

Исследование рецессивных форм НМСН у российских больных с использованием новой медицинской технологии «Система детекции в одной пробирке частых мутаций при рецессивных наследственных моторно-сенсорных нейропатиях»

Шагина О.А., Миловидова Т.Б., Булах М.В., Поляков А.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», Москва, 115478, ул. Москворечье, д. 1, e-mail: polyakov@med-gen.ru

Наследственные моторно-сенсорные нейропатии (НМСН) — клинически и генетически гетерогенная группа наследственных болезней, затрагивающих периферическую нервную систему. На сегодняшний день известно более 50 генов, ответственных за развитие НМСН. Описаны практически все типы наследования: аутосомно-доминантный, аутосомно-рецессивный, Х-сцепленные доминантный и рецессивный. Несмотря на разнообразие функций белковых продуктов генов, ответственных за НМСН, все они экспрессируются в периферических нервах и приводят к сходному фенотипу полинейропатии. Клиническое сходство проявлений мутаций разных генов, а также различные типы их наследования делают невозможным определение риска рождения больного ребенка в семье без верификации диагноза молекулярно-генетическими методами. Не менее 5% всех случаев НМСН приходится на формы с аутосомно-рецессивным типом наследования — НМСН4. Как и для большинства аутосомно-рецессивных болезней в генах НМСН4 описаны частые мутации, исследование которых позволяет существенно оптимизировать ДНК-диагностику НМСН. В работе представлены результаты исследования НМСН4 в выборке российских больных НМСН с использованием новой медицинской технологии «Система детекции в одной пробирке частых мутаций при рецессивных наследственных моторно-сенсорных нейропатиях».

Ключевые слова: наследственная моторно-сенсорная нейропатия, НМСН4, *FGD4*, *FIG4*, *GDAP1*, *SH3TC2*

Введение

НМСН — клинически и генетически гетерогенная группа наследственных болезней, затрагивающих периферическую нервную систему. На сегодняшний день известно более 50 генов, ответственных за развитие НМСН. Описаны практически все типы наследования: аутосомно-доминантный, аутосомно-рецессивный, Х-сцепленные доминантный и рецессивный. Несмотря на разнообразие функций белковых продуктов генов, ответственных за НМСН, все они экспрессируются в периферических нервах и приводят к сходному фенотипу полинейропатии. На основании данных электро-нейромиографического обследования — определения скорости проведения импульса (СПИ) по срединному нерву — НМСН подразделяются на миелинопатии и аксонопатии. Однако, исследования последних лет показали всю условность такого разделения, так как мутации в одном и том же гене могут приводить к НМСН1 и НМСН2 [1].

Показано, что не менее 5% всех случаев НМСН приходится на формы с аутосомно-рецессивным типом наследования — НМСН 4-го типа [2, 3]. На сегодняшний день описаны мутации 10 генов с аутосомно-рецессивным типом наследования, являющиеся причиной

НМСН. Выделение подтипов НМСН4 основано на клинических характеристиках, этнической принадлежности, нейропатологических особенностях и хромосомном локусе. Больные с НМСН4, как правило, имеют клинический фенотип НМСН, включая слабость и атрофию в дистальных отделах конечностей, снижение/потерю чувствительности и деформацию стопы по типу полый. Некоторые подтипы имеют специфические клинические характеристики, такие, как сенсоневральная глухота, связанная с НМСН4D. Аутосомно-рецессивные нейропатии, как правило, имеют более раннее начало (в раннем детстве) и более тяжелое течение по сравнению с аутосомно-доминантными вариантами.

В 1996 г. картирован локус НМСН4А, а в 2002 г. идентифицирован ген *GDAP1* [4]. Продукт гена — ганглиозид-индуцированный ассоциированный с дифференцировкой протеин 1-го типа содержит 358 аминокислот и экспрессируется, главным образом, в структурах центральной и периферической нервной системы. Белок локализован на наружной мембране митохондрий, и его основной функцией является обеспечение процесса фрагментации разветвленной митохондриальной сети периферических нервов. Длительное время НМСН4А описывалась в группе демиелинизирующих полинейропатий, и показанием для исследования мута-

ций в гене *GDAP1* служило наличие у больных низких СПИ по срединному нерву. 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 [2, 5]. В гене *GDAP1* описана частая мутация Leu239Phe. Доля НМСН4А составляет 25% среди всех случаев НМСН с аутосомно-рецессивным типом наследования [5].

Ген *SH3TC2*, ответственный за НМСН4С, кодирует белок, экспрессирующийся в шванновских клетках периферических нервов, локализованный в плазматической мембране и, предположительно, выполняющий функцию миелинизации и/или аксоглиального взаимодействия. В гене *SH3TC2* описана часто встречающаяся мутация с.1972С>Т ис.2860С>Т [6].

НМСН4Н была описана DeSandre-Giovannoli et al. как тяжелая демиелинизирующая нейропатия, сцепленная с локусом (12p11.2–p13.1). К фенотипу НМСН4Н приводят мутации гена *FGD4*, локализованного на хромосоме 12 (12p11.2). Ген *FGD4* кодирует белок фрабин, играющий важную роль в регуляции сигналов клеток в процессе миелинизации и в организации актинового цитоскелета, а именно, прикреплении его к клеточной мембране. В настоящее время идентифицировано 4 различных мутации гена *FGD4* с наиболее часто встречающимися заменами в положении 298: Met298Thr и Met298Arg (с.893Т>С, с.893Т>G) [7, 8].

НМСН4J — это тяжелая демиелинизирующая нейропатия с началом в раннем детстве. Описан один случай быстро прогрессирующего паралича без сенсорных нарушений. Ген *FIG4*, ответственный за НМСН4J, локализован на хромосоме 6 (6q21). Продуктом гена является белок FIG4, функции которого хорошо не изучены. Предполагают, что белок FIG4 играет роль в регуляции комплекса фосфатидилинозитол-3,5-бисфосфат. Это соединение участвует в движении малых сас-подобных структур, называемых везикулами, которые переносят некоторые вещества в клетке. В настоящее время описано пять мутаций гена *FIG4*, причем четыре из них встречаются в компаунд-гетерозиготном состоянии с пятой, Ile41Thr (с.122Т>С) [9].

Как и для большинства аутосомно-рецессивных болезней в генах НМСН4 описаны частые мутации, исследование которых позволяет существенно оптимизировать ДНК-диагностику НМСН.

Клиническое сходство проявлений мутаций разных генов, а также различные типы их наследования делают невозможным определение риска рождения больного ребенка в семье без верификации диагноза молекулярно-генетическими методами. Большой размер генов НМСН4 и наличие частых мутаций делает актуальной задачей разработку диагностических систем поиска повторяющихся мутаций с целью оптимизации ДНК-диагностики НМСН.

Материалы и методы

Из базы лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ», содержащей образцы ДНК 1232 неродственных семей с диагнозом НМСН были отобраны образцы ДНК 92 семей (147 пробандов), родословная которых не исключала аутосомно-рецессивный тип наследования болезни. Предварительно во всех этих семьях был проведен поиск наиболее частых мутаций аутосомно-доминантных генов НМСН, мутаций не обнаружено.

ДНК была выделена из цельной крови, забранной в пробирку с антикоагулянтом ЭДТА, с использованием набора реактивов для выделения Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA) по протоколу производителя.

Для диагностики рецессивных НМСН в практику ФГБНУ «МГНЦ» была внедрена медицинская технология: «Система детекции в одной пробирке частых мутаций при рецессивных наследственных моторно-сенсорных нейропатиях». В основу данной технологии положена мультиплексная проба-зависимая лигазная реакция с последующей амплификацией (Multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA), представленная впервые в 2002 г. компанией-разработчиком MRC-Holland [9].

Дизайн олигонуклеотидных проб для лигирования, универсальных праймеров осуществлен в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ», синтез — в ЗАО «Евроген», Москва.

Последовательности проб, входящих в реакцию, выбирали согласно базе данных GeneBank. Использованы последовательности генов *FGD4*; *FIG4*; *GDAP1*; *SH3TC2*, фланкирующие области интересующих мутаций (табл. 1).

Длина амплифицированных фрагментов составляет от 82 до 118 п.н.

Лигазную реакцию проводили на программируемом термоциклере Терцик (ДНК-технология, Россия) с использованием ДНК-лигазы Pfu («Stratagene»).

Лигирование проводили в 5 мкл реакционной смеси, содержащей 1х реакционный буфер (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0,1% Igepal, 0,01 mM rATP, 1 mM DTT), 17 специфичных проб, 0,04 единицы активности термофильной ДНК-лигазы, 0,1–1 мкг геномной ДНК.

Лигазную реакцию осуществляли в следующем режиме: первоначальная денатурация при 95°C — 5 минут, затем лигирование при 63°C — 3 часа.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на программируемом термоциклере Терцик (ДНК-технология, Россия) с использованием ДНК-полимеразы Biotaq («БиоМастер») и пары универсальных праймеров (табл. 2).

ПЦР проводили по следующей схеме: в 15 мкл реакционной смеси, содержащей 1х реакционный буфер (67 mM Tris-HCl, 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Twin-20), 0,25 мкМ каждого олигопраймера, 250 мкМ каждого

дезоксинуклеозидтрифосфата, 1,5 единицы термофильной ДНК-полимеразы, добавляли 5 мкл лигата.

ПЦР проводили в следующем режиме: первоначальная денатурация при 95°C — 5 минут, затем 25 циклов смены температур: 94°C — 2 с, температура отжига праймеров 66°C — 2 с, элонгация цепи 72°C — 2 с; заключительная элонгация 72°C — 7 минут. Для проведения ПЦР использовали режим точной регуляции.

Продукт реакции детектировался методом вертикального электрофореза в 8%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) (соотношение акриламида/бисакриламида 19/1). Результаты электрофореза визуализировали после окрашивания геля раствором бромистого этидия на документирующей системе GelDoc фирмы BIO-RAD (США) в УФ-излучении с длиной волны 312 нм. Электрофореграмма представляла из себя паттерн полос, соответствующих различным нормальным или мутантным аллелям гена. По наличию/отсутствию полос с длинами, соответствующими нормальной/мутантной последовательности, судили о наличии/отсутствии конкретной мутации в генотипе пробанда (табл. 3).

Результаты и обсуждение

Во всех образцах ДНК неродственных пробандов из 92 семей, родословная которых не исключала аутосомно-рецессивный тип передачи НМСН, был проведен поиск наиболее частых мутаций с использованием внедренной в практику ФГБНУ МГНЦ новой медицинской технологии «Система детекции в одной пробирке частых мутаций при рецессивных наследственных моторно-сенсорных нейропатиях».

Мутации аутосомно-рецессивных генов были выявлены в 20 семьях: в 16 семьях — мутация с.715C>T (L239F) гена *GDAP1* (у пробандов из четырех семей в гомозиготном состоянии и у 12 в гетерозиготном); мутации гена *SH3TC2* были выявлены у пробандов из трех семей в гетерозиготном состоянии; с.1972C>T (R658C) — у двух больных, с.2860C>T (R954X) — у одного; в одной из семей была детектирована мутация с.122T>C (I41T) гена *FIG4* в гетерозиготном состоянии. Мутаций гена *FGD4* выявлено не было. С использованием новой медицинской технологии удалось выявить мутации на 24 хромосомах неродственных больных. Таким образом,

Таблица 1

Пробы, применявшиеся для детекции мутаций

Ген и детектируемая мутация	Последовательность олигонуклеотидов (5' → 3')
C.893T>C <i>FGD4</i>	FT: GTTCGTACGTGAATCGCGGTAC GT CTCAGAAATTGGCACCATTCCCTTAAGAT
	FC: GTTCGTACGTGAATCGCGGTAC GA CAGAAATTGGCACCATTCCCTTAAGAC
	R: GTATGGAGAATATGTGAAAGGATTTGATAATGC TTTATTCTTC GATGCGATCCGATGCCTTCATG
C.893T>G <i>FGD4</i>	FT: GTTCGTACGTGAATCGCGGTAC GT CTCAGAAATTGGCACCATTCCCTTAAGAT
	FG: GTTCGTACGTGAATCGCGGTAC AGAAATTGGCACCATTCCCTTAAGAG
	R: GTATGGAGAATATGTGAAAGGATTTGATAATGC TTTATTCTTC GATGCGATCCGATGCCTTCATG
C.122T>C <i>FIG4</i>	FT: GTTCGTACGTGAATCGCGGTAC GT GCAGAAACGAAATATCGTGTCTTGAAGAT
	FC: GTTCGTACGTGAATCGCGGTAC CAGAAACGAAATATCGTGTCTTGAAGAC
	R: TGATAGAACAGAACCAAAAGATTTGGTC TTTTC GATGCGATCCGATGCCTTCATG
C.715C>T <i>GDAP1</i>	MF: GTTCGTACGTGAATCGCGGTAC TT GGGTGAAGGATTACCCGCAGAA
	NF: GTTCGTACGTGAATCGCGGTAC GGTGAAGGATTACCCGCAGAG
	R: CCAAGGTTGCTGGCCCTC AATATC GATGCGATCCGATGCCTTCATG
C.1972C>T <i>SH3TC2</i>	FC: GTTCGTACGTGAATCGCGGTAC GTCCTGCCCTTTGCCGAGC
	FT: GTTCGTACGTGAATCGCGGTAC T GGTCTGCCCTTTGCCGAGT
	R: GCCTGCAGCTCCTCTCTGG GATGCGATCCGATGCCTTCATG
C.2860C>T <i>SH3TC2</i>	FC: GTTCGTACGTGAATCGCGGTAC CATTGCTGTTTGGCTTAAGGCATC
	FT: GTTCGTACGTGAATCGCGGTAC GT GCATTGCTGTTTGGCTTAAGGCATT
	R : GACATCTAAAGAGTAAGTATGTCCCATGC GATGCGATCCGATGCCTTCATG

Таблица 2

Универсальные праймеры и условия амплификации, применяемые в технологии

Последовательность праймеров, 5' → 3'	t отжига
F: GTTCGTACGTGAATCGCGGTAC R: CATGAAGGCATCGGATCGCATC	66°C

наиболее вероятная причина НМСН — мутации в генах с аутосомно-рецессивным типом наследования, была установлена в 20 российских семьях.

Данные исследования показали, что на долю аутосомно-рецессивных форм приходится не менее 2% всех случаев НМСН у российских больных. Полученные результаты исследования наиболее распространенных мутаций наиболее частых генов согласуются с мировыми данными о частотах НМСН4 и частотах встречаемости мутаций в различных генах. Показано, что у российских больных наиболее частой формой аутосомно-рецессивных НМСН является НМСН4А, на долю мутации с.715С>Т приходится более 80% хромосом пробандов с выявленными мутациями. Так как в систему диагностики включена только одна частая мутация гена *GDAP1*, на долю которой приходится не менее 40% всех мутаций этого гена — реальная частота НМСН4А у российских больных существенно выше. Однако предыдущие исследования спектра мутаций гена *GDAP1* у российских больных [2] не выявили других частых мутаций, которые целесообразно было бы включить в систему. Поэтому для определения реального вклада НМСН4А в структуру НМСН у российских больных необходимо исследование всей кодирующей последовательности гена *GDAP1*.

Было установлено, что мутации генов *GDAP1* и *SH3TC2* выявляются у больных с НМСН I и НМСН II типов. В 13 из 16 семей с заменой с.715С>Т гена *GDAP1* и в двух из трех семей с мутациями гена *SH3TC2* при электронейромиографическом обследовании были зарегистрированы СПИ по срединному нерву, превышающие 38 м/с, что соответствует диагнозу НМСН2 (аксонопатия). В четырех семьях с выявленными аутосомно-рецессивными мутациями, в том числе и в семье с заменой с.122Т>С в гене *FIG4*, были зарегистрированы СПИ, соответствующие миелинопатиям (НМСН I). В одной из семей с мутацией гена *GDAP1* в гомозигот-

ном состоянии, у двух больных сестер были зарегистрированы СПИ по срединному нерву 43 м/с и 32 м/с, таким образом, в данной семье имеет место промежуточный тип НМСН.

Несмотря на невысокий вклад НМСН4 в структуру НМСН у российских больных, наличие форм с аутосомно-рецессивным типом наследования необходимо учитывать при проведении медико-генетического консультирования и расчете рисков в отягощенных семьях.

Впервые в России разработана система детекции в одной пробирке шести повторяющихся мутаций четырех генов *FGD4*: с.893Т>С, с.893Т>G; *FIG4*: с.122Т>С; *GDAP1*: с.715С>Т; *SH3TC2*: с.1972С>Т, с.2860С>Т, ответственных за НМСН4. Новая методика может быть использована, для подтверждающей диагностики НМСН, в том числе и на ранних стадиях заболевания, проведения пренатальной диагностики в отягощенных семьях.

Показаниями к использованию технологии являются:

1. Поиск молекулярно-генетических причин НМСН в отягощенных семьях;
2. Диагностика гетерозиготного носительства НМСН4 у родственников больного;
3. Проведение пренатальной диагностики в отягощенных семьях;
4. Популяционные исследования частот носительства НМСН4.

Противопоказания для использования технологии «Система детекции в одной пробирке частых мутаций при рецессивных наследственных моторно-сенсорных нейропатиях» отсутствуют.

Детекция мутаций позволяет подтвердить диагноз на молекулярно-генетическом уровне, провести, в случае необходимости, пренатальную диагностику.

Система детекции шести повторяющихся мутаций четырех генов *FGD4*: с.893Т>С, с.893Т>G; *FIG4*: с.122Т>С; *GDAP1*: с.715С>Т; *SH3TC2*: с.1972С>Т,

Таблица 3

Интерпретация результатов

Ген	Мутация	Аллель	Длина	Статус точки
<i>FGD4</i>	с.893Т>С	с.893Т	118	Норма
		с.893С	115	Мутация
	с.893Т>G	с.893Т	118	Норма
		с.893G	112	Мутация
<i>FIG4</i>	с.122Т>С	с.122Т	108	Норма
		с.122С	105	Мутация
<i>GDAP1</i>	с.715С>Т	с.715Т	92	Мутация
		с.715С	89	Норма
<i>SH3TC2</i>	с.1972С>Т	с.1972Т	84	Мутация
		с.1972С	82	Норма
	с.2860С>Т	с.2860Т	100	Мутация
		с.2860С	97	Норма

c.2860C>T, ответственных за наследственные моторно-сенсорные нейропатии типа 4 в одной пробирке позволяет выявить причину НМСН4 не прибегая к секвенированию всей последовательности генов, что позволяет снизить финансовые и временные затраты на проведение ДНК-диагностики данного заболевания.

Список литературы

1. Hoyle JC, Isfort MC, Roggenbuck J, Arnold WD. The genetics of Charcot-Marie-Tooth disease: current trends and future implications for diagnosis and management. *Appl Clin Genet*. 2015 Oct 19;8:235-43.
2. Шагина О.А., Дадали Е.Л., Федотов В.П. и др. Наследственная моторно-сенсорная полинейропатия типа 4А. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2010;110 (5): 13-16.
3. Миловидова Т.Б. Клинико-молекулярно-генетический анализ наследственной моторно-сенсорной нейропатии I типа. — Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук — ГУ «Медико-генетический научный центр РАМН» — Москва. — 2011
4. Nelis E, Erdem S, Van Den Bergh PY et al. Mutations in *GDAP1*: autosomal recessive CMT with demyelination and axonopathy. *Neurology*. 2002 Dec 24;59(12):1865-72
5. 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 Jan;30(1):22-5.
6. Jan Senderek, Carsten Bergmann, Claudia Stendel, et al. Mutations in a Gene Encoding a Novel SH3/TPR Domain Protein Cause Autosomal Recessive Charcot-Marie-Tooth Type 4C Neuropathy. *Am J Hum Genet*. 2003 Nov; 73(5): 1106-1119.doi: 10.1086/379525
7. Delague V, Jacquier A, Hamadouche T et al. Mutations in *FGD4* encoding the Rho GDP/GTP exchange factor FRABIN cause autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth type 4H. *Am J Hum Genet*. 2007 Jul;81(1):1-16.
8. Stendel, C., Roos, A., Deconinck, T. et al. Peripheral nerve demyelination caused by a mutant Rho GTPase guanine nucleotide exchange factor, Frabin/*FGD4*. *Am. J. Hum. Genet*. 81: 158-164, 2007.
9. Clement Y, Chow, Yanling Zhang et al. Mutation of *FIG4* causes neurodegeneration in the pale tremor mouse and patients with CMT4J. *Nature*. 2007 Jul 5; 448(7149): 68-72.

Информация о конфликте интересов

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

The study of autosomal recessive CMT-disease with using a new medical technologies «One tube detection system for most common recessive CMT-mutation»

Shchagina O.A., Milovidova T.B., Bulah M.V., Polyakov A.V.

Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics»,
115409, Moscow, Moskvorechie 1, e-mail: polyakov@med-gen.ru

Hereditary motor and sensory neuropathy (Charcot-Marie-Tooth or CMT disease) is a clinically and genetically heterogeneous group of hereditary diseases affecting the peripheral nervous system. More than 50 CMT-genes are known. All types of inheritance have been described for this disease: autosomal dominant, autosomal recessive, X-linked dominant and recessive. Protein products of CMT-genes expressed in peripheral nerves and result in is the similar phenotype polyneuropathy. Clinical manifestations similar mutations of different genes, as well as various types of inheritance makes it impossible to determine the patient's risk of giving birth in the family without verification of the diagnosis by molecular genetic methods. At least 5% of all cases of CMT are autosomal recessive inheritance — CMT4. The paper presents the results of a study in Russian CMT patients using new medical technology «One tube detection system for most common recessive CMT-mutation».

Keywords: hereditary motor and sensory neuropathy, CMT4, *FGD4*, *FIG4*, *GDAP1*, *SH3TC2*