В. П. Сокольник, Р. Д. Хмель

МУТАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ NAIP-ГЕНА В СЕМЬЯХ СО СПИНАЛЬНОЙ МЫШЕЧНОЙ АТРОФИЕЙ

Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя»

В настоящей работе представлены данные по мутационному изучению NAIP-гена у 49 пациентов с клиническим диагнозом спинальная мышечная атрофия (СМА), у 91 члена их семей без признаков СМА (86 родителей и 5 сибсов) и у 120 новорожденных белорусской популяции. Результаты исследования показали, что NAIP-ген делеционно изменен у 43% пациентов со СМА I и у 3,5% их родителей. В целом, проведенные исследования указывают на высокую степень делеционных мутаций у пациентов с тяжелой формой СМА.

Ключевые слова: *спинальная мышечная атрофия, NAIP-ген, NLRs, делеционный анализ.*

V. P. Sokolnik, R. D. Khmel

MUTATION ANALYSIS OF THE NAIP GENE IN SPINAL MUSCULAR ATROPHY FAMILIES

In this report we present the deletion analysis of the NAIP gene (exons 4 and 12) in 49 SMA patients, in 91 members of their families (86 parents and 5 siblings) and in 120 newborns. Our studies demonstrated that NAIP gene was deleted in about 43% of SMA 1 patients and in 3,5% of their parents. Taken together, these results provided evidence for high incidents of the NAIP gene deletion mutations in SMA I patients.

Key words: *spinal muscular atrophy, NAIP gene, NLRs, deletion analysis.*

NAIP-ген (the gene for neuronal apoptosis inhibitory protein), в настоящее время известный также как BIRC1-ген (the baculovirus inhibitor of apoptosis repeat containing protein gene), был идентифицирован группой исследователей из Оттавы, возглавляемой A. MacKenzie в 1995 г., как претендующий на роль детерминирующего гена для спинальной мышечной атрофии (СМА) [14]. В настоящее время общепринятой является точка зрения о том, что мутационные изменения этого гена детерминируют тяжесть заболевания. Получены также данные, указывающие на вовлечение NAIP в регуляцию морфогенеза и поддержание стабильности функционирования некоторых органов и тканей [5, 8]. Показано, что характер экспрессии NAIP изменен при таких заболеваниях как синдром Дауна, болезнь Альцгеймера, некоторые формы рака [2, 15].

У человека NAIP-ген расположен в локусе q13.1 пятой хромосомы и является мультикопийным геном. Полная копия гена ($NAIP^{ful}$) образована, по меньшей мере, 16 экзонами [1, 14]. Кроме полной копии имеются 5“-и 3“-делетированные формы (NAIP1, NAIP2, YNAIP1, YNAIP2) [13, 14]. Кодируемые белки относят к высококонсервативному классу белков-супрессоров апоптоза IAP (the inhibitors of apoptosis) благодаря наличию в структуре BIR-повторов (baculoviral inhibitory repeats). Кроме этого, как было недавно предположено, NAIP, или некоторые из его укороченных копий, кодируют белки, принадлежащие к семейству NLRs (NOD-like receptors, известные также под названиями NOD-LRR, NACH-LRR и CATERPILLER), потому что своей нуклеотидной структурой детерминирует домены NOD (nucleotide binding oligomerization domain) и LRR (leucine-rich repeat) [3, 13]. NLRs входят в группу узнающих паттерн рецепторов (PRRs – английская аббревиатура pattern recognition receptors) наряду с ещё тремя семействами белков – TLRs (toll-like receptors), CLRs (C-tipe lectin receptors) и RLHs (RIG-like helicases). Эти белки являются составляющей частью врожденного иммунитета, так как обеспечивают узнавание структурных компонентов патогенов и индуцируют соответствующий иммунный ответ [10, 12]. В частности, различные Naip (гомологичный мултикопийный ген у мышей) детерминируют специфичность NLRC4-инфламмасомы относительно бактериальных лигандов [7, 16]. NLRC4 инфламмасома – это цитоплазматический мультибелковый комплекс, содержащий протеин NLRC4 (NLR family, CARD domain containing 4) и индуцирующий врожденный иммунный ответ на бактериальные белки флагеллин и PrgJ посредством активации каспазы 1. В геноме мыши имеется 7 паралогичных копий гена (Naip1 – 7). Показано, что для активации NLRC4 бактериальным белком PrgJ требуется Naip2, а для индукции ответа на флагеллин – Naip5 и Naip6 [7, 16].

В настоящее время предполагается, что гены, кодирующие PRRs, имеют непосредственное отношение к механизмам развития ряда патологических состояний [11, 12].

Цель исследования: делеционный анализ гена NAIP в семьях, имеющих детей со СМА.

Материал и методы

Обследовано 49 пациентов с клиническим диагнозом СМА, 91 член их семей без признаков СМА (86 родителей и 5 сибсов) и 120 новорожденных белоруской популяции. 4-и 12-ый экзоны NAIP-гена (номера экзнов приведены согласно Chen с соавт. [1]) амплифицировали и анализировали как описано ранее [14]. Подтверждение необычных результатов (наличие делеций у асимптоматичных родителей) и анализ NAIP-гена у новорожденных проводили с помощью метода амплификации ДНК из высушенных пятен крови [9].

Результаты и обсуждение

Спинальная мышечная атрофия (СМА) – полиморфная группа наиболее часто встречающихся нейромышечных заболеваний с аутосомно-рецессивным типом наследования. Главным морфологическим проявлениям болезни является дегенерация нейронов передних рогов спинного мозга.

В зависимости от времени появления симптомов заболевания и его тяжести выделяют три детские формы: СМА I (болезнь Верднига – Гоффманна, тяжелая форма заболевания), СМА II (промежуточная по тяжести) и СМА III (болезнь Кугельберга – Веландера, наиболее легкая форма СМА). В исследуемую группу пациентов вошли дети, имеющие все три формы СМА: со СМА I обследовано 28 детей, со СМА II – 13 и со СМА III – 8.

Проведенное исследование показало, что экзон 4 NAIP-гена отсутствовал у 12 из 49 проанализированных пациентов со СМА, что составило 24,5%, при этом все они имели тяжелую форму заболевания – СМА I. Среди пациентов со СМА I частота выявления данной мутации равна 43%. Делеционное изменение NAIP-гена имели также 3 родителя детей со СМА из 86 обследованных, что составило 3,5%. Полученные нами ранее данные свидетельствовали о том, что, в отличие от родителей, все пациенты, наряду с мутациями в NAIP-гене, имели делеционные изменения гена SMN1 (survival motor neuron 1 gene), который в настоящее время рассматривается как ген, детерминирующий СМА. В изученной группе новорожденных мутаций в NAIP-гене не обнаружено. В целом, проведенное исследование подтвердило полученные ранее данные о высокой степени мутирования NAIP-гена при тяжелой форме СМА. Выявленные делеционные изменения могут указывать на отсутствие полной копии гена и приводить к недостатку белков, содержащих BIR-повторы. Исследователи, обнаружившие NAIP-ген, предположили, что такие мутации могут способствовать ослаблению ингибиции апоптоза, имеющей место в эмбриогенезе центральной нервной системы в норме, а это, в свою очередь, приведет к усилению гибели моторных нейронов [14]. И действительно, в дальнейшем было показано, что полная копия NAIP подавляет запрограммированную клеточную гибель благодаря ингибиции каспаз BIR-доменом [3].

Однако механизмы, посредством которых мутации этого гена детерминируют тяжесть СМА, по-видимому, не ограничены нарушением антиапоптозной функции NAIP в моторных нейронах. Так, селективное обнаружение NAIP в кишечных ворсинах и особенности его структурного устройства предполагают, что белок может способствовать выживанию клеток, подвергающихся терминальной дифференцировке, и функционировать как рецептор для узнавания кишечных патогенов [8]. Предполагается также, что количественный дисбаланс белков, кодируемых этим геном, может способствовать развитию почечной гипоплазии и связанной с ней гипертензии [5]. Данные, полученные на экспериментальных животных, показали, что Naip5 играет ключевую роль в апоптотическом функционировании макрофагов [4], на что указывает экспрессия Naip5 в этих клетках и ее модуляция внутриклеточными компонентами патогенов. С медицинской точки зрения было бы полезным изучение функционирования этих органов и клеток у пациентов со СМА, имеющих мутации в NAIP-гене.

Пути, посредством которых NAIP реализует свои функции в различных тканях, в настоящее время изучены недостаточно. Недавно получены данные, указывающие на то, что и у человека экспрессируются множественные изоформы NAIP-белков, которые возникают в результате транскрипции гена $NAIP^{ful}$ и его частично делетированных копий – NAIP1 и NAIP2. Более того, существует несколько дополнительных точек инициации транскрипции: в качестве промотора могут использоваться AluSINE и ERV-P LTR, а для NAIP1 и NAIP2 имеется ещё и точка инициации транскрипции в последнем интроне прилежащего гена GUSBP1. Показано, что в различных тканях отдельные белки экспрессируются дифференциально. Наивысшая степень экспрессии 5“-транскриптов обнаружена в печени (предполагается, что они транскрибируются из $NAIP^{ful}$), в то время как 3“-транскриптов больше всего найдено в яичке [13]. Предполагается, что белки, теряющие BIR-повторы, могут приобретать новые функции или регулировать активность антиапоптозных NAIP-протеинов [13].

Проведенный нами выборочный ретроспективный анализ медицинской документации показал наличие выявленной с помощью ультразвукового исследования кисты печени у пробанда со СМА, имеющего делеционные изменения NAIP-гена. В настоящий момент мы не можем утверждать однозначно, что данное наблюдение является доказательством вовлечения NAIP-гена в патологическое изменение печени у этого пациента. Однако в литературе имеются экспериментальные данные [6], полученные на модельных мышах, свидетельствующие о важной роли печени в патогенезе тяжелых форм заболевания, что авторы работы связывают с геном SMN. В нашем случае SMN1-ген был также делеционно изменен. Следует отметить, что в этой семье 4-ый экзон NAIP-гена не выявлен и у отца пробанда, это может указывать на отсутствие у него копий, содержащих 5“-экзоны. Несмотря на то, что на данный момент СМА-асимптоматичные члены подобных семей рассматриваются как здоровые, в будущем профилактическое медицинской наблюдение за ними, возможно, окажется полезным в установлении этиологии других болезней, отличных по клиническому течению от СМА, например, частых респираторных заболеваний, наличия гипертензии или кистозных изменений в печени.

Таким образом, в дальнейшем необходимо изучение состава NAIP-белков при СМА и оценка изменения их функций не только как ингибиторов апоптоза, но и как внутриклеточных белков-сенсоров, имеющих отношение к реализации механизмов врожденного иммунитета. Наличие гомозиготных делеционных изменений NAIP-гена у пациентов со СМА позволяет предположить дисбаланс NAIP-белков также и у гемизиготных родителей. В связи с фундаментальной биологической ролью NAIP все они нуждаются в дальнейшем медицинском наблюдении.

Литература

1. Chen, Q., Baird, S.D., Mahadevan, M. [et al.] // Genomics. 1998. Vol. 48, № 1. P. 121 – 127.

2. Choi, J., Hwang, Y.K., Choi, Y. J. [et al.] // J. Korean Med. Sci. 2007. Vol. 22. P. S17 – 23.

3. Davoodi, J., Lin, L., Kelly, J. [et al.] // J. Biol. Chem. 2004. Vol. 279, № 39. P. 40622 – 40628.

4. Diez, E., Yaraghi, Z., MacKenzie, A., Gros, P. // J. Immunol. 2000. Vol. 164, № 3. P. 1470 – 1477.

5. Dziarmaga, A., Hueber, P., Iglesias, D. [et al.] // Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2006. Vol. 291. P. F913 – F920.

6. Hua, Y., Sahashi, K., Rigo, F. [et al.] // Nature. 2011. Vol. 478. P. 123 – 126.

7. Kofoed, E.M., Vance, R.E. // Nature. 2011. Vol. 477. P. 592 – 595.

8. Maier, J.K.X., Balabanian, S., Coffill, C.R. [et al.] // DOI: 10.1369 / jhc. 6A7144. 2007.

9. Makowski, G.S., Aslanzadeh, J., Hopfer, S.M. // Clin. Chem. 1995. Vol. 41, № 3. P. 477 – 479.

10. Meylan, E., Tschopp, J., Karin, M. // Nature. 1996. Vol. 442. P. 39 – 44.

11. Nejentsev, S., Walker, N., Riches, D. [et al.] // Science. 2009. V. 324, № 5925. P. 387 – 389.

12. Netea, M.G. and van der Meer, J.W.M. // N. Engl. J. Med. 2011. Vol. 364, № 1. P. 60 – 70.

13. Romanish, M.T, Nakamura, H., Lai, C.B. [et al.] // PloS ONE. 2009. Vol. 4, № 6. P. e5761.

14. Roy, N., Mahadevan, M.S., McLean M. [et al.] // Cell. 1995. Vol. 80, № 1. P. 167 – 178.

15. Yamamoto, K., Abe, S., Nakagawa, Y. [et al.] // Leuk. Res. 2004. Vol. 28, № 11. P. 1203 – 1211.

16. Zhao, Y., Yang, J., Shi, J. [et al.] // Nature. 2011. Vol. 477. P. 596 – 600.

Поступила 10.11.2011 г.