

СТРУКТУРА ГЕНА LMNA, ЕГО ПРОДУКТЫ И ИХ ФУНКЦИИ. МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ И АНАЛИЗ КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ У ПАЦИЕНТОВ С ДИЛАТАЦИОННОЙ КАРДИОМИОПАТИЕЙ

Д. П. Ермакович

Компонентами ядерной ламины являются белки промежуточных филаментов V типа – ламины А и В типов. Ламины В-типа: В1 и В2 – кодируются двумя различными генами, LMNB1 и LMNB2. Ламины А-типа являются производными гена LMNA, состоящего из 12 экзонов с точкой альтернативного сплайсинга в экзоне 10 и кодирует 4 изоформы ламин: мажорные (А и С) и минорные (АΔ10 и С2) [1]. Ламины А/С состоят из короткого аминокислотного терминального глобулярного домена (NH₃), α-спирального центрального стержневого домена и глобулярного «хвостового» карбокси-терминального домена (COOH) [2].

Функции белков-ламин: регуляция формы ядра и механической стабильности, организация хроматина и регуляция экспрессии генов, регуляция клеточного цикла и дифференцировки клеток [3,4].

Известно более десятка синдромов, связанных с образованием дефектных ламин в результате мутаций гена LMNA. Одним из них является ДКМП 1А (Дилатационная Кардиомиопатия с дефектами проводимости) – заболевание миокарда, характеризующееся быстрым развитием дилатации (растяжения) камер сердца, возникновением дисфункции синусового узла с нарушением сердечного ритма и атриовентрикулярной проводимости (до полной блокады). Часто вместе с ДКМП, обусловленной мутациями гена LMNA, наблюдаются скелетно-мышечные аномалии [5]. Среди широкого спектра ДКМП, тип 1А стоит на втором месте по встречаемости, что говорит о большой доле такого типа болезни среди прочих ДКМП.

Цель работы – провести поиск мутаций в гене LMNA у пациентов с дилатационной кардиомиопатией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнялась в лаборатории нехромосомной наследственности ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси». Объектом исследования являлись пациенты с диагнозом ДКМП1А, происходившие лечение в РНПЦ «Кардиология» г. Минска. У пациентов было получено письменное разрешение на использование их биологического материала в молекулярно-генетических исследованиях. Всего было отобрано 165 пациентов. Из полученного в виде пятен крови на бумажных носителях

биологического материала была выделена ДНК фенол-хлороформным методом. После чего происходила амплификация фрагментов гена LMNA, охватывающих экзоны и прилежащие интронные области, и их прямое секвенирование (по Сэнгеру). В случае обнаружения мутации ее носительство перепроверялось альтернативными методами: SSCP-анализом, ПДРФ, анализом фрагмента при помощи NGS. Генетическое тестирование родственников 1-ой линии было применено для установления происхождения замены. Для анализа хроматограмм использовалась программа ChromasPro, для проверки на возникновение/изменение точек альтернативного сплайсинга – Human Splicing Finder V.3.0, для анализа фолдинга мутантного белка – Jpred 4 (A Protein Secondary Structure Prediction Server) [6,7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами было проанализировано 375 фрагментов гена LMNA у 165 пациентов. Из них в 70 обнаружены изменения в этом гене (таблица). Данные различия представлены 10 типами, из которых 7 полиморфных замен и 3 миссенс-мутации.

Для полиморфизмов и мутаций, представленных низкой частотой, осуществлялся углубленный анализ при помощи биоинформатических online-ресурсов. Крайне низкая распространенность аллелей в популяции может говорить о действии отбора против замены, например, в связи с заболеванием, либо о недавнем времени её образования. Так анализ замены Arg190Pro при помощи Jpred 4 показал, что эта мутация, вероятно, приводит к неправильной сборке альфа-спирального центрального домена, так как нарушает регулярность в образовании альфа-спирали по сравнению с нормальным белком. Анализ замены Leu204Leu при помощи Human Splicing Finder V.3.0 на возникновение точки альтернативного сплайсинга в месте мутации показал, что данная замена изменяет сайты для связывания таких факторов сплайсинга как ПЕ-элементы (intron-identity elements – определяют начало-конец области, подвергающейся вырезанию), PESE-октамеры (putative exonic splicing enhancer – активируют процесс вырезания последовательности), а также сайт для частицы hnRNP A1 (**h**eterogeneous **n**uclear **R**ibonucleoparticule A1), в норме ингибирующей процесс альтернативного сплайсинга.

Было показано, что все миссенс-мутации имеют происхождение de novo и ранее не встречались в их семьях. Это свидетельствует об их роли в развитии ДКМП1А. Определение редкого полиморфизма

Leu204Leu в семье пациента показало, что мать пробанда является ее носителем без проявления ДКМП. Дальнейшее изучение позволит установить роль этой замены в развитии сердечной недостаточности.

Таблица

Изменения последовательности гена LMNA у пациентов с ДКМП

Экзоны	Общее число проанализированных фрагментов гена	Количество пациентов с изменениями в LMNA	Локусы, в которых обнаружены изменения	Частота минорного аллеля	
				Исследование	1000 Genomes*
1	15	1	Полиморфизм Arg50Arg C>T rs397517894	—	0.0008
3	105	1	Миссенс-мутация Arg190Pro G>C rs267607571	0.0048	—
		5	Полиморфизм с.396+73 C>T rs11264443	0.0238	0.0751
			Полиморфизм с.396+56 G>A rs11264442	0.0238	0.0775
		3	Полиморфизм Leu204Leu G>A rs12117552	0.0149	0.0080
5		14	Полиморфизм Ala287Ala C/T rs538089	0.0857	0.1931
		2	Полиморфизм Ala287Ala C/C rs538089		
8	135	14	Полиморфизм с.1489-41 C>T rs553016	0.0667	0.1823
		2	Полиморфизм с.1489-41 T/T rs553016		
9		1	Миссенс-мутация Thr528Arg C>G rs57629361	0.0037	—
		1	Миссенс-мутация Trp520Arg T>C rs267607557	0.0037	—
10	120	23	Полиморфизм His566His C>T rs4641	0.1208	0.2202
		3	Полиморфизм His566His T/T rs4641		

*проект по секвенированию геномов тысячи человек, относящихся к разным расам и национальностям [8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У 3 пациентов с ДКМП1А были обнаружены миссенс-мутации, определяющие данное заболевание вследствие нарушения правильного фолдинга ламиновых белков. У 52 пациентов были обнаружены широко распространенные полиморфизмы, у 9 – замены, не меняющие белковую последовательность, но с определенной долей вероятности меняющие процесс альтернативного сплайсинга.

Автор выражает благодарность к.б.н, доценту, ведущему научному сотруднику Н.Г. Даниленко, к.б.н, старш.научн.сотр. Л.Н. Сивицкой за идею статьи, за консультации и помощь в ходе исследовательской работы, к.б.н, старш.научн.сотр А.М. Шимкевичу за помощь в проведении молекулярно-генетического исследования, к.м.н., ведущему научному сотруднику Т.Г. Вайханской за идею работы и предоставление материалов для исследования.

Литература

1. *Burke B., Stewart C.* Life at the edge: the nuclear envelope and human disease // *Nature reviews molecular cell biology*. 2002. Vol. 3. P. 575–585.
2. *Fatkin D., MacRae C., Sasaki T [et al.]*. Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease // *The New England Journal of Medicine*. 1999. Vol. 341, N 23. P. 1715–1723.
3. *Забирник А.С., Гудкова А.Я., Малашичева А.Б. [и др.]*. Ламины и ламинопатии: роль в самообновлении и дифференцировке стволовых клеток взрослого организма // *Бюллетень ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова*. – 2013. – № 13. – С. 77–82.
4. *Pekovic V., Hutchison C.* Adult stem cell maintenance and tissue regeneration in the ageing context: the role for A-type lamins as intrinsic modulators of ageing in adult stem cells and their niches // *Journal of Anatomy*. 2008. Vol. 213. P. 5–25.
5. *Вайханская Т.Г., Сивицкая Л.Н., Даниленко Н.Г. [и др.]*. Клинический случай смешанного фенотипа кардиомиопатии // *Материалы республиканской научно-практической конференции «Кардиомиопатии: современные методы диагностики и лечения»*. Минск, 2016. С. 17–27.
6. Интернет-адрес: <http://www.umd.be/HSF3/HSF.html>.
7. Интернет-адрес: <http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred>.
8. Интернет-адрес: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes>.