

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ДНК-ДИАГНОСТИКЕ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ *DHPLC*

К.А. Моссэ, Н.И. Моссэ

ГУ РНПЦ «Мать и дитя», Минск, Беларусь

kosmosse@cosmostv.by

Моногенные болезни, число которых на сегодняшний день оценивается в 4-5 тысяч нозологий, вызываются повреждением первичной структуры ДНК в одном гене.

К частым моногенным наследственным заболеваниям относят нозологии, встречающиеся с частотой 1 на 10000 и выше, к редким - с частотой менее 1 на 100 тысяч, хотя это деление в значительной степени условно.

Количество самых распространенных наследственных заболеваний в Беларуси составляет около 30, и для их молекулярно-генетической диагностики уже разработаны и используются различные методики в зависимости от их мутационной природы. Чаще всего они основаны на применении полимеразной цепной реакции (ПЦР), рестрикции и гель-электрофореза и позволяют выявлять конкретные известные и часто встречающиеся у пациентов мутации.

В то же время количество больных, страдающих редкими заболеваниями или заболеваниями, для которых использование стандартных методов анализа отдельных мутаций является неэффективным, во много раз выше и по различным данным может составлять до 1% населения.

Мутации в определенных генах являются, во многих случаях, также первопричиной развития таких социально-значимых патологий как врожденные пороки сердца, кардиомиопатии, атеросклероз, онкологические и неврологические заболевания, болезни обмена веществ и соединительной ткани.

Для того, чтобы молекулярно-генетическая диагностика могла быть выполнена для любого пациента с предполагаемой наследственной патологией необходимо применение универсальной технологии ДНК-анализа, позволяющей выявлять большинство мутаций и полиморфизмов, являющихся причиной заболеваний или предрасположенности к ним.

На сегодняшний день в мире существуют методические подходы, которые могут быть использованы для выполнения данной задачи. Наиболее перспективным для эффективного сканирования последовательности ДНК является комплексное применение методов денатурирующей высокоэффективной жидкостной хроматографии, Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (DHPLC) и секвенирования.

DHPLC – это современный метод, позволяющий определять изменения нуклеотидной последовательности в молекулах ДНК размером от 150 до 1500 пар оснований. Принцип метода заключается в том, что двухцепочечная молекула ДНК, имеющая даже единичное ошибочное спаривание оснований имеет меньшее время удерживания на хроматографической колонке при температуре, достаточной для частичной денатурации образца [1].

Одним из важнейших практических применений технологии является надежное, быстрое и экономичное выявление нарушений в первичной последовательности ДНК у человека. На данный момент количество генов человека, для анализа которых применялся метод DHPLC, превысило 400 и неуклонно растет. Секвенирование тех фрагментов ДНК, в которых выявлено изменение нуклеотидной последовательности, выполняется для непосредственной идентификации мутаций или полиморфизмов.

Внедрение данной технологии началось в ГУ РНПЦ «Мать и дитя» в 2008 году. Одним из первых ее практических применений был анализ 4 экзона гена трансмембранного регуляторного белка муковисцидоза (ТРБМ) у пациентов с муковисцидозом (МВ).

В качестве биологического материала использовалась геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови пациентов с МВ, у которых одна или обе генные мутации оставались не идентифицированными.

Аmplification экзонной последовательности проводили с применением стандартной методики и праймеров [2].

Анализ продуктов ПЦР проводили методом DHPLC в жидкостном хроматографе “Varian” при следующих условиях – время разделения 8 мин., температура 53-61°C, поток 0,45 мл/мин.

Прямое секвенирование экзона выполняли с наборами ABI PRISM BIGDYE TERMINATOR V3.1 по методике производителя. Для разделения фрагментов ДНК использовали автоматический капиллярный электрофорез в генетическом анализаторе ABI PRISM 310.

Всего протестировано 26 образцов ДНК от пациентов с МВ. Анализ методом DHPLC проводили в диапазоне нагрева колонки от 53 до 61°C для подбора оптимальной температуры денатурации последовательности ДНК 4-го экзона. В двух пробах наблюдались дополнительные пики на хроматограмме, что могло быть следствием мутации в данном экзоне (рис. 1).

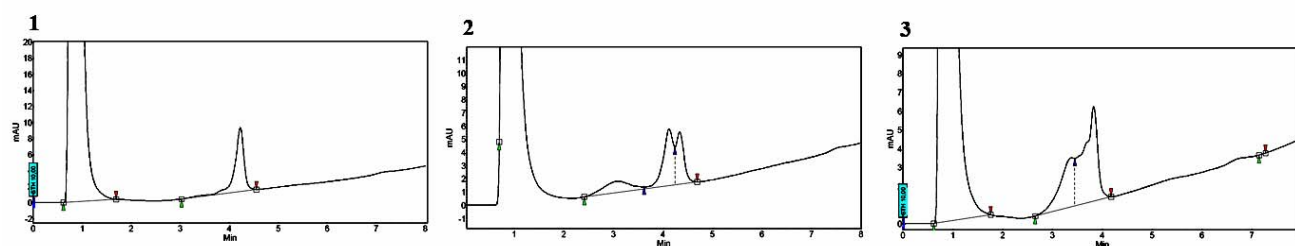


Рис. 1. DHPLC-анализ продуктов ПЦР 4-го экзона гена ТРБМ. 1– норма, 2, 3 – образцы с измененным профилем хроматограммы.

Секвенирование фрагментов в обоих случаях подтвердило наличие изменений в нуклеотидной последовательности и позволило определить генный дефект. У первого пациента обнаружена замена оснований G→A, которая была идентифицирована как миссенс мутация E92K. У второго – обнаружена делеция четырех нуклеотидов (мутация 541del4), приводящая к выпадению аминокислоты и сдвигу рамки считывания (рис. 2). Обе мутации являются очень редкими и описаны в научной литературе всего у трех пациентов [3].

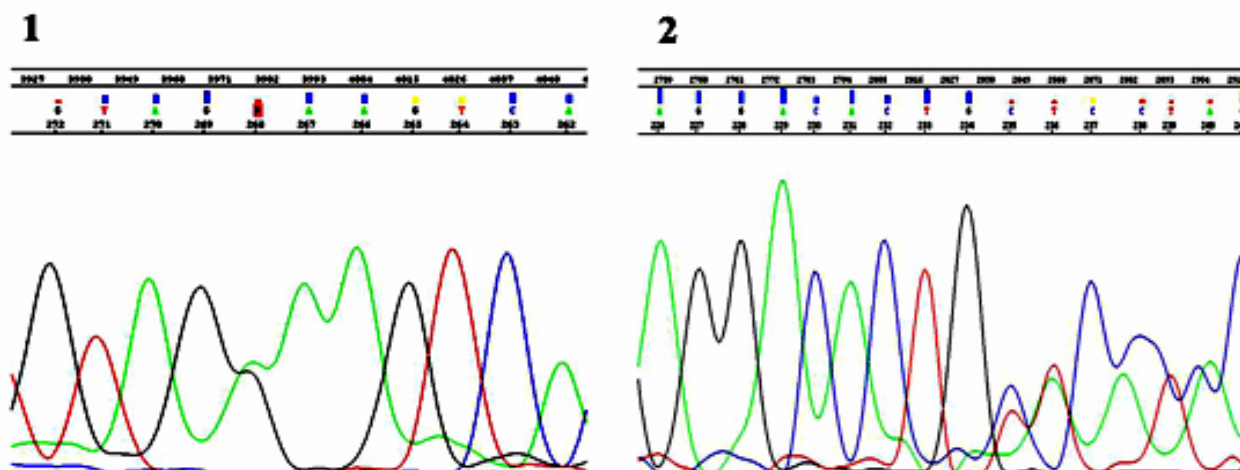


Рис. 2. Результаты секвенирования 4 экзона гена ТРБМ. 1 – мутация E92K, 2 – мутация 541del4.

Полученные результаты показывают, что технология DHPLC является быстрым, чувствительным и экономически оправданным методом выявления нарушений в первичной последовательности ДНК генов человека, что и составляет основную задачу молекулярно-генетической диагностики.

Внедрение данной технологии ДНК-анализа позволит в несколько раз увеличить количество диагностируемых наследственных заболеваний в Беларуси и выявлять до 98% всех изменений в генах, определяющих их развитие, что приведет к снижению уровня инвалидности и смертности от этих патологий за счет пренатальной диагностики, медико-генетического консультирования и ранней профилактики в семьях высокого риска.

1. W. Xiao, P. J. Oefner Denaturing high-performance liquid chromatography: a review // Hum Mutat. – 2001. – V. 17. – P. 439-474.
2. J. Zielenski, R. Rozmahel, D. Bozon, B. Kerem, Z. Grzelczak, J. R. Riordan, J. Rommens, L. C. Tsui Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene // Genomics. – 1991. – V. 10. – P. 214-228.
3. Cystic fibrosis mutation database [<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>].

ВЛИЯНИЕ АНАЛОГА НАДН НА ФОРМИРОВАНИЕ СПОНТАННЫХ И РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК, МИКРОЯДЕР И АПОПТОЗА В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ *IN VITRO*

Н.В. Никитченко, О.В. Даливеля, Р.И. Гончарова, Н.И. Рябоконт
ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», Минск, Беларусь
n.ryabokon@igc.bas-net.by

Нерепарированные или неправильно репарированные первичные повреждения ДНК увеличивают риск появления мутаций, aberrаций хромосом и микроядер, а также вероятность гибели клеток посредством небезопасного для тканей некроза или по пути программируемой клеточной смерти (апоптоза). Выбор пути реализации первичных повреждений ДНК зависит от энергетического статуса клетки и ее окислительно-восстановительного (редокс) потенциала. Основная цель представленной работы состояла в изучении дозозависимого защитного эффекта производного 1,4-дигидропиридина, аналога НАДН с высокой электронодонорной активностью, при формировании первичных повреждений ДНК, микроядер и апоптоза, возникающих спонтанно или индуцированных ионизирующей радиацией в лимфоцитах человека.

Лимфоциты были изолированы из периферической крови здоровых доноров в градиенте Histopaque, подвергнуты острому гамма-облучению в дозе 2 Гр и инкубированы в среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и различных концентраций исследуемого препарата 3,5-бис-этоксикарбонил-2,6-диметил-1,4-дигидропиридин-4-карбоксилат натрия (AV-153), синтезированного в Латвийском институте органического синтеза. При изучении влияния препарата на спонтанный уровень регистрируемых эффектов лимфоциты сразу после изоляции были инкубированы в тех же условиях и при тех же концентрациях исследуемого препарата. Анализ уровня первичных повреждений ДНК осуществлен на 3 ч инкубации по завершению эксцизионной репарации оснований ДНК с использованием метода щелочного гель-электрофореза единичных клеток (метод ДНК-комет), используемого согласно международным стандартам [1] и описанному ранее протоколу [2]. Метод ДНК-комет позволяет учитывать количественно односторонние и двусторонние разрывы ДНК, а также апуриновые-апириминовые сайты [1]. В параллельных экспериментах на 72 ч инкубации учитывали количество микроядер (МЯ) в лимфоцитах, стимулированных к делению с использованием ФГА и задержанных при помощи