

# Новый аллельный вариант наследственной моторно-сенсорной нейропатии 1X типа, обусловленный мутацией 62delG в гене GJB1

КИРИЛЕНКО Н.Б., ДАДАЛИ Е.Л.<sup>1</sup>, ФЕДОТОВ В.П.<sup>2</sup>, МЕРСИЯНОВА И.А.<sup>2</sup>,  
ШАРКОВА И.В.<sup>1</sup>, ТВЕРСКАЯ С.М.<sup>2</sup>, ПОЛЯКОВ А.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> — ГОУ ВПО Российский государственный медицинский университет МЗ РФ, кафедра генетики МВФ; Москва 117869, ул. Островитянова 1, тел. (095) 433-71-40

<sup>2</sup> — ГУ Медико-генетический научный центр РАМН; Москва, ул. Москворечье д. 1 (095) 324-87-72

*Представлены данные клинико-генетического обследования четырех больных из одной семьи с сегрегацией НМСН1Х типа, обусловленной ранее не описанной однонуклеотидной делецией нуклеотида 62 в кодоне 21 гена GJB1. Результатом выявленной мутации является образование стоп-кодона после 83-го аминокислотного остатка коннексина 32. Высказано предположение о невысокой функциональной значимости первого трансмембранного белкового домена в формировании щелевого соединения шванновских клеток миелиновой оболочки.*

*Упробанда — 25-летнего мужчины обнаружены умеренно выраженные клинические и электромиографические признаки НМСН 1 типа. У матери пробанда и двух его сестер отмечались лишь не резко выраженные нарушения: затруднения при ходьбе и гипотрофия перонеальной группы мышц. На электромиограмме отмечались умеренные признаки аксонального поражения.*

## Введение

Наследственная моторно-сенсорная нейропатия 1X типа (НМСН1Х) (ОМIM: 302800) - X-сцепленное доминантное заболевание, характеризующееся выраженной генетической гетерогенностью [1, 8, 11, 13]. Этиологическим фактором НМСН1Х являются мутации в гене GJB1 (gap junction B type1), локализованном в области Xq13.1 [4]. Ген содержит 2 экзона, один из которых кодирует белок щелевых соединений шванновских клеток миелиновой оболочки нервов — коннексин 32 (Cx32). К настоящему времени идентифицировано более 230 мутаций в гене GJB1, приводящих к развитию НМСН1Х [11]. У 77,8% больных обнаружены миссенс-мутации, в 7,8% случаев — нон-сенс-мутации, в 9,3% случаях идентифицированы делеции и инсерции, приводящие к сдвигу рамки считывания, а у 4% больных делеции и инсерции были кратны трем нуклеотидам. У 1,5% больных с НМСН1Х выявлены комплексные перестройки в гене GJB1. В немногочисленных исследованиях, направленных на изучение клинико-генетических корреляций при НМСН1Х, показаны различия в тяжести клинических проявлений заболевания у больных в зависимости от типа и локализации мутаций в гене GJB1 [5, 10, 13]. Эти различия объясняются особенностями патогенетических механизмов заболевания, реализующихся при различных мутациях, нарушающих аминокислотную последовательность отдельных доменов Cx32. Это делает актуальным проведение исследований, направленных на изучение фенотипических особенностей аллельных вариантов НМСН1Х, обусловленных различными мутациями в гене GJB1.

В настоящей работе нами представлены клинико-молекулярно-генетические данные четырех больных с НМСН1Х — членов одной семьи с наличием ранее не описанной однонуклеотидной делеции - 62delG в гене GJB1.

## Методы исследования

Выделение ДНК из образцов крови проводили с помощью набора реактивов D1Atom™ DNA Prep 200 согласно протоколу фирмы-производителя. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на программируемом термоциклере МС2 производства фирмы «ДНК-технология» (Россия) с использованием ДНК-полимеразы Biotaq («Биомастер») по следующей схеме: 0,1—1 мкг геномной ДНК, 0,25 мкМ каждого олигопраймера, 250 мкМ каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата помещали в 25 мкл однократного буфера для ПЦР следующего состава: 67 мМ Tris-HCl, pH 8,8; 16,6 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>0</sub><sub>4</sub>; 0,01% Twin-20; 1,5 единицы термофильной ДНК-полимеразы. Концентрацию хлорида магния для каждого фрагмента подбирали индивидуально. ПЦР проводили при следующих условиях: первоначальная денатурация 95°C — 5 мин, затем 32 цикла последовательной смены температур: денатурация 94°C — 45 с, отжиг олигопраймеров (температура для каждой пары подбиралась индивидуально) — 45 с, элонгация 72°C — 45 с. Заключительная элонгация 72°C — 7 мин. Последовательность олигопраймеров, длины амплификационных фрагментов и условия реакции представлены в табл. 1.

Для выявления изменений нуклеотидной последовательности проводили SSCP-анализ (анализ од-

Последовательность олигопраймеров, длины амплификационных фрагментов и условия проведения ПЦР

Локус	Последовательность праймеров, 5'→3'	Длины, п.н.	t° отжига	[MgCl <sub>2</sub> , mM
CX32 Ex2.1	F - TTTCTGACAGCTTGCTTCATGGC R - GGGAGATGGGAAGAATTGGTC	269	62°C	1,5
CX32 Ex2.2	F - CCTGGCTGCAACAGCGTTTGC R - GGCCTCAAACAACAGCCGGAAC	270	62°C	1,5
CX32 Ex2.3	F - GTGGTGGACCTATGTCATCAGC R - TGGGCTCGGCGGGCACAGGC	273	62°C hot start	1,0
CX32 Ex2.4	F - GCCGAGGTGGTGTACCTCATC R - GCAGGTTGCCTGGTATGTGG	255	62°C	1,5

нонитового конформационного полиморфизма) [15, 16]. Для этого образец после ПЦР денатурировали при 42°C в течение 30 мин, добавляя к 10 мкл амплификата 1 мкл 5М раствора NaOH, 0,5 мкл 0,5М ЭДТА и 4,5 мкл воды. Затем к образцу добавляли 7 мкл буфера-краски, содержащего 95% формамида, и наносили его на 10%-ный полиакриламидный гель (исходное соотношение акриламида и метиленабисакриламида 29:1), содержащий 5% глицерин. Электрофорез геля длиной 20 см проводили при комнатной температуре, напряжении 120 В с использованием 0,5-кратного TBE в качестве электрофорезного буфера. После электрофореза гель окрашивали SYBR Gold nucleic acid gel stain с последующей визуализацией в проходящем УФ-свете. При выявлении фрагмента с измененной электрофоретической подвижностью по сравнению с контрольными образцами проводили определение его нуклеотидной последовательности методом прямого секвенирования образца на автоматическом секвенаторе ABI 3100 фирмы Applied Biosystems согласно протоколу фирмы-производителя.

**Результаты исследования и их обсуждение**

При проведении эпидемиологического исследования наследственных болезней нервной системы в городе Волгограде нами обнаружена семья с клинико-электронейромиографическими проявлениями НМСНІХ. При неврологическом осмотре четырех членов семьи (3 женщины и 1 мужчина) выраженные симптомы НМСНІХ отмечены только у пробанда мужского пола. Родословная семьи представлена на рис. 1.

Первые признаки заболевания появились у пробанда в возрасте 17 лет и характеризовались слабостью стоп, болями в области икроножных мышц и частыми подвывихами в голеностопных суставах. При его осмотре в 26-летнем возрасте обнаружены типичные признаки полинейропатии в виде слабости и гипотрофии мышц стоп, перонеальной группы и межкостных мышц кистей, гипостезии кистей и стоп, признаков спиноцеребеллярной атаксии, а также выраженных вегетативных нарушений в области иннервации пораженных мышц. Клинические

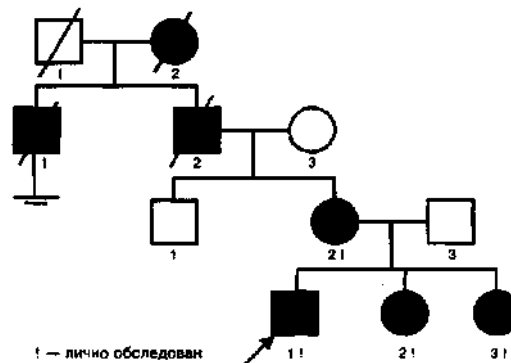


Рис. 1. Родословная семьи С-ко

симптомы и темп прогрессирования заболевания были выражены умеренно и не приводили к потере трудоспособности больного. Особенностью клинических проявлений у обследованного больного была асимметрия поражения, с превалированием симптомов в мышцах правой нижней конечности. При его электромиографическом обследовании обнаружено снижение скорости проведения импульса по срединному нерву до 35 м/с.

Родственницы пробанда женского пола (его мать и две сестры) жалоб не предъявляли и считали себя практически здоровыми. Слабовыраженные признаки полинейропатии выявлены у них только при клиническом осмотре. У одной из сестер пробанда (IV-2) в возрасте 21 года выявлены снижение ахилловых рефлексов, умеренная гипотрофия мелких мышц кистей, интенционный тремор при выполнении пальценосовой пробы и затруднение при ходьбе на пятках. Скорость проведения импульса по срединному нерву у этой пациентки составляла 38,1 м/с. У второй сестры пробанда (IV-3) в возрасте 16 лет и у матери пробанда (III-2) в возрасте 46 лет выявлены лишь умеренное снижение ахилловых рефлексов и небольшие затруднения при ходьбе на пятках. Скорость проведения импульса по срединному нерву у IV-4 составляла 45,6 м/с и незначительно отличалась от контрольных значений. Сводные данные об особенностях клинических проявлений у больных в обследованной семье представлены в табл. 2.

При проведении ДНК анализа у пробанда, его матери и двух его сестер обнаружена ранее не опи-

Спектр клинических симптомов у больных семьи С-ко с 62delG

Больные		С-ко 1	С-ко 2	С-ко 3	С-ко 4
Пол		Ж	Ж	Ж	М
Возраст при осмотре		46 лет	22 года	16 лет	26 лет
СИМПТОМЫ	Деформация стоп				+
	Гипостезия стоп				+
	Гипостезия кистей				+
	Снижение ахилловых рефлексов	+	+	+	+
	Снижение коленных рефлексов			+	+
	Гипотрофия мышц кистей		+		+
	Гипотрофия мышц голеней				+
	Степпаж				+
	Интенционный тремор кистей		+		+
	Спиноцереbellарная атаксия				+
	Парез стоп	+	+	+	+
	Вегетативные нарушения	—	—	—	+

санная делеция одного нуклеотида в положении 62 гена GJB1(62delG). Данная делеция располагалась в области, кодирующей первый трансмембранный домен. Наличие этой мутации приводит к сдвигу рамки считывания и образованию стоп-кодона, терминирующего трансляцию после 83-го аминокислотного остатка Сх32. Результаты секвенирования фрагмента второго экзона гена GJB1 образцов ДНК, полученных от пробанда IV-1 и здорового донора, представлены на рис. 2.

Описаны 23 мутации в гене GJB1 (делеции и инсерции, некротные трем нуклеотидам), приводящие к сдвигу рамки считывания, пятнадцать из которых являются точковыми [5, 6, 11, 12, 14, 17]. К настоящему времени не идентифицировано ни одной мутации со сдвигом рамки считывания в области гена GJB1, кодирующей первый трансмембранный домен Сх32, включающий с 20-го по 38-й аминокислотные остатки. Представленная работа является первым таким описанием.

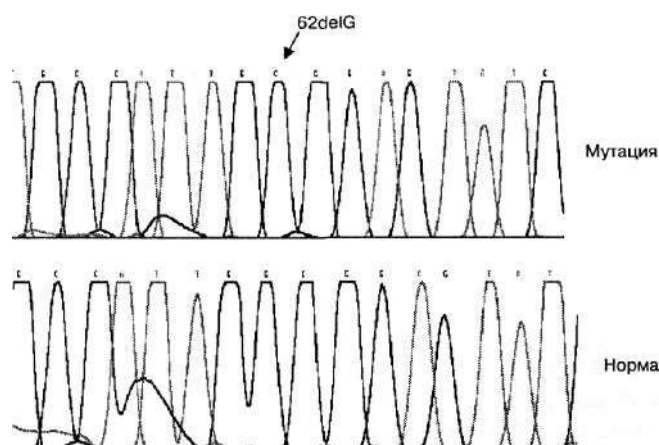


Рис. 2. Результаты секвенирования фрагмента второго экзона гена GJB1 образцов ДНК, полученных от пробанда IV-1 и здорового донора. Выявлена мутация 62delG

В литературе имеются лишь единичные работы, посвященные клинико-генетическим корреляциям при наличии аллельных вариантов НМСН1Х [9, 10]. Показано, что клинические проявления НМСН1Х менее резко выражены при миссенс-мутациях, чем при нонсенс-мутациях, а также делециях и инсерциях, приводящих к сдвигу рамки считывания. С другой стороны, при некоторых миссенс-мутациях описано возникновение выраженного фенотипа заболевания, что объясняется функциональной значимостью этого белкового домена или определенной аминокислоты, заряд которой может играть ключевую роль в функционировании щелевого соединения. Установлено, что наибольшая тяжесть клинических проявлений наблюдается при наличии миссенс-мутаций, локализованных в N- и C-концевых участках белка, а также четвертом трансмембранном домене Сх32, а наименьшая — при миссенс-мутациях, нарушающих структуру интрацеллюлярной петли, соединяющую второй и третий трансмембранные домены [10]. В единичных работах, посвященных изучению клинико-генетических корреляций при НМСН1Х, отмечается, что миссенс-мутации в участке гена, кодирующем первый трансмембранный домен Сх32, приводят к слабовыраженному или умеренному фенотипу НМСН1Х [1, 2]. Анализ клинических проявлений НМСН1Х у больных обследованной нами семьей свидетельствует о том, что даже наличие делеции в этой области гена GJB1 приводит к умеренно выраженному фенотипу заболевания у лиц мужского пола. У гетерозиготных женщин — носителей данной мутации клинические проявления выявляются только при неврологическом осмотре и не сопровождаются жалобами на ухудшение состояния здоровья. Значения скорости проведения импульса по срединному нерву у них свидетельствуют о слабовыраженной аксонной полинейропатии. Таким образом, полученные нами результаты и ана-

лиз литературных данных позволяют предполагать невысокую функциональную значимость первого трансмембранного домена в формировании и функционировании шелевого соединения.

### Список литературы

1. Дадали Е.Л. Наследственные нервно-мышечные заболевания: диагностика и медико-генетическое консультирование : Автореф. дисс. на соискание уч. степени д.м.н. — М., 1999. — 35 с.
2. Руденская Г.Е., Шатана И.А., Вассерман Н.Н. и др. Наследственная моторно-сенсорная нейропатия с X-сцепленным доминантным наследованием // Журн. невропат. и псих. — 2001. — Т. 10. — С. 813.
3. Ainsworth P.J., Bolton C.F., Murphy B.C. et al. Genotype/phenotype correlation in affected individuals of a family with a deletion of the entire coding sequence of the connexin 32 gene // Hum. Genet. — 1998. - Vol. 103. - P. 242-244.
4. Beckett J., White B.N., Simpson N.E., Ebers G.C., Holden J., MacLeod P.M. A linkage study using DNA markers localizes the gene for X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease at Xq13-Xq22 // Cytogenet. Cell Genet. - 1985. - Vol. 40. - P. 579.
5. Bone L.J., Deschenes S.M., Balice-Gordon R.J. et al. Connexin32 and X-linked Charcot-Marie-Tooth disease // Neurobiol Dis. — 1997. - Vol. 4. - P. 221-230.
6. Fairweather N., Bell C., Cochrane S. et al. Mutations in the connexin 32 gene in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMTX1) // Hum. Mol. Genet. - 1994. - Vol. 13. - P. 29-34.
7. Falk M.M., Buehler L.K., Kumar N.M., Gilula N.B. Cell-free synthesis and assembly of connexins into functional gap junction membrane channels // EMBO J. - 1997. - Vol. 16. - P. 2703-2716.
8. Hahn A.F., Brown W.F., Koopman W.J., Feasby T.E. X-linked dominant hereditary motor and sensory neuropathy // Brain. — 1990. - Vol. 113. - P. 1511-1525.
9. Haits N.E., Nelis E., Van Broeckhoven C. 3rd workshop of the European CMT consortium: 54th ENMC international workshop on genotype/phenotype correlations in Charcot-Marie-Tooth type 1 and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies, 28–30 November 1997, Naarden // Neuromusc. Disord. - 1998. - Vol. 8. - P. 591-603.
10. Ionasescu V., Ionasescu R., Searby C. Correlation between connexin 32 gene mutations and clinical phenotype in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy // Am. J. Med. Genet. — 1996. - Vol. 63. - P. 486-491.
11. Nelis E., Cruts M., Wouters H. Mutations/-11.12.2003.
12. Nicholson G.A., Yeung L., Corbett A. Efficient neurophysiology selection of X-linked Charcot-Marie-Tooth families: ten novel mutations // Neurology. - 1998. - Vol. 51. - P. 1412-1416.
13. Martin P.E., Mambetisaeva E.T., Archer D.A. et al. Analysis of gap junction assembly using mutated in Charcot-Marie-Tooth X-linked disease // J. Neurochemistry. - 2000. - Vol. 74. - P. 711–727.
14. Meggouh F., Benomar A., Rouger H. et al. The first de novo mutation of the connexin 32 gene associated with X linked Charcot-Marie-Tooth disease // J. Med. Genet. - 1998. - Vol. 35. - P. 12.
15. Orita M., Orita M., Suzuki Y., Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction // Genomics. — 1989. — Vol. 5. — P. 874–879.
16. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1977. — Vol. 74. - P. 5463-5467.
17. Sillibourne J., Hackwell S.M., Stevens C.A., Harvey J.F. Rapid mutation analysis of Charcot-Marie-Tooth type 1 // J. Med. Genet. — 1998. - Suppl. - P. 87.

### NOVEL ALLELIC VARIANT OF HEREDITARY MOTOR AND SENSORY NEUROPATHY WITH GJB1 GENE MUTATION (62DELG)

KIRILENKO N.B.<sup>1</sup>, DADALI E.L.<sup>1</sup>, FEDOTOV V.P.<sup>2</sup>,  
MERSIJANOVA I.V.<sup>2</sup>, SHARKOVA I.V.<sup>1</sup>, TVERSKAJA S.M.<sup>2</sup>, POLIAKOV A.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> — Medical State University of Russia \*

<sup>2</sup> — Research Center for Medical Genetics, Moscow (Russia) \*\*

*A novel mutation has been identified in a family from Russia: a deletion of the second nucleotide of codon 21 (62delG). The mutation predicts a frame shift and termination of translation after 83 amino acid. Four affected individuals were found in the family.*

*The proband, a 25-year-old male showed some signs of demyelinating sensorimotor neuropathy. His clinical features and electrophysiological findings were typical for CMT1. Three other patients — his mother and two sisters — had only discrete walking difficulties and atrophy of peroneal muscles. Electrophysiological findings indicated axonal neuropathy.*