

УДК 577.213.3

Н.В. ГРИЩЕНКО<sup>1,2</sup>, А.М. БИЧКОВА<sup>2</sup>, Н.А. ПІЧКУР<sup>2</sup>,  
Г.В. СКИБАН<sup>2</sup>, В.В. ДМИТРЕНКО<sup>1</sup>, Л.А. ЛІВШИЦЬ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ  
<sup>2</sup> Науковий центр радіаційної медицини АМН України, Київ

## ДОСЛІДЖЕННЯ ДУПЛІКАЦІЇ ХРОМОСОМНОЇ ДІЛЯНКИ 17p11.2-12 У ХВОРИХ ІЗ СПАДКОВОЮ МОТОСЕНСОРНОЮ НЕВРОПАТИЄЮ ТИПУ 1А



Хвороба Шарко-Марі-Тус (ШМТ) є одним з найбільш розповсюджених спадкових захворювань, частота якого складає 1 : 2500. ШМТ — це гетерогенна група захворювань, які характеризуються хронічною невропатією рухових і чутливих нервів. В роботі представлено результати детекції дуплікації розміром 1,5 м.п.н. в хромосомній ділянці 17p11.2-12 у хворих із аутосомно-домінантною ШМТ1 (ШМТ1A) та членів їх родин з використанням аналізу двох поліморфних мікросателітних локусів — 17S921 та 17S1358, які містять (CA)<sub>n</sub>-повтори і локалізовані на ділянці дуплікації. ШМТ1A-дуплікація була ідентифікована в трох з п'яти сім'ї з аутосомно-домінантною ШМТ1. Отримані дані свідчать про те, що аналіз ШМТ1A-дуплікації може бути використаний для ранньої диференційної діагностики ШМТ, включаючи пренатальну, та генетичного консультування в сім'ях високого ризику даного захворювання.

© Н.В. ГРИЩЕНКО, А.М. БИЧКОВА, Н.А. ПІЧКУР,  
Г.В. СКИБАН, В.В. ДМИТРЕНКО, Л.А. ЛІВШИЦЬ, 2003

**Вступ.** Спадкова мотосенсорна невропатія, або хвороба Шарко-Марі-Тус (ШМТ), — це гетерогенна група захворювань, при яких уражуються периферичні нерви. В результаті цього розвивається симетрична, хронічна, прогресуюча дистальна слабкість та атрофія дистальних м'язів зі зменшенням або відсутністю сухожильних рефлексів та утратою чутливості кінцівок [1]. ШМТ — це найрозповсюженніше спадкове неврологічне захворювання, частота якого варіє в різних популяціях світу, але в середньому складає 1 : 2500 [2, 3]. За клінічними даними, які визначаються із застосуванням критерію швидкості провідності нервових імпульсів (NCV — nerve conduction velocity), виділяють два основних типи — ШМТ1 та ШМТ2. Зазвичай ШМТ1 розвивається в результаті пошкодження мієліну, що на гістологічних препаратах виглядає як сегментарна деміелінізація [1]. Відомо, що первинною мішенню ураження при ШМТ2 є аксони [2]. ШМТ2 характеризується більш м'якими клінічними проявами. ШМТ1 часто називають «деміеліновою невропатією», а ШМТ2 — «аксонопатією».

За типом успадкування виділяють аутосомно-домінантну, аутосомно-рецесивну та Х-зчеплену форми ШМТ. На сьогодні вже відомо близько 20 локусів, які зчеплені з різними формами ШМТ та споріднених невропатій [4], але пошук нових локусів триває, і існує велика імовірність, що цей список буде поповнений.

Найбільш розповсюжденим є ШМТ1, для якого вже картовано три гени: для аутосомно-домінантного типу ШМТ1A — ген PMP22 (peripheral myelin protein 22) в хромосомній ділянці 17p11.2 [5–7]; для аутосомно-домінантного типу ШМТ1B — ген MPZ/P<sub>0</sub> (myelin protein zero) в хромосомній ділянці 1q22-23 [8]; для Х-зчепленого типу ШМТ1Х — ген Cx32 (connexin 32) в хромосомній ділянці Xq13 [9]. Отримано також нові відомості про зв'язок мутацій в гені EGR2 (early growth response) з розвитком ШМТ1 [10], але ці дані потребують уточнення.

Приблизно 3/4 пацієнтів з ШМТ1 належать до ШМТ1A. Для цієї підгрупи встановлено найбільш часте генетичне ушкодження (мажорна мутація) — дуплікація нуклеотидної послідовності розміром 1,5 м.п.н. в ділянці 17p11.2-12, яка виникає в результаті нерівного кросинговеру між двома гомологічними повторюваними елементами, що фланкують дану

ділянку [11]. Ця мутація зустрічається у 50–70 % хворих на ШМТ1А [5]. Ген PMP22 знаходиться всередині цієї ділянки. Встановлено, що делеції, інсерції, точкові мутації в цьому гені теж призводять до розвитку ШМТ1А [12, 13].

Метою даної роботи була ідентифікація дуплікації нуклеотидної послідовності розміром 1,5 м.п.н. на хромосомній ділянці 17p11.2-12 у хворих з аутосомно-домінантним типом успадкування (ШМТ, тип 1А) та членів їх родин. Для цього проводився аналіз різних алельних варіантів геномної послідовності поліморфних локусів 17S921 та 17S1358, локалізованих в районі дуплікації.

**Матеріали та методи.** Матеріалом для дослідження були зразки периферичної крові хворих на різні типи нейромотосенсорної невропатії (хвороба Шарко-Марі-Тус) та членів їх сімей з різних регіонів України.

ДНК із зразків крові виділяли з використанням методів, які були описані раніше [14, 15].

Послідовності олігонуклеотидних праймерів для ампліфікації *in vitro* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції гомологічні послідовностям поліморфних локусів 17S1358 та 17S921 [16]. ПЛР проводили в автоматичному режимі на термоциклері «DNA Thermal Cycler 480» фірми «Perkin Elmer» за схемою, яка наведена в таблиці.

Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації проводили в 12%-ному неденатуруючому поліакриламідному гелі (співвідношення акриламіду та бісакриламіду 29 : 1, в 0,5 × ТВЕ при 200 В впродовж 20 год) з наступною візуалізацією за допомогою забарвлення бромістим етидіумом і сканування на УФ-транслюмінаторі.

Оскільки обидва досліджуваних локуси є поліморфними за кількістю СА-динуклеотидів,

їх алельні варіанти можуть відрізнятися один від одного лише на декілька СА-повторів. Тому для встановлення точних розмірів продуктів ампліфікації конкретних алелів проводили їх аналіз за допомогою автоматичного лазерного флуориметра ALF-express («Amersham Pharmacia Biotech»). Для цього один з кожної пари праймерів був помічений флуоресцентним барвником Су5. Аліквоту продукту ПЛР (0,25–0,5 мкл) змішували з 3 мкл розчину для нанесення на гель, що містив: 95%-ний формамід, 5 мг/мл декстрана синього, два внутрішніх маркери визначеного розміру. Після цього суміш денатурували протягом 3 хв при 95 °C і швидко охолоджували на льоду, після чого наносили на денатуруючий 8%-ний поліакриламідний ALF-гель (співвідношення акриламід : бісакриламід = 24 : 1), що містив 0,5 × ТВЕ і 7 М сечовину. Електрофорез проводили при температурі 45 °C, при 1000 В, 50 мА, 30 Вт протягом 90 хв. Після сканування ALF-гелю флуорограму продуктів ПЛР обробляли з використанням комп'ютерної програми FM2.1 (Fragment Manager Software V2.1, Pharmacia).

**Результати дослідження та їх обговорення.** Нами було проведено клініко-генеалогічний аналіз 28 неспоріднених сімей та отримано 88 зразків ДНК хворих та членів їх родин з аутосомно-домінантним, аутосомно-рецесивним та Х-зчепленим типом успадкування хвороби Шарко-Марі-Тус з різних регіонів України.

Для дослідження дуплікації 1,5 м.п.н. області 17p11.2-12 (яка зустрічається у 50–70 % хворих на ШМТ1А) нами було відібрано лише ті сім'ї, в яких було встановлено аутосомно-домінантний тип успадкування (5 сімей — 17 зразків ДНК).

Для ідентифікації цієї дуплікації нами був використаний підхід, раніше описаний Мерсіяновою та співавт. [16], суть якого полягає в детекції алельних варіантів шести мікросателітних поліморфних локусів з ділянки, яка дуплікується. В даному дослідженні для реєстрації дуплікації нами були відібрані локуси 17S921 та 17S1358, які за літературними даними характеризуються високим рівнем гетерозиготності [16]. У випадку дуплікації у хворого мають бути присутні по три алеля для кожного з цих маркерів: подвійний набір алелів на одній хромосомі та один алель на іншій. Тому

#### Схема полімеразної ланцюгової реакції

| Локус   | Етап і кількість шиклів | Денатурація  | Відпаливання праймерів | Синтез       |
|---------|-------------------------|--------------|------------------------|--------------|
| 17S1358 | I                       | 94 °C – 2 хв | 58 °C – 45 с           | 72 °C – 45 с |
|         | II                      | 94 °C – 40 с | 57 °C – 35 с           | 72 °C – 40 с |
| 17S921  | I                       | 94 °C – 2 хв | 56 °C – 45 с           | 72 °C – 45 с |
|         | II                      | 94 °C – 40 с | 55 °C – 35 с           | 72 °C – 40 с |

## Дослідження дуплікації хромосомної ділянки 17p11.2-12 у хворих...

ідентифікація ШМТ1А-дуплікації за допомогою цих маркерів може бути інформативною лише у випадках, коли реєструються або три алеля по досліджуваному маркеру (у випадку, якщо всі три алеля мають різні розміри), або два алеля різної інтенсивності (якщо два з трьох алелей мають одинаковий розмір, то смуга, яка відповідає подвійній дозі алеля, буде мати більшу інтенсивність) (рис. 1).

Як неінформативні розглядалися наступні ситуації (рис. 1): 1) якщо індивід був гомозиготним за досліджуваним локусом (три алеля однакового розміру) — таку гомозиготу неможливо відрізити від здорової гомозиготи з двома алелями; 2) якщо спостерігалась більша інтенсивність коротшого алеля при різниці між алелями в один СА-повтор (2 п.н.), оскільки навіть при відсутності ШМТ1А-дуплікації для продуктів ПЛР в послідовності мікросателітних локусів характерним є те, що менш протягний алель, який відрізняється від іншого лише на один СА-повтор, завжди має більшу інтенсивність внаслідок ефекту «зісковування ДНК-полімерази».

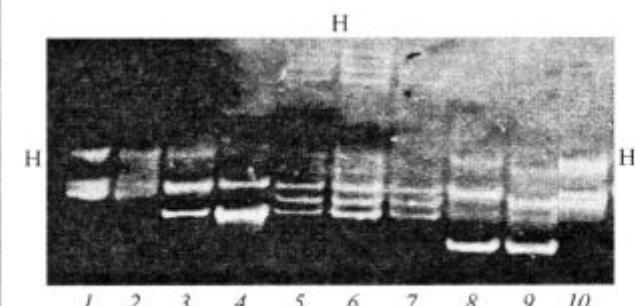
Таким чином, ситуації 1–3 (рис. 1) є інформативними, тобто у таких хворих за результатами аналізу мікросателітних локусів можна ідентифікувати дуплікацію, а у випадках 4 та 5 аналіз мікросателітних локусів є неінформативним.

Для всіх відібраних нами сімей було проведено аналіз ШМТ1А-дуплікації з використанням мікросателітних локусів 17S921 та 17S1358.

З електрофореграми продуктів ПЛР послідовності локуса 17S921 (рис. 2) можна побачити, що сім'я Ж1 інформативна за даним локусом, оскільки в цій сім'ї бабуся має два алеля різної інтенсивності, а її дочка та дві онучки мають по три різних алеля локуса 17S921. Таким чином, в сім'ї Ж1 було ідентифіковано дуплікацію в досліджуваному локусі. В двох інших сім'ях ми бачимо ситуацію, при якій алелі, що відрізняються на 2 п.н., недостатньо чітко розділяються (сім'я Г1: батько та пробанд та сім'я П1: маті). Крім того, гетеродуплекси, які утворюються при електрофорезі в ПААГ в неденатуруючих умовах, заважають коректній інтерпретації результатів в сім'ї Г1 (у батька, який є хворим, можна помилково ідентифікувати наявність трьох алелів). Разом з тим в сім'ї П1 за-



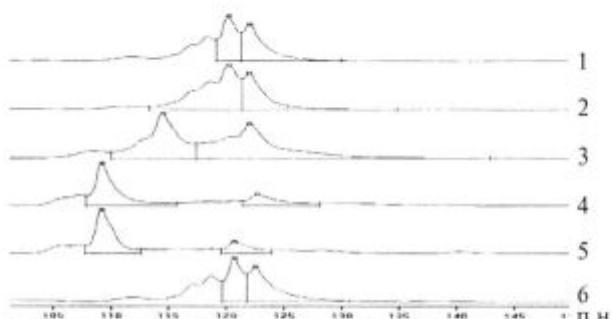
**Рис. 1.** Схематичне зображення електрофореграмами можливих варіантів розподілу алелів будь-якого мікросателітного маркерного локуса з ділянки ШМТ1А-дуплікації: 1 — хворий з трьома різними алелями мікросателітного локуса; 2 — хворий з двома різними алелями мікросателітного локуса різної інтенсивності (різниця 2 п.н.), довший алель має більшу інтенсивність; 3 — хворий з двома різними алелями мікросателітного локуса різної інтенсивності (різниця > 2 п.н.); 4 — хворий, який є гомозиготою за даним локусом; 5 — хворий з двома різними алелями мікросателітного локуса різної інтенсивності (різниця 2 п.н.), алель з меншою кількістю повторів має більшу інтенсивність



**Рис. 2.** Електрофореграма продуктів ПЛР локуса 17S921. Сім'я Г1: 1 — батько; 2 — пробанд; 3 — маті. Сім'я Ж1: 4 — бабуся по матері; 5 — маті; 6 — пробанд; 7 — сібс. Сім'я П1: 8 — батько; 9 — пробанд; 10 — маті. Н — гетеродуплекси

цих же умов аналізу неможливо оцінити інтенсивність різних алелів у хворих (батько та пробанд). Тому для встановлення точних розмірів та кількісної оцінки продуктів ампіліфікації конкретних алелів ми проводили їх аналіз за допомогою автоматичного лазерного флуориметра ALF-express, оскільки дана система дозволяє провести кількісну оцінку ПЛР-продуктів кожного з алелей на основі комп'ютерної обробки. Використання короткого денатуруючого ПААГ дозволило запобігти появлі гетеродуплексів.

З наведеної флуорограми (рис. 3) можна визначити, що у батька з родини Г1 наявні лише два алеля однакової інтенсивності, а не три, як



**Рис. 3.** Флуорограми продуктів ПЛР локуса 17S921. Сім'я ГІ: 1 — батько; 2 — пробанд; 3 — мати. Сім'я ПІ: 4 — батько; 5 — пробанд; 6 мати

ми бачили на електрофорограмі (рис. 2). Таким чином, в сім'ї ГІ нами не ідентифікована дуплікація. В сім'ї ПІ за допомогою комп'ютерної обробки флуорограми продуктів ПЛР вдалось встановити, що у хворих батька та дочки наявні по два алеля локуса 17S921 різної інтенсивності (інтенсивність відрізняється понад в два рази), що свідчить на користь дуплікації.

Таким чином, дуплікація ділянки 17p11.2-12 була встановлена у 9 хворих з трьох неспоріднених сімей з ШМТ1А. В одній родині було виявлено три алеля локуса 17S921 у матері та двох дітей, а у бабусі — два алеля різної інтенсивності. Цікаво зазначити, що в цій родині тяжкість клінічних проявів захворювання варіювала в поколіннях від легкої ШМТ з пізньою маніфестацією у бабусі до тяжкої форми з ранньою маніфестацією у її онучок. Подібна клінічна картина була описана для родини з ШМТ2 [17]. Таким чином, можна зробити висновок про наявність генів-модифікаторів клінічного фенотипу при ШМТ. У дитини з іншої родини було виявлено три алеля локуса 17S921, в іншому випадку у батька та дитини, хворих на ШМТ, виявлено два алеля локуса 17S921, але інтенсивність одного з них була приблизно в два рази більшою, ніж іншого. Результати аналізу локуса 17S1358 підтвердили наявність дуплікації в двох з трьох родин. У хворих з інших двох родин, в яких не було виявлено дуплікації, нами буде проводитись пошук генетичних ушкоджень інших типів в ділянці 17p11.2-12. Отже, використання аналізу двох мікросателітних локусів 17S921 та 17S1358 є інформативним для реєстрації ШМТ1А-дуплікації. Крім того, дослідження двох та більше

хворих з однієї родини підвищує ефективність даного методу.

Підсумовуючи, можна зробити висновок, що запропонований підхід є перспективним для аналізу дуплікації в ділянці 17p11.2-12 і може бути використаний для ДНК-діагностики, включаючи пренатальну, в родинах хворих з домінантним типом ШМТ. Така діагностика може стати ефективним засобом профілактики та підґрунттям для розробки ефективних методів запобіжного лікування цього тяжкого спадкового захворювання.

**SUMMARY.** Charcot-Marie-Tooth neuropathy (CMT) is one of the most common hereditary disorders, affecting 1:2500 individuals. CMT is a heterogeneous group of disorders characterized by chronic peripheral motor and sensory neuropathy. We have performed the detection of 1,5 Mb CMT1A tandem duplication in 17p11.2-12 chromosome region for autosome-dominant CMT1 patients and their relatives using the analysis of two (CA)<sub>n</sub> polymorphic microsatellite loci: 17S921 and 17S1358 localised in the duplication region. CMT1A duplication was found in three of five autosome-dominant CMT1 families. It has been shown that CMT1A duplication analysis is important for early differential diagnosis of CMT including prenatal diagnosis and genetic consulting in high risk families.

**РЕЗЮМЕ.** Болезнь Шарко-Мари-Тус (ШМТ) является одним из наиболее распространенных наследственных заболеваний, частота которого составляет 1:2500. ШМТ — это гетерогенная группа заболеваний, характеризующихся хронической невропатией двигательных и чувствительных нервов. В работе представлены результаты детекции дупликации размером 1,5 м.п.н. в хромосомной области 17p11.2-12 у пациентов с аутосомно-доминантной ШМТ1 (ШМТ1А) и членов их семей с использованием анализа двух полиморфных микросателлитных локусов — 17S921 и 17S1358, содержащих (CA)<sub>n</sub>-повторы и локализованных на участке дупликации. ШМТ1А-дупликация была идентифицирована в трех из пяти семей с аутосомно-доминантной ШМТ1. Полученные данные свидетельствуют о том, что анализ ШМТ1А-дупликации может быть использован для ранней дифференциальной диагностики ШМТ, включая пренатальную, и генетического консультирования в семьях высокого риска данного заболевания.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Dyck P.J., Chance P., Lebo R., Carney J.A. Hereditary motor and sensory neuropathies // Peripheral Neuropathy. — Philadelphia : W.B. Saunders Company, 1993. — P. 1094–1136.
2. Skre H. Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease // Clin. Genet. — 1974. — 2. — P. 98–118.

3. Emery A.E. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases — a world survey // Neuromuscul. Disord. — 1991. — 1. — P. 19–29.
4. De Jonghe P., Timmerman V., Nelis E., Martin J-J., Van Broeckhoven C. Charcot-Marie-Tooth disease and related peripheral neuropathies // J. Peripher. Nerv. Syst. — 1997. — 2 — P. 370–387.
5. Lupski J.R., Montes de Oca-Luna R., Slaugenhaupt S., Pentao L., Guzzetta V., Trask B.J., Saucedo-Cardenas O., Barker D.F., Killian J.M., Garcia C.A., Chakravarti A., Patel P.I. DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A // Cell. — 1991. — 66. — P. 219–239.
6. Patel P.I., Roa B.B., Welcher A.A., Schoener-Scott R., Trask B.J., Pentao L., Snipes G.J., Garcia C.A., Francke U., Shooter E.M., Lupski J.R., Suter U. The gene for the peripheral myelin protein PMP-22 is a candidate for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A // Nat. Genet. — 1992. — 1. — P. 159–165.
7. Roa B.B., Garcia C.A., Suter U., Kulpa D.A., Wise C.A., Mueller J., Welcher A.A., Snipes G.J., Shooter E.M., Patel P.I., Lupski J.R. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. Association with a spontaneous point mutation in the PMP22 gene // Engl. J. Med. — 1993. — 329. — P. 96–101.
8. Hayasaka K., Himoro M., Sato V. et al. Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B is associated with mutations of the myelin PO gene // Nat. Genet. — 1993. — 5. — P. 31–34.
9. Bergoffen J., Scherer S.S., Wang S. et al. Connexin mutation in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease // Science. — 1993. — 262. — P. 2039–2042.
10. Warner L.E., Mancias P., Butler I.J. et al. Mutations in the early growth response 2 (EGR2) gene are associated with hereditary myelinopathies // Nat. Genet. — 1998. — 18. — P. 382–384.
11. Reiter L.T., Murakami T., Koeuth T., Pentao L. et al. A recombination hotspot responsible for two inherited peripheral neuropathies is located near a mariner transport-like element // Nat. Genet. — 1996. — 12. — P. 288–297.
12. Nelis E., Holmberg B., Adolfsson R., Holmgren G., Van Broeckhoven C. PMP22 Thr(118)Met: recessive CMT1 mutation or polymorphism? // Nat. Genet. — 1997. — 15. — P. 13–14.
13. Roa B.B., Garcia C.A., Pentao L., Killian J.M., Trask B.J., Suter U., Snipes G.J., Ortiz-Lopez R., Shooter E.M., Patel P.I., Lupski J.R. Evidence for a recessive PMP22 point mutation in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A // Nat. Genet. — 1993. — 5. — P. 189–194.
14. Маниамис Т., Фрич Е.Е., Сэмбрук Ж. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1985. — 420 с.
15. Wehnert M., Herrmann F.H., Metzke H. et al. Erste Ergebnisse bei der genomischen Carrierdiagnostik in Risikosippen mit Haemophilie A und B in der DDR // Z. gesamte Med. — 1988. — 43, № 16. — P. 441–444.
16. Mersiyanova I.V., Ismailov S.M., Polyakov A.V. et al. Screening for mutations in the peripheral myelin genes PMP22, MPZ and Cx32 (GJB1) in Russian Charcot-Marie-Tooth neuropathy patients // Hum. Mut. — 2000. — 15. — P. 340–347.
17. Bellone E., Rodolico C., Torcano A. et al. A family with autosomal dominant mutilating neuropathy not linked to either Charcot-Marie-Tooth disease type 2B (CMT2B) or hereditary sensory neuropathy type I (HMS I) loci // Neuromus. Disord. — 2002. — 12. — P. 286–291.

Надійшла 18.04.03