

На правах рукописи

ВАЛИЕВ РУСЛАН РАДИСОВИЧ

**АНАЛИЗ ГЕНА ФИБРИЛЛИНА-1
У БОЛЬНЫХ СИНДРОМОМ МАРФАНА**

03.00.15 – генетика

**АВТОРЕФЕРАТ
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

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор Янковский Николай Казимирович

доктор биологических наук,
профессор Чемерис Алексей Викторович

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

Защита диссертации состоится 17 ноября 2005 г. в 10 часов 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, к.б.н.

Бикбулатова С.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Синдром Марфана (СМ) - тяжелое наследственное системное заболевание соединительной ткани, с выраженными патологическими нарушениями в скелетной, глазной и сердечно-сосудистой системах, наследуемое по аутосомно-доминантному типу (ММ 154700). Частота встречаемости СМ в различных странах мира составляет 1:5000 - 1:10 000 (Pyeritz, McKusick, 1979; Pyeritz et al., 2000). Для СМ характерными особенностями являются высокий процент спорадических случаев (25-30%), обусловленных мутациями de novo, варьирующая экспрессивность и неполная пенетрантность (Pyeritz, McKusick et al., 1979; Collod-Beroud et al., 2003). В настоящее время в качестве основной причины заболевания рассматриваются мутации в гене фибриллина-1 (*FBNI*) (Human Genome Sequencing Project NT 034890) (Bayers et al., 2004; Boileau et al., 2005), локализованного на длинном плече 15 хромосомы (15q15-21) (Kainulainen et al., 1990; Dietz et al., 1991). Ген *FBNI* кодирует белок фибриллин-1 (ОММ 134797), являющийся основным компонентом межклеточного вещества. За более чем десятилетний период изучения гена *FBNI* выявлено более пятисот различных мутаций по всему гену, большая часть из которых является миссенс-мутациями, затрагивающими высоко консервативные аминокислотные остатки в кальций связывающих доменах белка фибриллина-1 (Collod-Beroud et al., 2003; Boileau et al., 2005). Однако, несмотря на значительный прогресс, достигнутый в понимании молекулярно-генетических основ, остается еще открытым ряд ключевых вопросов, касающихся патогенеза этого заболевания. Многими исследователями отмечаются значительные трудности в сопоставлении данных молекулярно-генетического анализа с клинической картиной СМ (Kainulainen et al., 1990; Black et al., 1998; Collod-Beroud et al., 2002). Также установлено, что повреждения в гене фибриллина-1 приводят не только к развитию СМ, но и являются причиной других заболеваний соединительной ткани (Dietz et al., 1992; Lonqvist et al., 1994; Sood et al., 1996; Writz et al., 1996). В последнее время все больше появляется исследований, показывающих участие других генов в патогенетических процессах синдрома Марфана (Guisti et al., 2003; Mizuguchi, Collod-Beroud et al., 2004), что, наряду с высоким клиническим полиморфизмом и плейотропным характером патологических нарушений, свидетельствует о гетерогенной природе заболевания. Таким образом, инвалидизирующее течение, значительный клинический полиморфизм СМ, наличие схожих по клиническим

признакам заболеваний, высокий риск повторного заболевания в семье и отсутствие терапевтических методов лечения делают наиболее актуальным проведение профилактических мероприятий, направленных на предотвращение возникновения повторных случаев заболевания в отягощенных семьях. Эффективное медико-генетическое консультирование в значительной мере зависит от результатов молекулярно-генетических исследований, направленных на выявление первичного генетического дефекта заболевания, что позволяет провести дифференциальную, пресимптоматическую и пренатальную диагностику синдрома Марфана.

Цель и задачи исследования. Целью работы является эпидемиологическое и молекулярно-генетическое изучение синдрома Марфана.

В соответствии с целью исследования были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести эпидемиологические исследования, определить этнические и территориальные особенности распространения синдрома Марфана в Республике Башкортостан.
2. Провести поиск мутаций и полиморфизмов в гене фибриллина-1 у больных синдромом Марфана.
3. Исследовать распределение частот аллелей и генотипов полиморфных ДНК-локусов *MTS-1*, *MTS-2*, *MTS-4* гена фибриллина-1 у больных синдромом Марфана и здоровых доноров.
4. Провести анализ гаплотипов по локусам *MTS-1*, *MTS-2*, *MTS-4* гена фибриллина-1 у здоровых доноров и в семьях больных синдромом Марфана.
5. Изучить полиморфизм 677C>T гена метилентетрагидрофолатредуктазы у больных синдромом Марфана и здоровых доноров.
6. Разработать алгоритм проведения ДНК-диагностики синдрома Марфана.

Научная новизна. Впервые дана эпидемиологическая характеристика синдрома Марфана в Республике Башкортостан. Впервые в России проведен анализ гена фибриллина-1 у больных синдромом Марфана. Обнаружены две новые миссенс-мутации в гене фибриллина-1: G1176R; C2489Y и 3 новых полиморфизма: IVS65+13InsG; 3171C>T; IVS24-15G>A. Выявлена ассоциация аллеля *C полиморфизма 1875T>C в гене фибриллина-1 с развитием пролапса митрального клапана у больных синдромом Марфана. Показана ассоциация аллеля *T полиморфизма 677C>T гена метилентетрагидрофолатредуктазы с развитием тяжелой формы нарушений в сердечно-сосудистой системе у

больных синдромом Марфана. Обнаружен гаплотип 2-11-8 по полиморфным локусам *MTS-1*, *MTS-2*, *MTS-4* гена фибриллина-1 на 40% нормальных хромосом и гаплотип 2-2-8 на 18% мутантных хромосом, что предполагает сцепление данного гаплотипа с относительно частой мутацией.

Научно-практическая значимость. Полученные данные позволяют расширить представление о молекулярно-генетических механизмах развития синдрома Марфана, а также способствуют разработке косвенной ДНК-диагностики данного заболевания на основе анализа гаплотипов для внедрения его в практику медико-генетической службы. Результаты исследования могут быть использованы при чтении курсов медицинской генетики на биологических факультетах университетов, в медицинских ВУЗах и на курсах повышения квалификации медицинских работников.

Положения, выносимые на защиту:

1. Неравномерность территориального распространения синдрома Марфана в Республике Башкортостан.
2. Идентификация двух новых мутаций и девяти полиморфизмов при скрининге тридцати экзонов гена фибриллина-1 у больных синдромом Марфана.
3. Ассоциация полиморфизма 1875T>C гена фибриллина-1 с развитием пролапса митрального клапана у больных синдромом Марфана.
4. Ассоциация полиморфизма 677C>T гена метилентетрагидрофолат-редуктазы с развитием тяжелой формы нарушений в сердечно-сосудистой системе у больных синдромом Марфана.
5. Статистически значимые различия в распределении частот аллелей и гаплотипов полиморфных локусов *MTS-1*, *MTS-2*, *MTS-4* гена фибриллина-1 между нормальными и мутантными хромосомами у больных синдромом Марфана.
6. Возможность проведения косвенной ДНК-диагностики синдрома Марфана с использованием анализа гаплотипов по локусам *MTS-1*, *MTS-2*, *MTS-4* гена фибриллина-1.

Апробация работы. Результаты исследования были представлены на Всероссийской научной конференции “Актуальные проблемы современной генетики” (Москва, 2003), на Ежегодных конференциях Европейского общества генетиков человека (Бирмингем, 2003; Прага, 2005), Всероссийской конференции Вавиловского общества генетиков и селекционеров “Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития” (Москва, 2004), на V съезде Российского общества медицинских генетиков (Уфа, 2005).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 154 страницах машинописного текста, содержит 40 таблиц и 42 рисунка. Список литературы включает 150 источников.

Материал исследования. Для проведения эпидемиологических исследований использована база данных по больным, состоящим на диспансерном учете в Медико-генетической консультации Республиканского перинатального центра (МГК РПЦ) Республики Башкортостан с клиническим диагнозом “синдром Марфана”, согласно Джентовским критериям. Молекулярно-генетические исследования проведены у 75 больных из 71 семьи, а также 67 членов их семей разной этнической принадлежности. Забор крови больных осуществлялся на базе МГК РПЦ, Республиканской клинической больницы им. Г.Г.Куватова, а также в ходе экспедиционных выездов в 2001-2004 гг. в районы Республик Башкортостан, Татарстан, Саха (Якутия), Северная Осетия-Алания и Кабардино-Балкария. В контрольную выборку были отобраны здоровые индивиды (N=57) без клинических проявлений патологий соединительной ткани, а также здоровые семьи (N=74) для проведения анализа гаплотипов.

Методы исследования. Выделение ДНК проводили методом последовательной фенольно-хлороформной экстракции из цельной венозной крови (Mathew, 1984). Анализ полиморфных ДНК-локусов *MTS-1*, *MTS-2*, *MTS-4* и экзонов гена фибриллина-1 (*FBN1*), а также полиморфизма 677C>T гена метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*) проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью праймеров, предложенных рядом исследователей (Lee et al., 1994; Pereira et al., 1994; Nijbroeck et al., 1995; Hayward et al., 1997; Tiecke et al., 2001; Korkko et al., 2002). Поиск мутаций и

полиморфизмов в гене фибриллина-1 осуществляли методом конформационного полиморфизма одноцепочечной ДНК (SSCP-анализ) (Orita et al., 1989). Результаты SSCP-анализа оценивали в 10%-ном полиакриламидном геле с последующим окрашиванием азотнокислым серебром. Очистку проб для секвенирования осуществляли путем элюирования ДНК из агарозного геля с последующим использованием набора реагентов "DIAtom™DNA Elution" по методике, описанной в инструкции. Определение нуклеотидных последовательностей проводили на автоматическом секвенаторе ABI Prism модель 310 (Applied Biosystems).

Статистическая обработка полученных результатов. Математическую обработку результатов исследования проводили с помощью пакета программ статистического анализа "Rows x Columns" (Roff, Bencen, 1989), Statistica ver. 6.0 (StatSoft, Inc., 2003) с использованием следующих методов анализа: непараметрической корреляции Спирмена, хи-квадрат, простой линейной регрессии. Вычисление показателей отношения шансов (Odds Ratio) и относительного риска (Relative Risk) для качественных бинарных данных проводили с использованием интерактивной таблицы сопряженности 2×2 с вычислением статистик связи, а также их доверительных интервалов (с поправкой Йейтса на непрерывность), разработанной В. П. Леоновым (<http://www.biometrika.tomsk.ru/>). В случае, когда ожидаемое число наблюдений в одной из ячеек было меньше пяти, использовали точный двухсторонний критерий Фишера (Гланц, 1999). Показатель фактической гетерозиготности рассчитывали по формуле, предложенной Л. А. Животовским (1991), теоретическую гетерозиготность определяли как ожидаемую долю гетерозигот по Харди-Вайнбергу (Nei M., 1975), величину аллельной ассоциации оценивали по коэффициенту стандартного неравновесия (Krawczak M. et al., 1988).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Эпидемиологическое исследование синдрома Марфана в Республике Башкортостан

На 2005 год, в Республике Башкортостан (РБ) состоят на учете в Медико-генетической консультации 105 больных с клиническим диагнозом "синдром Марфана" из 96 семей. На сегодняшний день распространенность заболевания в республике составляет 2,55 на 100 000 населения. Проведенное исследование выявило неравномерный характер распространения СМ на территории

республики (рис.1). Заболевание зарегистрировано в 18 из 54 административных районов и в 11 из 21 города республики. Согласно полученным результатам, в городах проживает достоверно больше больных, нежели в сельской местности ($\chi^2=17,79$, $df=1$, $p<0,001$). Подобная закономерность может объясняться более высоким уровнем диагностики заболевания в городах РБ. Частота спорадических случаев СМ в Республике Башкортостан составила 30,3%, что подтверждает высокий процент возникновения мутаций *de novo* в европейских популяциях (Pyeritz and McCusick, 1979; Collod-Beroud et al., 2003).

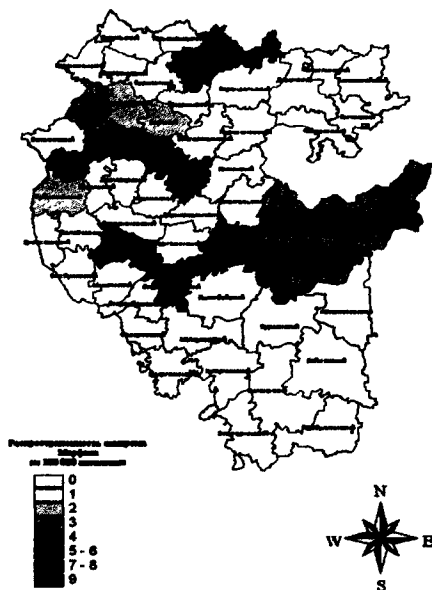


Рис.1 Распространенность синдрома Марфана в Республике Башкортостан.

Большое число спорадических случаев и особенности территориального распределения СМ в РБ предполагает существование взаимосвязи между экологической ситуацией и частотой заболевания. Проведенные корреляционный ($R=0.5850$, $p=0.0085$) и регрессионный анализы ($R=0.5047$, $R^2=0.2547$, $df=1$, $F=5,8098$, $p=0.0275$) показывают существование статистически значимой взаимосвязи между частотой заболеваемости СМ и наличием крупных промышленных предприятий, объясняющей 25,47% вариабельности

частоты СМ в республике. Половой состав больных распределился следующим образом: 43 больных мужского пола, что составляет 40,95% от общего числа больных и 62 (59,05%) больных женского пола. Различия не достигли статистической значимости ($p > 0,05$). Средней возраст больных на момент постановки диагноза составил $13,4 \pm 3,7$ лет, что ниже, чем в ряде европейских стран, где средний возраст манифестации составил 21,6 лет (De Bei et al., 2004). Это, по-видимому, связано с различным подходом к постановке диагноза. Заболевание встречалось в шести этнических группах, являющихся наиболее многочисленными в составе населения республики. По этническому составу больные СМ распределились следующим образом: 43,81% русских, 26,67% татар, 13,33% башкир, 2,86% чувашей, 1,90% армян, 0,95% украинцев, 10,48% метисов от межнациональных браков, образованных сочетанием этносов, представленных выше.

Таким образом, обнаружено неравномерное распространение СМ в Республике Башкортостан, вероятно, связанное с различным уровнем экологической обстановки, а также с уровнем клинической диагностики заболевания в отдаленных районах РБ; установлены особенности этнической и половой структуры заболевания, возраст манифестации, частота спорадических случаев СМ.

2. Поиск мутаций и полиморфизмов в гене фибриллина-1 у больных синдромом Марфана

Проведен скрининг мутаций в тридцати (1-4,15,18,24-40,59-65) функционально значимых экзонах гена фибриллина-1 (*FBNI*) (Tiecke et al., 2001; Rommel et al., 2002; Collod-Berod et al., 2003) у 60 больных СМ из Республики Башкортостан, а также из Республик Татарстан, Саха-Якутия, Северная Осетия-Алания и Кабардино-Балкария. Методом SSCP-анализа было выявлено 52 случая изменения подвижности одноцепочечной ДНК в 12 экзонах гена *FBNI*. В 18 экзонах SSCP-анализ изменений подвижности не выявил. В 45 случаев секвенционный анализ выявил изменения в нуклеотидной последовательности гена *FBNI* (табл.1). Обнаруженные изменения локализованы преимущественно в центральных (24-28) и концевых экзонах (60,62,65) гена фибриллина-1, что в целом подтверждает повышенную мутабельность данных регионов гена (Tiecke et al., 2001; Rommel et al., 2002; Collod-Beroud et al., 2003).

**Изменения в нуклеотидной последовательности гена фибриллина-1
у больных синдромом Марфана**

Изменение	Количество больных	Экзон	Положение в гене	Кодон	Кодон дикого типа	Кодон мутантного типа	Аминокислота дикого типа	Аминокислота мутантного типа	Ссылки
1875T>C	24	15	1875	625	AAT	AAC	Asn	Asn	(Hayward et al., 1997)
IVS18-46A>G	2	18	2167	-	-	-	-	-	(Hayward et al., 1997)
IVS24-15G>A	1	24	2952	984	GTC	GTA	Val	Val	-
3171C>T	1	25	3171	1057	AGC	AGT	Ser	Ser	-
3294C>T	1	26	3294	1098	GAC	GAT	Asp	Asp	(Yunan et al., 1999)
3442C>G	2	27	3442	1148	CCC	GCC	Pro	Ala	(Tynan et al., 1993)
IVS28+15delTTT TTTA	9	28	3589	-	-	-	-	-	(Nijbroek, et al., 1995)
3526G>A	1	28	3526	1176	GGG	AGG	Gly	Arg	-
7466G>A	1	60	7466	2489	TGT	TAT	Cys	Tyr	-
IVS62+8A>C	2	62	7819	-	-	-	-	-	(Youil et al., 2000)
IVS65+13InsG	1	65	8628	-	-	-	-	-	-

Функционально значимыми оказались два изменения, приводящие к заменам консервативных аминокислотных остатков в кальций связывающих доменах белка фибриллина-1 (3526G>A (G1176R); 7466G>A (C2489Y)). По типу изменений они классифицируются как миссенс-мутации, по характеру последствий - как доминантно-негативные мутации (gain-of-function mutation) (Горбунова, Баранов, 1997). В литературе данные мутации не описаны. В ходе скрининга обнаружено девять полиморфизмов в кодирующих и некодирующих регионах гена: 1875T>C, IVS18-46A>G, IVS24-15G>A, 3171C>T, 3294C>T, 3442C>G, IVS28+15delTTTТА, IVS62+8A>C, IVS65+13InsG. Наиболее часто встречаемыми у больных СМ были полиморфизмы 1875T>C (40%) и IVS28+15de(TTTТА)n (15%), расположенные в 15-ом экзоне и в 28-ом интроне, соответственно. Для проверки их функциональной значимости было проведено изучение данных локусов в контрольной группе здоровых индивидов. Были выявлены статистически значимые различия в распределении частот аллелей полиморфизма 1875T>C у больных СМ с пролапсом митрального клапана (ПМК) ($\chi^2=4,28$; $df=1$, $p=0,038$) по сравнению с контрольной группой здоровых

индивидов (рис. 2). Показано, что аллель *FBN1**C является генетическим фактором риска ($RR=1,58$ [$95\%CI=1,02 - 2,23$]); Odds ratio=2,3 [$95\%CI=1,04-5,1$] развития пролапса митрального клапана у больных СМ. Различия в распределении частот генотипов между больными с ПМК и здоровыми донорами не достигли статистической значимости ($p>0,05$). Распределение частот аллелей и генотипов полиморфизма IVS28 + 15(TTTTA)_n между больными СМ и контрольной группой здоровых индивидов не выявило статистически значимых различий ($p>0,05$).

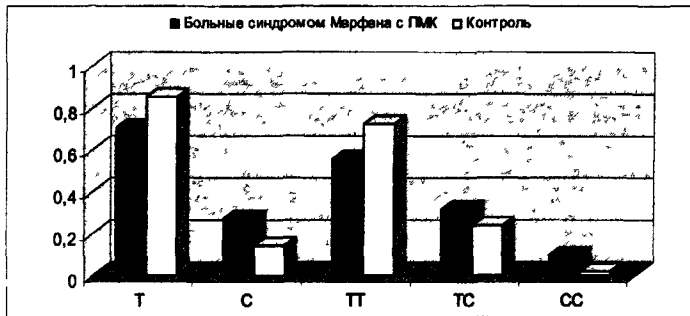


Рис. 2. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфизма 1875T>C гена *FBN1* у больных синдромом Марфана с пролапсом митрального клапана и в контрольной группе.

3. Анализ полиморфных ДНК-локусов *MTS-1*, *MTS-2*, *MTS-4* гена фибриллина-1 у больных синдромом Марфана и в контрольной группе

В связи с большим размером гена *FBN1* и отсутствием мажорных мутаций актуальной становится разработка косвенной ДНК-диагностики СМ с использованием генетических маркеров, сцепленных с заболеванием. Применение косвенных методов молекулярной диагностики среди больных предусматривает в качестве обязательного предварительного этапа исследование частот аллелей соответствующих полиморфных локусов в анализируемых популяциях, а также определение вероятности рекомбинации и неравновесия по сцеплению между маркерными сайтами и мутантными аллелями гена.

Проведено изучение трех полиморфных ДНК локусов *MTS-1*, *MTS-2*, *MTS-4* гена *FBN1*, содержащих микросателлитные (CA)_n повторы, в контрольной группе здоровых индивидов и у больных СМ (рис.3). Анализ

полиморфных ДНК-локусов *MTS-1*, *MTS-2*, *MTS-4* гена *FBN1* в выборке здоровых индивидов татарской и русской этнической принадлежности выявил статистически значимые различия по локусу *MTS-1* ($\chi^2=11,66$; $df=5$, $p=0,04$).

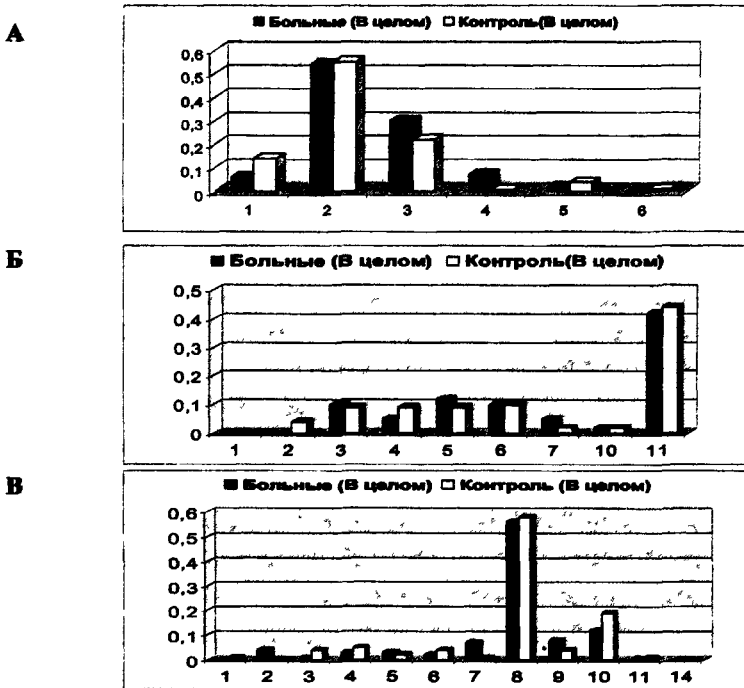


Рис. 3. Распределение частот аллелей полиморфных локусов гена фибриллина-1 у больных синдромом Марфана и в контрольной группе здоровых доноров.

А - локус *MTS-1*, Б - локус *MTS-2*, В - локус *MTS-4*.

Различия в распределении частот аллелей и генотипов по двум другим локусам оказались статистически не значимыми ($p>0,05$). Не выявлено статистически достоверных различий и в распределении частот аллелей и генотипов полиморфных ДНК-локусов *MTS-1*, *MTS-2*, *MTS-4* гена фибриллина-1 у больных СМ с учетом их этнической принадлежности ($p>0,05$). Проведенный сравнительный анализ показал статистически значимые различия между больными СМ в целом и контрольной группой здоровых индивидов в распределении частот аллелей локусов *MTS-2*, *MTS-4* гена фибриллина-1 ($p<0,05$) (рис.3). Распределение частот аллелей изученных локусов между

больными и контролем с учетом их этнического происхождения выявило достоверные различия между больными СМ и здоровыми донорами татарской этнической принадлежности по локусу *MTS-1* ($\chi^2=9,51$; $df=4$; $p=0,043$).

Таким образом, проведенное исследование полиморфных локусов *MTS-1*, *MTS-2*, *MTS-4* гена *FBN1*, с одной стороны, свидетельствует об отсутствии межэтнической гетерогенности по распределению частот их аллелей, с другой стороны, показывает различия в целом между больными СМ и контролем, что наряду с мультиаллельностью и высокой гетерозиготностью данных локусов, позволяет использовать их для молекулярно-генетической диагностики СМ.

4. Анализ полиморфных ДНК-локусов *MTS-1*, *MTS-2*, *MTS-4* гена фибриллина-1 в семьях с синдромом Марфана

Проведено исследование полиморфных ДНК-локусов *MTS-1*, *MTS-2*, *MTS-4* в двадцати девяти семьях с СМ разной этнической принадлежности. В двадцати двух семьях (76%) наблюдался аутосомно-доминантный тип наследования и по данным полиморфным локусам были определены аллели, ассоциированные с нормальными (N) и мутантными (M) хромосомами. В семи семьях (24%) определение мутантной хромосомы оказалось невозможным в силу того, что родители пробандов, а также их родственники были фенотипически здоровы, что характеризует данные случаи как спорадические.

В локусе *MTS-1*, в целом, на мутантных хромосомах было выявлено четыре аллельных варианта, а на нормальных – пять (рис.4-А). Частыми аллелями на мутантных хромосомах оказались аллели *MTS-1*2* и *MTS-1*3*, обнаруженные с частотой 0,54 и 0,32, соответственно. Эти же аллели были доминирующими и на нормальных хромосомах, где их частота составила 0,6 и 0,2. Различия в распределении частот аллелей локуса *MTS-1* между нормальными и мутантными хромосомами, а также с учетом их этнического происхождения не достигли статистической значимости ($p>0,05$).

В локусе *MTS-2*, в целом, на мутантных хромосомах было определено восемь аллельных вариантов, а на нормальных – пять (рис. 4-Б). Различия в распределении частот аллелей, в целом, между мутантными и нормальными хромосомами оказались статистически значимыми ($\chi^2=17,37$, $df=8$, $p=0,025$). Достоверно чаще на мутантных хромосомах встречался аллель *MTS-2*2* с частотой 0,36 ($\chi^2=5,02$, $df=1$, $p=0,025$). На нормальных хромосомах чаще других наблюдался аллель *MTS-2*11* с частотой 0,6 ($\chi^2=7,95$; $df=1$, $p=0,005$).

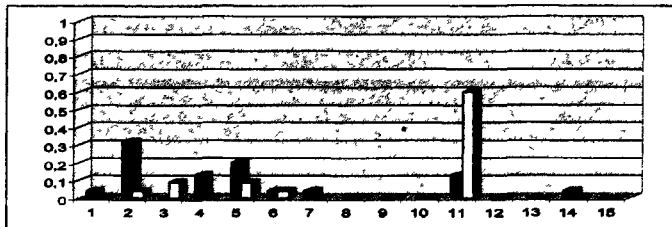
Обнаружены также статистически значимые различия в распределении частот аллелей между мутантными и нормальными хромосомами у лиц русской этнической принадлежности ($\chi^2=14,44$; $df=7$, $p=0,03$).

В локусе *MTS-4*, в целом, на мутантных хромосомах количество аллельных вариантов составило восемь, а на нормальных – пять (рис.4-В). Статистически значимые различия наблюдались по частоте аллеля *MTS-4*8*, встречавшегося на мутантных хромосомах с частотой 0,36, а на нормальных хромосомах - с частотой 0,72 ($\chi^2=4,49$; $df=1$, $p=0,034$). Распределение частот аллелей, в целом, между мутантными и нормальными хромосомами, а также с учетом их этнического происхождения не достигли статистической значимости ($p>0,05$).

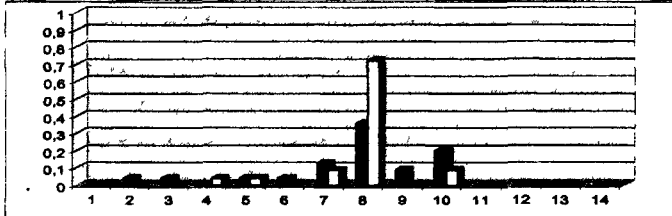
А



Б



В



Мутантные хромосомы



Нормальные хромосомы

Рис. 4. Распределение частот аллелей полиморфных ДНК локусов гена фибриллина-1 на мутантных и нормальных хромосомах у больных синдромом Марфана. А - *MTS-1*; Б - *MTS-2*; В - *MTS-4*.

С целью выявления степени ассоциации аллелей полиморфных ДНК-локусов *MTS-1*, *MTS-2*, *MTS-4* гена *FBN1* был определен стандартный коэффициент неравновесия по сцеплению – ΔSt для наиболее частых аллелей, расположенных на мутантных хромосомах. Максимальная величина ΔSt наблюдалась для аллеля *MTS-2*2* локуса *MTS-2* (-0,44). Заметно ниже величина ΔSt отмечена для локусов *MTS-1* и *MTS-4* (-0,14 и -0,15). Это, вероятно, связано с тем, что наиболее частые аллели одинаково встречаются и на мутантных и на нормальных хромосомах.

5. Изучение гаплотипов полиморфных локусов *MTS-1*, *MTS-2*, *MTS-4* гена фибриллина-1 в контрольной группе здоровых доноров

Проведено изучение гаплотипов *MTS-1-MTS-2-MTS-4* гена *FBN1* в семьях здоровых доноров с целью выявления закономерностей распределения гаплотипов данных полиморфных локусов у здоровых индивидов в целом, а также в зависимости от их этнической принадлежности. Всего было выявлено 51 различных гаплотипов на 90 хромосомах. На 52 хромосомах русского происхождения было определено 30 гаплотипов, на 38 хромосомах татарского происхождения – 29 гаплотипов. У русских наиболее частыми оказались гаплотипы 2-11-8 и 1-11-8, обнаруженные с частотой 0,21 и 0,07, соответственно. У татар чаще других встречались гаплотипы 2-11-8, 1-11-8, 3-11-8, частота которых составила 0,16, 0,08 и 0,08, соответственно, остальные гаплотипы были редкими и встречались с частотой менее 0,05. По распределению частот гаплотипов полиморфных локусов *MTS-1-MTS-2-MTS-4* гена *FBN1* между русскими и татарами статистически значимых отличий не выявлено ($p > 0,05$). Таким образом, у здоровых доноров по локусам *MTS-1*, *MTS-2*, *MTS-4* гена *FBN1* показано отсутствие этнических особенностей в распределении частот гаплотипов и существование одного частого гаплотипа 2-11-8.

6. Изучение гаплотипов полиморфных локусов *MTS-1*, *MTS-2*, *MTS-4* гена фибриллина-1 на нормальных и мутантных хромосомах у больных синдромом Марфана

По локусам *MTS-1*, *MTS-2*, *MTS-4* гена фибриллина-1 проведен анализ гаплотипов на нормальных и мутантных хромосомах у больных синдромом Марфана из 22 семей. На 22 мутантных хромосомах было определено 19

гаплотипов, 15 (79%) из которых не встречались на нормальных хромосомах (рис.5). Выявлено 12 гаплотипов на нормальных хромосомах, на которых достоверно чаще встречался гаплотип 2-11-8, определенный с частотой 0,4, в десять раз превышающей таковую на мутантных хромосомах (0,04) ($\chi^2=6,34$; $df=1$, $p=0,012$). Самым частым на мутантных хромосомах оказался гаплотип 2-2-8, обнаруженный с частотой 0,18, что предполагает сцепление данного гаплотипа с относительно частой мутацией. На нормальных хромосомах частота гаплотипа 2-2-8 составила 0,04. Выявленные различия в распределении частот гаплотипов в целом на нормальных и мутантных хромосомах оказались статистически значимыми ($\chi^2=32,53$; $df=21$; $p=0,027$). Достоверные отличия были обнаружены также и в распределении частот гаплотипов на нормальных и мутантных хромосомах русского происхождения ($\chi^2=16,6$; $df=12$, $p=0,037$).

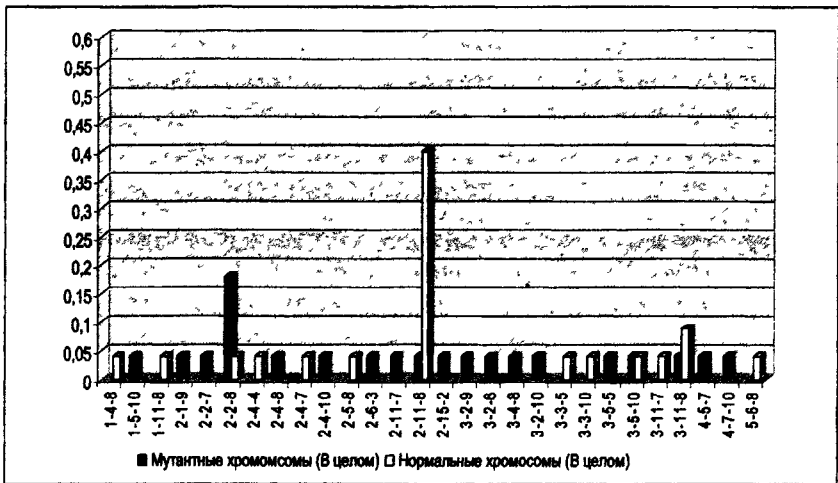


Рис. 5. Распределение частот гаплотипов *MTS-1-MTS-2-MTS-4* на нормальных и мутантных хромосомах у больных синдромом Марфана.

Таким образом, проведенный гаплотипический анализ позволил предположить о существовании широкого спектра мутаций в гене фибриллина-1 и одной относительно частой мутации, ассоциированной с гаплотипом 2-2-8.

7. Практическое применение анализа гаплотипов в семьях с синдромом Марфана

В нашей работе исследованы 35 семей, в которых зарегистрированы случаи СМ. В 29 семьях с помощью полиморфных ДНК-локусов *MTS-1*, *MTS-2*, *MTS-4* гена *FBNI* удалось составить варианты гаплотипов для каждого из членов семьи. В остальных шести семьях, в виду отсутствия одного из родителей, определение гаплотипов не представилось возможным. В 76% семей наблюдался аутосомно-доминантный тип наследования, что позволило проследить передачу гаплотипа, сцепленного с заболеванием. На рисунке 6-А показана родословная семьи X., в которой был определен гаплотип 2-2-8, сцепленный с СМ у пробанда, а также у его матери и ее родного брата, имеющих клинические признаки заболевания. В 25% исследованных семей определение мутантных хромосом оказалось невозможным, поскольку оба родителя были фенотипически здоровы, пример подобной родословной представлен на рисунке 6-Б. Родители пробанда и сибс не имеют каких-либо клинических признаков СМ. Данная семья не информативна для косвенной ДНК-диагностики из-за невозможности определить гаплотип, сцепленный с заболеванием.

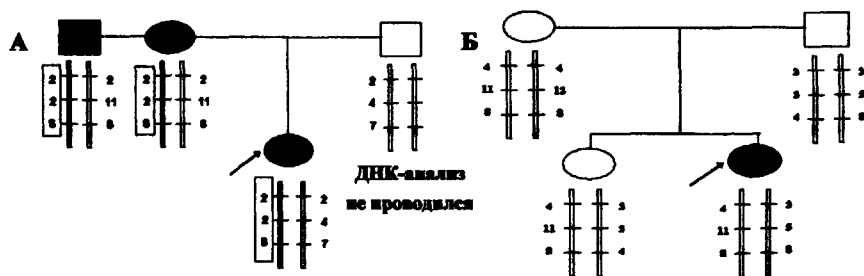


Рис. 6. Анализ родословных семей с синдромом Марфана.

А - аутосомно-доминантный тип наследования, Б - спорадический случай. Пробанд указан стрелкой. Белым цветом указаны нормальные хромосомы, черным - мутантные.

В связи с вышесказанным, проведение ДНК-диагностики СМ с использованием анализа гаплотипов возможно только в каждой отдельной семье, при условии аутосомно-доминантного типа наследования и информативности данной семьи по изучаемым генетическим маркерам.

8. Исследование полиморфизма 677C>T гена метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) у больных синдромом Марфана

Высокий клинический полиморфизм СМ с выраженными нарушениями в различных системах органов предполагает также вовлечение других генов, участвующих в патогенезе заболевания. В последнее время активно проводится изучение влияния гомоцистеина в сыворотке крови на развитие нарушений в сердечно-сосудистой системе для ряда заболеваний (Miyao et al., 1998; Cattaneo et al., 1999; Seshadri et al., 2002). Поскольку, нарушения в сердечно-сосудистой системе являются одним из главных диагностических признаков СМ, было проведено изучение полиморфизма 677C>T гена *MTHFR* в выборке больных СМ, а также в группе здоровых индивидов.

В контрольной группе здоровых доноров аллель *MTHFR*Т* обнаружен с частотой 0,14. Частота аллеля *MTHFR*Т* в общей выборке больных составила 0,25. В целом, различия в распределении частот аллелей полиморфизма 677C>T гена *MTHFR* не достигли статистической значимости ($p>0,05$). У больных СМ достоверно чаще встречался генотип *MTHFR*C/*Т* ($\chi^2 = 4,203$; $df=1$, $p = 0,045$), частота которого составила 0,44. Полученные показатели относительного риска ($OR=2,5$ [95%CI=1,03–6,1]; $RR=1,42$ [95%CI=1,01– 1,89]) свидетельствуют о том, что генотип *MTHFR*C/*Т* является генетическим маркером риска сердечно-сосудистых нарушений у больных СМ. Различия в распределении частот гомозиготного генотипа *MTHFR*Т/*Т*, в целом, между больными СМ и контрольной группой не достигли статистической значимости ($p>0,05$).

Для дальнейшего анализа больные СМ были подразделены по степени тяжести поражения сердечно-сосудистой системы на среднюю (пролапс митрального клапана без расширения основания аорты) и тяжелую формы (пролапс митрального клапана первой и второй степени с расширением основания аорты). Распределение частот аллелей полиморфизма 677C>T гена *MTHFR* между больными со средней формой тяжести сердечно-сосудистых нарушений (ССН) и контролем не выявило статистически значимых различий ($p>0,05$). Генотип *MTHFR*C/*Т* чаще встречался в группе со средней формой тяжести нарушений в сердечно-сосудистой системе, где частота его составила 0,43. Гомозиготный генотип *MTHFR*Т/*Т* в группе больных со средней формой тяжести сердечно-сосудистых патологий не встречался, в то время как частота его у больных с тяжелой формой ССН составила 0,18. Обнаруженные различия

в распределении частот аллелей локуса *MTHFR* между больными с тяжелой формой ССН и контролем оказались статистически значимыми ($\chi^2 = 4,47$; $df=2$, $p=0,034$). Сравнительный анализ распределения частот генотипов полиморфизма 677C>T гена *MTHFR* у больных с различной степенью тяжести поражения сердечно-сосудистой системы и здоровых индивидов выявил статистически значимые различия в группе больных с тяжелой формой ССН и контролем (двусторонний критерий Фишера, $p=0,043$) (рис.7). Полученные значения относительного риска ($OR=3,43$ [$95\%CI=1,07-10,88$]; $RR=2,54$ [$95\%CI=1,06-5,44$] для аллеля *MTHFR**T свидетельствуют об ассоциации данного аллеля с развитием тяжелой формы нарушений в сердечно-сосудистой системе у больных СМ. Несмотря на высокий показатель относительного риска ($OR=10,66$) для генотипа *MTHFR**T/*T, доверительный интервал в этом случае является очень широким (0,64 - 333,3), что не позволяет сделать однозначного вывода о том, является ли этот генотип рисковым для развития тяжелой формы нарушений в сердечно-сосудистой системе у больных СМ. Увеличение объема выборки приведет к сужению границ доверительного интервала и, как следствие, позволит сделать более надежные оценки.

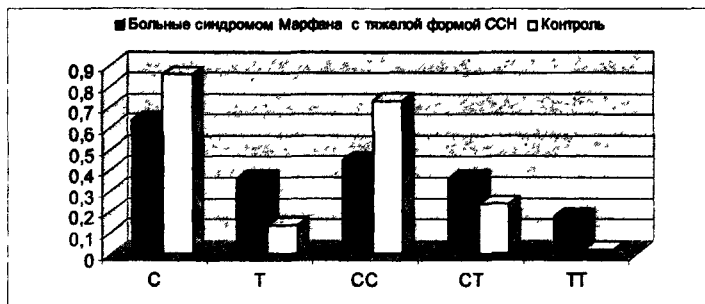


Рис. 7. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфизма 677C>T гена *MTHFR* у больных синдромом Марфана с тяжелой формой сердечно-сосудистых нарушений (ССН) и в контрольной группе здоровых доноров.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что ген *MTHFR* вовлечен в патогенез синдрома Марфана и аллель *MTHFR**T способствует утяжелению клинических признаков нарушения в сердечно-сосудистой системе у больных синдромом Марфана.

ВЫВОДЫ

1. Распространенность синдрома Марфана в Республике Башкортостан составляет 2,55 на 100 000 населения, что на порядок ниже, чем в целом по Европе. Установлена неравномерность территориального распространения заболевания в РБ. Число спорадических случаев синдрома Марфана в РБ соответствует среднемировому показателю.
2. Скрининг 30 экзонов гена фибриллина-1 у больных синдромом Марфана выявил 9 полиморфизмов и 2 мутации. Низкая частота мутаций в гене *FBN1* предполагает гетерогенность заболевания.
3. Обнаружены две новые миссенс-мутации (G1176R; C2489Y) и 3 новых полиморфизма (IVS65+13InsG; 3171C>T; IVS24-15G>A) в гене фибриллина-1.
4. Выявлена ассоциация аллеля *C полиморфизма 1875T>C 15-го экзона гена фибриллина-1 с развитием пролапса митрального клапана у больных синдромом Марфана.
5. Обнаружена ассоциация аллеля *T полиморфизма 677C>T гена метилентетрагидрофолатредуктазы с развитием тяжелой формы нарушений в сердечно-сосудистой системе у больных синдромом Марфана.
6. Установлены различия в распределении частот аллелей полиморфных ДНК-локусов *MTS-1*, *MTS-2*, *MTS-4* гена фибриллина-1 между больными синдромом Марфана и контрольной группой здоровых доноров, а также достоверные различия в распределении частот аллелей полиморфного локуса *MTS-2* гена фибриллина-1 между нормальными и мутантными хромосомами.
7. Выявлены статистически значимые отличия в распределении частот гаплотипов по трем полиморфным локусам *MTS-1*, *MTS-2*, *MTS-4* на нормальных и мутантных хромосомах. Гаплотип 2-11-8 чаще встречается на нормальных хромосомах (0,4), гаплотип 2-2-8 - на мутантных хромосомах (0,18).
8. Разработан алгоритм проведения ДНК-диагностики синдрома Марфана, позволяющий использовать анализ гаплотипов по локусам *MTS-1*, *MTS-2*, *MTS-4* гена фибриллина-1 для косвенной ДНК-диагностики заболевания.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Валиев Р.Р., Фатхлисламова Р.И., Хуснутдинова Э.К. Молекулярно-генетическое изучение синдрома Марфана в Республике Башкортостан // «Актуальные проблемы современной генетики» - Москва, 2003. - С.13.
2. Valiev R. R., Khusainova R. I., Khusnutdinova E.K. Mutation analysis of the FBN1 gene among patients with Marfan syndrome from Bashkortostan, Russia // European Journal of Human Genetics - European Human Genetics Conference.- Birmingham, 2003.- V.7. - P. 259.
3. Валиев Р.Р., Хусаинова Р.И., Хуснутдинова Э.К. Синдром Марфана: клинические и генетические аспекты // Медицинская генетика – 2003.- №11- С. 450-459.
4. Валиев Р.Р., Хусаинова Р.И., Кутуев И.А. Скрининг мутаций в гене фибриллина-1 у больных с синдромом Марфана, проживающих в Республике Башкортостан // Материалы III съезда ВОГиС “Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития” - Москва, 2004. - С.21-22.
5. Valiev R., Khusainova R., Khusnutdinova E. The study of Marfan syndrome in Republic of Bashkortostan // European Journal of Human Genetics - European Human Genetics Conference.- Munich, 2004. - V.12. - P.102.
6. Хусаинова Р.И., Валиев Р.Р., Кутуев И.А., Хуснутдинова Э.К. Эпидемиологическое и молекулярно-генетическое изучение синдрома Марфана // Медицинская генетика – 2004. - № 6.- С. 290-296.
7. Хуснутдинова Э. К., Хидиятова И. М., Хусаинова Р.И., Карунас А.С., Исламгулов Д.В., Валиев Р.Р., Мурзабаева С.Ш. Молекулярно-генетическое изучение наследственной патологии в Волго-Уральском регионе // Вестник ВОГИС – 2005. - №6. – С. 102-123.
8. Валиев Р.Р., Хусаинова Р.И., Хуснутдинова Э.К. Анализ гена фибриллина-1 у больных синдромом Марфана // Материалы V съезда Российского общества медицинских генетиков – Уфа - 2005.- Медицинская генетика – 2005 - №4. – С.163.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

CM - синдром Марфана

FBN1 - ген фибриллин-1

SSCP – анализ конформационного полиморфизма одноцепочечной ДНК

MTHFR - ген метилентетрагидрофолатредуктазы

ССН – сердечно-сосудистые нарушения

ПМК – пролапс митрального клапана

Odds ratio (OR) – отношение шансов

RR – relative risk – относительный риск

95% CI – confidence interval – 95% доверительный интервал

Валиев Руслан Радисович

Анализ гена фибриллина-1 у больных синдромом марфана

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 № 315.

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

№ 19359

РНБ Русский фонд

2006-4

21290