

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 А. 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^{full}) образована, по меньшей мере, 16 экзонами [1, 14]. Кроме полной копии имеются 5'- и 3'-делементированные формы (NAIP1, NAIP2, YNAIP1, YNAIP2) [13, 14]. Кодированные белки относятся 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), CLRс (C-type lectin receptors) и RLHs (RIG-like helicases). Эти белки являются составляющей частью врожденного иммунитета, так как обеспечива-

ют узнавание структурных компонентов патогенов и индуцируют соответствующий иммунный ответ [10, 12]. В частности, различные Naip (гомологичный мультикопийный ген у мышей) детерминируют специфичность NLRC4-инфлам-масы относительно бактериальных лигандов [7, 16]. NLRC4 инфламмаза – это цитоплазматический мульти-белковый 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 белорусской популяции. 4- и 12-ый экзоны NAIP-гена (номера экзонов 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 проявлением болезни является дегенерация нейронов передних рогов спинного мозга.

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

Проведенное исследование показало, что экзон 4 NAIP-гена отсутствовал у 12 из 49 проанализированных пациентов со SMA, что составило 24,5%, при этом все они имели тяжелую форму заболевания – SMA I. Среди пациентов со SMA I частота выявления данной мутации равна 43%. Делеционное изменение NAIP-гена имели также 3 родителя детей со SMA 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 SMA. 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 SMA. 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 SMA, 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 SMA, 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^{full} 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 (предполагает-

ся, что они транскрибируются из NAIP^{full}), 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 SMA, 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 мышях, 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 SMA-асимптоматичные члены подобных семей рассматриваются как здоровые, в будущем профилактическое медицинское наблюдение за ними, возможно, окажется полезным в установлении этиологии других болезней, отличных по клиническому течению от SMA, например, частых респираторных заболеваний, наличия гипертензии или кистозных изменений в печени.

Таким образом, в дальнейшем необходимо изучение состава NAIP-белков при SMA 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 SMA 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., Yraghi, 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.