

Т.В. Осадчук, К.А. Моссе, Н.В. Румянцева

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ MPZ У ПАЦИЕНТОВ С НЕВРАЛЬНОЙ АМИОТРОФИЕЙ ШАРКО-МАРИ-ТУС

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

*Республика Беларусь, 220053 г. Минск, Орловская, 66*

СМТ тип 1В является одним из типов невральной амиотрофии Шарко-Мари-Тус, наследственной демиелинизирующей невропатии, и ассоциирована с мутациями в гене MPZ. На первом этапе диагностики в группе пациентов с клиническими симптомами невропатии были исключены две наиболее частые формы – СМТ тип 1А и СМТ тип 1Х. Так как 77% мутаций в гене MPZ локализовано во 2 и 3 экзонах, был проведен секвенсный анализ этих экзонов, который выявил мутации у 2 из 50 пробандов (4%) с СМТ, одна из найденных мутаций ранее не описана. Новая мутация ассоциирована с тяжелым фенотипом и не была обнаружена у здоровых членов семьи, а также в контрольной группе здоровых доноров, что подтверждает предположение о причине возникновения СМТ тип 1В. Мы также обнаружили мутации у 3 из 8 обследованных родственников пробандов.

**Ключевые слова:** невральная амиотрофия Шарко-Мари-Тус тип 1В, миелиновый белок P<sub>0</sub>, ген MPZ, мутация.

T. Osadchuk, K. Mosse, N. Rumyantseva

## DETERMINATION OF MUTATIONS IN MPZ GENE IN PATIENTS WITH CHARCOT- MARIE-TOOTH NEUROPATHY

CMT 1B is a type of Charcot-Marie-Tooth disease, an inherited demyelinating neuropathy, associated with mutations in MPZ gene. At the first stage CMT 1A and CMT 1X were excluded by QF-PCR analysis of duplication in 17p11.2 region and by sequence analysis of GJB1 gene in a group of selected patients with clinical symptoms of neuropathy. As 77% mutations in MPZ gene are localized in exons 2 and 3, DNA resequencing of exons 2 and 3 of MPZ gene revealed mutations in 2 of 50 probands (4%) with CMT, one of these mutations is new. The new mutation is associated with severe phenotype and was not detected in healthy members of the family and normal subjects, which supports the hypothesis that it is responsible for the CMT1B phenotype. We also identified mutations in 3 of 8 probands' relatives.

**Key words:** Charcot-Marie-Tooth disease type 1B, myelin protein P<sub>0</sub>, MPZ gene, mutation.

Невральная амиотрофия Шарко-Мари-Тус (СМТ), или наследственная моторно-сенсорная невропатия (НМСН), - обширная группа генетически гетерогенных заболеваний, характеризующаяся симптомами прогрессирующей полиневропатии с преимущественным поражением мышц дистальных отделов конечностей. НМСН является самым частым среди наследственных заболеваний периферической нервной системы. Частота всех форм НМСН варьирует от 1 до 4 на 10000 в различных популяциях [9].

К настоящему времени идентифицировано более двадцати генов, мутации в которых приводят к развитию клинического фенотипа НМСН. Описаны все типы наследования НМСН: аутосомно-доминантный, аутосомно-рецессивный и X-сцепленный. Наиболее часто встречается аутосомно-доминантное наследование.

Первичное поражение нерва приводит к вторичной слабости и атрофии мышц. В наибольшей степени страдают нервные волокна, покрытые миелиновой оболочкой, которые иннервируют скелетные мышцы. В первую очередь нарушается иннервация наиболее дистальных мышц, испытывающих большую физическую нагрузку (мышцы стоп и голеней, в меньшей степени – мышцы кистей и предплечий). Поражение чувствительных нервов вызывает нарушение болевой, тактильной и температурной чувствительности в стопах, голенях и кистях. Заболевание начинается в конце первой – начале второй декады жизни. Первыми симптомами являются слабость в ногах, изменение походки, в дальнейшем прогрессируют слабость мышц, атрофия мышц голеней, ноги приобретают вид «перевернутых бутылок», часто происходит деформация стоп (формируется так называемая «полая» стопа), в процесс вовлекаются мышцы кистей и предплечий. Выявляется снижение или утрата сухожильных рефлексов (в первую очередь ахилловых), сенсорные нарушения [1-3].

Клинические проявления отдельных генетических вариантов имеют значительное сходство. Все это затрудняет диагностический этап медико-генетического консультирования и обуславливает необходимость проведения ДНК-анализа для дифференциальной диагностики различных генетических вариантов НМСН.

**Ген MPZ** (myelin protein zero), мутации в котором приводят к развитию невральной амиотрофии Шарко-Мари-Тус тип 1В, локализован в хромосоме 1 в сегменте q22.1-q23, состоит из 6 экзонов общей протяженностью 7 т.п.н. Размер экзонов варьирует от 131 до 370 нуклеотидов. Ген MPZ кодирует миелиновый белок P<sub>0</sub> с молекулярной массой 28 кДа, содержащий 219 аминокислотных остатков, который является основным структурным компонентом периферического миелина и составляет приблизительно 50% от массы периферического миелинового белка [10, 16]. Белок P<sub>0</sub> имеет доменную структуру:

единственный трансмембранный домен, большой экстрацеллюлярный домен и меньший интрацеллюлярный домен (рисунок 1). Это гомофильная адгезивная молекула семейства иммуноглобулин-подобных белков, которой принадлежит важная роль в процессе укладки отдельных слоев миелиновой оболочки (компактизации миелина).

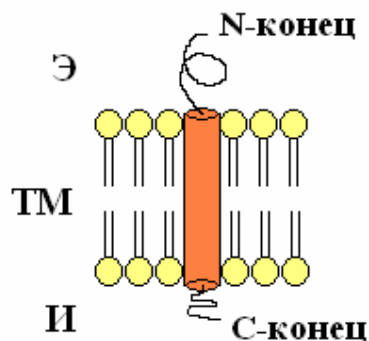


Рисунок 1. Схематическая структура белка P<sub>0</sub>: Э – экстрацеллюлярный домен, ТМ – трансмембранный домен, И – интрацеллюлярный домен

В настоящее время в гене MPZ обнаружены более 120 мутаций всех известных типов (миссенс, нонсенс, сплайсинговые, со сдвигом рамки считывания, делеции и т.д.), проявляющихся в целом спектре фенотипов [17]. Различные типы мутаций влияют на все структурные части белка и могут изменять адгезию миелина. Основной тип мутаций – однонуклеотидные замены, главным образом миссенс- и сплайсинговые, нарушающие функции внеклеточного домена, играющего значительную роль в адгезии миелиновой оболочки. В редких случаях описаны делеции во втором экзоне гена. Мутации распределены внутри гена неравномерно, более 70% из них локализованы во втором и третьем экзонах, кодирующих экстрацеллюлярный домен, что свидетельствует о его функциональном значении [15]. Результатом может быть как демиелинизирующий, так и аксональный симптомокомплекс.

Цель данной работы – идентификация мутаций в гене MPZ, являющихся причиной невралгической амиотрофии Шарко-Мари-Тус тип 1В (СМТ1В) в группе пациентов с НМСН.

#### **Материалы и методы**

Исследуемую группу составили пробанды с клиническим диагнозом невралгической амиотрофии Шарко-Мари-Тус. Отбор пациентов проводился согласно международным диагностическим критериям для данной патологии [8]. У всех пациентов предварительно было исключено носительство дупликации/делеции в гене PMP22, отвечающих за СМТ тип 1А, и точечных мутаций в гене GJB1, определяющих СМТ тип 1Х. В случае обнаружения мутации у пробанда анализ проводился также другим доступным членам семьи.

В качестве биологического материала для исследования использовалась геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови методом фенол-хлороформной экстракции [6]. Все образцы ДНК были протестированы на наличие точечных мутаций во втором и третьем экзонах гена MPZ методом ресеквенирования 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 ресеквенирования 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 MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ dATP/dCTP/dTTP/dGTP, 5 пМ праймеров и 0,75 единиц активности Taq-полимеразы. Для амплификации использовали праймеры, фланкирующие 2 и 3 экзона гена MPZ [12, 14]:

2 экзон (длина фрагмента 290 п.о.):

P21: CTTCCTCTGTATCCCTTACTG

M6: CTCCTTAGCCCAAGTTATCT

3 экзон (длина фрагмента 370 п.о.):

P4: TCATTAGGGTCCTCTCACATGC

M21: GCCTGAATAAAGGTCCTTAGGC

После денатурации образцов при 95°C в течение 7 мин проводили 30 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: 1 мин денатурации при 95°C, 1 мин отжига при 60°C и 1 мин синтеза при 72°C. На завершающей стадии синтеза пробирки с образцами выдерживали в течение 7 мин при 72°C.

Реакцию ресеквенирования 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. Пробу денатурировали 4 мин при 95°C, после чего пробирки быстро охлаждали во льду. Электрофорез проводили в генетическом анализаторе ABI PRISM 310 при следующих параметрах: длина капилляра – 47 см; заполнение капилляра 4% полимером POP-4™; температура – 50°C; время инъекции образца в капилляр 15-30 сек; время разделения 25 мин;

напряжение 11 кВ. Обработку результатов выполняли с помощью пакета компьютерных программ GENESCAN и GENOTYPER (Applied Biosystems).

### Результаты и обсуждение

СМТ1В – наследственная невропатия с аутосомно-доминантным типом наследования. Тип 1В является вторым по частоте среди аутосомно-доминантных форм СМТ после СМТ1А, и третьим по частоте с учетом X-сцепленной формы СМТ1Х. Исходя из этого, отбор пациентов в группу исследования проводился после исключения дупликации гена PMP22, а также мутаций в гене GJB1 у пробандов мужского пола. В случае обнаружения у пробанда мутации в гене MPZ анализ проводился другим доступным для исследования членам семьи.

Для определения мутаций в гене MPZ ресеквенирование кодирующей последовательности гена проведено в 58 образцах ДНК (50 пробандов, 8 родственников). По данным литературы [15], большинство мутаций данного гена (около 77%) обнаружено во втором и третьем экзонах, поэтому поиск нуклеотидных замен выполнен в первую очередь в этих двух экзонах. При выполнении исследования идентификацию мутаций проводили исходя из зафиксированных изменений в последовательности нуклеотидов в анализируемом фрагменте ДНК.

Мутации во втором и третьем экзонах гена MPZ обнаружены в двух семьях у 5 человек: у 2 из 50 пробандов, что составило 4%, и у 3 из 8 обследованных родственников. Характеристика выявленных нуклеотидных замен представлена в таблице 1.

Таблица 1. Данные о мутациях в гене MPZ, идентифицированных у пациентов с СМТ тип 1В

Мутация	Положение мутации (нуклеотидная замена)	Изменение в первичной последовательности	Тип мутации	Число лиц, имеющих мутацию
IVS1-2A>C	с.68-2A>C	agTG→c gTG	сплайсинговая	4
Thr124 Met	с.371C>T	ACG→ATG	миссенс	1

Семья 1. Ранее не описанная мутация IVS1-2A>C идентифицирована у женщины-пробанда 23 лет (III.3, родословная представлена на рисунке 2) с клинической картиной синдрома Русси-Леви. Сплайсинговая мутация представлена однонуклеотидной заменой во второй позиции 3'-последовательности 1 интрона гена MPZ и обозначается как IVS1-2A>C. Клинические проявления отмечены в конце I декады жизни в виде слабости в нижних конечностях, снижения

двигательной активности, изменения походки. В 12 лет неврологические нарушения включали мышечную гипотонию, асимметрию носогубной складки, легкие координаторные нарушения (неустойчивость в позе Ромберга), снижение сухожильных и периостальных рефлексов в руках, отсутствие брюшных, коленных, ахилловых рефлексов, слабость и чувство онемения в ногах, расстройство чувствительности в ногах по типу «высоких носков», снижение мышечной силы в пальцах ног (2-3б.), высокий свод стоп.

В течение 2 декады жизни отмечено прогрессирование клинических симптомов: тремор и снижение мышечной силы в руках, нарушение почерка, «шаткая» походка, нарушение чувствительности в дистальных отделах ног, парестезии, зябкость ног, судороги икроножных мышц, симптом «щелчка» в коленных суставах, формирование «полой стопы». Отмечено прогрессирующее снижение остроты зрения – миопия высокой степени (-7D), изометрическая, хориоретинальная (неоднократно проводилась лазерная коагуляция). Слух клинически не нарушен. Множественные переломы ввиду неоднократных падений – перелом копчика, перелом в голеностопном суставе, трижды переломы пальцев ног. По данным ЭхоКГ ПМК 1 степени, ДХЛЖ. Интеллект нормальный. Замужем, имеет двоих детей (роды путем операции кесарево сечение). При осмотре в возрасте 23 лет имеют место мышечная гипотония, нарушения походки, выраженная слабость в ногах, гипотрофия мышц дистальных отделов нижних конечностей, отсутствие сухожильных и периостальных рефлексов, гипестезия стоп и голеней, деформация стоп («полая стопа»), снижение мышечной силы в руках.

В связи с тем, что заболевание наследуется по аутосомно-доминантному типу, для выявления происхождения мутации, ДНК-диагностика была проведена родителям пробанда (II.2 и II.5), а также двум ее сыновьям в возрасте 2,5 лет и 4 месяцев (IV.1 и IV.2). Мутация была идентифицирована у отца пробанда (II.5), и у обоих детей (IV.1 и IV.2). Отец пробанда имеет нормальное интеллектуальное и физическое развитие, считал себя здоровым в течение 1–4 декады жизни, имел высокую двигательную активность, занимался спортом. В анамнезе 4 перелома (травмы) – переломы малоберцовой кости, копчика, пальцев кисти. После 40 лет отмечена прогрессирующая слабость в ногах, снижение двигательной активности. При осмотре в возрасте 50 лет имеет место тремор рук, умеренная слабость в ногах, гипотрофия мышц и нарушение чувствительности дистальных отделов нижних конечностей, снижение сухожильных и периостальных рефлексов, парестезии, зябкость ног, чувство онемения левой стопы. У старшего сына пробанда (на момент консультации возраст 2,5 года) отмечается неуклюжесть при ходьбе (ходит на «прямых» ногах, старается не сгибать ноги в коленных суставах), плосковальгусные стопы. При осмотре младшего сына пробанда в возрасте 4-х месяцев нарушений моторного развития не выявлено, обоим детям рекомендовано наблюдение

невролога. Также были обследованы и другие родственники пробанда (Ш.4, П.4, Ш.5). У здоровых родственников данная мутация не выявлена. Так как мутация описана впервые, были протестированы 50 контрольных образцов ДНК от здоровых доноров (100 хромосом), ни в одном из случаев данная нуклеотидная замена не была обнаружена. Результаты ресеквенирования представлены на рисунке 3.

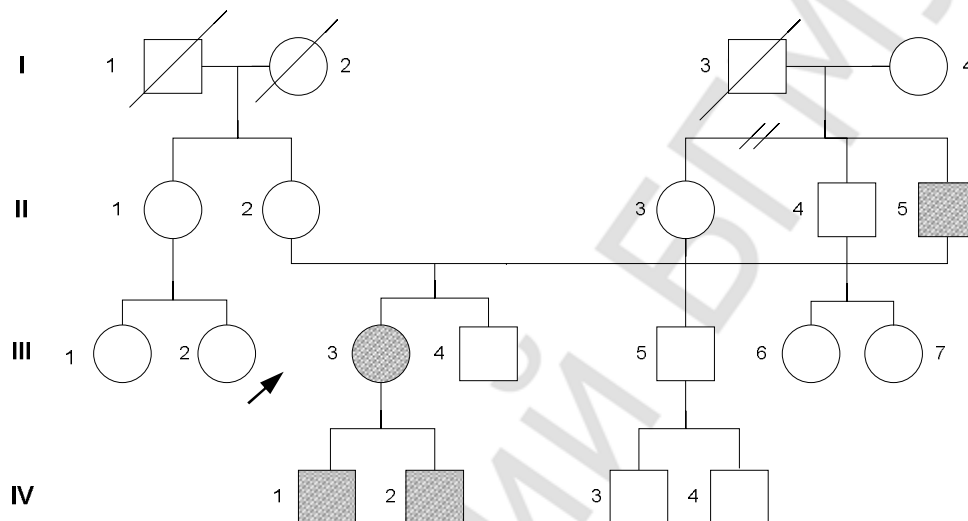


Рисунок 2. Родословная семьи К. Стрелкой отмечен пробанд Ш.3.

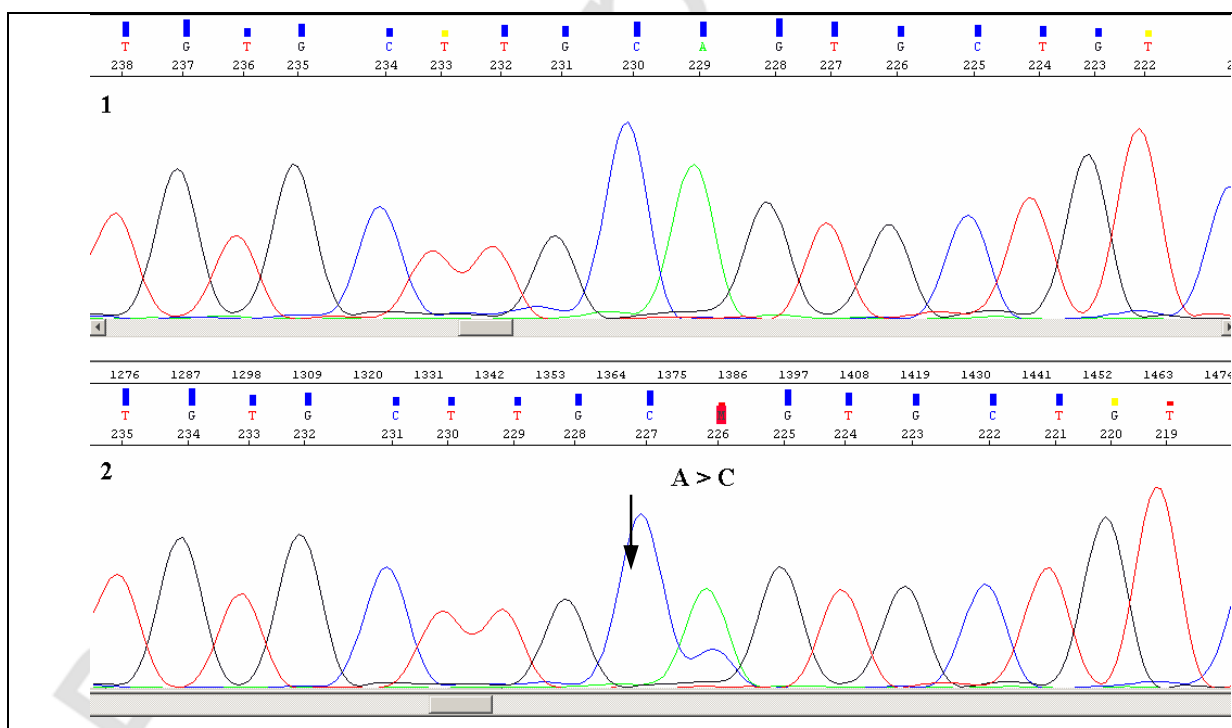


Рисунок 3 – Результаты секвенирования второго экзона гена MPZ

1 – норма, 2 – пробанд. Стрелкой отмечено место однонуклеотидной замены IVS1-2A>C

Семья 2. Описанная ранее различными группами исследователей [4, 5, 7, 11] нуклеотидная замена с.371C>T обнаружена у мужчины-пробанда С (III.5, родословная представлена на рисунке 4). Данная мутация обозначается как Thr124Met и приводит к замене треонина на метионин в 124 кодоне в экстрацеллюлярном домене белка. Следствием мутации является клиническая картина невральная амиотрофии Шарко-Мари-Тус 2 типа с поздним дебютом (первые симптомы заболевания – слабость в стопах, неловкость, деформация стоп, появились после 20 лет). При осмотре наблюдалась «шаткая» походка, при ходьбе тянет стопы, стоит без поддержки с трудом, выраженная гипотрофия мышц голени, высокие своды стоп, снижение чувствительности в нижних конечностях, легкий тремор верхних конечностей. Также отмечаются нейросенсорная тугоухость легкой степени слева, хронический кашель и синдром Аргайла-Робертсона (отсутствие прямой реакции зрачка на свет при сохранении ее на аккомодацию и конвергенцию, анизокория, миоз OD), которые являются характерными фенотипическими признаками, ассоциированными с мутацией Thr124Met [4, 5, 7, 11]. При электронейромиографическом исследовании обнаружена патология периферических нервов первично демиелинизирующего характера выраженной степени.

В связи с тем, что заболевание наследуется по аутосомно-доминантному типу и риск развития СМТ у детей пробанда составляет 50%, а клинические признаки при данной мутации могут проявляться после 40-летнего возраста, молекулярно-генетическое исследование было проведено 38-летней дочери пробанда (IV.4), по результатам которого мутация Thr124Met в гене MPZ исключена. Результаты секвенирования представлены на рисунке 5.

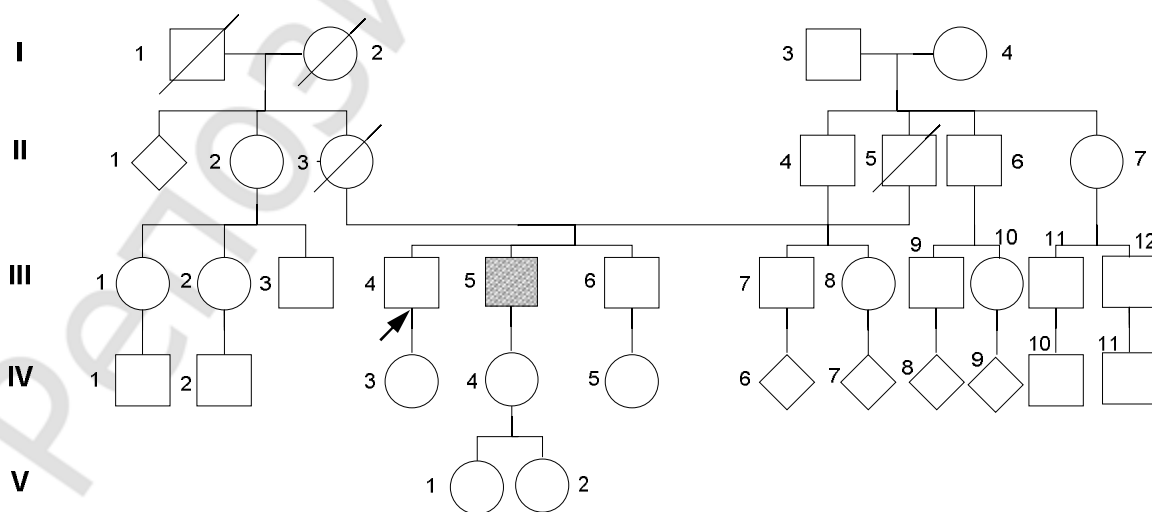
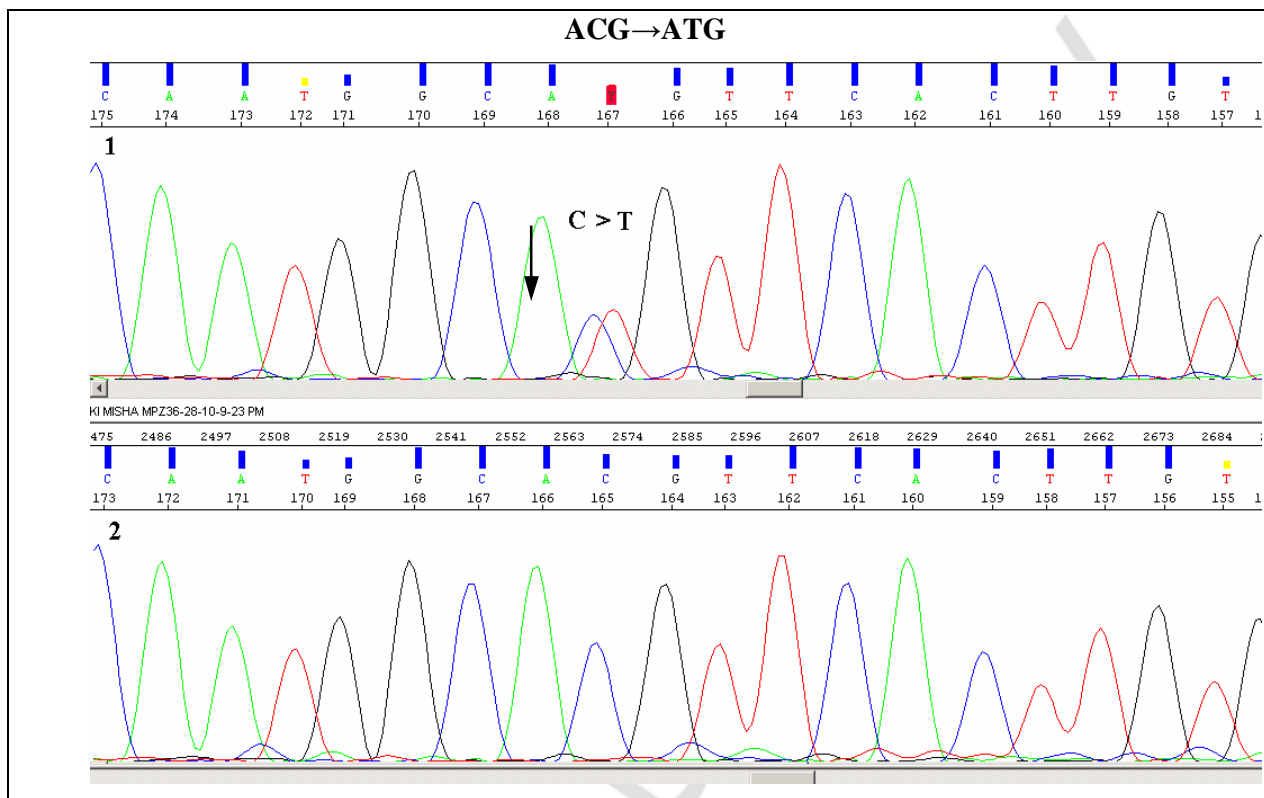


Рисунок 4. Родословная семьи С.





**Рисунок 5 – Результаты секвенирования третьего экзона гена MPZ**

1 – пробанд, 2 – норма. Стрелкой отмечено место нуклеотидной замены с.371C>T

По данным литературы, мутации в гене MPZ являются одной из частых причин невралгии Шарко-Мари-Тус [13, 15]. Обнаружение нуклеотидных замен в исследуемой группе пациентов свидетельствует о необходимости исследования данного гена с целью дифференциальной диагностики типа СМТ. Применение методов ДНК-анализа способствует раннему выявлению заболевания, а также позволяет проводить пренатальную диагностику в семьях с идентифицированными мутациями. Результаты исследований являются основой для создания расширенного алгоритма молекулярно-генетической диагностики генов, ответственных за развитие НМСН.

## Литература

1. *Аверочкин, А. И.* Заболевания периферической нервной системы / А. И. Аверочкин, Ю. В. Мозолевский, Д. Р. Штульман // *Болезни нервной системы* / под ред. Н. Н. Яхно, Д. Р. Штульмана. М., 2001. Гл. 6. С. 500–506.
2. *Иллариошкин, С. Н.* ДНК-диагностика наследственных моногенных болезней нервной системы / С. Н. Иллариошкин, И. А. Иванова-Смоленская, Е. Д. Маркова // *ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование в неврологии*. М., 2002. Гл. 3. С. 173–189.
3. *Левин, О. С.* Наследственные полиневропатии / О. С. Левин // *Полиневропатии*. М., 2006. Гл. 10. С. 357–391.
4. *Baloh, R. H.* Chronic cough due to Thr124Met mutation in the peripheral myelin protein zero (MPZ gene) / R. H. Baloh [et al.] // *Neurology*. 2004. Vol. 62. P. 1905–1906.
5. *Chapon, F.* Axonal phenotype of Charcot-Marie-Tooth disease associated with a mutation in myelin protein zero gene / F. Chapon [et al.] // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 1999. Vol. 66. P. 779–782.
6. *Davies, K. E.* Human genetic diseases: a practical approach / K. E. Davies // Oxford: IRL press. 1986. P. 56.
7. *De Jonghe, P.* The Thr124Met mutation in the peripheral myelin protein zero (MPZ) gene is associated with a clinically distinct Charcot–Marie–Tooth phenotype / P. De Jonghe [et al.] // *Brain*. 1999. Vol. 122. P. 281–290.
8. *De Visser, S.* Hereditary motor and sensory neuropathy or Charcot–Marie–Tooth disease Types IA and IB / S. De Visser; ed. A. E. Emery. 2<sup>nd</sup> ed. // *Diagnostic Criteria for Neuromuscular Disorders*. 1994 P. 49–52.
9. *Emery, A. E.* Population frequencies of inherited neuromuscular diseases – a world survey / A. E. Emery // *Neuromuscul. Disord*. 1991. Vol. 1. P. 19–29.
10. *Hayasaka, K.* Structure and chromosomal localization of the gene encoding the human myelin protein zero (MPZ) / K. Hayasaka [et al.] // *Genomics*. 1993. Vol. 17. P. 755–758.
11. *Misu, K.* An axonal form of Charcot-Marie-Tooth disease showing distinctive features in association with mutations in the peripheral myelin protein zero gene (Thr124Met or Asp75Val) / K. Misu [et al.] // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2000. Vol. 69. P. 806–811.
12. *Nelis, E.* Rapid screening of myelin genes in CMT1 patients by SSCP analysis: identification of new mutations and polymorphisms in the P0 gene / E. Nelis [et al.] // *Hum. Genet*. 1994. Vol. 94. P. 653–657.

13. *Nelis, E.* Estimation of the mutation frequencies in Charcot-Marie-Tooth disease type 1 and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies: a European collaborative study / E. Nelis [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* 1996a. Vol. 4. P. 25–33.
14. *Nelis, E.* Comparison of single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for detection of mutations in Charcot- Marie-Tooth type 1 disease and related peripheral neuropathies / E. Nelis [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* 1996b. Vol. 4. P. 329–333.
15. *Nelis, E.* Mutations in the peripheral myelin genes and associated genes in inherited peripheral neuropathies / E. Nelis [et al.] // *Hum. Mutat.* 1999. Vol. 13. P. 11–28.
16. *Su, Y.* Myelin protein zero gene mutated in Charcot-Marie-Tooth type 1B patients / Y. Su [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. Vol. 90. P. 10856–10860.
17. *The Mutation Database of Inherited Peripheral Neuropathies* [Electronic resource]. Mode of access: <http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations>. Date of access: 16.09.2010.