

Выявление экспансии тринуклеотидных повторов при болезни Гентингтона

Назаров В.Д.¹, Лапин С.В.¹, Гавриченко А.В.¹, Хуторов Д.В.¹, Лобачевская Т.В.¹, Хальчицкий С.Е.², Брачунов С.П.³, Красаков И.В.⁴, Виссарионов С.В.², Баиндурашвили А.Г.², Эмануэль В.Л.¹, Тотолян А.А.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197022 Санкт-Петербург, Россия; e-mail: nazarov19932@mail.ru

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский детский ортопедический институт им. Г.И. Турнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197022 Санкт-Петербург, Россия; e-mail: s_khalchitski@mail.ru

³ Общество с ограниченной ответственностью «Медико-биологический центр», 173011 Великий Новгород, Россия; e-mail: http://info@dnk-test.com

⁴ ФГБУ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России, 194044, Санкт-Петербург, Россия; e-mail: ikrasakov@gmail.com

Болезнь Гентингтона является тяжелым наследственным нейродегенеративным заболеванием центральной нервной системы, проявляющимся двигательными и психическими расстройствами, а также снижением когнитивных функций. Заболевание входит в группу болезней экспансии тринуклеотидных повторов и характеризуется увеличением количества CAG-триплетов в гене *HTT*. Определение количества тринуклеотидных повторов является важным этапом не только диагностики, но и прогнозирования течения болезни Гентингтона. Работа посвящена оценке клинично-лабораторной методологии определения количества CAG-триплетов в гене *HTT* с использованием полимеразной цепной реакции с праймингом тройных повторов и капиллярного электрофореза. Обследовано 8 пациентов с болезнью Гентингтона и 50 доноров контрольной группы. Проведенная валидация системы дала возможность определить основные аналитические параметры и показала высокую воспроизводимость и точность теста. Апробация тестовой системы позволила обнаружить увеличение количества CAG-повторов в пределах умеренной или выраженной экспансии у всех пациентов с болезнью Гентингтона. Количество CAG-повторов в контрольной группе было в пределах нормы. Методология полимеразной цепной реакции с праймингом тройных повторов позволяет с высокой точностью определять количество CAG-триплетов.

Ключевые слова: Болезнь Гентингтона, CAG-повторы, экспансия, ПЦР тройных повторов.

Информация о конфликте интересов: Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов.

Investigation of trinucleotides expansion level in Huntington disease with triplet repeats PCR

Nazarov V.D.¹, Lapin S.V.¹, Gavrichenko A.V.¹, Chutorov D.V.¹, S.E.², Brachunov S.P.³, Krasakov I.V.⁴, Vissarionov S.V.², Baidurashvili A.G.², Totolyan A.A.¹

¹ Center for Molecular Medicine, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg 197022, Russia; E-mail: Nazarov19932@mail.ru

² The Turner Scientific Research Institute for Children's Orthopedics, Saint Petersburg 197022, Russia; E-mail: s_khalchitski@mail.ru

³ Limited liability company «Medico-biological center», 173011 Veliky Novgorod, Russia; E-mail: info@dnk-test.com

⁴ The Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, Saint Petersburg 194044, Russia; E-mail: ikrasakov@gmail.com

Huntington disease is a debilitating genetic neurodegenerative disease of the central nervous system manifesting by various movement disorders, neuropsychiatric symptoms and mood abnormalities. Huntington disease is categorized by trinucleotide repeat expansion disorder and characterized by increase in number of CAG-triplet in *HTT* gene. Determination of expansion of CAG-repeats is obligatory for the diagnosis of Huntington disease. Besides that, measuring of CAG-repeats quantity can help to predict future course of the disease. This article is dedicated to the study of the quantity of CAG-repeats in *HTT* gene in patients with the Huntington disease and in the control group without neurological symptoms. Triplet repeat PCR technique and capillary electrophoresis were used for the detection of CAG-repeats. Validation of system helped to determine basic analytic parameters of test and showed its high reproducibility and precision. Approbation of test system in patients with the Huntington disease showed that in all tested samples had moderate or significant expansion of CAG-repeats. The amount of CAG-triplets in the control group did not exceed limits of normal. Triplet repeats PCR allows determining the quantity of CAG-triplets with high precision and reproducibility, to decrease the time of the test conduction and to simplify the whole procedure.

Key words: Huntington disease, CAG-repeats, expansion, triplet repeats PCR.

Введение

Болезнь Гентингтона (БГ) представляет собой наследственное аутосомно-доминантное нейродегенеративное заболевание, проявляющееся двигательными нарушениями, расстройством когнитивных функций и психоэмоциональными отклонениями [1]. Распространенность заболевания в европейской популяции составляет от 7 до 10 чел. на 100 000 населения. В основе патогенеза заболевания лежит патологическая экспансия тринуклеотидных CAG повторов в локусе 4p16.3 на 5'-конце 1-го экзона гена *HTT*, кодирующего белок гентингтин (ГЕНТ) [2]. Экспансией называется патологическое увеличение количества нуклеотидных последовательностей в нестабильных участках генома, приводящее к нарушению функции кодируемого белка и других протеинов. Причиной появления экспансии при БГ называют образование аномальных и неклассических форм ДНК, таких, как инвертированные повторы и «шпильки», триплекс и квадриплекс нуклеотидные пары. Данные структуры нарушают нормальную репликацию ДНК, приводя к остановке репликационного аппарата или «проскальзыванию» и дальнейшему увеличению количества повторов [3]. Кроме этого, было показано, что нарушение различных механизмов репарации и рекомбинации ДНК также приводит к появлению патологических экспансий. В случае с БГ в норме в гене *HTT* количество CAG-повторов не превышает 35, хотя при умеренном увеличении CAG-повторов в пределах 27–35 существует риск до 10% развития БГ у последующих поколений [4]. Патологическая экспансия более 36 CAG-повторов приводит к образованию аномального белка ГЕНТ с удлинённым полиглутаминовым участком на N-конце молекулы. Изменение первичной структуры ГЕНТ приводит к дестабилизации молекулы, повышению склонности к агрегации и образованию внутриядерных отложений. Некоторые авторы называют данный механизм главной причиной селективной гибели ГАМКэргических шипиковых нейронов полосатого тела при БГ, однако значимую роль играет и нарушение убиквитин-протеасомной системы деградации белков, аксонального транспорта, транскрипции ДНК, а также эксайтотоксичность, вызванная мутантным белком, и появление токсичного N-фрагмента белка ГЕНТ с экспансионной полиглутаминовой последовательностью [5].

Было показано, что уровень экспансии находится в обратной корреляции со временем начала первых неврологических симптомов и скоростью прогрессии [6]. Количество CAG повторов мутантного аллеля объясняет только 50–70% вариаций в возрасте манифестации и тяжести БГ. Другие генетические, а также внешнесредовые факторы могут оказывать влияние на течение БГ [7].

Лабораторное подтверждение и определение уровня экспансии при БГ является важным этапом не только дифференциального диагноза, но и прогнозирования течения заболевания и определения рисков его развития у последующего поколения.

Наиболее распространенным подходом для определения количества CAG-повторов в гене *HTT* является классическая полимеразная цепная реакция (ПЦР) с использованием меченых «репортерами» праймеров, которые фланкируют зону CAG-триплетов [8, 9].

При использовании данного метода сложно дифференцировать одинаковое количество CAG-повторов на обоих аллелях и псевдогомоаллелизм, вызванный отсутствием продукта ПЦР одной из аллелей гена пациента. Данный феномен может возникать при очень высоком уровне экспансии или при полиморфизме нуклеотидов в участке связывания праймеров. В соответствии с рекомендациями, для исключения псевдогомоаллелизма требуется проведение саузерн-блоттинга [8, 9].

Одним из альтернативных подходов к определению точного количества CAG-повторов, исключению псевдогомоаллелизма, а также подтверждению наличия очень высокой экспансии является метод ПЦР с праймингом тройных повторов, описанный в 1993 г. Warner с соавт. [10, 11].

Работа посвящена оценке клинико-лабораторных характеристик методологии определения количества CAG-триплетов в гене *HTT* с использованием ПЦР с праймингом тройных повторов и капиллярного электрофореза.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 7 пациентов с клиническим диагнозом БГ и 1 пациент с генетическим диагнозом БГ с отсутствием симптоматики заболевания (основная группа). Группу контроля составили 50 доноров крови, которые никогда ранее не госпитализировались с неврологической симптоматикой и не имели родственников, страдающих неврологическими заболеваниями (контрольная группа). Исследование одобрено Этическим комитетом ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова 31 октября 2016 года на заседании № 189.

Геномная ДНК, использованная для генетического анализа, была выделена из лейкоцитов периферической крови с использованием коммерческой системы QIAGEN (Германия). Очищенная ДНК была разведена в элюирующем ТЕ-буфере. При проведении анализа концентрации ДНК индекс абсорбции 260/280 во всех образцах варьировал в пределах 1,8–1,9. После измерения концентрации ДНК была разведена до 100 нг/мкл и хранилась при 20°C.

Количество CAG-повторов в обеих группах было определено с использованием методики ПЦР с праймингом тройных повторов.

Для проведения ПЦР с праймингом тройных повторов была синтезирована пара олигонуклеотидов, один из которых был мечен FAM-6 «репортером». Прямой праймер граничил с 5'-концом участка CAG-повторов и отступал от него на три нуклеотида (TCC) из-за наличия полиморфизма в данном участке, который может пре-

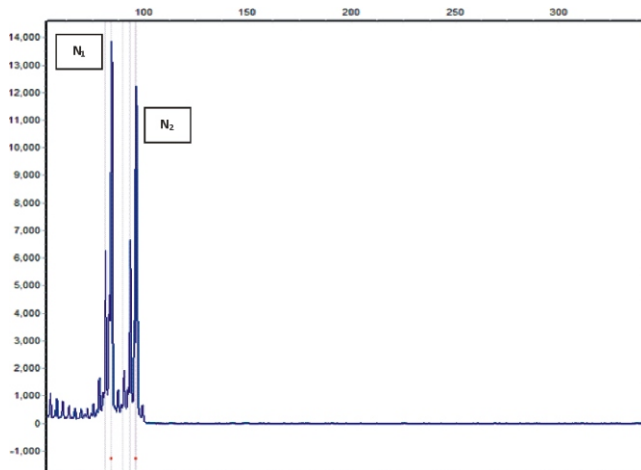


Рис. 2. Пример электрофореграммы образца без увеличения количества CAG-повторов. N₁-15 CAG-повторов, N₂-16 CAG-повторов.

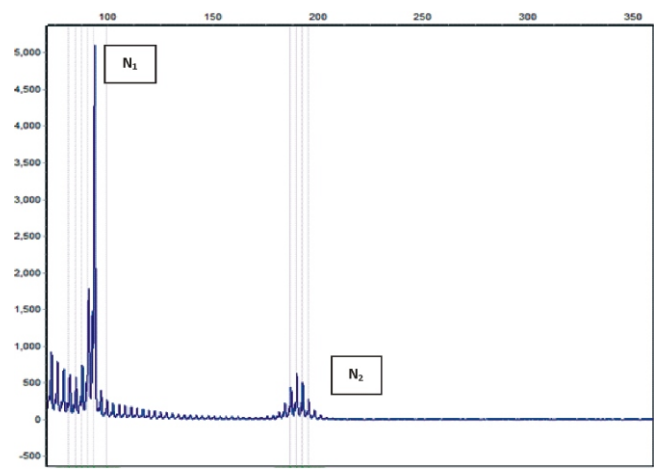


Рис. 3. Пример электрофореграммы с экспансией одного из аллелей. N₁-15 CAG-повторов, N₂-40 CAG-повторов.

реакции с помощью BigDye XTerminator Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) и далее анализировался методом автоматического капиллярного электрофореза в генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems).

Была определена внутривоспроизводимость и межвоспроизводимость метода в контрольных образцах и у пациентов. После этого у 50 доноров и 8 пациентов был проведен анализ количества CAG-повторов.

Результаты исследования

При использовании методики ПЦР с праймингом тройных повторов продукты ПЦР, разделенные методом высокоточного капиллярного электрофореза, образуют характерную картину флуоресцентной «лестницы» с разницей между пиками в три нуклеотида. Несмотря на то, что обратный праймер может связываться с любым участком CAG-повторов, что и создает характерную электрофоретическую картину, наибольшей специфичностью праймер обладает к последним 5 CAG-повторам, поэтому размеры пиков с наибольшей

высотой являются размерами ПЦР-продукта, включающего область с CAG-повторами двух аллелей пациента. Примеры электрофореграмм отрицательного контрольного образца и пациента с ХГ приведены на рис. 2 и 3.

Проведенная оценка клинико-диагностических характеристик теста по определению количества CAG-повторов в гене *HTT* путём ПЦР с праймингом тройных повторов позволила определить воспроизводимость и аналитическую точность теста. Полученные данные воспроизводимости приведены в табл. 1.

Было проведено исследование количества CAG-повторов у 50 доноров и у 8 пациентов с диагнозом ХГ методом ПЦР с праймингом тройных повторов и секвенирования.

Количество CAG-триплетов у пациентов с диагнозом ХГ, рассчитанное методом ПЦР с праймингом тройных повторов, полностью совпадало с результатами прямого автоматического секвенирования участка экспансии и нормального аллеля.

Количество триплетов в обоих аллелях в когорте доноров не превышало 26 и варьировало от 12 до 26. В группе пациентов с ХГ количество CAG-повторов в мутантном аллеле варьировало от 37 до 48. У одного

Таблица 1

Результаты исследования воспроизводимости тестовой системы

Валидационный критерий	Среднее значение размера продукта ПЦР ± SD		Коэффициент вариации CV %	
	1 аллель	2 аллель	1 аллель	2 аллель
Внутривоспроизводимость отрицательного образца в 30 повторах	86,21 ± 0,3	91,96 ± 0,1	0,34	0,2
Внутривоспроизводимость положительного образца в 30 повторах	91,67 ± 0,35	171,54 ± 0,34	0,27	0,17
Межвоспроизводимость отрицательного образца в 30 тестах	86,52 ± 0,37	92,98 ± 0,41	0,39	0,35
Межвоспроизводимость положительного образца в 30 тестах	91,31 ± 0,39	171,98 ± 0,4	0,37	0,19

пациента нами было обнаружено увеличение количества триплетов на двух аллелях: на одном — в пределах патологической экспансии, на втором — в пределах умеренного увеличения. График распределения количества триплетов в двух группах приведен на рис. 4.

Обсуждение результатов и выводы

С каждым годом обнаруживается все больше неврологических генетических нозологий, характеризующихся увеличением повторяющихся нуклеотидных последовательностей. БГ является одной из первых патологий, для которой было доказано, что экспансия триплетов может приводить к развитию серьезных нарушений функции нейронов. Несмотря на то, что мутация в гене *HTT* была

обнаружена в 1993 г., до настоящего времени БГ остается неизлечимым инвалидизирующим заболеванием со средней продолжительностью жизни от 15 до 18 лет после появления первых симптомов [13]. Генетическое тестирование БГ важно не только для проведения дифференциального диагноза, но и определения прогноза, а также рисков развития заболевания в следующем поколении или у родственников.

Наиболее распространенным подходом для детекции экспансии является классическая ПЦР с использованием меченых «репортерами» праймеров, которые фланкируют зону CAG-триплетов. Разделение продуктов реакции путем капиллярного, агарозного или полиакриламидного электрофореза позволяет воспроизводимо выявлять до 125 CAG-повторов в гене *HTT* [14]. Для более высоких уровней

Таблица 2

Клиническое описание пациентов с диагнозом «Хорея Гентингтона»

Пациент	Пол	Количество CAG-повторов. ПЦР с праймингом тройных повторов*		Количество CAG-повторов. Метод автоматического секвенирования		Возраст появления первых моторных нарушений	Неврологический статус при последней госпитализации	Анамнез
		1 аллель	2 аллель	1 аллель	2 аллель			
Пациент 1	М	15,3	47,2	16	48	23 года	Хореический гиперкинез. Торсионная дистония Левосторонняя пирамидная микросимптоматика Смешанная атаксия. Умеренные когнитивные нарушения	Нет
Пациент 2	Ж	14,8	40	15	40	45 лет	Хореический гиперкинез. Элементы псевдо-бульбарного паралича Левосторонняя пирамидная симптоматика Смешанная атаксия. Умеренные когнитивные нарушения	Больны мать, дочь
Пациент 3	М	15,1	39,8	16	40	43	Хореический гиперкинез Элементы мозжечковой атаксии Деменция Гипомимия, агрессия, апатия	Больны дед, мать, брат
Пациент 4	Ж	14,5	41,9	15	42	Симптоматика отсутствует	Симптоматика отсутствует	Больны отец, дядя, бабушка, прадед
Пациент 5	Ж	33,5	39,5	34	40	43	Хореический гиперкинез Элементы мозжечковой атаксии Деменция	Нет
Пациент 6	Ж	19	38	19	38	41	Хореический гиперкинез. Левосторонняя пирамидная симптоматика Умеренные когнитивные нарушения	Нет
Пациент 7	Ж	14	46,4	14	47	27	Хореический гиперкинез. Легкие когнитивные нарушения Депрессия	Болен отец
Пациент 8	Ж	14,3	37	15	37	62	Хореический гиперкинез. Деменция	Нет

Примечание. Количество CAG-повторов приведено без учета округления в большую сторону

экспансии CAG-повторов требуется использование трудоемкого и длительного саузерн-блоттинга.

Альтернативным лабораторным подходом к определению количества CAG-триплетов является ПЦР с праймингом тройных повторов с использованием капиллярного электрофореза и меченых праймеров. Данная методика не только позволяет точно определять уровень экспансии, но также дифференцировать случаи псевдогемоаллелизма и подтверждать наличие очень высоких уровней экспансии у пациентов [10].

В ходе валидации методологии нами были использованы специфические добавки в ПЦР-смесь, а также альтернативный TouchDown-протокол с удлинённой элонгацией ПЦР продукта, что позволило значительно повысить специфичность и робастность проводимой реакции.

Были исследованы основные аналитические характеристики ПЦР с праймингом тройных повторов. Продемонстрирована высокая внутрилабораторная воспроизводимость при анализе в одной лаборатории одних и тех же положительных и отрицательных проб с полным повтором процедуры приготовления образцов и выполнения всех измерений в разных сериях. Коэффициент вариации CV% ни в одной из серий измерений не превысил порога в 1%.

Было проведено прямое подтверждение количества CAG-повторов в группе пациентов с БГ с использованием автоматического секвенирования. Количество CAG-повторов, определенное методом секвенирования, совпадало с количеством CAG-повторов, выявленных с помощью ПЦР с праймингом тройных повторов, учитывая уровень приемлемой ошибки [8, 9].

В ходе апробации тестовой системы и исследования количества повторов в группе доноров ни в одном образце не было найдено количества повторов, соответствующего умеренной или выраженной экспансии. В группе пациентов с клинически подтвержденной БГ у всех исследуемых был обнаружен хотя бы один аллель с умеренной или выраженной экспансией. Пациент с компаундным увеличением количества триплетов вызывает интерес в связи с данными о возможном влиянии немутатного аллеля на фенотип и течение БГ [15]. И хотя ряд работ отрицает какое-либо влияние нормального аллеля на проявления БГ, надежные данные о влиянии умеренно увеличенных аллелей отсутствуют [7].

Таким образом, нами была проведена валидация и апробация методологии точного определения количества CAG-повторов при диагностике БГ. Методология ПЦР с праймингом тройных повторов может использоваться в качестве альтернативного подхода генетической диагностики БГ. Недостатком данного исследования является маленькая выборка пациентов. Потенциально применение данного метода в клинической практике с использованием высокоточного капиллярного электрофореза и меченых праймеров поможет избежать возможных ложноотрицательных результатов и дифференцировать случаи псевдогемоаллелизма.

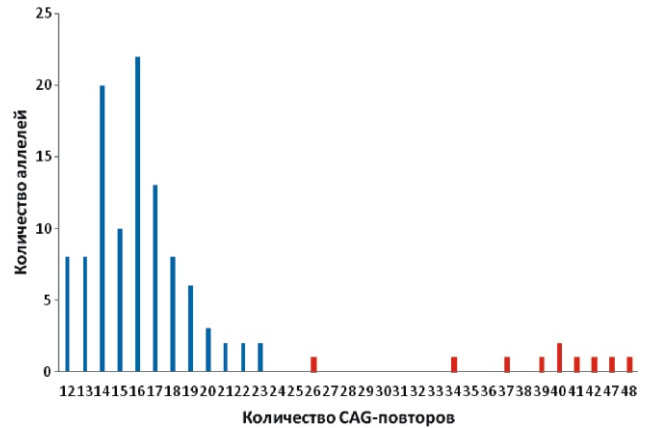


Рис. 4. Распределение количества CAG-повторов на всех аллелях пациентов с БГ и в контрольной группе. Синим цветом отмечены столбы с количеством CAG-повторов в пределах нормы, красным — с умеренным увеличением или экспансией.

Список литературы

- Иллариошкин С.Н. и др. ДНК диагностика и медико-генетическое консультирование в неврологии. М., 2002.
- Bates GHPJL: Huntington's disease. 3 edn, Oxford, UK: Oxford University Press, 2002.
- Budworth H, McMurray CT. A brief history of triplet repeat diseases. *Methods Mol Biol.* 2013; 1010: 3-17.
- Harper PS. Huntington Disease. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd; 2006.
- Ross CA, Tabrizi SJ. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol.* 2011; 10(1): 83-98.
- Иллариошкин С.Н., Игараша С., Онодера О., Маркова Е.Д., Никольская Н.Н., Танака Н., Чабрашвили Т.З., Инсарова Н.Г., Эндо К., Иванова-Смоленская И.А., Тсуи С. Trinucleotide repeat length and rate of progression of huntington's disease. *Annals of Neurology.* 1994; 36. № 4: 630-635.
- Lee JM, Ramos EM, Lee JH, et al. CAG repeat expansion in Huntington disease determines age at onset in a fully dominant fashion. *Neurology.* 2012; 78(10): 690-695.
- Losekoot M, van Belzen MJ, Seneca S, Bauer P, Stenhouse SaR, Barton DE. EMQN/CMGS best practice guidelines for the molecular genetic testing of Huntington disease. *Eur J Hum Genet.* 2013; 21(5): 480-486.
- Bean L, Bayrak-Toydemir P. American College of Medical Genetics and Genomics Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories, 2014 edition: technical standards and guidelines for Huntington disease. *Genet Med.* 2014; 16(12): e2.
- Jama M, Millson A, Miller CE, Lyon E. Triplet repeat primed PCR simplifies testing for huntington disease. *J Mol Diagnostics.* 2013; 15(2): 255-262.
- Warner JP, Barron LH, Brock DJ. A new polymerase chain reaction (PCR) assay for the trinucleotide repeat that is unstable and expanded on Huntington's disease chromosomes. *Mol Cell Probes.* 1993; 7(3): 235-239.
- Roy H, Perlis et al. Prevalence of incompletely penetrant Huntington's disease alleles among individuals with major depressive disorder. *Am J Psychiatry.* 2010; 167: 574-579.
- McMurray CT. Mechanisms of trinucleotide repeat instability during human development. *Nat Rev Genet.* 2010; 11(11): 786-799.
- Nance MA, Mathias-Hagen V, Brenningstall G, Wick MJ, McGlennen RC. Analysis of a very large trinucleotide repeat in a patient with juvenile Huntington's disease. *Neurology* 1999; 52: 392-394.
- Williams LC, Hegde MR, Nagappan R, et al. Null alleles at the Huntington disease locus: implications for diagnostics and CAG repeat instability. *Genet Test.* 2000; 4(1): 55-60.