

Спектр мутаций гена коннексина-32 (gjb1) у больных с невралной амиотрофией шарко-мари-тус тип 1X в Беларуси

ГУ Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя», МЗ РБ

Ключевые слова: невралная амиотрофия Шарко-Мари-Тус 1X типа, коннексин-32, ген GJB1, мутация.

СМТ1X – наследственная невропатия с X-сцепленным типом наследования. Мутации в гене GJB1 являются вторыми по частоте среди других форм СМТ после дупликации гена PMP22. Образцы ДНК от пробандов мужского пола с предположительным X-сцепленным типом наследования были протестированы на наличие точечных мутаций в гене GJB1. Мутации во втором экзоне гена GJB1 обнаружены в 7 семьях у 16 человек: у 7 из 33 пробандов (что составило 21,2%) и у 9 из 11 родственников. Из семи идентифицированных мутаций четыре мутации, ассоциированные с тяжелым фенотипом, выявлены и описаны нами впервые в мире.

Невралная амиотрофия Шарко-Мари-Тус (СМТ – от англ. Charcot-Marie-Tooth) – генетически гетерогенная группа наследственных заболеваний периферической нервной системы. СМТ 1X типа является вторым по частоте генетическим вариантом демиелинизирующих полиневропатий, наследуется по X-сцепленному доминантному типу с ограниченной пенетрантностью у женщин и составляет 10-20% от всех заболеваний этой группы [11]. Мужчины с СМТ1X поражены обычно тяжелее, чем женщины.

Клиническая картина СМТ1X у мужчин сходна с картиной СМТ1А, но заболевание протекает несколько тяжелее и характеризуется выраженным клиническим полиморфизмом [1]. Типичный возраст начала болезни у мужчин 5-25 лет (чаще на первой декаде жизни) [10]. Прогрессирование в большинстве случаев медленное, иногда состояние остается стабильным многие годы. У женщин – носительниц мутации может не быть проявлений болезни, но нередко отмечается легкая клиническая картина. Поражение периферических нервов у больных женщин менее выражено, что объясняется наличием нормальной копии гена GJB1 второй X-хромосомы. Появление выраженных клинических симптомов заболевания у женщин может быть связано с преимущественной инактивацией X-хромосомы, несущей нормальную копию гена GJB1, а также со значительной функциональной неполноценностью гена при наличии ряда нонсенс-мутаций в гене GJB1 [2, 13].

При изучении клинико-генетических корреляций при СМТ1X, показаны различия в тяжести клинических проявлений заболевания у больных в зависимости от типа и локализации мутаций в гене GJB1 [5, 9]. Эти различия объясняются особенностями патогенетических механизмов заболевания, реализующихся при различных мутациях, нарушающих аминокислотную последовательность отдельных доменов.

Клинические проявления СМТ1X менее выражены при миссенс-мутациях, чем при нонсенс-мутациях, приводящих к остановке синтеза белка [4]. Однако при некоторых миссенс-мутациях также описано возникновение выраженного фенотипа заболевания, что объясняется функциональной значимостью белкового домена, в котором находится мутация, или определенной аминокислоты.

Ген GJB1 (gap junction beta 1 protein), мутации в котором приводят к развитию заболевания, локализован в области хромосомы Xq13.1 и состоит из двух экзонов, один из которых является кодирующим. Продукт гена – белок коннексин-32 (Cx32), который состоит из 283 аминокислот и имеет 9 доменов: 4 трансмембранных, 2 экстрацеллюлярных и 3 интрацеллюлярных [3].

Белок коннексин-32 (Cx32) принадлежит к классу белков межклеточных контактов. Такие белки образуют прямые межклеточные каналы между однотипными клетками и участвуют в факультативном транспорте ионов и небольших молекул между ними [7]. В основном Cx32 экспрессируется и функционирует в шванновских клетках периферических нервов. Места его локализации – некомпактный миелин в области контактов между соседними шванновскими клетками (перехват Ранвье) и некомпактный миелин щелей Шмидта-Лантермана [12]. Шесть одинаковых белков Cx32 олигомеризуются в мембране шванновской клетки, образуя полуканал (коннексон). Два коннексона в прилежащих мембранах формируют между соседними слоями миелина прямой внутриклеточный канал. Такие каналы делают возможным транспорт ионов и низкомолекулярных питательных веществ между слоями миелина по направлению к внутренним слоям миелиновой оболочки и аксону, обеспечивая их трофику [6].

К настоящему времени в гене *CJB1* идентифицировано более 300 мутаций, которые нарушают синтез белка, и, соответственно, приводят к развитию СМТ1Х, и их количество с каждым годом увеличивается [14].

Материалы и методы

Исследуемую группу составили пробанды мужского пола, у которых неврологическая патология могла иметь X-сцепленный тип наследования. В случае обнаружения мутации у пробанда анализ проводился также другим членам семьи.

В качестве биологического материала для исследования использовалась геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови методом фенол-хлороформной экстракции [8]. Все образцы ДНК были протестированы на наличие точечных мутаций в гене *GJB1*, являющихся причиной СМТ1Х, методом прямого секвенирования кодирующей последовательности гена. Выполнение методики включало в себя пять основных этапов:

- Амплификация экзонных последовательностей с помощью стандартной ПЦР;
- Очистка продуктов ПЦР от компонентов реакции методом преципитации полиэтиленгликолем и этанолом;
- Реакция секвенирования ПЦР-продукта с использованием одного из экзонных праймеров;
- Очистка продуктов секвенирующей реакции методом преципитации этанолом;
- Анализ полученных фрагментов ДНК в генетическом анализаторе.

Смесь для ПЦР с конечным объемом 20 мкл содержала 100 нг ДНК, 1хПЦР буфер, 2,5мМ MgCl₂, 200 мкМ dATP/dCTP/dTTP/dGTP, 5 пМ праймеров и 0,75 единиц активности Taq-полимеразы. Для амплификации использовали праймеры, фланкирующие три фрагмента 2-го экзона гена *GJB1* [9]:

Cx1 TGA GGC AGG ATG AAC TGG ACA GGT

Cx2 TTG CTG GTG AGC CAC GTG CAT GGC

Cx3 ATC TCC CAT GTG CGG CTG TGG TCC

Cx5 GAT GAT GAG GTA CAC CAC CT

CxS1 CGT CTT CAT GCT AGC TGC CTC TGG

CxA1 TGG CAG GTT GCC TGG TAT GT

Реакцию секвенирования выполняли с наборами ABI PRISM BIGDYE TERMINATOR V1.1 READY REACTION CYCLE SEQUENCING KIT по методике производителя. Для синтеза фрагмента ДНК использовали один из праймеров.

После очистки продукта секвенирующей реакции высушенную пробу растворяли в 20 мкл формамида. Пробы денатурировали 2 мин при 95°C, после чего пробирки быстро охлаждали во льду. Электрофорез проводили в генетическом анализаторе ABI PRISM 310

при следующих параметрах: длина капилляра – 36 см; заполнение капилляра 4% полимером POP-4™; температура – 500С; время инъекции образца в капилляр 15-30 сек; время разделения 30 мин; напряжение 11 кВ. Обработку результатов выполняли с помощью пакета компьютерных программ GENESCAN и GENOTYPER (Applied Biosystems).

Результаты и обсуждение

СМТ1Х – наследственная невропатия с Х-сцепленным типом наследования. Мутации в гене GJB1 являются вторыми по частоте среди других форм СМТ после дупликации гена PMP22. Исходя из этого, после исключения дупликации, образцы ДНК от пробандов мужского пола, у которых неврологическая патология могла иметь Х-сцепленный тип наследования, были протестированы на наличие точечных мутаций в гене GJB1, являющихся причиной СМТ1Х. В случае обнаружения мутации у пробанда анализ проводился также другим доступным для исследования членам семьи.

Для определения редких и поиска ранее не описанных мутаций в гене GJB1 секвенирование кодирующей последовательности гена проведено в 44 образцах ДНК (33 пробанда, 11 родственников). В общей сложности определена нуклеотидная последовательность 116 фрагментов ДНК. При выполнении исследования идентификацию мутаций проводили исходя из зафиксированных изменений в последовательности нуклеотидов в анализируемом фрагменте ДНК.

Мутации во втором экзоне гена GJB1 обнаружены в семи семьях у 16 человек: у 7 из 33 пробандов, что составило 21,2% и у 9 из 11 родственников. Из семи мутаций четыре мутации, ассоциированные с тяжелым фенотипом, выявлены и описаны нами впервые в мире. Пять нуклеотидных замен приводят к возникновению миссенс-мутаций в различных доменах белка. Мутация W133X принадлежит к классу нонсенс-мутаций и вызывает остановку процесса белкового синтеза. Мутация X284L является примером очень редкой нонстоп-мутации, при которой исчезает последовательность, служащая сигналом для остановки синтеза нормальной белковой молекулы. В одном образце обнаружен полиморфизм, не приводящий к замене аминокислоты. Характеристика обнаруженных нуклеотидных замен представлена в таблице 3.1.

Таблица 1 - Данные о мутациях в гене GJB1, обнаруженных у пациентов с СМТ1Х

№ п/п	Мутация	Положение мутации (нуклеотидная замена)	Изменение в кодирующем кодоне	Домен	Название мутации по Международной номенклатуре	Число имеющих мутацию
1.	Ser50Cys	c.149C>G*	TCC→TGC	EC1	S50C	3
2.	Leu90Phe	c.268C>A*	CTC→ATC	TM2	L90I	3
3.	Tyr135Cys	c.404A>G	TAT→TGT	TM3	Y135C	1
4.	Trp133Stop	c.398G>A*	TGG→TAG	TM3	W133X	2
5.	Val181Met	c.541G>A	GTG→ATG	EC2	V181M	3
6.	Glu208Lys	c.622G>A	GAG→AAG	С-конец	E208K	2
7.	Stop284Leu	c.851G>T*	TGA→TTA	С-конец	X284L	2
8.	Leu79Leu (полморф)	c.235C>T	CTG→TTG	TM2	L79L	1

* мутации, описанные впервые в мире

Ниже приводится описание четырех новых мутаций.

G идентифицирована у двух братьев от разных браков>Мутация c.149C (полусибсы), имеющих тяжелую невропатию. У обоих пациентов первые клинические признаки проявились в возрасте 10-11 лет. Мать, не имеющая симптомов заболевания, является гетерозиготным носителем мутантного гена. Миссенс-мутация, названная в

соответствии с международной номенклатурой S50C (Ser50Cys), приводит к замене серина на цистеин в 50 кодоне первого экстрацеллюлярного домена белка коннексина 32. У здоровых родственников данная мутация не обнаружена. Результаты секвенирования представлены на рисунке 1.

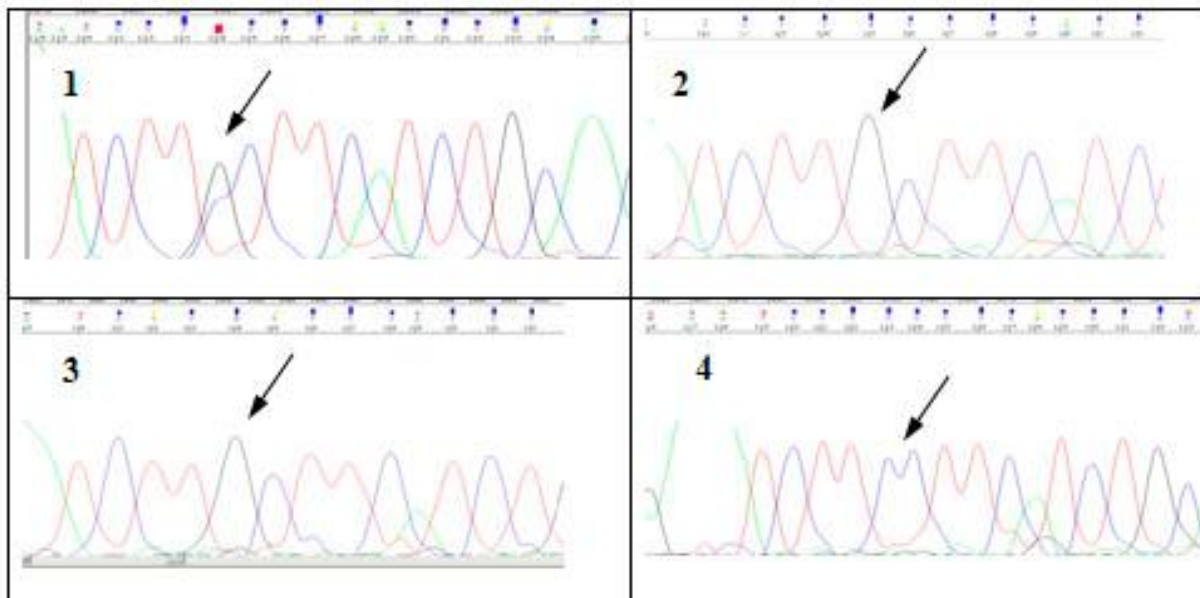


Рисунок 1. Результаты секвенирования второго экзона гена Cx32: 1 –мать пробанда, 2 – пробанд, 3 – брат пробанда, 4 – дядя пробанда. Стрелкой отмечено G.>место нуклеотидной замены с.149С

А выявлена у мужчины-пробанда с тяжелой невропатией. Две>Мутация с.268С его дочери являются гетерозиготными носительницами мутантного гена, и соответственно имеют 50% риск рождения больных сыновей. Мутация приводит к замене лейцина на изолейцин в 90 кодоне второго трансмембранного домена белка и обозначается как L90I (Lei90Ile). Результаты секвенирования представлены на рисунке 2.

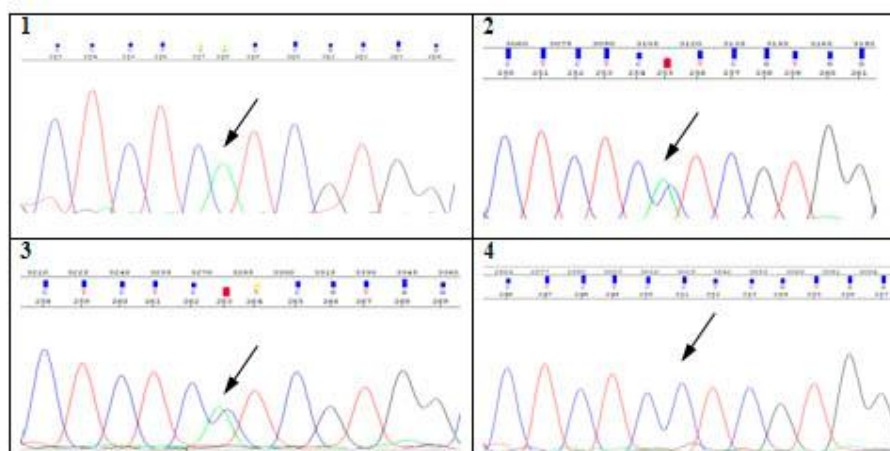


Рисунок 2. Результаты секвенирования второго экзона гена GJB1: 1 – пробанд 2 – первая дочь пробанда, 3 – вторая дочь пробанда, 4 – норма. Стрелкой отмечено A.>место нуклеотидной замены с.268С

Т идентифицирована у пробанда с тяжелой невропатией,>Мутация с.851G первые клинические признаки которой проявились еще в дошкольном возрасте. Мать пробанда также имеет симптомы заболевания, но менее выраженные и является гетерозиготным

носителем мутантного гена. Нонстоп-мутация, названная в соответствии с международной номенклатурой X284L (Stop284Leu), приводит к замене терминирующего кодона белка коннексина-32 на лейцин в 284 положении. Результаты секвенирования представлены на рисунке 3.

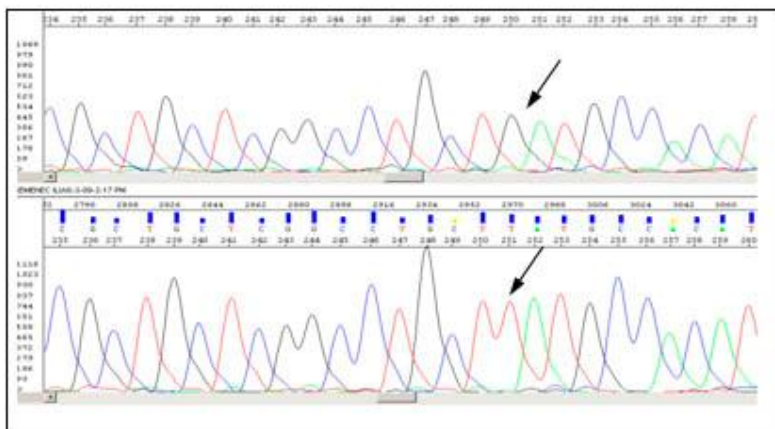


Рисунок 3. Результаты секвенирования второго экзона гена GJB1: 1 – норма, 2 – T>пробанд. Стрелкой отмечено место нуклеотидной замены с.851G

А идентифицирована у пробанда, имеющего тяжелую>Мутация с.398G невропатию. Первые клинические признаки проявились на первой декаде жизни. Мать пробанда, не имеющая симптомов заболевания, является гетерозиготным носителем мутантного гена. Нонсенс-мутация, названная в соответствии с международной номенклатурой W133X (Trp133Stop), приводит к замене триптофана на стоп-кодон в 133 кодоне белка коннексина-32, вызывает остановку процесса белкового синтеза. У клинически здоровой сестры пробанда, не имеющей признаков заболевания, данная мутация не обнаружена. Результаты секвенирования представлены на рисунке 4.

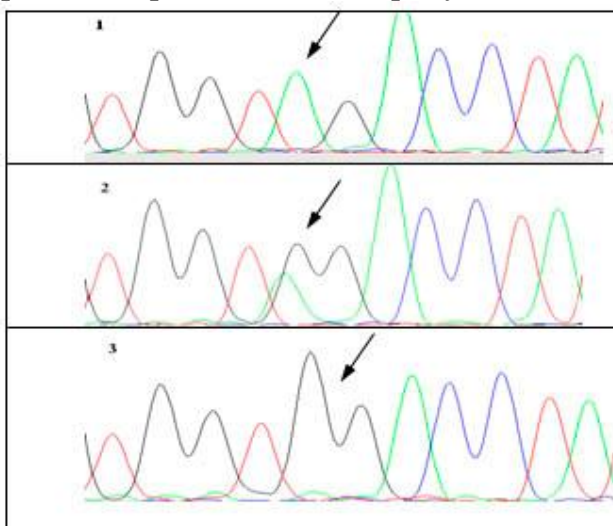


Рисунок 4. Результаты секвенирования второго экзона гена GJB1: 1 – пробанд, 2 – мать пробанда, 3 – норма. Стрелкой отмечено место нуклеотидной замены A.>с.398G

В общей сложности из семи выявленных нами мутаций четыре описаны впервые. Пять нуклеотидных замен приводят к возникновению миссенс-мутаций в различных доменах белка. Одна мутация принадлежит к классу нонсенс-мутаций и одна является нонстоп-мутацией. Высокая частота мутаций гена GJB1 (21,2%) у пациентов с неврологической патологией и возможным X-сцепленным типом наследования, свидетельствует о

необходимости исследования данного гена с целью молекулярно-генетической диагностики СМТ1Х. Применение методов ДНК-анализа будет способствовать раннему выявлению заболевания и его своевременной профилактике.

Литература

1. Дадали, Е. Л. Клинические характеристики наследственной моторно-сенсорной невропатии с мутациями в гене коннекина-32 / Е. Л. Дадали [и др.] // Неврол. журнал. 2001. Т. 6, № 6. С. 13–17.
2. Дадали, Е. Л. Клинико-генетический анализ наследственной моторно-сенсорной невропатии IX типа (НМСНIX) / Е. Л. Дадали [и др.] // Мед. генетика. 2004. Т. 3, № 5. С. 235–241.
3. Bergoffen, J. Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease / J. Bergoffen [et al.] // Science. 1993. Vol. 262. P. 2039–2042.
4. Birouk, N. X-linked Charcot-Marie-Tooth disease with connexin 32 mutations / N. Birouk [et al.] // Neurology. 1998. Vol. 50. P. 1074–1082.
5. Braathen, G. J. Two novel connexin 32 mutations cause early onset X-linked Charcot-Marie-Tooth disease / G. J. Braathen [et al.] // BMC Neurology. 2007. Vol. 7. P. 19–27.
6. Bruzzone, R. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling / R. Bruzzone [et al.] // Eur. J. Biochem. 1996. Vol. 15. P. 1–27.
7. Castro, C. Altered formation of hemichannels and gap junction channels caused by C-terminal connexin-32 mutations / C. Castro [et al.] // J. Neurosci. 1999. Vol. 19. P. 3752–3760.
8. Davies, K. E. Human genetic diseases: a practical approach / K. E. Davies // Oxford: IRL press. 1986. P. 56.
9. Dubourg, O. Clinical, electrophysiological and molecular genetic characteristics of 93 patients with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease / O. Dubourg [et al.] // Brain. 2001. Vol. 124. P. 1958–1967.
10. Hahn, A. F. X-linked dominant hereditary motor and sensory neuropathy / A. F. Hahn [et al.] // Brain. 1990. Vol. 113. P. 1511–1525.
11. Haites, N. E. 3rd Workshop of the European CMT consortium: 54th ENMC International Workshop on Genotype/Phenotype Correlations in Charcot-Marie-Tooth type 1 and Hereditary Neuropathy with Liability to Pressure Palsies 28–30 November 1997, Naarden, The Netherlands / N. E. Haites [et al.] // Neuromuscul. Disord. 1998. Vol. 8. P. 591–603.
12. Scherer, S. Connexin 32 is a myelin-related protein in the PNS and CNS / S. Scherer [et al.] // J. Neurosci. 1995. Vol. 15. P. 8281–8294.
13. Wicklein, E. M. Missense mutation (R15W) of the connexin32 gene in a family with X chromosomal Charcot-Marie-Tooth neuropathy with only female family members affected / E. M. Wicklein [et al.] // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 1997. Vol. 63. P. 379–381.
14. www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations