

**Ю. П. Буренкова**

## **АНАЛИЗ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ, КОДИРУЮЩЕМ БЕЛОК ДИСТРОФИН**

**Научные руководители: канд. биол. наук, доц. В. В. Хрусталёв**

*Кафедра общей химии,*

*Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

**Резюме.** *Статья содержит данные о строении гена, кодирующего белок дистрофин, статистический анализ типа и частоты встречаемости мутаций в нём, а также мутаций гена, ведущих к развитию миодистрофии Дюшенна – летального заболевания.*

**Ключевые слова:** *дистрофин, генетические мутации, статистический анализ, мышечная дистрофия Дюшенна.*

**Resume.** *This article contains information about the structure of gene encoding the dystrophin protein, statistical analysis of the type and frequency of mutations occurrence in it and mutations leading to the Duchenne muscular dystrophy development.*

**Keywords:** *dystrophin, genetic mutations, statistical analysis, Duchenne muscular dystrophy.*

**Актуальность.** Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) – летальное X-сцепленное заболевание, вызванное мутациями в гене дистрофина (DMD), locus которого локализован на Хр21.2. МДД относится к наиболее часто встречающимся наследственным нервно-мышечным болезням. Распространенность 2-5:100000 населения, популяционная частота – 1:3500 новорожденных мальчиков [5, 7].

В результате мутаций прекращается синтез белка дистрофина из-за сдвига рамки считывания. Потеря этого белка приводит к прогрессирующей дистрофии мышц (в т. ч. сердечной мышцы) и к смерти в возрасте до 30 лет от легочной или сердечной недостаточности [4, 5, 7]. Более легкая форма этого заболевания – мышечная дистрофия Беккера (МДБ) – вызывается мутациями без сдвига рамки считывания, клетки в результате синтезируют модифицированный дистрофин, меньший по размеру либо с незначительно измененной аминокислотной последовательностью [1]. Около 30% случаев заболевания МДД обусловлены мутациями *de novo*, 70% – носительством мутации матерью [3].

Ген DMD является одним из самых больших генов человека (примерно 2,4 Мб ДНК). Ген кодирует несколько изоформных белков, один из самых важных – мышечный дистрофин [5]. Дистрофин отвечает за соединение цитоскелета мышечного волокна с основной базальной пластинкой (внеклеточного матрикса) через дистрофин-ассоциированный гликопротеидный комплекс. Отсутствие дистрофина приводит к поступлению избыточного кальция в саркомеру. Мышечные волокна подвергаются некрозу, происходит замещение мышечной ткани жировой, а также соединительной [5, 7]. В настоящее время эффективного лечения МДД не разработано, терапия построена на возможности перевода МДД в более легкую форму – МДБ [4, 5].

**Цель:** статистический анализ типа и частот встречаемости мутаций в гене, кодирующем белок дистрофин человека, в т. ч., приводящих к МДД.

**Задачи:**

1. Изучить строение белка дистрофина, взаимосвязь между положением мутации и фенотипом МДД.
2. Провести статистический анализ типа и частоты встречаемости мутаций гена, кодирующего дистрофин.
3. Провести статистический анализ типа и частоты мутаций гена DMD, ведущих к МДД.

**Материал и методы.** Информация о нуклеотидной последовательности DMD взята из международной базы данных Ensembl, идентификатор – ENST00000357033 ([www.ensembl.org/index.html](http://www.ensembl.org/index.html)) [2]. Информация о мутациях DMD, ведущих к МДД, из открытой онлайн базы данных Leiden Duchenne Muscular Dystrophy Mutation Database (9130 пациентов с МДД, [www.dmd.nl](http://www.dmd.nl)) [3]. Рассчитаны частоты использования гуанина и цитозина (G+C) в «скользящих окнах» длиной 140 нуклеотидов (шаг 20), частоты использования G и C в первых (1GC), вторых (2GC) и третьих (3GC) положениях кодонов [6]. Статистический анализ проводился в MS Excel.

**Результаты и их обсуждение.** Дистрофин состоит из четырех областей (79 экзонов): N-концевой актин-связывающий домен (ABD); центральный домен, содержащий 24 спектрин-подобных повтора (1-24, синий), прерываемый 4 шарнирными областями (H1-4, оранжевый); цистеин-богатый домен (светло-оранжевый); и C-концевой домен (темно-оранжевый) (рисунок 1 – А). Графически показаны соотношения между участком делеции и тяжестью фенотипа (рисунок 1 – В) [1].

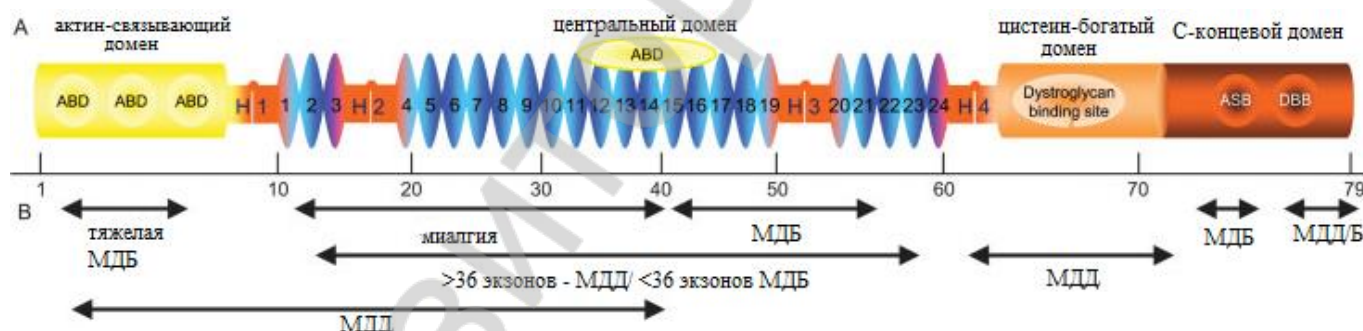


Рисунок 1 – Схема белка дистрофина

При статистическом анализе мутаций гена DMD, информация о которых есть в базе данных, выявлено следующее [2]. На сегодняшний день содержится информация о 97282 мутациях, ведущих к разнообразным фенотипическим проявлениям. Из них наследуемых – 93132 (95,73% всех): в кодирующей части – 4539 (4,87%), в интронах – 88593 (95,13%). Число соматических мутаций – 4150 (4,26% всех): в кодирующей части – 3916 (94,36%), в интронах – 234 (5,64%). Среднее значение суммы частот использования гуанина и цитозина (G+C) на протяжении гена составляет  $44,4 \pm 9,3$  %. Частота использования составляет в первых положениях кодонов  $1GC = 54,98 \pm 3,68\%$  (рисунок 2, синим), вторых  $2GC = 32,59 \pm 3,62\%$  (красным), и в третьих положениях  $3GC = 45,62 \pm 5,47\%$  (зеленым).

Однонуклеотидные замены чаще всего обнаруживаются в интронах (82,5% всех, 86,2% наследуемых мутаций и 90,6% таких мутаций в интронах) (таблица 1). Транзиции тимина на цитозин достоверно преобладают над обратными заменами цитозина на тимин. Транзиции гуанина на аденин, наоборот, происходят в 1,36 раз чаще, чем транзиции аденина на гуанин.

Частота возникновения трансверсий тимина на гуанин недостоверно отличается от частоты трансверсий гуанина на тимин. Точно так же, примерно с равной частотой возникают трансверсии аденина на цитозин и цитозина на аденин. Если сравнить частоты замен по направлению AT-давления (42,19%) и GC-давления (38,62%), то разница между ними будет достоверной. Т.о. интронная последовательность находится под действием мутационного AT-давления ( $\mu D < 0,5$ , показатель мутационного давления).

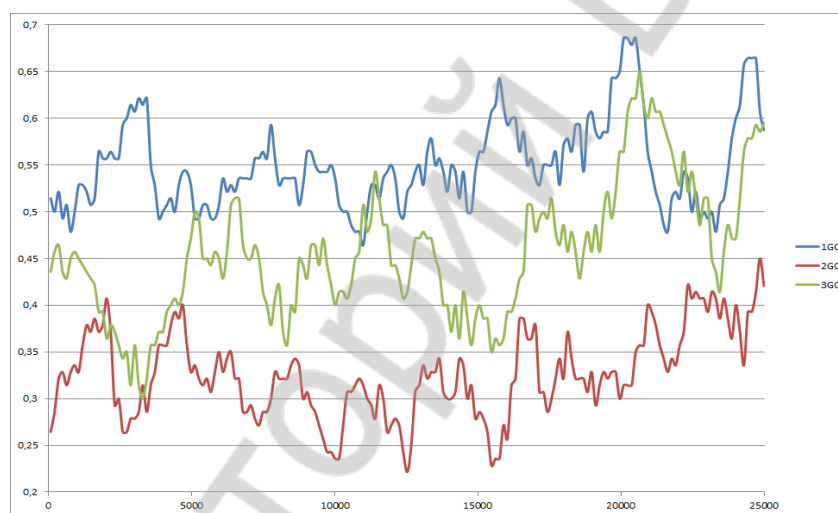


Рисунок 2 – Частота использования GC в разных положениях кодонов

В экзонах транзиции цитозина на тимин происходят достоверно чаще (в 1,16 раза), чем замены тимина на цитозин, транзиции гуанина на аденин в 2,53 раз чаще, чем транзиции аденина на гуанин. Частота возникновения трансверсий тимина на гуанин сходна с частотой трансверсий гуанина на тимин, также, как и замен аденина на цитозин и цитозина на аденин (недостоверные различия). Если сравнить частоты замен по направлению AT-давления (50,74%) и GC-давления (28,68%), то разница между ними будет достоверной. Т.о., последовательность нуклеотидов в экзонах также находится под действием мутационного AT-давления ( $\mu D < 0,5$ ).

Таблица 1. Частоты возникновения мутаций (%) в гене DMD человека.

Место	T/C	C/T	A/G	G/A	T/G	G/T	A/C	C/A	A/T	T/A	C/G	G/C
Экзоны	13,56	15,78	8,19*	20,69	3,3	3,7	3,64	10,55	3,67	7,08	5,23	4,60
	*	*		*	0	2	*	*	*	*		

Интро- НЫ	16,66 *	16,00 *	12,15 *	16,46 *	4,1 4	4,0 5	5,68	5,68	5,68 *	4,89 *	4,13 *	4,48 *
Значком (*) отмечены случаи, в которых разность между заменами противоположного направления достоверна (P<0,05).												

Асимметричное мутационное давление имеет место в интронах, в экзонах же наблюдается симметричное мутационное давление.

Также были проанализированы данные о 9130 пациентах с МДД по всему миру [3]. Наиболее частые мутации, ведущие к развитию МДД – это полиэкзонные делеции (5250 пациентов, 57,50% всех МДД) и замены одного нуклеотида (1986, 21,75% всех). Менее распространены полиэкзонные дупликации (888 или 9,73%), делеции (667, 7,31%) или дупликации одной пары нуклеотидов (237, 2,6%). Еще меньше распространены инсерции одного нуклеотида – 102 пациента (1,12%). Самая малая распространённость у полиэкзонных инверсий (2) и инсерций (13 пациентов).

Из всего многообразия полиэкзонных делеций 66,3% расположены в области 40-55 экзона. Из них 15 вариантов самых часто встречающихся в области 43-52 интрона (рисунок 3, в % от всех делеций). Также распространена делеция в области 2i-7i (1,39%) и 7i-9i (0,8% от полиэкзонных делеций).

П/п	Делеция	DMD											%	
		43 i	44 i	45 i	46 i	47 i	48 i	49 i	50 i	51 i	52 i	53		
1	44i_45i													5,12
2	44i_50i													3,98
3	47i_50i													3,87
4	44i_52i													3,71
5	43i_44i													3,24
6	50i_51i													3,24
7	48i_50i													2,72
8	45i_47i													2,30
9	47i_52i													2,21
10	51i_52i													2,17
11	49i_50i													1,81
12	44i_47i													1,70
13	48i_52i													1,58
14	45i_51i													1,50
15	45i_50i													1,43

Рисунок 3 – Карта распространенных полиэкзонных делеций

Замена одной пары нуклеотидов – вторая по распространённости мутация DMD (1986 пациентов, 21,75% всех). В расположении таких мутации нет определенной закономерности, но наиболее часто у пациентов с МДД они встречаются в 70, 59, 24, 14, 37, 7, 53, 21, 48, 34 экзонах. При этом почти 20% относится к замене С на Т, а также любой нуклеотид чаще всего заменяется на Т (37%).

Полиэкзонные дупликации в большинстве случаев встречаются в первых 11 экзонах. Дупликация 1i-2i встречается у 78 МДД пациентов и составляет 8,78% от полиэкзонных дупликаций. Дупликация 2i-7i составляет 4,49%, дупликация 7i-9i – 3,15% и 7i-11i – 2,14%.

Делеции одной пары нуклеотидов часто встречаются в 18 (3,3%), 6, 16 и 74

(2,7%) и в 70 (2,4%) экзонах. Наиболее часто дубликации 1 пары нуклеотидов происходят в районе 79 экзона (17), а также 2 интрона (13 пациентов). Инсерции 1 пары нуклеотидов часто происходят в 23 экзоне и в 8 интроне (по 6 пациентов).

В международных базах данных не найдено информации по пациентам из РБ с МДД, но общемировой статистике в РБ примерно 190-475 таких пациентов. Дальнейшее изучение мутаций гена DMD, возможностей их коррекции, создание общереспубликанской базы пациентов, является важным для участия РБ в клинический испытаниях в настоящем и поиска причины мутаций и лечения МДД в дальнейшем.

#### **Выводы:**

1 Изучено строение белка дистрофина (состоит из 4 областей, 79 экзонов), а также графически показана взаимосвязь между местом мутации и ожидаемым фенотипом.

2 Большую часть мутаций в гене DMD составляют наследуемые интронные мутации (91,1% всех). По мировой статистике около 70% случаев МДД обусловлено наследуемыми мутациями в DMD. В гене DMD до настоящего времени в первых положениях кодонов сохраняется повышенное содержание гуанина и цитозина (так как большинство замен в них несинонимичны). Самые распространенные мутации в DMD – однонуклеотидные замены (82,5% всех), а среди мутаций, ведущих к МДД – полиэкзонные делеции (57,50% всех МДД).

3 Наиболее часто МДД вызывается большими (>36 экзонов) мутациями в центральном домене, либо в любом другом месте гена при сдвиге рамки считывания. Полиэкзонные мутации более упорядочены относительно типа мутации и ее расположения (между 43 и 53 экзонами). Замена одной пары нуклеотидов – второй по распространенности тип мутаций в гене DMD при МДД. В большинстве случаев мутации одной пары нуклеотидов (кроме ситуации со сдвигом рамки считывания) не ведут к развитию МДД, а являются либо синонимичными, либо ведут к развитию более легкой формы МДБ.

*Y. P. Burenkova*

### **ANALYSIS OF MUTATIONS IN THE GENE CODING FOR DYSTROPHIN PROTEIN**

*Tutor: associate professor V. V. Khrustalev*

*Department of general chemistry,*

*Belarusian State Medical University, Minsk*

#### **Литература**

1. Aartsma-Rus, A. Entries in the Leiden Duchenne Muscular Dystrophy Mutation Database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule / A. Aartsma-Rus // Muscle Nerve. — 2006. — Vol. 34. — P. 135–144.
2. Ensembl Database [Electronic resource] / WTSI, EMBL-EBI. — Режим доступа: [www.ensembl.org/index.html](http://www.ensembl.org/index.html). (дата обращения: 25.03.16).
3. Leiden Duchenne Muscular Dystrophy Mutation Database [Electronic resource] / Leiden Uni-

70-я Международная научно-практическая конференция студентов и молодых учёных  
"Актуальные проблемы современной медицины и фармации - 2016"

---

versity Medical Center. — Режим доступа: [www.dmd.nl](http://www.dmd.nl). (дата обращения: 25.09.15).

4. Molza, A. E. Structural Basis of Neuronal Nitric-Oxide Synthase Interaction with Dystrophin Repeats 16 and 17 / A. E. Molza // *J. Biol. Chem.* — 2015. — 20 p.

5. Santos R. New variants, challenges and pitfalls in DMD genotyping: implications in diagnosis, prognosis and therapy / R. Santos // *Journal of Human Genetics.* — 2014. — Vol. 59. — P. 454–464.

6. Барашкова Е. С. Мутационное давление в гене APC человека / Е. С. Барашкова, Т. А. Хрусталёва, В. В. Хрусталёв // «Молодёжь в науке 2015» – материалы X международной научной конференции. – Минск: НАН Беларуси, 2015. – С. 163.

7. Муравлева, Э.А. Детекция мутации de novo в гене дистрофина и её значение для медико-генетического консультирования при мышечной дистрофии Дюшенна / Э.А. Муравлева // Бюллетень медицинских Интернет-конференций. — 2014. — Т. 4. — №4.