

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНА *GDAP1* ПРИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ МОТО-СЕНСОРНЫХ НЕЙРОПАТИЯХ

А.В. Поляков¹, О.А. Щагина¹, В.П. Федотов², Е.Л. Дадали¹

¹ Медико-генетический научный центр РАМН, г. Москва

**² Воронежский областной клинический диагностический центр,
межобластная медико-генетическая консультация, г. Воронеж**

Наследственные моторно-сенсорные нейропатии (НМСН) - генетически гетерогенная группа заболеваний со сходными клиническими проявлениями. К настоящему времени кроме аутосомно-доминантного типа наследования описаны аутосомно-рецессивный, X-сцепленные рецессивный и доминантный типы наследования [1]. Описание семей-с аутосом-

но-рецессивным типом наследования НМСН привело к необходимости совершенствования их классификационной структуры и выделению IV типа этой группы заболеваний (к III типу по-прежнему отнесена болезнь Дежерина-Сотта). НМСН-IV характеризуются аутосомно-рецессивным наследованием и тяжелым злокачественным течением, по электро-

нейромиографическому критерию - скорости проведения импульса по срединному нерву - в этой группе встречаются как миело-, так и аксонопатии. К настоящему времени описано восемь генетических вариантов НМСН IV типа, наиболее распространенным из которых является IVA тип [2].

В 2002 г. было установлено, что мутации гена *GDAP1*, локализованного на хромосоме 8q21.11, являются причиной НМСН IVA типа [3, 4]. На сегодняшний день описано более 30 различных мутаций этого гена. Интересно отметить, что большинство мутаций являются нонсенс-мутациями, приводящими к образованию преждевременного стоп-кодона, или затрагивают аминокислотную последовательность С-конца белка, что, как показывает функциональный анализ, приводит к неспособности *GDAP1* прикрепляться к внешней мембране митохондрий и, следовательно, выполнять свои основные функции регулятора расщепления митохондриальных мембран. Подобные мутации наследуются аутосомно-рецессивно, что свидетельствует о том, что одной копии гена достаточно для нормального функционирования аппарата слияния - расщепления митохондрий [5-8]. Существуют единичные описания миссенс-мутаций, затрагивающих другие участки гена. Как правило, эти мутации наследуются аутосомно-доминантно или являются мутациями *de novo* [6, 9].

Обратная ситуация наблюдается в отношении точковых мутаций, меняющих аминокислотный состав других участков протеина. Было показано, что экспрессия в клетке таких мутантных белков приводит к индукции расщепления митохондриальной сети. Заболевание в семьях с такими мутациями наследуется аутосомно-доминантно, а клинический фенотип совпадает с НМСН IIA2 типа, вызываемого мутациями в гене митофузина 2. Предполагается, что такие точковые мутации по механизму «gain of function» приводят не к образованию гигантских митохондрий, а к усиленной фрагментации хондриома, возникающей также при нарушении функционирования митофузина 2 [6].

Ганглиозидиндуцированный, ассоциированный с дифференцировкой протеин 1 экспрессируется во многих тканях организма, особенно высоко его содержание в органах центральной и периферической нервной системы. В течение нескольких лет после открытия мутаций гена *GDAP1* в качестве причины наиболее частой из рецессивных форм болезни Шарко-Мари-Тута функция белка оставалась не изученной. Исходя из структурного сходства, его относили к семейству внутриклеточных глутатион-S-трансфераз [10], однако подробные исследования этого белка, проведенные коллективами авторов из разных стран, показали отсутствие у него ферментативной активности; кроме того, на С-терминальном конце белка были обнаружены два гидрофобных домена, характерных для белков, локализующихся в мембранах. Дальнейшие опыты показали, что *GDAP1* локализуется в наружной мембране митохондрий, прикрепляясь к ней за счет двух С-концевых гидрофобных доменов, таким образом, что N-конец белка обращен в цитоплазму. Основной функцией белка является регуляция процесса расщепления мембран [11, 12].

В структуре *GDAP1* выявлено 4 домена: N- и С-глутатион-Б-трансферазные, функция которых до сих пор детально не изучена, и два С-концевых гид-

рофобных домена, необходимых для «заякоривания» в митохондриальной мембране [11].

Длительное время НМСН IVA типа описывалась в группе демиелинизирующих полинейропатий, и показанием для исследования мутаций в гене *GDAP1* служило наличие у больных демиелинизирующего варианта НМСН. Однако исследованиями последних лет показано, что у большинства обследованных больных, имеющих мутацию в этом гене, СПИ по срединному нерву больше соответствуют аксональному варианту НМСН или являются промежуточными [5, 13]. Наличие противоречивых результатов клинико-электромиографического обследования больных обуславливает необходимость продолжения исследований, направленных на уточнение диагностических критериев НМСН IVA типа, являющихся основанием для идентификации этого варианта с помощью молекулярно-генетических методов.

Материал и методы

Материалом для исследования являлись образцы ДНК, выделенные из периферической крови 110 больных в возрасте от 4 до 60 лет (52 мужчины и 48 женщин) из 72 неродственных семей с наследственной аксонопатией и 36 их клинически здоровых родственников. В качестве группы сравнения использовались образцы ДНК, выделенные из крови 300 здоровых доноров, проживающих на территории различных областей РФ.

Выделение геномной ДНК из лейкоцитов периферической крови выполняли с помощью готового набора реактивов для выделения «DIAform DNA Prep100» («Isogene Lab. Ltd.», Россия) по протоколу производителя.

Аmplификацию всех исследуемых фрагментов ДНК проводили методом ПЦР на программируемом термоциклере «MC2» фирмы «ДНК-технология» (Россия) с использованием оригинальных олигонуклеотидных праймеров, которые синтезировались в НПФ «Литех» или НПО «Syntol» (Россия).

Для выявления изменений нуклеотидной последовательности гена *GDAP1* использовался метод SSCP-анализа со щелочной денатурацией и автоматическое секвенирование, которое проводилось согласно протоколу фирмы-производителя на приборе «ABI Prism 3100» («Applied Biosystems», США). В качестве матрицы для секвенирования использовали фрагменты ДНК, полученные после проведения ПЦР. Анализ результатов секвенирования осуществлялся с помощью программ Chromas и Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Исследование микросателлитных повторов проводилось методом ПДАФ-анализа. Результаты оценивали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с последующим окрашиванием геля раствором бромистого этидия и регистрацией с помощью документирующей системы GelDoc фирмы «Bio-Rad» (США) в УФ-излучении. В работе использовали эндонуклеазы производства фирмы «СибЭнзим» (Россия) и «Fermentas» (Литва).

При сравнении частот аллелей в хромосомах с мутациями Leu239Phe гена *GDAP1* с частотой этих аллелей в популяции использовали точный критерий Фишера.

Для оценки неравновесности по сцеплению для полиморфных маркеров в группе больных использовали оценку $5 = (PD - PN)/(1 - PN)$, где 5 - мера

неравновесности сцепления, PD - частота ассоциированного аллеля среди хромосом с мутацией, P_N - частота этого же аллеля среди нормальных хромосом [14, 15].

Для определения «возраста» мутации Leu239Phe гена *GDAP1* применяли подход, основанный на понятии «генетических часов» и оценивающий количество поколений d с момента появления мутации в популяции до настоящего времени [16, 17]:

$$g = \frac{\log \delta_g}{\log(1-\theta)},$$

где θ - рекомбинационная фракция; g - мера неравновесности сцепления.

Результаты и обсуждение

В результате исследования всей кодирующей последовательности гена *GDAP1* были выявлены мутации у 9 больных из 6 неродственных семей (табл. 1).

В трех семьях у пробандов была выявлена мутация Leu239Phe (с.715C>T) экзона 6 в гомозигот-

ном состоянии, еще у двух больных эта мутация была выявлена в гетерозиготном состоянии. Данная мутация была описана ранее как причина аксонопатии в семьях из Чехии и Польши [18]. Кроме того, были выявлены две ранее не описанные мутации Pro153Leu и Arg257Stop.

Для установления природы высокой частоты мутации Leu239Phe было выбрано 8 микросателлитных маркеров с высокой гетерозиготностью, расположенных в интервале 8 м.п.н. вокруг гена *GDAP1*. Проанализированы частоты аллелей этих маркеров на хромосомах с мутацией и без мутации. Полное неравновесие по сцеплению было обнаружено по маркеру D8S286. По остальным маркерам также наблюдалось неравновесие по сцеплению (табл. 2). Таким образом, причиной распространенности этой мутации на территории России является эффект основателя.

Были определены значения неравновесия по сцеплению 5 для каждого аллеля всех исследованных маркеров, используя точный критерий Фишера для оценки достоверности ассоциации данного аллеля маркера с локусом *HMCH-IVA*.

Таблица 1

Мутации гена *GDAP1*

Экзон гена <i>GDAP1</i>	Семья	Мутация 1	Мутация 2	Клинический фенотип	Тип наследования
EX3	149	Pro153Leu (с.458C>T)	n.d.	HMCH-II	<i>de novo?</i>
EX6	294	Leu239Phe (C.7150T)	Leu239Phe (C.7150T)	HMCH-II с атрофией зрительного нерва	AP
EX6	552	Leu239Phe (с.715C>T)	Leu239Phe (C.7150T)	HMCH-II	AP
EX6	374	Leu239Phe (с.715C>T)	Leu239Phe (C.7150T)	HMCH-II	Изолированный случай
EX6	312	Leu239Phe (с.715C>T)	Arg257Stop (C.7630T)	HMCH-II	Изолированный случай
EX6	558	Leu239Phe (C.7150T)	n.d.	HMCH-II	AP

Примечание, n.d. - нет данных; AP - аутосомно-рецессивный.

Таблица 2

Аллельные частоты маркеров (%), сцепленных с локусом *HMCH-IVA*

Аллель	D8S279		D8S1776		D8S286		Map <ep				D8S1805		D8D1705		D8S1757	
	Зд.	Бол.	Зд.	Бол.	Зд.	Бол.	Зд.	Бол.	Зд.	Бол.	Зд.	Бол.	Зд.	Бол.	Зд.	Бол.
0	5,9								02,2	-	01,1	-	8,3	-	4,7	
1	7,4	1Г,1	26,1	1Г,1	0Г,1	-	33,7	-	32,6	-	06,5	44,4	6,3	-	3,1	11,1
2	10,3		32,6	44,4	0,00	-	00,0	-	02,2	11,1	13,1	22,2	6,3	-	17,2	-
3	5,9	1Г,1	27,1	33,3	01,1	-	01,1	-	35,9	88,9	25,0	11,1	20,8	1Г,1	20,3	-
4	13,2		13,0		04,3	-	00,0	-	05,4		17,4	22,2	14,6		6,3	-
5	13,1	2Г,2	0,00	-	05,4	-	07,6	-	01,1	-	12,0	-	12,5	3Г,3	10,9	-
6	19,1	11,1	0,01	11,1	01,1	-	22,8	-	02,2	-	18,5	-	29,2	22,2	17,2	-
7	13,2	22,2			01,1	-	06,5	-	03,3	-	05,4	-	2,1	22,2	7,8	33,3
8	7,4				13,0	100,0	01,1	-	07,6	-	01,1	-			4,7	44,4
9	1,5	2Г,2			25,0		02,2	-	05,4	-		-			3,1	
10					13,0		00,0	-		-		-			1,6	
11					15,2		00,0	-		-		-			1,6	11,1
12					08,7		01,1	11,1				-				
13					09,8		03,3	88,9				-				
14					01,1		00,0					-				
15							04,3					-				
16							06,5					-				
17							07,6					-				

Примечание. Зд. - здоровые; бол. - больные. Подчеркнуты аллельные частоты маркеров, для которых обнаружено наибольшее неравновесие по сцеплению.

При построении гаплотипа основателя выбирали аллели, характеризующиеся максимальной неравновесностью сцепления с локусом заболевания по сравнению с другими аллелями маркеров и имеющие большее накопление в хромосомах с мутацией по сравнению с другими аллелями (табл. 3). Поэтому при определении предкового аллеля учитывали наибольшее положительное значение r и наименьшее p среди всех аллелей данного маркера. Гаплотипы хромосом с мутацией Leu239Phe представлены в табл. 4.

Таблица 3

Ассоциация и неравновесие по сцеплению аллелей маркеров с локусом HMCH-IVA

Маркер	Аллель	r	$5 \pm 95\%$ -й ДИ
D8S279	9	0,035	0,21 \pm 0,28
D8S1776	2	0,480	0,18 \pm 0,51
D8S286	8	< 0,001	1
D8S551	13	< 0,001	0,89 \pm 0,22
GDAP1	C.715T		
D8S548	3	0,003	0,83 \pm 0,33
D8S1805	1	0,005	0,41 \pm 0,36
D8S1705	5	0,041	0,37 \pm 0,39
D8S1757	8	0,003	0,42 \pm 0,35

Примечание, r - вероятность ошибки для одностороннего варианта точного критерия Фишера; 5 - мера неравновесности сцепления аллелей полиморфных маркеров с локусом заболевания; ДИ - доверительный интервал.

Таким образом, наиболее вероятным представляется следующий гаплотип основателя: D8S279-D8S1776 - D8S286 - D8S551 - D8S548 - D8S1805-D8S1705-D8S1757: 9-2-8-13-3-1-5-8. Интересно, что в данном случае неравновесие по сцеплению определенных аллелей исследованных маркеров, как и достоверная ассоциация этих аллелей с локусом HMCH-IVA, наблюдается на довольно продолжительном расстоянии от мутации: 3,54 и 2,28 cM соответственно в сторону центра- и теломеры. Это

может быть связано с относительно небольшим возрастом эффекта основателя в популяции.

При расчете «возраста» мутации использовали значения неравновесия по сцеплению для маркеров D8S279, D8S1805, D8S1705 и D8S1757, для аллелей которых наблюдалась достоверная ассоциация с локусом HMCH-IVA и мера неравновесности сцепления аллеля данного маркера 8 с заболеванием лежала в пределах 0,20-0,50 (табл. 5).

Среднюю продолжительность одного поколения принимали равной 30 годам, соответственно, время, за которое была накоплена мутация, составляет около (1 000 \pm 610) лет. Учитывая, что средний год рождения больных 1990-й, период начала распространения мутации IX-XI вв., что соответствует историческим сведениям о заселении славянскими народами территории Центральной России.

Таким образом, доля мутаций гена *GDAP1* у больных наследственными аксонопатиями составляет 8%. Выявлена мутация Leu239Phe, которая в гомозиготном или компаунд-гетерозиготном состоянии является причиной заболевания в 5 из 6 семей выборки с мутациями гена *GDAP1*. Высокая частота этой мутации позволяет оптимизировать ДНК-диагностику HMCH IVA типа.

Среди 6 семей с предположительно аутосомно-рецессивным типом наследования (кровно-родственный брак или двое больных детей у клинически здоровых родителей) мутация Leu239Phe явилась причиной заболевания в трех семьях. Таким образом, исследование одной этой мутации позволяет выявить причину заболевания не менее чем у 50% семей с HMCH-V. Среди изолированных 36 случаев данная мутация явилась причиной HMCH у двух пробандов.

Установлено, что причиной столь высокой частоты этой мутации является эффект основателя, и «возраст» этой мутации оценен в (1 000 \pm 610) лет.

Данная работа частично поддержана грантом Президента РФ НШ-5736.2006.7.

Таблица 4

Гаплотипы хромосом с мутацией Leu239Phe

Маркер	D8S279	D8S1776	D8S286	D8S551	C.7150T	D8S548	D8S1805	D8D1705	D8S1757
net	0,88	0,65	0,82	0,66		0,74	0,75	0,84	0,79
т.п.н.	73 151	73 667	75 244	75 371	75 439	75 821	78 257	80 408	81 202
cM	91,46	92,58	94,61			95,15	95,15	96,21	97,28
552 ¹	5	3	8	13	T	3	4	7	8
294 ¹	5	3	8	13	T	3	1	5	8
558	7	6	8	13	T	3	4	5	12
552 ²	7	1	8	12(1)	T	3	1	6	7
374 ¹	1	2	8	13	T	3	2	6	7
374 ²	9	2	8	13	T	3	1	3	1
294 ²	9	2	8	13	T	3	1	5	8
312	3	2	8	13	T	2(!)	1	5	8

Примечание. Жирным шрифтом выделена сохраненная часть гаплотипа основателя; знаком (!) обозначены мутантные аллели.

Таблица 5

Число поколений, прошедших с момента распространения мутации Leu239Phe

Маркер	g
D8S279	66,95
D8S1805	31,77
D8S1705	20,06
D8S1757	14,63
Среднее значение	33,35 \pm 20,36

Примечание, g - число поколений.

Литература

- <http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/time/hmsn.html>. Neuromuscular Disease Center.
- Vallat J.M., Grid D., Magdelaine C. et al. Autosomal recessive forms of Charcot-Marie-Tooth disease // Curr. Neurol. Neurosci. Rep. 2004. № 4 (5). P. 413-419.
- Kalaydjieva L., Hallmayer J., Chandler D. et al. Gene mapping in Gypsies identifies a novel demyelinating neuropathy on chromosome 8q24 // Nat. Genet. 1996. V. 14 (2). P. 214-217.
- Nelis E., Erdem S., Van Den Bergh P.Y. et al. Mutations in *GDAP1*: autosomal recessive CMT with demyelination and axonopathy // Neurology. 2002. V. 59 (12). P. 1865-1872.

5. Birouk N., Azzedine I., Dubourg O. et al. Phenotypical features of a Moroccan family with autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease associated with the S194X mutation in the *GDAP1* gene // Arch. Neurol. 2003. V. 60 (4). P. 598-604.
6. Claramunt R., Pedrola L., Sevilla T. et al. Genetics of Charcot-Marie-Tooth disease type 4A: mutations, inheritance, phenotypic variability, and founder effect // J. Med. Genet. 2005. V. 42 (4) P. 358-365.
7. De Sandre-Giovannoli A., Chaouch M., Boccaccio I. et al. Phenotypic and genetic exploration of severe demyelinating and secondary axonal neuropathies resulting from *GDAP1* nonsense and splicing mutations // J. Med. Genet. 2003. V. 40 (7). P. e87.
8. [http:// www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/DataSource/](http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/DataSource/) Mut ByGene.cfm. CMT mutation data base.
9. Stojkovic T., Latour P., Viet G. et al. Vocal cord and diaphragm paralysis, as clinical features of a French family with autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease, associated with a new mutation in the *GDAP1* gene // Neuromuscul. Disord. 2004. V. 14 (4). P. 261-264.
10. Marco A., Cuesta A., Pedrola L. et al. Evolutionary and structural analyses of *GDAP1*, involved in Charcot-Marie-Tooth disease, characterize a novel class of glutathione transferase-related genes // Mol. Biol. Evol. 2004. V. 21 (1). P. 176-187.
11. Niemann A., Ruegg M., La Padula V. et al. Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease // J. Cell Biol. 2005. V. 170(7). P. 1067-1078.
12. Pedrola L., Espert A., Wu X. et al. *GDAP1*, the protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4A, is expressed in neurons and is associated with mitochondria // Hum. Mol. Genet. 2005. V. 14 (8). P. 1087-1094.
13. Cuesta A., Pedrola L., Sevilla T. et al. The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease // Nat. Genet. 2002. V. 30 (1). P. 22-25.
14. Bengtsson B.O., Thomson G. Measuring the strength of associations between HLA antigens and diseases // Tissue Antigens. 1981. V. 18 (5). P. 356-363.
15. Levin M.L., Bertell R. RE: «simple estimation of population attributable risk from case-control studies» // Am. J. Epidemiol. 1978. V. 108 (1). P. 78-79.
16. Labuda D., Zietkiewicz E., Labuda M. The genetic clock and the age of the founder effect in growing populations: a lesson from French Canadians and Ashkenazim // Am. J. Hum. Genet. 1997. V. 61 (3). P. 768-771.
17. Risch N., de Leon D., Ozelius L. et al. Genetic analysis of idiopathic torsion dystonia in Ashkenazi Jews and their recent descent from a small founder population // Nat. Genet. 1995. V. 9(2). P. 152-159.
18. Kabzinska D., Drac H., Rowinska-Marcinska K. et al. Early onset Charcot-Marie-Tooth disease caused by a homozygous Leu239Phe mutation in the *GDAP1* gene // Acta Myol. 2006. V. 25 (1). P. 34-37.