



УДК 616-056.7:616.153.922:575.224.22

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ НОВОЙ МИССЕНС-МУТАЦИИ G571E, НОВОЙ МОЛЧАЩЕЙ МУТАЦИИ H229H, НОНСЕНС-МУТАЦИИ C74X И ЧЕТЫРЕХ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ В ГЕНЕ РЕЦЕПТОРА ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С СЕМЕЙНОЙ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИЕЙ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА

© 2001 г. Ф. М. Захарова\*<sup>#</sup>, В. И. Голубков\*, М. Ю. Мандельштам\*,  
Б. М. Липовецкий\*\*<sup>#</sup>, В. С. Гайцхоки\*

\* Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН,  
197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12;

\*\* Институт мозга РАН, Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 08.12.2000 г. Принята к печати 22.02.2001 г.

У пациентов с семейной гиперхолестеринемией Санкт-Петербурга в гене рецептора липопротеинов низкой плотности идентифицированы новая миссенс-мутация G571E (с.1775 G > A), новая молчащая мутация H229H (с.750 C > T) и нонсенс-мутация C74X (с.285 C > A), ранее описанная в Японии, но неизвестная в России. Показано, что изученная нами выборка российских пациентов полиморфна по многим маркерам в гене рецептора: с.1171 G/A, с.1773 T/C, с.2177 C/T, с.2231 G/A.

*Ключевые слова:* мутация; однонуклеотидные полиморфизмы; рецептор липопротеинов низкой плотности; семейная гиперхолестеринемия.

### ВВЕДЕНИЕ

Рецептор липопротеинов низкой плотности (ЛНП) играет существенную роль в метаболизме холестерина у человека. Его функция заключается в поглощении холестеринбогатых липопротеиновых частиц из крови. Мутации в гене рецептора ЛНП приводят к образованию дефектного белка, частично или полностью неспособного выполнять свои функции, или к количественной недостаточности рецептора на клеточной поверхности, в результате чего уровень холестерина в крови заметно повышается. Доминантное заболевание, связанное с наличием мутаций в гене рецептора ЛНП и называемое семейной гиперхолестеринемией (СГ), часто приводит у носителей мутаций к развитию атеросклероза в раннем возрасте [1]. Частота встречаемости СГ составляет 1/500.

Липидный профиль крови пациентов с СГ типичен для гиперлипидемии типа IIa, и больные могут быть выявлены по наличию семейной отягощенности коронарной болезнью сердца и по ли-

пидному профилю крови. К настоящему времени в России идентифицировано 11 мутаций в гене рецептора ЛНП [2–4]. Однако эти мутации объясняют не более 15% случаев СГ в Санкт-Петербурге. В настоящем исследовании представлены новые результаты по изучению молекулярной варибельности гена рецептора ЛНП при СГ в российской популяции и описаны три мутации, из которых две новые, а одна, описанная ранее в Японии, впервые обнаружена в России.

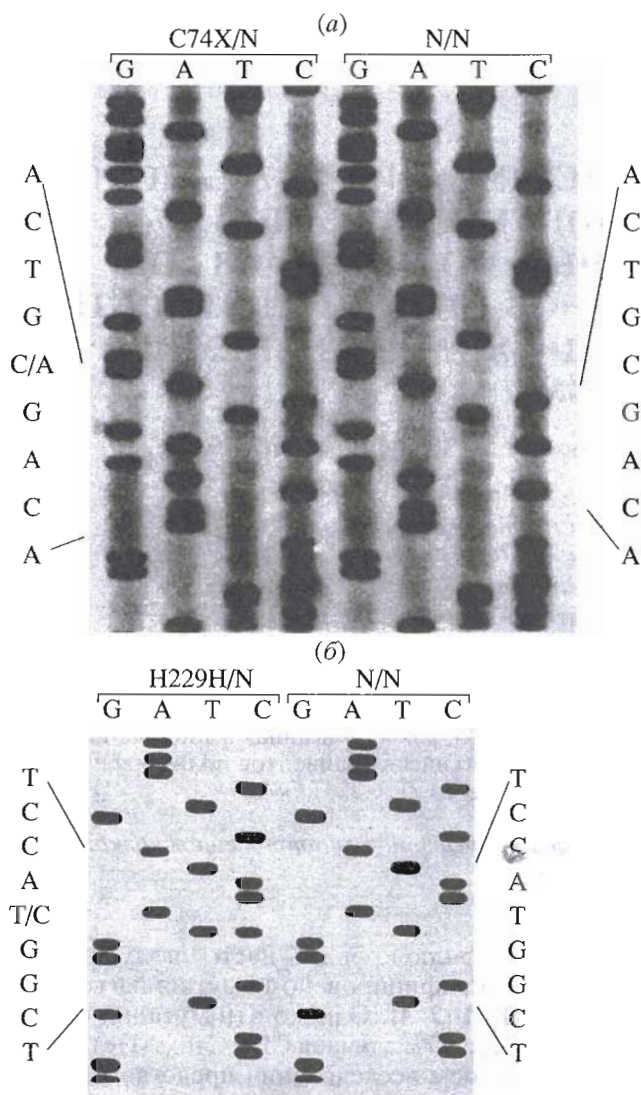
### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы осуществили поиск мутаций в экзонах 3, 5, 8, 12 и 15 гена рецептора ЛНП в коллекции ДНК от 100 пробандов с СГ. Образцы геномной ДНК, имеющие измененный характер миграции при проведении гетеродуплексного анализа и анализа конформационного полиморфизма однонитевых фрагментов ДНК (SSCA), были секвенированы. В результате мы идентифицировали молчащую мутацию H229H (с.750 C > T<sup>\*</sup>) (нумерация нуклеотидов и аминокислот по работе [5]) в экзоне 5, мутацию G571E (с.1775 G > A) в экзоне 12, нонсенс-мутацию C74X (с.285 C > A) в экзоне 3 и че-

Сокращения: ЛНП – липопротеины низкой плотности; RFLP – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов; ПЦР – полимеразная цепная реакция; СГ – семейная гиперхолестеринемия; SSCA – анализ конформационного полиморфизма однонитевых фрагментов ДНК.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (812) 234-33-56; факс: (812) 234-94-89; эл. почта: zakharova@VZ5518.spb.edu).

\* Символ “с.” перед цифрой означает, что нумерация нуклеотидов приведена по последовательности кДНК.



**Рис. 1.** Идентификация мутаций С74Х (а) и Н229Н (б) методом прямого секвенирования амплифицированных фрагментов экзона 3 (а) и 5 (б) гена рецептора ЛНП. N/N – ДНК пациента без мутации, С74Х/Н или Н229Н/Н – ДНК пациента с соответствующей мутацией в гетерозиготном состоянии.

тыре однонуклеотидных полиморфизма в других экзонах гена рецептора: А370Т (с.1171 G > А, экзон 8), N570N (с.1773 T > C, экзон 12), Т705I (с.2177 C > T, экзон 15) и R730R (с.2231 G > А, экзон 15).

Очевидно, что мутация С74Х может явиться причиной СГ у ее носителей, так как она приводит к образованию стоп-кодона (TGC → TGA) и, как следствие, к синтезу укороченного белка-рецептора, не содержащего полноразмерного лигандсвязывающего домена. На рис. 1а представлены данные секвенирования экзона 3 гена рецептора ЛНП пациента с мутацией С74Х в гетерозиготном состоянии. Нонсенс-мутация С74Х ранее описана у пациента с СГ из Японии [6]. Эта мутация при-

водит к появлению сайта узнавания для эндонуклеазы рестрикции *DdeI*, что делает легким ее поиск с помощью рестрикционного анализа. Методом рестрикционного анализа нами было обнаружено, что сын пробанда не имеет данной мутации.

На рис. 1б представлены данные секвенирования экзона 5 гена рецептора ЛНП пациента с мутацией Н229Н в гетерозиготном состоянии. Имеющая место у пациента замена С на Т в 750-м положении мРНК рецептора ЛНП не приводит к замене аминокислотного остатка в последовательности белка, так как оба кодона (САТ и САС) соответствуют гистидину. Данные о найденной нами мутации с.750 С > Т отсутствовали в Human Genome Mutation Database, а так как она обнаружена лишь на одной из 170 изученных хромосом, мы рассматриваем ее как редкую новую молчащую мутацию, а не как полиморфизм. Исчезновение участка узнавания для эндонуклеазы *NcoI* в последовательности, содержащей мутацию, делает возможным поиск этой мутации у других индивидумов с помощью рестрикционного анализа.

На рис. 2 приведено графическое изображение результатов автоматического секвенирования экзона 12 гена рецептора ЛНП с мутацией G571E в гетерозиготном состоянии. Эта мутация (с.1775 G > А) ранее не описана. Вполне вероятно, что возникающая в результате замена неполярного остатка глицина на отрицательно заряженный остаток глутаминовой кислоты, может приводить к нарушению функционирования рецептора ЛНП и объяснять достаточно высокое содержание холестерина (252 мг/дл) в крови пациента, и, как следствие, возникновение у него СГ.

Изучение частоты встречаемости однонуклеотидного полиморфизма с.2231 G/A (R730R, CGG → CGA), известного так же как *MspI* RFLP [7], показало, что из 192 изученных хромосом 38 (20%) имели аллель А, что близко к частоте, указанной в базах данных Интернета (24%). Исчезновение сайта для эндонуклеазы *MspI* позволяет использовать для поиска полиморфизма R730R рестрикционный анализ. Мутация Т705I была уже описана. Ранее было показано [8], что несмотря на происходящую замену остатка треонина на изолейцин, эта мутация не является причиной гиперхолестеринемии. Нуклеотидная замена G/A в положении 1171 кДНК приводит к исчезновению в последовательности экзона 8 гена рецептора ЛНП участка узнавания для эндонуклеазы рестрикции *StuI*, что позволяет тестировать ее с помощью рестрикционного анализа [9]. Эта мутация, известная как А370Т, изменяет аминокислотную последовательность рецептора, но не вызывает развития семейной гиперхолестеринемии. При мутации N570N (с.1773 T > C, экзон 12) изменение кодона в кДНК не приводит к изменению аминокислотной последовательности рецептора, так

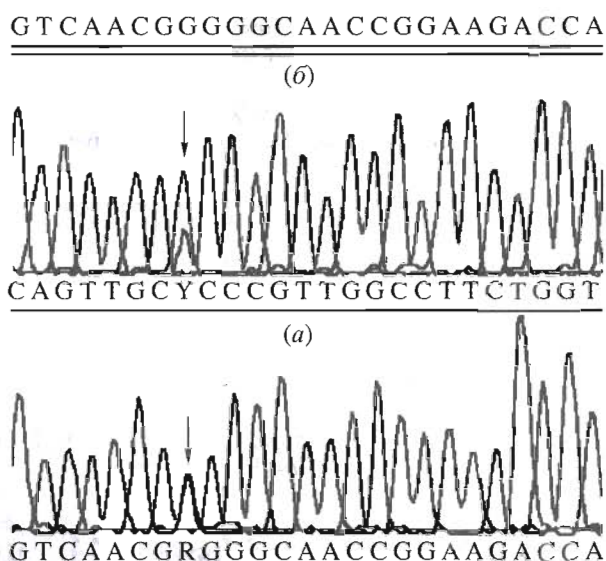


как и нормальный (AAT), и мутантный (AAC) кодоны соответствуют аспарагину. Данный полиморфизм также может быть выявлен с помощью рестрикционного анализа (при варианте последовательности AAC появляется сайт для эндонуклеазы *HincII*) [10].

Таким образом, в российской популяции наряду с широко распространенными однонуклеотидными полиморфными вариантами гена рецептора ЛНП, имеются уникальные, не описанные до этого мутации, которые благодаря проведенным нами исследованиям могут быть легко обнаружены в гене рецептора ЛНП с помощью рестрикционного анализа.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ДНК выделяли из лейкоцитов крови по методу Кюнклея [11, 12]. Амплификацию изучаемых экзонов гена рецептора ЛНП проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для амплификации ДНК использовали ранее описанные праймеры [2]. Размер ПЦР-фрагмента из экзона 3 составлял 176, экзона 5 – 173 (а не 252 как было указано [2]), экзона 8 – 175, экзона 12 – 209, экзона 15 – 246 п.о. ПЦР проходила в реакционной смеси (30 мкл), содержащей следующие компоненты: 50 мМ KCl, 10 мМ Трис-HCl pH 8.4, 1.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 200 мкмоль/л каждого из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0.25 мкмоль/л каждого из фланкирующих праймеров и 1 ед. акт. *Taq*-полимеразы. Геномную ДНК добавляли в количестве 30–50 нг на одну реакцию. Оптимизированный температурный профиль ПЦР включал 30 циклов и имел следующий вид: 95°C – 1 мин, 59°C (для экзонов 3, 5), 60°C (для экзонов 8, 15) или 62°C (для экзона 12) – 1 мин и 72°C – 1 мин. Перед началом первого цикла осуществляли денатурацию матричной геномной ДНК при 95°C в течение 5 мин, по окончании последнего цикла проводили финальную доработку амплифицированных фрагментов при 72°C в течение 9 мин. Полученные ПЦР-продукты анализировали с помощью электрофореза в 8% полиакриламидном геле (соотношение акриламид-бисакриламид, 29 : 1) в однократном Трис-боратном буфере [13]. После электрофореза ДНК в геле окрашивали серебром [14]. Поиск мутаций проводили с помощью методов гетеродуплексного [15] и SSCA-анализа [16]. Однонитевые конформеры разделяли электрофорезом в 12% (экзоны 3, 5) и 9% (экзоны 8, 12, 15) полиакриламидном геле (%С = 2.5) с полиэтиленгликолем 6000 [17]. Образцы ДНК, имеющие аномальный характер миграции однонитевых структур, были секвенированы по методу Сэнгера [13]. Для секвенирования использовали набор реактивов и протокол фирмы Медиген (Новосибирск, Россия), а в качестве метки – [α-<sup>33</sup>P]dATP. Электрофорез продук-



**Рис. 2.** Идентификация мутации G571E в экзоне с помощью автоматического секвенирования ДНК на приборе DNA Sequencer ABI 377 (Applied Biosystems, США). Приведены последовательности кодирующей (а) и некодирующей нитей (б) ДНК с мутацией в гетерозиготном состоянии. В самой верхней части рисунка приведена нормальная последовательность кодирующей нити гена рецептора ЛНП человека. Стрелками на рисунках показано положение нуклеотидной замены. R обозначает пуриновый нуклеозид, т.е. G или A, а Y – пиримидиновый, т.е. T или C.

тов секвенирующей реакции проводили в аппарате фирмы Macrofor (LKB-Pharmacia, Швеция).

### БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящая работа поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований № 97-04-48887 и № 00-04-48962, грантом программы поддержки Ведущих научных школ России № 00-15-97931 и программы “Геном человека”.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goldstein J.L., Brown M.S. // The Metabolic Basis of Inherited Disease. 6th ed. / Eds Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D. New York: MacGraw Hill, 1989. P. 1577–1698.
2. Hobbs H.H., Brown M.S., Goldstein J.L. // Hum. Mutat. 1992. V. 1. P. 445–466.
3. Манделъштам М.Ю., Голубков В.И., Шур Ю.А., Липовецкий Б.М., Гайцхоки В.С. // Биоорг. химия. 1998. Т. 24. С. 798–800.
4. Chakir Kh., Mandelsham M.Ju., Shevtsov S.P., Golubkov V.I., Skobeleva N.A., Schur Yu.A., Zakharova F.M., Lipovetskyi B.M., Konstantinov V.O., Denisenko A.D., Gaitshkoki V.S., Schwartz E.I. // Mol. Genet. Metab. 1998. V. 65. P. 311–314.

5. Yamamoto T., Davis C.G., Brown M.S., Schneider W.J., Casey M.L., Goldstein J.L., Russell D.W. // *Cell*. 1984. V. 39. P. 27–38.
6. Hirayama T., Yamaki E., Hata A., Tsuji M., Hashimoto K., Yamamoto M., Emi M. // *J. Hum. Genet.* 1998. V. 43. P. 250–254.
7. Geisel J., Weisshaar B., Oette K., Mechtel M., Dorfler W. // *Nucl. Acids Res.* 1987. V. 15. P. 3943.
8. Lombardi P., Sijbrands E.J., Kamerling S., Leuven J.A., Havekes L.M. // *Hum. Genet.* 1997. V. 99. P. 106–107.
9. Kotze M.J., Retief A.E., Brink P.A., Weich H.F.H. // *S. Afr. Med. J.* 1986. V. 70. P. 77–79.
10. Leitersdorf E., Hobbs H. // *Nucl. Acids Res.* 1988. V. 16. P. 7215.
11. Kunkel L.M., Smith K.D., Boyer S.H. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 74. P. 1245–1249.
12. Bell G.I., Karam J.H., Rutter W.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1981. V. 78. P. 5759–5763.
13. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. ed. Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
14. Oto M., Miyake S., Ywaza Y. // *Anal. Biochem.* 1993. V. 213. P. 19–22.
15. White M.B., Carvalho M., Derse D., O'Brian S.J., Dean M. // *Genomics*. 1992. V. 12. P. 301–306.
16. Orita M., Suzuki Y., Sekiya T., Hayashi K. // *Genomics*. 1989. V. 5. P. 874–879.
17. Markoff A., Savov A., Vladimirov V., Bogdanova N., Kremensky I., Ganov V. // *Clin. Chem.* 1997. V. 43. P. 30–33.

## Identification of Novel Missense Mutation G571E, Novel Silent Mutation H229H, Nonsense Mutation C74X, and Four Single Nucleotide Polymorphisms in the Low-density Lipoprotein Receptor Gene in Patients with Familial Hypercholesterolemia from St. Petersburg

F. M. Zakharova<sup>\*,#</sup>, V. I. Golubkov<sup>\*</sup>, M. Ju. Mandelshtam<sup>\*</sup>,  
B. M. Lipovetskii<sup>\*\*</sup>, and V. S. Gaitskhoki<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>*Institute Experimental Medicine, Russian Academy of Medical Sciences,  
ul. Akad. Pavlova 12, St. Petersburg, 197376 Russia*

<sup>\*\*</sup>*Institute of Human Brain, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

Novel missense mutation G571E (c.1775 G > A), novel silent mutation H229H (c.750 C > T), and nonsense mutation C74X (c.285 C > A), earlier described in Japan but unknown in Russia, were identified in the low-density lipoprotein (LDL) receptor gene in St. Petersburg familial hypercholesterolemia in patients. The analyzed group of patients was shown to be polymorphic in many positions of the LDL receptor gene, namely: c.1171 G/A, c.1773 T/C, c.2177 C/T, and c.2231 G/A. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words: mutation, single nucleotide polymorphisms, low-density lipoprotein receptor, familial hypercholesterolemia*

<sup>#</sup> *To whom correspondence should be addressed; phone: + 7 (812) 234-3356; fax: + 7 (812) 234-9489; e-mail: zakharova@VZ5518.spb.edu.*