

## Семейный случай редкой наследственной моторно-сенсорной нейропатии типа 2P, обусловленной мутацией гена *LRSAM1*

Щагина О.А.<sup>1</sup>, Дадали Е.Л.<sup>1</sup>, Федотов В.П.<sup>2</sup>, Рыжкова О.П.<sup>1</sup>,  
Чухрова А.Л.<sup>1</sup>, Миловидова Т.Б.<sup>1</sup>, Поляков А.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» ФАНО России,  
115522 РФ, Москва, Москворечье 1

<sup>2</sup> БУЗ Воронежской области «Воронежская областная клиническая больница №1»,  
394066, г. Воронеж, Московский проспект, 151

Наследственные моторно-сенсорные нейропатии (НМСН) — группа болезней периферической нервной системой, обладающая выраженной генетической гетерогенностью и клинической полиморфностью. Консультирование семей со случаями наследственной моторно-сенсорной нейропатии является трудной задачей для врача-генетика. В статье приведены клинические, электрофизиологические и молекулярно-генетические данные обследования большой семьи из Самары с аутосомно-доминантной наследственной моторно-сенсорной нейропатией. Всем членам семьи проведен неврологический осмотр по стандартной методике. Электромиографическое обследование проводилось с использованием 4-канального электромиографа «Нейро-МВП», фирмы «Нейрософт» (Россия). Молекулярно-генетическое исследование проводилось методом прямого автоматического секвенирования целевых генов и экзомного секвенирования на секвенаторе IlluminaNextSeq 500 методом парно-концевого чтения (2 x 75 п.н.) с использованием набора IlluminaTruSeq® ExomeKit. Причиной НМСН в описываемой семье является ранее описанный в большой семье из Сардинии патогенный вариант с.2047-1G>A в интроне 24 гена *LRSAM1*. На сегодняшний день описано всего лишь 20 семей, причиной болезни в которых являются патогенные варианты гена *LRSAM1*. Особенности проявления наследственной моторно-сенсорной нейропатии типа 2P с доминантным типом наследования является поздний возраст манифестации (на 4–5 декаде жизни), асимметрия поражения нижних конечностей, мягкие клинические проявления и медленное прогрессирование не приводящее к инвалидизации. Единственным адекватным методом молекулярно-генетической диагностики данной формы болезни является высокопроизводительное секвенирование. Генетическое тестирование, направленное на поиск выявленной в данной семье мутации, является единственным способом определения генетического риска и профилактики рождения больных детей при достижении членами семей больных детородного возраста.

**Ключевые слова:** наследственная моторно-сенсорная нейропатия, *LRSAM1*, экзомное секвенирование.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Family case of rare Charcot-Marie-Tooth 2P disease caused by *LRSAM1* mutation

Shchagina O.A.<sup>1</sup>, Dadali E.L.<sup>1</sup>, Fedotov V.P.<sup>2</sup>, Ryzhkova O.P.<sup>1</sup>,  
Chuchrova A.L.<sup>1</sup>, Milovidova T.B.<sup>1</sup>, Polyakov A.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research Centre for Medical Genetics,  
115522, Moskvorechie 1, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Budgetary Healthcare Institution of the Voronezh Region «Voronezh Regional Clinical Hospital No.1»,  
394066, Moscovskiy prospect 151, Voronezh, Russia

**Introduction.** Charcot-Marie-Tooth disease is clinical polymorphic and genetic heterogeneity group of peripheral nervous system disorders. Genetic counseling for CMT-families is a difficult problem for the doctor. **Materials and methods.** Autosomal dominant CMT-family from Samara was observed by clinical, electrophysiological and molecular-genetic methods. Genetic research was performed by direct automatic sequencing of target genes and exome-sequencing on the IlluminaNextSeq 500 sequenator by method of pair and trailer reading (2kh75p.o) about use of the IlluminaTruSeq® ExomeKit set. **Results.** We identified a splice-site *LRSAM1* gene mutation (с.2047-1G>A, p.Ala683ProfsX3). Today only 20 families with *LRSAM1* mutations are described. The clinical features in this family is the late age of manifestation (on 4-5 decade of life), asymmetry of atrophy, the weak clinical manifestations and the slow. **Conclusion.** Genetic diagnostics for this CMT should be carried out by the NGS-methods. Genetic testing is the only way to determine the status of family members for the purpose of planning pre-conception prevention.

**Key words:** Charcot-Marie-Tooth disease, exome-sequencing, *LRSAM1*.

### Введение

Наследственные моторно-сенсорные нейропатии (НМСН) — это генетически гетерогенная и клинически полиморфная группа болезней нервной системы. Частота НМСН — 1:2500—1:10000 в различных популяциях. Заболевание характеризуется симптомами прогрессирующей полинейропатии с преимущественным поражением мышц дистальных отделов конечностей.

Консультирование семей со случаями НМСН является трудной задачей для врача-генетика. Наследственные полинейропатии могут являться самостоятельной нозологической формой (болезнь Шарко-Мари) или вторичными по отношению к другим наследственным заболеваниям (транстиретиновый амилоидоз, болезнь Фабри и т.д.). На сегодняшний день известно более 70 различных генов, мутации которых приводят к фенотипу НМСН. Разная степень выраженности симптомов, как и разные фенотипы наследственных полинейропатий: моторно-сенсорная, моторная, сенсорная — могут наблюдаться не только у больных с мутациями в одном и том же гене, но и у членов одной семьи. Мутации в одном и том же гене могут иметь различные типы наследования, так, для генов *MFN2* и *P0* описаны не только типичные случаи аутосомно-доминантного наследования, но и случаи аутосомно-рецессивного наследования мутаций [1—4], а для преимущественно рецессивных мутаций в гене *GDAP1* существуют описания семейных случаев с аутосомно-доминантным наследованием [5].

Использование технологий высокопроизводительного секвенирования наряду с количественными методами анализа позволяет выявить причину наследственной нейропатии более чем в 60% случаев. Накопление клинических и молекулярно-генетических данных о

редких формах НМСН позволяют упростить врачу-генетику принятие решения о спектре необходимых для постановки диагноза молекулярно-генетических обследований и облегчить работу врача-лабораторного генетика и клинического биоинформатика при анализе данных различных методов ДНК-диагностики [6—7].

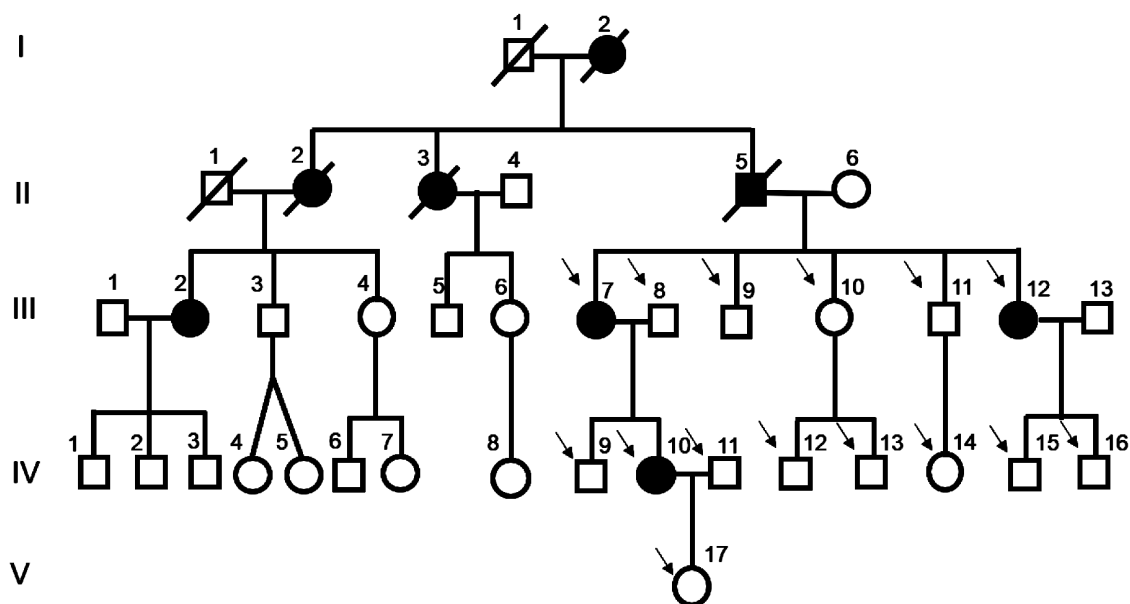
В статье представлены клиничко-молекулярно-генетические характеристики больных — членов одной семьи с аутосомно-доминантным типом наследования редкой формы НМСН типа 2Р, причиной которой является мутация гена *LRSAM1*.

### Материалы и методы

В рамках экспедиционной работы в 2000 и 2001 годах были проведены неврологический осмотр, электронейромиографическое исследование и собраны образцы периферической крови 15 больных и здоровых членов большой семьи с НМСН с сегрегацией заболевания в 4 поколениях (рисунок).

Неврологический осмотр был проведен по стандартной методике. Электромиографическое обследование проводилось с использованием 4-канального электромиографа «Нейро-МВП», фирмы «Нейрософт» (Россия) по стандартной методике. Исследование включало в себя анализ СРВ по моторным и сенсорным волокнам нервов рук и ног с соблюдением температурного режима.

Определение нуклеотидной последовательности генов, проводили методом прямого секвенирования продукта ПЦР как с прямого, так и с обратного праймера, на основе ферментативного сиквенса по Сенгеру. В качестве матрицы для проведения секвенирования ис-



Родословная семьи с НМСН. Черным цветом обозначены больные, белым — здоровые члены семьи. Стрелками указаны больные и здоровые члены семьи, которым были проведены неврологический осмотр, электронейромиографическое исследование и у которых взята кровь для ДНК-анализа.

пользовали фрагменты, полученные после проведения ПЦР. Автоматическое секвенирование проводилось согласно протоколу фирмы-производителя на приборе ABIPrism 3100 (Applied Biosystems).

Дизайн олигонуклеотидных праймеров и проб осуществлен в лаборатории ДНК — диагностики ФГБНУ МГНЦ, синтез — в ЗАО «Евроген», Москва. Последовательности праймеров выбирали согласно базе данных GeneBank.

Анализ экзона проведен на секвенаторе нового поколения IlluminaNextSeq 500 методом парно-концевого чтения (2x75 п.н.). Для пробподготовки была использована методика селективного захвата участков ДНК, относящихся к кодирующим областям более 20 000 генов (набор IlluminaTruSeq® ExomeKit).

Для названия выявленных вариантов использовалась номенклатура, представленная на сайте <http://varnomen.hgvs.org/recommendations/DNA> версия 2.15.11.

Обработка данных секвенирования проведена с использованием стандартного автоматизированного алгоритма, предлагаемого Illumina, для анализа данных, представленного на сайте <https://basespace.illumina.com>. Оценка влияния на сплайсинг выполнялась с использованием ресурсов NetGene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>) и Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/HSF3/>). Оценка патогенности выявленных при проведении экзомного исследования вариантов проводилась согласно критериям, приведенным в российских рекомендациях для интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) [8].

### Результаты

Неврологический осмотр проведен 13 членам семьи в возрасте от 10 до 52 лет. У трех членов семьи (III.7, III.12, IV.10) предположен клинический диагноз *наследственная моторно-сенсорная нейропатия*, который был подтвержден электронейромиографическим исследованием. Статус еще двух членов семьи (III.10 и IV.15) удалось установить только по результатам проведения ЭМГ и окончательно подтвердить результатами ДНК-анализа, так как у них наблюдались минимальные признаки полинейропатии, которая, очевидно имела другую этиологию: диабетическая полинейропатия у III.10 и токсическая у IV.15, страдающего алкоголизмом.

Клинические проявления у всех пораженных членов семьи были достаточно однотипными. Заболевание манифестировало в возрасте 35–46 лет со слабости в дистальных отделах нижних конечностей, трудностей при ходьбе, впоследствии присоединялась атрофия мышц голени. Деформация стоп по типу полых была выявлена только у самого старшего из больных — женщины, которой на момент обследования исполнилось 52 года. При осмотре обращала на себя внимание асимметрия атрофий нижних конечностей у всех пораженных чле-

нов семьи. Атрофий мышц верхних конечностей и деформаций кистей ни у кого из осмотренных больных выявлено не было. Снижение поверхностной и глубокой чувствительности (болевого, температурного и двумерно-пространственного чувства) по полиневритическому типу было в разной степени выражено у всех больных. Симптомы сенситивно-мозжечковой атаксии в виде неустойчивости в позе Ромберга, адиадохокinesis, интенция при выполнении пальценосовой пробы, трудностей перемещения в пространстве в темноте отмечены у всех обследованных. Сухожильные рефлексы с нижних и верхних конечностей не вызывались или были снижены.

При проведении электрофизиологического обследования у всех пробандов отмечалось аксональное поражение моторных волокон нервов рук и ног — снижение амплитуд М-ответов. Показатели СПИ по срединному нерву варьировали от 38 м/с до 44 м/с. Денервационной активности выявлено не было.

Проведен поиск мутации методом прямого автоматического секвенирования по Сенгеру в генах, ответственных за наиболее частые формы НМСН: *PMP22*, *P0*, *CX32*, *EGR*, *LITAF*, *MFN2*, *NEFL*, *HSPB1*, *YARS*, *DNM2* — мутаций не обнаружено.

На следующем этапе проведено полноэкзтное секвенирование одному из больных членов семьи. В результате был выявлен ранее описанный в большой семье из Сардинии патогенный вариант с.2047-1G>A в интроне 24 гена *LRSAM1*. Данная мутация приводит к тому, что канонический сайт сплайсинга AG на границе интрона 24 — экзона 25 превращается в AA, однако, так как следующий нуклеотид экзона 25 также гуанин, сплайсинг происходит, но со сдвигом рамки считывания. На белковом уровне аланин в позиции 683 изменяется на пролин с последующим образованием преждевременного стоп-кодона вместо следующей аминокислоты. Данные изменения были подтверждены исследованием белкового продукта гена больных и здоровых членов Сардинской семьи — у больных членов семьи половина белка *LRSAM1* была представлена укороченной последовательностью [9].

Сегрегация варианта с.2047-1G>A гена *LRSAM1* совместно с заболеванием в российской семье была подтверждена секвенированием по Сенгеру целевого фрагмента гена у всех доступных для исследования 15 членов семьи.

### Обсуждение

Мутация гена *LRSAM1* выявлена как причина НМСН в российской семье из города Самара. Ген *LRSAM1* локализован на хромосоме 9q31.3-q34.2, состоит из 25 экзонов и кодирует убиквитин-лигазу типа E3, участвующую в процессах деградации белков. Особенно высока экспрессия продукта гена в мотонейронах спинного мозга. Окончательная функция данного протеина и

его роль в структуре и функционировании нервной системы до сих пор не установлена. Функциональный анализ, основанный на введении эмбрионам рыбок данио рерио (*Zebrafish*) конструкций, приводящих к исчезновению последнего 25-го экзона гена *LRSAMI*, показал нарушение морфогенеза нервной системы и нарушение двигательных функций [10]. В 2010 году ген *LRSAMI* был идентифицирован как причина НМСН в семье из Канады, с рецессивным типом наследования болезни, несколькими кровнородственными браками в родословной. Заболевание у больных членов этой семьи начиналось на 1–2 декаде жизни и медленно прогрессировало. У пробандов была выявлена гомозиготная мутация с.1914G>A в акцепторном сайте сплайсинга [11].

На сегодняшний день описано всего лишь 20 семей, причиной болезни в которых являются патогенные варианты гена *LRSAMI*, из них в 19 случаях диагноз звучит как *наследственная моторно-сенсорная нейропатия* или *аксональная периферическая нейропатия*, в одной семье патогенный вариант этого гена описан при церебеллярной атаксии (Human Gene Mutation Database <https://portal.biobase-international.com>).

Особенностями проявлений НМСН типа 2Р с доминантным типом наследования является поздний возраст манифестации (на 4–5 декаде жизни), асимметрия поражения нижних конечностей, мягкие клинические проявления и медленное прогрессирование, не приводящее к инвалидизации. В больших семьях описаны асимптоматические носители патогенного варианта в возрасте 30–40 лет [9,10,12,13].

Очевидно, что именно этими особенностями клинического течения заболевания обусловлены трудности генетического картирования доминантных форм болезни. Несмотря на то, что в распоряжении исследователей из разных стран был материал нескольких больших семей, как потом оказалось с НМСН 2Р, причина заболевания в них была установлена лишь после идентификации гена в семье с рецессивным типом наследования. Полногеномные анализы сцепления в семьях с доминантным типом наследования НМСН, оказывались неэффективными в связи с невозможностью точно установить НМСН-статус всех членов семей. Для одной из семей причиной болезни в которой, как было установлено в 2016 году, оказалась мутация р.Cys694Tyr гена *LRSAMI* [14], в 2004 году была идентифицирована ложная область сцепления на хромосоме 12 [15], в то время как ген *LRSAMI* локализован в регионе chr9q31.3-q34.2. Картирование НМСН 2Р в большой семье с аутомно-рецессивным типом наследования объясняется более выраженной симптоматикой НМСН у пораженных членов этой семьи, ранним возрастом манифестации и относительной простотой полногеномного картирования рецессивных форм по поиску участков гомозиготности, применённому в исследовании Guernsey DL с соавторами в канадской семье [11].

Кроме первого описания АР НМСН, все представленные на сегодняшний день в литературе и базах данных случаи НМСН, связанные с мутациями гена *LRSAMI*, имеют доминантный тип наследования. Это доказано или сегрегационным анализом, или подтверждением статуса мутации de novo в изолированных случаях болезни. Доминантные НМСН 2Р манифестируют на два десятилетия позднее, чем описанная рецессивная форма болезни.

### Заключение

В статье представлено первое в России описание клинических проявлений НМСН типа 2Р в семейном случае болезни, причиной которой явилась мутация сайта сплайсинга гена *LRSAMI*.

Анализ клинических проявлений у больных членов обследованной семьи и литературные данные свидетельствуют в пользу умеренного течения классического варианта наследственной аксонопатии, не приводящего к выраженной инвалидизации больных. Особенностью НМСН 2Р является поздний возраст манифестации — 3–4 декада жизни, медленное прогрессирование, асимметрия поражений.

Учитывая редкость НМСН, связанной с мутациями гена *LRSAMI*, относительно большие размеры гена, отсутствие специфических особенностей клинических проявлений, позволяющих на этапе клинического или нейрофизиологического обследования провести дифференциальную диагностику, единственным адекватным методом молекулярно-генетической диагностики данной формы болезни является высокопроизводительное секвенирование.

Так как для доминантных форм НМСН 2Р характерен поздний возраст проявления первых симптомов болезни, генетическое тестирование, направленное на поиск выявленной в данной семье мутации, является единственным способом определения генетического риска и профилактики рождения больных детей при достижении членами семей больных детородного возраста.

### Список литературы

1. Carr AS, Polke JM, Wilson J et al. MFN2 deletion of exons 7 and 8: founder mutation in the UK population. *J Peripher Nerv Syst.* 2015 Jun;20(2):67-71. doi: 10.1111/jns.12117. PubMed PMID: 26114802
2. Nicholson GA, Magdelaine C, Zhu D et al. Severe early-onset axonal neuropathy with homozygous and compound heterozygous MFN2 mutations. *Neurology.* 2008 May 6;70(19):1678-81. doi:10.1212/01.wnl.0000311275.89032.22. PubMed PMID: 18458227
3. Warner LE, Hilz MJ, Appel SH et al. Clinical phenotypes of different MPZ (P0) mutations may include Charcot-Marie-Tooth type 1B, Dejerine-Sottas, and congenital hypomyelination. *Neuron.* 1996 Sep;17(3):451-60. PubMed PMID: 8816708.
4. Ikegami T, Nicholson G, Ikeda H et al. A novel homozygous mutation of the myelin Po gene producing Dejerine-Sottas disease

(hereditary motor and sensory neuropathy type III). *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 May 6;222(1):107-10. PubMed PMID: 8630052

5. Гарсна-Sobrino T, Blanco-Arias P, Palau F et al. Phenotypical features of a new dominant GDAP1 pathogenic variant (p.R226del) in axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromuscul Disord.* 2017 Jul;27(7):667-672. doi: 10.1016/j.nmd.2017.01.008. Epub 2017 Jan 17. PubMed PMID: 28236508

6. Saporta AS, Sottile SL, Miller LJ et al. Charcot-Marie-Tooth disease subtypes and genetic testing strategies. *Ann Neurol* 2011;69:22-33;

7. Murphy SM, Laura M, Fawcett K et al. Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes and guidelines for genetic testing. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012;83:706-10

8. Рыжкова ОП, Кардымон ОЛ, Прохорчук ЕБ и др. Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS). *Медицинская генетика.* 2017 (7): 4-17

9. Nicolaou P, Cianchetti C, Minaidou A et al. A novel LRSAM1 mutation is associated with autosomal dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Eur J Hum Genet.* 2013 Feb;21(2):190-4. doi: 10.1038/ejhg.2012.146. Epub 2012 Jul 11. PubMed PMID:22781092; PubMed Central PMCID: PMC3548253

10. Weterman MA, Sorrentino V, Kasher PR et al. A frameshift mutation in LRSAM1 is responsible for a dominant hereditary polyneuropathy. *Hum Mol Genet.* 2012 Jan 15;21(2):358-70. doi:

10.1093/hmg/ddr471. Epub 2011 Oct 19. PubMed PMID: 22012984; PubMed Central PMCID: PMC3276280.

11. Guernsey DL, Jiang H, Bedard K et al. Mutation in the gene encoding ubiquitin ligase LRSAM1 in patients with Charcot-Marie-Tooth disease. *PLoS Genet.* 2010 Aug 26;6(8). pii: e1001081. doi:10.1371/journal.pgen.1001081. PubMed PMID: 20865121; PubMed Central PMCID:PMC2928813

12. Hakonen JE, Sorrentino V, Avagliano Trezza R et al. LRSAM1-mediated ubiquitylation is disrupted in axonal Charcot-Marie-Tooth disease 2P. *Hum Mol Genet.* 2017 Jun 1;26(11):2034-2041. doi:10.1093/hmg/ddx089. PubMed PMID: 28335037;

13. Engholm M, Sekler J, Schonendorf DC et al. A novel mutation in LRSAM1 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease with dominant inheritance. *BMC Neurol.* 2014 Jun 3;14:118. doi:10.1186/1471-2377-14-118. PubMed PMID: 24894446; PubMed Central PMCID:PMC4060843

14. Peeters K, Palaima P, Pelayo-Negro AL et al. Charcot-Marie-Tooth disease type 2G redefined by a novel mutation in LRSAM1. *Ann Neurol.* 2016 Dec;80(6):823-833. doi:10.1002/ana.24775. Epub 2016 Sep 30. PubMed PMID: 27686364

15. Nelis E, Berciano J, Verpoorten N et al. Autosomal dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease type 2 (CMT2G) maps to chromosome 12q12-q13.3. *J Med Genet.* 2004 Mar;41(3):193-7. PubMed PMID: 14985381; PubMed Central PMCID: PMC1735709