

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ  
УДК 575.599.9

**ПОИСК ЭКСПАНСИИ CAG-ПОВТОРОВ В ЭКСПРЕССИРУЮЩИХСЯ В МОЗГУ  
ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯХ ДНК ПРИ ПСИХИЧЕСКИХ И  
НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ**

**И.В.ОВЧИННИКОВ, Э.А.БРАГА, М.Г.АКСЕНОВА, Е.Б.ДРУЗИНА,  
О.И.ОВЧИННИКОВА, С.Н.ИЛЛАРИОШКИН, В.Г.КАЛЕДА, Е.Д.МАРКОВА,  
И.А.ИВАНОВА-СМОЛЕНСКАЯ**

Научный центр психического здоровья РАМН; Государственный научный центр РФ "ГосНИИ генетика";  
НИИ неврологии РАМН, Москва.  
Москва, Загородное шоссе, 2/2; Москва, Дорожный проезд, 1

Динамические мутации в виде экспансии тринуклеотидных повторов — новый тип мутаций в геноме человека. Экспансия CAG-повторов в кодирующих областях генов является молекулярно-генетической основой нескольких заболеваний нервной системы. Из базы данных GenBank были выбраны восемь последовательностей ДНК с CAG-повторами, экспрессирующимися в тканях мозга человека. Поиск экспансии CAG-повторов был проведен для больных с шизофренией и эссенциальным тремором. Экспансия CAG-повторов в исследованных локусах не обнаружена и размер аллелей с CAG-повторами сходен у пациентов и здоровых контрольных индивидов. В локусе HS0073 выявлен полиморфизм длин аллелей с CAG-повторами и для больных шизофренией показан статистически достоверный избыток гомозигот.

**Ключевые слова:** CAG повторы, шизофрения, эссенциальный тремор.

**Введение.** В последние годы найден новый тип мутаций в геноме человека, который получил название динамических мутаций. Они характеризуются экспансией или удлинением трактов тринуклеотидных повторов. Экспансия тринуклеотидных повторов является молекулярно-генетической основой по крайней мере восьми заболеваний. Динамические мутации можно разделить на три класса:

- 1) длинные экспансии CGG/CCG-повторов в 5' нетранслируемых областях генов, приводящие их к потере функций (синдром ломкой X-хромосомы);
- 2) длинные экспансии CTG/CAG-повторов в 3' нетранслируемых областях генов, приводящие к приобретению геном новой патологической функции (миотоническая дистрофия);
- 3) короткие экспансии CAG-повторов в транскрибируемых областях генов, приводящие к изменению сборки или активности белковых субъединиц.

Последний класс динамических мутаций лежит в основе по крайней мере пяти нейродегенеративных заболеваний (табл. 1):

— хорея Гентингтона (ХГ) [1];

- спинальная и бульбарная амиотрофия Кеннеди (СБАК) [2];
- спиноцеребеллярная атаксия 1-го типа (СЦА1) [3];
- дентаторубро-паллидолюисова атрофия (ДРПЛА) [4];
- спиноцеребеллярная атаксия 3-го (СЦА3) типа или болезнь Мачадо-Джозефа [5].

Таблица 1

Заболевания, вызываемые экспансией CAG-повторов в транскрибируемых областях генов

Заболевание	Ген	Хромосомная локализация	Число CAG-повторов	
			норма	патология
ХГ	IT15	4p16.3	11-34	42-121
СБА	андрогеновый рецептор	Xq12-21	15-31	40-62
СБАК		6p23-24	19-36	43-81
ДРПЛА		12p	7-23	49-75
СЦА3		14q32.1	13-36	68-79

Известны два подхода для идентификации генов, которые содержат тринуклеотидные повторы внутри транскриптов. При первом проводится гибридизация различных кДНК-библиотек с олигонуклеотидом, содержащим tandemно повторяющуюся тринуклеотидную последовательность (например (CAG)<sub>5-10</sub>).

Другой подход состоит в поиске генов или последовательностей, содержащих такой повтор, в существующих генетических базах данных. При секвенировании библиотек кДНК человека, полученных из мРНК, ранее были идентифицированы 36 клонов, содержащих CAG-повторы. Из них наиболее часто клоны с CAG-повторами (всего — 26) отмечены в кДНК из мозговой ткани плода человека. Всего было идентифицировано 12 генов, содержащих в экзонах CAG-повторы с восемью и более повторяющимися единицами [6].

Последовательности, содержащие CAG-повторы, наиболее богато представлены среди генов, экспрессирующихся в тканях мозга, и относительно редки в других тканях человека. В связи с этим, целью настоящего исследования является поиск экспансии таких повторов, выбранных из базы данных GenBank, в которых можно предполагать достаточно высокую вероятность открытия динамических мутаций или ассоциации полиморфизма длин аллелей с психоневрологическими заболеваниями.

**Методика.** Для поиска экспансии CAG-повторов выбраны следующие образцы: 1) кровь здоровых случайных контрольных индивидов (38 образцов); 2) ткани мозга больных шизофренией (16 образцов); 3) кровь больных шизофренией (11 образцов); 4) кровь больных эссенциальным тремором (5 образцов); 5) кровь больных хореей Гентингтона (2 образца). Диагностика шизофрении проведена в соответствии с критериями МКБ-10 (ICD-10), а для пациентов, у которых отбирали кровь, — также по системе, принятой в НИИ клинической психиатрии НЦПЗ РАМН. Все больные с эссенциальным тремором и хореей Гентингтона были обследованы стационарно и диагноз поставлен по критериям, принятым в отделении нейрогенетики НИИ неврологии РАМН.

ДНК выделяли экстракцией фенол/хлороформом и осаждением этиловым спиртом [7]. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на амплификаторе РНС-2 фирмы Techne. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 67 mM трис-HCl, pH 8,8; 16,6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01%-ный твин-20, 0,15 мг/мл БСА, по 0,25 mM каждого из четырех dNTP, по 10 pM каждого праймера, 3 ед. термостабильной ДНК-полимеразы ("Биотех", Москва) и 50-100 нг геномной ДНК. ПЦР проводили при температурах денатурации +94°C (1 мин) и полимеризации +72°C (1 мин) со следующими температурами отжига праймеров: +52°C — локус HS0073, +54°C — локус HS6942, +57°C — локус HSAAADDO, +59°C — локусы HSXT02676, TO8872, TO8930, +63°C — локус TO8600, +65°C — локус HS4183. Разделение фрагментов ДНК осуществляли в ультратонком ПААГ (12% Т, 5% С, толщина — 400 мкм), содержащем 7% глицерина, в 1хTBE буфере. После электрофореза в ПААГ помещали в 10%-ный этанол на 10 мин, окисляли в 1%-ной азотной кислоте в течение 5 мин и промывали дистиллированной водой. Затем окрашивали гель в 0,012 М растворе нитрата серебра в течение 20 мин, сливали раствор и промывали водой. Восстановление проводили в

растворе, содержащем 0,28 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и 0,019%-ный формальдегид, и когда желательная интенсивность окрашивания была достигнута, останавливали процесс восстановления промывкой 10%-ным раствором ледяной уксусной кислоты. После проявления гель высушивали под вакуумом.

**Результаты и обсуждение.** Из базы данных GenBank были выбраны экспрессирующиеся в тканях мозга человека последовательности ДНК, содержащие CAG-повторы с числом повторяющихся единиц более шести. Эти локусы являлись потенциальными кандидатами для поиска экспансии CAG-повторов и полиморфизма длин аллелей. Всего для изучения было выбрано восемь последовательностей: HSXT02676, HS6942, HSAADDDO, HS0073, HS4183, TO8600, TO8872, TO8930. Кроме последовательности SAAADDO, их принадлежность к какому-либо гену и хромосомная локализация неизвестны.

Анализ полиморфизма выбранных последовательностей был проведен у больных шизофренией и эссенциальным тремором. Характер генетической передачи этих заболеваний связан с наличием антиципации (уменьшение возраста начала болезни и утяжеление клинической картины в последующих поколениях) и неполной пенетрантности (наследование гена-кандидата, не всегда приводящее к развитию заболевания), которые позволяют предполагать наличие в генах-кандидатах экспансии CAG-повторов. Выбор пациентов с хореей Гентингтона объясняется наличием экспансии CAG-повторов в гене IT-15, которая является непосредственной молекулярно-генетической основой этого заболевания.

Тринуклеотидные повторы, расположенные в транскрибируемых областях генов и подверженные динамическим мутациям, показывают свойство полиморфизма длин аллелей так же, как и микросателлитные повторы, расположенные в интронах. Поэтому первым этапом исследования был поиск такого полиморфизма в выбранных последовательностях методом амплификации ДНК на основе ПЦР. К уникальным последовательностям ДНК, окружающим CAG-повторы, были синтезированы праймеры (табл. 2).

Праймеры для амплификации CAG-повторов

Таблица 2

Локус	Праймер 5'→3'	Длина фрагмента, п.н.
HSXT2676	GGCGATTAGGGGTTGTCCGT ATCCTACGATGTGCTGCTGC	310
HS6942	CAAAAGTGGCAGATGCAGAA CCTTTATTGCATCCATCCCA	329
HSAADDDO	TAGTTCATGGTTGCTTGAGGT GGAGCCATCCTCTTGT	150
HS0073	CTCTCCTGAAAGCTTCTCCC GGCTGGAGCCTTTNACT	144
HS4183	GCCGCGTCTCTCCCAAGT AGGGGTGGTGGCAGCAGCAG	281
TO8600	GAACCCGCTCCAGACAGAC GATACTGGTGCTTCTGCAATT	214
TO8872	TCTGAACAGGCCTCGC GGCTCCTCCCGTGGCTA	206
TO8930	AGGAGCACTACAGCAGCCT TAGATGAAGATGTTGCAGCCA	181

Амплификация CAG-повторов в выбранных последовательностях показала, что в 7 из 8 локусов не обнаружен полиморфизм длин аллелей. В локусе HS0073 найден такой полиморфизм с числом аллелей равным шести. При исследовании различных групп образцов отмечен избыток гомозигот в мозге и крови больных шизофренией. Гомозиготность у здоровых контрольных индивидов составила 0,290, тогда как в мозговой ткани больных шизофренией — 0,75, в крови больных шизофренией — 0,636 и в целом в группе больных шизофренией — 0,703 (табл. 3). Из общего количества выявленных гомозигот (32) подавляющее большинство состоит из аллелей в 147 п.н. (мозговая ткань больных шизофренией — 11, кровь больных шизофренией — 7, кровь больных эссенциальным тремором — 1,



норма — 9). Наблюдаемые и ожидаемые значения [8] гомозиготности локуса HS0073 представлены в табл. 4. Полученные данные позволяют сделать вывод о наличии статистически достоверного избытка гомозигот в локусе HS0073 у больных шизофренией по сравнению с группой здоровых контрольных индивидов ( $\chi^2 = 6,23$ ;  $p < 0,05$ ).

Аллельный полиморфизм локуса HS0073 в исследованных образцах

Таблица 3

Группа пациентов	Гетерозиготы	Гомозиготы	Аллели					
			138	141	144	147	150	153
Шизофрения (мозг)	4	12	1	3	2	24	2	0
Шизофрения (кровь)	4	7	0	2	2	17	1	0
Тремор	3	2	0	2	1	5	2	0
Хорея Г.	2	0	0	0	2	2	0	0
Норма	27	11	3	11	16	35	9	2

Наблюдаемая и ожидаемая гомозиготность локуса HS0073 в различных группах пациентов

Таблица 4

Группа пациентов	Гомозиготность		$\chi^2$	P
	Наблюдаемая	Ожидаемая		
Шизофрения (мозг)	0,750	0,568±0,035	0,924	>0,05
Шизофрения (кровь)	0,636	0,597±0,054	0,024	>0,05
Шизофрения (мозг+кровь)	0,703	0,587±0,022	0,604	>0,05
Норма	0,290	0,285±0,008	0,004	>0,05

Экспансия CAG-повторов в исследованных локусах не обнаружена ни в группе больных шизофренией, ни в группе больных эссенциальным синдромом. В локусе HS0073 не найдены длинные аллели, размер которых значительно превышает 153 п.н., и интервал размеров аллелей при этих заболеваниях совпадает с интервалом размеров аллелей у здоровых контрольных индивидов. Отсутствие положительного результата может быть обусловлено несколькими причинами: 1) данный тип динамических мутаций может отсутствовать; 2) может существовать экспансия других микросателлитных повторов; 3) аллели с экспансией CAG-повторов в исследованных последовательностях так редки, что они не были выявлены в типированных образцах, т.к. исследованные выборки больных и здоровых индивидов невелики. Один из потенциально полезных аспектов исследования не связан напрямую с поиском экспансии. В случае хромосомной локализации эти локусы могут быть сцеплены с генами, у которых известны функции, и таким образом полиморфные локусы будут использованы при анализе ассоциаций и генетического сцепления.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант N 95-04-12170) и ГНТП "Геном человека".

#### ЛИТЕРАТУРА

- 1 Huntington's Disease Collaborative Research Group // Cell. — 1993. — Vol. 72. — P. 971-983.
- 2 La Spada A.R., Wilson E.M., Lubahn D.B. et al. // Nature. — 1991. — Vol. 352. — P. 77-79.
- 3 Orr H.T., Chung M., Banfi S. et al. // Nature Genetics. — 1993. — Vol. 4. — P. 221-226.
- 4 Koide R., Ikeuchi T., Onodera O. et al. // Nature Genetics. — 1994. — Vol. 6. — P. 9-13.
- 5 Kawaguchi Y., Okamoto T., Taniwaki M. et al. // Nature Genetics. — 1994. — Vol. 8. — P. 221-228.
- 6 Riggins G.J., Lokey L.K., Chastain J.L. et al. // Nature Genetics. — 1992. — Vol. 2. — P. 186-191.
- 7 Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. // Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Lab., 1982, P. 545.
- 8 Nei M. // Genetics. — 1978. — Vol. 89. — P. 583-590.

#### SEARCH OF CAG REPEAT EXPANSION IN DNA SEQUENCES EXPRESSED IN THE BRAIN FOR PHYSICAL AND NEUROLOGICAL DISORDERS

I.V.Ovchinnikov, E.A.Braga, M.G.Aksenova, E.B.Druzina, O.I.Ovchinnikova, S.N.Illarioshkin, V.G.Kaleda, E.D.Markova, I.A.Ivanova-Smolenskaya

Mental Health Research Center, Russian Academy of Medical Sciences; State Research Center "NII genetika"; Institute of Neurology, Russian Academy of Medical Sciences; Moscow

Dynamic mutations due to trinucleotide repeat expansion are a new class of human genome mutations. CAG repeat expansion in the coding region of associated genes is the molecular genetic basis of the several diseases of nervous system. Eight DNA sequences with CAG repeats expressed in human brain were chosen from the GenBank database. The search of CAG expansion was carried out for patients with schizophrenia (brain and blood) and essential tremor. CAG repeat expansion has not been found for the loci. The distribution of allelic sizes is similar in the patients and control samples. Locus HS0073 has shown the polymorphism of the length for CAG repeat alleles. Statistically reliable excess of the homozygotes has been found for schizophrenic patients.

Key words: CAG repeat expansion, schizophrenia, essential tremor.