

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ

1·2014

Квартальный
научно-теоретический журнал

Основан в январе 1983 г.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. В. КОСТРОВ
Зам. главного редактора Ю. М. РОМАНОВА
Ответственный секретарь Т. С. ИЛЬИНА

В. И. АГОЛ, А. Д. АЛЬТШТЕЙН, А. П. АНИСИМОВ, В. А. ГВОЗДЕВ,
В. Н. ГЕРШАНОВИЧ, А. Л. ГИНЦБУРГ, В. В. ДЕМКИН, Н. В. КАВЕРИН,
Е. Д. КУЗНЕЦОВА (научный редактор), С. А. ЛИМБОРСКАЯ, С. А. ЛУКЬЯНОВ,
Н. Ф. МЯСОЕДОВ, С. В. НЕТЕСОВ, Е. Д. СВЕРДЛОВ, Г. Б. СМИРНОВ,
Н. И. СМЕРНОВА, В. З. ТАРАНТУЛ

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

А. М. БОРОНИН (Пушино-на-Оке), В. И. ВОТЯКОВ (Минск),
А. А. ПРОЗОРОВ (Москва), Ю. К. ФОМИЧЕВ (Минск),
С. В. ШЕСТАКОВ (Москва)

Журнал утвержден в Перечне ведущих научных журналов и изданий, выпускаемых в Российской Федерации, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук (Бюллетень ВАК)

Журнал полностью переводится на английский язык в США издательством ALLERTON PRESS, INC.

Сведения о статьях, публикуемых в журнале, размещаются в следующих международных информационно-справочных изданиях: *Index Medicus*, *Biological Abstracts*, *Chemical Abstracts*, *Current Contents*, *Ulrich's International Periodicals Directory*, а также журнал включен в информационные продукты Thomson Reuters. Начиная с тома 23 (1) 2008 г. издание индексируется и вносится в следующие базы данных:

- Science Citation Index Expanded (известный также как SciSearch®)
- Journal Citation Reports/Science Edition®
- Biotechnology Citation Index®
- Biological Abstracts
- BIOSIS Previews.



МОСКВА «ИЗДАТЕЛЬСТВО "МЕДИЦИНА"»

СОДЕРЖАНИЕ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Филатова Е.В., Алиева А.Х., Шадрина М.И., Шульская М.В., Федотова Е.Ю., Иллариошкин С.Н., Лимборская С.А., Сломинский П.А.** Анализ мутаций у пациентов с предполагаемой аутосомно-доминантной формой болезни Паркинсона 3
- Тюрин Ю.А., Шамсутдинов А.Ф., Фассахов Р.С.** Изучение полиморфизма однонуклеотидных фрагментов *aur* гена металлозависимой протеазы штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных с кожи больных atopическим дерматитом ... 5
- Тимофеев В.С., Кудрявцева Т.Ю., Мокриевич А.Н., Павлов В.М., Дятлов И.А.** Молекулярное типирование штаммов *Francisella tularensis* методом мультилокусного анализа вариативности числа tandemных повторов 8
- Лакхин А.В., Тарантул В.З., Генинг Л.В.** Индуцированный марганцем некорректный синтез ДНК как возможная причина мanganизма 15
- Смирнова Н.И., Агафонов Д.А., Щелканова Е.Ю., Заднова С.П., Черкасов А.В., Кутырев В.В.** Геноварианты возбудителя холеры Эль Тор: получение, молекулярно-генетический и протеомный анализ 21
- Субботина Е.Л., Локтев В.Б.** Молекулярная эволюция вируса Западного Нила 31

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

- Zhibin Sun, Yan Huang, Yanzhuo Wang, Yugu Zhao, Zhongli Cui.** Potassium Hydroxide-Ethylene Diamine Tetraacetic Acid Method for the Rapid Preparation of Small-scale PCR template DNA from Actinobacteria. 38

CONTENTS

EXPERIMENTAL WORKS

- Filatova E. V., Alieva A. Kh., Shadrina M. I., Shulskaya M. V., Fedotova E. Y., Illarioshkin S. N., Limborska S. A., and Slominsky P. A.** Analysis of Mutations in Patients with Suspected Autosomal Dominant Form of the Parkinson Disease 3
- Tuyrin Y. A., Shamsutdinov A. F., and Fassahov R. S.** A Study of the Single Nucleotide Polymorphism Fragments of the *aur* Gene Metalloprotease Strains of *Staphylococcus aureus* Isolated from the Skin of Patients with Atopic Dermatitis 5
- Timofeev V. S., Kudryavtseva T. Y., Mokrievich A. N., Pavlov V. M., and Dyatlov I. A.** *Francisella tularensis* Strains Molecular Typing Using the Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis 8
- Lakhin A. V., Tarantul V. Z., and Gening L. V.** The Manganese-Induced Infidelity of the DNA Synthesis as a Possible Cause of Manganism 15
- Smirnova N. I., Agafonov D. A., Shchelkanova E. Yu., Zadnova S. P., Cherkasov A. V., and Kutyrev V. V.** Genovariants of the Cholera Agent Biovar El Tor: Construction, Molecular-Genetic, and Proteomic Analysis 21
- Subbotina E. L. and Loktev V. B.** Molecular Evolution of the West Nile Virus 31

SHORT COMMUNICATION

- Zhibin Sun, Yan Huang, Yanzhuo Wang, Yugu Zhao, and Zhongli Cui.** Potassium Hydroxide-Ethylene Diamine Tetraacetic Acid Method for the Rapid Preparation of Small-scale PCR Template DNA from Actinobacteria 38



Адрес редакции:

Москва, 107140

ул. Верхняя Красносельская, д. 17А, стр. 1 Б

ОАО «Издательство "Медицина"»

Редакция журнала "Молекулярная генетика, микробиология и вирусология"

Тел. редакции: (499) 264-36-66

e-mail: molgenetika@yandex.ru

Зав. редакцией И. Х. Измайлова

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ

Тел./факс 8-499-264-00-90

E-mail: oao-medsina@mail.ru

Ответственность за достоверность информации, содержащейся в рекламных материалах, несут рекламодатели.

Редактор Е. И. Константинова

Художественный редактор
А. В. Минаичев

Корректор А. В. Малахова

Переводчик С. К. Чаморовский

Все права защищены. Ни одна часть этого издания не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

Сдано в набор 18.11.13

Подписано в печать 23.12.13

Формат 60 × 88%.

Печать офсетная. Печ. л. 5,00.

Усл.-печ. л. 4,90. Уч.-изд. л. 5,50.

Заказ 19.

Подписной тираж номера 180 экз.

ЛР №010215 от 29.04.97 г.

E-mail: meditsina@mtu-net.ru

www.medlit.ru

Отпечатано в типографии ООО "Подольская Периодика",

142110, г. Подольск, ул. Кирова, 15

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014
УДК 616.858-092-612.6.05]:577.21.08

**Е.В. Филатова¹, А.Х. Алиева¹, М.И. Шадрина¹, М.В. Шульская¹, Е.Ю. Федотова²,
С.Н. Иллариошкин², С.А. Лимборская¹, П.А. Сломинский¹**

АНАЛИЗ МУТАЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ПРЕДПОЛАГАЕМОЙ АУТОСОМНО-ДОМИНАНТНОЙ ФОРМОЙ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

¹Институт молекулярной генетики Российской академии наук, 123182 Москва, Россия. ²Научный центр неврологии Российской академии медицинских наук, 125367, Москва, Россия

Болезнь Паркинсона (БП) – тяжелое неврологическое заболевание человека, в патогенез которого вовлечены различные генетические системы и факторы внешней среды. Однако, несмотря на активные исследования этого заболевания, причины его остаются до конца не выясненными и по-прежнему не определен точный спектр всех генов и мутаций, принимающих участие в патогенезе наследственной формы БП. Настоящая работа посвящена анализу мутаций, приводящих к развитию моногенных форм БП, у пациентов с предполагаемой аутосомно-доминантной формой БП с помощью множественной лигазной полимеразной реакции (МЛПР). Выявлены мутации (G2019S в *LRRK2*, гетерозиготные делеции 2 и 3, 3 и 4 экзонов и гетерозиготная дупликация экзонов 2-4 гена *PARK2*, делеция экзона 3 в гене *PARK7*), приводящие к развитию БП, только у 7 (18,4%) человек из 70, что говорит о необходимости дальнейшего поиска новых мутаций, например, с помощью методов экзомного секвенирования. В дальнейшем это поможет разработать молекулярно-генетические тесты для ранней доклинической диагностики и определения риска развития БП и лучше понять причины и механизмы развития этого заболевания.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона; мутации; множественная лигазная полимеразная реакция

Болезнь Паркинсона (БП) – тяжелую неврологическую патологию, являющуюся одним из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний человека, в настоящее время относят к мультифакториальным заболеваниям, в патогенез которых вовлечены различные генетические системы и факторы внешней среды. В основе неуклонно прогрессирующего течения БП лежит гибель дофаминергических нейронов компактной части черной субстанции головного мозга, однако истинные причины развития БП в настоящее время остаются до конца невыясненными [1]. В настоящее время считают, что для большинства больных характерно спорадическое развитие заболевания, и только в 10–15% случаев оно наследуется по моногенному аутосомному типу. На данный момент в 7 генах моногенных форм БП (*SNCA*, *PARK2*, *LRRK2*, *PARK7*, *PINK1*, *UCHL1*, *ATP13A2*) обнаружено около двух сотен различных мутаций, приводящих к развитию заболевания [2, 3]. Однако даже такое большое количество выявленных мутаций не способно объяснить все случаи наследственных и тем более спорадических форм БП. По-прежнему остается открытым вопрос о том, какой вклад вносят в патогенез спорадической формы БП гены семейных форм заболевания и другие генетические факторы.

Настоящая работа посвящена анализу мутаций, приводящих к развитию моногенных форм БП, у пациентов с предполагаемой аутосомно-доминантной формой БП с помощью множественной лигазной полимеразной реакции (МЛПР). Данная работа в дальнейшем позволит разработать методы отбора пациентов для более детального и эффективного (но дорогостоящего)

поиска и анализа новых мутаций и генов – экзомного секвенирования. Это позволит уточнить спектр генетических причин развития семейных форм БП в российской популяции, а также выявить ранее неизвестные мутации, приводящие к формированию аутосомно-доминантной формы БП. Дальнейший анализ мутаций в генах, вовлеченных в патогенез БП, позволит разработать молекулярно-генетические тесты для ранней доклинической диагностики и определения риска развития БП, а кроме того, лучше понять причины и механизмы развития этого заболевания.

Материалы и методы

В настоящей работе было исследовано 70 пробандов, у которых на основании семейного анамнеза диагностировали БП с высокой вероятностью аутосомно-доминантного типа наследования. Все пациенты с БП были русскими по происхождению из Москвы. Пациенты были отобраны и исследованы по международной унифицированной оценочной шкале БП (Unified Parkinson's Disease Rating Scale – UPDRS) и шкале Хен и Яра (Hoehn and Yahr scores) [4, 5] в Научном центре неврологии Российской академии медицинских наук (Москва). Средний возраст пациентов составил 53,2±6,8 (47–60) года, среднее значение ± стандартное отклонение (диапазон), соотношение по полу: мужчины/ женщины 16/22. Все образцы крови были взяты с информированного согласия исследуемых лиц. Настоящее исследование было одобрено Этическим комитетом Научного центра неврологии Российской академии медицинских наук (Москва).

Выделение геномной ДНК из лейкоцитов проводили с использованием набора AxyPrepBlood Genomic DNA Miniprep Kit («Axygen», США) согласно рекомендациям производителя. Концентрацию выделенных нуклеиновых кислот измеряли с помощью набора Quant-iT RNA BR Assay Kit и флуориметра Qubit («Invitrogen», США) согласно рекомендациям производителя.

Подготовку образцов ДНК пациентов с БП для проведения фрагментного анализа проводили методом МЛПР с использованием наборов зондов P051-50 (lot C2-0911) и P052-50 (lot C1-0809) для диагностики БП и набора реагентов EK1-FAM для МЛПР SALSA MLPA («MRC-Holland b.v.», Нидерланды) согласно рекомендациям производителя.

Капиллярный электрофорез проводили на приборе ABI-Prism 3100 («Applied Biosystems», США) с использованием капилляра длиной 36 см и полимера POP-4 согласно рекомендациям производителя. В качестве маркера был использован размерный стандарт GeneScan™ – 600 LIZ® Size Standard («Applied Biosystems», США).

Первичную обработку полученных данных, сопоставление полученных пиков с информацией о них в наборе праймеров и зондов на мутации и полиморфизмы, а также фрагментный анализ проводили с использованием программного обеспечения Coffalyser.Net («MRC-Holland», Нидерланды).

Результаты и обсуждение

В ходе работы у 7 (18,4%) пациентов были найдены различные мутации, приводящие к развитию моногенных форм БП.

В 3 (8%) случаях обнаружена точковая мутация G2019S в гене дардарина *LRRK2* (что подтверждает ра-