

О.А.Якуц¹, К.А. Моссэ¹, С.А. Лихачев², И.В. Плешко²

Молекулярногенетический анализ хорей Гентингтона в Республике Беларусь

ГУ РНПЦ «Мать и дитя»¹

ГУ «РНПЦ неврология и нейрохирургия»²

Хорея Гентингтона – тяжелое прогрессирующее наследственное заболевание головного мозга с аутосомно-доминантным типом наследования. Мутация, приводящая к развитию хорей Гентингтона, заключается в увеличении числа (экспансии) тринуклеотидных CAG-повторов в гене IT-15. Разработка методов молекулярно-генетического анализа данного гена позволила провести ДНК-диагностику у пациентов с хореей Гентингтона и изучить генотип- фенотипическую корреляцию. Проведено молекулярно-генетическое обследование 41 пациента (36 пробандов и 5 членов их семей), экспансия CAG-повторов обнаружена у 31 человека.

Ключевые слова: Хорея Гентингтона, экспансия, ген IT-15.

Хорея Гентингтона - одно из самых тяжелых прогрессирующих нейродегенеративных наследственных заболеваний головного мозга. Частоты встречаемости хорей Гентингтона в разных странах мира широко переменчивы. Так, например, самая высокая частота – 5-10 больных на 100 000 жителей - характерна для стран восточной Европы, США и Канады. Значительно реже заболевание встречается в Японии – 0,11-0,45 на 100 000, в Китае – 0,2-0,4 на 100 000 и Африке - <0,01 на 100 000 жителей [7].

Первые признаки хорей Гентингтона проявляются между 4-й и 5-й декадами жизни. Средний возраст манифестации составляет 38 лет. Больные обычно живут 15-18 лет после начала заболевания. Заболевание начинается с личностных и эмоциональных изменений, затем присоединяется постепенное ухудшение высших психических функций. Возникающая клиническая картина имеет два основных проявления: хореический гиперкинез и нейропсихические нарушения. Гиперкинетический синдром проявляется непроизвольным гримасничаньем, усилением жестикуляции, дрожанием, пошатыванием при ходьбе. Выраженность и распространенность гиперкинезов с течением времени нарастает. Могут отмечаться дизартрия и дисфагия.

Нарушения психики переменчивы: вначале появляется повышенная возбудимость, затем отмечается депрессия, снижение памяти, внимания, самокритики, наблюдаются поведенческие изменения: апатия, агрессивность, алкоголизм, могут быть бред и галлюцинации, в последующем развивается деменция. Отмечается выраженное стремление к суициду. Иногда отмечаются вспышки агрессивного поведения [3, 6].

В 10% случаев отмечается ювенильный вариант хорей Гентингтона с манифестацией до 20-ти лет и в 5% случаев – до 14 лет. Он проявляется

хореей, брадикинезией, дистонией. Иногда могут встречаться атипичные случаи ювенильного варианта хореей. Они сопровождаются паркинсонизмом, ригидностью, акинезией, атаксией [8]. Поздняя манифестация (после 50-ти лет) отмечается в 20% случаев [9].

Ген хореей Гентингтона (IT15) был идентифицирован в 1993 г на хромосомном сегменте 4p16.3. Он имеет размер около 180 кб, состоит из 67 экзонов и кодирует белок гентингтин (huntingtin). В своём первом экзоне ген содержит тандемную последовательность (CAG)_n – повторов, число которых в норме составляет обычно от 6 до 20. Сущность мутации при хореей Гентингтона заключается в экспансии внутригенных тандемных тринуклеотидных повторов, количество которых у пациентов увеличивается до 36-180. Так как CAG повторы расположены в транслируемой области гена, их экспансия приводит к синтезу аномального белка, содержащего пропорционально удлиненный полиглутаминовый участок [1].

Существует следующая градация возможного развития заболевания в зависимости от числа повторов [5]:

- ≤26 повторов – нормальные аллели;
- 27-35 повторов – промежуточные аллели. У индивида с таким числом повторов заболевание не развивается, но есть риск передачи своим детям аллеля с аномально увеличенным числом повторов. Данный риск зависит от различных факторов, включающих пол родителя, размер аллеля и структуру ДНК-последовательности, фланкирующей экспансию. Для 35-ти повторов риск составляет 6-10%.
- 36-39 повторов – аллели с варьирующей пенетрантностью. Хореей у данных индивидов может развиваться, а может и не развиваться.
- ≥ 40 повторов – полная пенетрантность. Аллели данного размера связаны с развитием хореей Гентингтона.

Наблюдается прямая корреляция между числом повторов и степенью фенотипического проявления заболевания и обратная с возрастом манифестации [2, 8].

Для хореей Гентингтона характерно явление антиципации - нарастание тяжести заболевания и уменьшение возраста, при котором оно возникает, в последующих поколениях. Причиной является накопление CAG повторов при наследовании. При этом увеличение их числа наблюдается чаще при передаче мутантного гена от отца. Данный феномен (зависимость формы и тяжести проявления заболевания от родительского источника мутантной хромосомы) называют генетическим импринтингом.

Наше исследование проводилось с целью определения величины экспансии гена IT-15 у пациентов с хореей Гентингтона современными молекулярно-генетическими методами, а также изучения генотип- фенотипической корреляции при данной патологии.

Материалы и методы:

Исследуемую группу составили пробанды с предварительным клиническим диагнозом хореей Гентингтона, проходившие клиническое обследование и

лечение в «РНПЦ неврология и нейрохирургия», а также проходившие медико-генетическое консультирование в РНПЦ «Мать и дитя».

В качестве биологического материала для исследования использовалась геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови методом фенол-хлороформной экстракции по стандартной методике [4].

Во всех образцах ДНК проводили прямое определение количества повторов CAG в гене IT15 с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) и капиллярного электрофореза.

Реакционная смесь для ПЦР с конечным объемом 20 мкл содержала 100 нг ДНК, 1xПЦР буфер, 2,5 mM MgCl₂, 200 мкМ dATP/dCTP/dTTP/dGTP, 10 пМ праймеров и 0,75 единиц активности Taq-полимеразы. В качестве праймеров использовались олигонуклеотидные последовательности, фланкирующие участок ДНК. Для анализа образцов ДНК в автоматическом анализаторе ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) синтезировали ПЦР-продукт с флуоресцентной меткой. Для этой цели использовали меченый вариант прямого праймера, имевшего молекулу «репортера» FAM–6 на 3`-конце [9]:
HD 482: 5' GGC TGA GGA AGC TGA GGA G 3'

HD 344: 5' CCT TCG AGT CCC TCA AGT CCT TC 3' FAM

Эти последовательности праймеров фланкируют CAG – повторы, минуя CCG-полиморфизм, что позволяет избежать ошибок при проведении генетического тестирования [9].

После денатурации образцов при 95°C в течение 5 минут выполняли 30 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: 1 мин денатурации при 95°C, 1 мин отжига при 62°C и 1 мин синтеза при 72°C.

На завершающей стадии синтеза пробирки выдерживали 7 мин при 72°C.

Продукты ПЦР анализировали с помощью автоматического капиллярного электрофореза в генетическом анализаторе ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Из каждой реакции 0.7 мкл амплификата смешивали с 0.7 мкл маркера молекулярного веса ROX350 (Applied Biosystems) и 8 мкл деионизированного формамида. Смесь денатурировали 4 мин при 95°C.

Электрофорез проводили при следующих параметрах: время инъекции образца в капилляр 5 сек, время разделения 24 мин, напряжение 7,5 кВ, длина детектора 36 см. Для разделения использовали 4% раствор полимера POP–4™ (Applied Biosystems). Обработку данных и определение аллелей выполняли с помощью пакета компьютерной программы GENESCAN (Applied Biosystems).

Результаты и обсуждение:

Молекулярно-генетический анализ на наличие экспансии в гене гентингина выполнен у 41 человека (36 пробандов с предварительным клиническим диагнозом хорея Гентингтона и 5 родственников). Аллели с патологическим увеличением числа повторов были обнаружены у 31 человека, (в 3 случаях до появления симптомов), у 10 человек был показан нормальный генотип.

В нормальных хромосомах число CAG повторов составило от 13 до 24 (нормальными считаются аллели с числом повторов до 26). Наиболее часто

был представлен аллельный вариант с 17 повторами (13 хромосом из 82) (рис.1), что согласуется с данными других исследователей [2, 7, 9]. В двух хромосомах обнаружены промежуточные аллели с числом повторов равным 28. Один из пациентов имеет второй нормальный аллель, на основании чего диагноз хорей Гентингтона у него исключен. При этом существует незначительный риск увеличения числа повторов в следующем поколении при наследовании промежуточного аллеля, что делает целесообразным молекулярно-генетическое тестирование его детей. У второго пациента обнаружен также аллель с 52 повторами (максимальная экспансия среди всех обследованных). У него имеет место ювенильная форма хорей Гентингтона с ранним и крайне тяжелым проявлением заболевания. В мутантных хромосомах число повторов варьировало от 39 до 52. Наиболее часто встречались аллели с числом повторов 43 и 45 (по 7 хромосом) (рис. 1).

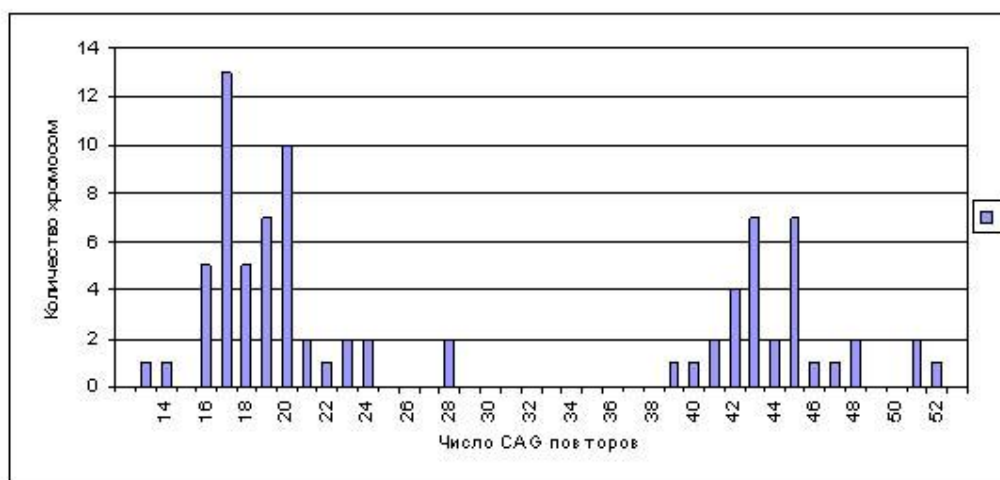


Рис. 1. Распределение аллелей гена IT15 по числу CAG повторов у пациентов с хореей Гентингтона.

Среди пациентов соотношение полов было следующим 28 мужчин: 13 женщин. Возраст манифестации заболевания составил от 24 до 68 лет. Была отмечена тесная взаимосвязь между величиной экспансии CAG повторов и возрастом дебюта симптомов, что соответствует имеющимся литературным данным [1, 2, 5]. Так, у двух пациентов с наибольшей степенью экспансии (51 и 52 повтора) заболевание манифестировало в 24 и 29 лет, и быстро развился крайне тяжелый ювенильный вариант хорей Гентингтона.

Хорея Гентингтона это аутосомно-доминантное заболевание, и мутантный аллель наследуется с вероятностью 50%. Очень важно проведение генетического анализа родственников пробанда который позволяет или установить носительство мутантного гена еще до появления клинических признаков или исключить его и соответственно вероятность развития патологии в будущем.

Нами было проведено доклиническое молекулярно-генетическое обследование 5 родственников пробандов в четырех семьях. В двух семьях у обследованных дочери и сестры пробандов установлен нормальный генотип, что исключает у них риск возникновения заболевания

В третьей семье хорей Гентингтона подтверждена у женщины 38 лет. В результате молекулярно-генетического обследования у нее обнаружена экспансия в 45 СAG повторов. Исследование ДНК также было выполнено для ее дочери и сына. Результаты тестирования показали, дочь унаследовала от матери аллель с нормальной длиной повторов и имеет нормальный генотип. Риск возникновения заболевания у нее исключен. Сын унаследовал от матери мутантный аллель, при чем произошло уменьшение величины экспансии на два повтора до 43, что, по данным литературы, характерно для материнской передачи мутантного аллеля [2, 5, 6]. Результаты анализа образцов ДНК данной семьи представлены на рис. 2.

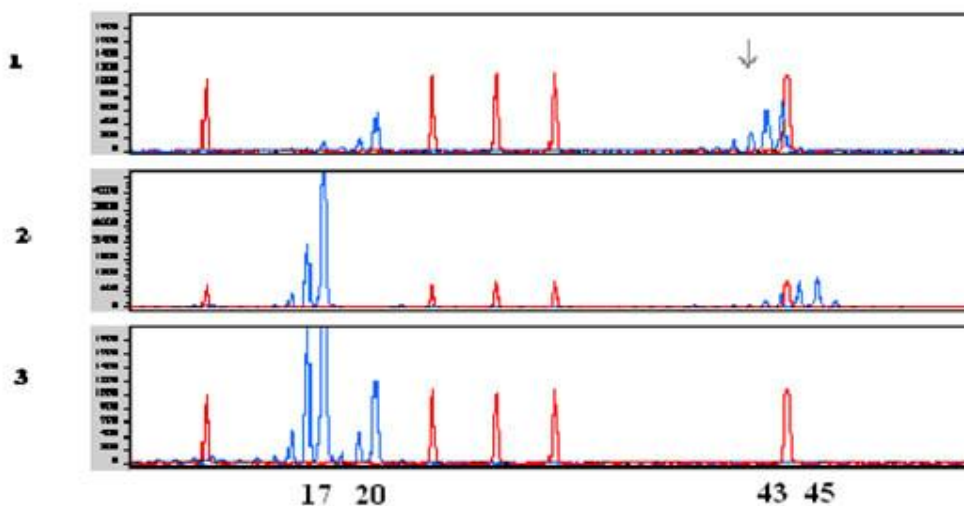


Рис. 2 Результаты капиллярного электрофореза образцов ДНК семьи с хореей Гентингтона. Стрелкой показаны мутантные аллели. 1 – сын пробанда (аллели с 20 и 43 повторами), 2- пробанд (17 и 45 повторов), 3 – дочь пробанда (17 и 20 повтораов).

В четвертой семье мутантный аллель обнаружен у женщины с хореей Гентингтона и ее сына. У матери величина экспансии составила 45 повторов, а у сына произошло ее увеличение на 1 повтор до 46. Это явление более типично для отцовской передачи мутантного аллеля, а при материнской встречается редко.

Проведенная молекулярно-генетическая диагностика позволила не только установить генный дефект и верифицировать клинический диагноз хорей Гентингтона у пациентов но и определить генетический статус бессимптомных родственников пробандов указывающий на наличие или отсутствие у них риска развития патологии. Разработанные методы ДНК анализа экспансии тринуклеотидных СAG повторов в гене IT15 могут быть

также использованы для проведения пренатальной диагностики в семьях с хореей Гентингтона. Такая диагностика позволяет подтвердить или исключить мутацию на ранних стадиях развития плода и предоставить необходимую информацию для принятия решения относительно исхода беременности.

Выводы:

Впервые в Республике Беларусь проведено изучение молекулярно-генетической природы хорей Гентингтона. Исследованы тринуклеотидные CAG повторы в гене IT15, увеличение количества которых выше нормы (экспансия) является причиной развития заболевания. Определены наиболее часто встречающиеся аллели гена как в нормальных, так и в мутантных хромосомах.

Выполнено молекулярно-генетическое обследование 41 пациента (36 пробандов и 5 членов их семей). Экспансия в гене IT15 выявлена, и клинический диагноз подтвержден в 31 случае. В четырех семьях проведено обследование родственников, не имеющих клинических проявлений, и определен их генетический статус.

Литература

1. Иллариошин, С. Н. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование в неврологии / С. Н. Иллариошин, И. А. Иванова-Смоленская, Е. Д. Маркова. М.: МИА, 2004.
2. Ключников, С. А. Диагностика хорей Гентингтона на доклинической стадии и при атипичных вариантах заболевания: автореф. дис. ... канд. мед. наук:14.00.13 / С. А. Ключников; НИИ Неврологии РАМН, 1998. 28 с.
3. Хидиятова, И. М. Эпидемиология и молекулярно-генетические основы наследственных заболеваний нервной системы в Республике Башкортостан: автореф. дис. на соискание уч. степ. д-ра б. наук / И. М. Хидиятова. Уфа, 2008.
4. Davies, K. E. Human genetic diseases: a practical approach / K. E. Davies // Oxford: IRL press. 1986. P. 56.
5. Haigh, B. Huntington disease / B. Haigh [et al.] // J. Clin. Exp. Neuropsychol, 2005: 9:147–154.
6. Moreno, G. E. Huntington Chorea / G. E. Moreno // Cuban J. of Hum. Genet., 2001: 305–311.
7. Saleem, Q. Molecular analysis of Huntington disease and linked polymorphism in the Indian population / Q. Saleem [et al.] // Acta Neurol Scand 2003: 281–286.
8. Squitieri, F. Juvenile Huntington's disease / Squitieri F. // Mech. Of Ageing and Develop. 2006: 208–212.
9. Raskin, S. Huntington disease. DNA Analysis in Brazilian population / S. Raskin [et al.] // Arq. Neuro-Psiquiatr. 2000. Vol. 58, n.