

Молекулярные причины прогрессирующей оссифицирующей фибродисплазии у российских пациентов

Сермягина И.Г., Баязутдинова Г.М., Браславская С.И., Логинова А.Н.,
Ряднинская Н.В., Чухрова А.Л., Щагина О.А., Поляков А.В.

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», г. Москва 115478 ул. Москворечье, д. 1. факс (495) 324 8110, e-mail: sirina74@mail.ru

Фибродисплазия оссифицирующая прогрессирующая (ФОП, FOP, MIM 135100) — редкое аутосомно-доминантное наследственное заболевание (частота 1:2000000), характеризующееся врожденной костной патологией и прогрессирующим гетеротопическим окостенением мягких тканей больного. Патологический процесс имеет непредсказуемый прогрессирующий характер с возникновением новых костных образований. Формирование патологических оссификатов происходит в различных частях тела, в местах травмирования мышечной и соединительной ткани. За развитие ФОП ответственны мутации, возникающие в гене *ACVR1*. Немногочисленные работы в российской научной литературе, посвящены клиническим признакам и особенностям течения ФОП. Целью данного исследования является обобщение результатов, полученных в результате проведения ДНК-диагностики ФОП у российских пациентов. Результаты молекулярно-генетического исследования причин возникновения ФОП в России представлены впервые. В лаборатории ДНК-диагностики Медико-генетического научного центра с 2009 года проводится поиск мутаций в гене *ACVR1*. Молекулярную причину заболевания удалось установить у 28 из 72 обследованных неродственных пробандов.

Ключевые слова: фибродисплазия оссифицирующая прогрессирующая, ФОП, *ACVR1*.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

The molecular reasons for the Fibrodysplasia ossificans progressiva in the Russian patients

Sermyagina I.G., Bayazutdinova G.M., Braslavskaya S.I., Loginova A.N.,
Ryadninskaya N.V., Schagina O.A., Poliakov A.V.

Research Center for Medical Genetics, Moscow, Russia, e-mail: sirina74@mail.ru

Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP, FOP, MIM 135100) [1] is a rare autosomal dominant hereditary disease (frequency 1:2000000), characterized by congenital bone disease and progressive heterotopic ossification of the patient's soft tissues. The pathological process is unpredictable and progressive, with new bone formations. Pathological ossification occurs in different parts of the body, in the area of muscle damage and connective tissue. The development of fibrodysplasia occurs as a result of a mutation in the *ACVR1* gene. Several works in the Russian scientific literature show the clinical signs and characteristics of fibrodysplasia ossificans progressiva. Objective of this research is generalization of the results received as a result of performing DNA diagnostics of FOP at the Russian patients. The results of molecular-genetic analysis of the causes of FOP in Russia are presented for the first time. Searching of mutations in *ACVR1* gene is carried out to laboratories of DNA diagnostics Medical Genetics Research Center since 2009. The molecular cause of the disease was found in 28 of 72 unrelated probands.

Key words: Fibrodysplasia ossificans progressiva, FOP, *ACVR1*.

Введение

Фибродисплазия оссифицирующая прогрессирующая (ФОП, FOP, MIM 135100) — редкое наследственное заболевание (частота 1:2000000), характеризующееся генетически обусловленной гетеротопической оссификацией мягких тканей больного [1]. ФОП наследуется аутосомно-доминантно с полной пенетрантностью. В литературных источниках отсутствует информация о преобладании данной патологии у определенных этнических групп [2]. В основном встречаются спорадические случаи данной болезни, однако имеются и редкие описания семейных случаев ФОП [3].

Манифестация болезни происходит, как правило, в раннем детском возрасте. Однако, известны случаи позд-

него возникновения первых проявлений ФОП. Для фенотипа пациентов, наряду с оссификатами и костными аномалиями, специфично наличие «маркерной» врожденной микродактилии больших пальцев ног. При формировании дополнительной кости вначале отмечается уплотнение и воспаление пораженного участка ткани, что отличает патологическую оссификацию от естественной. Течение патологического процесса имеет непредсказуемый, неуклонно прогрессирующий характер с чередованием «вспышек» возникновения костных образований. Формирование дополнительной патологической костной ткани происходит в различных частях тела в местах травмирования мышечной и соединительной ткани. Как правило, первыми страдают мышцы шеи и спины с последующим распростране-

нием патологического процесса на другие части тела. У больных с ФОРП дополнительные кости могут формироваться в суставах и приводить к нарушениям подвижности опорно-двигательного аппарата, глубокой инвалидизации больных, вплоть до полного обездвиживания. В случаях, когда в патологический процесс вовлекаются жевательные мышцы, нарушается способность нормально принимать пищу. Попытки хирургического удаления оссификатов, как правило, запускают новую волну патологического процесса. При данном заболевании категорически противопоказаны любые оперативные вмешательства [4]. На сегодняшний день кроме симптоматической терапии активно разрабатывается патогенетическая медикаментозная терапия ФОРП с использованием агонистов рецептора ретиноевой кислоты (RAR γ) и проводятся клинические испытания препарата, способного предотвратить патологическую посттравматическую оссификацию. Препарат Palovarotene разработанной Clementia Pharmaceuticals успешно прошел вторую фазу клинических испытаний и уже зарегистрирован, как орфаный препарат в США [5, 6].

За развитие данного патологического состояния ответственны мутации, возникающие в гене, кодирующем рецептор ACVR1 (Activine A Receptor type I, также известный как ALK-2), который относится к семейству BMP-рецепторов (bone morphogenetic protein). Ген ACVR1 был картирован Shore с соавторами [7] в 2006 году в локусе 2q23-q24. Он состоит из 11 экзонов. Первые два экзона являются некодирующими. Регуляторный белок участвует в процессе эмбрионального формирования костной ткани и постнатальной репарации костей скелета [6]. Белок ACVR1 состоит из 509 аминокислот.

Ввиду редкости данного заболевания в российской научной литературе имеются немногочисленные работы, посвященные клиническим признакам и особенностям течения ФОРП [8–11]. В лаборатории ДНК-диагностики Медико-генетического научного центра с 2009 года проводится поиск мутаций в гене ACVR1. Целью данного исследования является обобщение результатов, полученных в результате ДНК-диагностики ФОРП у российских пациентов. В данной работе впервые в России представлены данные о молекулярно-генетических причинах ФОРП, полученные на максимально возможной для нашей страны, с учетом редкости данной болезни, выборке больных и членов их семей.

Материалы и методы исследования

С 2009 по 2017 гг. нами собраны образцы 72 неродственных больных с клиническим диагнозом ФОРП из различных российских регионов. В исследуемой выборке были представлены пациенты обоих полов. Расовая и этническая принадлежность не определялась. Возраст больных на момент проведения молекулярно-генетического анализа варьировал от 2 до 30 лет. В нескольких случаях при выявлении у пациента мутации в гене ACVR1 по инициативе родителей были исследованы образцы ДНК членов семьи.

Образцы геномной ДНК получены из венозной крови пациентов с использованием наборов для выделения Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, WI, USA) и DIAAtomTM DNA Prep 200, согласно протоколам производителя. Для поиска мутаций в гене ACVR1 использованы пары праймеров, выбранные в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ МГНЦ и синтезированные в НПФ «Литех». Одиннадцать амплифицируемых фрагментов включают в себя нуклеотидную последовательность и прилегающие интронные участки с 1 по 11 экзоны гена ACVR1. Амплификация необходимых фрагментов ДНК проводилась методом полимеразной цепной реакции на программируемом термоциклере MC2 фирмы «ДНК-технология» (Россия). Определение нуклеотидной последовательности амплифицированных фрагментов ДНК проводилось методом Сенгера с использованием набора для секвенирования и протокола фирмы производителя на приборе ABI Prism 3100 (Applied Biosystems).

Результаты и обсуждение

В результате исследования всей кодирующей последовательности и прилежащих интронных областей гена ACVR1 причину заболевания удалось установить у 28 из 72 обследованных неродственных пробандов. Спектр выявленных у российских больных мутаций представлен в таблице.

Как видно из таблицы, в 23 случаях была выявлена самая частая и первая описанная мутация в гене ACVR1 с.617G>A (p.Arg206His), локализованная в экзоне 6. По данным мировых исследований, данная патологическая замена выявляется более чем у 90% больных с клиниче-

Спектр выявленных мутаций в гене ACVR1 у российских больных с ФОРП

Таблица

Экзон	Замена нуклеотида	Белок	Количество
6	с.617G>A	p.Arg206His	23
6	с.619C>G	p.Gln207Glu	1
8	с.974G>C	p.Gly325Ala	1
8	с.982G>A	p.Gly328Arg	1
8	с.983G>A	p.Gly328Glu	1
9	с.1067G>A	p.Gly356Asp	1

ским диагнозом *фибродисплазия оссифицирующая прогрессирующая* [12]. В пяти других случаях найдены ранее описанные в научной литературе и генетических базах миссенс-мутации с.619C>G (p.Gln207Glu) в экзоне 6, с.974G>C (p.Gly325Ala), с.982G>A (p.Gly328Arg), с.983G>A (p.Gly328Glu) в экзоне 8 и с.1067G>A (p.Gly356Asp) в экзоне 9 гена *ACVR1* [13, 14].

Все выявленные мутации возникли в экзонах, входящих в «горячую» область гена. Накопленные литературные данные позволяют выделить регион гена *ACVR1*, в котором описано наибольшее количество мутаций. Данный регион включает в себя 6, 7, 8 и 9 экзоны и соответствует двум функционально важным участкам в структуре белка *ACVR1*: GS-домену и домену протеинкиназы (рис. 1). На данный момент в базе мутаций человека HGMD зарегистрировано всего 17 миссенс-мутаций и одна делеция [15].

В результате однонуклеотидной замены с.617G>A в экзоне 6 гена *ACVR1* происходит замещение аргинина на гистидин в кодоне 206 в глицин-серин богатом домене рецептора. Эта аминокислотная замена приводит к конформационному изменению рецептора, что нарушает взаимодействие со специфическим ингибитором FKBP12, который в норме ограничивает его повышенную активность. Неконтролируемая активация рецептора вызывает развитие патологического формирования костной ткани. В международной литературе мутация p.Arg206His признается одной из самых патогенных, приводящей к поистине катастрофическим последствиям для пораженного организма [16, 17]. В результате возникновения данной замены развивается классическая форма ФОП. Для мутаций в других точках гена описаны различные варианты клинической картины [18].

В России, как и во всем мире, наиболее частой является мутация p.Arg206His, на долю которой в нашей выборке приходится 82% (рис. 2).

В трех семьях были исследованы образцы ДНК родителей больных ФОП с целью определения природы возникновения мутации. Установлено, что в двух семьях мутация возникла *de novo*. В одной из семей с мутацией p.Arg206His для исследования был доступен биологический материал матери и родного сибса пробанда. У брата пробанда был выявлен тот же патогенный вариант нуклеотидной последовательности, что и у больного. К сожалению, мы не располагаем биологическим материалом и объективной информацией о клиническом статусе биологического отца больных детей, поэтому не можем установить, что явилось причиной передачи мутации двум детям в семье: болезнь отца или герминальный мозаицизм одного из родителей.

Недостаточные данные о клинической картине заболевания у прошедших ДНК-диагностику в нашей лаборатории пациентов не позволяют подтвердить литературные наблюдения о взаимосвязи положения мутации и патологических проявлений ФОП.

Установлено, что причиной возникновения ФОП у больных в России являются мутации гена *ACVR1*. Му-

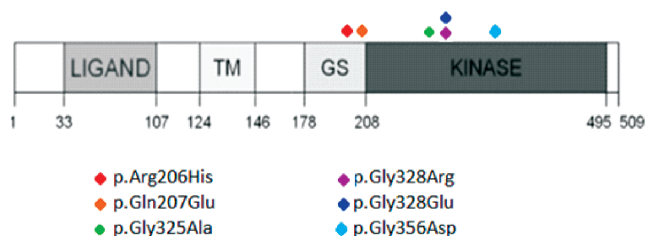


Рис. 1. Распределение мутаций на схеме доменной организации белка *ACVR1*.

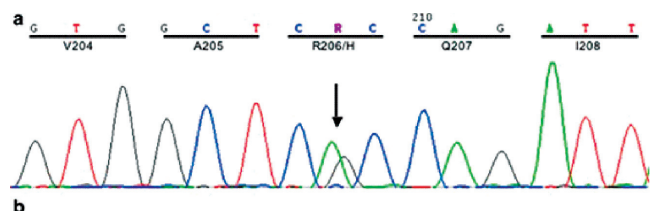


Рис. 2. Мутация p.Arg206His в экзоне 6 гена *ACVR1*.

тации данного гена выявлены у 40% обследованных пробандов. Столь низкий процент выявляемости мутаций в обследованной группе российских больных, по-видимому, связан с низкой осведомленностью врачей различных специальностей о клинических и генетических особенностях данной патологии. Это, возможно, приводит к избыточной диагностике ФОП на клиническом этапе обследования пациентов.

На клиническом этапе обследования ФОП необходимо дифференцировать с различными вариантами патологии: врожденными аномалиями скелета, прогрессирующей оссифицирующей гетероплазией, с доброкачественными и злокачественными новообразованиями костной системы. Такой перечень дифференциальных диагнозов может приводить к продолжительным многочисленным консультациям с применением различных инвазивных процедур, которые крайне опасны для больных ФОП, так как могут привести к возникновению новых очагов оссификации. Учитывая, с одной стороны, вариабельность клинических проявлений ФОП, а с другой — наличие мажорной мутации, облегчающей проведение ДНК-диагностики, молекулярно-генетический анализ гена *ACVR1* имеет решающее значение в дифференциальной диагностике и окончательной верификации диагноза ФОП. Быстрота, безопасность, относительная доступность для жителей различных регионов РФ, позволяют рассматривать молекулярно-генетический анализ как один из первоочередных этапов обследования пациентов с подозрением на это заболевание.

Список литературы

1. OMIM: Mendelian Inheritance in Man. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim].
2. Kaplan F.S., Le Merrer M., Glaser D.L., Pignolo R.J., Goldsby R., Kitterman J.A., Groppe J., Shore E.M. Fibrodysplasia ossificans progressiva. Best Practice & Research // Clinical Rheumatology. 2008. Vol. 22. P. 191-205.

3. Hebel N., Shore E.M., Kaplan F.S. Three pairs of monozygotic twins with fibrodysplasia ossificans progressiva: the role of environment in the progression of heterotopic ossification // *Clin Rev Bone Miner Metab.* 2005. Vol. 3. P. 205-208.
4. Коваленко-Клычкова Н.А., Клычкова И.Ю., Кенис В.М., Мельченко Е.В. Прогрессирующая оссифицирующая фибродисплазия у детей (обзор литературы и анализ 5 клинических случаев) // *Травматология и ортопедия России.* 2014. №1. С. 102-109.
5. Chakkalakal et al. Palovarotene Inhibits Heterotopic Ossification and Maintains Limb Mobility and Growth in Mice with the Human ACVR1 R206H Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP) Mutation. *J Bone Miner Res.* 2016.
6. Clementia Announces Top-line Results from Phase 2 Trial of Palovarotene for Treatment of Patients with Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. Clementia Pharma. Retrieved 2016.10.14 www.clementiapharma.com.
7. Shore E.M., Xu M., Feldman G.J., et al. A recurrent mutation in the BMP type I receptor ACVR1 causes inherited and sporadic fibrodysplasia ossificans progressiva // *Nature Genet.* 2006. Vol. 38. P. 525-527.
8. Антелава О.А., Никишина И.П., Гусева И.А., Мякоткин В.А., Хелковская-Сергеева А.Н., Насонов Е.Л., Раденска-Лоповок С.Г. Прогрессирующая оссифицирующая фибродисплазия // *РМЖ.* 2015. №7. С. 415
9. Антелава О.А., Лобжанидзе Т.Б., Никишина И.П., Фёдоров Е.С., Бельская Е.А., Хитров А.Н. Прогрессирующая оссифицирующая фибродисплазия // *РМЖ.* 2005. №8. С. 560
10. Рябова Т.В., Баяндина Г.Н., Утюшева М.Г., Геппе Н.А. и др. Прогрессирующий оссифицирующий полимиозит у детей. В кн.: *Сложный больной в практике педиатра-ревматолога.* М.: МИА. 2008. С. 86-104.
11. Рябова Т.В., Геппе Н.А., Михалева Г.В., Сермягина И.Г. Клинические и рентгенологические проявления оссифицирующей прогрессирующей фибродисплазии у детей. // *Лечащий врач.* 2011. № 1. С. 31.
12. Huning I, Gillessen-Kaesbach G. Fibrodysplasia ossificans progressiva: clinical course, genetic mutations and genotype-phenotype correlation. // *MolSyndromol.* 2014. 5(5). P. 201-1.
13. Koster B., Pauli R.M., Reardon W. et al. Classic and atypical fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) phenotypes are caused by mutations in the bone morphogenetic protein (BMP) type I receptor ACVR1. // *Hum. Mutat.* 2009. Vol. 303. P. 79-90.
14. Whyte MP, Wenkert D, Demertzis JL et al. Fibrodysplasia ossificans progressiva: middle-age onset of heterotopic ossification from a unique missense mutation (c.974G>C, p.G325A) in ACVR1. // *J Bone Miner Res.* 2012.27(3). P. 729-37.
15. База мутаций человека Human Gene Mutation Database [<http://www.hgmd.org>].
16. Kaplan FS, Chakkalakal SA, Shore EM. Fibrodysplasia ossificans progressiva: mechanisms and models of skeletal metamorphosis. *DisModelMech.* 2012. 5 (6) P. 756-62.
17. Groppe JC, Wu J, Shore EM, Kaplan FS. In vitro analyses of the dysregulated R206H ALK2 kinase-FKBP12 interaction associated with heterotopic ossification in FOP. *CellsTissuesOrgans.* 2011. 194 (2-4). P. 291-295.
18. Pignolo RJ, Shore EM, Kaplan FS: Fibrodysplasia ossificans progressiva: clinical and genetic aspects. *Orphanet J RareDis.* 2011. 6. P.80-10.