

# Мезомелическая дисплазия с преаксиальной полидактилией Вернера, обусловленная мутацией в регуляторном элементе ZRS гена *SHH*

Федотов В.П.<sup>1</sup>, Галеева Н.М.<sup>2</sup>, Поляков А.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> — Медико-генетическая консультация, Областная клиническая больница, Воронеж

<sup>2</sup> — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Медико-генетический научный центр»

Российской академии медицинских наук, Москва, 115478, ул. Москворечье, д.1; e-mail: dnalab@med-gen.ru

Мезомелическая дисплазия Вернера — редкое аутосомно-доминантное заболевание, характеризующееся сочетанием гипоплазии/аплазии большеберцовых костей с преаксиальной полидактилией и/или трёхфаланговым большим пальцем кистей. Молекулярно-генетической причиной заболевания, по данным литературы, являются мутации в положении 404 регуляторного элемента (ZRS) гена *SHH*, находящемся в гене *LMBR1*. В настоящей работе впервые в отечественной литературе приводится семейное наблюдение мезомелической дисплазии Вернера с молекулярно-генетической верификацией диагноза. У пациента с данным заболеванием впервые выявлена точковая замена в положении 403 регуляторного элемента ZRS гена *SHH*. По результатам исследования, можно предположить, что замены не только в положении 404 ZRS, но, возможно, и в окружающей области данного нуклеотида, помимо преаксиальной полидактилии и трёхфалангового большого пальца, приводят к поражению костей голени и мезомелической дисплазией Вернера.

**Ключевые слова:** мезомелическая дисплазия Вернера, преаксиальная полидактилия, трёхфаланговый большой палец, ZRS, *SHH*

## Введение

Врождённые аномалии развития конечностей — многочисленная группа генетически гетерогенных нарушений, широко распространённых повсеместно. Среди них аномалии развития пальцев кистей и стоп представлены как разнообразными нарушениями формы (брахиодактилии — 9 типов, клинодактилия), так и редукцией их числа (олигодактилии), а также сверхкомплектными пальцами (полидактилии). Известны как изолированные генетические формы преаксиальных и постаксиальных полидактилий с аутосомно-доминантным типом наследования, так и синдромальные (более 48 форм).

Одной из редких форм врождённых аномалий развития конечностей является мезомелическая дисплазия Вернера (MIM 188770), которая характеризуется сочетанием гипоплазии/аплазии большеберцовых костей с преаксиальной полидактилией и трёхфаланговым большим пальцем кистей. Первое клиническое наблюдение данного заболевания представлено в 1915 г. немецким акушером-гинекологом Р. Werner, который описал 20-летнюю беременную женщину с резким укорочением голеней из-за аплазии большеберцовых костей, с шестипальмыми кистями рук и удвоенными трёхфаланговыми большими пальцами, с семью и восемью пальцами на стопах.

На сегодняшний день в OMIM для данного заболевания приводятся только клинические описания нескольких спорадических случаев без молекулярно-генетической верификации. Однако в 2010 г. была опубликована работа, в которой впервые обнаружены две мута-

ции у двух неродственных пациентов с диагнозом *мезомелическая дисплазия Вернера*. В своём сообщении авторы представили данные об обнаружении двух точковых замен G>A и G>C в позиции 404 регуляторного элемента ZRS гена *SHH* [11].

ZRS (zone of polarizing activity regulatory sequence) — регуляторный элемент, отвечающий за инициацию и пространственную ориентацию экспрессии гена *SHH* в зоне поляризационной активности ZPA (zone of polarizing activity) развития конечностей. ZRS находится на расстоянии 1 млн п.н. от гена *SHH* в инtronе 5 гена *LMBR1* и содержит 800 пар оснований, консервативных у многих организмов (от рыб до млекопитающих) [5].

В мировой литературе мутации в регуляторном элементе гена *SHH* описаны при преаксиальной полидактилии второго типа, синдактилии четвёртого типа, трёхфаланговом большом пальце первого типа, трёхфаланговом большом пальце в сочетании с синдактилией.

В данной работе впервые в отечественной литературе приводится семейное наблюдение мезомелической дисплазии Вернера с молекулярно-генетической верификацией.

## Материалы и методы

У probanda с множественными аномалиями конечностей (полидактилия кистей рук и стоп, гипоплазия обеих большеберцовых костей, дисплазия тазобедренных суставов, внутренняя косолапость) были проведены клинико-генеалогическое, рентгенологическое исследо-

## СЛУЧАЙ ИЗ ПРАКТИКИ

вания, включая мультирезовую компьютерную томографию нижних конечностей.

Для молекулярно-генетического исследования использовали образцы геномной ДНК пробанда, выделение которой из лейкоцитов периферической крови выполняли с помощью набора реактивов DNA Prer100 фирмы DLAtom™ по протоколу производителя. Амплификацию фрагментов ДНК проводили методом ПЦР на программируемом термоциклире MC2 фирмы «ДНК-технология» (Россия) в 25 мкл реакционной смеси следующего состава: 0,1—1,0 мкг геномной ДНК; 0,25 мКМ каждого оригинального олигопраймера; по 200 мКМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата; 1,0 единица активности ДНК-полимеразы Biotaq («Биомастер»); буфер для ПЦР (67 мМ Tris-HCl; 16,6 мМ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,01% Twin-20; pH 8,8); 20—30 мкл минерального масла; концентрация  $\text{MgCl}_2$  3 мМ, температура отжига праймеров 62°C, длина фрагментов 1 и 2 — 200 и 300 п.н. соответственно.

- последовательность прямого праймера 1:  
5'-CCTCTGGCCAGTGTAAATG-3';
- последовательность обратного праймера 1:  
5'-GGGGAAAAAGTCATCTGGT-3';
- последовательность прямого праймера 2:  
5'-GGTGAAGCGAAGAGTTCTG-3';
- последовательность обратного праймера 2:  
5'-CAATTGGGGGATTGTAGAGG-3'.

Последовательность праймеров заимствована из работы M. Farooq с соавторами [4], синтез выполнен в ЗАО «SYNTOL».

Методом прямого автоматического секвенирования были исследованы последовательности предварительно амплифицированных фрагментов ДНК, содержащих последовательность регуляторного элемента ZRS гена *SHH*.



Рис. 1. Пациент с мезомелической дисплазией Вернера

Анализ результатов секвенирования проводился с помощью программы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

## Результаты

У пробанда наблюдается шестипалая правая кисть, изодактилия пальцев, агенезия тенара, семипалая левая кисть с изодактилией всех пальцев (трёхфаланговые), лучевые и локтевые кости одинаковой длины. Наблюдаются полидактилия стоп (семипальые с обеих сторон). Обе большеберцовые кости резко и асимметрично укорочены и утолщены даже в сравнении с бедренными костями. Обе малоберцовые кости значительно изогнуты, «саблевидной» формы приближаются к нормальной длине. У пробанда отсутствуют надколенники и оба проксимальных сустава между мало- и большеберцовыми костями. Проксимальные отделы малоберцовых костей расположены вне коленных суставов на уровне нижней трети диафизов бедренных костей, суставные поверхности, эпифизы бедренных костей резко деформированы. У пробанда наблюдаются варусные деформации голеностопных суставов, вертикальное положение таральных костей. При рентгенографическом исследовании тазобедренных суставов выявлена дисплазия тазобедренных суставов, вальгусная деформация обеих бедренных костей (рис. 1).

В семье пробанда аналогичные аномалии развития конечностей отмечаются у матери (45 лет) также инвалида детства: патологически низкий рост, непропорциональный за счёт резкого укорочения и деформации обеих голеней. Обе кисти пятитипальные с трёхфаланговыми первыми пальцами, отсутствием больших пальцев и аплазией мышц тенаров из-за отсутствия противопоставления больших пальцев остальным. Обе стопы шестипальые. Других родственников с подобными аномалиями в семье нет (рис. 2).

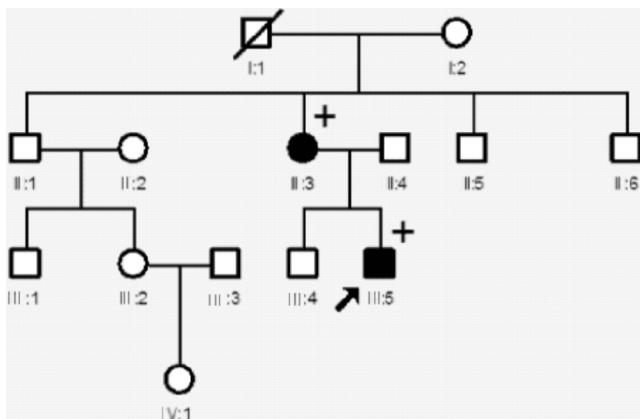


Рис. 2. Родословная семьи с мезомелической дисплазией Вернера

При исследовании ДНК пробанда в гетерозиготном состоянии выявлена точковая замена T>G в позиции 403 регуляторного элемента ZRS гена *SHH*, находящемся в гене *LMBR1*: *CATAAAAGTGACCTTGTAC* (*T>G*) *GTATTTATGACCAAGATGACTTT* (рис. 3). Название мутации присвоено по аналогии с работой M. Farooq с соавторами [4]. При исследовании ДНК 150 здоровых индивидуумов данная замена обнаружена не была.

### Обсуждение

На сегодняшний день описано около 30 мутаций в регуляторном элементе ZRS гена *SHH*, находящемся в гене *LMBR1*. Точковые мутации в гетерозиготном состоянии выявлены у больных с полидактилией и у больных с полидактилией в сочетании с трёхфаланговым большим пальцем. Описан пациент с заменой в ZRS в гомозиготном состоянии, фенотип которого не отличался от фенотипа его родственников, являющихся гетерозиготными носителями данной мутации [9]. Дупликации регуляторного элемента гена *SHH* встречаются при комбинированном фенотипе аномалий пальцев кистей и стоп [10], при полисиндактилии рук (type Haas) и при синдактилии четвёртого типа в сочетании с гипоплазией большой берцовой кости [12]. Также в семье с преаксиальной полидактилией второго типа в регуляторном элементе ZRS описана инсерция 13 букв [7].

При мезомелической дисплазии Вернера на сегодняшний день в четырёх неродственных семьях выявлены две точковые замены G>A и G>C в позиции 404 регуляторного элемента гена *SHH* [3, 11]. Первоначально мутация 404G>A была описана у больного с преаксиальной полидактилией [8]. Однако D. Wieczorek с соавторами считают, что диагноз преаксиальная полидактилия в данном случае был поставлен ошибочно, так как у больного имело место поражение большой берцовой кости. Интересно отметить, что у пациентов с одинаковой мутацией и даже у пациентов из одной семьи может на-

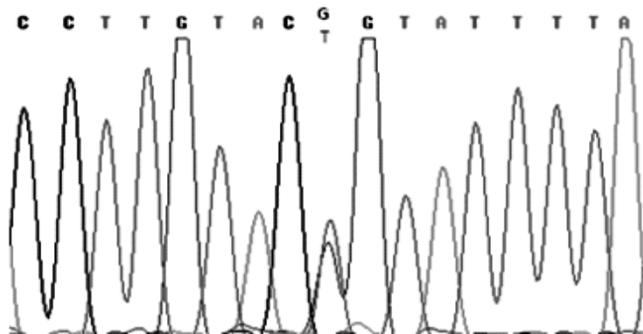


Рис. 3. Фрагмент результатов автоматического секвенирования регуляторного элемента ZRS гена *SHH*

блодаться разная степень поражения костей голени. Так в одной семье у пациентов в первом поколении отмечается лишь двусторонняя преаксиальная полидактилия рук, во втором — преаксиальная полидактилия рук в сочетании с резким укорочением голени, в третьем — синдактилия рук в сочетании с аплазией большой и малой берцовой кости [11].

В нашем случае у пациента с мезомелической дисплазией Вернера была выявлена замена T>G в консервативной позиции 403 регуляторного элемента ZRS гена *SHH*, находящемся в гене *LMBR1*. Другие точковые замены в этой области (в положениях 105, 295, 297, 305, 329, 334, 463, 619, 621, 739) были выявлены у больных с преаксиальной полидактилией или у больных с преаксиальной полидактилией в сочетании с трёхфаланговым большим пальцем без поражения костей голени [1, 2, 4–6, 8, 9]. Таким образом, до настоящего времени существовало предположение, что молекулярно-генетической причиной мезомелической дисплазии Вернера является именно замена в положении 404 ZRS [11]. По результатам данного исследования, можно предположить, что замены не только в положении 404 ZRS, но возможно и в окружающей области данного нуклеотида, помимо преаксиальной полидактилии и трёхфалангового большого пальца, приводят к поражению костей голени и мезомелической дисплазии Вернера.

### Список литературы

1. Albuission J., Isidor B., Giraud M., Pichon O. et al. Identification of two novel mutations in Shh long-range regulator associated with familial pre-axial polydactyly // Clin. Genet. — 2011. — №79. — P. 371—377.
2. Al-Qattan M., Abdulkareem I., Haidan Y. and Balwi M. A Novel Mutation in the SHH Long-Range Regulator (ZRS) Is Associated With Preaxial Polydactyly, Triphalangeal Thumb, and Severe Radial Ray Deficiency // American Journal Of Medical Genetics. — 2012. — Part A. — P. 1—6.

## СЛУЧАЙ ИЗ ПРАКТИКИ

3. Cho T.J., Baek G.H., Lee H.R., Moon H.J., Yoo W.J., Choi I.H. Tibial hemimelia-polydactyly-five-fingered hand syndrome associated with a 404 G>A mutation in a distant sonic hedgehog cis-regulator (ZRS): a case report // J. Pediatr. Orthop. B. — 2012.
4. Farooq M., Troelsen J., Boyd M., Eiberg H. et al. Preaxial polydactyly/triphalangeal thumb is associated with changed transcription factor-binding affinity in a family with a novel point mutation in the long-range cis-regulatory element ZRS // European Journal of Human Genetics. — 2010. — 18. — P. 733—736.
5. Furniss D., Lettice L., Taylor I., Critchley P., Giele H. et al. A variant in the sonic hedgehog regulatory sequence (ZRS) is associated with tripalangeal thumb and deregulates expression in the developing limb // Human Molecular Genetics. — 2008. — Vol. 17, №16. — P. 2417—2423.
6. Gurnett C., Bowcock A., Dietz F., Morcuende J. et al. Two Novel Point Mutations in the Long-Range SHH Enhancer in Three Families With Tripalangeal Thumb and Preaxial Polydactyly // American Journal of Medical Genetics. — 2007. — Part A. 143. — P. 27—32.
7. Laurell T., Mee J., Wenger A., Grigelioniene G. A Novel 13 Base Pair Insertion in the Sonic Hedgehog ZRS Limb Enhancer (ZRS/LMBR1) Causes Preaxial Polydactyly with Tripalangeal Thumb // Human Mutation. — 2012. — Vol. 00, №0. — P. 1—4.
8. Lettice L., Heaney S., Purdie L., Li L., Beer P. et al. A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly // Human Molecular Genetics. — 2003. — Vol. 12, №14.
9. Semerci C., Demirkiran F., Ozdemir M., Biskin E. et al. Homozygous feature of isolated tripalangeal thumb-preaxial polydactyly linked to 7q36: no phenotypic difference between homozygotes and heterozygotes // Clin. Genet. — 2009. — №76. — P. 85—90.
10. Sun M., Ma F., Zeng X., Liu Q., Zhao X. et al. Tripalangeal thumb-polysyndactyly syndrome and syndactyly type IV are caused by genomic duplications involving the long range, limb specific SHH enhancer // J. Med. Genet. — 2008. — №45. — P. 589—595.
11. Wieczorek D., Pawlik B., Li Y., Akarsu N. et al. A Specific Mutation in the Distant Sonic Hedgehog (SHH) Cis-Regulator (ZRS) Causes Werner Mesomelic Syndrome (WMS) While Complete ZRS Duplications Underlie Haas Type Polysyndactyly and Preaxial Polydactyly (PPD) With or Without Tripalangeal Thumb // Human Mutation. — 2010. — Vol. 31, №1. — P. 81—89.
12. Wu L., Liang D., Niikawa N., Ma F., Sun M. et al. A ZRS Duplication Causes Syndactyly Type IV With Tibial Hypoplasia // American Journal Of Medical Genetics. — 2009. — Part A. — P. 816—818.

### Werner mesomelic syndrome with preaxial polydactyly, induced by mutation in zone of polarizing activity regulatory sequence (ZRS) of gene *SHH*

Fedotov V.P.<sup>1</sup>, Galeeva N.M.<sup>2</sup>, Polyakov A.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> — Regional Clinical Hospital, Genetic counseling, Voronezh, Russian Federation

<sup>2</sup> — Research Centre for Medical Genetics, 115478, Moscow, ul. Moskvorechye, 1, Russian Federation; e-mail: dnalab@med-gen.ru

Werner mesomelic syndrome is an autosomal dominant disorder characterized by hypo- or aplasia of the tibiae in addition to the preaxial polydactyly (PPD) and/or tripalangeal thumb. To date molecular-genetic cause of disease is mutations at position 404 of the zone of polarizing activity regulatory sequence (ZRS), a long-range limb-specific enhancer of the sonic hedgehog (*SHH*) gene, which situated in *LMBR1* gene. This article reports about first family with Werner mesomelic syndrome with molecular confirmation in Russia. New mutation in patient at position 403 within the ZRS region was detected. These data suggest that transitions not only at position 404 within the ZRS region lead to a more severe clinical phenotype with the affection of tibial development.

**Key words:** Werner mesomelic syndrome, preaxial polydactyly, tripalangeal thumb, ZRS, *SHH* gene