

## КЛИНИКО-МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НАСЛЕДСТВЕННЫХ АКСОНОПАТИИ, ОБУСЛОВЛЕННЫХ НАРУШЕНИЕМ ФОРМИРОВАНИЯ ХОНДРИОМА

О.А. Щагина<sup>1</sup>, Е.Л. Дадали<sup>1</sup>, В.П. Федотов<sup>2</sup>, А.В. Поляков<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Медико-генетический научный центр РАМН, г. Москва

<sup>2</sup> Воронежский областной клинический диагностический центр, межобластная медико-генетическая консультация, г. Воронеж

Исследованиями последних лет показано, что нарушение структуры и функций митохондрий лежит в основе патогенеза ряда распространенных наследственных нейродегенеративных заболеваний, что связано с повышенной чувствительностью нервной ткани к дисбалансу энергетических процессов. Мутации в генах, белковые продукты которых участвуют в обеспечении биохимических процессов в митохондриях, являются причиной возникновения заболеваний из группы наследственных спастических параплегии, прогрессирующих мышечных дистрофий, атаксий, экстрапирамидных заболеваний [1, 2]. Установление значительной роли нарушений функционирования митохондрий в патогенезе тех или иных наследственных заболеваний имеет существенное значение, так как позволяет повысить эффективность их лечения посредством назначения специфической метаболической терапии.

В последние годы идентифицировано три генетических варианта наследственных моторно-сенсорных нейропатий (НМСН), обусловленных мутациями в генах, белковые продукты которых вносят существенный вклад в формирование структуры и функционирование хондриома (разветвленных митохондриальных сетей) аксонов периферических нервов. Один из этих генов - *MFN2* (1p35-36) - приводит к возникновению НМСН IIA2 типа [3], второй - *GDAP1* (8q21.1) обуславливает возникновение НМСН IVA типа [4] и третий, *DNM2* (19p12), приводит к возникновению редкого промежуточного варианта аксонопатии - НМСН ДП 1В [5]. Белковые продукты этих генов регулируют слияние и разделение митохондрий в процессе формирования хондриома [5].

Клинические проявления отдельных генетических вариантов имеют значительное сходство. Все это затрудняет диагностический этап медико-генетического консультирования и обуславливает необходимость проведения анализа частот встречаемости и особенностей клинических проявлений различных генетических вариантов НМСН [7, 8]. В последние несколько лет в ряде популяций проведены исследования, направленные на изучение частоты и спектра мутаций в генах белков, обеспечивающих формирование митохондриальных сетей. Показано, что эти генетические варианты составляют существенную долю в структуре наследственных аксонопатий в группах больных ряда европейских стран [9-11], однако в выборке больных, проживающих на территории РФ, такого рода исследования не проводились.

### 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 «DIAfom DNA Prep № 2» («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».

Для выявления изменений нуклеотидной последовательности генов *MFN2*, *GDAP1* и *DNM2* 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>).

### Результаты и обсуждение

В результате проведенного исследования выборки больных с наследственной аксонопатией оценена доля генетических вариантов, обусловленных мутациями генов, белки которых обеспечивают поддержание структуры хондриома. Показано, что на долю мутаций гена *MFN2*, ответственного за возникновение НМСН MA типа приходится 17% случаев заболевания, мутации гена *GDAP1* являются причиной наследственных аксонопатий в 8% семей. Доля мутаций этих генов была существенно выше в семьях с подтвержденным аутосомно-доминантным (AD) или аутосомно-рецессивным (AR) типом наследования заболевания и составила 25 и 40% соответственно. Мутаций гена *DNM2* в исследованной выборке не выявлено (рис. 1). Полученные результаты соответствуют литературным данным о частотах встречаемости изученных генетических вариантов.

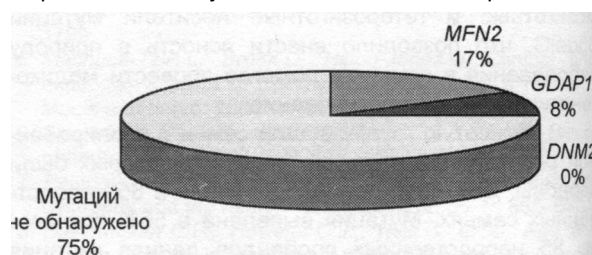


Рис. 1. Доли мутаций генов *MFN2*, *DNM2*, *GDAP1* в выборке российских больных

В гене *MFN2*, мутации которого ответственны за НМСН-IA, обнаружено шесть различных миссенс-мутаций в 12 семьях, четыре из которых - Thr206Ile (C.6170T), Arg94Trp (C.2800T), Val705Ile (c.2113G>A)

и Arg94Gln (с.281G>A) - были описаны ранее, а две мутации - Ser249Cys (С.7450G) и Leu724Pro (с.2171С>Т) - идентифицированы впервые. Одна из мутаций - Arg94Trp - выявлена в двух неродственных семьях, другая - Arg94Gln - в пяти, мутация Thr206Ile - в двух семьях, остальные мутации обнаружены у единичных больных выборки.

Чтобы установить природу высокой частоты мутации Arg94Gln, был проведен анализ гаплотипов хромосом с данной мутацией, используя как микросателлитные маркеры, лежащие вблизи гена *MFN2*, так и внутригенные однонуклеотидные полиморфизмы (SNP).

По четырем микросателлитным маркерам - D1S2667-CA2120-D1S434-D1S228 - неравновесия по сцеплению с каким-либо из аллелей выявлено не было. По внутригенным однонуклеотидным полиморфизмам, на хромосомах, несущих мутацию Arg94Gln, в 4 семьях был обнаружен общий гаплотип: rs2236055-rs3766744-rs873457-rs2236058: G-G-C-G. При сравнении частот гаплотипа rs2236055-rs3766744-rs873457-rs2236058: G-G-C-G на хромосомах с мутацией Arg94Gln и хромосомах здоровых людей достоверных отличий выявлено не было ( $p = 0,36$ ). Действительно, данный гаплотип является наиболее частым, и его частота в популяции составила 49%. Таким образом, высокая частота данного гаплотипа на хромосомах с мутацией является не следствием эффекта основателя, а отражает ассоциации, существующие между аллелями изученных SNP в популяции.

Исходя из полученных данных по анализу гаплотипов, имеющихся в литературе описаний случаев возникновения мутации Arg94Gln *de novo* [12] и того, что еще в двух семьях выборки причиной заболевания явилась мутация Arg94Trp того же кодона, сделан вывод, что в гене *MFN2* имеется «горячая» точка в кодоне 94, мутации в котором являются причиной НМСН-ІА у 58% больных, проживающих на территории РФ.

Проведено исследование всех экзонов гена *DNM2* у всех больных выборки. Кроме описанных ранее полиморфизмов было обнаружено два изменения нуклеотидной последовательности. В интроне 16 у трех пробандов выборки была выявлена вставка одного нуклеотида с.1881+31insC, не описанная как полиморфизм, в гетерозиготном состоянии. Исследование

методом SSCP-анализа 50 здоровых неродственных доноров (100 хромосом) из различных регионов РФ выявило трех гетерозиготных и одного гомозиготного носителя инсерции. Таким образом, вставка нуклеотида с.1881+31insC является полиморфным вариантом, аллельная частота которого составляет 5%.

В экзоне 8 у одного пробанда была выявлена замена С.1077ОТ (Gly359Gly), не приводящая к замене аминокислоты. Была подобрана эндонуклеаза рестрикции *Hin6I*, режущая нормальную последовательность, и проведено исследование 200 неродственных доноров (400 хромосом) из различных регионов России. Ни у одного из контролей данной замены выявлено не было. Замена С.1077ОТ не изменяет вероятность сайтов сплайсинга. Из полученных данных нельзя сделать однозначного вывода о том, является ли эта замена очень редким полиморфизмом или причиной заболевания в данной семье.

В результате исследования всей кодирующей последовательности гена *GDAP1* были выявлены мутации у девяти больных из шести неродственных семей. В трех семьях у пробандов была выявлена ранее описанная рядом авторов мутация Leu239Phe (с.715С>Т) экзона 6 в гомозиготном состоянии, еще у двух больных эта мутация была выявлена в гетерозиготном состоянии. Таким образом, мутация Leu239Phe (с.715С>Т) в гомозиготном или компаунд-гетерозиготном состоянии явилась причиной заболевания в пяти из шести семей с НМСН ІА, что позволяет рекомендовать первоочередное исследование этой мутации гена *GDAP1*. Кроме того, были выявлены две ранее не описанные мутации Pro153Leu и Arg257Stop.

Выявление «горячей» точки гена *MFN2* и частой мутации гена *GDAP1* представляет уникальную возможность для оптимизации ДНК-диагностики этих форм аксонопатий.

Были проанализированы клинические проявления в группах 24 больных из 10 неродственных семей с мутациями в гене *MFN2* и у 9 больных (4 мужского и 5 женского пола) в возрасте от 9 до 34 лет с НМСН-ІА, обусловленной мутацией в гене *GDAP1*.

При сравнении анализируемых групп больных с выявленными мутациями генов *MFN2* и *GDAP1* обнаружены клинические признаки, достоверно чаще встречающиеся в одной из двух групп больных (таблица).

Таблица 1

Сравнительные данные о частотах встречаемости клинических признаков в группах больных с мутациями в генах *MFN2* и *GDAP1*

Признак	Ген		P
	<i>MFN2</i>	<i>GDAP1</i>	
	Число исследованных больных		
	24	9	
Возраст манифестации, лет	9,3 ± 5,7 (2-27)	2,9 ± 1,6 (1-5)	
Снижение (отсутствие) ахиллова рефлекса, %	100	100	1
Снижение (отсутствие) коленного рефлекса*, %	58	100	0,032
Снижение (отсутствие) карпорадиального рефлекса, %	92	100	1
Снижение (отсутствие) рефлекса с двуглавой мышцы*, %	38	100	<0,001
Тремор пальцев кистей*, %	75	0	<0,001
Координаторные расстройства, %	71	100	0,15
Деформация стоп, %	100	100	1
Деформация кистей*, %	63	100	0,039
Поверхностная гипестезия в руках, %	50	67	0,46
Поверхностная гипестезия в ногах, %	50	67	0,46
Расстройства глубиной чувствительности*, %	25	100	<0,001
СПИ п. medianus, м/с	53,6 ± 8,2 (41,6-66,8)	44,7 ± 7,4 (32,0-54,0)	-

Примечание, p - вероятность ошибки для одностороннего варианта точного критерия Фишера; \* - клинические признаки, для которых выявлены статистически достоверные различия в двух группах больных.

Как видно из таблицы, в двух анализируемых группах больных выявлены достоверные различия частот встречаемости 5 из 13 анализируемых признаков. Такие признаки, как снижение (отсутствие) коленного рефлекса, рефлекса с двуглавой мышцей, тремор пальцев, деформация кисти, расстройство глубокой чувствительности, встречаются достоверно чаще среди больных с мутациями в гене *GDAP1*. Для этой же группы больных характерен ранний (1-5 лет) возраст манифестации заболевания, хотя и у нескольких больных с НМСН-IIA заболевание манифестировало до 5 лет.

По электронейромиографическому критерию - СПИ по срединному нерву - группы больных не различаются, в обеих группах наблюдается аксональный уровень поражения. СПИ по срединному нерву в большинстве случаев соответствовала нормальным значениям или имела промежуточные значения.

На основании результатов собственных исследований и обобщения литературных данных о частоте встречаемости и особенностях клинических проявлений наследственных аксонопатий с АД- и АР-типами наследования разработаны алгоритмы молекулярно-генетического обследования семейных и изолированных случаев этой группы заболеваний. Предложенные алгоритмы представлены на рис. 2, 3.

Классическая клиническая картина периферической полинейропатии характерна для трех генетиче-

ских вариантов наследственных аксонопатий с АД-типом наследования - НМСН-IIA, НМСН-IIЕ и НМСН-IIF [13]. Поэтому очередность их молекулярно-генетического исследования может диктоваться частотой встречаемости этих вариантов в группе наследственных аксонопатий и возрастом их манифестации. Два других генетических варианта с АД-типом наследования, для которых идентифицированы гены, - НМСН-IVB и НМСН-IIID - имеют ряд характерных особенностей, отличающих их от «классического» варианта этой группы заболеваний.

Самой частой причиной аксонопатий являются мутации гена *MFN2*. В семейном случае с АД-типом наследования рекомендуется первоочередное исследование «горячей» точки гена *MFN2* - кодона 94- и в случае отсутствия в ней мутаций дальнейшее исследование всей последовательности гена *MFN2*, и лишь после исключения его как причины заболевания - исследование других генов, мутации которых приводят к клиническому фенотипу аксонопатий, исходя из размеров гена, так как для каждого из них существуют лишь единичные описания мутаций.

В случае АР-типа наследования заболевания или при подозрении на него (кровно-родственный брак) рекомендуется поиск мутаций в гене *GDAP1* с первоочередным анализом мутации Leu239Phe, которая в соответствии с результатами данного исследования является причиной не менее 40% НМСН с АР-типом наследования.

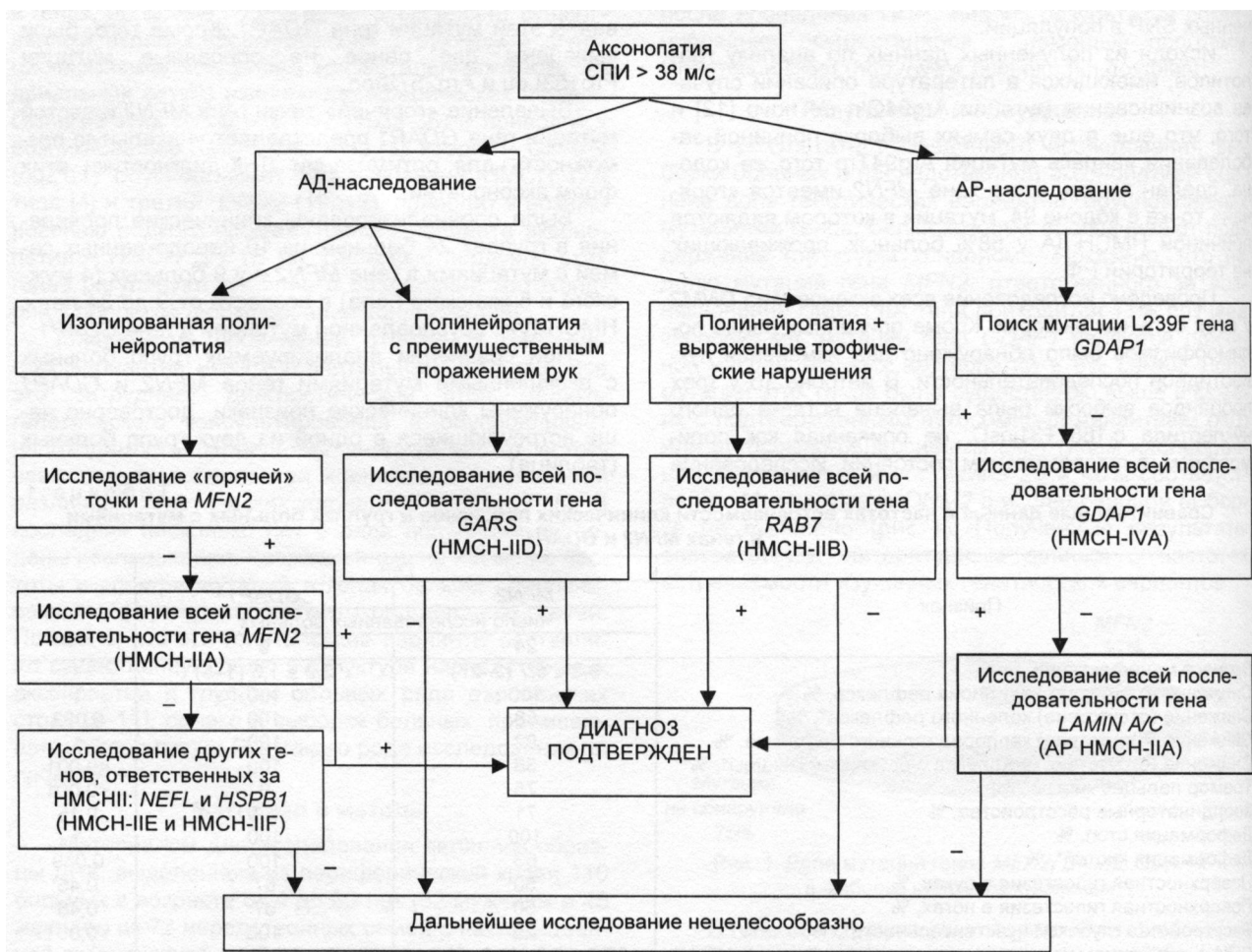


Рис. 2. Алгоритм молекулярно-генетической диагностики семейных случаев наследственных аксонопатий:  
«+» - мутация найдена; «-» - мутация не обнаружена

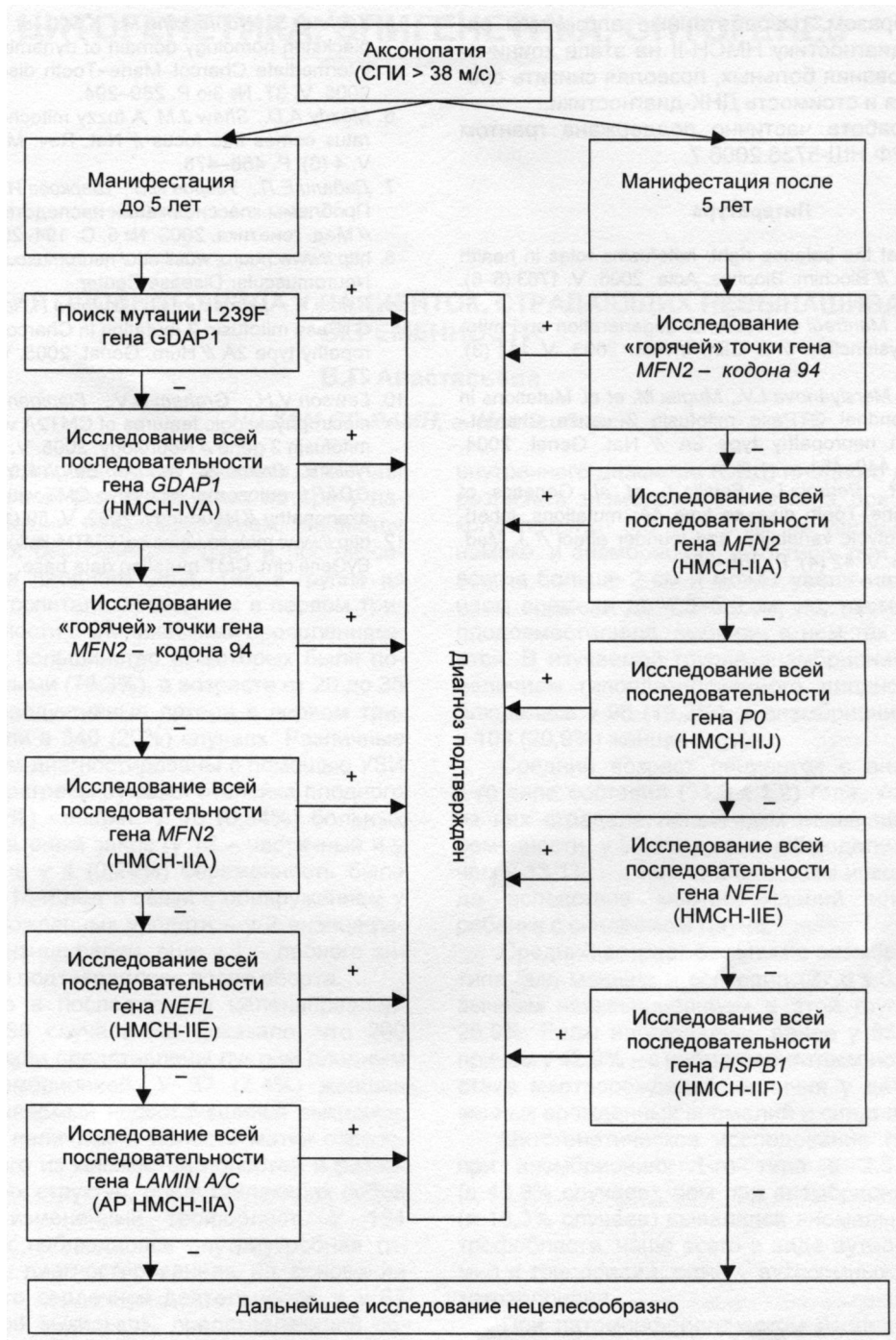


Рис. 3. Алгоритм молекулярно-генетической диагностики изолированных случаев наследственных аксонопатий: «+» - мутация найдена; «-» - мутация не обнаружена

Анализ литературных данных показал, что к настоящему времени идентифицированы гены лишь двух вариантов наследственных аксонопатий с АР-типом наследования, следовательно, молекулярно-генетическая диагностика АР-форм аксонопатий может ограничиться поиском мутаций в генах *GDAP1* и *Lamin A/C* (см. рис. 2).

Наибольшую сложность представляет создание алгоритма молекулярно-генетической диагностики в семьях с единственным больным. В этих случаях ориентиром могут служить возраст манифестации и тяжесть клинического течения (см. рис. 3). Так, в случае манифестации заболевания до 5 лет и быст-

рого прогрессирования заболевания целесообразно начинать диагностический поиск с исследования гена *GDAP1*, при отсутствии мутаций в этом гене идентификация генетического варианта может быть продолжена и направлена на анализ мутаций в гене *MFN2*, так как у небольшой части больных с ИА-типом отмечалось раннее начало и злокачественное течение заболевания.

В случае более поздней манифестации заболевания целесообразно проводить исследование трех генов: *MFN2*, *MPZ*, *NEFL*, *HSPB1*, последовательность исследования которых диктуется частотой встречаемости НМСН-ИА, НМСН-IIJ, НМСН-HE и НМСН-IIF.

Таким образом, разработанные алгоритмы оптимизируют диагностику НМСН-II на этапе клинического обследования больных, позволяя снизить сроки проведения и стоимость ДНК-диагностики.

Данная работа частично поддержана грантом Президента РФ НШ-5736.2006.7.

#### Литература

1. Santel A. Get the balance right: mitofusins roles in health and disease // *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. V. 1763 (5-6). P. 490-499.
2. Schon E.A., Manfredi G. Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction // *J. Clin. Invest.* 2003. V. 111 (3). P. 303-312.
3. Zuchner S., Mersiyanova I.V., Muglia M. et al. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A // *Nat. Genet.* 2004. V. 36 (5). P. 449-451.
4. 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.
5. Zuchner S., Noureddine M., K.M.L. et al. Mutations in the pleckstrin homology domain of dynamin 2 cause dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth disease // *Nat. Genet.* 2005. V. 37. № 3 P. 289-294.
6. Mozdy A.D., Shaw J.M. A fuzzy mitochondrial fusion apparatus comes into focus // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2003. V. 4 (6). P. 468-478.
7. Дадали Е.Л., Угаров И.В., Шаркова И.В., Кириленко Н.Б. Проблемы классификации наследственных нейропатий // *Мед. генетика.* 2003. № 5. С. 194-200.
8. <http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/time/hmsn.html>. Neuromuscular Disease Center.
9. Kijima K., Numakura C, Izumino H. et al. Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutation in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A // *Hum. Genet.* 2005. V. 116 (1-2). P. 23-27.
10. Lawson V.H., Graham B.V., Flanigan K.M. Clinical and electrophysiologic features of CMT2A with mutations in the mitofusin 2 gene // *Neurology.* 2005. V. 65 (2). P. 197-204.
11. 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.
12. <http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/DataSource/Mut-ByGene.cfm>. CMT mutation data base.