

Р.И. Хусаинова, Д.Д. Надыршина, И.Р. Гилязова,  
С.П. Алексеева, А.Н. Ноговицына, А.Л. Сухомясова,  
С.А. Федорова, Э.К. Хуснутдинова

## ПОИСК МУТАЦИЙ В ГЕНЕ COL1A1 У БОЛЬНЫХ НЕСОВЕРШЕННЫМ ОСТЕОГЕ- НЕЗОМ ИЗ РЕСПУБЛИКИ САХА (ЯКУТИЯ)

УДК 616.-053.2

Исследование 51 экзона и прилегающих интронных областей гена COL1A1 у больных несовершенным остеогенезом из Якутии выявило 2 различные мутации: сдвига рамки считывания c.3540\_3541insC (p.Gly1181AlafsX38) у больного НО якутской и мутация сайта сплайсинга c.4005+1G>T у пациента русской этнической принадлежности. Мутация c.3540\_3541insC (p.Gly1181AlafsX38) в гене COL1A1 описана впервые. Обнаруженные мутации относятся к количественным, приводят к 1 клиническому типу заболевания, выявлены в гетерозиготном состоянии и являются уникальными для каждой семьи.

**Ключевые слова:** несовершенный остеогенез, коллаген 1 типа, мутации.

DNA sequencing of 51 exons and exon-intron junctions in COL1A1 gene in patients with osteogenesis imperfecta from Yakutia was performed. Two different mutations: mutations shifting the reading frame c.3540\_3541insC (p.Gly1181AlafsX38) are identified in a patient of Yakut ethnicity and splicing site mutation c.4005 +1 G> T in patient of Russian ethnic origin. Mutation c.3540\_3541insC (p.Gly1181AlafsX38) hasn't been described early. Mutations lead to a clinical 1 type of osteogenesis imperfecta, identified in heterozygous state and are unique to each family.

**Keywords:** osteogenesis imperfecta, collagen type 1, mutations.

**Введение.** Несовершенный остеогенез (МКБ – 10 - Q78.0 – незавершенный остеогенез) – системное заболевание соединительной ткани, характеризующееся широким спектром клинических проявлений, основным из которых является ломкость костей. На сегодняшний день выявлено 8 генов, ответственных за развитие 11 типов НО. Генетический дефект, обуславливающий развитие НО 5 типа, до сих пор не идентифицирован. НО 1 типа является наиболее распространенной формой данного заболевания, наблюдается у 60-80% больных и фенотипически характеризуется голубыми склерами и минимальной костной деформацией [10, 20, 22]. При данной форме заболевания, как правило, наблюдается уменьшение количества коллагена I типа в результате сдвига рамки считывания, образования стоп кодонов или сплайсинговых мутаций в генах коллагена 1 типа – основного

структурного белка костной ткани. Молекула коллагена I типа построена из 3 полипептидных α-цепей: двух α1 (I) и одной α2 (I). Каждая из цепей содержит примерно 1000 аминокислот [11, 24]. Ген COL1A1, кодирующий 1 цепь, локализуется на хромосоме 17q21.31-q22, содержит 51 экзон и имеет протяженность 18 тыс.п.н [3, 8]. В настоящее время обнаружено более 200 мутаций в гене COL1A1 у больных НО: инсерции, разнообразные делеции, однонуклеотидные замены, сплайсинговые и нонсенс-мутации [24]. Мутации различаются по типу и локализации и приводят к недостаточному количеству белка за счет снижения секреции нормального коллагена при количественных мутациях, либо к образованию аномального коллагена при качественных мутациях [9]. Чаще всего выявляются миссенс-мутации, на долю которых приходится более 70% всех изменений, менее распространенными являются мутации сдвига рамки считывания, нонсенс-мутации и мутации сайтов сплайсинга, реже всего встречаются – делеции, дупликации и инсерции [6, 9]. Спектр мутаций в генах коллагена 1 типа описан многими исследователями для американских и европейских популяций [9, 14, 19, 21], есть ряд исследований больных НО из Азии [4, 17, 18]. Показано, что для каждой популяции экспрессионный профиль и характер мутаций зависит от их этнического происхождения [17].

Высокая степень генетической гомогенности коренных народов Якутии из-за высокого уровня изоляции (низкой частоты межнациональных браков) позволяет отнести эту популяцию

к «идеальной» в отношении возможности идентификации мутаций генов и менделевских болезней и картирования генов широко распространенных заболеваний [1, 2]. В таких популяциях, сохраняющих традиционный уклад жизни, существующих долгое время в условиях относительной изоляции, новый аллель вносится извне основателем популяции (эффект основателя), либо возникает de novo. Учитывая вышесказанное, нами проведен поиск изменений нуклеотидной последовательности в гене COL1A1 у больных несовершенным остеогенезом из Республики Саха (Якутия) для определения мутаций эффекта основателя, а также анализ корреляций обнаруженных мутаций с формой и типом наследования заболевания.

**Материал и методы исследования.** В качестве материала были использованы образцы ДНК 15 больных с установленным клиническим диагнозом «несовершенный остеогенез» из 12 семей из Республики Саха (Якутия), состоящих на учете в медико-генетической консультации ГБУ «Республиканская больница №1 – Национальный центр медицины» МЗ РС(Я). Геномную ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции по Метью, 1984 [15]. Поиск изменений нуклеотидной последовательности в гене COL1A1 проводили методом анализа конформационного полиморфизма однонуклеотидной ДНК (SSCP) по методике, предложенной Орита М. с соавт. с щелочной и температурной денатурацией [12]. Использованы описанные ранее пары праймеров, фланкирующие экзо-

ФГУН Институт биохимии и генетики УНЦ РАН: ХУСАИНОВА Рита Игоревна – с.н.с., ritakh@mail.ru, НАДЫРШИНА Дина Даяновна – н.с. dinanad@mail.ru, ГИЛЯЗОВА Ирина Ришатовна – к.б.н., н.с., ХУСНУТДИНОВА Эльза Камиловна – зав. отделом, elzakh@rambler.ru; МГК РБ№1-НЦМ МЗ РС(Я): АЛЕКСЕЕВА Светлана Петровна – врач-генетик, НОГОВИЦЫНА Анна Николаевна – врач-генетик, зав. лаб. ЯНЦ КМП СО РАМН, nogan@yandex.ru, СУХОМЯСОВА Айтилина Лукична – зав. МГК, зав. лаб. ЯНЦ КМП СО РАМН, aitalinas@yandex.ru, ФЕДОРОВА Сардана Аркадьевна – зав. лаб. ЯНЦ КМП СО РАМН, зав. лаб. БГФ СВФУ им. М.К.Аммосова, sardaanafeodorova@mail.ru.

ны и прилегающие интронные области [7]. После денатурации образцы наносили на 8% полиакриламидный гель (ПААГ). Электрофорез геля длиной 20 см, толщиной 1 мм проходил при комнатной температуре при напряжении 100В в течение 20 - 40 часов. Окраска геля проводилась в течение 25 минут 0,09% раствором азотнокислого серебра (AgNO<sub>3</sub>). Анализ образцов проводился по критерию присутствия или отсутствия дополнительных полос по сравнению с контрольной ДНК (норма). Определение последовательности нуклеотидов у образцов с измененной подвижностью однонитевой ДНК проводили с помощью автоматического секвенатора ABI PRISM модель 310 («Applied Biosystems») с использованием набора для флуоресцентного мечения DYEnamic™ ET, согласно протоколу фирмы производителя («Amersham Pharmacia Biotech» DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kit). Для «прочтения» последовательности нуклеотидов использовали приложение BioEdit v.5.0.9. (1997- 2001), а для анализа полученных сиквенсов – MegAlign из пакета программ DNASTar Inc (1993-2002).

Оценку влияния впервые выявленных замен на вероятность возникновения/потери сайтов сплайсинга проводили при помощи программы Splice

Prediction using Consensus Sequences (WebGene): <http://www.itba.mi.cnr.it/webgene>.

**Результаты исследования и обсуждение.** Молекулярно-генетическое исследование проведено у 15 больных НО из 12 семей, из них 10 – якутской, 1 – русской и 1 – эвенской этнической принадлежности.

В качестве основного метода поиска мутаций нами был использован метод SSCP, преимуществом которого является его простота наряду с достаточно высокой чувствительностью [12]. Однако есть и недостатки, в числе которых резкая потеря чувствительности метода, если анализируемый фрагмент достигает свыше 400 п.н. и длительная продолжительность электрофоретического разделения продуктов амплификации. Тем не менее метод достаточно широко применяется многими исследователями для поиска полиморфных участков ДНК. Экзоны протяженностью более 400 п.н. подверглись прямому секвенированию. Обнаруженные в ходе SSCP-анализа образцы с измененной, по сравнению с контролем, подвижностью одноцепочечной ДНК в дальнейшем исследовались с помощью метода секвенирования.

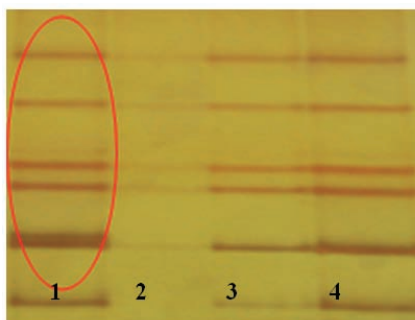
Ген COL1A1, кодирующий 1 цепь гена коллагена I типа, содержит 51

экзон и состоит из 38 тыс. пар нуклеотидов. В настоящее время обнаружено около 200 мутаций у больных НО в различных популяциях мира [<https://oi.gene.le.ac.uk/>]. Несмотря на большое количество обнаруженных мутаций в гене COL1A1, для каждой популяции характерен свой спектр, состоящий из небольшого числа мутаций, варьирующих от 6 у больных НО из Бразилии до 14 у евреев из Израиля [9, 7, 13, 14, 16]. У больных из Литвы обнаружено 11 типов мутаций, американцев – 10, японцев – 9, китайцев – 8 [4, 9, 18, 23]. При этом каждый исследователь находит ранее не описанные в литературе мутации наряду с известными. Большинство мутаций, ведущих к развитию НО, являются уникальными, что свидетельствует о высокой изменчивости гена COL1A1.

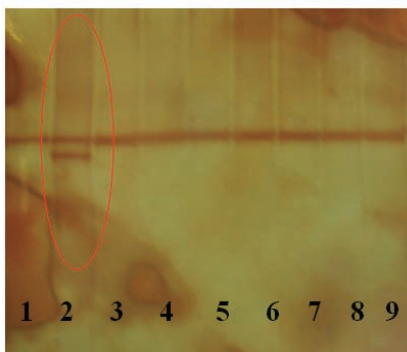
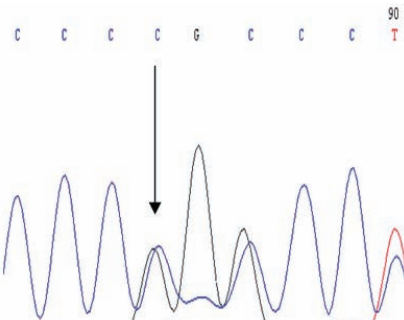
В проведенном нами исследовании 51 экзона и прилегающих интронных областей гена COL1A1 у больных НО было выявлено 2 типа изменений подвижности одноцепочечной ДНК в 49 и 50 экзонах гена COL1A1 у двух неродственных больных НО из РС (Я).

В результате последующего секвенирования образца с измененной подвижностью одноцепочечной ДНК была обнаружена ранее не описанная мутация с.3540\_3541insC (p.Gly1181AlafsX38) в 49 экзоне гена COL1A1 у больного НО якутской этнической принадлежности (рис. 1). У пробанда наблюдается тугоухость, голубые склеры. Как сопутствующие заболевания проявляются резидуальная энцефалопатия, цереброастенический синдром, нейропатия и миотонический синдром. У родителей данная мутация не была выявлена, что предполагает возникновение этой мутации de novo.

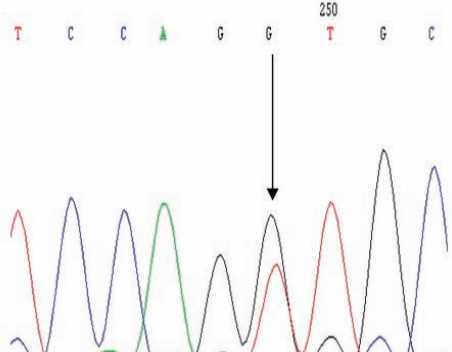
Анализ образца с измененной подвижностью одноцепочечной ДНК в 50 экзоне гена COL1A1 позволил идентифицировать мутацию сплайсинга с.4005+1G>T в семье русской этнической принадлежности (рис. 2). Пациент имеет голубые склеры, множественные переломы верхних и нижних конечностей, ребер, компрессионный перелом позвоночника и несовершенный дентиногенез. Имеются сопутствующие заболевания: расщелина мягкого и твердого неба, резидуальная энцефалопатия и полиноз. Родители пробанда не были доступны для ДНК-анализа, однако анализ родословной предполагает аутосомно-доминантный тип наследования заболевания по линии отца. Данная мутация ранее описана только итальянскими исследователями [<https://oi.gene.le.ac.uk/>].



**Рис.1.** Идентификация мутации с.3540\_3541insC (p.Gly1181AlafsX38) в гене COL1A1 у пробанда якутской этнической принадлежности



**Рис.2.** Идентификация мутации с.4005+1G>T в гене COL1A1 у больного русской этнической принадлежности из Якутии



По литературным данным, мутации сдвига рамки считывания и сплайсинговые мутации чаще всего приводят к НО 1 типа с легким течением [23], что согласуется с нашими данными. У обоих больных НО из Якутии с выявленными мутациями с.4005+1G>Т и с.3540\_3541insC (p.Gly1181AlafsX38) в гене *COL1A1* зарегистрирован НО 1 типа с наличием сопутствующих заболеваний.

Нами не найдены мутации, обусловленные эффектом основателя в гене *COL1A1* у больных НО из Республики Саха (Якутия). Наши результаты согласуются с данными ученых из Израиля, которые также провели анализ мутаций в гене *COL1A1* у 65 пациентов с НО еврейского происхождения с целью выявления эффекта основателя. Ими были определены 14 различных мутаций (миссенс, нонсенс, мутации сдвига рамки считывания и сайта сплайсинга), однако все обнаруженные мутации оказались уникальными для каждой семьи и были разбросаны по всему гену [14]. Возможно, что для НО не характерны мутации, связанные с эффектом основателя, даже в относительно изолированных популяциях.

**Выводы.** Таким образом, в 16,7% семьях с НО из Якутии были определены 2 типа мутаций: сдвига рамки считывания и мутация сайта сплайсинга, которые относятся к количественным мутациям, приводящим к уменьшению количества нормального коллагена из-за нестабильности аномальной РНК, к более легким клиническим проявлениям заболевания, выявлены в гетерозиготном состоянии и являлись уникальными для каждой семьи. Мутация с.3540\_3541insC (p.Gly1181AlafsX38) в гене *COL1A1* описана впервые. Семьи с обнаруженными мутациями информативны для проведения пренатальной ДНК-диагностики. Наши исследования вносят существенный вклад в понимание молекулярно-генетических особенностей заболевания и гено-фенотипических корреляций при несовершенном остеогенезе.

Результаты данной работы могут также послужить теоретической и ме-

тодической основой для разработки и оптимизации молекулярно-генетической диагностики такого сложного заболевания как несовершенный остеогенез.

### Литература

- Пузырев В.П. Наследственные болезни якутов / В.П. Пузырев, Н.Р. Максимова // Генетика. - 2008. - Том 44. № 10. - С. 1308-1314.
- Пузырев В.П., Максимова Н.Р. Hereditary diseases among Yakuts / V.P. Puzyrev, N.R. Maksimova // Genetics. - 2008. - Vol.44. №10. - P. 1308-1314.
- Федорова С.А. Генетические портреты народов Республики Саха (Якутия): анализ линий митохондриальной ДНК и Y-хромосомы / С.А. Федорова. - Якутск: Изд-во ЯНЦ СО РАН, 2008. - 235 с.
- Fedorova S.A. Genetic portraits of populations from the Republic of Sakha (Yakutia): analysis of mitochondrial DNA and Y-chromosome lineages / S.A. Fedorova // YSC SD RAMS Press. Yakutsk. 2008. 235 p.
- A New Osteogenesis Imperfecta with Improvement over Time Maps to 11q / A. Kamoun-Goldrat [et al.] // American Journal of Medical Genetics. - 2008. - V. 146A. - P. 1807-1814.
- A novel COL1A1 nonsense mutation causing osteogenesis imperfecta in a Chinese family / W. Liu [et al.] // Molecular Vision. - 2007. - V. 13. - P. 360-65.
- A novel RNA-splicing mutation in COL1A1 gene causing osteogenesis imperfecta type I in a Chinese family / Xin-Yi Xia [et al.] // Clinica Chimica Acta. - 2008. - V. 398. - P. 148-151.
- A single amino acid substitution (D1441Y) in the carboxyl-terminal propeptide of the  $\alpha 1(I)$  chain of type I collagen results in a lethal variant of osteogenesis imperfecta with features of dense bone diseases / J.M. Pace [et al.] // J Med Genet. - 2002. - V. 39. - P. 23-29.
- Analysis of the COL1A1 and COL1A2 genes by PCR amplification and scanning by conformation-sensitive gel electrophoresis identifies only COL1A1 mutations in 15 patients with osteogenesis imperfecta type I: identification of common sequences of null-allele mutations / J. Körrkö [et al.] // Am J Hum Genet. - 1998. - V. 62(1). - P. 98-110.
- Audiometric, surgical, and genetic findings in 15 ears of patients with osteogenesis imperfect / F.K. Swinnen [et al.] // Laryngoscope. - 2009. - V. 119(6). - P. 1171-1179.
- Benusienė E. COL1A1 mutation analysis in Lithuanian patients with osteogenesis imperfect / E. Benusienė, V. Kucinskas // J Appl Genet. - 2003. - V. 44(1). - P. 95-102.
- Cheung M.S. Osteogenesis Imperfecta: Update on presentation and management / M.S. Cheung, F.H. Glorieux // Rev Endocr Metab Disord. - 2008. - V. 9. - P. 153-160.
- Deficiency of Cartilage-Associated Protein in Recessive Lethal Osteogenesis Imperfecta / Barnes A.M. [et al.] // N Engl J Med. - 2006. - Vol. 355. - P. 2757-64.
- Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single cell conformation polymorphism / M. Orita [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. - 1989. - V.86. - P. 2766-2770.
- Evidence that abnormal high bone mineralization in growing children with osteogenesis imperfecta is not associated with specific collagen mutations / P. Roschger [et al.] // Calcif Tissue Int. - 2008. - V. 82 (4). - P. 263-270.
- Genetic and biochemical analyses of Israeli osteogenesis imperfecta patients / L. Ries-Levavi [et al.] // Hum Mutat. - 2004. - V. 23(4). - P. 399-400.
- Mathew C.C. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA// methods in molecular biology / Mathew C.C.; ED. Walker J.M. - N.Y.: Haman press. - 1984. - P. 31-34.
- Molecular findings in Brazilian patients with osteogenesis imperfecta / F.C. Reis [et al.] // J. Appl. Genet. - 2005. - V. 46 (1). - P. 105-108.
- Mutational spectrum of type I collagen genes in Korean patients with osteogenesis imperfecta / K-S. Lee [et al.] // Human Mutation. - 2006. Mutation in Brief #894 Online.
- Mutations in type I collagen genes in Japanese osteogenesis imperfecta patients / K. Kataoka [et al.] // Pediatrics international. - 2007. - V. 49. - P. 564-569.
- Osteogenesis imperfecta type VII: an autosomal recessive form of brittle bone disease / L.M. Ward [et al.] // Bone. - 2002. - V. 31. - P. 12-18.
- Roughley P.J. Osteogenesis imperfecta - clinical and molecular diversity / P.J. Roughley, F.Rauch, F.H. Glorieux // European Cells and Materials. - 2003 - V. 5. - P. 41-47.
- Strategies and outcomes of prenatal diagnosis for osteogenesis imperfecta: a review of biochemical and molecular studies completed in 129 pregnancies / M. Pepin [et al.] // Prenat Diagn. - 1997. - V. 17(6). - P. 559-570.
- Tinkle B.T. A genetic approach to fracture epidemiology in childhood / B.T. Tinkle, R.J. Wenstrup // Am J Med Genet C Semin Med Genet. - 2005 - V. 139C(1). - P. 38-54.
- Willing M.C. Premature chain termination is a unifying mechanism for COL1A1 null alleles in osteogenesis imperfecta type I cell strains / M.C. Willing, S.P. Deschenes, R.L. Slayton, E.J. Roberts // Am J Hum Genet. - 1996. - V. 59(4). - P. 799-809.
- Witecka J. Two novel COL1A1 mutations in patients with osteogenesis imperfecta (OI) affect the stability of the collagen type I triple-helix / J.Witecka, A.M. Auguociak-Duma, A. Kruczek, A.Szydio // J Appl Genet. - 2008. - V. 49(3). - P.283-295.