

УДК 616-056.7:616.153.922

В.В.Егоров (5 курс, каф. БФ), Ф.М.Захарова, (ВНИИЭМ РАМН)

ПОИСК МУТАЦИЙ И ПОЛИМОРФИЗМОВ В ЭКЗОНАХ 7 И 13 ГЕНА РЕЦЕПТОРА ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ ЧЕЛОВЕКА В ПОПУЛЯЦИИ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА

Целью данного исследования являлось изучение молекулярной вариабельности гена рецептора ЛНП у больных семейной гиперхолестеринемией (СГ) в популяции Санкт-Петербурга. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- дополнить коллекцию ДНК больных СГ и гиперлипидемией типа II без клинической картины СГ;
- осуществить поиск мутаций и полиморфизмов в экзонах 7 и 13 гена рецептора ЛНП в имеющемся банке геномной ДНК;
- сравнить частоты встречаемости аллелей AvaII ПДРФ (С/Т, с.1959) в выборках больных СГ, со спорадическими случаями гиперлипидемии типа II и контрольной группы между собой;
- сравнить частоты встречаемости аллелей Ava II ПДРФ в группах больных СГ и контроля в Санкт-Петербурге с частотами для тех же групп в Европе.

Исследование проводили на коллекции образцов геномной ДНК пациентов с СГ, спорадическими случаями гиперлипидемии (ГЛ) и группы контроля. В процессе работы мы дополнили имеющуюся коллекцию геномных ДНК больных СГ и ГЛ 20 новыми образцами. Таким образом, анализируемая в работе коллекция, составила 37 семей с СГ, 62 пациента с ГЛ. Кроме этого, в работе использовали 52 образца ДНК группы контроля из Санкт-Петербурга и 16 образцов ДНК группы больных миопатиями разного типа из Москвы. Экзоны с прилежащими частями интронов гена рецептора ЛНП были амплифицированы методом ПЦР, а далее скринированы с помощью гетеродуплексного анализа и анализа конформационного полиморфизма однонитевых фрагментов ДНК (SSCP-анализа) на наличие мутационных изменений в последовательности ДНК. Секвенирование образцов проводили на DNA Sequencer 377 (ABI 377) фирмы Applied Biosystems.

При проведении SSCP-анализа амплификатов экзона 7 гена рецептора ЛНП во всех образцах банка не наблюдалось ни одного случая аномальной электрофоретической подвижности конформеров, что свидетельствует об отсутствии мутаций в последовательности экзона 7 гена рецептора ЛНП. При проведении SSCP-анализа амплификатов экзона 13 мы обнаружили несколько образцов с аномальной электрофоретической подвижностью. Секвенирование нескольких таких образцов показало, что они содержат нуклеотидную замену С/Т в положении с.1959 кДНК, не приводящую к аминокислотной замене в последовательности рецептора ЛНП. Это изменение в ДНК приводит к исчезновению в последовательности экзона 13 гена рецептора ЛНП единственного сайта для эндонуклеазы AvaII, что позволило в дальнейшем провести анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) образцов ДНК всех исследуемых групп и определить частоты аллелей С и Т в каждой группе. С помощью критерия χ^2 мы сравнили между собой частоты аллелей AvaII ПДРФ в группах СГ, ГЛ и контроля СПб и получили, что на уровне значимости 5% можно принять гипотезу о принадлежности этих выборок к одной генеральной совокупности. Одинаковое соотношение между полиморфными аллелями AvaII ПДРФ в группах больных СГ, ГЛ и в группе контроля свидетельствует об отсутствии связи между наследованием одного из аллелей и возникновением заболевания.

Мы сравнили частоту встречаемости AvaII ПДРФ в группе с СГ и контроля СПб с ана-

логичными группами в Европе. При анализе с помощью критерия χ^2 мы получили, что на уровне значимости 5% гипотеза о принадлежности популяции Санкт-Петербурга к европейским (Лондон, Германия) популяциям верна.

Проверка равновесия Харди-Вайнберга показывает, что по исследуемому аллелю на уровне значимости 5% гипотеза о выполнении равновесия в группе больных ГЛ ($\chi^2=0,064$) и СГ ($\chi^2=3,1$) и больных миопатией из Москвы ($\chi^2=0,11$) верна, что свидетельствует об отсутствии давления отбора по исследуемому аллелю. У пациентки Б. группы СГ была обнаружена мутация E397X. Проведение семейного анализа показало, что мутация имеется у 6 из 10 родственников пробанда, причем все больные с гиперхолестеринемией в этой семье являются носителями мутации. Для выявления того, какой из аллелей полиморфизма с.1959 С/Т (AvaII ПДРФ) сцеплен с мутацией E397X, в семье пациентки Б. был проведен рестрикционный анализ амплификатов экзона 13 гена рецептора ЛНП всех имеющихся образцов геномной ДНК членов данной семьи, в результате чего мы выяснили, что мутация находится на хромосоме с аллелем Т полиморфизма, но данный ПДРФ не является информативным в данной родословной, то есть из его наследования в данной семье невозможно установить диагноз СГ у детей.

Выводы:

1. Мутации в экзонах 7 и 13 гена рецептора ЛНП у больных СГ и ГЛ исследуемого банка обнаружены не были.
2. Впервые в популяции Санкт-Петербурга в экзоне 13 гена рецептора ЛНП обнаружили полиморфизм с.1959 С/Т (AvaII ПДРФ).
3. Частота встречаемости аллелей AvaII ПДРФ в группах СГ, ГЛ и группе контроля в Санкт-Петербурге не отличается.
4. Из анализа косегрегации аллеля Т AvaII ПДРФ и мутации E397X гена рецептора ЛНП в семье пациентки Б. установлено, что мутация E397X находится на хромосоме с вариантом Т AvaII ПДРФ, но данный полиморфизм не является информативным для диагностики СГ в данной семье.