

ОСОБЕННОСТИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ СИНДРОМА РЕТТА

Обухович О.П.

**научный руководитель кандидат биологических наук Чаплинская Е.В.,
доцент кафедры биологии БГМУ**

*Белорусский государственный медицинский университет, кафедра биологии,
г. Минск*

Ключевые слова: синдром Ретта, генные мутации, ген MeCP2, X-инактивация, поздняя репликация.

Резюме: в работе представлен детальный анализ современных молекулярно-цитогенетических методов диагностики синдрома Ретта. Более подробно изучены некоторые направления, в частности, по материалам базы данных Международной ассоциации синдрома Ретта был охарактеризован спектр мутаций гена MeCP2, выделены наиболее часто встречающиеся замены в аминокислотной последовательности белка, кодируемого геном MeCP2.

***Resume:** the detail analysis of modern methods of molecular-cytogenetic diagnostic of the Rett's syndrome is presented in the article. The separate aspects are described more, thanks to analysis of the IRSA MeCP2 Variation Database the proportion of mutations in a gene MeCP2 has been counted, as well as the proportion of the changes in the protein MeCP2. On the basis of specific features of X-inactivation and kind of replication X-chromosome ways of antenatal diagnostic are presented.*

Актуальность. По данным Всемирной организации здравоохранения в настоящее время аутизм занимает ведущее место среди психических заболеваний у детей и встречается с частотой 1:80-1:150 индивидуумов [2]. До недавнего времени синдром Ретта также входил в спектр аутистических расстройств. Среди всех умственно отсталых девочек заболеваемость синдромом составляет 2,48 %. Среди глубоко умственно отсталых женщин — не менее 10 % [3].

Синдром Ретта (РТТ) включает в себя большое количество симптомов, затрагивающих различные функциональные системы организма. Характерными клиническими проявлениями синдрома являются постепенный регресс психического развития (первые проявления в возрасте от 4 до 18 месяцев), утрата целенаправленных и появление стереотипных движений, необратимые изменения со стороны опорно-двигательного аппарата и дыхательной системы. Поскольку одним из проявлений синдрома Ретта являются существенные нарушения в сфере социализации и коммуникации, РТТ представляет собой одно из наиболее социально значимых нервно-психических заболеваний среди детей.

В последнее время синдром Ретта активно изучается во всем мире. Однако по-прежнему не существует критериев для пренатальной диагностики синдрома. В связи с этим весьма актуально изучение молекулярно-цитогенетических особенностей диагностики РТТ.

Цель: исследование особенностей молекулярной и цитогенетической диагностики синдрома Ретта.

Задачи: 1. Обобщить и систематизировать современные методы диагностики РТТ; 2. Определить роль явлений X-инактивации и поздней репликации хромосомы X в цитогенетической диагностике синдрома Ретта; 3. Описать роль мутационной изменчивости гена MeCP2 как одного из критериев для цитогенетической диагностики РТТ. 4. Дать количественную оценку изменениям аминокислотной последовательности белка, кодируемого геном MeCP2.

Материал и методы. В ходе работы были использованы материалы молекулярных и цитогенетических исследований, предоставленные Международной ассоциацией синдрома Ретта [4]. Для выяснения разнообразия вариантов мутаций в гене MeCP2 при РТТ, использовались данные международной базы RettBaseIRSA, которая содержит подробную генетическую информацию для 4389 случаев классического и атипичного синдрома Ретта [6]. С помощью программы Statistica 6.0 были рассчитаны: частоты встречаемости различных видов мутаций исследуемого гена;

частоты мутирования различных функциональных доменов MeCP2; выявлены наиболее часто мутируемые домены белка MeCP2 и преобладающие виды мутаций в них; проанализирован аминокислотный состав мутантных белков.

Результаты и их обсуждение. Долгое время после открытия заболевания этиология синдрома оставалась неизученной. Относительно характера наследования велись долгие споры. В настоящее время общепринятой версией является X-сцепленный характер наследования. На основании проанализированных источников были выделены 3 основных направления в дифференциальной диагностике РТТ:

1. Исследования характера репликации хромосомы X с помощью молекулярных методов и цитогенетического анализа при необходимости.

2. Установление спектра мутаций гена MeCP2, его влияние на нарушение функций одноименного белка.

3. Анализ особенностей X-инактивации у пациентов с РТТ и их родителей.

Одним из существенных факторов, определяющих генез РТТ, является особый тип репликации хромосомы X в интерфазу мейоза I. В результате проведенных исследований синдрома Ретта был выявлен аномальный тип поздно реплицирующейся хромосомы X, не встречающийся в контроле, что свидетельствует о нарушении процесса репликации инактивируемой хромосомы X как возможном механизме развития заболевания. Предполагается возможность использования обнаруженных нарушений в качестве диагностического критерия. Другой особенностью РТТ является наличие ранее реплицированного участка хромосомы X (Xq28), который может быть выявлен с помощью молекулярно-цитогенетических методов [1].

В ходе дифференциальной диагностики синдрома Ретта нельзя не учитывать определение мутаций гена MeCP2. Мутации данного гена обнаруживаются у большинства пациентов с синдромом (91% классического РТТ, 55% атипичной формы). При анализе указанной выше базы данных в гене MeCP2 установлены следующие виды мутаций: миссенс (38,69%), нонсенс (27,23%), молчащие мутации (6,92%), делеции и инсерции рамки считывания (14,68% от всех мутаций, среди них совместные мутации 5,82%) и иные виды (2,87%). Восемь мутаций (четыре миссенс-мутации и четыре нонсенс-мутации) являются рекуррентными и встречаются у 65% детей с данной патологией.

Поскольку ген состоит из нескольких функциональных доменов и имеет длинную пространственную цепь, то возникла необходимость расчета частоты изменений каждого функционального участка. Наиболее подвержены мутациям домены TRD (33,03%) с преобладанием нонсенс мутации, MBD (24,56%) в котором чаще встречается миссенс мутация, в С-концевом фрагменте (17,91%) с наибольшей частотой проявления здесь мутаций рамки считывания.

С целью расширения представлений об особенностях мутационных изменений различных областей белка MeCP2, была рассчитана частота встречаемости некоторых видов мутаций в каждом из доменов. В домене TRD, NLS и междоменном интервале преобладают нонсенс мутации, в MBD миссенс мутации. Миссенс мутации отсутствуют в NLS домене. Совместные мутации проявляются редко, но чаще зафиксированы в С-концевом фрагменте. Преобладающий вид мутации в каждом домене различен. Надо полагать, это связано с различной нуклеотидной последовательностью доменов, а также различной способностью к репарации ДНК в участках изучаемого гена.

Диагностику MeCP2 мутаций у детей с синдромом Ретта для экономии финансовых затрат и времени необходимо проводить в две стадии: первая — энзиматический тест на наличие восьми рекуррентных мутаций; вторая — секвенирование кодирующей области и фланкирующих последовательностей гена MeCP2. Энзиматический тест на наличие восьми рекуррентных мутаций (R160W, R133C, T158M, R168X, R255X, R270X, R294X, R306C) не уступает по эффективности секвенированию и позволяет определить мутации гена MeCP2 у 40–80% детей с синдромом Ретта. Для пациентов, у которых не обнаружены мутации при использовании энзиматического теста, необходимо проводить исследование MeCP2 мутаций методом секвенирования [5].

При анализе аминокислотных замен в белке MeCP2 выявлено следующее:

для различных доменов распределение спектра «неправильных аминокислот» (то есть появившихся после мутации) различно. При сопоставлении (корреляционный анализ Correlation matrices) двух рядов «неправильных» аминокислот- MBD и TRD доменов - зависимости выявлено не было ($r < 0,1$). Это может свидетельствовать о том, что направленность аминокислотных замен в этих доменах различна. Однако следует отметить и общие черты: в этих доменах в ходе мутационных преобразований преимущественно образуется аргинин. Для ряда аминокислот наблюдается схожее количественное представительство в различных доменах, соответственно, в MBD и TRD: аланин, 33 и 23; для некоторых ассиметричное: лизин, 13 и 28, серин, 27 и 11.

Наличие мутации гена не является полностью достоверным показателем синдрома Ретта. Более перспективным выглядит изучение особенностей X-инактивации методом метил-чувствительной рестрикции в сочетании с количественной ПЦР адекватным для диагностики синдрома Ретта. Данный анализ позволяет также проводить диагностику у девочек с синдромом Ретта без MeCP2 мутаций [6].

Выводы: 1. Основными направлениями в дифференциальной диагностике РТТ являются: исследования характера репликации хромосомы X с помощью молекулярных методов и цитогенетического анализа; установление спектра мутаций гена MeCP2, его влияние на нарушение функций одноименного белка; анализ особенностей X-инактивации у

пациентов с РТТ и их родителей; 2. Наличие ранее реплицированного участка хромосомы X (Xq28), который может быть выявлен с помощью молекулярно-цитогенетических методов, а также изучение особенностей X-инактивации методом метил-чувствительной рестрикции в сочетании с количественной ПЦР адекватным для диагностики синдрома Ретта могут быть использованы для дифференциальной диагностики РТТ; 3. В ходе дифференциальной диагностики синдрома Ретта нельзя не учитывать определение мутаций гена MeCP2. Мутации данного гена обнаруживаются у большинства пациентов с синдромом (91% классического РТТ, 55% атипичной формы). Диагностику MECP2 мутаций у детей с синдромом Ретта необходимо проводить в две стадии: первая — энзиматический тест на наличие восьми рекуррентных мутаций; вторая — секвенирование кодирующей области и фланкирующих последовательностей гена MECP2; 4. В MBD и TRD доменах белка MECP2 среди мутировавших аминокислот преобладает аргинин, соответственно доменам 54,95 и 46,57%. Для аланина наблюдается схожее количественное представительство в обоих доменах, соответственно, в MBD и TRD, 33 и 23; для других аминокислот - ассиметричное: лизин, соответственно, 13 и 28, серин, соответственно, 27 и 11.

Литература

1. Ворсанова С.Г., Соловьев И.В., Юров И.Ю., Демидова И.А., Берешева А.К., Колотий А.Д., Монахов В.В., Кравец В.С., Юров Ю.Б. Цитогенетическая и молекулярная диагностика различных форм умственной отсталости у детей. // Южно-Российский Медицинский Журнал. — 2004. — №2. — С. 61-66.
2. Всеобъемлющие согласованные усилия по лечению всего спектра нарушений, связанных с аутизмом/ доклад Секретариата Исполнительного комитета Всемирной организации здравоохранения. // 133-ая сессия. — 08.04.2013.
3. Казанцева, Л. З. Синдром Ретта у детей / Л. З. Казанцева, Ю. Улас // Лечащий врач. — 1998. — №6. — С. 138-145.
4. Официальный сайт Международной Ассоциации синдрома Ретта [Электронный ресурс]/ International Rett's syndrome Association.- Research.- 2014 Symposium.- Режим доступа: <http://www.rettssyndrome.org>.
5. Юров И.Ю., Ворсанова С.Г., Воинова Улас В.Ю., Новиков П.В., Юров Ю.Б. / Комплексный клиникогенетический подход к диагностике синдрома Ретта у детей. // Вопросы современной педиатрии. — 2006. — т.6 — №4. — с.38-41.
6. RettBase [Электронный ресурс]/ MECP2 Mutation Data Form.-MeCP2 Mutation Database.- Режим доступа: <https://www.rettbase>.