ ($p>0,1$)	$\chi^2=2,03$ ($p>0,1$)
Татары	больные ИЭ	84,2	2,6	13,2
	контроль	46,4	10,75	25
		$\chi^2=8,94$ ***	$\chi^2=0,7$ ($p>0,1$)	$\chi^2=0,82$ ($p>0,1$)
Башкиры	больные ИЭ	78	9,8	9,8
	контроль	36,4	18,2	27,3
		$\chi^2=11,51$ **	$\chi^2=4,5$ ($p>0,1$)	$\chi^2=2,76$ *

Примечание: разница между группами сравнения достоверна при : * - $p<0,1$; ** - $p<0,05$; *** - $p<0,01$; **** - $p<0,001$.

Показано, что при сочетании генотипов $315*C/*C-588*C/*C$ риск развития идиопатической эпилепсии выше, чем при наличии гомозиготного генотипа $*C/*C$ по одному из этих полиморфных вариантов.

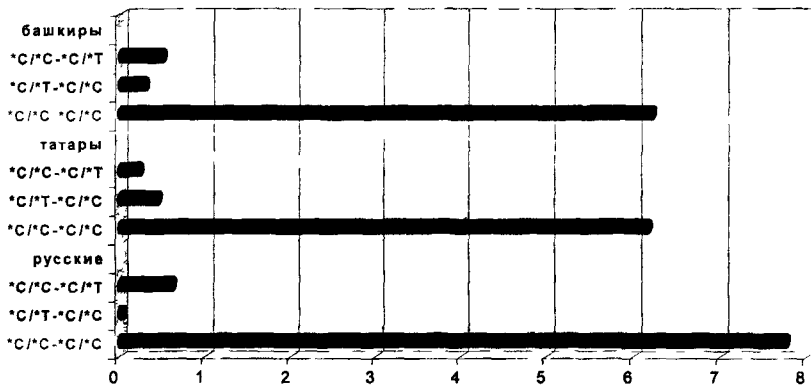


Рис 4. Значения величин отношения шансов (OR) риска развития ИЭ по сочетаниям генотипов полиморфных вариантов $315C>T$, $588C>T$ гена $GABRG2$ в исследованных группах

Оба полиморфизма находятся в областях, кодирующих домен связывания с бензодиазепинами, эффективными антиконвульсантами, усиливающими ГАМК-эргическое ингибирование. Возможно, выраженная ассоциация этих локусов с риском ИЭ объясняется сцеплением с какой-то функционально значимой мутацией в гене *GABRG2*.

Анализ ассоциаций полиморфных вариантов гена *R5* - субъединицы каинатного рецептора глутамата *GRIK1* (*STR*, *522A>C*) с идиопатической эпилепсией

Рецепторы глутамата являются основным звеном в механизме возбуждения, играют важную роль в развитии нервной системы и в явлении синаптической пластичности (Contractor A. et al., 2001). Предполагается, что изменения в последовательности гена *GRIK1* могут лежать в основе эпилептогенеза (Shibata H. et al., 2001). В связи с этим нами проведен анализ ассоциаций двух полиморфных вариантов гена *GRIK1* (*STR*, *522A>C*) у больных идиопатической эпилепсией и здоровых доноров из Башкортостана.

Анализ распределения частот аллелей и генотипов *522A>C* полиморфного варианта гена *GRIK1* выявил значимые различия между больными ИЭ и здоровыми донорами башкирской этнической принадлежности (рис. 5). В группе пациентов частота гетерозигот *522*A/*C* (15%) меньше по сравнению с контролем (38%) ($OR=0,3$, 95%CI 0,09-0,9, $\chi^2=4,5$, $p=0,03$) и больше частота гомозигот *522*A/*A* (79,6% и 60%, соответственно) ($OR=2,6$, 95%CI 0,09-7,6, $\chi^2=3$, $p=0,08$).

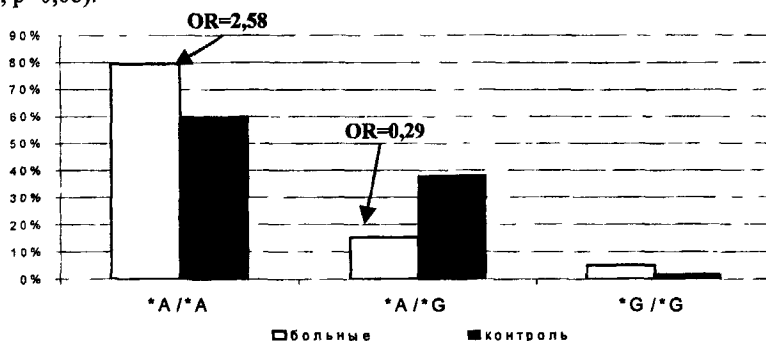


Рис. 5. Распределение частот генотипов *522A>C* полиморфного варианта гена *GRIK1* у больных ИЭ и здоровых доноров башкирской этнической принадлежности

Учитывая высокую консервативность нуклеотидной последовательности гена *GRIK1*, наиболее вероятное объяснение ассоциации данного полиморфизма состоит в сцеплении этого локуса с функционально значимой мутацией в самом гене *GRIK1* (Izzi C. et al., 2002).

Анализ характера распределения аллелей и генотипов полиморфного варианта *STR* гена *GRIK1* не выявил достоверных различий как между выборками пациентов ИЭ и здоровых доноров, так и при разделении этих групп по этнической принадлежности.

Анализ ассоциаций полиморфных вариантов (*TagIA*, *NcoI*) гена рецептора D2 дофамина (*DRD2*) с идиопатической эпилепсией

Установлено, что при судорожной активности вследствие чрезмерной деполяризации концентрация дофамина и других катехоламинов в эпилептогенном очаге значимо возрастает по сравнению с контрольными образцами (Kawanishi Y. et al., 2000). В качестве генетических маркеров, сцепленных с нервно-психическими заболеваниями, рассматриваются несколько диаллельных рестрикционных полиморфизмов гена D2 рецептора дофамина (*DRD2*), таких как *TagIA*, *NcoI*.

Анализ ассоциаций двух полиморфизмов (*TagI A*, *NcoI*) гена *DRD2* у больных ИЭ и здоровых доноров различной этнической принадлежности не подтвердил вовлеченность этого гена в предрасположенность к развитию идиопатической эпилепсии у больных из Башкортостана. Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов *TagI A* – полиморфного локуса гена *DRD2* выявил достоверные различия между группами пациентов русской и башкирской этнической принадлежности за счет более высокой частоты в группе последних аллеля **A2* (74,2% по сравнению с 59,2%; $\chi^2=3,8$, $p=0,05$) и гомозиготного генотипа **A2/*A2* (51,1% относительно 34,2%; $\chi^2=6,2$, $p=0,04$).

Анализ ассоциаций полиморфных локусов (3'-VNTR и *MspI*) гена переносчика дофамина (*SLC6A3*) с идиопатической эпилепсией

Согласно литературным данным, полиморфные варианты гена *SLC6A3* имеют функциональную значимость в развитии некоторых психических заболеваний (Cook E. et al., 1995; Persico A. et al., 1997; Зайнуллина А. с соавт., 2002). Исследования, проведенные на модельных мышах с нарушенной

функцией переносчика дофамина, показали, что дофамин, накапливаясь в синаптической щели, вызывает спонтанную судорожную активность.

При анализе распределения частот генотипов *MspI*- полиморфного локуса гена *SLC6A3* обнаружено статистически значимое увеличение доли гомозигот *SLC6A3**G/*G (OR=2,2, 95%CI 0,9-5,64, $\chi^2=2,75$; $p=0,09$) в выборке больных ИЭ татарской этнической принадлежности по сравнению со здоровыми донорами (52,6% и с 33,3%) (рис. 6).



Рис. 6. Распределение частот генотипов *MspI*- полиморфного локуса гена *SLC6A3* у больных ИЭ и здоровых доноров татарской этнической принадлежности

Результаты оценки распределения частот аллелей и генотипов *VNTR* – полиморфного локуса гена *SLC6A3* для исследуемых групп разной этнической принадлежности не выявили ассоциации с риском развития идиопатической эпилепсии.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что по полиморфным ДНК-локусам *D2S2330* и *D2S124*, сцепленным с геном $\alpha 1$ - субъединицы нейронального натриевого канала *SCN1A*, генетическими маркерами повышенного риска развития идиопатической эпилепсии у русских являются аллели *D2S2330*9*, *D2S124*4* и *D2S124*5*. У татар повышенный риск развития заболевания ассоциирован с аллелем *D2S124*5* и генотипом *D2S124*4/*5*, у башкир – с аллелем *D2S124*4*.
2. У больных идиопатической эпилепсией в гене $\alpha 1$ - субъединицы нейронального натриевого канала впервые выявлена мутация *G396A* (частота 2,4%), а также два аллельных варианта *1212G>A* и *2817G>C*, последний из которых не был описан ранее.
3. Установлена ассоциация аллеля *D5S422*1* полиморфного ДНК-локуса *D5S422*, сцепленного с геном $\gamma 2$ - субъединицы рецептора гамма – аминокислотной кислоты, с повышенным риском развитием идиопатической эпилепсии у лиц русской этнической принадлежности, аллеля *D5S422*12* – у пациентов татарской этнической принадлежности. Показано, что генетическими маркерами повышенного риска развития заболевания в объединенной группе больных ИЭ является аллель *D5S422*1*, пониженного риска - аллель *D5S402*4*.
4. Выявлены два аллельных варианта в гене $\gamma 2$ - субъединицы рецептора гамма – аминокислотной кислоты *GABRG2*: *315C>T* и *588C>T* у больных ИЭ и здоровых доноров. Установлено увеличение риска развития идиопатической эпилепсии при наличии аллелей **C*, гомозиготных генотипов **C/*C* и сочетания генотипов *315*C/*C-588*C/*C* у больных из Башкортостана.
5. Показано, что генотип **A/*A 522A>C* полиморфного варианта гена *R5* - субъединицы каинатного рецептора глутамата ассоциирован с риском развития идиопатической эпилепсии у башкир.
6. Обнаружено, что генетическим маркером повышенного риска развития идиопатической эпилепсии у татар является генотип *SLC6A3*G/*G MspI*- полиморфизма гена переносчика дофамина *SLC6A3*.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Фаттахова А. Х., Карунас А. В., Хуснутдинова Э.К. Современные представления о молекулярно-генетической природе эпилепсии. // Труды конференции « Н.И. Вавилов и современная генетика», посвященная 115-летию со дня рождения и 65-летию со дня смерти академика Н.И. Вавилова - Уфа, 2004. - С.48-62.
2. Фаттахова А.Х., Карунас А.В., Булатова Г.Р., Нигматуллин Р.Х., Хуснутдинова Э.К. Молекулярно-генетическое исследование идиопатической генерализованной эпилепсии в Башкортостане // Медицинская генетика. – 2005. - №11. – С.533-536.
3. Fattakhova A., Karunas A., Khusnutdinova E. Association study of idiopathic generalized epilepsy in Volgo-Ural region of Russia // Abstracts of European Human Genetics Conference. - Munich, Germany - European J of Human Genetics – 2004. - V.12. - P.111.
4. Фаттахова А. Х., Карунас А. В., Хуснутдинова Э.К. Исследование полиморфного ДНК-локуса D5S422 у больных с идиопатической эпилепсией из Башкортостана. // Сборник тезисов «Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития» - Москва, 2004. - С.103.
5. Фаттахова А. Х., Карунас А. В., Булатова Г.Р., Нигматуллин Р.Х., Хуснутдинова Э.К. Анализ полиморфного ДНК-локусов D5S402 и D2S2330 у больных идиопатической эпилепсией из Башкортостана // Сборник научных трудов конференции ученых Республики Башкортостан «Научный прорыв - 2005» - Уфа, 2004 – С.45.
6. Фаттахова А.Х., Карунас А.В., Булатова Г.Р., Нигматуллин Р.Х., Хуснутдинова Э.К. Исследование генетической предрасположенности к идиопатической эпилепсии в Башкортостане // Медицинская генетика – 2005. - №6 – С.280.
7. Fattakhova A., Karunas A., Bulatova G.R., Nigmatullin R.Kh., Khusnutdinova E. Analysis of D5S422 and D5S402 markers in idiopathic epilepsy (IE) patients from Russia // Materials of XIII World Congress of Psychiatry - Cairo, Egypt, 2005 - P. 223.
8. Фаттахова А. Х., Карунас А. В., Хуснутдинова Э.К. Молекулярно-генетические аспекты идиопатической эпилепсии // Журнал «Неврологии и психиатрии им. А.С.Корсакова» - 2005. - №7 – С.72-76.

Список сокращений и обозначений:

ИЭ – идиопатическая эпилепсия;

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота;

SCN1A – ген $\alpha 1$ - субъединицы нейронального натриевого канала;

GABRG2 – ген $\gamma 2$ - субъединицы рецептора гамма-аминомасляной кислоты;

GRIK1 – ген R5 - субъединицы каинатного рецептора глутамата;

DRD2 – ген D2 рецептора дофамина;

SLC6A3 – ген переносчика дофамина;

STR – короткие tandemные повторы;

VNTR - варьирующее число tandemных повторов;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

SSCP – анализ конформационного полиморфизма однонитевой ДНК;

ПДРФ – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов;

ЦНС – центральная нервная система;

OR (odds ratio) – показатель соотношения шансов;

CI, confidence interval – 95% доверительный интервал;

p – вероятность;

Фяттахова Альфия Хайдаровна

**Исследование молекулярно-генетических основ
предрасположенности к идиопатической эпилепсии**

03.00.15 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Лицензия № 0177 от 10.06.96 г.

Подписано в печать 14.10.2005 г.

Отпечатано на ризографе.

Формат 60x84 ¹/₁₆. Усл.-печ. л. 1,5 Уч.-изд. л. 1,7

Тираж 100 экз. Заказ № 314.

450000, г. Уфа, ул. Ленина, 3,
ГОУ ВПО «Башгосмедуниверситет РосЗДРАВА»

19520

РНБ Русский фонд

2006-4

17020