

*Е.К.Гинтер, Н.В.Петрова*

## ГЕНЕТИКА МУКОВИСЦИДОЗА

Медико-генетический научный центр Российской АМН, Москва

Муковисцидоз (МВ), или кистозный фиброз поджелудочной железы, является одним из самых частых наследственных заболеваний. Хотя данные о частоте МВ в большинстве случаев получены на основе регистрации больных с определенными клиническими проявлениями заболевания и лабораторными показателями и таким образом могут занижать истинную частоту МВ, для большинства европейских стран и стран Северной Америки принята частота МВ: 1 больной на 2000—2500 новорожденных, которая оказалась сходной как при регистрации больных МВ, так и при скрининге новорожденных различными тестами на МВ [4]. Для европейской части бывшего СССР получена примерно такая же оценка распространенности МВ, правда, на основе косвенного расчетного метода [2]. Вместе с тем, известны популяции, где частота МВ существенно ниже (известны также локальные популяции, где она существенно выше). МВ реже встречается в Швеции и Финляндии. В Японии и, возможно, африканских странах его частота, по-видимому, не превышает 1:100 000. Однако эта проблема требует дополнительных исследований с применением более надежных методов выявления МВ [13].

МВ является аутосомно-рецессивным заболеванием, т.е. он проявляется только у лиц, получивших мутантный ген от каждого из родителей. Больной, следовательно, должен быть либо гомозиготным по определенной мутации, либо компаундом, когда мутации, полученные от обоих родителей, различаются.

Из столь высокой частоты МВ в популяциях следует, что частота гетерозигот, т.е. носителей мутантного гена, должна составлять около 4%, а частота мутантного гена (в предположении об отсутствии аллельного разнообразия) — около 2%. Следовательно, наблюдается полиморфизм для этой генетической системы. Хорошо известно, что частота редкого аллеля в любой генетической системе выше 1% не может быть объяснена высокой частотой повторных мутаций в соответствующем гене и требуются иные популяционно-генетические объяснения. Таких объяснений может быть несколько, два из которых можно считать основными: высокая частота мутантного аллеля объясняется селективными преимуществами гетерозигот при опре-

деленных условиях или она объясняется действием случайных генетических процессов, прежде всего дрейфа генов. Следует также упомянуть такие объяснения, как существование нескольких локусов, мутации в семьях с больным МВ. Были предприняты многочисленные попытки обнаружить селективные преимущества у гетерозигот по гену МВ (облигатными гетерозиготами являются родители больных) или доказать наличие репродуктивной компенсации, однако они не дали определенных результатов. С другой стороны, в модельных экспериментах было показано, что даже столь высокая частота мутантного гена в огромной по численности популяции может быть объяснена эффектами дрейфа генов [10,14]. Таким образом, выбор между различными механизмами повышения частоты гена МВ в настоящее время сделать невозможно, хотя хочется надеяться, что это произошло неслучайно и что ген МВ защищает носителя от действия какого-то вредного внешнесредового фактора, в частности инфекции.

Поиски продукта гена МВ велись давно. Основные клинические проявления МВ связаны, как известно, с нарушением функции экзокринных желез. Это и меконеальный илеус, закупорка протоков поджелудочной железы, и вязкий секрет экзокринных желез бронхального дерева, особенности секрета потовых желез, содержащего избыток ионов натрия и хлора (что было использовано для разработки наиболее точного до сих пор метода диагностики МВ — так называемого потового теста), и нарушения функции других экзокринных желез. Однако при общем понимании, что в патогенезе МВ нарушения электролитного обмена должны играть весьма важную роль и что, скорее всего, они могут быть обусловлены автономным нарушением внутриклеточных процессов, поиски продуктов гена МВ в основном шли в биологических жидкостях и в первую очередь в сыворотке крови больных, т.е. почти сознательно были направлены на выявление вторичных продуктов гена. Тем не менее, удалось обнаружить в конце концов так называемый кистофиброзный фактор (многие исследователи полагали, что он является одним из классов иммуноглобулинов), который использовался в диагностике МВ и даже

выявлении гетерозиготного носительства гена MB. Таким образом, следует признать, что усилия по выявлению продуктов гена MB в биологических жидкостях, которые принесли желаемый результат в отношении ряда наследственных болезней обмена веществ, оказались для MB неэффективными. Стало ясно, что для изучения продукта гена MB требуется использование нетрадиционных подходов.

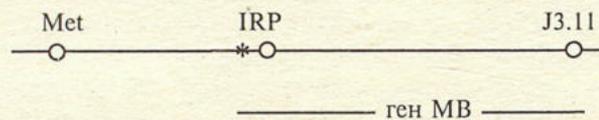
К этому времени значительные успехи были сделаны молекулярной генетикой в изучении этиологии другого распространенного наследственного заболевания — X-сцепленной рецессивной миодистрофии Дюшенна, причем они были достигнуты необычным путем. Суть нового подхода заключалась в установлении преимущественно методом генетического картирования точной локализации мутантного гена на предельно коротком участке X-хромосомы с последующим поиском на этом участке с помощью перекрывающихся клонов геномной ДНК самого гена. Для миодистрофии Дюшенна решение этой задачи оказалось относительно простым, так как были известны случаи заболевания у женщин, обусловленные транслокациями участка X-хромосомы на аутосомы. Точки разрыва X-хромосомы в транслокациях служили однозначным маркером локализации мутантного гена. Еще более подходящими для анализа были случаи миодистрофии Дюшенна у мальчиков с видимой небольшой делецией X-хромосомы. Кроме того, значительная часть мутаций в гене миодистрофии Дюшенна оказалась связанной с крупными делециями, что еще больше облегчило поиск гена. Таким образом исследователям удалось сначала выделить и проклонировать ген миодистрофии Дюшенна, установить его структуру и характер мутаций, а затем уже на этой основе определить тип и структуру белка, названного дистрофином, кодируемого соответствующим геном [9]. Такой способ изучения механизма действия мутантного гена был назван обратной генетикой, поскольку вместо традиционного пути от признака к гену используется путь от гена к признаку.

История выделения и клонирования гена MB полна драматизма. Над этой проблемой бился ряд исследовательских групп в Европе и Америке, между которыми завязалась острая конкуренция. Более удачливыми оказались группы исследователей из Педиатрического Госпиталя Торонто, которыми руководили Лап-Чи Тсуя и Джон Риордан, работавшие совместно с группой Френсиса Коллинза из Медицинского института Говарда Мичиганского университета. Начало этой истории может быть отнесено к 1985 г., когда группе Лап-Чи Тсуя удалось локализовать ген MB на 7-й хромосоме одновременно с двумя другими группами исследователей [6,8,15].

В отличие от миодистрофии Дюшенна при MB было трудно ожидать, что мутации могут быть обусловлены крупными делециями, поэтому предстояло проделать огромную работу, пытаясь локализовать ген MB между двумя фланкирующими его маркерами — онкогеном *met* и полиморфной последовательностью ДНК J3.11, наиболее тесно сцепленными с MB. Между двумя этими маркерами расстояние составляло 1600 т.п.н.,

то есть было слишком большим, чтобы его можно было пройти, используя технику прогулки по хромосоме (один из методов физического картирования генома), за разумное время. Метод прогулки по хромосоме заключается в идентификации в геномной библиотеке перекрывающихся клонов ДНК, которые относятся к исследуемой области. К счастью, в группе Коллинза был разработан более эффективный метод поиска нужного гена — так называемый метод прыжков по хромосоме, который позволяет перескакивать через достаточно протяженные отрезки ДНК. Кроме того, этот метод позволял преодолеть еще одно препятствие для метода прогулки по хромосоме — существование неклонируемых последовательностей ДНК.

Используя оба метода, группы Лап-Чи Тсуя и Коллинза начали систематический поиск гена в указанном выше районе 7-й хромосомы, двигаясь от одного из маркеров в обоих направлениях. Когда на одном из направлений был пройден ген IRP, стало ясно, какое из направлений является правильным. Для установления отношения сегментов ДНК, изолированных во время прогулки и прыжков по хромосоме к гену MB, в них специально идентифицировались локусы, проявляющие полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ), которые были использованы для анализа сцепления в семьях, где ранее были идентифицированы кроссинговеры между геном MB и фланкирующими ДНК-маркерами. Всего в ходе работы было выявлено 18 ПДРФ на отрезке ДНК длиной 500 т.п.н., некоторые из которых оказались решающими для сужения области поиска гена MB, т.к. в исследованных семьях было показано, что кроссинговер произошел между ними и фланкирующими ДНК-маркерами.



На схеме показано, что прицельный поиск гена MB, расположенного между генами *Met* и J3.11, начался с участка, отмеченного звездочкой, в направлении гена J3.11.

Для поиска гена MB был использован также секвенс участков ДНК. При этом предполагалось, что ген MB должен содержать консервативную последовательность ДНК, характерную и для других организмов, так как ген выполняет важную физиологическую функцию. Кроме того, эта последовательность должна была содержать CpG островки, которые обычно маркируют 5' конец генов. В этой последовательности должна была также содержаться открытая рамка считывания. Всего на пути к гену MB было найдено три консервативные последовательности, две из которых были вскоре отвергнуты как возможные гены MB. Уверенность, что третья консервативная последовательность может быть геном MB появилась тогда, когда была обнаружена ее гибридизация с библиотекой кДНК,

полученной из клеток потовых желез, и, следовательно, соответствующей активно работающим в них генам. Эта консервативная последовательность была использована для клонирования всего гена МВ, который оказался достаточно большим, занимая около 250 т.п.н. Анализ нуклеотидной последовательности гена МВ показал, что он включает 27 экзонов, кодирующих белок, состоящий из 1480 аминокислотных остатков. Белок был назван муковисцидозным трансмембранным регулятором проводимости (CFTR). Характеристики предсказанной структуры белка позволили его отнести к семейству трансмембранных белков, характеризующихся сходной структурой. Он состоит из двух половин, каждая из которых включает гидрофобную область, предположительно необходимую для проникновения через мембрану, и последовательность, необходимую для связывания нуклеотидтрифосфатов (нуклеотидсвязывающая складка — NBF), разделенных R-доменом, который связывает фермент фосфокиназу.

Последующие многочисленные исследования функций CFTR показали, что он является хлорным каналом. Активируясь в результате фосфорилирования протеинкиназой А и присоединения АТФ, CFTR обеспечивает поток ионов хлора через клеточную мембрану. Некоторые результаты исследований позволили предположить, что у CFTR имеются и другие функции, в частности, транспорт внутриклеточных пузырьков и, возможно, даже транспорт АТФ.

Белок CFTR обнаружен в тех тканях, в которых протекает патологический процесс при МВ. Наряду с этим, он выявлен также в достаточно больших количествах в почках, матке и некоторых других органах. Что касается его внутриклеточной локализации, то CFTR накапливается на поверхности апикальной мембраны эпителиальных клеток дыхательной системы, желудочно-кишечного тракта, репродуктивной системы и потовых желез [5].

Дополнительное доказательство того, что выделен и клонирован ген МВ было получено, когда в гене больных МВ была выявлена делеция 3 п.н. в 10 экзоне, которая должна была приводить к утрате остатка фенилаланина в 508 положении соответствующего белка. Делеция обнаруживалась примерно в 70% хромосом от больных МВ. Вся изложенная выше последовательность событий, связанных с выделением гена МВ, приведена в трех статьях, опубликованных в специальном номере журнала "Science" 8 сентября 1989 г. [7,11,12].

За прошедшие три года было описано более 200 различных мутаций в гене МВ. Примерно половина из этих мутаций является так называемыми миссенс-мутациями, обуславливающими замены отдельных аминокислот и выявляющими наиболее важные домены CFTR-белка. Найдены также и три других класса мутаций: нонсенс мутации, приводящие к образованию стоп-кодона, мутации сдвига рамки считывания вследствие инсерции или делеции небольшого числа нуклеотидов и мутации сплайсинга. Распределение мутаций по гену скорее всего носит неслучайный характер, по крайней мере относительно частые мутации

в гене МВ преимущественно локализируются в области, кодирующей нуклеотидсвязывающую складку. Предполагается, что по характеру нарушения функциональных характеристик CFTR-белка мутации можно разделить на три класса: с нарушением созревания белка и его правильного встраивания в мембрану (мутация ΔF508, по-видимому, относится к этому классу), с полным нарушением работы хлорного канала и с частично измененной работой хлорного канала.

В результате анализа более чем 30 000 мутантных хромосом, представляющих разные регионы мира, установлено, что наиболее частой является мутация ΔF508, встретившаяся в 67% хромосом. Еще более 10 мутаций встречается с частотой от 1 до примерно 3%. Среди них наиболее частыми являются мутации G542X и G551D — обе в 11 экзоне. Все остальные мутации оказались чрезвычайно редкими.

Исследование мутантных хромосом от больных МВ из популяций бывшего СССР (преимущественно из России) показало, что хотя мутация ΔF508 является доминирующей, ее относительная частота существенно ниже, чем в мировой популяции, составляя около 50%. Идентифицированы также некоторые другие мутации, все, однако, с очень низкой частотой [3].

К сожалению, до сих пор нет данных об абсолютных частотах отдельных мутаций в разных популяциях. Что же касается относительных частот, то установлено, что они существенно варьируют между популяциями. Так, например, относительная частота мутации ΔF508 составляет в популяции Дании почти 90%, а в популяции евреев-ашкенази Иерусалима — только 22%. В этой, последней, популяции самой частой оказалась мутация W1282X — 60% [13].

Высокая частота МВ во многих популяциях и возможность диагностики гетерозиготного носительства гена МВ молекулярно-генетическими методами создали принципиальную возможность проведения скрининга с выявлением супругов—гетерозигот и последующей пренатальной диагностикой для таких супружеских пар. Однако при таком широком разнообразии мутаций в гене МВ трудно предполагать высокую эффективность скрининга на носительство гена МВ при выявлении относительно узкого спектра мутаций в большинстве популяций.

Генетическая гетерогенность МВ создает также серьезные проблемы для пренатальной диагностики этого заболевания. Принципиальная возможность пренатальной ДНК-диагностики МВ появилась после генетического картирования гена МВ и выявления тесно сцепленных с ним полиморфных ДНК-маркеров. Естественно, что для такой пренатальной диагностики подходили только те семьи, в которых родители были гетерозиготны по используемым ДНК-маркерам, поэтому к маркерным системам предъявлялось требование высокой гетерозиготности, кроме тесности сцепления с геном МВ.

Молекулярно-генетический анализ гена МВ создал возможность прямого выявления мутаций. В настоящее время известна структура олигонуклеотидных праймеров и аллель-специфические последовательности, которые

позволяют однозначно идентифицировать с помощью полимеразной цепной реакции многие мутации в гене МВ. Понятно, однако, что использование множества тестов на разные мутации при пренатальной диагностике технически трудно выполнимо и очень дорогостояще. В настоящее время пренатальная диагностика гомозигот по мутации ΔF508 осуществляется прямым определением мутации методом полимеразной цепной реакции в ДНК, выделенной из ворсинок хориона, начиная с 8 недель беременности. В том случае, если плод оказывается компаундом по мутации ΔF508 и неизвестной мутации, или когда обе мутации в гене МВ неизвестны, пренатальная диагностика осуществляется непрямой методом. Суть этого метода заключается в установлении генотипа хромосом родителей, несущих мутантный ген, по полиморфным генетическим системам, тесно сцепленным с геном МВ. Наиболее употребительными являются такие полиморфные системы как XV-2с, KM19, CS7, MP6D9, J3.11, а также некоторые внутригенные полиморфизмы, в частности VNTR-полиморфизм в 6 интроне. Высокая гетерозиготность этих полиморфных систем позволяет сделать информативными (мутантная и нормальная хромосома у каждого из родителей должны различаться по аллелям хотя бы одной из указанных систем) для пренатальной диагностики практически все семьи, которые в ней нуждаются [1].

Молекулярно-биологическое изучение МВ открыло перспективы для более направленной терапии этого заболевания. Новые фармакологические препараты, такие как амилорид и АТФ/УТФ, предназначаются для того, чтобы обойти дефект хлорного канала. Разрабатываются также новые препараты, которые бы активировали мутантные формы CFTR. Однако настоящая патогенетическая коррекция может быть достигнута только с помощью генотерапии. Уже получены первые обнадеживающие результаты по переносу с помощью различных векторов гена МВ в клетки больных, в том числе и с сайт-специфическим встраиванием этого гена и синтезом его продукта, что приводило к исправлению дефекта хлорного канала, но, конечно, придется решить еще много проблем, таких как безопасность переноса гена, повышение эффективности этого переноса и ряд других, прежде чем этот метод найдет применение в клинике [5].

В этой статье мы затронули только часть проблем, имеющих отношение к генетике МВ. Вместе с тем нам хотелось показать, что генетические исследования приводят не только к более глубокому пониманию этиологии и патогенеза наследственного заболевания, но и влияют на другие компоненты системы помощи больным и их семьям.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Баранов В.С., Горбунова В.Н., Иващенко Т.Э. Пренатальная диагностика, медико-генетическое консультирование и профилактика муковисцидоза (кистозного фиброза): Метод. рекомендации.— М., 1991.
2. Бочкова Д.Н., Громов Р.В., Врнеева А.С., Куандыков Е.У., Номорская Л.А., Рейтова И.В. // Педиатрия.— 1974.— № 12.— С.24—26.
3. Baranov V.S., Ivaschenko T.E., Gorbunova V.N., Osynovskaya N.S., Gembovskaya S.A. // *Pediatr. Pulmonol.*— 1991.— Suppl.6.— P.244.
4. Boat T.E., Welsh M.J., Beaudet A.L. // *The Metabolic Basis of Inherited Disease* / Ed. C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle. 6-th Ed.— New York, 1989.— P.2649—2680.
5. Collins F.S. // *Pediatr. Pulmonol.*— 1992.— Suppl.8.— P.63—64.
6. Eiberg H., Schmiegelow K., Tsui L.-C., Buchwald M., Niebuhr E., Phelan P.D., Williamson R., Warwick W., Koch C., Mohr J. // *Cytogenet. Cell Genet.*— 1985.— Vol.40.— P.623.
7. Kerem B.-S., Rommens J.M., Buchanan J.A., Markiewicz D., Cox T.K., Chakravarti A., Buchwald M., Tsui L.-C. // *Science.*— 1989.— Vol.245.— P.1073—1080.
8. Knowlton R.G., Cohen-Haguenauer O., Van Cong N., Frezal J., Brown V.A., Barker D., Braman J.C., Shumm J.W., Tsui L.-C., Buchwald M., Donniss-Keller H. // *Nature.*— 1985.— Vol.318.— P.380—382.
9. Monaco A.P., Kunkel L.M. // *Trends Genet.*— 1987.— Vol.3.— P.33—37.
10. Rao D.C., Morton N.E. // *Am. J. Hum. Genet.*— 1973.— Vol.25.— P.594—597.
11. Riordan J.R., Rommens M., Kerem B.-S., Alon N., Rozmahel R., Grzelczak Z., Zielenski J., Lok S., Plavsic N., Chou J.-L., Drumm M.L., Iannuzzi M.C., Collins F.S., Tsui L.-C. // *Science.*— 1989.— Vol.245.— P.1066—1073.
12. Rommens J.M., Iannuzzi C., Kerem B.-S., Drumm M.L., Melmer G., Dean M., Rozmahel R., Cole J.L., Kennedy D., Hidaka N., Zsiga M., Buchwald M., Riordan J.R., Tsui L.-C., Collins F.S. // *Ibid.*— P.1059—1065.
13. Tsui L.-C. // *Trends Genet.*— 1992.— Vol.8.— P.692—698.
14. Wagener D.K., Cavalli-Sforza L.L., Barakat R. // *Am. J. Hum. Genet.*— 1978.— Vol.30.— P.262—270.
15. White R., Woodward S., Leppert M., O'Connell P., Hoff M., Herbst J., Lalouel J.-M., Dean M., Vande Woude G. // *Nature.*— 1985.— Vol.318.— P.382—384.

Поступила 23.04.93.