

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ПОШИРЕНИХ МУТАЦІЙ ГЕНА *ATM* У ПАЦІЄНТІВ З ПІДОЗРОЮ НА АТАКСІО-ТЕЛЕАНГІЕКТАЗІЮ

Атаксія-телеангіектазія (А-Т, синдром Луї-Бар) — це важке аутосомно-рецесивне захворювання, що характеризується прогресуючими ураженнями нервової системи, мозочковою атаксією, шкірною та очною телеангіектазією, комбінованим імунодефіцитом зі схильністю до розвитку синопульмонарних інфекцій. Для А-Т також характерні чутливість до опромінення, множинні вади розвитку органів, схильність до виникнення онкологічних захворювань [1, 2].

Атаксія-телеангіектазія є клінічно та генетично гетерогенним захворюванням, оскільки показана наявність кількох комплементарних груп. Чотири з них (А, С, D, E) були картовані в локусі 11q22-23 і виявилися пов'язаними з мутаціями в гені *ATM*. Даний ген має довжину 150 000 п. н. та складається з 66 екзонів [3, 4].

На сьогоднішній день описано більше 100 мутацій в понад 300 родинах. 70% призводять до вкорочення *ATM* білка. Решта 30% припадає на міссенс-мутації та невеликі делеції чи інсерції, що не порушують рамки читування. У гені описано 88 поліморфізмів з невизначеною функцією. Поліморфні варіанти зустрічаються надзвичайно рідко, і ген *ATM* вважається одним з найбільш консервативних серед аутосомних генів. Мутації зустрічаються по всій довжині гена без помітних «гарячих точок». Для більшості мутацій показаний ефект засновника. Велика кількість алельних варіантів гена *ATM* зумовлює те, що більшість пацієнтів з А-Т є компаундними гетерозиготами. Це суттєво ускладнює молекулярну діагностику та популяційний скринінг.

А-Т виявлена по всьому світу. Середня частота випадків А-Т становить 1 на 100 000 новонароджених (за іншими даними, 1 на 40 000), а частота гетерозигот по мутантних алелях *ATM* становить 1,4–2% [4–6].

У зв'язку з клінічною гетерогенністю виділяють 4 типи пацієнтів з А-Т. У хворих першого типу спостерігається класичне захворювання з маніфестаціями, описаними нижче. Хворі друго-

го типу не мають деяких клінічних ознак А-Т, але в них виявлена радіочутливість. Хворі третього типу мають класичні ознаки захворювання, але не чутливі до дії радіації. Хворі четвертого типу мають лише поодинокі ознаки А-Т і не виявляють радіочутливості. Пацієнти з нетиповими формами атаксії зустрічаються рідко [7, 8].

Проблема діагностики АТ в Україні є надзвичайно актуальним питанням як з точки зору превентивних заходів та допомоги практичній медицині, так і при визначенні реальних частот розповсюдження А-Т. Метою цієї роботи було проведення молекулярно-генетичного аналізу мутацій гена *ATM* у пацієнтів з підозрою синдрому Луї-Бар.

Матеріали і методи

Матеріалом дослідження були зразки ДНК, виділені з клітин периферійної крові пацієнтів з підозрою синдрому Луї-Бар, які обстежувались у Львівському медико-генетичному центрі та Львівській обласній дитячій спеціалізованій клінічній лікарні. Виділення та очищення ДНК з лейкоцитів периферійної крові проводили методом висолювання. Дослідження екзонів 24, 42, 43, 50, 54 гена *ATM*, що містять сайти мутацій 7636del9nt (codon 2546 екзону 54), 6095G→A (codon 2003 екзону 43), IVS53–2A→C (codon 2544del 159nt екзону 54), 7010delG→T (codon 2337), 5932G→T (codon 1973del88nt екзону 42), 3214G→T (codon 1026del207nt екзону 24), проводили за допомогою ПДРФ аналізу [9, 10].

Продукти ампліфікації візуалізували шляхом проведення електрофорезу в 2% агарозному гелі, який містив бромистий етидій, та сканували на ультрафіолетовому транслюмінаторі «ECX-15.M» (VILBERLOURMAT, Франція). Результати сканування агарозних гелів знімали цифровою камерою «Gellmager» (HELICON, Росія). Обробку зображень здійснювали на комп'ютері за допомогою програм Adobe Photoshop CS та Gel Explorer 2.0.

Результати та обговорення

Проведено молекулярно-генетичне дослідження шести мутацій гена *ATM* у 70 пробандів з підозрою на атаксію-телеангіектазію, діагностовану на підставі клінічних даних. У пацієнтів клінічно спостерігали порушення ходи (98%), атаксію (74%), очні телеангіектазії (75%), плями типу «кави з молоком» (30%), підвищений рівень альфафетопротейну (82%).

Для молекулярно-генетичної діагностики нами було вибрано 6 поширених мутацій: 7636del9nt (кодон 2546 екзона 54), 6095G→A (кодон 2003 екзона 43), IVS53–2A→C (кодон 2544del 159nt екзона 54), 5932G→T (кодон 1973del88nt екзона 42), 3214G→T (кодон 1026del207nt екзона 24) та 7010delG→T (кодон 2337 екзона 50) (рис.).

Мутація IVS53–2A→C змінює інваріантний сайт сплайсингу в положенні –2 від екзона 54, що призводить до делеції цього екзона з кДНК. Молекулярно-генетична діагностика мутації IVS53–2A→C ґрунтувалася на тому, що дана мутація зумовлює втрату сайту дії для ендонуклеази рестрикції *AluI*. ПДРФ аналіз мутації IVS53–2A→C (codon 2544del159nt екзона 54) проводився з використанням рестриктази *AluI*. За відсутності мутації із ПЛР-продукту розміром 110 пар нулеотидів утворювалися фрагменти 70 та 40 п.н., тоді як за наявності мутації ПЛР-фрагмент не розщеплювався (рис.).

Для детекції мутації 7636del9nt (codon 2546 екзона 54) використовувалися ті самі праймери, що були розроблені для детекції IVS53–2A→C.

7636del9nt призводить до втрати сайту розщеплення для рестриктази *FspI*, тому у здорових індивідів після розділення в 3% агарозному гелі спостерігаються два фрагменти розміром 78 і 32 п.н., у гомозиготних носіїв мутації 7636del9nt спостерігається один фрагмент розміром 110 п.н., а гетерозигот — три фрагменти розмірами 110, 78, 32 п.н.

Мутація 5932G→T (codon 1973del88nt екзона 42) зумовлює появу стоп-кодону (GAA [Glu] rTAA [stop]) в екзоні 42. Трансверсія G→T створює новий сайт розщеплення для рестриктази *MseI*. ПДРФ аналіз мутації 5932G→T (codon 1973del88nt екзона 42, проводився з використанням рестриктази *MseI*. За відсутності мутації ПЛР-продукт розміром 232 п.н. розщеплюється з утворенням фрагментів 199 та 33 п.н., тоді як за наявності мутації утворюються фрагменти розміром 159, 40 та 33 п.н.

Мутація 6095G→A зумовлює заміну в екзоні 43 останнього нуклеотиду G на A, що призводить до делеції 43 екзона з кДНК та втрати сайту розщеплення для рестриктази *FspI*. ПДРФ аналіз мутації 6095G→A (codon 2003 екзона 43) проводився з використанням рестриктази *FspI*. За відсутності мутації ПЛР-продукт розміром 301 п.н. розщеплюється рестриктазою *FspI* на фрагменти 239 та 62 п.н., тоді як за наявності мутації ПЛР-продукт не розщеплюється (рис.).

Мутація 3214G→T (codon 1026del207nt екзона 24) зумовлює появу стоп-кодону (GAA [Glu] — TAA [stop]) в екзоні 24. У кДНК спостерігалися різні форми мРНК, в яких внаслідок

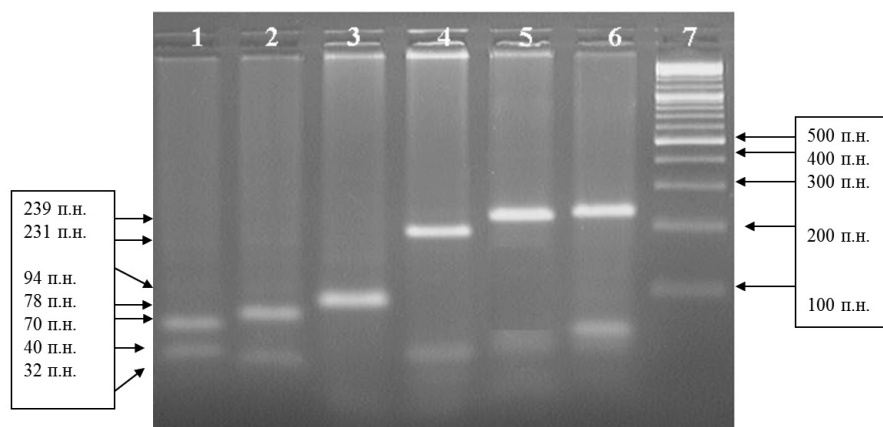


Рис. Електрофореограма ділянки ДНК, що містить фрагменти гена *ATM*, 2,5% агарозний гель: 1— генотип N/N за мутацією 7636del9nt (codon 2546 екзона 54); 2 — генотип N/N за мутацією IVS53–2A→C (codon 2544del 159nt екзона 54); 3 — генотип N/N за мутацією 3214G→T (codon 1026del207nt екзона 24); 4 — генотип N/N за мутацією 5932G→T (codon 1973del88nt екзона 42); 5 — генотип N/N за мутацією 7010delG→T (codon 2337екзона 50); 6 — генотип N/N за мутацією 6095G→A (codon 2003 екзона 43); 7 — маркери молекулярної ваги 100 п.н.

док порушення сплайсингу екзони 23 і 24 були делетовані, тому у таких мРНК відновлювалася правильна рамка зчитування. ПДРФ аналіз мутації 3214G→T (codon 1026del207nt екзона 24) проводився з використанням рестриктази *MseI*. За наявності мутації після дії рестриктази ПЛР-продукту розміром 94 п.н. утворювалися фрагменти 71 та 23 п.н., тоді як за відсутності мутації ПЛР-продукт не розщеплювався (рис.).

Результати молекулярно-генетичного аналізу шести вище перерахованих мутацій гена *ATM* представлені у табл. У 62-х з обстежених пробандів не виявлено досліджуваних мутацій гена *ATM*. У жодного пробанда не встановлено гомозиготне носійство цих мутацій. У ході молекулярно-генетичного обстеження ми виявили 8 пробандів, що були гетерозиготними носіями одного з досліджуваних мутантних алелей. Зокрема, по одному пробанду були гетерозиготами за мутаціями IVS53–2A→C та 3214G→T гена *ATM*. Гетерозиготне носійство мутації 5932G→T гена *ATM* встановлено у 2 пробандів, що склало 2,86%. А з найвищою частотою (5,71%) зустрічався гетерозиготний генотип за мутацією 6095G→A гена *ATM*, який був виявлений у чотирьох пробандів.

Отже, молекулярно-генетичне дослідження мутацій гена *ATM* дозволило нам виявити поодинокі випадки мутантних алелей гена *ATM*. А саме, 8 пробандів були гетерозиготними носіями тієї чи іншої з шести досліджуваних мутацій, що склало 11,43% від загальної кількості обстежених пробандів. Проте, зважаючи на низьку час-

тоту А-Т у популяції, досліджувана вибірка хворих є невеликою. Для гена *ATM* є характерною велика кількість мутацій, частоти яких різняться у різних популяціях та етнічних групах. Спектр досліджуваних нами мутацій був вибраний відповідно до мутацій, які є поширеними у слов'ян. Проте не виключено, що для нашої популяції є характерними інші мутації гена *ATM*. Зважаючи на вищенаведене, доцільним є визначити спектр та частоти поширення мутацій гена *ATM* в Україні і відповідно до отриманих результатів ввести у протокол практичної молекулярно-генетичної діагностики найбільш інформативні мутації. Для цього необхідно провести секвенування гена *ATM* у пацієнтів з А-Т із неідентифікованими алелями та визначити поширеності мутацій, не досліджуваних у цій роботі.

Висновки

1. Проведено молекулярно-генетичне дослідження мутацій 7636del9nt (кодон 2546 екзона 54), 6095G→A (кодон 2003 екзона 43), IVS53–2A→C (кодон 2544del 159nt екзона 54), 5932G→T (кодон 1973del88nt екзона 42), 3214G→T (кодон 1026del207nt екзона 24) та 7010delG→T (кодон 2337 екзона 50) гена *ATM* у 70 пробандів.

2. У дослідній групі у 8 пробандів встановлено гетерозиготне носійство мутацій гена *ATM*: по одному пробанду — гетерозиготи за мутаціями IVS53–2A→C та 3214G→T, 2 пробанди (2,86%) — гетерозиготи за мутацією 5932G→T та 4 пробанди (5,71%) — гетерозиготи за мутацією 6095G→A.

Таблиця

Молекулярно-генетичне дослідження мутацій гена *ATM*

Назва мутації (локалізація)	Генотип				
	N/N		N/M		M/M
	N	%	N	%	
7636del9nt (54 екзон)	70	100	0	0	Не виявлено
IVS53-2A→C (54 екзон)	69	98,57	1	1,43	
5932G→T (42 екзон)	68	97,14	2	2,86	
7010delG→T (50 екзон)	70	100	0	0	
6095G→A (43 екзон)	66	94,29	4	5,71	
3214G→T (24 екзон)	69	98,57	1	1,43	

Примітки: N — відсутність відповідної мутації, M — мутація у відповідній ділянці.

3. Зважаючи на велику кількість мутацій гена *ATM*, частоти яких різняться у різних популяціях та етнічних групах, вважаємо доцільним проведення секвенування гена *ATM* у пацієнтів з

A-T та визначення спектру та частоти поширення інших мутацій гена *ATM* в Україні для підвищення інформативності практичної молекулярно-генетичної діагностики атаксії-телеангіектазії.

ЛІТЕРАТУРА

- Schaffner C., Idler I., Stilgenbauer D., Lichter P. Mantle cell lymphomas characterized by inactivation of the ATM gene // *Medical Sciences*.— 2000.— 93, N 2.— P. 1223–1245.
- Stumm M., Sperling K., Wegner R.-D. Noncomplementation of radiation-induced chromosome aberrations in ataxia-telangiectasia/ataxia-telangiectasia-variant heterodiploids // (Letter) *Am. J. Hum. Genet.*— 1997.— 60.— P. 1246–1251.
- Taylor A., Byrd P. Molecular pathology of ataxia telangiectasia // *Journal of Clinical Pathology*.— 2005.— 58.— P. 1009–1015.
- Yuille M., Condie A., Hudson C., Bradshaw P., Stone E., Matutes E., Catovsky D., Houlston R. *ATM* mutation rare in familial chronic lymphocytic leukemia // *Blood*.— 2002.— 100, N 2.— P. 603–609.
- Ball L., Xiao W. Molecular basis of ataxia telangiectasia and related diseases // *Acta Pharmacologica Sinica*.— 2005.— N 8.— P. 897–907.
- Tauchi H., Matsuura S., Kobayashi J., Sakamoto S., Komatsu K. Nijmegen breakage syndrome gene, NBS1, and molecular links to factors for genome stability // *Oncogene*.— 2002.— 21 (58).— P. 8967–8980.
- Boulton J. Ataxia telangiectasia gene mutations in leukaemia and lymphoma // *Journal of Clinical Pathology J Clin Pathol*.— 2001.— 54.— P. 512–516.
- Saviozzi S., Saluto A., Taylor A. M. R., Last J. I. L., Trebini F., Paradiso M. C., Grosso E., Funaro A., Ponzio G. A late onset variant of ataxia-telangiectasia with a compound heterozygous genotype, A8030G/7481insA // *Journal of Medical Genetics*.— 2002.— 39.— P. 57–61.
- Taylor A. M. R., Byrd P. J. Molecular pathology of ataxia telangiectasia // *Journal of Clinical Pathology*.— 2005.— N 58.— P. 1009–1015.
- Milhan Telatar, Sharon Teraoka, Zhijun Wang, Helen H. Chun, Ataxia-Telangiectasia: Identification and Detection of Founder-Effect Mutations in the ATM Gene in Ethnic Populations // *Am. J. Hum. Genet.*— 1998.— 62.— P. 86–97.

TRETYAK B.¹, MAKUKH H.¹, KITSERA N.¹, KOSTIUCHENKO L.², AKOPYAN H.¹

¹ Institute of Hereditary Pathology of the Ukrainian National Academy of Medical Sciences, Ukraine, 79000, Lviv, Lysenko str., 31-a, e-mail: irynej@ukr.net

² Western Ukrainian Specialized Children's Medical Centre Lviv, Ukraine, Dnisterska str., 27

THE MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF COMMON ATM GENE MUTATIONS AMONG PATIENTS WITH ATAXIA-TELANGIECTASIA SUSPECTION

The **aim** of this study was to conduct of molecular genetic analysis of *ATM* gene mutations in patients with ataxia-telangiectasia suspicion. **Methods.** DNA was isolated from the peripheral blood cells. DNA was subjected to polymerase chain reaction, RFLP-analysis and electrophoresis in 2% agarose gel. **Results.** Molecular genetic testing of *ATM* gene mutations 7636del9 nt (codon 2546 exon 54), 6095G→A (codon 2003 exon 43), IVS53-2A→C (codon 2544del 159nt exon 54), 5932G→T (codon 1973del88nt exon 42), 3214G→T (codon 1026del207nt exon 24) та 7010 delG→T (codon 2337 exon 50) were performed in 70 probands. In the experimental group was found that 8 probands were heterozygous carriers of *ATM* gene mutations: one proband — heterozygotes by the mutations IVS53-2A→C and 3214G→T, 2 probands (2.86%) — heterozygotes by the mutation 5932G→T and 4 probands (5.71%) — heterozygotes by the mutation 6095G→A. **Conclusions.** The sequencing of whole *ATM* gene among patients with unidentified mutations are required to determine the frequency of distribution of other *ATM* mutations in Ukraine for implementation for practical molecular genetic diagnosis of ataxia-telangiectasia.

Keywords: ataxia-telangiectasia, mutations of *ATM* gene.