

О.А.Якуц<sup>1</sup>, К.А. Моссэ<sup>1</sup>, С.А. Лихачев<sup>2</sup>, И.В. Плешко<sup>2</sup>, Е.А. Кузовкова<sup>2</sup>  
**МУТАЦИИ В ГЕНЕ GCH1 У БОЛЬНЫХ С ДОФА-ЗАВИСИМОЙ  
ДИСТОНИЕЙ В БЕЛАРУСИ**

<sup>1</sup> – РНПЦ «Мать и дитя», <sup>2</sup>-РНПЦ неврологии и нейрохирургии

Дофа-зависимая дистония – форма дистонии, которая начинается преимущественно в детском возрасте, характеризуется наличием дневной флуктуации симптомов и высокой чувствительностью к препаратам леводопы. Причиной развития генетически обусловленной формы заболевания являются мутации в гене ГТФ-циклогидролазы I. Проведено молекулярно-генетическое исследование 20 пациентов. Мутации в гене GCH1 обнаружены у двух человек.

**Ключевые слова:** дофа-зависимая дистония, ген ГТФ-циклогидролазы I.

V.A.Yacuts<sup>1</sup>, K.A.Mosse<sup>1</sup>, S.A.Likhachev<sup>2</sup>, I.V.Pleshko<sup>2</sup>, A.A.Kuzaukova<sup>2</sup>

**MUTATIONS OF GCH1-GENE IN PATIENTS WITH DOPA-RESPONSIVE DYSTONIA IN BELARUS**

Dopa-responsive dystonia is a form of dystonia, which is starting in a childhood, has diurnal fluctuation of symptoms and dramatic response to L-dopa. Mutations of GCH-1 gene are genetic base of dopa-responsive dystonia. We analyzed DNA probes from patients using sequencing analysis. As a result, 2 out of 20 patients have point mutations in fifth exon of GCH1 gene.

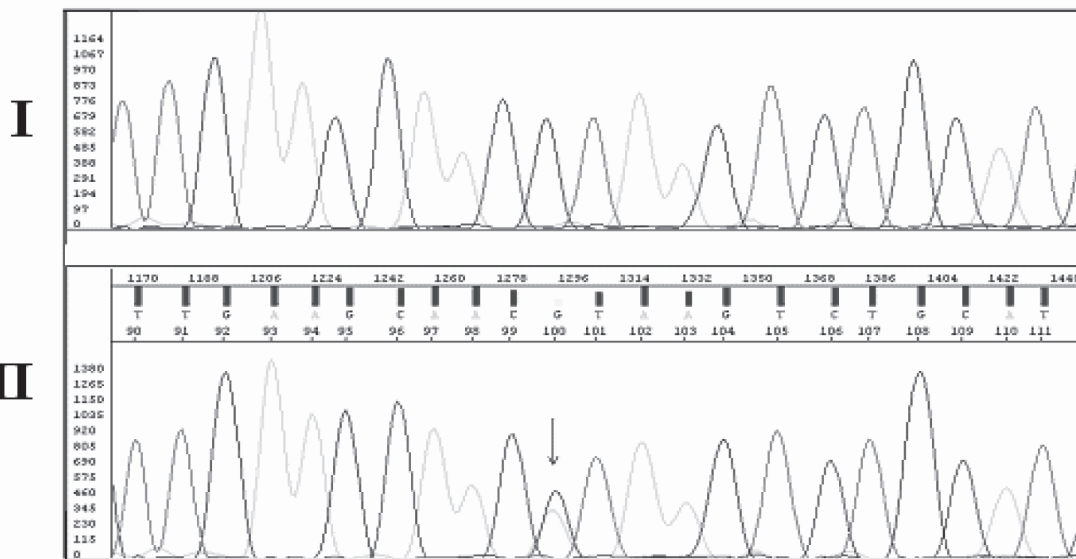
**Key words:** Dopa-responsive dystonia, GCH-1 gene.

Дофа-зависимая дистония (ДЗД) впервые была описана Сегавой (Segawa) в 1971 г. ДЗД составляет 5-10 % первичной дистонии у детей и подростков. У женщин заболевание встречается в 3-4 раза чаще, чем у мужчин [7].

ДЗД характеризуется дистонией в сочетании с паркинсонизмом, флуктуацией проявлений заболевания в течение суток, а также высокой чувствительностью к препаратам леводопы [3].

Она начинается до 12 лет (в среднем в 6 лет) и проявляется дистонией, гиперрефлексией и паркинсонизмом [1]. Симптомы варьируют в течение дня и уменьшаются на фоне приема низких доз препаратов леводопы. Клинически ДЗД харак-

теризуется повышенным пластическим тонусом, различным в отдельных мышечных группах, что приводит к патологическим установкам позы. Характерны дистонические феномены в ногах, отсутствие торсии туловища и кривошеи, асим-



**Рисунок 1.** Результаты секвенирования 5-го экзона гена GCH1 двух образцов ДНК. I – нормальная последовательность нуклеотидов; II – последовательность с мутацией IVS 5+1 G>A. Мутация обозначена стрелкой.

Таблица 1. Последовательности праймеров для амплификации экзонов гена GCH1 [5].

Экзон	Последовательность праймеров	Длина фрагмента
1	5' GTT TAG CCG CAG ACC TCG AAG CG 3' 5' GAG GCA ACT CCG GAA ACT TCC TG 3'	502 п.н.
2	5' GTA ACG CTC GCT TAT GTT GAC TGT C 3' 5' ACC TGA GAT ATC AGC AAT TGG CAG C 3'	315 п.н.
3	5' AGA TGT TTT CAA GGT AAT ACA TTG TCG 3' 5' TAG ATT CTC AGC AGA TGA GGG CAG 3'	259 п.н.
4	5' GTC CTT TTT GTT TTA TGA GGA AGG C 3' 5' GGT GAT GCA CTC TTA TAA TCT CAG C 3'	298 п.н.
5	5' GTG TCA GAC TCT CAA ACT GAT GTC 3' 5' TCA CTT CTA GTG CAC CAT TAT GAC G 3'	175 п.н.
6	5' ACC AAA CCA GCA GCT GTC TAC TCC 3' 5' AAT GCT ACT GGC AGT ACG ATC GG 3'	233 п.н.

метричная симптоматика, чаще преобладающая слева, отсутствие нарушений интеллекта. Клинические проявления со временем нарастают, вплоть до полной обездвиженности, исчезновения речи, нарушения глотания. Прогрессирование с генерализацией процесса отмечается как минимум у 76% пациентов.

Генетической основой большинства случаев ДЗД являются мутации гена ГТФ-циклогидролазы I (GCH1, DYT5), который картирован на хромосомном сегменте 14q22.1-q22.2. Ген GCH1 состоит из шести экзонов, имеет размер 750 п.н. [5]. Ген GCH1 кодирует фермент-ГТФ-циклогидролазу I, участвующий в синтезе тетрагидробиоптерина. Тетрагидробиоптерин выполняет многочисленные физиологические функции [6]. Он является кофактором трех ферментов-гидролаз: фенилаланин-, тирозин-и триптофангидролазы. Эти ферменты необходимы для синтеза гормонов и нейротрансмиттеров, таких как дофамин, норадреналин, адреналин и серотонин.

Молекулярный анализ, проведенный в ряде семей с ДЗД различного этнического происхождения, позволил выявить более 85 различных мутаций в кодирующей области гена GCH1, которые практически равномерно распределены по всем шести экзонам [3, 5]. Большинство найденных мутаций являются уникальными, процент повторяющихся мутаций низкий. В 50% случаев у пациентов выявляются точечные мутации, и около 37% составляют делеции различных экзонов гена ГЦГ-1 [5].

Ранее пенетрантность заболевания оценивалась в 30% [4]. Однако учет атипичных и стертых проявлений заболевания позволяет считать её значительно выше (порядка 80%) [3].

В большинстве случаев ДЗД является заболеванием с аутосомно-доминантным типом наследования, и мутации гена GCH1 обнаруживаются в гетерозиготном состоянии. В

редких случаях мутации гена GCH1 присутствуют в гомозиготном состоянии. В этом случае развивается атипичная неонатальная гиперфенилаланинемия (более тяжелый фенотип атипичной фенилкетонурии с неполной чувствительностью к препаратам леводопы). Клинически данный синдром характеризуется неонатальной задержкой двигательного развития, гипотонией, эпилептическими припадками, умственной отсталостью [7].

Клинические проявления ДЗД чрезвычайно вариабельны, а диагностические рамки данной формы наследственной дистонии весьма широки. Часто заболевание протекает под маской детского церебрального паралича, имеет сходную клиническую картину с ювенильным паркинсонизмом, поэтому для точной постановки диагноза необходимо проведение генетического анализа [3].

### Материал и методы

Из 20 обследованных человек 17 находились на стационарном либо поликлиническом обследовании и лечении в РНПЦ неврологии и нейрохирургии и 3 пациента проходили медико-генетическое консультирование в РНПЦ «Мать и дитя». Возраст обследованных составил 2 – 72 года (36,4±9,1), соотношение лиц женского и мужского пола 4:1. У пациентов были следующие клинические диагнозы: ДЗД и другие формы мышечных дистоний, дегенеративное заболевание ЦНС, болезнь Паркинсона с ранним началом и наличием дистонического синдрома в клинической картине заболевания. Наследственный анамнез был отягощен у 5 пациентов по различным формам дистоний и болезни Паркинсона.

Определения мутаций в гене GCH-1 проводили методом прямого ресеквенирования кодирующей последовательности и прилегающих интронных участков.

Реакционная смесь для полимеразной цепной реакции (ПЦР) с конечным объемом 20 мкл содержала 1xПЦР буфер, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 мкM dATP/dCTP/dTTP/dGTP, 5 пM праймеров и 1 единицу активности Taq-полимеразы. Для амплификации 1-6 экзонов гена GCH1 использовались

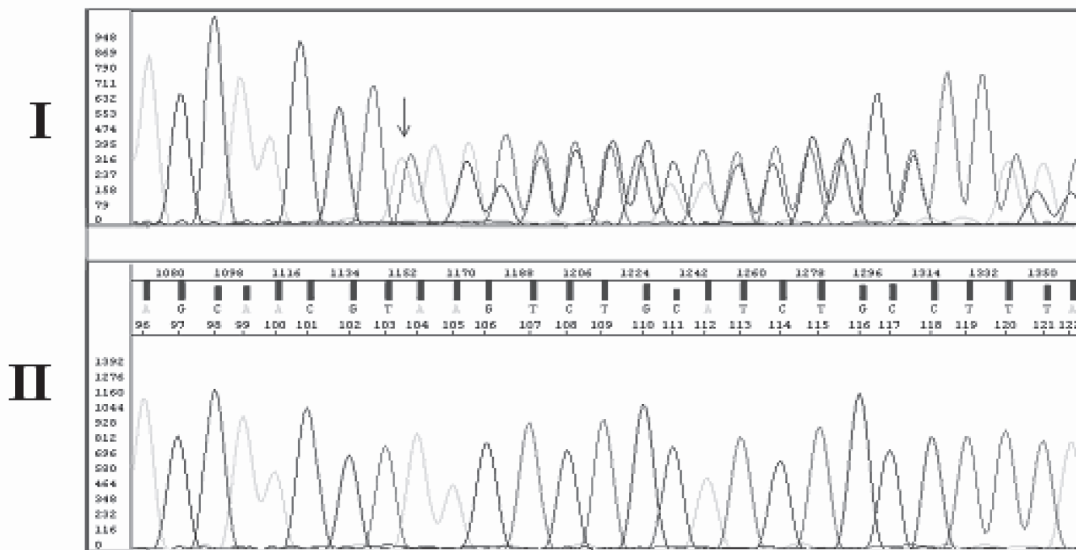


Рисунок 2. Результаты секвенирования 5-го экзона гена GCH1 двух образцов ДНК. I – последовательность с мутацией IVS 5+3insT. Мутация обозначена стрелкой. II – нормальная последовательность нуклеотидов

пары праймеров, отображенные в таблице 1.

ПЦР проводили при следующих температурно-временных условиях: начальная денатурация 3 минуты при 94°C затем 30 циклов амплификации по 30 сек 94°C и 1 мин 60°C. На завершающей стадии синтеза пробирки выдерживались 6 мин при 60°C.

Реакцию секвенирования выполняли с использованием набора реагентов BigDye Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Секвенирующая реакция включала 25 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: 10 сек. денатурации при 96°C, 5 сек. отжига при 60°C и 4 мин синтеза при 60°C.

Продукты секвенирующей реакции очищали методом precipitation 96% этанолом в присутствии 3М ацетата натрия. Электрофорез проводили в генетическом анализаторе ABI PRISM 310 при следующих параметрах: длина капилляра – 36 см; заполнение капилляра 4 % полимером POP – 4™; температура – 50°C; время инъекции образца в капилляр 15 – 30 с; время разделения 30 мин; напряжение 11 кВ. Полученные результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения Sequencing Analysis 5.1.

### Результаты и обсуждение

По результатам молекулярно-генетического анализа на наличие мутаций в шести экзонах гена GCH1 и прилежащих интронных последовательностях точечные мутации в гене GCH1 выявлены у двух человек.

Пациент 1 (1980 г.р.) поступил в РНПЦ ННХ 10.03.2010 с жалобами на насильственный наклон головы влево, боль в области шеи, произвольные движения в руках и ногах. Болеет с 7 лет, когда появилось подворачивание стоп при ходьбе; заболевание постепенно прогрессировало. Неоднократно осуществлялось обследование и лечение стационарно, выставлялся диагноз болезнь Фридрайха, с 1997 года – генерализованная мышечная дистония. При приеме препаратов леводопы отмечался положительный эффект. В неврологическом статусе: ВНД – в сознании, ориентирована, контактна. ЧН – без особенностей. В покое тонус в конечностях не изменен. Силовых парезов нет. СПР Д=С, средней живости, патологических стопных знаков нет. Координаторные пробы выполняет правильно. При ходьбе появляется «штыкообразная» кривошея с насильственным поворотом головы влево, дистонический гиперкинез в форме сгибания рук и «подворачивания» стоп. На фоне приема мадокома 250 мг – 1/2 таблетки 3 раза в сутки отмечался положительный эффект – значительное уменьшение дистонических проявлений.

У пациента 1. (1980 г.р.) обнаружена однонуклеотидная замена гуанина на аденин в первом положении 5-го интрона мутация **IVS 5+1 G>A**. Данная замена затрагивает высококонсервативную последовательность GT, которая является донором сплайсинга для 5 интрона. В результате происходит делеция 5 экзона, а также появляется стоп-кодон (TAA) в положении 215 [7].

Результаты анализа показаны на рисунке 1.

Пациент 2 (1984 г.р.) поступил в РНПЦ ННХ 24.11.2010 г. с диагнозом дегенеративное заболевание ЦНС с умеренным стволово-мозжечковым синдромом. Отмечались жалобы на слабость в руках, ногах, скованность при движении, произвольные движения в левой руке, правой ноге. В анамнезе в 1994 г лечение с диагнозом нейрохориоретинит токсико-аллергического характера, отмечалось резкое снижение остроты зрения на оба глаза с полным восстановлением в течение 2-х недель. В 1996г появилась слабость в ногах, которая постепенно нарастала. Лечилась с диагнозом рассеянный энцефаломиелит с хорошим эффектом на прием преднизолона и стабилизацией симптоматики в течение 6 месяцев. На МРТ ГМ 1996г: мелкоточечные кисты в субкортикальном наджелудочковом белом веществе полу-

шарий. В 1997г повторный курс дексаметазона в связи с ухудшением и положительной динамикой на фоне терапии. В 2006 г стабильное в РНПЦ ННХ с диагнозом: Дегенеративное заболевание ЦНС (ближе к ювенильной форме паркинсонизм-дистония) с умеренно выраженным акинетико-ригидным синдромом и дистоническим синдромом преимущественно в нижних конечностях. В неврологическом статусе: ВНД – ориентирована, контактна. ЧН – без особенностей. Тонус в конечностях повышен по экстрапирамидному типу, преимущественно в разгибателях. Силовых парезов нет. СПР Д – С, оживлены, зоны не расширены, патологических стопных знаков нет. Тремор покоя в левой руке, постуральный тремор в обеих руках. Дистонические феномены в конечностях в виде приведения и сгибания предплечья, сгибания кисти слева, супинация стоп больше справа. Координаторные пробы выполняет неустойчиво. В позе Ромберга пошатывается. При проведении пробы с препаратами леводопы через 1 час после приема мадопара 250 мг отмечала значительное уменьшение скованности, в неврологическом статусе определялось уменьшение экстрапирамидного тонуса в конечностях. В последующем через 5 дней приема мадопара 250 мг по 0,5 таблетки 3 раза в сутки появились произвольные движения в ногах, затрудняющие ходьбу. Мадопар был отменен и назначен мирапекс 0,5 мг-3 раза в день, ПК-мерц 100 мг-3 раза в день.

У пациента 2 (1984 г.р.) была обнаружена мутация **IVS 5+3insT** (рисунок 2). При этой мутации происходит вставка тимина в третьем положении интрона, что вызывает сдвиг рамки считывания.

Согласно литературным данным, между типом мутации и его клиническим проявлением корреляция отсутствует [7].

Таким образом, впервые в Беларуси было проведено определение полной нуклеотидной последовательности всех шести экзонов гена GCH1 в группе пациентов с ДЗД.

У двух пациентов в 5 экзоне выявлены диагностически значимые мутации, такие как **IVS 5+1 G>A** и **IVS 5+3insT**, которые ранее были описаны в литературе. Родственникам пробандов предложено пройти молекулярно-генетическое обследование на наличие обнаруженных у пробандов мутаций.

Дофа-зависимая дистония является заболеванием, для которого существуют эффективные методы лечения. Своевременная эффективная терапия пробандов и их родственников в случае носительства мутации является залогом их полноценной активной жизни.

### Литература

1. *Бобылова, М. Ю.* Дофа-зависимая дистония (болезнь Сегавы) / М. Ю. Бобылова, С. В. Михайлова, Л. П. Гринио // Журнал неврологии и психиатрии. 2009. № 8. С. 73-76.
2. *Иллариошкин С. Н.* ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование в неврологии / С. Н. Иллариошкин, И. А. Иванова-Смоленская, Е. Д. Маркова. М.: МИА, 2002. 591 с.
3. *Сломинский, П. А.* Молекулярно-генетический анализ дофа-зависимой и дофа-независимой форм торсионной дистонии // П. А. Сломинский [и др.] // Медицинская генетика. 2006. Т. 5, пр. 2. С. 55 – 58.
4. *Bandmann, O.* Dopa-responsive dystonia in British patients: new mutations of the GTP-cyclohydrolase I gene and evidence for genetic heterogeneity / O. Bandmann [et al.] // Human Molecular Genetics. 1996. Vol. 5, № 3. P. 403 – 406.
5. *Hagenah, J.* High mutation rate in dopa-responsive dystonia: Detection with comprehensive GCH1 screening / J. Hagenah [et al.] // Neurology. 2005. Vol. 64. P. 908 – 911.
6. *Ichinose, H.* Characterization of Mouse and Human GTP Cyclohydrolase I Genes / H. Ichinose, T. Ohye, Y. Matsuda // The Journal of biological chemistry. 1995. Vol. 270, № 17. P. 10062 – 10071.
7. *Tassin, J.* Levodopa-responsive dystonia GTP cyclohydrolase I or parkin mutations? / J. Tassin, A. Durr, A.-M. Bonnet // Brain. 2000. Vol. 123. P. 1112 – 1121.