

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1996

УДК 616.441-055.5/7-008.9-074

Д. А. Кадырова, Б. А. Атаханова, М. Л. Рахимова, Г. Д. Умарова, Я. Х. Туракулов

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ТИРЕОГЛОБУЛИНА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

Лаборатория молекулярной биологии (зав. — проф. Б. А. Атаханова) Института биохимии (дир. — член-корр. АН Республики Узбекистан Т. С. Саатов) АН Республики Узбекистан, Ташкент

Врожденные аномалии тиреоидного метаболизма могут привести к замедлению роста и умственного развития, поэтому для обнаружения заболевания на начальной стадии и своевременного лечения необходима программа скрининга новорожденного. Около 3–5% случаев врожденного гипотиреоза обусловлены дефектом синтеза или структуры основного белка щитовидной железы тиреоглобулина (ТГ).

ТГ — йодсодержащий гликопротеин, в составе которого осуществляется биосинтез тиреоидных гормонов. Нативный ТГ состоит из 2 идентичных 12S-субъединиц с мол. массой по 330 кД, кодируемых 33S мРНК. мРНК_{ТГ} — одна из самых больших мРНК, описанных у млекопитающих; ее мол. масса составляет $2,8 \cdot 10^6$ Д. В последние годы ТГ стал объектом молекулярно-биологических исследований: на матрице мРНК_{ТГ} удалось синтезировать 2-нитевую кДНК полной длины, т. е. получить полный структурный ген ТГ [9].

Протяженность гена ТГ более 300 т. п.н. В геноме человека ген ТГ представлен 1 копией. Он содержит не менее 37 экзонов, разделенных интронами. Между 5¹- и 3¹-областями гена ТГ обнаружены значительные структурные различия: все экзоны, кодирующие 3¹-область мРНК, примерно одинакового размера (100–200 т. п.н.), в 5¹-области среди экзонов одинакового размера имеются экзоны размером 1120 и 560 п.н.; в 3¹-области обнаружены интроны размером 64 т. п.н., в то время как размеры интронов 5¹-концевого сегмента не превышают 8 т. п.н. [5].

Вследствие большого размера гена ТГ ожидается, что он подвержен значительному числу инактивирующих мутаций. Природа дефектов в гене ТГ при наследственных заболеваниях щитовидной железы человека неизвестна, поэтому молекулярно-генетические исследования этих заболеваний основаны на семейном анализе распределения нормальных полиморфных участков узнавания рестриктаз, т. е. на изучении нормального полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ). В последние годы в литературе обсуждаются перспективы изучения ПДРФ для диагностики наследственных заболеваний щитовидной железы [3, 4].

Основной целью данной работы были проведение популяционно-генетического анализа ПДРФ, выявляемого в гене ТГ, и отработка системы молекулярно-генетических исследований наследственных заболеваний щитовидной железы, связанных с полинуклеотидными перестройками в структуре ТГ.

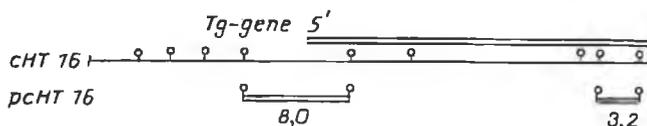


Рис. 1. Организация 5¹-конца гена ТГ.

Рестрикционная карта космидного клона и (рестриктаза EcoRI).

Материалы и методы

ДНК из лейкоцитов человека выделяли методом фенольной экстракции [2]. Рестрикционный анализ проводили с помощью рестриктаз BamHI, HindIII, EcoRI, EcoRV, MstI, PvuII (НПО "Фермент", Вильнюс). Фрагменты ДНК (1 мкг на пробу) разделяли методом электрофореза в 0,8% агарозном геле по методу P. Sharp и соавт. [7]. Перенос ДНК из геля на нейлоновые фильтры "Biodan" осуществляли по методу E. Southern [8]. Введение радиоактивной метки в ДНК проводили методом нуклеотидного замещения радиоактивной метки в ДНК по P. Riqby и соавт. [6] с помощью ДНК-полимераз E.coli. Гибридизацию проводили с мечеными ³²P ДНК вышеуказанных клонов (удельная активность 10⁷–10⁸ срп/мкг) в течение 18 ч при 65°C в смеси, содержащей 4X ССР, 4-кратный раствор Денхарта, 0,5 мг/мл поли (У), 0,1% SDS, 5% декстрансульфата. После гибридизации фильтры тщательно отмывали и подвергали автордиографии в течение 5–15 дней при –70°C, используя пленку РМ-1 и усиливающие экраны.

Результаты и их обсуждение

Ген ТГ человека картирован в длинном плече хромосомы 8 в области полосы q24, что было подтверждено как гибридизацией *in situ*, так и блот-анализом по Саузерну соматических клеток гибридов человек — грызун [4].

Для изучения ПДРФ были использованы зонды, охватывающие 5¹-конец гена ТГ (рис. 1).

В исследованиях заболеваний большое значение имеет определение гетерозиготного носительства, т. е. выявление в популяции индивидуумов, у которых нет данного заболевания, но они гетерозиготны по рецессивной мутации, которая способна выявить эту болезнь.

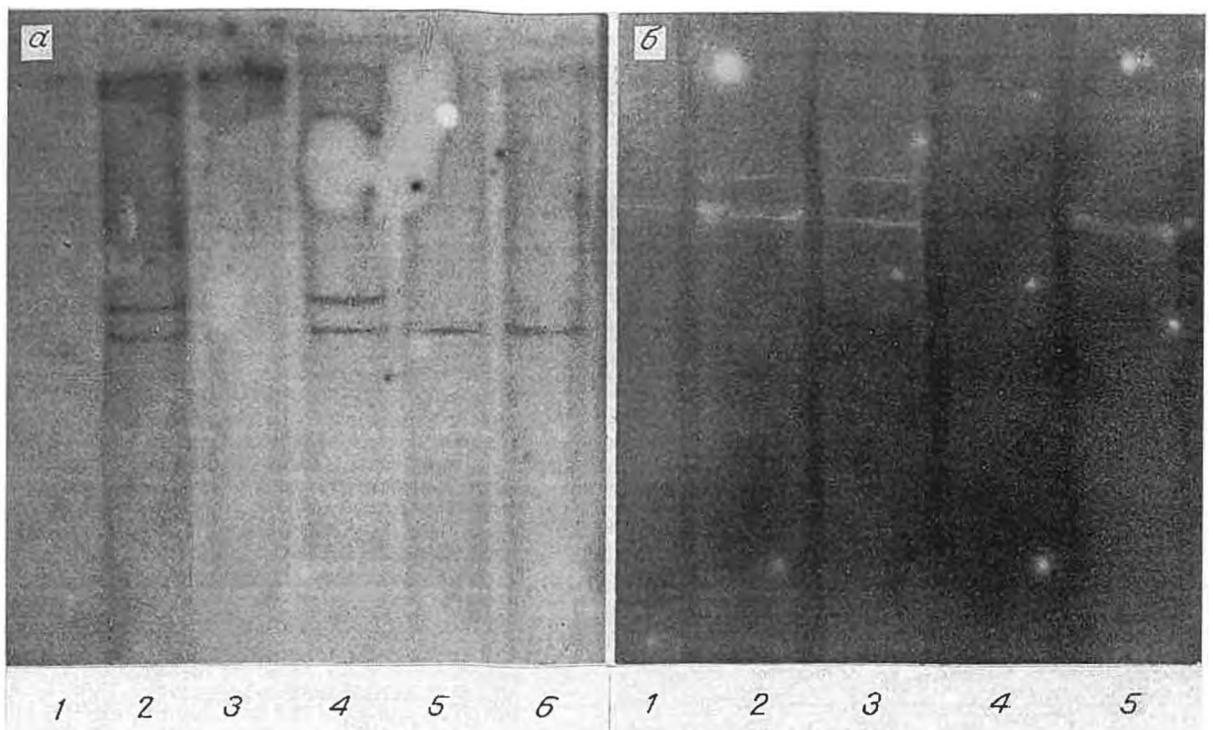
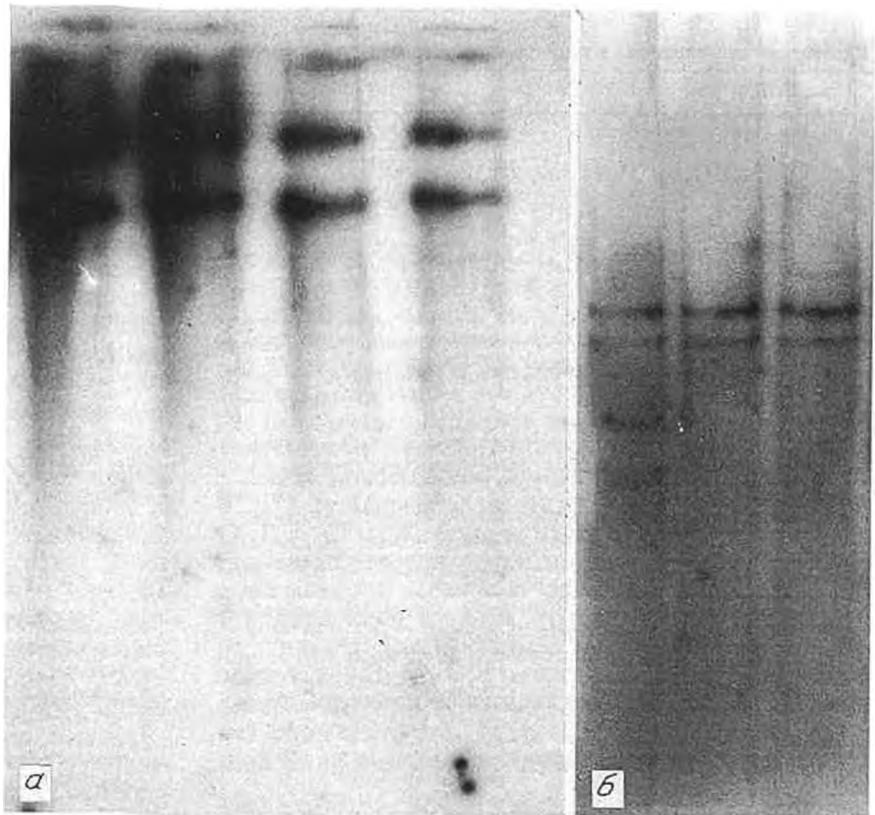
При расщеплении образцов ДНК крови здоровых жителей Ташкента рестриктазами EcoRV и TaqI с последующим блот-анализом были обнаружены 2 пары альтернативных вариантов нормального ПДРФ — 13,8 или 8,5 и 5,8 или 5,2 т. п.н. соответственно (рис. 2). Для каждого фермента было протестировано по 40 индивидуумов. В табл. 1 приведены распределения генотипов по рестрикционным полиморфным сайтам EcoRV и TaqI в гене ТГ здоровых доноров — жителей Ташкента.

Частота встречаемости EcoRV- и TaqI-полиморфизма в гене ТГ составила 33 и 21% соответственно (табл. 2).

Рис. 2. Авторадиограф образцов ДНК из донорской крови, обработанных рестриктазами *EcoRV* (а) и *TaqI* (б).

Рис. 3. Авторадиограф образцов ДНК из крови больных, обработанных рестриктазами *EcoRV* (а) и *TaqI* (б).

а: 1 — норма, 2 — отец, 3 — дочь, 4 — мать; б: 1 — мать, 2 — норма, 3 — отец, 4 — дочь.



Для исследования ПДРФ в гене ТГ при врожденном гипотиреозе были проанализированы образцы ДНК 2 семей (мать, отец, дочь) с клиническим диагнозом врожденного гипотиреоза. Найдены 2 пары альтернативных вариантов ПДРФ, выявляемых при расщеплении ДНК рестрикционными эндонуклеазами (*EcoRV*-зондом рсНТ 16/3,2 и *TaqI*-зондом рсНТ 16/8,0 в зависимости от присутствия или отсутствия полиморфного сайта) — 13,8 или 8,5 и 5,8 или 5,2 т. п.н. (рис. 3).

Как известно, наличие у человека той или иной формы ПДРФ — характеристика чисто вероятностная; чем больше вариантов ПДРФ, связанного с данным геном, имеется в данной популяции, тем больше вероятность того, что удастся подобрать нужную рестриктазу. В этом отношении ген фенилаланингидроксилазы оказался весьма удачным. Частота встречаемости ПДРФ в гене фенилаланингидроксилазы составляет более 80%, что обеспечивает возможность диагностики фе-

Таблица 1
Распределение генотипов в гене ТГ здоровых жителей Ташкента

ПДРФ	Генотип	Популяция
EcoRV	++	37
	+ -	13
	--	0
TaqI	++	40
	+ -	32
	- +	8
	--	0
		40

Примечание. + присутствует сайт рестрикции, - отсутствует сайт рестрикции.

нилкетонурии в абсолютном большинстве семей с возможным риском данного заболевания [1]. В случае заболеваний щитовидной железы ПДРФ оказался неожиданно редким, что ограничивает круг семей, в которых возможна диагностика. Так, при средней частоте замен и нуклеотидов в рамках нормального полиморфизма, составляющей примерно 1 замену на 100—200 п.н., в случае гена ТГ из "прозондированных" с помощью большого набора рестриктаз 1164 п.н. полиморфизм наблюдался лишь в 1 случае с очень низкой частотой — около 2% [2].

ПДРФ обнаруживается в 5¹- и 3¹-областях гена ТГ с разной частотой. Если в 3¹-концевой области выявлен всего лишь 1 редко встречаемый ПДРФ, то в 5¹-области выявлены 2 высокоповторяемых ПДРФ. Частота встречаемости EcoRV и TaqI ПДРФ составила 15 и 20% соответственно. Эти 2 высокочастотных ПДРФ в 5¹-части гена могут быть использованы для исследования не только врожденных аномалий синтеза ТГ, но и сцепления в области теломеры хромосомы 8q [4].

Наши результаты, а также данные об обнаружении 2 высокочастотных ПДРФ в 5¹-области гена ТГ дают возможность использовать ПДРФ в

Таблица 2
Частота полиморфных сайтов рестрикции в гене ТГ здоровых жителей Ташкента

ПДРФ	Показатель	Популяция
EcoRV	p	0,33 ± 0,04
	q	0,67
	N	40
TaqI	p	0,21 ± 0,06
	q	0,79
	N	40

Примечание. p и q — частота положительных и отрицательных сайтов рестрикции соответственно, N — число случаев.

качестве маркера для исследования врожденных аномалий синтеза ТГ, а в дальнейшем и для ДНК-диагностики этих заболеваний.

Выводы

1. Проведен популяционно-генетический анализ ПДРФ, выявляемого в гене ТГ. При расщеплении образцов крови здоровых жителей Ташкента рестриктазами EcoRV и TaqI были обнаружены 2 пары альтернативных вариантов нормального ПДРФ — 13,8 или 8,5 и 5,8 или 6,2 т. п.н. соответственно.

2. С целью выявления ПДРФ в гене ТГ при врожденном гипотиреозе проанализированы образцы ДНК 2 семей (мать, отец, дочь) с клиническим диагнозом врожденного гипотиреоза и обнаружены те же варианты ПДРФ, что и у здоровых индивидуумов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Калинин В. Н. // Достижения в молекулярной генетике. Достижения современной генетики и перспективы их использования в медицине. — М., 1987. — С. 38—48.
2. Шипицина Г. И., Луц М. Г., Шифтер К. А. и др. // Генетика. — 1980. — № 1. — С. 78—85.
3. Baas F., Bikker H., van Ommen G. J., de Vijlder J. J. M. // Hum. Genet. — 1984. — Vol. 67. — P. 301—305.
4. Baas F., Bikker H., Geurts A. et al. // Ibid. — 1985. — Vol. 69. — P. 138—143.
5. Baas F., van Ommen H., Bikker A. et al. // Nucl. Acids Res. — 1986. — Vol. 14. — P. 5171—5186.
6. Rigby P. W. J., Diecman M., Ponders G., Berg P. // J. Mol. Biol. — 1977. — Vol. 113. — P. 237—251.
7. Sharp P. A., Sugden B., Sambrook J. // Biochemistry. — 1973. — Vol. 12. — P. 3055—3063.
8. Southern E. M. // J. Mol. Biol. — 1975. — Vol. 98. — P. 503—517.
9. Vassart G., Brocas H., Lecocq E., Dumont E. // Eur. J. Biochem. — 1975. — Vol. 55. — P. 15—22.

Поступила 29.11.95

D. A. Kadyrova, B. A. Atakhanova, M. L. Rakhimova, G. D. Umarova, Ya. Kh. Turakulov — STUDY OF HUMAN THYROGLOBULIN GENE POLYMORPHISM

Summary. The nature of defects in thyroglobulin (TG) gene in hereditary diseases of the thyroid is unknown. Molecular genetic investigations of such diseases are based on familial analysis of distribution of normal polymorphic sites of restriction recognition, that is, on study of the normal polymorphism of the length of restriction fragments (PLRF). Population genetic analysis of PLRF detected in the TG gene was carried out. Study of the distribution of DNA by EcoRV and TaqI restrictases in blood samples from donors in the town of Tashkent, followed by blot analysis, revealed a simple two-allele polymorphism. The incidence of EcoRV and TaqI polymorphism in the TG gene was 33 and 21%, respectively. In order to find out the PLRF in the TG gene in patients with congenital hypothyroidism, DNA samples were analyzed in two families with the clinical diagnosis of congenital hypothyroidism. The same PLRF variants as in normal subjects were found. These results demonstrate the efficacy of using the detection of PLRF for the study of congenital abnormalities, synthesis of TG, and, possibly, for the DNA diagnosis in future.