

I. ЗАГАЛЬНІ ПРОБЛЕМИ КЛІНІЧНОЇ ПРОТЕОГЕНОМІКИ

УДК: 616.31-007.18-053.2:577.23

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ. СИНДРОМ РЕТТА

Гречанина Ю.Б., Гречанина Е.Я.

Украинский институт клинической генетики ХНМУ

61022, Харків, пр. Правди 13, тел.700-32-17; 705-16-74, e-mail: mgc@ukr.net

Эпигенетический контроль – изменение экспрессии генов происходит без изменения первичной последовательности нуклеотидов ДНК. Метилирование ДНК регулирует экспрессию генов через механизм компактизации-декомпактизации хроматина.

Reick W at all (2001) обобщил особенности эпигенетического программирования генома:

- рисунки метилирования ДНК обладают пространственной, временной и тканевой специфичностью;
- специфика метилирования ДНК наследуется дочерними клетками;
- специфические метки метилирования стираются в памяти примордиальных половых клеток;
- в ходе созревания половых клеток происходит восстановление рисунков метилирования в соответствии с половой принадлежностью организма;

- после слияния половых клеток происходит деметилирование генома;
- в процессе эмбриогенеза метилирование соматических клеток происходит де ново.

Метилирование цитозиновых оснований ДНК предопределяет взаимодействие между ДНК и белками, входящими в состав хроматина. Это взаимодействие через механизм компактизации-декомпактизации хроматина и регулирует экспрессию генов

Регуляция экспрессии генов обеспечивается химически модифицированными нуклеосомными гистонами (ацетилованными, метилированными или фосфорилированными).

Мобильность хроматина обеспечивают энзимы – аминотрансфераза гистонов и деацетилтрансфераза гистонов.

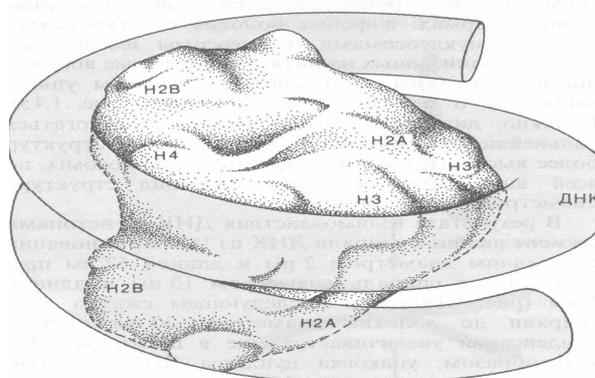


Рис.1. Сегмент ДНК (145 оснований)

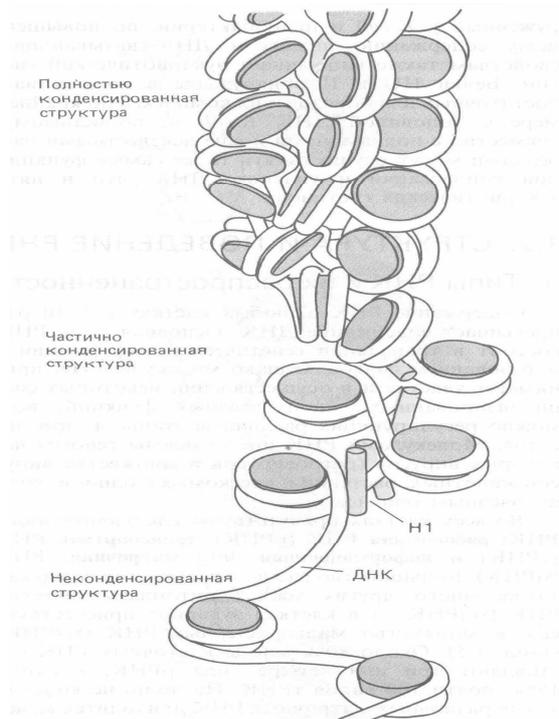


Рис. 2. Структура хроматина с разной степенью конденсации



Рис. 3. Взаимоотношение генетики и эпигенетики (по С.А. Назаренко, 2004)

Гетерохроматин - пучок фибрилл, диаметр которых варьирует в течение клеточного цикла и зависит от участка хромосомной локализации. Гетерохроматин – конститутивный и факультативный.

Конститутивный характеризуется:

- стабильностью,
- высоким содержанием сателлитных ДНК, выраженным полиморфизмом,
- появлением С-бендов после денатурации–ренатурации ДНК.

- содержит специфический тип ДНК, который называется сателлитным и состоит из большого количества tandemно расположенных коротких повторов азотистых оснований.
- конденсированным состоянием;
- поздней репликацией;
- метилированным состоянием;
- присутствием гипоацетилированных гистонов.

Таблица 1.

Классификация эпигенетических болезней человека

Нарушение эпигенетического статуса отдельных участков генома (локальный эффект)	Нарушение эпигенетического статуса всего генома (глобальный эффект)
1. Болезни, обусловленные унаследованными мутациями, нарушающими моноаллельную экспрессию генов — болезни геномного импринтинга (синдромы Видемана—Беквита, Прадера—Вилли, Энгельмана)	1. Болезни, обусловленные унаследованными мутациями генов, продукты которых вовлечены в поддержание уровня метилирования ДНК или модификацию структуры хроматина — Синдромы ICF, Ретта, ATR-X, Рубинштейна—Тейби, Коффина—Лаури
2. Болезни, обусловленные нарушенным статусом метилирования отдельных генов в результате de novo возникших мутаций в соматических клетках — а) раковые болезни, связанные с потерей импринтинга, приводящей к активации неактивных генов или подавлению экспрессии активного гена; б) раковые болезни, обусловленные гиперметилированием промоторов генов опухолевых супрессоров и их инактивацией	2. Болезни, обусловленные глобальным нарушением метилирования генома в результате de novo возникших мутаций в соматических клетках— Раковые болезни, связанные с глобальным гипометилированием генома, приводящим к активации онкогенов, ретротранспозонов и хромосомной нестабильности

Фенотипические особенности, аномалии и пороки развития у пациентов с ХП:

- кожа и ее производные,
- черепно-лицевые дизморфии,
- опорно-двигательный аппарат,
- нервная система,
- сердечно-сосудистая система,

- дыхательная система,
- пищеварительная система,
- мочевыделительная система,
- половая система,
- эндокринная система.

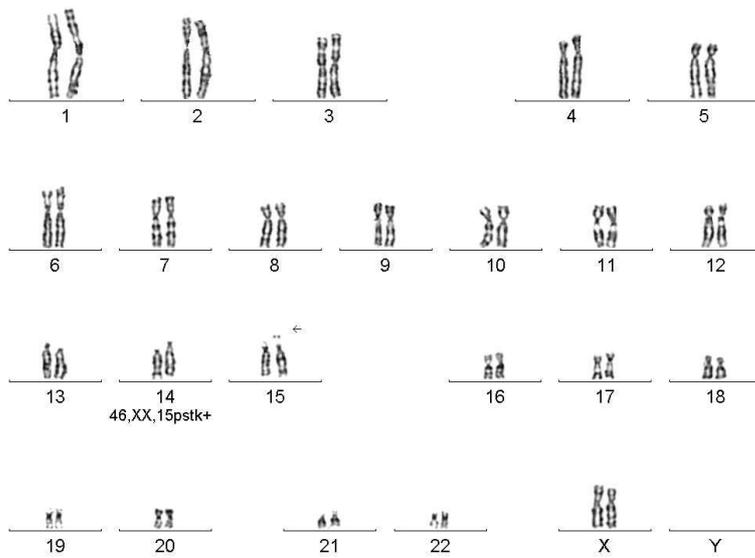
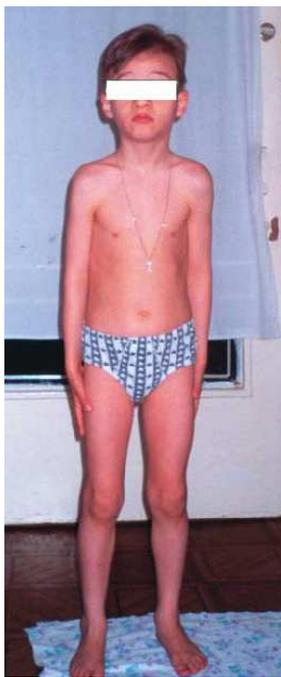
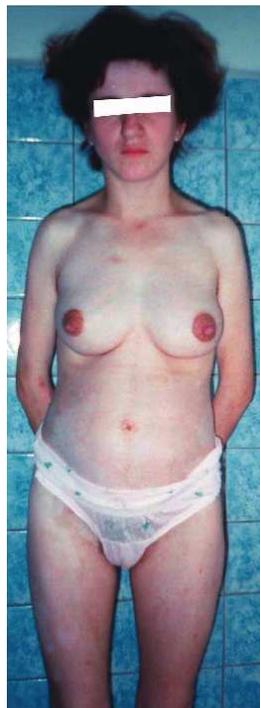


Рис. 4. Хромосомный полиморфизм (15 pstk)



*Рис. 5. XY, 9 gh+, 15 S+,
2% хр.нест*



*Рис. 6. XX, 15 S+,
1% хр. нест.*



*Рис. 7. XX, 15 S+,
1% хр.нест.*

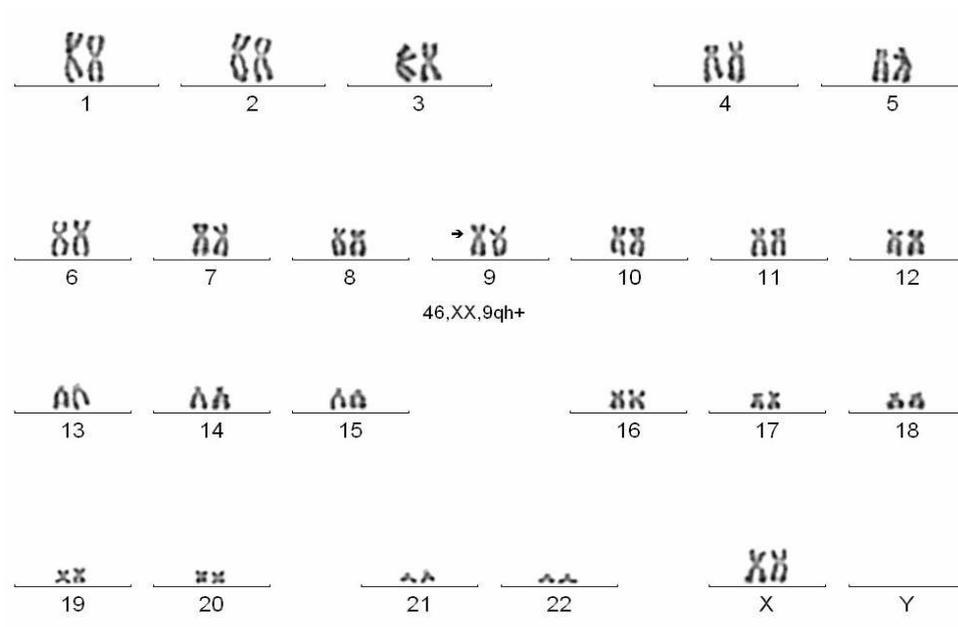


Рис. 8. Хромосомный полиморфизм (9qh+)



*Рис. 9. XY, 9 gh+,
G окр., C окр., 1% хр. нест.*



*Рис. 10. XY, 22pstk,
9gh+*



*Рис. 11. XY, 9 gh+,
1% хр. нест.*

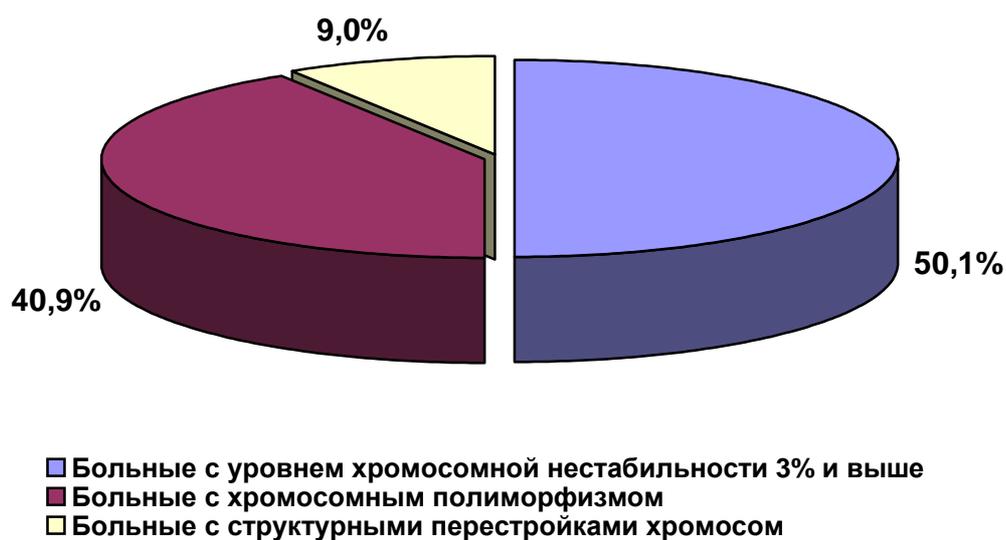


Рис. 12. Удельный вес различных хромосомных вариантов

Таблица 2.
Частота проявления фенотипических признаков, морфологических и др. нарушений у пациентов с хромосомным полиморфизмом

Группа признаков	46, XX 46, XY Контр.	46, XX, 1 qh+		46, XX, 9 qh+		46, XX, 16 qh+		46, XY qh+		Спутнич- ный поли- морфизм	
		46, XY, 1 qh+	п	Р	46, XY, 9 qh+	п	Р	46, XY, 16 qh+	п	Р	46, XY qh+
Кожа и её производные	74	23	<0.01	28	<0.01	0	-	5	<0.01	26	<0.01
Черепно-лицевые дизморфии	225	89	<<0.01	133	<<0.01	12	<0.01	50	<0.01	164	<0.01
Опорно-двигательный аппарат	112	61	<0.01	67	<0.01	14	<0.01	14	<0.01	117	<0.01
Нервная система	10	15	<0.01	19	<0.01	0	-	4	<0.01	18	<0.01
Сердечно-сосудистая система	12	2	<0.01	6	>0.99	1	0.95	3	0.75	5	>0.99
Дыхательная система	1	1	<0.01	7	0.25	0	-	0	-	1	>0.99
Пищеварительная система	16	5	>0.99	10	>0.99	0	-	4	0.50	15	0.025
Мочевыделительная система	13	4	>0.99	8	>0.99	0	-	1	0.90	10	0.75
Половая система	8	4	0.05	7	0.025	1	0.05	0	-	13	<0.01
Эндокринная система	10	2	>0.99	2	>0.99	0	-	2	0.75	7	>0.99

Таблица 3.

Цитогенетические, фенотипические и метаболические характеристики пациентов с хромосомным полиморфизмом

Кариотип	Возраст	Фенотип	Метаболические изменения
13s+			
46,XY,13s+ 3% хромосомной нестабильности	1 год 8 месяцев	МД, МАР, атаксия, макроцефалия, ренальная дисплазия	ГГААУ, аланинурия, глюкозурия, фруктозурия, мальтозурия
46,XY,13s+ 1% хромосомной нестабильности	13 лет	Низкая масса, пупочная грыжа, деформированная грудная клетка, гиперэластичность кожи, гемангиоматоз, преаурикулярные фистулы, микроцефалия, эписиндром, МАР	Пролинурия, глицинурия, аспарагиноурия, орнитинурия
46,XX,13s+ 4% хромосомной нестабильности	21 год	Микроцефалия, долихоцефалия, лордоз, генитальная гипоплазия, вторичная аменорея	Пролинурия, глицинурия, аспарагиноурия, орнитинурия
46,XX,13s+ 4% хромосомной нестабильности	10 мес	СТД, МАР, брахицефалия, диспластическая кардиопатия	Пролинемия, глицинемия, валинемия, серинемия, глюкозурия
46,XX,13s+ 3% хромосомной нестабильности	25 лет	МАР, брахицефалия, дисплазия почек	ГГААУ
9qh+			
46,XY,9qh+	30 лет	МД	ГГАА, тирозин, триптофан, аланин, аспарагиновая кислота
46,XY,9qh+	19 лет	МД, СТД, МАР, флюктуация Х ребра, оксипролин	Валинемия, аланинемия, пролинемия, глицинемия, аспарагиновая кислота, галактозурия, мальтозурия (синдром Штиллера)
46,XY,9qh+	34 года	Брахицефалия, множественные очаги депигментации, карцинома яичка, нефроптоз, диспластические изменения в почках	Пролинурия, глицеринурия, аланинемия
46,XY,9qh+ 6% хромосомной	2 года 2 месяца	Акроцефалия, киста сосудистого сплетения, дермоидная киста	Валинемия, аланинемия, аспарагиновая кислота

нестабильности 46,XY,9qh+	27 лет	У жены замершая беременность в 9 недель	Аланиемия, пролинемия, глицинемия, лизинемия
46,XY,9qh+ 4% хромосомной нестабильности	11 лет	Кифоз, СТД, проксимальная девиация V пальцев верхних конечностей, вальгусная деформация коленных суставов, варусная деформация голени	Аланинурия, пролинурия, глицинурия, орнитинурия

Синдром Ретта – клинический диагноз, подтвержденный анализом мутации в гене МЕСР2. Синдром Ретта (СР) является X-сцепленным нарушением, вызванным мутациями в гене метил-СрG-связанный белок 2 (МЕСР2). Вероятность – 1:10000 – 1:15000 женщин во всем мире. Общая ДНК была выделена из сухих пятен крови с использованием QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen) согласно протоколу. Геномная ДНК была использована для амплификации кодирующей последовательности.

Секвенирующий анализ выявил небольшую делецию 4 оснований АААG в позиции 856-859 в экзоне 4 гена МЕСР2 (856-859del4). Эта мутация приводит к сдвигу рамки считывания (K286fs) и преждевременному образованию стоп-кодона. Образование преждевременного стоп-кодона приводит к синтезу функционально неполноценного протеина

МЕСР2. Локализация мутации в транскрипционно-репрессивном домене, возможно, влияет на функцию белка МЕСР2 в процессе транскрипционной репрессии. Это первый случай в Украине, в котором клинический диагноз синдрома Ретта был подтвержден мутационным анализом гена МЕСР2.

Синдром Ретта является X – сцепленным доминантным нарушением. Клинические характеристики синдрома Ретта были впервые описаны в 1966 году педиатром (Вена). Он является наиболее частой генетической причиной умственной отсталости у девочек, на 2 месте после синдрома Дауна. Вероятность синдрома Ретта - 1/10000 – 1/15000 женщин. Обнаружение гена синдрома Ретта очень сложно из-за недостатка семейных случаев. Ген МЕСР2 был картирован на Xq28 между L1CAM и RCP/GCP несколько лет назад.

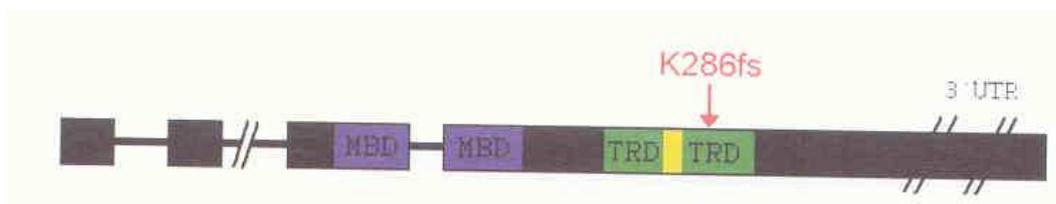


Рис. 13. Схема гена MeCP2 и локализация мутации K286fs

Его продукт, метил-СрG-связанный белок 2 (МЕСР2) участвует в эпигенетической регуляции (метиловании). Недавно полученные данные подтвердили неожиданную роль МЕСР2 в генной экспрессии в нервной системе. Мутации в гене МЕСР2 были обнаружены у 80% пациентов с синдромом Ретта во всем

мире. Частота обнаружения колеблется в зависимости от предварительного клинического диагноза.

Несмотря на скрининг, основанный на секвенировании кодирующих экзонов и смежных интронных последовательностей, мутации не выявлены в 20 – 30% классических случаев

синдрома Ретта. Вероятно мутации встречаются в регулирующих областях МЕСР2, которые не были исследованы. Существуют 8 преобладающих мутаций, вызывающих синдром Ретта, которые отвечают за более чем 50% всех случаев.

Описание наблюдения: Девочка родилась от здоровых родителей с помощью кесарева сечения, ее вес при рождении был 3000 г, рост 50 см, окружность головы 37 см. Возраст матери был 33, отца – 35 лет. Второй ребенок у здоровых родителей, не являющихся кровными родственниками, живущих в маленьком селе в Украине. Ее старшая 14-летняя сестра здорова.

В возрасте 5 мес. родители заметили первые признаки психомоторной задержки развития. С 6 мес., после добавления в питание овсяной каши, появилась диарея, потеря веса. Синдром Ретта заподозрен в возрасте 18 мес. С 3х лет страдает тяжелой физической и умственной задержкой развития, речь отсутствует. Низкая масса тела - 11,5 кг, рост 115 см и окружность головы 47,5 см (все параметры были снижены на 5%). Наблюдается страбизм, вздутие живота, ограничение объема движений бедра. Отмечен дефицит внимания. В руках нарушено скоординированное движение.

Методы. Общее геномная ДНК была извлечена из сухих пятен крови, используя QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen) согласно протокола. Пары праймеров были использованы для амплификации МЕСР2 – кодирующих экзонов и смежных интронных последовательностей. PCR проводилось при общем объеме 50ммоль/л включая 1хPCR буфер и РС2(снабжалась 3,5mM MgCl₂) 0,2mM dNTPS, 2,5 единиц

Klen Taq полимеразы (GeneAge), 20pmol каждого праймера и 100 ng геномной ДНК. Параметры цикла были 95°C 2 минуты, затем 30 циклов по 95°C 30 секунд, 60 - 67°C 30 секунд, 72°C 45 секунд, 72°C 10 минут. Продукты PCR были выделены из геля “ agarose“, используя QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen) согласно протокола. Автоматическое секвенирование продуктов PCR было выполнено с использованием ABI PRISM BigDye Terminator v 3.1. Фрагменты секвенирования были разделены капиллярным электрофорезом и определены через лазер, индуцирующий флуоресценцию на ABI PRISM 3100/3100 – Avant генетическом анализаторе. Результаты секвенирования были сравнены с последовательностью гена МЕСР2.

Результаты и обсуждение. Анализ секвенирования выявил небольшую делецию 4 оснований AAAG в позиции 856-859 в экзоне 4 гена МЕСР2 (856 -859 de14). Эта мутация приводит к сдвигу рамки считывания (K286fs) и созданию преждевременного стоп - кодона. Создание преждевременного стоп – кодона приводит к синтезу белка гена МЕСР2. Диагноз клинически может быть установлен, но анализ гена МЕСР2 уточняет его. Клиническая целесообразность исследования гена МЕСР2 включает обеспечение определения риска, определение репродуктивного выбора (пренатальная диагностика) и молекулярной оценки sibсов, что может способствовать установлению раннего диагноза и лечению.

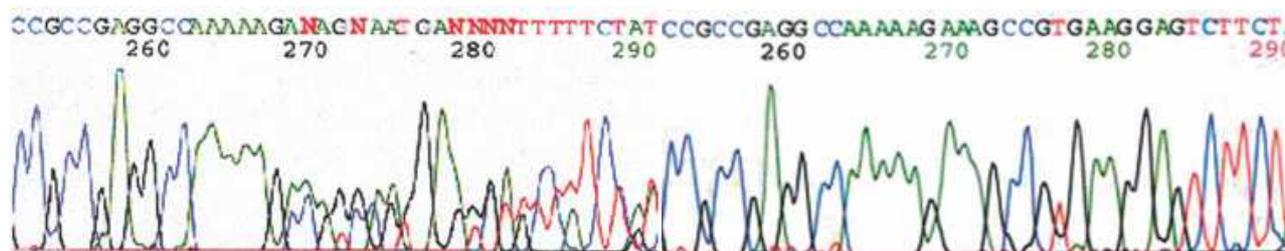


Рис. 14. Мутация (делеция) 856 – 859de14(K286fs) у наблюдаемой пациентки с синдромом Ретта (а) и контрольная ДНК без мутации (б)

```

normal      281 A E A K K K A V K E S S I R S V Q E T V
            841 GCCGAGGCCAAAAAGAAAGCCGTGAAGGAGTCTTCTATCCGATCTGTGCAGGAGACCGTA

mutated     841 GCCGAGGCCAAAAAGCCGTGAAGGAGTCTTCTATCCGATCTGTGCAGGAGACCGTAATCA
            281 A E A K K P STOP

```

Рис. 15. Сдвиг рамки считывания, вызванный делецией 4 основ (красный), результаты образования преждевременного стоп-кодона в белке мутированного гена МЕСР2 (синий)

В настоящее время известны более 200 различных мутаций в классических и нетипичных случаях синдрома Ретта. Описано огромное разнообразие степени тяжести для каждой мутации, поэтому сложно использовать данные мутации, чтобы собрать полезную информацию о прогнозе пробанда, которая является носителем мутации в гене МЕСР2. Мутации гена МЕСР2 были выявлены в

различных расовых группах и во многих европейских странах (российские, итальянские, шведские, немецкие, французские, словацкие, британские) вместе с китайскими, японскими, бразильскими и пакистанскими пациентами. Анализы мутации остальных наших пациентов необходимы для установления мутационного спектра гена МЕСР2 у украинского населения.

Таблица 4.

Наблюдение 1.

Пациент Даша, 1г.11 мес.	<i>Диагноз при направлении:</i> Для обследования.
Жалобы:	Задержка моторного, речевого развития. Не реагирует на обращенную речь. Раскачивается. Немотивированный смех, стереотипные движения руками в виде «мытья рук» и «хлопанье в ладоши». Ходит с поддержкой.
Анамнез:	Беременность I на фоне анемии, фето-плацентарной недостаточности, уреоплазмоза, маловодия. С раннего возраста - мышечная гипотония. С 1 года 10 мес. регресс в развитии.
Дополнит. исследования	<i>Кариотип лимфоцитов периферической крови</i> – 46,XX, 9gh-, 16gh-, 17ps, inv (19gh+)(p11q12), 21ps+. При исследовании репликации хромосомы X обнаружен аномальный тип позднореплицирующейся хромосомы X, встречающейся у больных с синдромом Ретта. <i>ЯМРТ головного мозга</i> - легкая наружная гидроцефалия. При <i>биохимическом исследовании</i> выявлено снижение холестерина, мочевой кислоты, кальция. Повышение ГАГ крови. <i>Фолиевая кислота</i> – 5,6 нг/мл. <i>Консультация кардиолога</i> – дисфункция синусового узла.
<i>Окончательный диагноз:</i>	Синдром Ретта, классическая форма. Мутация МесР2 гена.

Таблица 5.

Наблюдение 2.

Пациент Ирина, 2 года.	<i>Диагноз при направлении:</i> Ликворно-гипертензионный синдром. Задержка психо-речевого развития.
Жалобы:	Немотивированный смех, крики, не реагирует на окружающих, не понимает обращенную речь, не разговаривает. Стереотипные движения: машет руками, хлопает ладонями себя по щекам, раскачивается, застегивает и расстегивает застёжку «молния». Не ест твердую пищу. Тревожность в незнакомых местах. Походка похожа на движение заводной куклы.
Анамнез:	Беременность III, анемия, угроза прерывания, кольпит в 34 нед., стрессовые ситуации в первой половине беременности. Стремительные роды. Отмечалась пренатальная гипотрофия, конъюгационная желтуха. С 1 мес. срыгивания и рвоты до 7 мес. Задержка развития с 1 года. Часто болеет простудными заболеваниями. Отмечалась атония кишечника.
Дополнит. исследования	<i>Кариотип</i> – 46,XX, G-,C-окраска. При <i>биохимическом исследовании</i> выявлено умеренное повышение щелочной фосфатазы, трансаминаз, креатинина, ЛДГ. Положительный <i>тест мочи</i> на кетокислоты, на пролин; следы белка; повышена проба Пантуса.
<i>Окончательный диагноз:</i>	Синдром Ретта. Митохондриопатия.

Таблица 6.

Наблюдение 3.

Пациент Мария, 3 года 11 мес.	<i>Диагноз при направлении:</i> С-м Ретта.
Жалобы:	Поведенческие нарушения (расторможенность, приступы негативизма с плачем и громким вскрикиванием), стереотипные движения руками, отсутствие речи, нарушение координации движений. Запах ацетона из полости рта.
Анамнез:	Поздний репродуктивный возраст отца (45 лет к моменту рождения ребенка). Родилась с массой 4100г., ростом 58 см. До 1 года 8 мес. развивалась соответственно возрасту. С 1 г. 8 мес. после повышения температуры тела до 40 градусов -поведенческие нарушения; через 3-4 недели появились стереотипные движения руками, через 1,5 мес. признаки аутизма, пропала мелкая моторика. Наблюдался судорожный синдром.
Дополнит. исследования	При <i>биохимическом исследовании</i> выявлено: транзиторная аминокислотопатия, положительный тест на кетокислоты. ЯМРТ – органический патологии ЦНС не выявлено. <i>Консилиум с участием:</i> dr. YoonS.Shin, dr. Albano, dr. Kim, dr. T. Podskarbi, dr. W. Lehnert, V. Bzduch: Предварительный диагноз с-м Ретта; диф. диагноз с глутаровой ацидурией 1 типа. <i>Консультация профессора J. F. Hoffmann:</i> с-м Ретта.
<i>Окончательный диагноз:</i>	Синдром Ретта.

Наблюдение 4.

Пациент Лилия, 5 лет.	<i>Диагноз при направлении:</i> Врожденная аномалия развития головного мозга. С-м Ретта? Соединительно-тканная дисплазия.
Жалобы:	Грубая задержка темпов психомоторного развития, не понимает обращенную речь, не разговаривает, стереотипные движения руками (по типу «мытья рук», «умывания»), бруксизм, нарушение походки (походка «механической куклы»), судорожный синдром.
Анамнез:	Беременность I на фоне токсикоза и угрозы прерывания, роды преждевременные. До 6 мес. Росла и развивалась соответственно возрасту. Судорожный синдром (пароксизмы тонического напряжения) с 6 мес. после повышения температуры тела на фоне острого отита. Отмечалась мышечная гипотония. С 8 мес. - регресс в развитии. Отмечается микроцефалия, атаксия, страбизм.
Дополнит. исследования	<i>Кариотип</i> – 46,XX, 9 gh+, G-, C-окраска. При <i>биохимическом исследовании</i> выявлена гипокальциемия. <i>ЯМРТ головного мозга</i> с МР-ангиографией артерий – данных за очаговую и объемную патологию головного мозга не выявлено.
<i>Окончательный диагноз:</i>	Синдром Ретта.



Рис. 16. Синдром Ретта на фоне дефицита фолатного цикла

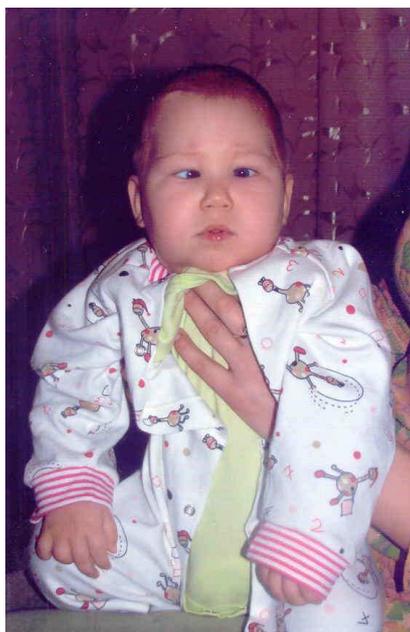


Рис. 17. Эпигенетическая болезнь (гипометилирование, хромосомный (46,XY, 9 рhqh) и генный (мутация 677 С-Т в гетерозиготном состоянии) полиморфизм)). Мягкая гомоцистеинурия. Синдромальная эпилепсия.

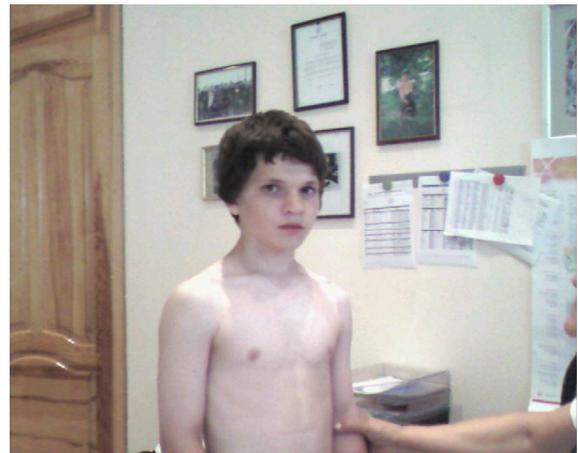


*Рис. 18. Эпигенетическая болезнь
Мозаичная форма синдрома Шерешевского-Тернера.
Нарушение фолатного цикла (полиморфизм в генах системы фолатного цикла. Обнаружен полиморфизм 677 С/Т MTHFR в гетерозиготном состоянии, ген эндотеллиальной NO-синтазы 4a/4b в гомозиготном состоянии). Нарушение энергетического обмена (MNGIE?). Врожденный горизонтальный нистагм с ротаторным компонентом (оперативная коррекция). Гиперметропический астигматизм обоих глаз. Амблиопия*



Рис. 19. Семейный случай эпигенетической болезни.

*Гипометилирование ДНК, дефицит фолатного цикла, нарушение обмена метионина (мозаичная форма трисомии по 21 хромосоме, хромосомный полиморфизм по хромосоме 1).
Полиморфизмы в генах фолатного цикла: MTHFR 677 С/Т в гетерозиготном состоянии, MTRR 66 А/Г в гомозиготном состоянии*



*Рис. 20. Эпигенетическая болезнь: нарушение обмена гликопротеидов (дефект посттрансляционной модификации лизосомальных ферментов). Нарушение обмена фолатного цикла (полиморфизм 66А→G (122M) в гене MTRR в гетерозиготном состоянии).
Хромосомный полиморфизм: 46, XY, 14 ps+.
Длинные (очень длинные) ресницы, гипертелоризм, серо-голубые склеры, эпикант)*



Рис. 21. Синдром Сетре-Чотсена, вторичная митохондриопатия, дефицит ферментов фолатного цикла