

# Исследование гена *GJB1* в выборке российских больных с наследственной моторно-сенсорной нейропатией типа I

Тибуркова Т.Б.<sup>1</sup>, Шагина О.А.<sup>1</sup>, Дадали Е.Л.<sup>1</sup>, Руденская Г.Е.<sup>1</sup>  
Федотов В.П.<sup>2</sup>, Бабушкина Н.П.<sup>3</sup>, Поляков А.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> — Медико-генетический научный центр РАМН,

Москва, 115478, ул.Москворечье, 1, факс: 324-81-10, e-mail: dnalab@rol.ru

<sup>2</sup> — Воронежский областной клинический диагностический центр. Межобластная медико-генетическая консультация

<sup>3</sup> - ГУ НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН.

Россия, 634050, г.Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10

Наследственная моторно-сенсорная нейропатия (НМСН), или болезнь Шарко-Мари-Тута, - медленно прогрессирующее заболевание периферической нервной системы. Нами была исследована выборка из 283 российских семей с клиническими и электронейромиографическими признаками НМСН типа I. В ходе исследования был определен вклад мутаций в гене *GJB1* в общее число случаев НМСН типа I. Описаны новые мутации в гене *GJB1*. Выявлены семьи с повторяющимися мутациями и исследована природа распространения мутаций.

Ключевые слова: наследственная моторно-сенсорная нейропатия (НМСН), ген *GJB1*, эффект основателя

## Введение

НМСН, или болезнь Шарко—Мари—Тута, — это обширная группа генетически гетерогенных наследственных заболеваний периферической нервной системы [9]. Описаны все типы наследования НМСН: аутосомно-доминантный, аутосомно-рецессивный и X-сцепленный. Наиболее часто встречается аутосомно-доминантное наследование. Несмотря на такое разнообразие, у больных с различными типами НМСН наблюдается общность клинических проявлений: прогрессирующая слабость и атрофия дистальных мышц конечностей, снижение сухожильных рефлексов, снижение всех видов чувствительности, деформация стопы и кисти по типу «обезьяньей лапы», характерные изменения походки («степпаж») [12].

Все моторно-сенсорные нейропатии в настоящее время по электронейромиографическим и морфологическим признакам принято разделять на два основных типа:

1) демиелинизирующий (НМСН I), характеризуемый снижением скорости проведения импульса (СПИ) по срединному нерву [2];

2) аксональный вариант (НМСН II), характеризуемый нормальной или несколько сниженной СПИ по срединному нерву [2].

Величина СПИ, равная 38 м/с, определяемая по двигательной компоненте срединного нерва, считается условной границей между НМСН I (СПИ < 38 м/с) и НМСН II (СПИ > 38 м/с) [1]. Однако описаны семьи, у пораженных членов которых наблюдалась значительная вариабельность этого параметра (от 25 до 45 м/с), в по-

следние годы предложено выделять промежуточный вариант НМСН [2].

Частота встречаемости всех типов НМСН варьирует от 1:10000 до 1:2500 населения в различных популяциях и является одной из самых высоких среди всех наследственных заболеваний нервной системы [1]. У 10—20% больных диагностируется X-сцепленная форма НМСН, более 90% случаев которой приходится на НМСН типа IX [13].

Причиной НМСН IX являются мутации в гене *GJB1* [23], локализованном на длинном плече X-хромосомы (Xq13.1). К настоящему моменту идентифицировано более 300 различных мутаций в гене *GJB1* [25]. Основной тип мутаций — точковые: миссенс- и нонсенс-. В редких случаях выявляются мутации со сдвигом рамки считывания. Продуктом гена является белок межклеточных контактов коннексин 32, который экспрессируется практически во всех тканях организма [26]. В нервной системе этот белок локализуется в некомпактном миелине в области контактов между соседними шванновскими клетками — перехватах Ранвье, а также в олигодендроцитах центральной нервной системы [15].

Коннексин 32 имеет доменную структуру и содержит 4 трансмембранных домена (TM1—TM4), одну цитоплазматическую (IC) и две экстрацеллюлярные (EC1 и EC2) петли, а также N- и C-концы, обращенные в цитоплазму [8, 23] (рис. 1). Шесть коннексиновых субъединиц образуют коннексон [18]. Два коннексона, расположенных на цитоплазматических мембранах двух соседних клеток, образуют межклеточный канал [18] (рис. 2). Основной функцией такого глиального канала является осуществление контактов между соседними шванновскими клетками, обеспечивающих сальтаторный харак-

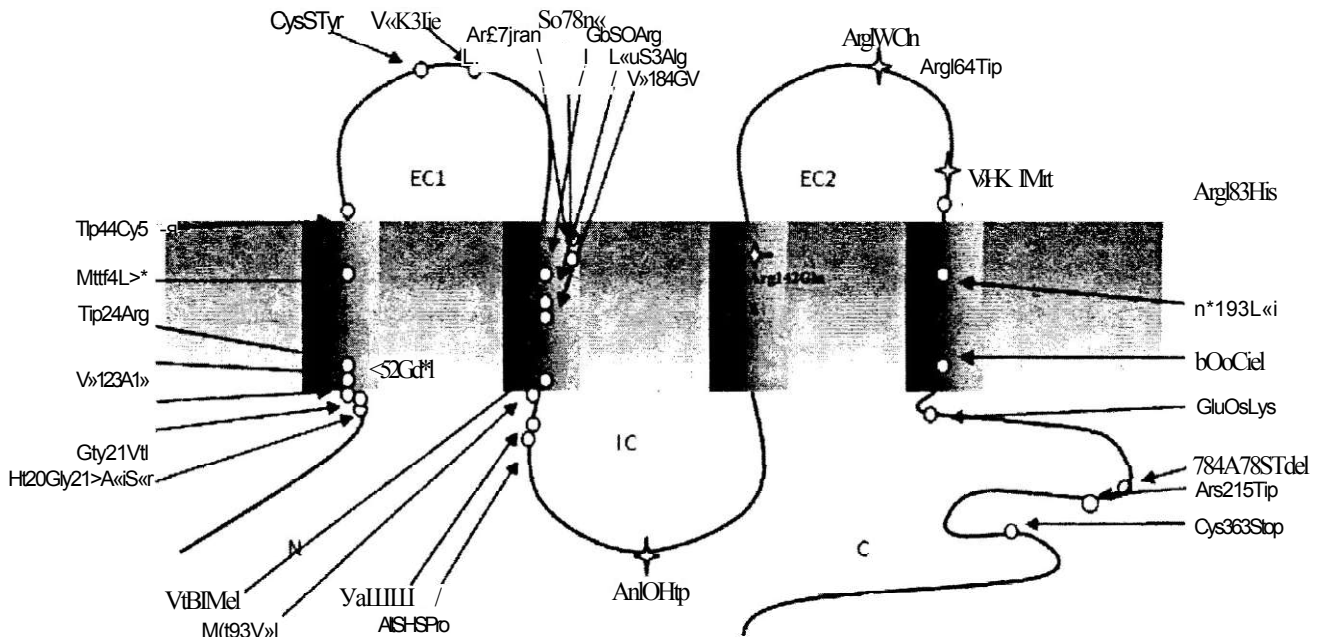


Рис. 1. Схематическое изображение белка коннексина: мутации, найденные в ходе исследования. Звездочкой выделены повторяющиеся мутации

тер проведения возбуждения по периферическому нерву, а также мембранный транспорт ионов и соединений с молекулярной массой до 1 кДа [8, 23]. Функционирование канала обеспечивает скорость и синхронность проведения электрических импульсов [2].

**Материалы и методы исследования**

База лаборатории ДНК-диагностики МГНЦ РАМН насчитывает 765 семей с НМСН.

Исходя из диагностических критериев, утвержденных на 53-м Международном семинаре Европейского нейромышечного центра, была сформирована выборка больных с диагнозом *НМСН тина I*. Всем больным и членам их семей проведено электронейромиографическое исследование, по результатам которого было отобрано 283 семьи с диагнозом *НМСН тина I* (79 семейных и 204 изолированных случая). В выборку вошли семьи, где хотя бы у одного из членов СПИ по срединному нерву была меньше 38 м/с. Таким образом, диапазон СПИ у больных в исследованной выборке был от 0 м/с до 52 м/с. Для всех семей был проведен поиск наиболее частой при этой форме заболевания мутации — дупликации в области короткого плеча хромосомы 17 (17p11.2-p.12).

В 145 семьях, где не была выявлена дупликация и данные генеалогического анализа не противоречили Х-сцепленному типу наследования, был проведен поиск мутаций в гене *GJB1*. В качестве группы сравнения использовались образцы ДНК, выделенной из крови 152 здоровых доноров, проживающих на территории различных регионов РФ.

Выделение геномной ДНК из лейкоцитов периферической крови было выполнено с помощью стандартного набора реактивов для выделения *DIAtom™ DNA VerIOO* (Isogene Lab. ltd., Россия) по протоколу производителя.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на программируемом термоциклере *MC2* производства фирмы «ДНК-технология» (Россия) с использованием ДНК-полимеразы *Biotaq* («Биомастер») в объеме 25 мкл реакционной смеси.

Поиск мутаций осуществлялся методом прямого автоматического секвенирования по Сенгеру как с прямо-

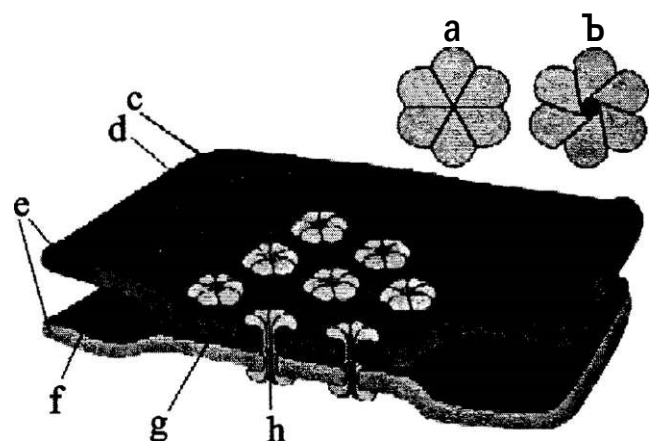


Рис. 2. Строение коннексона и межклеточного канала ([http://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%97%D0%BE%D0%B1%D1%80%D0%B0%D0%B6%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D1%8F:Gap\\_cellJunction%2C\\_LangNeutral.svg](http://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%97%D0%BE%D0%B1%D1%80%D0%B0%D0%B6%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D1%8F:Gap_cellJunction%2C_LangNeutral.svg)): а — закрытое состояние канала; б — открытое состояние канала; с — коннексон; d — коннексин-мономер; е — плазматическая мембрана; f — перехват Ранвье; g — щель 2-4 нм; h — гидрофильный канал

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

го, так и с обратного праймеров на приборе ABI Prism 3100 (Applied Biosystems) с использованием протокола фирмы-производителя. В качестве матрицы для секвенирования использовали фрагменты ДНК, полученные после проведения ПЦР с использованием оригинальных олигонуклеотидных праймеров (табл. 1), которые синтезировались в НПФ «Литех» или НПО «SYNTOL».

Анализ результатов секвенирования осуществлялся с помощью программ Chromas и BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Для построения гаплотипов хромосом с повторяющимися мутациями были использованы 10 высокополиморфных микросателлитных маркеров, расположенных в интервале 3,8 сМ (6 млн п.н.) в стороны теломеры и центромеры от гена *GJB1*: DXS8040, DXS1216, DXS8111, DXS1275, DXS983, DXS8107, DXS8052, DXS6743, DXS8070 и DXS8060 (<http://www.gdb.org/gdb/>).

Анализ производился методом ПЦР-ПДАФ с использованием оригинальных праймеров (табл. 2).

Аmplификацию всех исследуемых фрагментов ДНК проводили методом ПЦР в объеме 25 мкл реакционной смеси следующего состава:

- 1х реакционный буфер (67 мМ Tris-HCl (pH 8.8), 16,6 мМ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,01% Twin-20);
- по 200 мкМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата («Prom^ga»);
- 0,25 мкМ каждого праймера;
- 0,1 — 1,0 мкг геномной ДНК;
- единица термостабильной ДНК-полимеразы Bio-*taq* («БиоМастер»);
- 20—30 мкл минерального масла.

Концентрация  $\text{MgCl}_2$  в 1х реакционном буфере и температура отжига подбирались индивидуально (табл. 1, 2). ПЦР проводили на программируемом термоджеле *MC2* производства фирмы «ДНК-технология» со следующими параметрами:

- первоначальная денатурация — 95°C — 5 мин;
- 28-30 циклов: 94°C - 45 с; 58°C - 45 с; 72°C - 45 с;
- финальная достройка — 72°C — 7 мин.

Таблица 1  
Праймеры и условия амплификации, применявшиеся для анализа последовательности гена *GJB1*

Фрагмент	Последовательность праймеров, 5'→3'	Длина, п.н.	t отжига, °C	[MgCl <sub>2</sub> ], мМ
<i>GJB1</i> promoter	F: GTTAGCCTTTGCTTTCTACAGAC R: GACCCCGTTTGAGTTGTTCCGG	800	62	4,0
<i>GJB1</i> Ex1	F: CACAAAGGTCTCATTGTGCAGA R: GACCCCGTTTGAGTTGTTCCGG	200	62	4,0
<i>GJB1</i> Ex2	F: TGCGCAGGCAGTGCTATGGC R: CCTCCAACGGACCATACACC	940	65	3,6

Таблица 2  
Праймеры и условия амплификации, применявшиеся для анализа гаплотипов мутантных хромосом

Фрагмент	Координата, т.п.н.	Последовательность праймеров, 5'→3'	Длина, п.н.	t отжига, °C	[MgCl <sub>2</sub> ], мМ
DXS8040	68163	F: TTTCTCCATGACCCCGAGTCAC R: CCTCTAGACATCCGACTAAACTG	105-129	60	3,6
DXS1216	68281	F: GGAGATTAGATTCTTTTCAGTGAC R: ACGGGTAGACAAATCTTAAATAACG	172-186	60	3,6
DXS8111	68410	F: GTAGGAACAATAAGTTATGCCTTGC R: CGCAAAGGATTGTCACGGTTAGT	146-156	60	3,6
DXS1275	68431	F: GTCCTCAATAAACATTTGTTAAGTATG R: ACAAGGTCTGGAAGGCTGTGC	134-150	55	4,0
DXS983	69365	F: CTGCATTAATCCTCGATCTTTGC R: CGI I I IGTTAACCTACTTAAGTACG	113-125	60	3,6
DXS8107	69638	F: GAAGAACGTATTACATAGAACCTTC R: GCCACACGACAAGTTCAACAG	113-143	60	3,6
DXS8052	69730	h: CI ICI II IAAI IGUAACAGUCIGIG R: GAAC TGATTAACGATCCACTAATGAC	121-135	60	3,6
DXS6743	71281	F: CAGTCTTGCCGTTGCTATGGC R: CTTGGATTTACCGI I I I ICATCGG	94-104	60	4,0
DXS8070	72572	F: GCTTCACAGCTGGTACAGGTAC R: AAAACAGGTTTTATCTTTATCGTTGG	148-152	60	3,6
DXS8060	73381	F: CACAGCCATGTCCTAGCATAGG R: CAAACCAAACCTGTTAGTGACCTG	117-129	53	4,0

Для статистической обработки данных применялись пакеты программ Statistica 6.0 фирмы StatSoft Inc (США).

Для статистической оценки достоверности различия распределений аллелей исследованных маркеров в выборке хромосом больных данным заболеванием и контрольной выборке использовался критерий Фишера. Точный уровень значимости  $\alpha$  определяется по формуле:

$$\alpha = \begin{cases} 1 - \sum_{i=i_0}^{i_1} P(i) & \text{если } p_1 < p_2 \\ \sum_{i=i_1}^{i_2} P(i) & \text{если } p_1 > p_2, \end{cases}$$

где  $P(i) = \frac{N! \cdot n! \cdot (N-n)!}{i! \cdot (n-i)! \cdot (N-i)! \cdot (N-n+i)!}$ ;

$i_1 = \max\{0, n-N_2\}$ ,  $i_2 = \min\{n, N_1\}$ ;

$i_0$  — номер, начиная с которого  $P(i) < P(n_i)$  ( $i < i_0$  для  $P_1 > P_2$  и  $i > i_0$  для  $P_1 < P_2$ ) [45].

### Результаты исследования

В результате исследования было выявлено 35 различных мутаций в 48 семьях (94 чел.) (табл. 3). Это составило 17% всех семей с НМСН типа I. Подавляющее большинство мутаций (94%) локализовано в кодирующей части гена (в области второго экзона) и лишь в двух семьях (6%) обнаружены мутации в сайтах сплайсинга на границах Ib интрона. Большинство мутаций в гене *GJB1* (86%) являются точковыми и представляют собой однонуклеотидные замены, приводящие к изменению аминокислотной последовательности полипептидной цепи. Наиболее часто встречаются миссенс-мутации, которые идентифицированы у 80% больных. На долю нонсенс-мутаций приходится 6% от всех обнаруженных мутаций в гене *GJB1*. В 9% случаев выявлены делеции, не кратные трем нуклеотидам, приводящие к сдвигу рамки считывания (табл. 4).

Большинство идентифицированных мутаций было описано ранее, но некоторые мутации выявлены в ходе исследования впервые (табл. 3): мутации сайта сплайсинга с.-371T>C и с.-17G>A, локализованные в некодирующей области гена *GJB1* и приводящие к возникновению нового акцепторного сайта сплайсинга; нонсенс-мутация (с.849C>A) и мутации со сдвигом рамки считывания (с.62Gdel, с.606Cdel и с.784A785Tdel), результатом которых является синтез укороченного функционально неполноценного белка. Также впервые описаны 7 миссенс-мутаций: с.62G>T, с.70T>C, с.135G>C, с.158G>A, с.233C>T, с.251T>G и с.286G>C.

Большинство мутаций у больных с НМСН типа IX в исследованной выборке локализовано во фрагменте с 59-го по 849-й нуклеотид кодирующей последователь-

ности гена *GJB1* и приводит к изменению аминокислотной последовательности первого (24%), второго (21%), третьего (6%), четвертого (6%) трансмембранных (ТМ) доменов, первой (9%) и второй (12%) экстрацеллюлярных (ЕС) петель, интрацеллюлярной (IC) петли (9%), а также С-конца (12%) белка коннексина 32 (табл. 3, 5).

Интересно отметить, что в исследованной выборке выявлено 6 повторяющихся мутаций. Особенно интересны для нас мутации, которые встретились в трех семьях или более:

1) с.319C>T (Arg107Trp) — в трех неродственных семьях из Мордовии;

2) с.424C>T (Arg142Trp) — в четырех неродственных семьях из Воронежа, Тулы, Томска;

3) с.491G>A (Arg164Gln) — в пяти неродственных семьях из Саратова, Волгограда, Воронежа и Воронежской области;

4) с.541G>A (Val81Met) — в трех неродственных семьях из Воронежа, Самары, Кирова (табл. 3).

Высокая частота встречаемости данных мутаций может быть обусловлена либо эффектом основателя, либо наличием в гене *GJB1* «горячих» точек. Для установления причин наличия повторяющихся мутаций в гене *GJB1* были исследованы гаплотипы мутантных X-хромосом.

На хромосомах, несущих мутацию с.319C>T, в двух семьях (8 и 154) был выявлен общий гаплотип по всем исследуемым маркерам DXS8040-DXS1216-DXS8111-DXS1275-DXS983-DXS8107-DXS8052-C/£7-DXS6743-DXS8070-DXS8060: 4-3-3-1-6-3-8-T-4-3-5 повторов (табл. 6). Частота данного гаплотипа в семьях больных составляет 67%, а в популяции — 10% ( $p=0,032$ ,  $a=0,05$ ). Гаплотип семьи из Мордовии под номером 9 отличается по маркерам DXS8111, DXS1275, DXS8052, DXS6743 и DXS8060: 4-3-2-3-6-3-9-T-2-3-10 повторов.

На хромосомах с мутацией с.424C>T в двух семьях из Томска (59 и 114) был обнаружен общий предковый гаплотип по всем исследуемым маркерам DXS8040-DXS1216-DXS8111-DXS1275-DXS983-DXS8107-DXS8052-G/S7-DXS6743-DXS8070-DXS8060:

5-4-2-6-4-9-8-T-3-2-3 повтора. Частота данного гаплотипа в семьях больных составляет 50%, а в популяции подобный гаплотип в ходе нашего исследования не выявлен ( $p<0,0001$ ,  $a=0,05$ ). Для семей 135.1 (Тула) и 279.1 (Воронеж) с этой мутацией по маркерам DXS8040-DXS1216-DXS8111-DXS1275-DXS983-DXS8107-DXS8052- $\langle j/5 \rangle$ -DXS6743-DXS8070-DXS8060 были выявлены следующие гаплотипы: 3-3-2-6-6-12-3-T-3-3-2 повтора и 5-3-1-3-5-2-6-T-3-2-5 повторов соответственно (табл. 6), отличающиеся от гаплотипов семей из Томска и различные между собой, что свидетельствует о независимом происхождении мутации с.424C>T в семьях, проживающих в различных городах России.

На хромосомах, несущих мутацию с.491G>A, общий гаплотип не обнаружен (табл. 6).

Спектр мутаций в гене *GJB1* у российских больных

№	Экзон/ интрон	Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Домен белка	Количество семей	Авторы
1	Интрон 1Ь	с.-371Т>С	Мутация сайта сплайсинга	-	1	Данное исследование
2	Интрон 1Ь	с.-17 G>A	Мутация сайта сплайсинга	-	1	Данное исследование
3	2	59Т>А4 61G>A	He20Gly21 >AsnSer	ТМ1	1	[16]
4	2	62Gdel	Мутация со сдвигом рамки считывания	ТМ1	1	Данное исследование
5	2	62G>Т	Gly21Val	ТМ1	1	Данное исследование
6	2	64С>Т	Arg22Stop	ТМ1		[19]
7	2	65G>А	Arg22Gln	ТМ1	1	[3]
8	2	68Т>С	Val23Ala	ТМ1	1	[4]
9	2	70Т>С	Trp24Arg	ТМ1	1	Данное исследование
10	2	101Т>А	Met34Lys	ТМ1	1	[16]
11	2	132G>С	Trp44Cys	ЕС1	1	Данное исследование
12	2	158G>А	Cys53Tyr	ЕС1	1	Данное исследование
13	2	187G>А	Val63Ile	ЕС1	1	[3]
14	2	224G>А	Arg75Gln	ТМ2	1	[16, 20]
15	2	233С>Т	Ser78Phe	ТМ2	1	Данное исследование
16	2	239А>G	GlnSOArg	ТМ2	1	[16]
17	2	248Т>G	Leu83Arg	ТМ2	1	[24]
18	2	251Т>G	Val84Gly	ТМ2	1	Данное исследование
19	2	271G>А	Val91Met	ТМ2	1	[6]
20	2	277А>G	Met93Val	ТМ2	1	[16]
21	2	283G>А	Val95Met	1С	1	[3]
22	2	286G>С	Aia96Pro	1С	1	Данное исследование
23	2	3190Т	Arg107Trp	1С	3	[3, 16, 19]
24	2	4240Т	Arg142Trp	тмз	4	[16]
25	2	425G>А	Arg142Gln	тмз	2	[3, 6]
26	2	4900Т	Arg164Trp	ЕС2	1	[4, 6]
27	2	491 G>А	Arg164Gln	ЕС2	5	[3, 4, 6, 16]
28	2	541 G>А	Val181Met	ЕС2	3	[3]
29	2	548G>А	Arg183His	ЕС2	2	[3, 4, 16]
30	2	579С>G	Phe193Leu	ТМ4	1	[16]
31	2	606Cdel	Мутация со сдвигом рамки считывания	ТМ4	1	Данное исследование
32	2	622G>А	Glu208Lys	С	1	[16]
33	2	643С>Т	Arg215Trp	С	1	[4, 6, 19]
34	2	784А785Тdel	Мутация со сдвигом рамки считывания	С	1	Данное исследование
35	2	849С>А	Cys283Stop	С	1	Данное исследование

Таблица 4

Сравнение мутаций в гене *GJB1* у больных с НМСН типа IX в российской выборке и в общей выборке из различных популяций мира (поданным HGMD: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/alf.php>)

Тип мутации	В общей выборке, %	В российской выборке, %
Миссенс-мутации	75,9	80
Нонсенс-мутации	6,3	6
Мутации со сдвигом рамки считывания	7,9	9
Делеции и инсерции, кратные трем нуклеотидам	5,9	-
Мутации сайта сплайсинга	-	6

Таблица 5

Сравнительные данные о частоте встречаемости мутаций в гене *GJB1*, приводящих к изменениям в различных доменах белка коннексин 32

Домен белка	Доля мутаций (в общей выборке), %	Доля мутаций (данное исследование), %
N	9,4	-
TM1	11,2	24,2
EC1	10,0	9,1
TM2	12,1	21,2
1C	7,7	9,1
tm3	9,7	6,1
EC2	18,8	12,1
TM4	10,4	6,1
C	10,7	12,1
Всего	100	100

Примечание. Данные о распределении мутаций в гене *GJB1* по доменам белка коннексин 32 в общей выборке из различных популяций мира взяты с сайта: <http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/>

Таблица 6

Гаплотипы X-хромосом с повторяющимися мутациями

Мутация			с.319C>T			с.424C>T				с.491G>A					с.541G>A		
Семья			8	9	154	279.1	135.1	59 (Томск)	114 (Томск)	59.1	318.1	611.1	226.1	350.1	150.3	336	377.1
Маркер	т.п.н.	сМ															
DXS8040	68163	53,58	4	4	4	5	3	5	5	6	4	4	3	3	4	4	4
DXS1216	68281	53,58	3	3	3	3	3	4	4	2	2	2	4	4	5	5	5
DXS8111	68410	55,75	3	2	3	1	2	2	2	2	2	1	2	3	3	3	3
DXS1275	68431	55,75	1	3	1	3	6	6	6	6	3	5	3	6	7	7	7
DXS983	69365	56,29	6	6	6	5	6	4	4	5	3	6	7	5	8	1	1
DXS8107	69638	55,75	3	3	3	2	12	9	9	2	13	10	2	3	3	4	4
DXS8052	69730	55,75	8	9	8	6	3	8	8	4	2	2	2	4	7	7	7
<i>GJB1</i>	70361	55,95	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
DXS6743	71281	56,29	4	2	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4
DXS8070	72572	57,37	3	3	3	2	3	2	2	1	1	1	3	1	3	4	4
DXS8060	73381	57,37	5	10	5	5	2	3	3	6	1	4	3	3	4	4	4

Примечание. Жирным шрифтом выделены общие гаплотипы

Таблица 7

Частоты гаплотипов, сцепленных с геном *GJB1*, хромосом с повторяющимися мутациями, и в контрольной выборке

Мутация/Норма	Гаплотипы мутантных X-хромосом	Частота на хромосомах с мутациями, % (N)	Частота в контрольной выборке, % (N)	p, α=0,05
с.319C>T	4-3-3-1-6-3-8-M-4-3-5	67 (2)	10 (15)	0,032
с.424C>T	5-4-2-6-4-9-8-M-3-2-3	50 (2)	0(0)	<0,0001
с.541G>A	4-5-3-7-1-4-7-M-4-4-4	67 (2)	1 (2)	0,001

Примечание. Оценка статистической достоверности различия распределений гаплотипов X-хромосом, сцепленных с геном *GJB1*, проводилась в выборке трех хромосом с мутацией с.319C>T, четырех хромосом с мутацией с.424C>T, трех хромосом с мутацией с.541G>A и в контрольной выборке, состоящей из 152 X-хромосом необследованных мужчин. С помощью точного двустороннего критерия Фишера была статистически подтверждена достоверность неравновесия по сцеплению обозначенных в таблице гаплотипов с мутациями

На хромосомах с мутацией с.541G>A в двух семьях (336 и 377.1) был обнаружен общий гаплотип по всем исследуемым маркерам DXS8040-DXS1216-DXS8111-DXS1275-DXS983-DXS8107-DXS8052-GW-DXS6743-DXS8070-DXS8060: 4-5-3-7-1-4-7-A-4-4-4 повтора (табл. 6). Частота данного гаплотипа в семьях больных составляет 67%, а в популяции — 1% ( $p=0,001$ ,  $a=0,05$ ).

При сравнении частот гаплотипов мутантных хромосом с гаплотипами хромосом здоровых доноров было выявлено статистически достоверное неравновесие по сцеплению предковых гаплотипов с мутациями с.319C>T ( $p=0,02$ ,  $a=0,05$ ), с.541G>A ( $p<0,0001$ ,  $a=0,05$ ) и С.4240Т ( $p<0,0001$ ,  $a=0,05$ ) (табл. 7). В то же время было показано, что частота встречаемости других гаплотипов, выявленных в семьях с исследуемыми мутациями, статистически не отличается от частоты их встречаемости в популяции ( $p=0,289$ — $0,953$ ,  $a=0,05$ ).

### Обсуждение

Мутации в гене *GJB1* являются второй по частоте после дупликации в области короткого плеча хромосомы 17 причиной НМСН I у российских больных. На долю мутаций этого гена приходится 17% всех случаев НМСН I. Эти данные согласуются с данными о частотах встречаемости НМСН IX в других странах [1, 2, 11, 13, 17]. По данным итальянских и испанских ученых, мутации в гене *GJB1* являются причиной болезни в их популяциях в 19,3 и 14,7% случаев НМСН I соответственно [4, 14]. В США частота НМСН IX составляет 21,1% [10]. Исследования, выполненные в Китае, показывают, что в этой популяции частота встречаемости НМСН IX равна 6,3% [21]. Наши результаты хорошо укладываются в диапазон известных частот встречаемости НМСН IX, что говорит о правильно составленной выборке и адекватном выборе методов исследования.

Ген *GJB1* состоит из двух экзонов, один из которых кодирует сигнальную последовательность, а второй, состоящий из 852 п.н., кодирует белок [2]. Большинство мутаций выявлено нами в кодирующей последовательности гена и является причиной аминокислотных замен, изменяющих последовательность белка коннексина 32. Миссенс-мутации приводят к неправильному формированию межклеточного канала, снижению активности коннексина 32 и/или метаболической нестабильности канала [23]. Кроме миссенс-мутаций нами были выявлены две мутации, приводящие к образованию преждевременного стоп-кодона, и три мутации со сдвигом рамки считывания, результатом которых является синтез укороченного функционально неполноценного белка. В двух семьях с клиническими и электроэнцефалографическими признаками НМСН I и генеалогическими данными, свидетельствующими в пользу X-сцепленного типа наследования болезни, нами не были выявлены мутации в кодирующей последовательности гена. В связи с этим было принято решение исследовать некодирующий регион гена *GJB1*, что в РФ до на-

стоящего момента не производилось. Наиболее вероятными в данном случае представляются мутации сайта сплайсинга, поэтому правильным оказался поиск мутаций на границах экзона 1b и интрона 1b. В ходе проведенного исследования нами выявлены две мутации, приводящие к появлению новых акцепторных сайтов сплайсинга. На их долю приходится 6% от всех выявленных мутаций (табл. 4), что доказывает необходимость исследования наряду с кодирующей последовательностью гена *GJB1* его промоторной области и интронов. Следует заметить, что исследование всей нуклеотидной последовательности гена *GJB1* осуществляется только в нескольких странах (США, Великобритания, Германия, Франция, Тайвань и РФ). Однако в качестве рутинного метода диагностики НМСН IX исследование промоторной области наряду с кодирующей, вторым, экзоном гена *GJB1*, осуществляется только в РФ.

Мутации в различных участках гена приводят к нарушению структуры отдельных белковых доменов [И]. Считается, что основная функция ТМ-доменов заключается в формировании стенок канала с противоположных сторон щелевого соединения и его поры. ЕС-домам отводится ведущая роль в обеспечении сохранности структуры канала путем обеспечения взаимодействия двух противоположно расположенных коннексонов, а также регуляции времени его открытия. Структура IC-доменов специфична для различных коннексинов. Считается, что мутации, нарушающие последовательность IC-петли, не приводят к значительной выраженности клинических проявлений НМСН типа IX, в отличие от мутаций в N- и C-доменах, содержащих высококонсервативные последовательности [2, 11, 23]. В обследованной нами выборке больных отмечено преобладание мутаций, нарушающих аминокислотную последовательность первого и второго ТМ-доменов, IC-петли и C-концевого домена белка, и небольшое количество мутаций в третьем и четвертом ТМ-доменах и второй ЕС-петле. Отсутствие больных с мутациями, изменяющими структуру N-концевого участка коннексина 32, может быть связано с высокой функциональной значимостью данного домена при формировании коннексона и направленным действием отбора против зигот, имеющих мутации в соответствующих участках гена [2] (табл. 5).

Таким образом, анализ мутаций в гене *GJB1* в выборке больных с НМСН IX, проживающих на территории РФ, показал, что, как и в большинстве обследованных популяций, наиболее часто встречающимся типом мутаций являются миссенс-мутации в кодирующей части гена.

При изучении повторяющихся мутаций для двух семей из Мордовии было показано, что мутация с.319C>T унаследована ими от недавнего общего предка. Выявленные отличия гаплотипа X-хромосомы семьи №9 по пяти маркерам позволяют утверждать, что происхождение мутации в данном случае независимое (табл. 6, 7).

«Горячие» точки гена *GJB1*

Кодон	Мутации	Число семей
142	c.424C>T (Arg142Trp)	4
	c.425G>A (Arg142Gln)	2
164	C.4900T (Arg164Trp)	1
	c.491G>A (Arg164Gln)	5
] Всего из 48 семей (%)		12 (25)

Причиной распространенности мутации c.424C>T в семьях 59 и 114 из Томска, очевидно, является локальный эффект основателя. Для двух других семей из Центрального региона России с данной мутацией показано ее независимое происхождение. Также показано независимое происхождение мутации c.491G>A в пяти неродственных семьях. Для двух семей из Приволжского округа (Самара и Киров) также было показано, что причиной распространенности в них мутации c.541G>A является локальный эффект основателя. Отличия гаплотипа X-хромосомы семьи 150.3 (Воронеж) по трем маркерам говорит о независимом происхождении мутации в этой семье (табл. 6, 7).

Были выявлены лишь локальные эффекты основателя. Причиной данного феномена можно считать тот факт, что среди больных с НМСН IX действует отбор как против мужчин, так и против женщин (хоть и в более мягкой форме). В результате этого мутации в гене *GJB1* элиминируются достаточно эффективно. При анализе предкового гаплотипа мутантных X-хромосом нами отмечена его сохранность в значительном интервале 3,8 сМ (6 млн п.н.). Таким образом, показано, что все мутации в гене *GJB1* возникли недавно и не закрепляются в популяции вследствие элиминации семей с мутациями, как было указано выше.

Описание мутаций C.4240T, изменяющей аминокислотную последовательность кодона 142, и c.491G>A, изменяющей аминокислотную последовательность кодона 164, неоднократно встречалось в литературе [4, 22]. В ходе нашего исследования выявлены мутации c.425G>A в двух семьях и c.490C>T в одной семье в тех же кодонах, описание данных мутаций встречается у различных авторов и в международных базах данных. Исследование, проведенное испанскими учеными на большой выборке больных с НМСН I, показало, что кодон 164 гена *GJB1* и домен белка EC2 чаще остальных подвергаются нарушениям [5]. До данных, полученных нами в ходе исследования, на долю мутаций в кодонах 142 и 164 приходится суммарно 25% НМСН IX в РФ (табл. 8). Таким образом, можно сделать вывод, что данные кодоны являются «горячими» точками мутаций в гене *GJB1*. Наличие в гене «горячих» точек позволяет оптимизировать ДНК-диагностику НМСН IX.

### Список литературы

1. Иллариошкин С.Н., Дадали Е.Л., Федотов В.П. и др. Новая форма наследственной невропатии: болезнь Шарко—Мари—Тутта типа 2F // Атмосфера. Нервные болезни. — 2005. — №2. — С. 42-48.
2. Шаркова И.В. Клинико-генетический анализ наследственной моторно-сенсорной невропатии IX типа: Дисс. на соискание ученой степени к.м.н.
3. Bone L.J., Deschenes S.M., Balice-Gordon R.J. et al. Connexin32 and X-linked Charcot—Marie—Tooth disease // *Neurobio. Dis.* - 1997. - Vol. 4. - P. 221-230.
4. Bort S., Nelis E., Timmerman V. et al. Mutational analysis of the MPZ, PMP22 and Cx32 genes in patients of Spanish ancestry with Charcot—Marie—Tooth disease and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies (Abstract) // *Hum. Genet.* — 1997. - Vol. 99, №6. - P. 746-754.
5. Casanovas C., Banchs I., Corral J. et al. Clinical and molecular analysis of X-linked Charcot—Marie—Tooth disease type 1 in Spanish population (Abstract) // *Clin. Genet.* — 2007. — Feb. — Vol. 71(2). - P. 194.
6. Dubourg O., Tardieu S., Birouk N. et al. Clinical, electrophysiological and molecular genetic characteristics of 93 patients with X-linked Charcot—Marie—Tooth disease // *Brain.* — 2001. — Vol. 124. - P. 1958-1967.
7. Hattori N., Yamamoto M., Yoshihara T. et al. Demyelinating and axonal features of Charcot—Marie—Tooth disease with mutations of myelin-related proteins (PMP22, MPZ and Cx32): a clinicopathological study of 205 Japanese patients // *Brain.* — 2003. — Jan. - Vol. 126 (Pt 1). - P. 134-151. Review.
8. Ни Х., Ма М., Dahl G. Conductance of connexin hemichannels segregates with the first transmembrane segment // *Biophys. J.* - 2006. - Vol. 90, №1. - P. 140-150.
9. Huang Y., Sirkowski E.E., Stickney J.T. et al. Prenylation-defective human connexin32 mutants are normally localized and function equivalently to wild-type connexin32 in myelinating Schwann cells // *J. Neurosci.* - 2005. - Vol. 25, №31. — P. 7111—7120.
10. Ionasescu V.V. X-linked Charcot—Marie—Tooth disease and connexin32 (Abstract) // *Cell. Biol. Int.* — 1998. — Nov. - Vol. 22(11-12). - P. 807-813.
11. Ionasescu V.V., Searby C., Ionasescu R., Neuhaus I.M., Werner R. Mutations of the noncoding region of the connexin32 gene in X-linked dominant Charcot—Marie—Tooth neuropathy // *Neurology.* - 1996. - Vol. 47. - P. 541-544.
12. Kamholz J., Menichella D., Jani A. et al. Charcot—Marie—Tooth disease type 1: molecular pathogenesis to gene therapy // *Brain.* - 2000. - Vol. 123, №2. - P. 222-233.
13. Kochanski A., Kabzinska D. Molecular genetic analysis of the *GJB1* gene: a study of six mutations // *J. Appl. Genet.* — 2004. — Vol. 45, №1. - P. 95-100.
14. Mandich P., Grandis M., Geroldi A. et al. Gap junction beta 1 (*GJB1*) gene mutations in Italian patients with X-linked Charcot—Marie—Tooth disease. (Abstract) // *Hum. Genet.* — 2008. — Apr. 1 [Epub. ahead of print].



## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

15. Menichella D.M., Goodenough D.A., Sirkowski E. et al. Connexins are critical for normal myelination in the CNS // *J. Neurosci.* - 2003. - Vol. 23, №13. - P. 5963-5973.
16. Mersiyanova I.V., Ismailov S.M., Polyakov A.V., Dadali E.L., Fedotov V.P. et al. Screening for mutations in the peripheral myelin genes PMP22, MPZ and Cx32 in Russian Charcot—Marie—Tooth neuropathy patients // *Hum. Mutat.* — 2000. — Vol. 15. - P. 340-347.
17. Rehana B., Ichiro Y., Hiroyuki S. et al. X-linked Charcot—Marie—Tooth Disease (CMTX) in a Severely Affected Female Patient with Scattered Lesions in Cerebral White Matter // *Internal Medicine.* - 2007. - Vol. 46, №13. - P. 1023-1027.
18. Ressayre C., Gomes D., Dautigny A. et al. Connexin32 mutations associated with X-linked Charcot—Marie—Tooth show two distinct behaviors: loss of function and altered gating properties // *J. Neurosci.* - 1998. - Vol. 18, №11. - P. 4063-4075.
19. Ressayre C., Latour P., Blanquet-Grossard F. et al. X-linked dominant Charcot—Marie—Tooth neuropathy (CMTX): new mutations in the connexin32 gene // *Hum. Genet.* — 1996. — Vol. 98. — P. 172-175.
20. Silander K., Meretoja P., Pihko H. et al. Screening for connexin 32 mutations in Charcot—Marie—Tooth disease families with possible X-linked inheritance // *Hum. Genet.* - 1997. - Vol. 100. - P. 391-397.
21. Sons S., Zhang Y., Chen B. et al. Mutation frequency for Charcot—Marie—Tooth disease type 1 in the Chinese population is similar to that in the global ethnic patients // *Genet. Med.* — 2006. - Aug. - Vol. 8(8). - P. 532-535.
22. Stojkovic T., Latour P., Vandenberghe A., Hurtevent J.F., Vermersch P. Sensorineural deafness in X-linked Charcot—Marie—Tooth disease with connexin 32 mutation (R142Q) (Abstract) // *Neurology.* - 1999. - Vol. 52, №5. - P. 1010-1014.
23. VanSlyke J.K., Deschenes S.M., Musil L.S. Intracellular transport, assembly, and degradation of wild-type and disease-linked mutant gap junction proteins // *Mol. Biol. Cell.* — 2000. — Vol. 11, №6. - P. 1933-1946.
24. Williams, personal data, 2000.
25. <http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/DataSource/Mutations.cfm>
26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer.cgi?uglist=Hs.333303>

### The study of the *GJB1* gene in the sample of Russian patients with hereditary motor and sensory neuropathy, type I

Tiburkova T.B.<sup>1</sup>, Schagina O.A.<sup>1</sup>, Dadaly E.L.<sup>1</sup>, Rudenskaya G.E.<sup>1</sup>,  
Fedotov V.P.<sup>2</sup>, Babushkina N.P.<sup>3</sup>, Polyakov A.V.<sup>1</sup>

- <sup>1</sup> - Research Centre for Medical Genetics,  
Moskvorechie 1, 115478 Moscow, Russian Federation
- <sup>2</sup> - VOCD genetic counseling,  
Lenin sq. 5a, Russian Federation
- <sup>3</sup> - Research Institute of Medical Genetics TSC RAMS,  
10 Nab. Ushaiki, Tomsk, 634050, Russian Federation

Hereditary motor and sensory neuropathy (HMSN), or Charcot—Marie—Tooth disease, is a slowly progressive disease of the distal nervous system. Sample of 283 Russian families with clinical and electroneuromiographic criteria of the HMSN, type I were investigated by us. New mutations of the *GJB1* gene were detected. Families with recurrent mutations were haplotyped and causes of distribution these mutations are discussing.