

Картирование и идентификация генов болезни Шарко—Мари—Тута второго типа*

ЩАГИНА О.А.¹, МЕРСИЯНОВА И.В.¹, ДАДАЛИ ЕЛ.¹, ФЕДОТОВ В.П.², ПОЛЯКОВ А.В.¹

* — ГУМедико-генетический научный центр РАМН

Москва, 115478, Москворечье, 1. Факс: 324-81-10. E-mail: dnlab@rol.ru

² — Воронежская межобластная медико-генетическая консультация

Наследственные мотосенсорные нейропатии второго типа (НМСН2), или аксонопатии, — обширная генетически гетерогенная группа периферических полинейропатий. В данной работе изложены результаты картирования и идентификации генов трех форм НМСН второго типа: НМСН2А, НМСН2Е и НМСН2F.

Введение

НМСН являются не только самым частым среди наследственных заболеваний периферической нервной системы [15], но и одним из самых частых наследственных заболеваний человека. Частота всех форм НМСН варьирует от 10 до 40:100 000 в различных популяциях [17].

Морфологической основой болезни при НМСН являются дегенеративные изменения в периферических нервах и нервных корешках, касающиеся как аксона, так и миелиновой оболочки нерва. На основании локализации первичного дефекта болезнь Шарко—Мари—Тута подразделяют на 2 большие группы: миелинопатии и аксонопатии. К миелинопатиям относятся аутосомно-доминантные (АД), рецессивные, Х-сцепленные НМСН первого типа (скорость проведения импульса, СПИ, по п. medianus менее 38 м/с) и промежуточные (СПИ от 25 до 50 м/с) формы НМСН; к аксонопатиям — аутосомно-рецессивные и доминантные формы НМСН 2 (СПИ более 38 м/с) (рис. 1).

Клинико-генетическая гетерогенность НМСН явилась основанием для поиска локусов, сцепленных с данными заболеваниями. К настоящему времени картировано более 20 локусов, отвечающих за НМСН, идентифицировано 20 генов, мутации в которых приводят к развитию клинического фенотипа НМСН.

Основой генетического картирования является анализ сцепления клинического фенотипа заболевания с высокополиморфными маркерами. В настоящее время, после появления высокоразрешающих карт (Genethon (<http://www.cephb.fr/ceph-genethon-map.html>) и Marshfield (http://research.marshfieldclinic.org/genetics/Map_Markers/maps/IndexMapFrames)) процедура картирования гена представляет собой дорогостоящее, трудоемкое, но рутинное исследование. Существуют подходы, позволяющие сократить время и стоимость работы по поиску новых локусов, например анализ функциональных генов-кандидатов.

В течение 10 лет в лаборатории ДНК-диагностики ГУ МГНЦ РАМН проводился сбор семей с бо-

лезнью Шарко—Мари—Тут, результатом которого явилось картирование двух новых локусов и идентификация трех генов, ответственных за развитие этого заболевания.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили образцы ДНК, выделенной из крови больных и здоровых членов больших семей (табл. 1)

Таблица 1

Номер семьи	Число поколений	Количество членов семьи	Число больных	Число человек, доступных для исследования
СМТ 134	6	41	18	28
СМТ45	4	21	8	18
СМТ 2К	6	43	19	31

Диагноз "НМСН2" больным в семьях был поставлен на основании критериев, утвержденных на 53-м Международном семинаре Европейского нейромышечного консорциума. Основными из критериев были следующие:

- 1) медленно прогрессирующая симметричная мышечная слабость и атрофия дистальной части преимущественно нижних конечностей;
- 2) деформации стоп по типу полых;
- 3) снижение или утрата сухожильных рефлексов;
- 4) поверхностные гипостезии в дистальных отделах конечностей;
- 5) нормальные или умеренно сниженные значения СПИ по двигательным и чувствительным нервам.

ДНК была выделена из замороженной крови больных с НМСН и их здоровых родственников. Для получения ДНК необходимой степени чистоты и достаточного молекулярного веса использовали фенол-хлороформный метод выделения ДНК из крови [20]. ПЦР-амплификацию проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 1*реакционный буфер (67 mM Tris-HCl, 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Twin-20), 200 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 1 единицу термостабильной ДНК-полимеразы Biotaq. Концентрация MgCl₂ и температура отжига праймеров подбирались индивидуально для каждого фраг-

*Авторы выражают благодарность зарубежным коллегам Евграфову О.В., Исмаилову Ш.М., Zuchner S. за совместно проделанную работу.

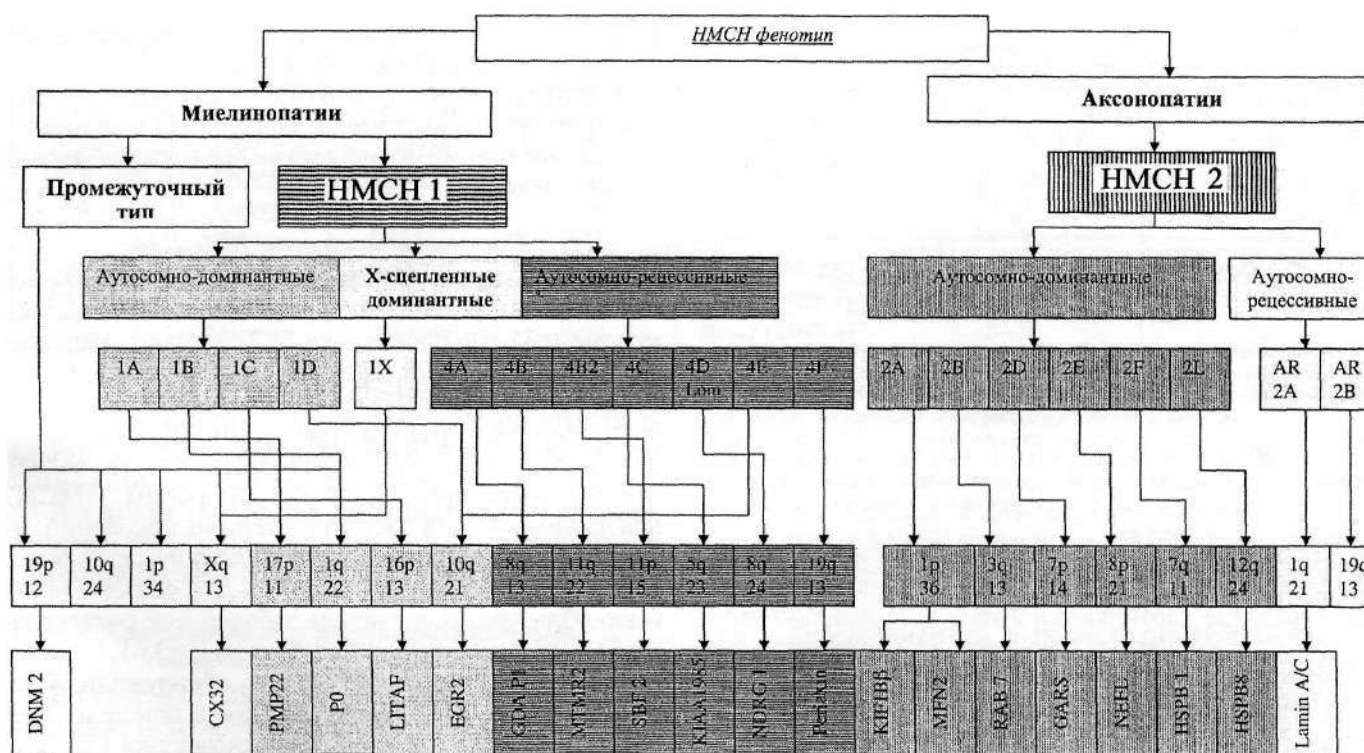


Рис. 1. Генетическая гетерогенность наследственных мотосенсорных нейропатий

мента. ПЦР проводили на программируемом термодиспетчере MC2 производства фирмы "ДНК-технология". Для визуализации результатов ПЦР-амплификации применялся электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ). Аллели микросателлитных полиморфных маркеров, используемых для анализа сцепления, разделяли в 8%-ном ПААГ (AA:бисAA = 29:1,3) длиной 20 см, приготовленном на однократном ТВЕ. Поиск мутаций в генах-кандидатах осуществляли методами SSCP-анализа и прямого автоматического секвенирования продукта ПЦР как с прямого, так и с обратного праймеров, на основании ферментативного секвенса по методу Сэнгера.

Оценку сцепления локуса заболевания с геномными маркерами проводили на основании статистического анализа сегрегации заболевания в семье с аллелями полиморфных маркеров, применяя метод максимального правдоподобия. Двухлокусный анализ сцепления осуществлялся с помощью программы MLINK, входящей в пакет программ "LINKAGE", версия 5.1. Для мультилокусного анализа сцепления использовалась программа LINKMAP, входящая в пакет программ "FASTLINK", версия 4.1P.

Результаты и обсуждение

Картирование и идентификация гена болезни Шарко—Мари—Тут типа 2E

Образцы ДНК нескольких пациентов из большой семьи СМТ134, с разветвленной родословной, были исследованы на возможные мутации в известных генах АД форм НМСН (PMP22, MPZ). После исключения мутаций в этих генах было исключено сцепле-

ние со всеми известными АД локусами болезни Шарко—Мари—Тут (СМТ 2A 1p35-p36, СМТ 2B 3q13-q22 и СМТ 2D 7p14).

Следующим этапом исследования стал скрининг маркеров, распределенных по геному, на сцепление с фенотипом НМСН 2 в семье СМТ 134. В первую очередь анализировались локусы возможных функциональных генов-кандидатов.

С этой точки зрения наиболее очевидными генами-кандидатами для аксональной формы НМСН являются гены белков аксонального цитоскелета, а также белков, принимающих участие в аксональном транспорте. К ним относятся белки нейрофиламентов, тубулинов, динеинов, кинезинов, а также большая группа связанных с ними ферментов, участвующих в регуляции аксонального транспорта.

Было исключено сцепление с локусами миелин-ассоциированного гликопротеина (MAG, myelin associated glycoprotein) на хромосоме 19q13.1; коннексина 26 (13q11-q12.2); трансмембранного белка олигодендроцитов (ОТМ — oligodendrocyte transmembrane protein) на хромосоме 3q26, гликопротеина миелинообразующих олигодендроцитов ЦНС (MOG, myelin-oligodendrocyte glycoprotein) 6p22-p23 и белка периферического миелина PMP2 на хромосоме 8q13-q21. Также было исключено сцепление с рядом аксональных белков: тубулином (3-5 (TUB p5, 19pter-pl3); ассоциированными с микротрубочками протеинами MAPTau (17q21.1) и MAP1B (5q13); периферином (12q12-q13); кинезинами KIF2 (5q12-q13), KIF5A (12q13) и динеином (11q21-q22.1) [12].

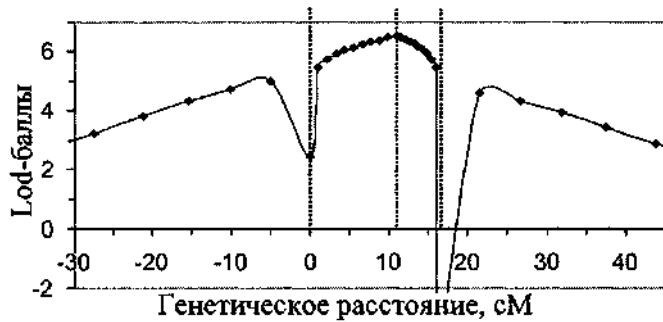


Рис. 2. Локализация гена *HMCH2E* методом мультилокусного анализа сцепления. Наибольшее значение Lod-балла, равное 6,54, получено для микросателлитного маркера из 5'-некодирующей области гена *NEFL* [*NEFL*(GT)*n*]. Маркеры D8S136 и D8S1769 были зафиксированы на расстоянии 16,38 сМ друг от друга, на основании карты генетического сцепления Marshfield Chromosome 8 Sex-Averaged Linkage Map. *NEFL* был помещен на расстоянии 11 сМ от маркера D8S136 на основании карты генетического сцепления NIH/CEPN Chromosome 8 Linkage Map (1992)

Данные о сцеплении заболевания в исследуемой семье были получены для маркеров на хромосоме 8p21-p22, где картируются 2 гена нейрофиламентов — *NEFL* и *NEFM*, — кодирующие соответственно легкую и среднюю цепи этого белка.

Нейрофиламенты являются основным элементом нейронального цитоскелета, в первую очередь длинных аксонов, образующих двигательные и чувствительные периферические нервы. Нейрофиламенты относятся к промежуточным филаментам (диаметр 10 нм) и являются облигатными гетерополимерами, состоящими *in vivo* из трех субъединиц: легкой (*NEFL*), средней (*NEFM*) и тяжелой (*NEFH*). Вследствие перестроек нейрофиламенты способны регулировать диаметр аксонов, а также влиять на динамику и функции других компонентов аксонального цитоскелета — микротрубочек и актиновых филаментов.

При двухлокусном анализе сцепления максимальное значение Lod-балла, равное 5,93 при $\theta=0,0$, получено для микросателлитного маркера (GT-повтора) из 5'-некодирующей области гена легкой цепи нейрофиламента *NEFL*. Мультилокусный анализ сцепления также показал, что наиболее вероятная локализация гена *HMCH2E* — интервал 16 сМ между маркерами D8S136 и D8S1769, причем максимальное значение LOD-балла, равное 6,54, было получено для того же маркера из некодирующей области гена *NEFL* (рис. 2). Поиск мутаций в кодирующих областях обоих генов выявил в кодоне 333 гена *NEFL* замену нуклеотида A998->C (CAG->CCG), которая приводит к доминантной миссенс-мутации — замене аминокислоты глутамин-333 на пролин (Gln333Pro) (рис. 3 см. на 3-й стр. обложки). Данная мутация сегрегировала совместно с заболеванием в семье и не была выявлена у 90 здоровых неродственных индивидуумов [12]. Таким образом, идентифицирован первый ген, ответственный за аксональный тип моторно-сенсорной нейропатии — ген легкой цепи нейрофиламента — *NEFL*.

В дальнейшем в различных странах были проведены скрининговые исследования по поиску мутаций в гене *NEFL*. В настоящее время обнаружено

12 мутаций, большинство из которых локализовано в первом экзоне. [3, 5, 6, 9, 21]

Идентификация гена *NEFL* — пример удачного применения подхода анализа сцепления с функциональными генами-кандидатами для картирования новых локусов НМСН.

Идентификация гена *HMCH2A*

Первым картированным локусом НМСН был локус *HMCH2A* [2, 19]. Ген картирован в 1993 г. на хромосоме 1p35-p36 в интервале 14,7 сМ между маркерами D1S160 и D1S228 с Lod-баллом $Z=3,69$ [2]. Сцепление с этим локусом было обнаружено во многих больших семьях из разных стран [14,16,23], в том числе и в российской семье СМТ45[23], что позволило предположить преобладание этой формы *HMCH2* над другими. Семья состоит из четырех поколений, из 21 члена этой семьи 8 чел. имеют клинический фенотип болезни Шарко—Мари—Тут. Для семьи СМТ45 было обнаружено сцепление заболевания с маркерами D1S2667 и D1S450 с Lod-баллом $Z=3,61$.

В 2001 г. японские ученые обнаружили миссенс-мутацию Q98L в гене *KIF1βB* в одной из трех *HMCH2A* семей японского происхождения [22]. Однако при исследовании этого гена в семи больших семьях из России, Европы, Турции и Японии, клинический фенотип заболевания в которых был сцеплен с локусом *HMCH2A* с Lod-баллом от 1,9 до 5,88, не было обнаружено ни одного изменения нуклеотидной последовательности в кодирующей области *KIF1βB*, что позволило предположить существование другого гена, ответственного за развитие данной формы заболевания [23]. Анализ сегрегации гаплотипов в этих семьях позволил исключить ген *KIF1βB* и уточнить границы локуса *HMCH2A* (рис. 4.). В 14 генах-кандидатах из этой области, экспрессирующихся в нервной системе (*UBE4B*, *PEX14*, *TARDBP*, *FMSCL2*, *FRAP1*, *KIAA1337*, *FBX02*, *FBX30*, *FBX06*, *CLCN6*, *NPPB*, *TNFRSF8* и *VPS13D*), мутации не были выявлены. Во всех исследуемых семьях были обнаружены миссенс-мутации в гене *MFN2*, лежащем на 1,65 млн п.н. центромернее *KIF1βB*. (табл. 2) [23]

Белок митофузин 2, кодируемый геном *MFN2*, — мембранная ГТФаза митохондрий, гомолог FZ01 *D.melanogaster*. Функциями митофузина являются: образование и поддержание мембранных сетей вокруг элементов цитоскелета, таких, как филаменты и микротрубочки; поддержание функционального рельефа мембраны митохондрий; поддержание мембранного потенциала митохондрий, а, следовательно, участие в процессе клеточного дыхания [1]. Митофузин 2 локализован в мембране митохондрий совместно с проапoptотическим белком Вах [И] и принимает непосредственное участие в процессе апоптоза [13].

В настоящее время остается не до конца ясным, каким образом мутации в гене белка, экспрессирующегося практически во всех тканях организма, могут приводить к развитию клинических проявлений

Клиническая, этническая и генетическая характеристики семей с НМСН2А

Семья	Регион	STR маркер	Lod-балл	Мутация	Возраст манифестации	СПИ (п. medianuas)
DUK663	Европа	D1S228	3.40	W740S (2219G C)	5-52	46-54
DUK1706	Европа	D1S228	2.27	L76P (227T C)	7-44	40-50
DUK1241	Европа	D1S228	2.20	R280H (839G A)	11-35	42-52
CMT156	Италия	D1S2667	3.11	P251A (751C G)	8-50	40-59
RU 45	Россия	D1S228	3.55	R94Q (281GA)	6-17	52-62
CMT166	Турция	D1S450	5.88	V69F (205G T)	5-15	53
J693	Япония	D1S244	1.50	R94Q (281GA)	3-15	52

болезни Шарко—Мари—Тут. Тем не менее, вероятно, что функционирование нейрофиламентов тесно взаимосвязано с группировкой митохондрий, невозможной без белка митофузина.

В данном случае для идентификации патологического гена применен анализ позиционных генов-кандидатов.

Картирование и идентификация гена, ответственного за НМСН2F

В семье СМТ2К, в которой насчитывается 6 поколений, 19 из 43 членов семьи имеют клинический фенотип НМСН2, было исключено сцепление со всеми известными АД локусами болезни Шарко—Мари—Тут, новому генетическому варианту было присвоено обозначение НМСН2F.

Для семьи с формой НМСН2F проведен полногеномный скрининг на наличие сцепления. Локус заболевания картирован на хромосоме 7q11-q21 между маркерами D7S2435 и D7S806. Максимальный Lod-балл при двухлокусном анализе сцепления Z=5,87 получен для маркера D7S2204 при отсутствии рекомбинаций [8]. Анализ гаплотипов в семье с привлечением максимального числа маркеров из интервала сцепления позволил определить наиболее вероятную область локализации патологического гена в интервале 5,4 сМ между маркерами D7S672 и D7S2421.

Из этого региона были отобраны 5 генов-кандидатов (*HIP1*, *AIP1*, *CYLN2*, *PTPN12* и *HSPB1*). Все экзоны этих генов были отсекуированы и, во втором экзоне гена *HSPB1* была найдена миссенс-мутация 404С->Т, которая приводит к замене серина в положении 135 на фенилаланин.

Далее было проведено скрининговое исследование 301 больного с клиническим фенотипом болезни Шарко—Мари—Тут, и так как у пациентов с дистальной наследственной моторной нейропатией (НМН) второго типа была найдена мутация в гене белка HSP22 [7], взаимодействующего с HSPB1 [18], в исследование включили 115 больных НМН. Результаты исследования представлены в табл. 3.

Белок HSPB1 (HSP27) относится к семейству белков теплового шока, или шаперонов, и экспрессируется во всех тканях. Все шапероны участвуют в фолдинге и рефолдинге белков. Было показано, что HSP27 участвует в сборке нейрофиламента [4]. Белок легкой цепи нейрофиламента обладает способ-

ностью к самосборке в гомополимерный филамент, когда экспрессируется в клетках SW13.cl.2Vim линии аденокарциномы, не имеющей сетей из промежуточных филаментов. Человеческий NEFL был котрансфицирован в эти клетки совместно с нормальным и S135F-мутантным HSP27. Было показано, что в клетках с мутантным HSP27, в отличие от клеток с нормальным HSP27, отсутствует самосборка нейрофиламентов, а происходит агрегация белков легкой цепи [4] (рис. 5 — см. стр. 3 обложки).

Нейрофиламенты — основной элемент нейронального цитоскелета и, в первую очередь, длинных аксонов, образующих двигательные и чувствительные периферические нервы. Нейрофиламенты относятся к промежуточным филаментам (диаметр 10 нм), классу IV, и являются облигатными гетерополимерами, состоящими *in vivo* из трех субъединиц — тяжелой, средней и легкой. Дефект легкой цепи приводит к НМСН2Е. Нейрофиламенты представляют собой динамичную структуру: их сборка или диссоциация регулируется вследствие фосфорилирования субъединиц. Из-за перестроек нейрофиламенты способны регулировать диаметр аксонов, а также влиять на динамику и функции других компонентов аксонального цитоскелета — микротрубочек и актиновых филаментов [10]. Дефект белка HSP27, без которого невозможны поддержание нормальной структуры и сборка нейрофиламента, приводит к НМСН2F. Процесс же фосфорилирования настолько энергозатратен, что для работы промежуточных филаментов необходима группировка митохондрий вокруг компонентов цитоскелета; мутации в

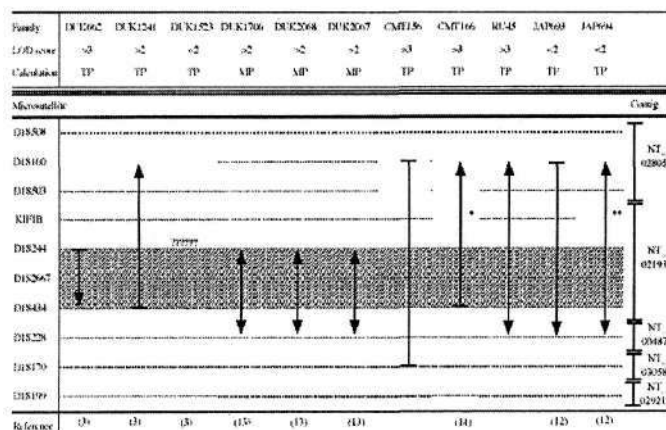


Рис. 4. Анализ сегрегации гаплотипов в семьях с НМСН2А

Мутации в гене *HSPB1* в семьях с НМСН2 и НМН

Семья	Диагноз	Страна	Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена
PN-474.1	НМН	Бельгия	379C->T	R127W
CMT2K	НМСН2	Россия	404C->T	S135F
CMT150	НМН	Великобритания	404C->T	S135F
PN-269.1	НМСН2	Бельгия	406C->T	R136W
CMT263	НМН	Хорватия	452C->T	T151I
CMT391	НМН	Австрия	545C->T	P182L

гене *MFN2*, нарушающие функционирование митохондриальной сети, — причина НМСН2А.

Таким образом, результатом работы стали картирование двух новых локусов болезни Шарко—Мари—Тут и обнаружение трех генов, ответственных за развитие НМСН2, в том числе первого из описанных — *NEFL* и гена наиболее частой формы НМСН2А — *MFN2*.

Список литературы

- Bach D. et al. Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity // *J. Biol. Chem.* — 2003. - Vol. 278, №19. - P. 17190-7.
- Ben Othmane K. et al. Localization of a gene (CMT2A) for autosomal dominant Charcot—Marie—Tooth disease type 2 to chromosome 1p and evidence of genetic heterogeneity // *Genomics.* — 1993. - Vol. 17, №2. - P. 370-5.
- De Jonghe P. et al. Further evidence that neurofilament light chain gene mutations can cause Charcot—Marie—Tooth disease type 2E // *Ann. Neurol.* - 2001. - Vol. 49, №2. - P. 245-9.
- Evgrafov O.V. et al. Mutant small heat-shock protein 27 causes axonal Charcot—Marie—Tooth disease and distal hereditary motor neuropathy // *Nat. Genet.* - 2004. - Vol. 36, №6. - P. 602-6.
- Fabrizi G.M. et al. Giant axon and neurofilament accumulation in Charcot—Marie—Tooth disease type 2E // *Neurology.* — 2004. - Vol. 62, №8. - P. 1429-31.
- Georgiou D.M. et al. A novel NF-L mutation Pro22Ser is associated with CMT2 in a large Slovenian family // *Neurogenetics.* — 2002. - Vol. 4, №2. - P. 93-6.
- Irobi J. et al. Hot-spot residue in small heat-shock protein 22 causes distal motor neuropathy // *Nat. Genet.* — 2004. - Vol. 36, №6. - P. 597-601.
- Ismailov S.M. et al. A new locus for autosomal dominant Charcot—Marie—Tooth disease type 2 (CMT2F) maps to chromosome 7q11-q21 // *Eur. J. Hum. Genet.* - 2001. - Vol. 9, №8. - P. 646-50.
- Jordanova A. et al. Mutations in the neurofilament light chain gene (*NEFL*) cause early onset severe Charcot—Marie—Tooth disease // *Brain.* - 2003. - Vol. 126, №Pt 3. - P. 590-7.
- Julien J.P. and W.E. Mushynski, Neurofilaments in health and disease // *Prog Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* - 1998. - Vol. 61. - P. 1-23.
- Karbowski M. et al. Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis // *J. Cell. Biol.* - 2002. - Vol. 159, №6. - P. 931-8.
- Mersyanova I.V. et al. A new variant of Charcot—Marie—Tooth disease type 2 is probably the result of a mutation in the neurofilament-light gene // *Am. J. Hum. Genet.* — 2000. — Vol. 67, №6. — P. 37-46.
- Mozdy A.D., J.M. McCaffery, and J.M. Shaw, Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fislp // *J. Cell. Biol.* — 2000. — Vol. 151, №2. - P. 367-80.
- Muglia M. et al. Clinical and genetic study of a large Charcot—Marie—Tooth type 2A family from southern Italy // *Neurology.* - 2001. - Vol. 56, №1. - P. 100-3.
- Ouvrier R.A. and G.A. Nicholson, Advances in the genetics of hereditary hypertrophic neuropathy in childhood // *Brain. Dev.* — 1995. - Vol. 17. - Suppl. - P. 31-8.
- Saito M. et al. Linkage mapping of the gene for Charcot—Marie—Tooth disease type 2 to chromosome 1p (CMT2A) and the clinical features of CMT2A // *Neurology.* - 1997. - Vol. 49, №6. - P. 1630-5.
- Skre H. Genetic and clinical aspects of Charcot—Marie—Tooth's disease // *Clin. Genet.* - 1974. - Vol. 6, №2. - P. 98-118.
- Sun X. et al. Interaction of human HSP22 (HSPB8) with other small heat shock proteins // *J. Biol. Chem.* - 2004. - Vol. 279, №4. - P. 2394-402.
- Timmerman V. et al. Linkage and mutation analysis of Charcot—Marie—Tooth neuropathy type 2 families with chromosomes 1p35-p36 and Xq13 // *Neurology.* - 1996. - Vol. 46, №5. - P. 1311-8.
- Vandenplas S. et al. Blot hybridisation analysis of genomic DNA // *J. Med. Genet.* - 1984. - Vol. 21, №3. - P. 164-72.
- Yamamoto M. et al. Glu528del in *NEFL* is a polymorphic variant rather than a disease-causing mutation for Charcot—Marie—Tooth disease in Japan // *Neurogenetics.* — 2004. — Vol. 5, №1. — P. 75-7.
- Zhao C et al. Charcot—Marie—Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor *KIF1Bbeta* // *Cell.* — 2001. — Vol. 105, №5. - P. 587-97.
- Zuchner S. et al. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot—Marie—Tooth neuropathy type 2A // *Nat. Gene.* - 2004. - Vol. 36, №5. - P. 449-51.

LINKAGE MAPPING AND IDENTIFICATION THE GENES FOR CHARCOT-MARIE-TOOTH DISEASE TYPE 2

SCHAGINA O. A., MERSIYANOVA I.V., DADALI E.L., FEDOTOV V.P., POLYAKOV A.V.
 Research Centre for Medical Genetics of RAMS, Moscow, Russia
 Voronezhskaya medical genetics consultation

Hereditary motor and sensory neuropathy type 2 (CMT2) or axonopathy — extensive genetically heterogenous group of peripheral neuropathies. The results of linkage analysis and gene identification of three forms CMT2: CMT2A, CMT2E and CMT2F are stated in the given work.