

Частота мутаций в гене *SOD1* у российских пациентов с боковым амиотрофическим склерозом

Лысогорская Е.В., Абрамычева Н.Ю., Захарова М.Н., Иллариошкин С.Н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр неврологии» Российской академии медицинских наук

Боковой амиотрофический склероз (БАС) — фатальное нейродегенеративное заболевание, характеризующееся прогрессирующей гибелью мотонейронов спинного и головного мозга, развитием параличей и гибелью пациентов от нарушения дыхательных и бульбарных функций. Около 10% случаев БАС связано с мутациями определённых генов, среди которых ведущее значение имеет ген Cu/Zn-супероксиддисмутазы (*SOD1*). Обследовано 206 пациентов (98 женщин и 108 мужчин) с БАС, включая 9 пациентов из восьми неродственных семей, страдающих семейной формой заболевания. В результате молекулярно-генетического анализа мутации *SOD1* выявлены в 50% семейных случаев и в 3% спорадических случаев заболевания. В статье представлены спектры выявленных мутаций у российских пациентов с БАС и наиболее показательные случаи семейной формы БАС, демонстрирующие необходимость проведения медико-генетического консультирования в отягощённых семьях.

Ключевые слова: боковой амиотрофический склероз, ген *SOD1*, мутационный анализ, медико-генетическое консультирование

Введение

БАС является неуклонно прогрессирующим нейродегенеративным заболеванием, которое характеризуется гибелью мотонейронов спинного и головного мозга, развитием параличей и гибелью пациентов от нарушения дыхательных и бульбарных функций, обычно спустя 2-5 лет от момента дебюта симптомов болезни [1]. Этиология БАС окончательно не установлена. Известно несколько теорий патогенеза БАС. Одной из них является теория оксидативного стресса, ключевым звеном которой является фермент антиоксидантной защиты клетки Cu/Zn-супероксиддисмутазы (СОД1). СОД1 локализован в цитозоле и представляет собой небольшой белок с молекулярной массой 32,5 кДа. Он ответственен за детоксикацию супероксидных радикалов и превращение их в молекулы кислорода и перекись водорода. Данный фермент кодируется геном *SOD1*, расположенным на хромосоме 21q22.1 [18].

SOD1 стал первым геном, для которого установлена ассоциация с БАС (локус ALS1, MIM #105400). Описание мутаций в гене *SOD1* при БАС сыграло большую роль в понимании патогенеза данного заболевания [18]. К настоящему времени описано свыше 160 мутаций в гене *SOD1* [<http://alsod.iop.kcl.ac.uk/>], подавляющее большинство которых является доминантными. Патогенетическая значимость многих мутаций доказана исследованиями на лабораторных животных и культурах клеток, а также при сегрегационном анализе в процессе обследования кровных родственников пациентов с семейной формой БАС [7, 14]. Показано, что ферментативная активность мутантного белка не изменяется, поэтому в настоящее время основной гипотезой цитотоксичности при повреждении гена является приобретение ферментом

СОД1 новых патологических функций, привнесённых мутациями и реализуемых преимущественно в двигательных нейронах (механизм «gain-of-function») [19].

Мутации в гене *SOD1*, по данным зарубежных исследователей, обуславливают около 20-30% семейных случаев и 5-7% спорадических случаев БАС [18]. Известны еще 18 генов, ассоциированных с развитием семейных (как правило, аутосомно-доминантных) случаев данного заболевания (табл. 1), однако выявляемость мутаций в них при БАС весьма низка [8, 15]. В нашей стране единственное исследование, посвящённое мутационному анализу гена *SOD1*, было проведено 10 лет назад и касалось сравнительно ограниченного числа пациентов-славян (51 чел.), лишь у трёх из которых были выявлены 2 точковые мутации гена [3]. В настоящей работе мы представляем результаты детального мутационного анализа гена *SOD1*, выполненного на крупнейшей когорте российских пациентов с БАС.

Материалы и методы

В период с 2007 по 2011 гг. было обследовано 206 больных БАС, обратившихся в Научный центр неврологии РАМН, в том числе 98 женщин (47,6%) и 108 мужчин (52,4%). Диагноз БАС устанавливался на основании стандартных международных критериев El Escorial [6]. В данное исследование были включены пациенты с «достоверным» и «вероятным» диагнозом БАС. Помимо спорадической формы БАС, составившей абсолютное большинство обследованных случаев, в исследуемую группу были включены также 9 пациентов из восьми неродственных семей, страдавших семейной формой заболевания. Таким образом, частота семейных случаев БАС в нашей когорте составила 4,3%. При полу-

чении сведений о наличии в семье двух и более родственников, страдающих БАС, положительный семейный анамнез подтверждался на основании представляемых медицинских документов или при непосредственном медицинском обследовании вторичных случаев.

Проведение данного исследования было одобрено локальным этическим комитетом Научного центра неврологии РАМН. Все пациенты были ознакомлены с условиями проведения исследования и подписывали информированное согласие на участие в нём.

Молекулярно-генетический анализ включал полное секвенирование кодирующей области гена *SOD1*. Образцы геномной ДНК выделяли из цельной крови с помощью набора для выделения Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Дизайн праймеров для каждого из пяти экзонов, включая фланкирующие интронные области длиной 100–200 п.н., представлен в табл. 2. Секвенирование проводили на генетическом анализаторе 3130 Applied Biosystems с использованием набора BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

Типирование двух однонуклеотидных замен в гене *SOD1* проводилось методом аллельной дискриминации с помощью 5'-нуклеазного (TaqMan) анализа. При этом для детекции аллельных вариантов использовались четыре аллельспецифичных TaqMan зонда FAM, R6G, ROX, Cy5 с различными флуоресцентными метками, позволяющими надёжно различать гомо- и гетерозиготы при амплификации в режиме реального времени. Амплификация проводилась на приборе для осуществления полимеразной цепной реакции в реальном времени «АНК-32» компании «Синтол».

Результаты и обсуждение

При секвенировании *SOD1* нами в совокупности выявлено 11 мутаций в гетерозиготном состоянии у 14 неродственных пациентов с БАС, в том числе 8 мутаций у 10 неродственных пациентов в кодирующей области гена (табл. 3) и 3 мутации у четырёх пациентов в некодирующих областях *SOD1* (табл. 4).

Таблица 1

Описанные генетические локусы при БАС

Локус	Ген	Белковый продукт	Хромосомная локализация
ALS1	<i>SOD1</i>	Медь/цинк-содержащая супероксиддисмутаза	21q22.11
ALS2	<i>ALS2</i>	Алсин	2q33.2
ALS3	Не идентифицирован	—	18q21
ALS4	<i>SETX</i>	Сенатаксин	9q34.13
ALS5	<i>SPAST</i>	Спастин	2p24
ALS6	<i>FUS</i>	Химерный белок, ассоциированный со злокачественной липосаркомой	16p11.2
ALS7	Не идентифицирован	—	20p13
ALS8	<i>VAPB</i>	Везикуло-ассоциированный мембранный белок	20q13.33
ALS9	<i>ANG</i>	Ангиогенин	14q11.1
ALS10	<i>TARDBP</i>	TAR-ДНК-связывающий белок	1p36.22
ALS11	<i>FIG4</i>	SAC-домен-содержащий белок	6q21
ALS12	<i>OPTN</i>	Оптивеврин	10p13
ALS13	<i>ATXN2</i>	Атаксин-2	12q23-q24.1
ALS14	<i>VCP</i>	Валозин-содержащий белок	9p13
ALS15	<i>UBQLN2</i>	Убиквлин-2	Хр11.21
ALS16	<i>SIGMAR1</i>	Неопиоидный внутриклеточный рецептор сигма-1	9p13
ALS17	<i>CHMP2B</i>	Хроматин-модифицирующий белок 2B	3p11.2
ALS18	<i>PFN1</i>	Профилин-1	17p13.3

Таблица 2

Структура праймеров для амплификации экзонов гена *SOD1*

Экзон	Прямой праймер	Обратный праймер
1	GCCACGCCCCCGTGAAGA	CTCAGCACTTGGGCACCGCA
2	TGGCCACAGGGTGCTTGTGC	TGAGGGGTTTAACGTTTAGGGGCT
3	TCCCTTCTCACTGTGGCTGACCA	GCCCAGGAAGTAAAGCATTCCAGC
4	GGTGCAGCCCCATCTTCTTCCC	ACAAGTGAGAAACCCCAATCCTGGCA
5	AGGGTAGCGTGTGGTGGTCT	TCCCTAAAGCTTCAAAGGACAGCC

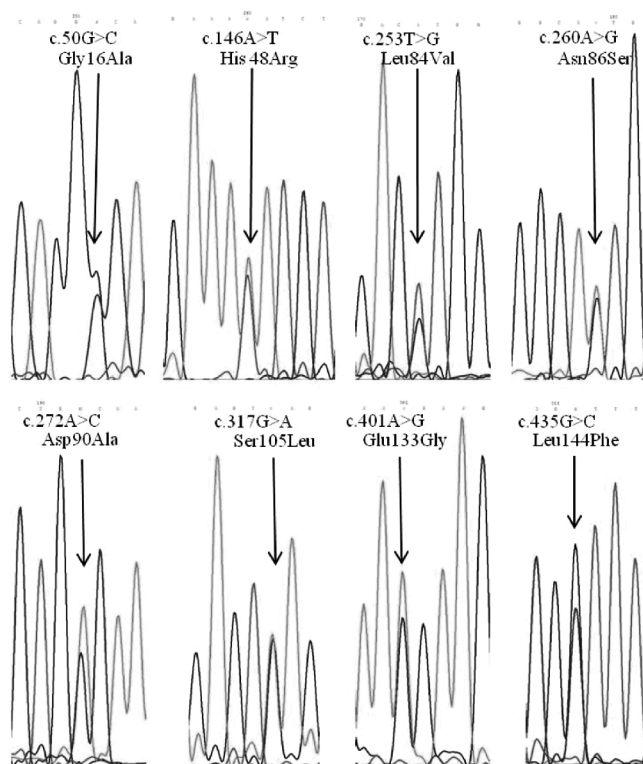
Выявленные кодирующие мутации в гене *SOD1*

ID пациента	Мутация*	Область	Возраст/пол	Форма заболевания	Литературная ссылка
187	Gly16Ala	Экзон 1	31/ж	Спинальная, sporadическая	[4]
15	His 48Arg	Экзон 2	50/м	Спинальная, sporadическая	
120	Leu84Val	Экзон 4	39/м	Бульбарная, семейная	[9]
145	Leu84Val	Экзон 4	29/м	Шейно-грудная, семейная	[9]
155	Asn86Ser	Экзон 4	54/ж	Шейно-грудная, sporadическая	[20]
224	Asn86Ser	Экзон 4	50/ж	Пояснично-крестцовая, семейная	[20]
206	Asp90Ala	Экзон 4	62/ж	Пояснично-крестцовая, sporadическая	[8]
116	Ser105Leu	Экзон 4	46/м	Спинальная, семейная	[20]
176	Glu133Gly	Экзон 5	34/ж	Шейно-грудная, sporadическая	[11]
17	Leu144Phe	Экзон 5	44/ж	Пояснично-крестцовая, sporadическая	[4]

Таблица 4

Выявленные некодирующие мутации в гене *SOD1*

ID пациента	Мутация*	Область	Возраст/пол	Форма заболевания	Литературная ссылка
62	c.-46C>T	Область промотора	42/м	Пояснично-крестцовая, sporadическая	Новая мутация
130	c.169+50delAACAGTA	Интрон 2	63/ж	Бульбарная, sporadическая	Новая мутация
163	c.169+50delAACAGTA	Интрон 2	65/ж	Шейно-грудная, sporadическая	Новая мутация
191	c.*249T>C	5'-фланкирующая область	46/ж	Шейно-грудная, sporadическая	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp

Рис. 1. Выявленные мутации в кодирующей области гена *SOD1*

Мутации в кодирующей области гена (рис. 1). Как видно в табл. 3, половина выявленных кодирующих мутаций была локализована в экзоне 4 гена. Все обнаруженные мутации были описаны ранее у больных БАС из других этнических групп [4, 13, 17]. Патогенетическая значимость большинства из указанных мутаций доказана; кроме того, для некоторых из них (наиболее часто встречающихся) достаточно чётко рассчитана пенетрантность, что позволяет определять прогноз заболевания у носителей в отягощённых семьях [5, 10].

Как показывает анализ фено-генотипических корреляций, практически все выявленные мутации характеризуются выраженным клиническим полиморфизмом. Так, описанная ранее [5] мутация Leu84Val была обнаружена у двух неродственных молодых мужчин с семейным БАС: в одном случае (рис. 2А) это был пациент, страдающий быстро прогрессирующей бульбарной формой заболевания с дебютом в 39 лет, мать и две родные тети которого также страдали БАС, а в другом (рис. 2В) — мужчина 29 лет с медленно прогрессирующей шейно-грудной формой заболевания, в семье которого БАС страдали бабушка, отец и дядя по отцу, причем симптомы у них дебютировали только на 6-м десятилетии жизни. В двух случаях (один — семейный, рис. 2В, другой — sporadический) была обнаружена мутация Asn86Ser: у пациентки с семейным БАС имела место пояснично-крестцовая форма заболевания с дебютом в 35 лет и медленным прогрессированием, тогда как у её сестры

с пояснично-крестцовой формой симптомы манифестировали в 54 года и продолжительность болезни составила 7 лет. Ещё у одной больной с мутацией Asn86Ser без семейного анамнеза имела место шейно-грудная форма БАС с дебютом в возрасте 54 лет и продолжительностью жизни 10 мес. от момента постановки диагноза. В одном случае у пациента с семейной формой БАС (рис. 2Г) была обнаружена мутация Ser105Leu, часто встречаемая при семейной форме заболевания и в других популяциях [12, 18]: заболевание дебютировало в 42 года и прогрессирует весьма медленно (к настоящему моменту длительность болезни составляет более 9 лет). В этой же семье диагноз БАС установлен у матери пациента, а носительство мутации обнаружено у тетки пациента, не имеющей к 65 годам каких-либо клинических и электрофизиологических признаков поражения мотонейронов. По данным зарубежных авторов известно, что мутация Ser105Leu может характеризоваться неполной пенетрантностью [10].

Таким образом, в исследуемой группе пациентов частота мутаций в гене *SOD1* для семейных случаев заболевания составила 50% (4 семьи из восьми).

Мутации Gly16Ala, His48Arg, Glu133Gly, Leu144Phe, Asn86Ser и Asp90Ala были выявлены в шести спорадических случаях БАС. Частота кодирующих мутаций в исследуемом гене при спорадической форме заболевания составила в нашей выборке больных 3%.

Функциональное значение кодирующих мутаций *SOD1* было оценено нами методом молекулярного моделирования в лаборатории функциональной синаптологии отдела исследований мозга ФГБУ «НЦН» РАМН (в.н.с. А.В. Россохин). С целью построения модели белка и поиска его минимальной энергетической конформации использовалась программа ZMM. Во всех случаях кодирующие точечные мутации гена приводили к умеренному или значительному изменению энергии белка *SOD1*, при этом 7 из них приводили к снижению энергии белка и повышению пространственной стабильности *SOD1*, что обычно сопровождается повышенной склонностью «инертной» мутантной молекулы к мисфолдингу и внутриклеточной агрегации. Таким образом, данные результаты подтверждают принадлежность БАС к классу так называемых *конформационных болезней* центральной нервной системы, характерной чертой которых является формирование в нейронах цитотоксичных нерастворимых белковых включений. Подробное описание проведённого *in silico* анализа мутаций гена *SOD1* представлено нами в самостоятельной публикации [2].

Мутации в некодирующих областях гена. У двух неродственных пациенток нами впервые была обнаружена делеция семи пар нуклеотидов с.169+50delAACAGTA в интроне 2. У обеих пациенток заболевание дебютировало в возрасте после 60 лет, однако фенотипические проявления болезни были весьма различными: в одном случае имела место медленно прогрессирующая шей-

но-грудная форма БАС, а в другом — быстро прогрессирующая бульбарная форма.

В обследованной нами группе были также впервые обнаружены замена с.-46C>T в промоторной области гена и замена с.*249T>C (rs16988412) в 5 интроне в области, влияющей на процесс сплайсинга. Данные области гена имеют большое функциональное значение, в связи с чем вышеуказанные замены могут являться патогенетически значимыми.

Для уточнения возможной патогенетической значимости обнаруженных интронных мутаций методами секвенирования (для мутации с.169+50delAACAGTA) и ПЦР в режиме реального времени (для с.-46C>T и с.*249T>C) были обследованы 385 образцов ДНК здоровых лиц из банка ФГБУ «НЦН» РАМН. Носительства рискованных аллелей в группе здоровых лиц выявлено не было. При этом замена с*249T>C, описанная в базе SNP как полиморфизм с частотой минорного аллеля 0,5%, встречалась в группе пациентов с БАС также с частотой 0,5%.

Исследование функциональной значимости обнаруженных некодирующих мутаций (оценка сплайсинга и т.д.) не проводилось в связи с отсутствием образцов цельной крови или других биологических тканей (образцы геномной ДНК хранились в лаборатории на протяжении ряда лет, а соответствующие пациенты умерли, либо недоступны для повторного обследования). Подтверждение их патогенетической роли в патогенезе БАС требует дальнейших исследований. Именно в связи с этим для более консервативной оценки частоты мутаций в обследованных генах БАС нами учитывались только кодирующие варианты.

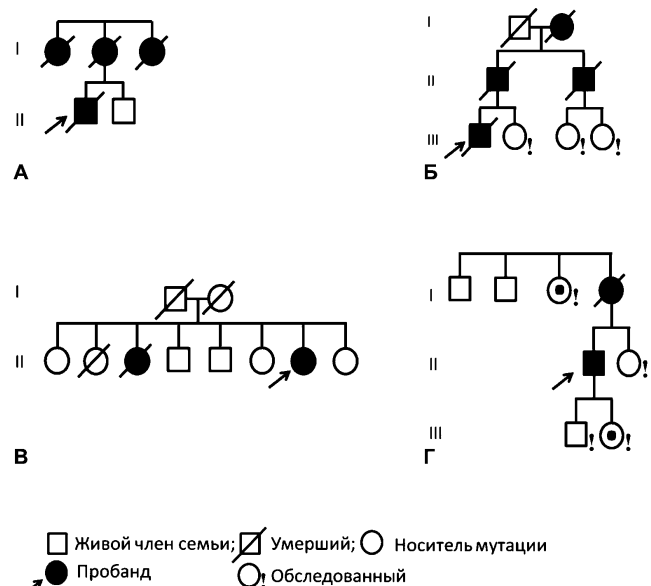


Рис. 2. Родословные пациентов с семейным БАС

Таким образом, в настоящей работе впервые на обширной (свыше 200 пациентов) российской выборке была оценена частота встречаемости мутаций в гене *SOD1* при семейной и спорадической форме БАС. При этом выявленная частота носительства мутаций при семейном БАС в российской популяции (50%) оказалась выше, чем описывают зарубежные исследователи (20–30%) [4, 18], тогда как частота мутаций *SOD1* при спорадической форме БАС (3%) оказалась сопоставимой с другими странами [4, 18]. Дальнейшее катамнестическое наблюдение за клинически здоровыми родственниками пациентов, являющихся носителями ряда исследованных мутаций *SOD1*, позволит уточнить данные о пенетрантности соответствующих мутаций и оптимизировать расчёты генетического риска при проведении медико-генетического консультирования отягощённых семей. Окончательное подтверждение патогенетической значимости выявленных в работе новых мутаций в некодирующих областях гена *SOD1* требует проведения дальнейших функциональных исследований с использованием различных подходов. Проведённое исследование продемонстрировало, что, аналогично большинству других изученных популяций мира, у российских пациентов с БАС ген *SOD1* является одним из ведущих молекулярных факторов, определяющих риск развития данного заболевания. Разработка подходов к воздействию на систему супероксиддисмутазы и, потенциально, других ферментов окислительного каскада рассматривается в числе наиболее перспективных возможностей терапии БАС [16].

Список литературы

- Иллариошкин С.Н. Генетика // Боковой амиотрофический склероз / Под ред. И.А. Завалишина. — М.: Евразия, 2007. — С. 229–255.
- Лысогорская Е.В., Россохин А.В., Абрамычева Н.Ю., Захарова М.Н., Иллариошкин С.Н. Мутации в гене *SOD1* при боковом амиотрофическом склерозе: возможности метода молекулярного моделирования // Молекулярная биология. — 2013. — В печати.
- Скворцова В.И., Лимборская С.А., Сломинский П.А. и др. Особенности спорадической болезни двигательного нейрона, ассоциированной с мутациями D90A и G12R, в российской популяции // Журн. неврол. и психиатрии им. С.С. Корсакова. — 2003. — Т. 103. — С. 46–52.
- Andersen P.M., Sims K.B., Xin W.W. et al. Sixteen novel mutations in the Cu/Zn superoxide dismutase gene in amyotrophic lateral sclerosis: a decade of discoveries, defects and disputes // *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* — 2003. — Vol. 4. — P. 62–73.
- Aoki M., Abe K., Houi K. et al. Variance of age at onset in a Japanese family with amyotrophic lateral sclerosis associated with a novel Cu/Zn superoxide dismutase mutation // *Ann. Neurol.* — 1995. — Vol. 37. — P. 676–679.
- Brooks B.R., Miller R.G., Swash M., Munsat T.L. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis // *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* — 2000. — Vol. 1. — P. 293–299.
- Cova E., Ghiroldi A., Guareschi S. et al. G93A *SOD1* alters cell cycle in a cellular model of Amyotrophic Lateral Sclerosis // *Cell Signal.* — 2010. — Vol. 22. — P. 1477–1484.
- Deng H.X., Chen W., Hong S.T. et al. Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia // *Nature.* — 2011. — Vol. 477. — P. 211–215.
- Deng H.X., Tainer J.A., Mitsumoto H. et al. Two novel *SOD1* mutations in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis // *Hum. Mol. Genet.* — 1995. — Vol. 4. — P. 1113–1136.
- Gilhus N.E., Barnes M.P., Brainin M. Клинические рекомендации по неврологии Европейской федерации неврологических сообществ / Пер. с англ. — 2012. — С. 368–370.
- Hosler B.A., Nicholson G.A., Sapp P.C. et al. Three novel mutations and two variants in the gene for Cu/Zn superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis // *Neuromuscul. Disord.* — 1996. — Vol. 6. — P. 361–366.
- Kawamata J., Hasegawa H., Shimohama S. et al. Leu106-to-val (CTC-to-GTC) mutation of superoxide dismutase-1 gene in patient with familial amyotrophic lateral sclerosis in Japan // *Lancet.* — 1994. — Vol. 343. — P. 1501.
- Luigetti M., Conte A., Madia F. et al. Heterozygous *SOD1* D90A mutation presenting as slowly progressive predominant upper motor neuron amyotrophic lateral sclerosis // *Neurol. Sci.* — 2009. — Vol. 30. — P. 517–520.
- Marinkovic P., Reuter M.S., Brill M.S. et al. Axonal transport deficits and degeneration can evolve independently in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2012. — Vol. 109. — P. 4296–4301.
- Millecamps S., Salachas F., Cazeneuve C. et al. *SOD1*, *ANG*, *VAPB*, *TARDBP*, and *FUS* mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis: genotype-phenotype correlations // *J. Med. Genet.* — 2010. — Vol. 47. — P. 554–560.
- Miller T., Smith R., Pestronk A. et al. Results of a Phase 1, Double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of the safety, tolerability, and pharmacokinetics of ISIS 333611 administered intrathecally to patients with familial ALS due to *SOD1* gene mutations // *Neurology.* — 2012. — Vol. 78 (Meeting Abstracts 1). — S25.001.
- Rabe M., Felbecker A., Waibel S. et al. The epidemiology of CuZn-SOD mutations in Germany: a study of 217 families // *J. Neurol.* — 2010. — Vol. 257. — P. 1298–1302.
- Rosen D.R., Siddique T., Patterson D. et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis // *Nature.* — 1993. — Vol. 362. — P. 59–62.
- Sahawneh M.A., Ricart K.C., Roberts B.R. et al. Cu,Zn-superoxide dismutase increases toxicity of mutant and zinc-deficient superoxide dismutase by enhancing protein stability // *J. Biol. Chem.* — 2010. — Vol. 285. — P. 33885–33897.
- Sato T., Nakanishi T., Yamamoto Y. et al. Rapid disease progression correlates with instability of mutant *SOD1* in familial ALS // *Neurology.* — 2005. — Vol. 65. — P. 1954–1957.

Frequency of mutations in the *SOD1* gene in Russian patients with amyotrophic lateral sclerosis

Lysogorskaia E.V., Abramychева N.Iu., Zakharova M.N., Illarionkin S.N.

Research Center of Neurology, Russian Academy of Medical Sciences

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease characterized by progressive loss of cortical and spinal motor neurons, the development of paralyses, and death from respiratory and bulbar failure. About 10% of ALS cases are caused by mutations in several genes, among which most important is Cu/Zn superoxide dismutase (*SOD1*) gene. Two hundred and six ALS patients (98 females and 108 males) were examined, including 9 patients from 8 unrelated families with a familial form of ALS. On molecular genetic analysis, *SOD1* coding mutations were detected in 50% of familial cases and 3% of sporadic cases of the disease. In the paper, a spectrum of mutations revealed in Russian patients with ALS and most representative cases of a familial form of ALS demonstrating the need for medical genetic counseling in affected families are presented.

Key words: amyotrophic lateral sclerosis, *SOD1* gene, mutation analysis, medical genetic counseling