ІІ. НОВІ ТЕХНОЛОГІЇ

УДК: 575.224:577.213/.215:57.008.7

ВИЗНАЧЕННЯ ТОЧКОВИХ МУТАЦІЙ В МІТОХОНДРІАЛЬНІЙ ДНК З ВИКОРИСТАННЯМ МЕТОДУ ПЛР І РЕСТРИКЦІЙНОГО АНАЛІЗУ

***Гусар В.А.*[1], *Гречаніна Ю.Б.*[2], *Жаданов С.І.*[3], *Шурр Т.*[3], *Гречаніна О.Я.*[2], *Фадєєва А.Л.*[2]**

Спеціалізований медико-генетичний центр[1], Харків, Україна
Інститут клінічної генетики ХНМУ[2], Харків,Україна
Департамент антропології Університету Пенсільванії[3], Філадельфія, США

Точні методи лабораторної діагностики мітохондріальних захворювань (МЗ) стали доступні тільки після повного секвенування мітохондріального генома, яке було завершене на 20 років раніше ядерного (1981р.), а також після розробки методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та методу рестрикції. Разом з тим генетичні причини виникнення ряду мітохондріальних синдромів були знайдені трохи більше 20 років тому [6,9,27], хоча деякі з синдромів були описані задовго до цих відкриттів (синдром Лебера - 1871 р. [11], синдром Лея - 1951 р. [12], синдром Кернса-Сейра - 1958 р. [10] та ін.). На сьогоднішній день встановлено, що мутації в мітохондріальній ДНК (мтДНК) відбуваються в 5 разів частіше, ніж в ядерній ДНК. Відомо більш 150 патогенних точкових мутацій і більш 100 крупних реорганізацій молекул мтДНК [7].

У зв'язку з тим, що однією з основних функцій мітохондрій в організмі людини є енергетична функція, при мітохондріальній патології, в першу чергу, вражаються тканини і органи, які споживають велику кількість енергії – мозок, серце, скелетна мускулатура, сітківка ока, ниркові канальці, ендокринні залози [1,18]. Це обумовлює і головні ознаки мітохондріальної патології – мультисистемність, прогресуючий характер захворювання. Проте патологічні стани органів при мітохондріопатіях не є специфічними, вони можуть бути обумовлені і іншими захворюваннями [1-3]. Діагностика МЗ тільки на підставі клінічної картини недостатня, для точної діагностики потрібне проведення сучасних досліджень - МРТ головного мозку, електроміографії, цитологічних досліджень біоптатів тканин, іммуногістохімічних досліджень цитохромоксидази, сукцинатдегідрогенази, НАДН, АТФ-ази та ін., а також вимірювання активності окремих мітохондріальних ферментів та їх комплексів в гомогенатах м'язів, дослідження електронно-мікроскопічними методами структури мітохондрій, дослідження полярографічними методами поглинання кисню ізольованими мітохондріями, вимірювання рівня лактату в плазмі крові та спинномозковій рідині (СМР) та неінвазивне вимірювання рівня лактату в головному мозку і СМР сучасними методами МРТ класичних біохімічних показників [2,3]. Підтверджуюча діагностика мітохондріальної патології за допомогою методів молекулярної діагностики набуває особливої актуальності.

Молекулярне дослідження повинне бути спрямованим на клінічний фенотип. Багатодисциплінарний підхід вкрай необхідний для уточнюючої діагностики МЗ, бо пацієнтів не завжди можливо зразу віднести до одного із клінічно визначених синдромів. Пошук мутацій спеціалістами молекулярної діагностики потребує знання клінічного діагнозу.

На підставі пошуку точкових мутацій мтДНК у 32 пацієнтів із певними клінічно визначеними МЗ, ми доводимо складність уточнюючої молекулярної діагностики і її високу діагностичну ефективність. Наводиться описана вперше в Україні

мутація 12706C ND5 мтДНК, асоційована із синдромом Лея (Leigh syndrome).

Метою дослідження був пошук точкових мутацій у мітохондріальному геному пацієнтів із клінічно встановленим діагнозом МЗ.

Матеріали і методи. В обстеженій групі з 32 пацієнтів з підозрою на мітохондріальну патологію була проведена комплексна: клінічна, біохімічна і молекулярна діагностика. Така кількість пацієнтів була відібрана із 182 обстежених з підозрою на МЗ на підставі наявності у них клінічно встановлених нозологічних форм МЗ. Спектр досліджених мутацій визначався клінічними формами і частотою певних мутацій. Молекулярне дослідження біологічних зразків пацієнтів виконувалось в Департаменті антропології Університету Пенсільванії (Prof. T.G.Schurr, Ph.D., MD. S.I.Zhadanov, Філадельфія, США), в лабораторії цитоплазматичної спадковості Інституту генетики і цитології НАН Білорусі (проф. Н.Г.Даниленко), в лабораторії молекулярної діагностики ХСМГЦ (к.мед.н. В.А.Гусар, м.н.с. А.Л.Фадєєва).

Таблиця 1.

Спектр досліджуваних мутацій мтДНК в групі пацієнтів

Мутація	Синдроми	Кількість досліджених зразків
T8993G в гені ATP6	Синдром Лея і синдром NARP	9
A8344G в гені тРНК ^{lys}	Синдром MERRF	7
A3243G в гені тРНК^{leu}	Синдром MELAS	27
Делеція крупного фрагмента молекули мтДНК	Синдром Кернса – Сейра, синдром Пірсона, прогресуюча зовнішня офтальмоплегія	6

В якості біологічного матеріалу використовувалася ДНК, виділена з лейкоцитів периферичної крові. Виділення ДНК проводили з використанням тест-системи НПФ «ЛІТЕХ», а також фенол-хлороформною екстракцією. Для виявлення мутацій мтДНК застосовували метод ПЛР з подальшою рестрикцією. Ампліфікацію проводили у відповідності до протоколів дослідження. Рестрикційний аналіз проводили з використанням наступних рестриктаз: *HAE III, Msp1, Bgl1* (НПО «Ферментас»). Результати детектували у агарозному (2-3%) та акриламідному гелях.

Делеції в мтДНК досліджували двома методами: методом Long PCR і методом із застосуванням трьох праймерів, який був розроблений в лабораторії цитоплазматичної спадковості Інституту генетики і цитології НАН Білорусі. Для long PCR використовувалися два специфічних праймера з послідовностями, гомологічними ділянкам за межами делеції (F і R) (рис. 1а). В результаті застосування даної методики у разі відсутності делеції синтезується фрагмент мтДНК завдовжки 10,2 т.п.н., а за наявності тієї або іншої делеції синтезуються фрагменти меншого розміру.

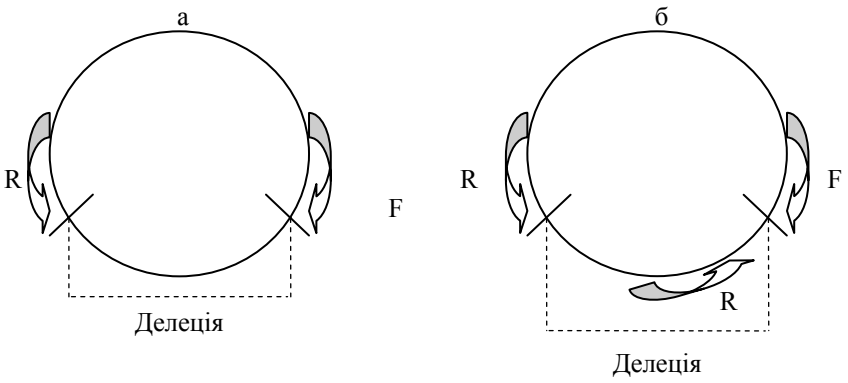


Рис. 1. а) Схематичне зображення праймерів для виявлення делецій мтДНК методом long PCR; б) Схемне зображення праймерів для виявлення найпоширенішої делеції мтДНК методом з більш низькими вимогами до

Методика із застосуванням трьох праймерів дозволяє виявляти найбільш поширену делецію (виявляється ~ у 30 % пацієнтів, які страждають на синдром Кернса-Сейра): послідовність прямого праймера (F) гомологічна ділянці за межами делеції, послідовність одного зворотного праймера (R1) – гомологічна стрічній ділянці за межами делеції, а послідовність другого зворотного праймера (R2) гомологічна ділянці делеції (рис.1б). Умови ампліфікації були підібрані таким чином, що довга ділянка FR1 не синтезувалася. В результаті, за відсутності делеції синтезуються два фрагменти ДНК – FR1 (короткий, без синтезу ділянки можливої делеції) і FR2, а за наявності делеції – тільки один фрагмент FR1.

Результати та їх обговорення. Молекулярно-генетичне дослідження синдрому Лея і синдрому проводилось у відповідності з вищеописаною методикою. Результати ампліфікації представлені на рис. 2.

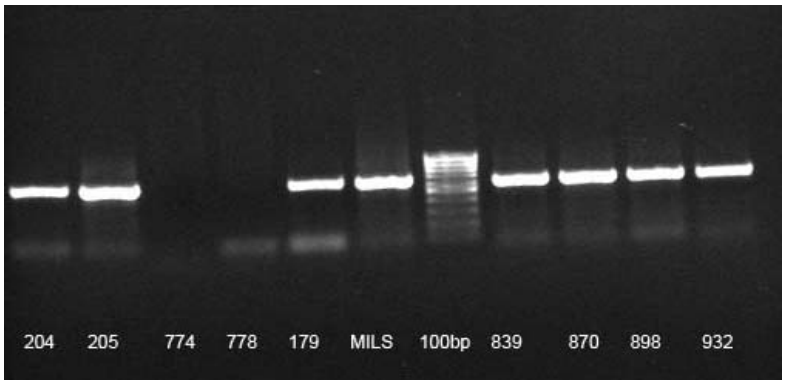


Рис.2. Перевірка ампліфікації в агарозному гелі: 774, 778 – ампліфікація не пройшла; MILS(синдром Лея) – контрольний зразок з мутацією; 100 bp – маркер довжини фрагментів; 204, 205, 179, 839, 870, 898, 932 – ампліфікація пройшла успішно.

Подальша рестрикція не виявила мутацію T8993G в гені ATP6. Результати представлені на рис.3

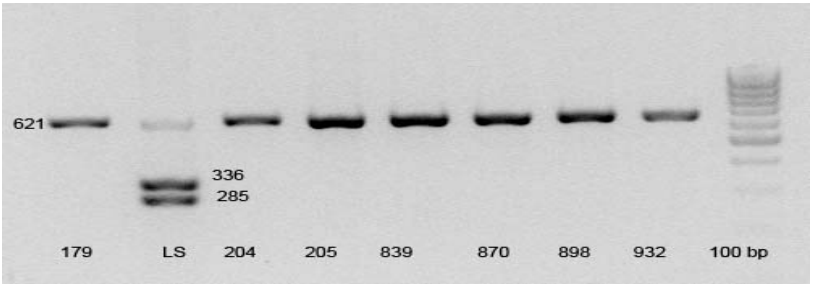


Рис.3. Рестрикційні фрагменти в поліакріламідному гелі при дослідженні на мутацію T8993G в гені ATP6: 621 – довжина фрагмента без мутації (п.н), 336, 285 – довжини фрагментів, на які рестриктаза розрізає ген за наявності мутації (п.н.); 179, 204, 205, 839, 870, 898, 932 – досліджувані зразки без мутації, LS (MILS) – контрольний зразок з мутацією; 100 bp – маркер довжини фрагмента 100-1000 п.о.

Результати дослідження міссенс-мутації A8344G в гені тРНК^{lys} на синдром MERRF представлені на рис.4 і 5.

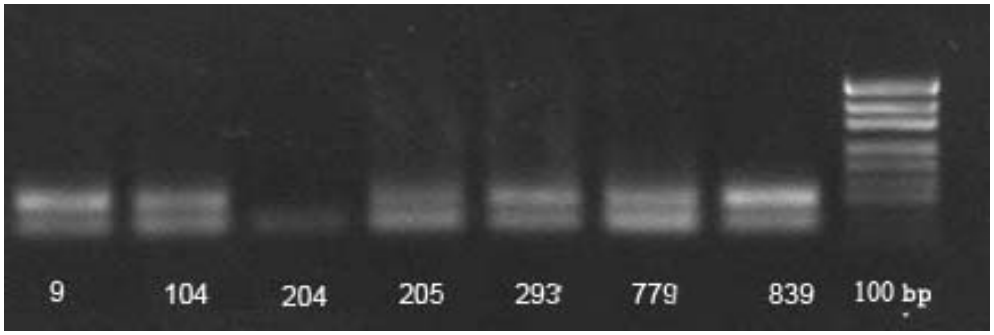


Рис. 4. Перевірка ампліфікації: 204 – ампліфікація не пройшла; 100 bp – маркер довжини фрагментів; 9, 104, 205, 293, 779, 839 – ампліфікація пройшла успішно.

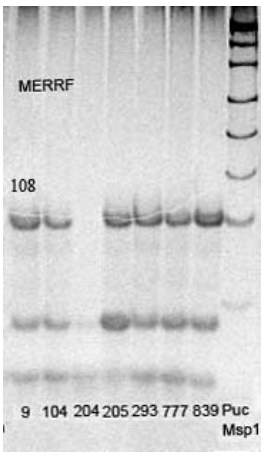
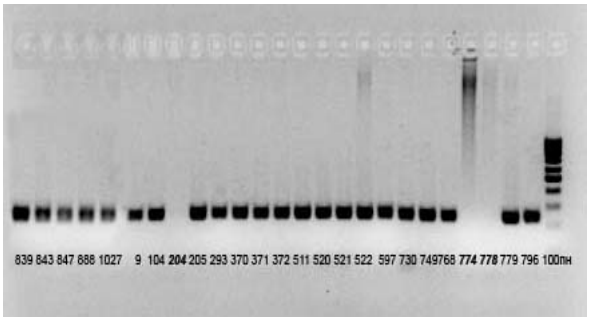


Рис. 5. Рестрікційні фрагменти в поліакріламідному гелі при дослідженні A8344G міссенс-мутації в гені тРНК^{lys} мтДНК: 108 – довжина фрагмента без мутації (п.н.) (за наявності мутації рестриктаза розрізає ген на фрагменти з довжинами 73 і 35 п.н.); 204 – зразок, ампліфікація якого не пройшла; 9, 104, 205, 293, 777, 839 – досліджувані зразки без мутації; PUC Msp1 – маркер довжини фрагмента 100 – 1000 п.н.

Результати молекулярно-генетичного дослідження мутації A3243G в гені тРНК^{leu} на синдром MELAS представлені на рис.6 та 7.

Рис. 6. Перевірка ампліфікації: 204, 774, 778 – ампліфікація не пройшла; 100 п.н. – маркер довжини фрагментів; 9, 104, 205, 293, 370, 371, 372, 511, 520, 521, 522, 597, 730, 749, 768, 779, 796, 839, 843, 847, 888, 1027 – ампліфікація пройшла успішно.



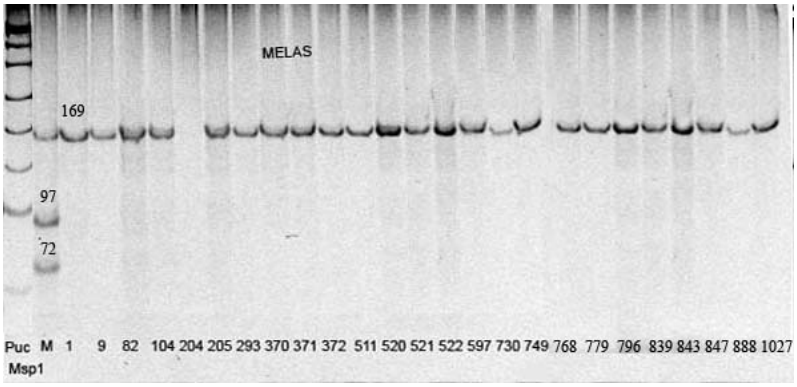


Рис.7.Рестрикційні фрагменти в поліакріламідному гелі при дослідженні мутації A3243G в гені мРНК^{leu} мтДНК: 169 – довжина фрагмента без мутації (п.н.); 97, 72 – довжини фрагментів, на які рестриктаза розрізає ген за наявності мутації (п.н.); М – контрольний зразок, узятий у гетероплазматичного носія мутації A3243G з переважанням копій мутантів мРНК^{Leu}; 204 – зразок, ампліфікація якого не пройшла; 1, 9, 82, 104, 205, 293, 370, 371, 372, 511, 520, 521, 522, 597, 730, 749, 768, 779, 796, 839, 843, 847, 888, 1027 – досліджувані зразки без мутації; PUC Msp1 – маркер довжини фрагмента.

Молекулярно-генетичне дослідження мутацій (делецій) на синдром Кернса-Сейра, синдром Пірсона і синдром прогресуючої зовнішньої офтальмоплегії проведене з використанням методу Long PCR.

Дослідження зразків на наявність делецій мтДНК не виявило результатів, оскільки реакція ампліфікації не пройшла (рис. 8). Це може бути зв'язано з тим, що виділення ДНК з використанням тест-систем не завжди забезпечує вихід ДНК належної якості, або з тим, що якість ДНК знизилася в результаті тривалого зберігання.

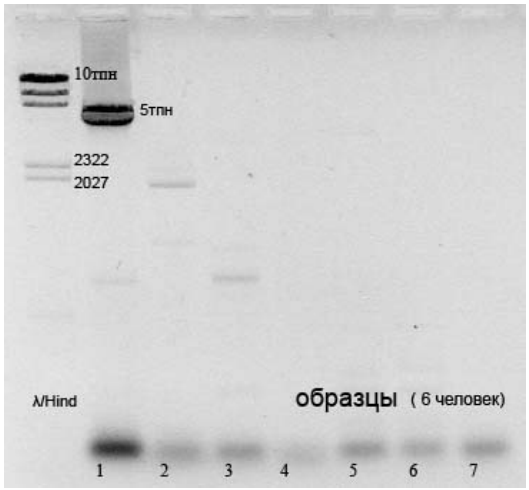


Рис. 8. Результати ампліфікації ДНК: 10 т.п.н. – довжина фрагмента без делеції; 5т.п.н. – довжина фрагмента за наявності делеції; 1 – контрольний зразок мтДНК з делецією; 2, 3, 4, 5, 6, 7 – досліджувані зразки, ампліфікація яких не пройшла (немає ні фрагмента завдовжки 10т.п.н., ні фрагментів більш короткої довжини λ/Hind– маркер довжини фрагмента 1т.п.н. – 10т.п.н.

При проведенні методу з використанням трьох праймерів найбільш поширеної делеції в зразках виявлено не було (рис. 9).

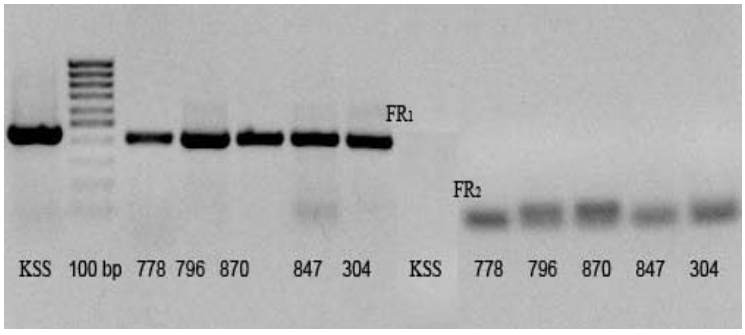


Рис.9. Ампліфікована ДНК в агарозному гелі: FR1 – ділянка ДНК, що складається з фрагментів, розташованих за межами можливої делеції; FR2 –фрагмент можливої делеції, що містить; KSS – контрольний зразок мтДНК з делецією; 778, 796, 870, 874, 304 – досліджувані зразки; 100 bp – маркер довжини фрагмента.

Дослідження окремих точкових мутацій мтДНК, асоційованих із синдромами MERRF, MELAS, синдромом Кернса-Сейра, Пірсона та синдромом прогресуючої зовнішньої офтальмоплегії не дали позитивних знахідок, тому результати подальшого вивчення будуть надані в інших публікаціях.

З 2002 року в рамках спільного проекту «Всебічний аналіз епідеміології та механізмів експресії мітохондріальних хвороб у слов'янських популяціях східної України» з лабораторією молекулярної генетики й генетики розвитку людини при Інституті цитології й генетики Сибірського відділення РАН (м.Новосибірськ, Росія) і Департаментом антропології Університету Пенсільванії (м.Філадельфія, США) проведений детальний скринінг патогенних мутацій мтДНК і дослідження стану енергетичного обміну у обстежених хворих.

Мітохондріальна NADH-Хінон оксідоредуктаза (комплекс I дихального ланцюга; EC 1.6.99.3) - один з більших і найбільш складних міжмембранних ферментних комплексів. Цей фермент каталізує перенос електронів від NADH до убіхінону й переміщає протони з мітохондріального матрикса в міжмембраний простір. Потік електронів і протонів створює електрохімічний градієнт на внутрішній стороні мітохондріальної мембрани, що забезпечує функціонування протонного насоса, який використовується при синтезі АТФ. Комплекс I складається, принаймні, з 43 різних субодиниць, сім з яких кодуються мтДНК (позначуваних ND1-6 і 4L), а інші - ядерною ДНК. Однак, скоординовані взаємодії між ядерним геномом і мітохондріальним, які забезпечують роботу цього життєво-необхідного комплексу протеїнів, залишаються до кінця не вивченими.

Спостереження над мітохондріальною патологією свідчить про значну питому вагу нейродегенеративних захворювань серед мітохондріопатій. Серед причин нейродегенеративних захворювань мітохондріального ґенезу дефіцит комплексу I дихального ланцюга був описаний у випадках нейродегенеративних розладів із пізньою маніфестацією, таких як хвороба Паркінсона, а також при важких неврологічних станах у немовлят і дітей грудного віку, що частіш за все проявляються синдромом Лея. За свідченням Liolitsa D. et.al [13] у пацієнтів із синдромом Лея зустрічаються різні ядерні генні дефекти і мутації мтДНК. Частіше за все – це мутації у мтДНК, які відбуваються в гені ND5, що, на думку авторів, дозволяє вважати ген ND5 «гарячою точкою» при мітохондріопатіях. Більшість таких мутацій описані як унікальні генетичні дефекти з неоднозначними патогенетичними ролями, оскільки не була доведена їхня асоціація з фенотипом синдрому Лея. Механізми експресії описаних мутацій все ще залишаються нез’ясованими. A.Morgan-Hughes J.A., Hanna M.G. [16] описали мітохондріальні енцефаломіопатії та припустили, що додатковими механізмами, які визначають фенотипічну експресію, можуть бути генетичний фон і екологічний фактор.

Наше спостереження (хвора Г.), яке наводиться, є випадком виникнення *de novo* гетероплазмічної мутації 12706C ND5 у хворої, у якої клінічно маніфестував фатальний синдром Лея з незвичайним симптоматичним ушкодженням і асиметрією головного мозку. Раніше мутація 12706C була описана як причина істотного зменшення активності комплексу I у пацієнтів із Лея-подібним синдромом [20] і припущення її ролі у розвитку ідіопатичної хвороби Паркінсона. Між іншим, ще в 1996 Miller і Kelly підтвердили асоціацію гіпергомоцистеінемії із хворобою Паркінсона, але на це не звернули увагу дослідники в подальшому.

Проведений філогенетичний аналіз позитивних випадків з мутацією 12706C, який продемонстрував, що всі мутації відбулися при різних гаплогрупах мтДНК шляхом незалежних мутаційних подій. Даний аспект мутації 12706C підтверджує її патогенетичне значення в розвитку синдрому Лея і вказує на її істотну роль

при нейродегенеративних захворюваннях у різних родинах. Ми розглянули «злоякісні» мутації гена ND5 мтДНК і припустили, що деякі з них можуть мати загальні механізми експресії, які зачіпають функціонально важливі аспекти.

Клінічний опис випадку (табл.2).

Таблиця 2.

Характер маніфестації та клінічні ознаки *de novo* гетероплазмічної мутації 12706C гену ND5 у хворої Г. з синдромом Лея

Періоди онтогенезу		Ознаки
проембріональний		Без преконцепційної підготовки. У матері – часті інфекції. Вегето-судинна дистонія.
ембріональний		Загроза переривання
антенатальний		Переношена вагітність. Пізній гестоз.
постнатальний	1 рік	відставання в психомоторному розвитку, неврологічні зміни – пірамідна недостатність, недостатня надбавка у вазі.
	2 роки	+ помірна лікворна гіпертензія
	7 років	Пневмонія, пароксизм важкої гіперактивності і гіпертензії (240/140 мм рт. ст), синусова тахікардія (ЧСС – 160-180), перманентна гіперглікемія, булімія, полідипсія, поліурія, біль в черевній і грудній порожнині, загальна слабкість
	7 років 1 міс.	В стаціонарі – гіповентиляція, центральні неврологічні порушення, правостороння м'язова гіпотонія, підвищення сухожильних рефлексів з рук справа, зниження – з ніг, позитивний с. Бабінського зліва, правосторонній парез VII пари ЧМН, екзотропія і ністагм. Свідомість ясна. Двостороння дольова пневмонія. Виділена E.coli. Брадіпное, загрожуюча гіпоксія. Назотрахеальна вентиляційна підтримка. МРТ: зміна густини спинномозкової рідини в лівій внутрішній капсулі, пошкодження правого базального ганглія, кортикальний ішемічний інфаркт, кортикальна гіпотрофія в лобово-скроневій області. Зупинка серця. Кардіопульмональна реанімація, відновлення спонтанної серцевої діяльності. Стабілізація стану.
	7 років 2 міс.	Ефективна інтенсивна медикаментозна терапія. Розвинувся персистуючий резидуальний геміпарез.
	7 років 3 міс.	Прогресуюча серцева недостатність. Легенева гіповентиляція. Низький діурез. Зниження маси тіла. Субфібрилітет, задишка, розлитий черевний біль. Двостороння дифузна інфільтрація легенів (Pseudomonas aeruginosa), пірамідна недостатність, бульбарні порушення, пригнічений кашельний рефлекс і повна відсутність ковтальних рефлексів. Трахеотомія. ІВЛ. Промивання бронхів. При ЕхоКГ: легенева гіпертензія, дилятація правих відділів серця, трікуспідальна регургітація IV ст., гіпертрофія міокарду правого і дискенезія лівого шлуночка, перикардіальний випот. WPW-синдром. КТ: множинні кісти, коркова атрофія, гідроцефалія з обмеженим ліквороводтоком. УЗД: токсичний набряк паренхіми печінки, нирок і підшлункової залози. Підвищення рівня ОА.

	7 років 5 міс.	2-місячна госпіталізація позитивно вплинула на поліпшення серцевого викиду, регрес пневмонії, поліпшення неврологічного статусу. Батьки відмовилися від подальшого лікування.
	7 років 10 міс.	Хвора померла на фоні інтермітуючої пневмонії і зупинки серця.

Молекулярно-генетичні дослідження.

Із зразків крові пробанда і її матері була виділена тотальна геномна ДНК. ДНК, виділена з м'язової тканини в позитивному випадку з мутацією 12706С (випадок пробанда F.), описаному раніше, була люб'язно надана нам доктором A.Munnich и S. Lebon, для проведення порівняльного аналізу.

МтДНК аналізувалася за допомогою саузерн-блотт гібридизації, з наступною рестрикцією ферментами *SnaBI* и *PvuII*, для виключення мутацій/перебудов мтДНК, що часто зустрічаються. Регіон, що кодує мтДНК, був ампліфікований зі специфічним набором праймерів на ділянки, що перекриваються, розміром 3 - 4 Кб в обох пробандів. Обидва зразки були секвеновані з використанням BigDye Terminator Pre-Mix kits, v3.1 (Applied Biosystems), очищені з використанням Centri-Sep columns (Princeton Separations) і розігнані на секвенаторі ABI 3100 Gene Analyzers у Центрі Секвенування відділу генетики Університету Пенсільванії. Сиквенсові файли були впорядковані з використанням програми Sequencher 3.1 (GeneCodes Corp.) і рівнялися зі стандартною Кембриджською послідовністю (Cambridge Reference Sequence, CRS). Наявність мутації 12706С ми підтверджували, використовуючи метод мутаційно-специфічної рестрикції з ферментом *BsaXI* з наступної ПЛР-ампліфікацією фрагмента 460 п.н. (позиції 12385-12845 т.п.н.). Крім того, був проведений скрінінг на мутацію ND5 серед 187 здорових осіб і пацієнтів з мітохондріальною хворобою, що підходять по гаплогрупам, обраних серед учасників з інших біомедичних проектів.

Кількісне визначення рівня ДНК.

Кількість мутантної мтДНК у зразках крові і м'язової тканини визначали, використовуючи рестрикційний аналіз із надлишком ферменту *BsaXI*. Провели розподіл зразків в агарозному гелі та проаналізували шляхом лазерної денситометрії після фарбування етидіумом броміду. Рівень гетероплазмії був оцінений по фактичній піксельній інтенсивності різних фрагментів мтДНК у гелі [14].

Вторинна структура білка і молекулярне моделювання.

Вторинна структура білка ND5 була проаналізована за допомогою комп'ютерної програми Proteomics ExPASy на сервері http://us.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl). Упорядкування структури зразка дикого типу ND5, також як і мутантного зразка, було виконано з використанням *TMpred Program*, що доступна через сервер Швейцарського інституту (група біоінформатики) (<http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html>), а застосування *Kyte-Doolittle* використане для аналізу гідропатії. Всі гідропатії як для білка дикого типу, так і для мутантного білка, були обчислені при розмірі рамки 9.

У цілому з GenBank були взяті 974 амінокислотні послідовності і упорядковані з використанням CLUSTAL W, відповідно до протоколу UniProtKB (http://www.ebi.uniprot.org). Послідовності *ND5/NuoL/MnhA*, відібрані для упорядкування, включали наступні послідовності: *Homo sapiens* ND5 (P03915), *Bos taurus* (P03920), *Gallus gallus* (P18940), *Xenopus laevis* (P03922), *Salmo salar* (Q9ZZM3), *Brachydanio rerio* (Q9MIY0), *Strongylocentrotus purpuratus* (P15552), *Drosophila melanogaster* (P18932), *Triticum aestivum* (Q37680), *Neurospora crassa* (P05510), *Rhodobacter capsulatus* (RRC00609). Метод PHD був

використаний для визначення вторинної структури (<http://www.predictprotein.org>).

Визначення PSI-BLAST ND5 області (домена) проводилося з використанням великої бази даних (nrdb90), включаючи послідовності з *Pfam-A*, інформація про які доступна на сервері *The DomPred Protein Domain Prediction* (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/dompred/>).

Філогенетичний аналіз.

Данні секвенування мтДНК родин пробандів і контрольних осіб при проведенні популяційного дослідження були проаналізовані за допомогою філогенетичного аналізу NETWORK [4], щоб визначити еволюційні відносини між гаплотипами, що мають мутацію 12706C. Філогенетична мережа спочатку була побудована з використанням серединного алгоритму (reduced-median algorithm) [4] і потім змінена вручну.

Клінічний профіль.

Більшість мутацій ND5 часто призводять до розвитку різних нейродегенеративних синдромів з варіабельністю клінічних ознак [5,13], що вказує на залучення систем органів при наявності декількох генетичних дефектів. Коркова атрофія гемісфер, залучення базальних гангліїв, часте ушкодження стовбура мозку з відсутністю життєвих рефлексів, ділятаційна кардіоміопатія неодноразово спостерігалися при синдромі Лея [12, 17, 21] і з'явилися підставою для постановки діагнозу у випадку, описаному нами.

Початкова маніфестація синдрому Лея із симпатичним кризом впливає на ушкодження таламічних ядер і входить у список патогенних форм "діенцефальної епілепсії", розширюючи клінічну гетерогенність цього синдрому. З іншого боку, спостережувана автономна відповідь може бути наслідком раніше існуючого гідроцефального стану. Синдроми серцевих аритмій досить часто спостерігаються серед пацієнтів з мітохондріальними порушеннями [19,30], також часто відзначаються у пацієнтів, обтяжених мутацією ND5 мтДНК [25]. Ці спостереження припускають, що мутації мтДНК і порушений енергетичний метаболізм відіграють схильну роль у розвитку аритмій.

Генетичний і філогенетичний аналізи.

Секвенування регіону, що кодує, мтДНК пробанда Г. виявило 24 основні нуклеотидні заміни в порівнянні з CRS (табл.3). МтДНК пробанда мала поліморфні сайти, які характерні для гаплогрупи X2e. Ця лінія мтДНК бере початок у Південній Сибірі, і також часто спостерігається у жителів Кавказу [22].

Тільки мутація мтДНК у пробанда Г. транзиція T→C у позиції 12706, привела до заміни на рівні трансляції 124-ого ароматичного залишку фенілаланіну на аліфатичний лейцин, що розташований у трансмембранній спіралі, знайдені за допомогою методу PHD.

Таблиця 3.

Нуклеотидні заміни в позитивних випадках з мутацією 12706C мтДНК у пробанда Г. і пробанда F. в порівнянні з CRS (Andrews і ін. 1999)

Сайт	Ген	Амінокислотна заміна	Випадки з мутацією 12706C		Коментарі
			Пробанд Г.	Пробанд Ф.	
750G	12SrRNA	-[a]	+	+	поліморфізм
1291C	12SrRNA	-	+	-	нова[b]
1438G	12SrRNA	-	+	+	поліморфізм
1719A	16SrRNA	-	+	-	поліморфізм
2706G	16SrRNA	-	+	-	поліморфізм
3381G	ND1	-	-	+	нова
4769G	ND2	-	+	+	поліморфізм

6221C	COI	-	+	-	поліморфізм
6267A	COI	-	+	-	поліморфізм
6371T	COI	-	+	-	поліморфізм
7028T	COI	-	+	-	поліморфізм
8260C	COII	-	-	-	поліморфізм
8860G	ATP6	T/A	+	+	поліморфізм
8888C	ATP6	I/T	-	+	нова
9966A	COIII	V/I	-	+	нова
11719A	ND4	-	+	-	поліморфізм
11932T	ND4	-	+	-	поліморфізм
12705T	ND5	-	+	-	поліморфізм
12706C	ND5	F/L	+[c]	+[c]	делетована
13135A	ND5	A/T	+	-	поліморфізм
13966G	ND5	T/A	+	-	поліморфізм
14470C	ND6	-	+	-	поліморфізм
14470A	ND6	-	-	+	поліморфізм
14766T	CytB	I/T	+	-	поліморфізм
14890G	CytB	-	-	+	нова
15034G	CytB		+	-	поліморфізм
15310C	CytB		+	-	поліморфізм
15326C	CytB	T/A	+	+	поліморфізм
15397G	CytB	-	+	-	нова
15894A	$tRNA^{Thr}$	-	+	-	поліморфізм

Поліморфні сайти були визначені щодо бази даних мітохондріального генома людини [<http://www.genpat.uu.se/mtDB/index.html>].
Примітки: (a) = відсутність амінокислотної заміни; (b) = нова мутація, характерна визначеній гаплогрупі мтДНК; (c) = стан гетероплазмії.

Філогенетичний аналіз поліпептидної послідовності ND5 різних зразків показав, що залишок фенілаланіну розташовувався в еволюційно консервативній області (рис. 10). Мутаційно-специфічний PCR-RFLP (ПЛР-ПДРФ) аналіз мутації 12706C і секвенування мітохондріального генома встановили, що ця мутація перебуває в стані гетероплазмії (мутаційний поріг ~ 50 %) у пробанда, але повністю відсутня в крові матері пробанда (рис.11, лінії 1 і 2). Ці дані з'явилися свідченням на користь гіпотези про найбільш імовірне виникнення *de novo* мутації 12706C у зародкових клітинах матері пробанда.

У випадку синдрому Лея у пацієнта F. мтДНК також містила мутацію 12706C у стані гетероплазмії (рис. 11, лінія 3). Однак, мтДНК цього пацієнта містила трансверсію в позиції 14470A, вказуючи на приналежність до Західноєвразійскої гаплогрупи H10, і відрізнялася від послідовності мтДНК пробанда Г. більш ніж на 22 SNP (табл. 3; рис. 12). На жаль, детальна генетична інформація не була доступна для першого описаного позитивного випадку мутації 12706 (випадок пробанда E.,[26]). Однак, кавказьке походження цього пацієнта і присутність цитозіну в позиції 12705, дозволило нам зробити висновок, що мутація мтДНК у пробанда E., ймовірно, належить Західноєвразійській гаплогрупі R [26] (рис. 12).

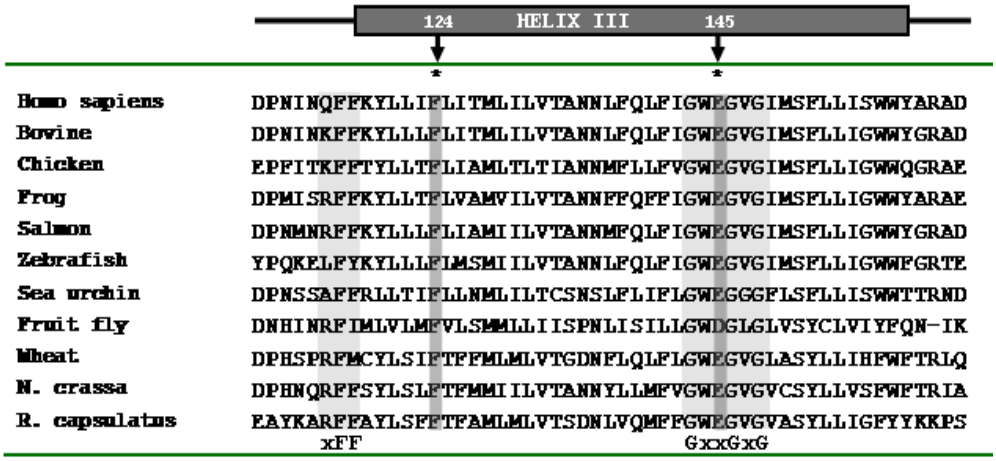


Рис.10. Еволюційно консервативна ділянка трансмембранної спіралі III ND5, що має мутації синдрому Лея. (*) - вказує на сайти, відповідальні за виникнення синдрому Лея і хвороби Паркінсона. Функціонально важливі сайти заштриховані. Нуклеотидні послідовності Homo sapiens ND5 (NU5M_HUMAN; номер доступу P03915), Bos taurus ND5 (Bovine; номер доступа P03920), Gallus gallus ND5 (Chicken; номер доступу P18940), Xenopus laevis ND5 (Frog; номер доступу P03922), Salmo salar ND5 (Salmon; номер доступу Q9ZZM3), Brachydanio rerio ND5 (Zebrafish; номер доступу Q9MIY0), Strongylocentrotus purpuratus ND5 (Sea urchin; номер доступу P15552), Drosophila melanogaster ND5 (Fruit fly; номер доступу P18932), Triticum aestivum ND5 (Wheat; номер доступу Q37680), Neurospora crassa ND5 (N.crassa; номер доступу P05510), Rhodobacter capsulatus NuoL (R. capsulatus; номер доступу RRC00609), номер доступу для кожної певної послідовності білка представлений згідно протоколу UniProtKB (<http: // www.ebi.uniprot.org>).

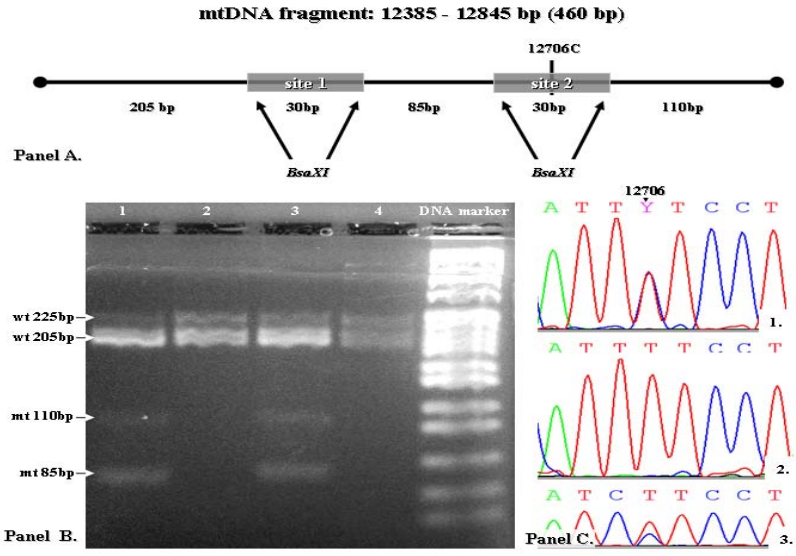


*Рис.11. Схематичний огляд методу PCR-RFLP (ПЛР-ПДРФ) по виявленню мутації 12706C. **Панель А.** Діаграма ампліфікованого фрагмента мтДНК із вказівкою положення сайту рестрикції BsaXI. У дикому типі мтДНК відсутній другий рестрикційний сайт BsaXI, що призводить до розподілу на 3 фрагменти по 225, 205, і 30 п.н. При наявності мутації 12706C в рестрикційному сайті BsaXI відбувається розділення на п'ять фрагментів по 205, 110, 85, 30, і 30 п.н. **Панель В.** Зображення ампліфікованого фрагмента гена ND5 з рестрикцією BsaXI в гелі. Пробанди Г. і F. (лінії 1 і 3) містять комбінацію молекул мутантного і дикого типів, у той час як, у матері пробанда Г. (лінія 2), як і в негативному контролі (лінія 4), спостерігаються тільки смуги дикого типу з відсутністю мутації. **Панель С.** Представлена електрофореграма пробанда Г. (1), його матері (2), і пробанда F. (3), з нумерацією ліній, що відповідає панелі В.*

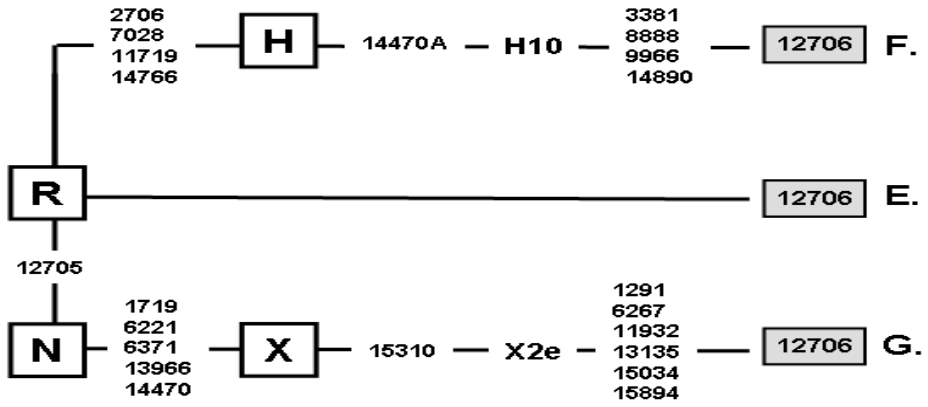


Рис.12. Філогенетичні відносини між різними гаплотипами, що мають мутацію 12706C. Для побудови цієї мережі були використані тільки послідовності, що кодують.

Гаплотипи мтДНК пробанда F., пробанда Г. і пробанда Е. представлені з мутацією 12706C. Основні філогенетичні галузі, яким належать ці гаплотипи мтДНК, позначені в квадратах.

Було також проскриновано 200 здорових осіб (КГ) і пацієнтів з мітохондріопатією, що мають гаплогрупи H і X, з нашої бази даних на мутацію 12706C, але вона не була виявлена (дані не наведені). Крім того, нами не було знайдено даних по мутації 12706C ND5 у великій базі даних, що містить повну інформацію про більш ніж 2 400 нуклеотидних послідовностях мтДНК (mtDB <http://www.genpat.uu.se/mtDB/index.html>) . Генетичні заміни, що могли, можливо потенційно змінити кодон F124, також не були знайдені.

Патогенетичні механізми мутації ND5.

Хоча периферичний, NADH-фрагмент комплексу I, що окисляє, був досить інтенсивно вивчений, роль мембранної області (домена), що кодує мтДНК, до кінця не з'ясована. Фізіологічна важливість субодиниці ND5 очевидна зі спостережень, що активність комплексу I повністю регулюється експресією гена ND5, а субодиниця ND5 відіграє істотну роль в активації комплексу I.

Огляд наявних даних свідчить про те, що ген ND5 мутує, в основному, з більш десятьма замінами в мтДНК, які описані в асоціації з мітохондріальними цитопатіями. Залучення периферичної і центральної нервової системи, яке часто спостерігається при синдромі Лея [25] і його сполученому варіанті синдром Лея/MELAS [5] припускає існування загальних механізмів експресії дефектів ND5.

Ми провели вивчення вторинної структури субодиниці ND5 і проаналізували її передбачувані функціональні ділянки, у яких могли виникнути патогенні мутації, щоб пояснити механізми їхньої експресії. Використовуючи метод *PHD*, ми показали, що поліпептид ND5 охоплює, принаймні, 12 трансмембранних петель, тісно з'єднаних із внутрішньою мембраною мітохондрії (дані не наведені). Визначення *PSI-BLAST* області (домена) далі показало, що ND5 складається із трьох головних функціональних доменів (число PSIBLAST = 1000), перший, з яких, локалізований в III трансмембранній спіралі білка (рис.13). Цей регіон специфічно зачіпає мутація F124L в ND5, що проявляється важкими нейродегенеративними змінами у пацієнтів із синдромом Лея, а також пов'язана з різними дефектами в E145G при синдромі Лея [13].

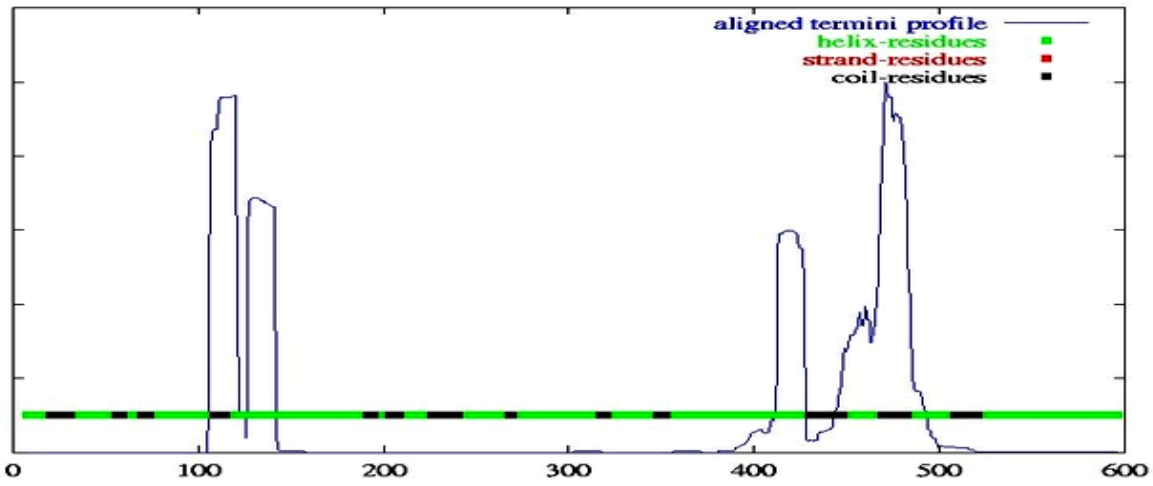


Рис.13. Визначення PSI-BLAST області (домена) білка ND5, розраховане для 3 доменів DPS [15].

Центральний фрагмент субодиниці ND5 людини, що охоплює трансмембранну петлю III і VIII, вказує на високу подібність до Na^+/H^+, як найбільш консервативна область серед різних зразків (рис. 10, див. також дані NuoL в [24]). Високий ступінь подібності гомологів ND5 (*Ngo12/NuoL*) і субодиниці A багатокомпонентного катіона/H+, привела до припущення, що ND5 забезпечує протонний канал у комплексі I [8]. Група Tsuchiya висунула гіпотезу, що амінокислотна послідовність *VFF* - один з варіантів білка, що може бути залучений у зв'язування Na^+, і ймовірно, відіграє помітну роль у протонному інгібуванні амілорідом ND5 бика. В ND5 людини амінокислотна послідовність *VFF* відсутня, але знайдена послідовність, що має, принаймні, три *FF*-сайти ($Q_{116}FF$, $A_{333}FF$, *и* $S_{590}FF$). Із цих трьох, сайт $Q_{116}FF$ розташований в області, суміжній із трансмембранною петлею III і вище залишку E124, у якому перебуває мутація 12706C (рис. 10).

Експериментальні дані далі демонструють, що *DCCD* (*N,N'-dicyclohexylcarbodiimide*) інгібірує перенос електронів і H+ у комплекс I. Цей процес інгібірування, як вважають, є наслідком специфічної блокади високо консервативного карбоксільного залишку, що бере участь у протонному транспорті. Варто вказати на те, що ця ділянка також перебуває в трансмембранній спіралі III субодиниці ND5 і входить до складу карбоксільного залишку E145 (ND5 бика/ ND5 людини) [28]. У пацієнтів із синдромом Лея E145 заміщений на G [13]. Далі було відзначено, що сайт E145 розташований у межах еволюційно високо консервативної області *GWEGVGI*, що є головною поєднуючою для *NAD(P)H* і *FAD, [GXGXXG]*, у ротенон-нечутливої бактеріальної *NADH (NDH-2)* дегідрогенази 2 типу (рис. 10).

Зовсім недавно область ND5 у межах спіралі III була описана як повна гетероплазмічна мутація мтДНК у тканині мозку пацієнтів із хворобою Паркінсона, і є одним з можливих факторів, що впливає на патогенетичний механізм ідіопатичної хвороби Паркінсона [20]. Найбільш специфічно те, що мутації F124L і E145G при синдромі Лея є найпоширенішими в таких тканинах, і, вочевидь, є причиною системного дефекту комплексу I у пацієнтів із хворобою Паркінсона [23, 29].

Крім того, паркінсонізм може бути пов'язаний не тільки з ідіопатичними випадками хвороби Паркінсона, а й виникати, як високо гетерогенний стан із залученням генетичних і екологічних етіологічних факторів. Повідомлялося, що хронічний і системний вплив токсичного пестициду ротенона відтворює особливості клініки хвороби Паркінсона в експериментальних моделях. Хоча точний

механізм токсичного ефекту ротенона складний і залишається, при впливі *in vitro*, у значній мірі неясним, він може впливати на каталітичну ділянку, що відповідальна за відновлення убіхінону до дігідроубіхінона на останній стадії переносу електронів у комплексі I. Дослідження фотоафінності аналога фенпіроксимата і структур рентгеном припускають, що можливий інгібітор *Q* перебуває в межах комплексу I, що може містити ND5 поряд з безліччю інших субодиниць.

Виходячи із цього, ми висунули гіпотезу про те, що мутації F124L і E145G ND5 змінюють функціонально важливі сайти, які потенційно залучені в механізм переносу протонів, і це порушення являє собою первинний патогенетичний механізм експресії. Часте виникнення патологічних мутацій у трансмембранній петлі III підтримує ідею про те, що таке місце розташування впливає на функцію або структуру протонного каналу комплексу I. Таким чином, навіть малий мутаційний вантаж (менш 50% мутантної мтДНК при 12706C і 12770A) може значно впливати на його функцію. Якщо ND5 також залучений у патогенез ідіопатичної хвороби Паркінсона, вищевказаний механізм міг би пояснити мітохондріальну дисфункцію у пацієнтів із хворобою Паркінсона і зв'язок між різними нейродегенеративними синдромами, такими як, синдром Лея і хвороба Паркінсона.

Висновки. У цілому, знайдена нами мутація 12706C ND5 відповідає всім критеріям, по яких її можна вважати патологічною і є більш частою генетичною причиною нейродегенерації, ніж вважалося раніше. Саме з цієї причини, вона повинна бути включена в рутинний скринінг пацієнтів з мітохондріальними цитопатіями. Фенотипічна експресія мутації 12706C - це типові ознаки клінічної картини при синдромі Лея. У стані гетероплазмії (мутантний поріг ~ 30-50%) мутація також присутня в різних тканинах, що чітко вказує на низький генетичний поріг для фенотипічної експресії. Фактично, ця мутація неодноразово виникала, як мутаційна подія *de novo*, при різних генетичних фонах (backgrounds), кожний з яких був асоційований з фенотипами синдрому Лея. Її виникнення *de novo* повна відсутність у здорових осіб, надалі, припускає, що вона швидко усувається з популяції шляхом негативної селекції.

Крім того, мутація 12706C перетворює еволюційно високо консервативний ароматичний фенілаланін у лейцин і асоціює з істотним зменшенням активності комплексу I. Ми припускаємо, що вона торкається функціонально значимої трансмембранної області, що, імовірно, є відповідальною за функцію переносу протонів комплексу I і може мати механізми експресії, подібні з такими, при ідіопатичній хворобі Паркінсона.

Таким чином, колективу дослідників в рамках колабораторного дослідження вдалося уточнити діагноз у випадку виникнення *de novo* в одного з пацієнтів гетероплазмічної мутації 12706C ND5, асоційованої із клінічним проявом фатального синдрому Лея. Проведений філогенетичний аналіз позитивних випадків з мутацією 12706C підтвердив незалежне виникнення таких мутацій, кожна з яких була наслідком нової мутаційної події в різних мтДНК.

Дослідження виконані за підтримкою *Fight for Sight Grant-in-Aid* і *Faculty Research Funds* Університету Пенсільванії.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гречаніна Ю.Б., Гусар В.А., Мінков А.І., Григоров С.М. Ультразвукова перинатальна діагностика 2002, № 15, стор. 44—70.
2. Гречанина Ю.Б., Снарская М.В. Ультразвукова перинатальна діагностика 2005, № 19, стор. 144—156.
3. Даниленко Н.Г., Давиденко О.Г. Здравоохранение 2010, № 7, стр. 32—39.

4. Bandelt HJ, Forster P, Sykes BC, Richards MB. 1995. Mitochondrial portraits of human populations using median networks. Genetics 141(2):743-753.
5. Crimi M, Galbiati S, Moroni I, Bordoni A, Perini MP, Lamantea E, Sciacco M, Zeviani M, Biunno I, Moggio M, Scarlato G, Comi GP. 2003. A missense mutation in the mitochondrial ND5 gene associated with a Leigh-MELAS overlap syndrome. Neurology 60(11):1857-1861.
6. Goto Y., Ninaka I., Horal S. // Nature 1990, Vol. 348, p. 651—653.
7. Haas R.H., Parikh S., Falk M., et al. // Pediatrics 2007, Vol. 120, № 6, p. 1326—1333.
8. Hamamoto T, Hashimoto M, Hino M, Kitada M, Seto Y, Kudo T, Horikoshi K. 1994. Characterization of a gene responsible for the Na+/H+ antiporter system of alkalophilic Bacillus species strain C-125. Mol Microbiol 14(5):939–946.
9. Holt I.J., Harding A.E., Morgan-Hughes J.A. // Nature 1988, Vol. 331, p. 717—719.
10. Kearns T.P., Sayre G.P. // A. M. A Arch. Of Ophtalmol. 1958, Vol. 60, p. 280—289.
11. Leber T. // Arc. Ophtalmol 1971, Bd 17, S 249—291.
12. Leigh D. 1951. Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. J Neurol Neurosurg Psychiatry 14(3):216-221.
13. Liolitsa D, Powell J, Lovestone S. Is the mitochondrial complex I ND5 gene a hot-spot for MELAS causing mutations? *Ann Neurol* 2003;53(1):128-32.
14. Liu VW, Zhang C, Linnane AW, Nagley P. 1997. Quantitative allele-specific PCR: Demonstration of age associated accumulation in human tissues of the A/G mutation at nucleotide 3243 in mitochondrial DNA. Hum Mutat 9(3):265-271.
15. Marsden RL, McGuffin LJ, Jones DT. 2002. Rapid protein domain assignment from amino acid sequence using predicted secondary structure. Prot Sci 11:2814-2824.
16. Morgan-Hughes JA, Hanna MG. 1999. Mitochondrial encephalomyopathies: the enigma of genotype versus phenotype. Biochim Biophys Acta 1410:125–145.
17. Morris AA, Leonard JV, Brown GK, Bidouki SK, Bindoff LA, Woodward CE, Harding AE, Lake BD, Harding BN, Farrell MA, Bell JE, Mirakhur M, Turnbull DM. 1996. Deficiency of respiratory chain complex I is a common cause of Leigh disease. Ann Neurol 40(1):25-30.
18. Munnich A., Rotig A., Chretien D., et al. // Inherit. Metab. Dis. 1996., Vol. 19, p. 521—527.
19. Nikoskelainen EK, Savontaus ML, Huoponen K, Antila K, Hartiala J. 1994. Pre-excitation syndrome in Leber's hereditary optic neuroretinopathy. Lancet 344:857-858.
20. Parker WDJr, Parks JK. 2005. Mitochondrial ND5 mutations in idiopathic Parkinson's disease. Biochem Biophys Res Commun 326(3):667-669.
21. Rahman S, Blok RB, Dahl HH, Danks DM, Kirby DM, Chow CW, Christodoulou J, Thorburn DR. 1996. Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities. Ann Neurol 39(3):343-351.
22. Reidla M, Kivisild T, Metspalu E, Kaldma K, Tambets K, Tolk HV, Parik J, Loogvali EL, Derenko M, Malyarchuk B, Bermisheva M, Zhadanov S, Pennarun E, Gubina M, Golubenko M, Damba L, Fedorova S, Gusar V, Grechanina E, Mikerezi I, Moisan JP, Chaventre A, Khusnutdinova E, Osipova L, Stepanov V, Voevoda M, Achilli A, Rengo C, Rickards O, De Stefano GF, Papiha S, Beckman L, Janicijevic B, Rudan P, Anagnou N, Michalodimitrakis E, Koziel S, Usanga E, Geberhiwot T, Herrnstadt C, Howell N, Torroni A, Villems R. 2003. Origin and diffusion of mtDNA haplogroup X. Am J Hum Genet 73(5):1178-1190.
23. Schapira AHV, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD. 1989. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson’s disease. Lancet 1:1269.

24. Steuber J. 2003. The C-terminally truncated NuoL subunit (ND5 homologue) of the Na+-dependent complex I from Escherichia coli transports Na^+. J Biol Chem 278(29):26817-26822.
25. Sudo A, Honzawa S, Nonaka I, Goto Y. 2004. Leigh syndrome caused by mitochondrial DNA G13513A mutation: frequency and clinical features in Japan. J Hum Genet 49(2):92-96.
26. Taylor RW, Morris AA, Hutchinson M, Turnbull DM. 2002. Leigh disease associated with a novel mitochondrial DNA ND5 mutation. Eur J Hum Genet 10(2):141-144.
27. Wallace D.C., Singh G., Lott M.T., et al. // Science 1998, Vol. 242, p. 1427—1430.
28. Yagi T, Matsuno-Yagi A. 2003. The proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase in the respiratory chain: the secret unlocked. Biochemistry 42(8):2266-2274.
29. Yoshino H, Nakagawa-Hattori Y, Kondo T, Mizuno Y. 1992. Mitochondrial complex I and II activities of lymphocytes and platelets in Parkinson's disease. J Neural Transm Park Dis Dement Sect 4:27–34.
30. Zhadanov SI. 2000. Clinical and genetic aspects of Leber's hereditary optic neuropathy. Consilium 5(15):62-66.

РЕЗЮМЕ

В настоящей статье представлены данные о поиске точковых мутаций мтДНК при синдроме Лея, Кернса – Сейра, Пирсона, NARP, MERRF, MELAS с использованием метода ПЦР и рестрикционного анализа. На основе поиска точковых мутаций мтДНК у 32 пациентов с клинически установленными митохондриальными заболеваниями, мы приводим сложность уточняющей молекулярной диагностики и ее высокую диагностическую эффективность. Приведен случай возникновения, описанной впервые в Украине, гетероплазмической мутации *de novo* 12706C ND5 мтДНК, ассоцированной с клиническим проявлением фатального синдрома Лея (Leigh syndrome). Приведенные данные подчеркивают важность включения секвенирования гена ND5 в диагностический протокол при митохондриальных цитопатиях.

SUMMARY

We presented in the article search-based data of mtDNA point mutations in Leigh syndrome, Kearns–Sayre syndrome, Pearson syndrome, NARP, MERRF, MELAS using PCR and restriction analysis. We presented the complexity of clarification of molecular diagnostics and its high diagnostic efficiency on search-based of mtDNA point mutations in 32 patients with clinically relevant mitochondrial diseases. We present an event of heteroplasmic mutation de novo 12706S ND5 mtDNA that associates with clinical manifestation of a fatal Leigh syndrome and was described for the first time in Ukraine. The above data underline the importance of including the sequencing of ND5 gene in diagnostic protocol for mitochondrial cytopathies.