

© Дмитрук І. М., Макух Г. В., Тиркус М. Я., Акопян Г. Я.

УДК 616.71-007.157:575.113.2

Дмитрук І. М., Макух Г. В., Тиркус М. Я., Акопян Г. Я.

АЛЕЛЬНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНІВ ЗАДІЯНИХ В ПРОЦЕСАХ МЕТИЛУВАННЯ ДНК В БАТЬКІВ ДІТЕЙ З DE NOVO МУТАЦІЯМИ АХОНДРОПЛАЗІЇ ЧИ ГІПОХОНДРОПЛАЗІЇ

ДУ «Інститут спадкової патології

Національної академії медичних наук України» (м. Львів)

iryname.dmytruk@gmail.com

Робота виконувалась в межах науково-дослідної роботи «Роль генетичного поліморфізму механізмів репарації і метилування ДНК в реалізації клінічного поліморфізму захворювань людини та визначенні схильності до виникнення соматичних і гермінативних мутацій» (№ державної реєстрації – 0114U001551).

Вступ. Мутації *de novo* в статевих та соматичних клітинах є етіологічною складовою багатьох захворювань людини. Вивчення механізмів та ендегенних чинників виникнення мутацій є актуальним питанням сучасної генетики, й генетики людини, зокрема.

Так званими «гарячими точками» появи мутацій є метильовані фрагменти ДНК. Оскільки, 60-70% всіх цитозинових залишків ДНК людини метильовані в ділянках повторів 5'-CpG-3', а гени, що містять в своїй структурі значний відсоток CpG-основ мають найвищу частоту виникнення мутацій, прослідковується можливість впливу профілю метилування ДНК на частоту виникнення та локалізацію спонтанних мутацій [4].

Найбільш мутуючим з усіх відомих в даний час нуклеотидів в людському геномі є метильований цитозин-фосфат-гуанозиновий динуклеотид 1138 гена *FGFR3* (рецептор фактору росту фібробластів 3) [20]. Мутації гена *FGFR3* G>A та G>T в положенні 1138 в гаметах ведуть до розвитку ахондроплазії (АХ), аутосомно-домінантного захворювання, яке є найбільш поширеною формою спадкової диспропорціональної низької статури і у більш ніж в 80% відсотках випадків виникає внаслідок мутації *de novo* [7, 12]. Також, внаслідок спонтанних мутацій C>A або C>G в нуклеотиді 1620 гена *FGFR3* виникає гіпохондроплазія (ГХ), аутосомно-домінантне захворювання, яке входить до скелетних дисплазій і фенотипово нагадує прояви ахондроплазії [6,14]. Виникає АХ та ГХ внаслідок нової мутації, яка відбулася в сперматозоїді чи яйцеклітині, з яких утвориться ембріон і залежить від віку батька [11,13]. Генетичні чинники

появи *de novo* мутацій в генеративних клітинах невідомі. Припускаємо, що зміна профілю метилування ДНК може виступати фактором ризику появи таких мутацій.

Одним з ключових ферментів, які здійснюють метилування ДНК у людини є ДНК-метилтрансфераза 3В (*DNMT3B*), що здійснює формування профілю метилування ДНК на ранніх стадіях онтогенезу [17]. Однунуклеотидні заміни 149C>T та 579G>T в гені *DNMT3B* впливають на функціонування гену та змінювати активність ферменту під час метилування ДНК [9,22]. Біодоступність метильних груп залежить від активності ферментів фолатного обміну. Ключовим ензиматичним регулятором є метилентетрагідрофолат редуктаза (*MTHFR*), що перетворює 5,10-метилентетрагідрофолат до 5-метилтетрагідрофолату, що виступає донором вуглецю при реметилуванні гомоцистеїну до метіоніну [3]. Метіонін синтаза (*MTR*) каталізує метилування до S-аденозилметіоніну – джерела метильних груп при метилуванні ДНК [10]. Тимідилат синтаза (*TYMS*) каталізує перетворення 5,10-метилентетрагідрофолату до дигідрофолату і дизоксидуридину до дизокситиміну. 5'нетрансльований регіон гена *TYMS* містить поліморфізм кількості тандемних повторів, так при наявності алелі з трьома тандемними повторами (3R) рівень мРНК вищий ніж при двох повторах (2R) [21]. В другому повторі 3R алелі картовано однунуклеотидну заміну 3R G>C, що також впливає на експресію гена *TYMS* [8]. Однунуклеотидні поліморфізми *MTHFR* 677C>T та *MTR* 2756 A>G змінюють ензиматичну активність генів і ведуть до зниження кількості субстрату необхідного для процесів метилування ДНК [3,10].

Підсумовуючи все вище викладене, припускаємо, що наявність певних алелів генів фолатного обміну та метилтрансфераз можуть виступати одним із чинників підвищеного ризику виникнення мутації *de novo* у статевих клітинах і відповідно зумовлювати

наявність патології (ахондроплазії/гіпохондроплазії) у їх дітей.

Мета роботи — охарактеризувати алельний поліморфізм генів задіяних в системі метилювання ДНК (*DNMT3B*, *MTHFR*, *MTR* та *TYMS*) в батьків дітей з de novo мутаціями ахондроплазії чи гіпохондроплазії.

Об'єкт і методи дослідження. Групу обстеження склали 24 сім'ї з виявленими у пробандів de novo випадками ахондроплазії чи гіпохондроплазії, а саме 20 повних сімей (батько та матір) та 4 сім'ї з обстеженими матерями. У досліджувану групу увійшло 24 матері, віком від 22 до 41 року ($29,83 \pm 5,47$), та 20 батьків, віком від 25 до 59 років ($32,95 \pm 9,19$). Контроль склали 100 здорових осіб без обтяженого сімейного анамнезу. При обстеженні 44 батьків не виявлено мутацій 1138 G>A, 1138 G>T, 1620C>A та 1620C>G гена *FGFR3*, не виявлено і фенотипових ознак АХ чи ГХ – батьки нормального або високого зросту з пропорційною статурою. Результати молекулярно-генетичної діагностики АХ чи ГХ у пробандів та членів їх сімей, включаючи батьків та сибсів, проведені та описані на попередньому етапі дослідження [1].

Пацієнти підписали інформовану згоду про використання наданого ними біологічного матеріалу для проведення молекулярно-генетичного дослідження. Протоколи експерименту були погоджені та затверджені Біоетичним Комітетом ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України». Передбачені заходи безпеки для здоров'я пацієнта, дотримання його прав, людської гідності та морально-етичних норм у відповідності до принципів Гельсінської де-

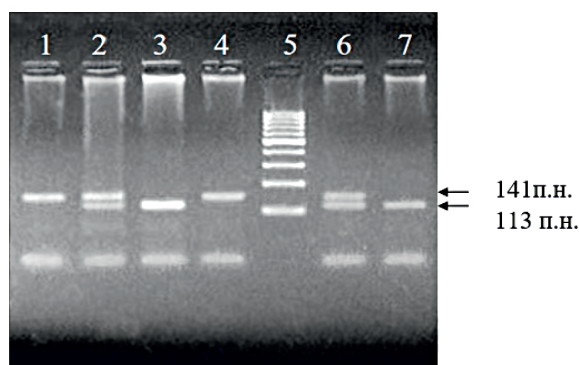


Рис. 1. Електрофореграма рестрикційного аналізу поліморфного локусу 3R/2R гена *TYMS*, 2,0% агарозний гель. Доріжка 5 – маркери молекулярної ваги 100 п.н.; 1,4 – генотип 3R3R; 2,6 – генотип 3R2R; 3,7 – генотип 2R2R.

кларції прав людини, Конвенції Ради Європи про права людини і біомедицини та відповідних законів України. Матеріалом для дослідження служила ДНК, виділена з лейкоцитів периферійної крові методом висолювання [2]. Ампліфікацію послідовностей ДНК проводили *in vitro*, використовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [15,18,19,16]. Для детекції поліморфізму кількості тандемних повторів гена *TYMS* отриманий ПЛР продукт аналізували у 2% агарозному гелі (рис. 1). Зразки, з 2R/3R або 3R/3R

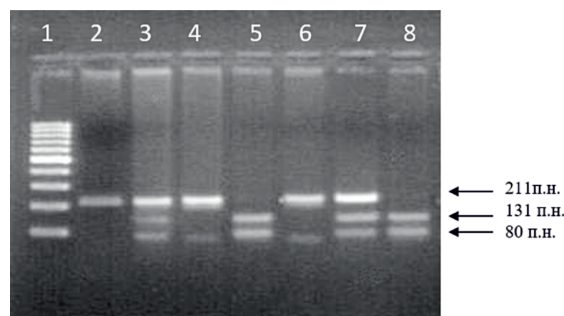


Рис. 2. Електрофореграма рестрикційного аналізу поліморфного локусу 2756 AG гена *MTR*, 2,0% агарозний гель. Доріжка 1 – маркери молекулярної ваги 100 п.н.; 2 – ПЛР продукт без рестрикції (211 п.н.); 3,7 – генотип 2756 AG; 4,6 – генотип 2756 AA; 5,8 – генотип 2756 GG.

генотипом були проаналізовані на наявність 3R G>C поліморфізму з використанням ендонуклеази рестрикції *HaeIII*.

Генотипування поліморфних локусів *DNMT3B* 149C>T, *DNMT3B* -579 G>T, *MTHFR* 677C>T та *MTR* 2756 A>G проводили методом поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів з використанням ендонуклеаз рестрикції *BlnI*, *PvuII*, *HinfI* та *HaeIII* відповідно. Для детекції отриманих рестриктних фрагментів проводили електрофорез у 2% агарозному гелі. Після чого проводили візуалізацію на УФ-транслюмінаторі та порівнювали з маркерами довжин. Результати сканування гелів знімали цифровою камерою «Gel Imager» при довжині хвилі 256 нм. Електрофореграма молекулярно-генетичного дослідження поліморфних локусів *MTR* 2756 A>G наведена на **рисунку 2**.

Отримані результати обробляли за допомогою методів варіаційної статистики, прийнятими для біологічних досліджень та рекомендованими для обробки результатів молекулярно-генетичних досліджень [5]. Статистичний аналіз проводили з використанням критерію χ^2 та застосовували точний критерій Фішера. Оцінку відносного ризику проводили за величиною співвідношення шансів (OR). Проводилась перевірка закону Харді-Вайнберга у досліджуваній та контрольній групах.

Результати досліджень та їх обговорення. У результаті проведеного молекулярно-генетичного аналізу ДНК встановлено генотипи щодо поліморфних локусів *DNMT3B* -579G>T, *DNMT3B* -149C>T, *MTHFR* 677C>T, *MTR* 2756 A>G, *TYMS* 3R2R та *TYMS* 3R G>C у 44 батьків дітей з de novo випадками АХ чи ГХ та у 100 осіб контрольної групи. Встановлений розподіл генотипів та алелей за досліджуваними поліморфними локусами в дослідній та контрольній групах вірогідно не відрізняється від теоретично очікуваного щодо рівноваги Харді-Вайнберга (**табл. 1**).

Аналіз розподілу генотипів поліморфних локусів -579G>T та -149C>T гена *DNMT3B* у дослідній групі пацієнтів не показав статистично вірогідних відмінностей від даних контролю (**табл. 2**). Частота генотипу 149TT, що асоціюється з підвищеним рівнем експресії гену, серед батьків дітей з АХ/ГХ становила

МЕДИЧНА ГЕНЕТИКА

Таблиця 1.

Частота генотипів та алелів поліморфних локусів *DNMT3B -579G>T*, *DNMT3B -149C>T*, *MTHFR 677C>T*, *MTR 2756 A>G*, *TYMS 3R2R* та *TYMS 3R G>C* серед батьків дітей з АХ/ГХ та осіб контрольної групи

Генотипи/ алелі	Частота алелів та генотипів, %									
	Батьки дітей з АХ/ГХ					Контрольна група				
	N	Фактична частота	HWE	χ^2	P	N	Фактична частота	HWE	χ^2	P
<i>DNMT3B 579G>T</i>										
579GG	10	0,23	0,25	0,36	0,55	35	0,35	0,34	0,10	0,75
579GT	24	0,54	0,50			47	0,47	0,49		
579TT	10	0,23	0,25			18	0,18	0,17		
579G	44	0,50	-			70	0,58	-		
579T	44	0,50	-			50	0,42	-		
<i>DNMT3B 149C>T</i>										
149CC	13	0,30	0,27	0,35	0,55	32	0,32	0,30	0,86	0,35
149CT	20	0,45	0,50			45	0,45	0,49		
149TT	11	0,25	0,23			23	0,23	0,21		
149C	46	0,52	-			109	0,55	-		
149T	42	0,47	-			91	0,45	-		
<i>MTHFR 677 C>T</i>										
677CC	23	0,52	0,53	0,04	0,84	40	0,40	0,44	0,04	0,84
677CT	18	0,41	0,40			52	0,52	0,45		
677TT	3	0,07	0,07			8	0,08	0,11		
677C	64	0,73	-			132	0,66	-		
677T	24	0,27	-			68	0,34	-		
<i>MTR 2756 A>G</i>										
2756AA	27	0,61	0,58	1,54	0,22	50	0,50	0,51	0,04	0,84
2756AG	13	0,30	0,36			42	0,42	0,41		
2756GG	4	0,09	0,06			8	0,08	0,08		
2756A	67	0,76	-			142	0,81	-		
2756G	21	0,24	-			58	0,19	-		
<i>TYMS H/L</i>										
H/H	2	0,05	0,06	0,18	0,67	0	0	0,02	2,65	0,1
H/L	17	0,38	0,36			28	0,28	0,24		
L/L	25	0,57	0,58			72	0,72	0,74		
H	21	0,24	-			28	0,14	-		
L	67	0,76	-			172	0,86	-		

Примітка: N – кількість спостережень, HWE (Hardy-Weinberg equilibrium) – теоретично очікувана частота при рівновазі Харді-Вайнберга; Генотипи високої (H) та низької (L) експресії гена *TYMS*: HH – 3RG3RG genotype; HL – 3RG2R, 3RG3RC genotypes; LL – 2R2R, 3RC2R, 3RC3RC genotypes.

23% у порівнянні з контрольною групою – 25%, частота *149T* алелю в дослідній групі незначно перевищувала показники контролю (47% та 45% відповідно). Частота *-579GG* генотипу в досліджуваній групі була нижчою (0,23) в порівнянні з контролем (0,35), гетерозиготних носіїв даного генотипу було більше в дослідній групі (0,54 до 0,47), а частота *-579TT* складала 23% в групі батьків дітей з АХ/ГХ і 18% в контрольній групі. Проведення статистичного обрахунку відношення шансів (OR) для поліморфізму *DNMT3B -149C>T* не виявило вірогідно вищого ризику появи de novo мутацій. Встановлено, що ризик виникнен-

ня de novo мутацій при АХ/ГХ у батьків може знизуватися при наявності генотипу *579GG* (OR=0,55), проте межі довірчого інтервалу були не вірогідними (CI:0,24 – 1.24) (табл. 2).

Аналіз розподілу генотипів поліморфного локусу *MTHFR 677C>T* показав вищу частоту генотипу *677CC* в групі батьків дітей з АХ/ГХ (0,52) у порівнянні з контрольною групою (0,40). Частота низькофункціонального алеля *677T* серед батьків становила 0,27 у порівнянні з 0,34 у контрольній групі, що може свідчити про протективну роль даного алеля в виникненні спонтанних мутацій у статевих клітинах,

Таблиця 2.

Розподіл генотипів та алелів поліморфних локусів - *DNMT3B - 579G>T*, *DNMT3B - 149C>T*, *MTHFR 677C>T*, *MTR 2756 A>G*, *TYMS 3R2R* та *TYMS 3R G>C* серед батьків дітей з АХ/ГХ та осіб контрольної групи

Генотипи, алелі	Контрольна група (n=100)	Батьки дітей з АХ/ГХ (n=44)			
	n (%)	n (%)	χ^2	p	OR (95% CI)
<i>DNMT3B 579G>T</i>					
579GG	35(35)	10 (23)	1,79	0,18	0,55 (0,24 – 1,24)
579GT	47(47)	24 (54)			1,35 (0,66 – 2,76)
579TT	18(18)	10 (23)			1,34 (0,56 – 3,20)
579G	70(58)	44 (50)	1,79	0,18	0,71 (0,43 – 1,17)
579T	50(42)	44 (50)			1,41 (0,85 – 2,33)
<i>DNMT3B 149C>T</i>					
149CC	32(32)	13 (30)	0,11	0,74	0,89 (0,41 – 1,93)
149CT	45(45)	20 (45)			1,02 (0,50 – 2,08)
149TT	23(23)	11 (25)			1,12 (0,49 – 2,55)
149C	109(55)	46 (52)	0,12	0,73	0,91 (0,55 – 1,51)
149T	91(45)	42 (47)			1,09 (0,66 – 1,81)
<i>MTHFR 677 C>T</i>					
677CC	40 (40)	23 (52)	1,88	0,39	1,64 (0,80 – 3,36)
677CT	52 (52)	18 (41)			0,64 (0,31 – 1,31)
677TT	8 (8)	3 (7)			0,84 (0,21 – 3,33)
677C	132 (66)	64 (73)	1,27	0,26	1,37 (0,79 – 2,39)
677T	68 (34)	24 (27)			0,73 (0,47 – 1,27)
<i>MTR 2756 A>G</i>					
2756AA	50 (50)	27 (61)	2,02	0,36	1,59 (0,77 – 3,27)
2756AG	42 (42)	13 (30)			0,58 (0,27 – 1,24)
2756GG	8 (8)	4 (9)			1,15 (0,33 – 4,04)
2756A	142 (81)	67 (76)	0,81	0,37	1,30 (0,73 – 2,32)
2756G	58 (19)	21 (24)			0,77 (0,43 – 1,37)
<i>TYMS H/L</i>					
H/H	0 (0)	2 (5)	6,76	0,04*	11,82 (0,56 – 251,54)
H/L	28 (28)	17 (38)			1,62 (0,77 – 3,42)
L/L	72 (72)	25 (57)			0,51 (0,24 – 1,07)
H	28 (14)	21 (24)	4,21	0,04*	1,93* (1,02 – 3,62)
L	172 (86)	67 (76)			0,52* (0,28 – 0,98)

Примітка: n – кількість обстежених; *p < 0.05 – статистично вірогідні частоти генотипів та алелей; OR* – статистично вірогідний коефіцієнт відношення шансів; Генотипи високої (H) та низької (L) експресії гена *TYMS* (на основі *3R2R* та *3R G>C* поліморфізму): HH – *3RG3RG*; HL – *3RG2R*, *3RG3RC*; LL – *2R2R*, *3RC2R*, *3RC3RC*.

що спричиняють АХ/ГХ. Показано, що для батьків наявність *677CC* генотипу може збільшувати ризик виникнення *de novo* мутацій АХ/ГХ при гаметогенезі у 1,64 рази (OR = 1.64 CI – 95%: 0.80 – 3.36, P > 0.05). Проте, дані результати не були статистично вірогідними (табл. 2).

При аналізі розподілу генотипів поліморфного локусу *2756 A>G* гена *MTR* встановлено, що генотип *2756AA* в групі батьків зустрічався з вищою частотою, ніж у контрольній групі (0,61 та 0,50 відповідно), хоча серед осіб контрольної групи виявилось більше гетерозигот за генотипом *2756AG* (0,52 при 0,41 у групі батьків дітей з АХ/ГХ). Встановлено, що гетерозиготний генотип *MTR 2756AG* може зменшувати ризик народження дитини з *de novo* мутаціями АХ/ГХ в 0.58 рази (OR = 0,58 CI – 95%: 0,27 – 1,24, P > 0.05). Проте статистично вірогідних відмінностей у частотах генотипів та алелей серед групи батьків

дітей з АХ/ГХ та контрольної групи не встановлено (P > 0.05) (табл. 2).

Для кращого розуміння клінічної значимості поліморфізмів *3R2R* та *3R G>C* гена *TYMS* було проаналізовано частоту генотипів за даними поліморфними локусами в групі батьків дітей з АХ/ГХ та групі контролю. Частота генотипів та алелей представлена у таблиці 3.

Для проведення статистичного аналізу всі генотипи були розділені на три групи залежно від впливу на функціональну активність гену: група високої функціональної активності - H/H та H/L, та група низької активності - L/L. Згідно з *in vitro* дослідженнями *3G* алель гена *TYMS* вважається алеллю високої експресії, а *2R* і *3RC* алелі – низької експресії [15]. Відповідно, генотип *3G/3G* віднесений до групи високої експресії H/H, генотипи *2R/3G*, *3C/3G* – до групи H/L, а *2R/2R*, *2R/3C* та *3C/3C* генотипи – до

Таблиця 3.

Частота генотипів та алелей поліморфного локусу 3R2R та 3R G>C гена TYMS серед батьків дітей з АХ/ГХ та осіб контрольної групи

TYMS 3R2R, 3R G>C		Контрольна група (N=100) n (%)	Батьки дітей з АХ/ГХ N=44 n (%)
Генотипи			
3R3R	3RG3RG	27 (27)	1 (1)
	3RG3RC		13 (30)
	3RC3RC		2 (5)
3R2R	2R3RG	40 (40)	7 (16)
	2R3RC		4 (9)
2R2R		33 (33)	10 (23)
Алелі			
3R	3RG	94 (47)	21 (24)
	3RC		51 (58)
2R		106 (53)	30 (34)
			37 (42)

Примітка: N – кількість обстежених осіб.

групи низької експресії L/L. Встановлено вірогідні відмінності в частоті груп генотипів гена *TYMS* у батьків дітей з АХ/ГХ порівняно з контролем (табл. 2). Частота генотипів низької експресії L/L вірогідно нижча у групі батьків (57%) ніж у осіб контрольної групи (72%). Генотипи високої експресії, Н/Н та Н/Л, з вищою частотою зустрічались в групі батьків дітей з АХ/ГХ (5% та 38% відповідно) ніж у групі контролю (0% та 28% відповідно). Наявність генотипів високої експресії (Н) вірогідно підвищує імовірність виникнення *de novo* мутацій АХ/ГХ при гаметогенезі майже у 2 рази (OR= 1,92; CI – 95%: 1,02 – 3,62), тоді як наявність генотипів низької експресії вірогідно знижують таку імовірність (OR= 0,52; CI – 95%: 0,28 – 0,98).

Отримані результати свідчать про можливу модулюючу роль поліморфізму генів фолатного обміну та метилтрансферази 3В в появі мутацій *de novo* під час гаметогенезу у батьків дітей з АХ/ГХ. Так, наявність низькофункційних алелів генів фолатного обміну може вести до зміни профілю метилювання ДНК, пошкодженнь ланцюга ДНК та аномальної експресії генів, а зміна функціональної активності метилтрансферази 3В впливає на профіль метилювання та змінює епігенетичну регуляцію генів. Встановлено, що наявність у батьків генотипів високої експресії гена *TYMS*, а саме 3G/3G, 2R/3G та 3C/3G, підвищують ймовірність виникнення *de novo* мутацій АХ чи ГХ у статевих клітинах, що може бути пов'язано зі змінами в біосинтезі піримідинів необхідних для синтезу та репарації ДНК. Не встановлено вірогідних відмінностей при дослідженні поліморфних локусів *DNMT3B -579G>T*, *DNMT3B -149C>T*, *MTHFR 677C>T*, *MTR 2756 A>G*, припускаємо, що збільшення вибірки обстежуваних груп може призвести до появи відмінностей в частотах генотипів та алелей даних поліморфних локусів. Оскільки мутації Ах та ГХ виникають у гаметах і, як відомо, значним чинником їх появи може виступати вік батька, доцільно проаналізувати розподіл генотипів та алелей диференційовано, у групі матерів та

у групі батьків, при збільшенні вибірки обстежуваних груп та з урахуванням вікових особливостей.

Висновки

1. Встановлено частоти генотипів та алелей поліморфних локусів *DNMT3B -579G>T*, *DNMT3B -149C>T*, *MTHFR 677C>T*, *MTR 2756 A>G* серед батьків дітей з ахондроплазією чи гіпохондроплазією та осіб контрольної групи.

2. Встановлено, що наявність генотипів 3G/3G, 2R/3G та 3C/3G гена *TYMS* збільшує ризик появи *de novo* мутацій у статевих клітинах і може зумовлювати наявність патології (ахондроплазії/гіпохондроплазії) у їх дітей.

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати можуть використовуватись у предиктивній медицині та дозволять поглибити уявлення про механізми виникнення мутацій *de novo* у людини у взаємозв'язку з алельними варіантами генів задіяних в системі метилювання ДНК.

Література

- Молекулярно-генетична діагностика мутацій гена *FGFR3* при ахондроплазії та гіпохондроплазії / Дмитрук І.М., Макух Г.В., Тиркус М. [та ін.] // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2015. – Т. 16. – С. 197-200.
- Пат. 32044 UA, МПК G01N33/49 (2006.01). – № u 200801896. Спосіб виділення ДНК з лейкоцитів периферійної крові / Макух Г.В., Заставна Д.В., Тиркус М.Я., Третяк Б.І., Чорна Л.Б.; заявл. 14.02.2008; опубл. 25.04.2008; Бюл. №8.
- A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) associated with decreased enzyme activity / I. Weisberg, P. Tran, B. Christensen [et al.] // *Mol Genet Metab.* – 1998. – Vol. 64. – P. 169-172.
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory / Adrian Bird // *GENES & DEVELOPMENT.* – 2002. – Vol. 16. – P. 6-21.
- Clerget-Darpoux F. Introduction to the genetic epidemiology of multifactorial diseases / F. Clerget-Darpoux, S. Lyonnet, P. Broet // *ESHG COURSE, CHU, Faculte de Medecine France.* – 2009.
- Clinical and genetic heterogeneity of hypochondroplasia / F. Rousseau, J. Bonaventure, L. Legeai-Mallet [et al.] // *J. Med. Genet.* – 1996. – Vol. 33 (9). – P. 749-752.
- FIBROBLAST GROWTH FACTOR RECEPTOR 3; *FGFR3* / [Електронний ресурс]: [сайт]. – Режим доступу : <http://omim.org/entry/134934>.
- Folate Metabolism Polymorphisms Influence Risk of Colorectal Adenoma Recurrence / A.H. Richard, R.M. Kenneth, Jo-Fen Liu [et al.] // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2006. – Vol. 15. – P. 1607-1613.
- Functional relevance of C46359T in the promoter region of human *DNMT3B6* / L. Wang, Z. Liu, L. Mao [et al.] // *Proc AACR.* – 2004. – № 45. – P. 2913-2918.
- Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the *cbIG* complementation group of folate/cobalamin disorders / D. Leclerc, E. Campeau, P. Goyette [et al.] // *Hum Mol Genet.* – 1996. – Vol. 5. – P. 1867-1874.

11. Hypochondroplasia / M.B. Bober, G.A. Bellus, S.M. Nikkel [et al.] // GeneReviews® [Internet], [Електронний ресурс]. – Last Update: 2013. – Режим доступу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1477>.
12. Mutation Analysis in Indian Children with Achondroplasia – Utility of Molecular Diagnosis / S.J. Pati, M. Banerjee, S.R. Phadke [et al.] // Indian Journal of Pediatrics. – 2009. – Vol. 76. – P. 147-149.
13. Mutations in fibroblast growth-factor receptor 3 in sporadic cases of achondroplasia occur exclusively on the paternally derived chromosome / D.J. Wilkin, J.K. Szabo [et al.] // Am J Hum Genet. – 1998. – Vol. 63. – P. 711-716.
14. Novel FGFR3 mutations creating cysteine residues in the extracellular domain of the receptor cause achondroplasia or severe forms of hypochondroplasia / S. Heuertz, M. Le Merrer, B. Zabel [et al.] // Eur. J. Hum. Genet. – 2006. – Vol. 14 (12). – P. 1240-1247.
15. Prognostic Significance of the Polymorphisms in Thymidylate Synthase and Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene in Lung Cancer / A. Takehara, K. Kawakami, N. Ohta [et al.] // Anticancer research. – 2005. – Vol. 25. – P. 4455-4462.
16. Promoter polymorphisms of DNMT3B and the risk of colorectal cancer in Chinese: a case-control study / F. Hong, Z. Feng, H. Jiabo [et al.] // Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. – 2008. – № 27. – P. 24.
17. Robertson K.D. DNA methylation, methyltransferases, and cancer / K.D. Robertson // Oncogene. – 2001. – № 20. – P. 3139-3155.
18. Role of polymorphism of methyltetrahydrofolate homocysteine methyltransferase (MTR) A2756G and breast cancer risk / Mojgan Hosseini // Pol j pathol. – 2013. – Vol. 64 (3). – P. 191-195.
19. The DNMT3B -579 G>T promoter polymorphism and risk of lung cancer / H. Liu, Y. Jiao, Y. Guan [et al.] // Experimental and therapeutic medicine. – 2012. – Vol. 3 (3). – P. 389-420.
20. The observed human sperm mutation frequency cannot explain the achondroplasia paternal age effect / I. Tiemann-Boege, W. Navidi, R. Grewal [et al.] // PNAS. – 2002. – Vol. 99, № 23. – P. 14952-14957.
21. Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy / S.T. Pullarkat, J. Stoehlmacher, V. Ghaderi [et al.] // Pharmacogenomics J. – 2001. – Vol. 1. – P. 65-70.
22. Zhonghua Y. Correlation between polymorphism in the promoter of DNA methyltransferase-3B and the risk of colorectal cancer / Y. Zhonghua, Y. Fang, Z. Xue // PUBMed. – 2012. – Vol. 46 (1). – P. 53-57.

УДК 616.71-007.157:575.113.2

АЛЕЛЬНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНІВ ЗАДІЯНИХ В ПРОЦЕСАХ МЕТИЛУВАННЯ ДНК В БАТЬКІВ ДІТЕЙ З DE NOVO МУТАЦІЯМИ АХОНДРОПЛАЗІЇ ЧИ ГІПОХОНДРОПЛАЗІЇ

Дмитрук І. М., Макух Г. В., Тиркус М. Я., Акопян Г. Я.

Резюме. Однонуклеотидні поліморфізми генів фолатного обміну та метилтрансферази 3В впливають на рівень їх експресії, що веде до зміни профілю метилування ДНК і може виступати фактором виникнення мутацій de novo у статевих клітинах. Метою роботи було охарактеризувати алельний поліморфізм генів задіяних в системі метилування ДНК в батьків дітей з de novo випадками ахондроплазії (АХ) чи гіпохондроплазії (ГХ). Проведено генотипування поліморфних локусів *DNMT3B -579G>T*, *DNMT3B -149C>T*, *MTHFR 677C>T*, *MTR 2756A>G*, *TYMS 3R2R* та *TYMS 3RG>C* у 44 батьків дітей з АХ/ГХ та 100 осіб контрольної групи. Молекулярно-генетичний аналіз проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції та аналізу поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів. Статистичний аналіз проведений шляхом розрахунку хі-квадрат та обчислення коефіцієнту відношення шансів (OR). Наявність генотипів високої експресії гена *TYMS* (3G/3G, 2R/3G та 3C/3G) вірогідно підвищує імовірність виникнення de novo мутацій АХ/ГХ при гаметогенезі майже у 2 рази (OR= 1,92; CI – 95%: 1,02 – 3,62). Вірогідних відмінностей у розподілі генотипів та алелей щодо поліморфізму генів *DNMT3B*, *MTHFR* та *MTR* не виявлено. Висновки: наявність генотипів 3G/3G, 2R/3G та 3C/3G гена *TYMS* в батьків дітей з АХ/ГХ можуть виступати чинником виникнення мутації de novo у їх статевих клітинах.

Ключові слова: метилування, алельний поліморфізм, ахондроплазія, гіпохондроплазія.

УДК 616.71-007.157:575.113.2

АЛЛЕЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ, ЗАДЕЙСТВОВАННЫХ В ПРОЦЕССАХ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК У РОДИТЕЛЕЙ ДЕТЕЙ С DE NOVO МУТАЦИЯМИ АХОНДРОПЛАЗИИ ИЛИ ГИПОХОНДРОПЛАЗИИ

Дмитрук И. М., Макух Г. В., Тиркус М. Я., Акопян Г. Я.

Резюме. Однонуклеотидные полиморфизмы генов фолатного обмена и метилтрансферазы 3В влияют на уровень их экспрессии, что ведет к изменению профиля метилирования ДНК и может выступать фактором возникновения мутаций de novo в половых клетках. Целью работы было охарактеризовать аллельный полиморфизм генов, задействованных в системе метилирования ДНК у родителей детей с de novo случаями ахондроплазии (АХ) или гипохондроплазии (ГХ). Проведено генотипирование полиморфных локусов *DNMT3B -579 G>T*, *DNMT3B -149C>T*, *MTHFR 677C>T*, *MTR 2756A>G*, *TYMS 3R2R* и *TYMS 3RG>C* у 44 родителей детей с АХ/ГХ и у 100 человек контрольной группы. Молекулярно-генетический анализ проводили с помощью полимеразной цепной реакции и анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Статистический анализ проведен путем расчета хи-квадрат и вычисления коэффициента отношения шансов (OR). Наличие генотипов высокой экспрессии гена *TYMS* (3G/3G, 2R/3G и 3C/3G) достоверно повышает вероятность возникновения de novo мутаций АХ/ГХ при гаметогенезе почти в 2 раза (OR = 1,92; CI - 95%: 1,02 - 3,62). Достоверных различий в распределении генотипов и аллелей полиморфизма генов *DNMT3B*, *MTHFR* и *MTR* не обнаружено. Выводы: наличие генотипов 3G/3G, 2R/3G и 3C/3G гена *TYMS* у родителей детей с АХ/ГХ могут выступать фактором возникновения мутации de novo в их половых клетках.

Ключевые слова: метилирование, аллельный полиморфизм, ахондроплазия, гипохондроплазия.

UDC 616.71-007.157:575.113.2

POLYMORPHISMS OF GENES INVOLVED IN DNA METHYLATION PROCESSES AMONG PARENTS OF CHILDREN WITH DE NOVO MUTATIONS OF ACHONDROPLASIA OR HIPOHONDROPLASIA

Dmytruk I. M., Makukh H. V., Thyrkus M. Y., Akopian G. Y.

Abstract. Aberrant DNA methylation are key epigenetic factors in nascence of de novo mutation. The genomic methylation patterns depend of the one carbon–metabolizing enzymes, that involved in the provision of methyl groups, and DNA methyltransferases. Single-nucleotide polymorphism of folate metabolizing gene and methyltransferase 3B gene may affect the gene expression level and lead to changes in DNA methylation profile, that may be a risk factor of de novo mutations in germ cells. The aim of the study was to characterize the genes polymorphisms involved in DNA methylation system among parents of children with de novo mutation of achondroplasia (AH) or hipohondroplasia (HH).

Material and methods. Genotyping of *DNMT3B* -579G>T, *DNMT3B* -149C>T, *MTHFR* 677C>T, *MTR* 2756A>G, *TYMS* 3R2R and *TYMS* 3RG>C was performed in 44 parents of children with AH/HH and in 100 persons from control group. The case group include 24 families with detected de novo mutation of AH/GH in probands: 24 mothers, aged 22 to 41 years ($29,83 \pm 5,47$), and 20 fathers, aged 25 to 59 years ($32,95 \pm 9,19$). For molecular genetic testing was used DNA samples, that were obtained from venous blood nuclear cells in patients with cancer. The extraction and refinement of DNA from the leukocytes of the peripheral blood was conducted by salting-out protocol extraction. Amplification of DNA chain in vitro was performed using the method of polymerase chain reaction. The PCR product was analysed by Restriction Fragment Length Polymorphism analysis. The results processed by methods of variation statistics suitable for biological studies and recommended for processing the molecular - genetic research results: Chi-square analysis (χ^2 tests), Hardy – Weinberg equilibrium, odds ratio (OR) with 95% confidence interval (CI).

Results. The distribution of genotype and allele frequencies of the *DNMT3B*, *MTHFR* and *MTR* polymorphisms did not show any significant differences between the cases and controls ($P > 0.05$). The distribution of genotype and allele frequency of *TYMS* polymorphic loci show statistical significant difference between case and control group. The frequency of low expression *TYMS* L/L genotypes was significantly lower in group of parents of child with AH/HH (57%) compared to control group (72%, $P < 0.05$). Distribution of high expression H/H and H/L genotype of *TYMS* gene show significant higher frequency in group of parents (5% and 38% respectively) than in control group (0% and 28% respectively). The results of OR calculation indicates that the *TYMS* high expression genotype (3G/3G, 2R/3G and 3C/3G) 2-fold (OR = 1,92; CI - 95%: 1.02 - 3.62) increases the risk of de novo AH / GH mutations at gametogenesis. The possibility of de novo AH / GH mutations reduce (OR= 0,52; CI – 95%: 0,28 – 0,98) in the presence of low expression genotype (2R/2R, 2R/3C and 3C/3C).

Conclusions. The *TYMS* 3G/3G, 2R/3G and 3C/3G genotypes presence in parents of children with AH/GH increase the risk of de novo mutation in paternal germ cells and may lead to inherited pathology in children (achondroplasia or hypohondroplasia).

Keywords: methylation, polymorphisms, achondroplasia, hipohondroplasia, mutation.

Рецензент – проф. Заставна Д. В.

Стаття надійшла 20.04.2016 року