

**ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ МУТАНТНЫМ ГЕНОТИПОМ И ФЕНОТИПОМ  
ПРИ ПЕРИОДИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ**

А.С. Айрапетян, Т.Ф. Саркисян, Е.О. Мнджоян, З.Р. Оганесян, Т.С. Степанян,  
Т.С. Григорян, С.Амселем, С.Казенев

*Центр медицинской генетики Национальной Академии Наук РА;  
Hospital Henri Mondor, France/  
375010 Ереван, ул. Закана, 5/1*

*Ключевые слова:* периодическая болезнь, мутации гена MEFV, генотип, фенотип

Периодическая болезнь (ПБ), или семейная средиземноморская лихорадка, – аутосомно-рецессивное наследственное заболевание, распространенное в популяциях средиземноморского происхождения, в частности среди армян, евреев-сефардов, арабов, турков с частотой гетерозиготных носителей мутантного гена от 1/6 до 1/20 [18]. Генные мутации, вызывающие развитие ПБ, играют важнейшую роль в контроле процессов воспаления [5,6,14,17]. Согласно D.Kastner et al., при многих воспалительных заболеваниях, в частности системной красной волчанке, первичный фактор множественных нарушений биохимических процессов в клетках остается невыясненным [13]. Тем не менее, наблюдаемые нарушения являются вторичным феноменом и следствием основной первичной дисфункции. Так начались исследования по выявлению генетических нарушений в клетках больных с наследственными периодическими воспалительными синдромами, в том числе и ПБ. Позиционное клонирование, проведенное двумя разными группами исследователей США и Франции, позволило идентифицировать ген MEFV (“Mediterranean fever”), ответственный за развитие ПБ [10,12]. Впервые в НИН (США) ген был локализован на коротком плече 16-й хромосомы при исследовании панели образцов ДНК евреев-неашкенази и других этнических групп [2,10,12]. В начале данных исследований был определен первоначальный фрагмент, состоящий из 300 генов и предположительно содержащий идентифицируемый ген по сцеплению с геном, ответственным за синтез гемоглобина, и последовательностью неясной функции (маркер D16S84). Прогресс в картировании генома позволил значительно сузить данный регион до физического расстояния, равного 1 млн п.о., с одной стороны, ограниченного генами PDK1 и TSC2 (гены, ответственные за 2 аутосомно-доминантных синдрома: поликистоз почек и туберозный склероз), а с другой, – CREBBP (ген, ответственный за наследственный синдром Rubinstein-Taybi с умственной отсталостью). Для дальнейшего поиска конкретного гена-кандидата была использована тактика скринирования УАС-библиотек, сконструированных из субхромосомных сегментов изучаемой ДНК [10,12].

Описанные мутации, вызывая замену всего одной аминокислоты, изменяют структуру и функции кодируемого белка, приводя к развитию фенотипа ПБ, что

свидетельствует о важной физиологической роли гена MEFV. КДНК, состоящая из 3,7 кб, относится к семейству высоко консервативных генов, включающих молекулы ядерных эффекторов и белков, связывающих нуклеиновые кислоты, играющие роль регуляторов воспаления, гематопоза, онкогенеза и эмбрионального развития [8,11]. Один из членов семейства подобных белков, рибонуклеарный белок Ro52, является мишенью для антител при системной красной волчанке и др. синдромах. К ним относятся также регуляторы транскрипции, в том числе мышинный ген *grt-1*, контролирующей экспрессию интерлейкина - 2, аттенуатор экспрессии длинных терминальных повторов промотора вируса иммунодефицита человека, ген-регулятор интерферона *Staf 50*, а также PML-зависимый трансактиватор гена *p21 WAF1/CIP1*, ответственного за дифференцировку миеломоноцитов и за контроль роста опухолей [6,8,11]. В нормальных тканях человека мРНК гена MEFV обнаруживается только в лейкоцитах периферической крови. При блот-гибридизации по Нозерну фракционированных лейкоцитов показана экспрессия гена в нейтрофилах, являющихся основными клетками, обнаруженными в воспалительных инфильтратах при ПБ [5,6]. Данный феномен подтверждает основную функцию гена MEFV, кодирующего специфический регулятор воспаления лейкоцитов, при мутации которого возникает аутовоспалительный фенотип ПБ. Экспрессия гена MEFV наблюдается при анализе кДНК клеточных линий солидных опухолей, в частности больных раком кишечника и простаты, в миелоидных клетках, участвуя в регуляции процессов миелоидной дифференцировки [5,6]. Кроме того, экспрессия MEFV-мРНК обнаруживается в селезенке, легких и мышцах, что в некоторой степени зависит от инфильтрации макрофагов и поврежденных нейтрофилов [5,6]. Потенциальное участие гена MEFV в процессах канцерогенеза продемонстрировано в лаборатории D.Kastner. У больных ПБ не обнаружено повышенной склонности к инфекциям [1,2,13]. Многие исследователи полагают, что высокая частота гетерозиготных носителей гена MEFV в некоторых популяциях Средиземноморья обусловлена их селективным преимуществом в отношении пока невыявленного патогена [9]. Следовательно, очевидно, что мутации гена MEFV приводят к развитию ПБ, однако пока конкретная функция данного гена остается не совсем ясной из-за отсутствия определенных различий в морфологии и в процессах высвобождения свободнорадикальных продуктов нейтрофилами между больными ПБ и здоровыми индивидами [1,2,7, 19].

Проведен молекулярно-генетический анализ гена MEFV у больных ПБ из разных регионов Армении. Методом PCR амплификации 10 экзонов гена MEFV из геномной ДНК с последующим исследованием рестрикционных фрагментов выявлены разные частоты наиболее распространенных мутаций среди представителей разных регионов. Изучение гено-фенотипических корреляций позволило констатировать, что разграничение клинических форм ПБ по тяжести и прогнозу может быть обеспечено клинико-генеалогическими и молекулярно-генетическими критериями.

Целью настоящего исследования является определение корреляции между генотипами и фенотипическими признаками у больных ПБ.

Обследована группа из 1000 больных ПБ в возрасте от 1 месяца до 70 лет (средний возраст 30,5 лет), составивших 1769 независимых аллелей; 263 больных являлись членами 94 семей. Передача болезни по наследству от родителей детям наблюдалась во всех семьях.

Клинические симптомы заболевания до проведения лечения колхицином (амилодоз почек, артрит, лихорадка, перитонит, плеврит, рожистое воспаление кожи, диарея) отмечали в специально разработанных анкетах, применяемых в клиниках Франции и США.

В качестве контрольной группы были обследованы 650 здоровых представителей армянской национальности.

*Анализ мутаций.* Геномную ДНК выделяли по стандартной методике из периферической крови. Для скрининга мутаций MEFV использовали несколько методов. Геномную ДНК амплифицировали с помощью соответствующих праймеров с получением продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Мутации выявляли с использованием различных ферментов рестрикции.

Эксперименты проводили с целью определения зависимости фенотипических проявлений от генотипа при скрининге мутационных изменений в последовательностях 2-, 3- и 5-го экзонов, а также большей части 10-го экзона. Условия экспериментов ПЦР и анализа фрагментов рестрикции определяли с помощью компьютерных программ MBEET87 и SQHTX. Продукты ПЦР, в которых изменения не были выявлены, последовательно смешивали с продуктами ПЦР, полученными от нормального контроля, после чего их подвергали циклу плавления и воссоединения, создавая гетеродуплексы с целью уточнения результатов реакции рестрикции.

Продукты ПЦР амплифицировали из геномной ДНК в стандартных условиях с соответствующими праймерами, которые затем обрабатывали рестрикционными ферментами. Полученные продукты ПЦР подвергали электрофорезу в агарозном или полиакриламидном геле.

Последовательный скрининг изучаемых мутаций проводили при помощи рестрикционного анализа с ферментами продуктов ПЦР, амплифицированных с праймерами.

*Статистический анализ.* Для определения корреляции между клиническими симптомами и сайтами мутаций (генотипа с фенотипом) сравнивали спектр генных мутаций с клиническими симптомами в 3 группах больных: у гомозигот по всем изученным мутациям; у гетерозигот с разными генотипами и у гетерозиготных носителей одной из мутаций. Различные клинические симптомы идентифицировали как по каждой мутации, вызывающей ПБ, так и между больными, имеющими по одной аллели.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием критериев Фишера и  $\chi^2$ . Тест  $\chi^2$  применен также и при составлении уравнений Харди-Вайнберга.

## Результаты и обсуждение

Проведен сравнительный анализ клинических симптомов между подгруппами больных, разделенных по спектру мутаций гена MEFV. У 1000 больных ПБ, проживающих в Армении, были выделены образцы ДНК для анализа мутаций гена MEFV. Исследовано 11 различных последовательностей гена MEFV. Семь из них являются мутациями M694V, V726A, M680I, R761H, F479L, M694I, E148Q, вызывающими ПБ. Совместными исследованиями с S.Amselem [3,4] выявлено, что пять последовательностей, локализованных в 5-м экзоне, полиморфны: три из них (G на A в 1422 нуклеотиде; G на A в нуклеотиде 1428; T на C в 1530 нуклеотиде) были описаны ранее, тогда как две другие были обнаружены недавно (C на T в нуклеотиде 1503; C на T в нуклеотиде 1518).

Из всех указанных последовательностей определены патологические для армянской популяции семь мутаций: M694V, M680I, V726A, R761H, M694I, E148Q, F479L, которые наблюдались в 97.63% случаев при анализе 1775 независимых аллелей. Следует выделить мутацию M694V, которая выявлена в половине исследованных аллелей.

Согласно результатам предыдущего исследования, проведенного совместно с S.Amselem [3,4], анализ распределения мутаций среди мужчин и женщин свидетельствует о повышенной пенетрантности двух мутаций 10-го экзона у мужчин: M680I (39M/23Ж,  $P < 0.001$ ) и V726A (37M/22Ж,  $P < 0.01$ ); различия не выявлены по мутации M694V (52M/45Ж, NS). Полученные результаты свидетельствуют о комплексном взаимодействии генетических детерминант с тяжестью фенотипа при ПБ.

У 1000 больных разные мутации гена MEFV обладали различной клинической экспрессией, что свидетельствует о гетерогенности его аллелей с высокой предрасположенностью гомозиготного генотипа M694V/M694V к развитию амилоидоза почек [3,4]. Во время приступов происходит приток гнойных асептических экссудатов, обогащенных нейтрофилами, в область воспаления; очевидно, экспрессия мутантных аллелей приводит к нарушению контроля процесса воспаления, опосредованного гранулоцитами [3,4]. У 66 из них при наличии определенных симптомов заболевания не было выявлено ни одной из мутаций гена MEFV.

Среди 205 лиц с одной мутацией гена у 96 наблюдались определенные признаки заболевания в отличие от 109 бессимптомных носителей.

Согласно полученным результатам, генотип MEFV наблюдался среди 686 лиц, из которых у большинства (641) была зарегистрирована ПБ (табл. 1). Сопоставив данные генетического анализа с клиническими проявлениями, установлена роль мутантного гена в полиморфизме клинического фенотипа. Анализ спектра мутаций у больных ПБ армянской национальности позволил выделить из них три основные, соответствующие фенотипу заболевания: M694V, V726A, M680I. Мутации 2-, 3-, 5- и 10-го экзонов E148Q, F479L, R761H, P369S, R408Q и другие обнаружены в основном в гетерозиготном состоянии. Гомозиготы по указанным мутациям встречаются крайне редко без выраженных клинических симптомов заболевания. Среди носителей двух мутаций гена MEFV в армянской популяции генотипами с наибольшей пенетрантностью явились следующие: M694V/M694V (98.2%); M694V/V726A (98.18%); M694V/M680I (96.46%); M680I/V726A (95.35%);

Лица с 2 мутациями гена MEFV

Генотип	ПБ	Без симптомов ПБ
M694V/M694V	168	3
M694V/V726A	162	3
M694V/M680I	109	4
M680I/V726A	82	4
M680I/M680I	26	-
M694V/R761H	21	-
V726A/V726A	22	3
M694V/E148Q	19	4
M680I/R761H	9	1
V726A/R761H	7	1
V726A/F479L	10	-
M694V/P369S	-	5
V726A/P369S	-	3
M680I/P369S	-	3
M680I/E148Q	2	1
M680I/F479L	2	-
E148Q/E148Q	-	1
F479L/F479L	1	-
M694I/E148Q	2	2
P369S/R408Q	-	1
P369S/R761H	-	1
V726A/R42W	1	-
M694V/F479L	-	1
E148Q/P369S	-	2
E148Q/R42W	-	1
Всего	641	45

M680I/M680I (100%); M694V/R761H (100%); V726A/F479L (100%); V726A/V726A (88.00%); M694V/E148Q (82.61%); M680I/R761H (90.00%). Наименьшей пенетрантностью обладают в основном генотипы, имеющие мутацию P369S. Очевидно, что присутствие аллеля P369S предотвращает развитие симптомов ПБ.

Гомозиготный (M694V/M694V) и гетерозиготный (M694V/другая мутация) генотипы наблюдались у 2/3 больных. Результаты генотипических и фенотипических корреляций представлены в табл. 2.

Таблица 2

Корреляции генотипа и фенотипа у носителей одной из мутаций гена MEFV

Мутация	Число случаев		Пол	Возраст начала заболев.	Лихорадка	Абдоминалгия	Торакалгия	Артралгия, миалгия	Амилоидоз почек, протеинурия	Кожные высыпания	Спленомегалия
	без ПБ	ПБ									
M694V	60	57	26/31	10.08	70.18%	78.95%	45.61%	19-A (35.18%) M-15 (27.78%)	A-4	3 (5.56%)	6 (11.11%)
V726A	20	20	14/6	8.33	32.50%	65.00%	45.00%	A-7 (36.84%) M-6 (31.58%)	A-1	2 (10.53%)	3 (15.79%)
M680I	11	13	4/9	9.82	76.92%	84.62%	15.38%	A-6 (54.54%) M-2 (18.18%)		1 (9.09%)	-
R761H	4	1	0/1	-	-	-	-	-	-	-	-
E148Q	-	3	2/1	-	[1]	[2]	[1]	[A-1]	-	-	-
F479L	3	1	1/0	3	[+]	[+]	[+]	-	-	-	-
K695R	-	1	1/0	6	[+]	[+]	-	-	-	-	-
A477F	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P369S	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Результаты молекулярного анализа мутаций и распределения генотипов по тяжести протекания ПБ обобщены по общепринятой системе оценки фенотипических признаков в баллах [16].

Среди больных с амилоидозом почек обнаружен наиболее характерный гомозиготный генотип по мутации M694V (22,2%,  $P < 0.01$ ), при котором чаще наблюдается артрит (56,3%,  $P < 0.01$ ) в сравнении с больными с другим генотипом. Данное различие является достоверным при сравнении гомозигот по M694V с гетерозиготами по наиболее часто встречающимся мутациям среди армян M694V/V726A и M694V/M680I ( $P < 0.01$ ). Полученные результаты представлены в табл. 1. При сопоставлении данных мутационного анализа с проявлением иных фенотипических признаков (абдоминалгия, торакалгия, кожные высыпания и др.) не было выявлено достоверных статистических различий между генотипами.

Методы молекулярно-генетической диагностики ПБ-заболевания, характеризующегося неполной пенетрантностью мутаций, относятся к наиболее информа-

тивным, позволяющим прогнозировать развитие заболевания и выбор тактики лечения. Анализ гена MEFV в генетической консультации позволит идентифицировать больных до начала приступов и рекомендовать прием колхицина, пока единственного известного эффективного средства. Генотипирование по мутациям MEFV создает перспективу выявления бессимптомных носителей двух мутаций M694V, приводящих к развитию амилоидоза почек.

Таким образом, очевидно, что молекулярное исследование, проведенное в семьях больных ПБ с учетом частот мутаций в разных регионах, открывает новые возможности для изучения этого заболевания, а также для установления правильного диагноза и прогноза для каждой семьи.

Поступила 23.03.01

**ԳԵՆՈՏԻՊԻ ԵՎ ՖԵՆՈՏԻՊԻ ԿՈՐԵԼԱՑԻԱՆԵՐԸ ՊԱՐՔԵՐԱԿԱՆ  
ՀԻՎԱՆԴՈՒԹՅԱՄԲ ՀԻՎԱՆԴՆԵՐԻ ՄՈՏ**

Հ.Ս. Հայրապետյան, Թ.Ֆ. Սարգսյան, Ե.Ն. Մնջոյան, Ջ.Ռ. Հովհաննիսյան, Թ.Ս. Ստեփանյան, Թ.Ս. Գրիգորյան, Ս. Ամսելեմ, Ս. Կազեմս

Պարբերական հիվանդությունը (ՊՆ) աուրոսում-ռեցեսիվ ձևով ժառանգվող հիվանդություն է, որը հանդիպում է միջերկրածովյան ավազանի պոպուլյացիաներում: ՊՆ բոլոր պարբերական տեսակներից այն առաջին ժառանգական հիվանդությունն է, որի պարճառը կեդային մուրացիաների առկայությունն է այն զենում, որը «Մարդու Գենոմ» ծրագրի համաձայն բորբոքային պրոցեսի կարևորագույն կարգավորիչն է հանդիսանում:

Պարբերական հիվանդությամբ քառասպոր 1000 հիվանդների մոտ ուսումնասիրվել են MEFV գենի 12 հայտնի մուրացիաները նրանց 1775 անկախ ավելներում: MEFV գենի մուրացիաների ախտահարույց դերը հայտնաբերվել է նրանց և կլինիկական առանձնահատկությունների ուսումնասիրության հիման վրա, որոնց համաձայն հիվանդների մեծամասնությունը կրում է MEFV գենի նվազագույնը 2 մուրացիաներ, իսկ մեկ մուրացիայով կամ առանց մուրացիաների հիվանդների թիվը ցածր է:

MEFV գենոտիպի ուսումնասիրությունը թույլ է քալիս հայտնաբերել հիվանդ անձանց նաև հիվանդության նախակլինիկական փուլում, մանավանդ M694V/ M694V գենոտիպի դեպքում, որը հաճախ պայմանավորում է երիկամային ամիլոիդոզի զարգացումը:

**GENOTYPE-PHENOTYPE CORRELATIONS IN PATIENTS WITH FAMILIAL MEDITERRANEAN FEVER**

H.S.Ayrapetyan, T.F.Sarkisian, E.O.Mndjoyan, Z.R.Oganesyan, T.S.Stepanyan, T.S.Grigoryan, S.Amselem, C.Cazeneuve

Familial mediterranean fever (FMF) is a recessively transmitted disorder restricted to Mediterranean populations. FMF is the first genetic disorder of all periodic inflammatory fevers caused by the gene which has been considered one of the most attractive targets in Human Genome project due to its defined regulatory role in inflammatory response. In the present study 12 MEFV gene mutations have been identified in 1775 independent alleles in 1000 Armenian patients. The diagnostic value of MEFV gene has been revealed at the analysis of correlations between the FMF gene mutations and clinical features. Apparently most of the FMF patients with two mutations of the gene, and only a small number of patients with one or without MEFV mutation have been detected. MEFV

genotyping helps to reveal affected individuals in their presymptomatic phase, especially M694V/M694V homozygous genotype, which is strongly associated with renal amyloidosis.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Bernot A., da Silva C., Dode C., Touitou I. et al. Hum.Mol.Genet., 1998, 7: 1317.
2. Booth D.R., Gillmore J.D. et al. QJM, 1998, 91:603.
3. Cazeneuve C., Sarkisian T., Ajrapetyan H., Amselem S. et al. Am.J.Hum.Genet., 1999, 65:88.
4. Cazeneuve C., Sarkisian T., Ajrapetyan H., Babloyan A., Sarkisian A., Papazian M., Amselem S. et al. Am.J.Hum.Genet., 2000, 67:1136.
5. Centola M., Aksentijevich I., Kastner D.L. Human Molecular Genetics, 7,10:1581-1588,1998.
6. Centola M., Wood G., Frucht D.M., Kastner D. Blood, 2000, 95;10:3223.
7. Dipple K.M., McCabe E.R.B. Am.J.Hum.Genet., 2000, 66:1729.
8. Gasperini S., Marchi M., Calzetti F. et al. J.Immunol., 1999, 62:4928.
9. Feingold J. Medecine/Sciences, 2000, 16:1-Y.
10. The French FMF Consortium, Nat.Genet., 1997, 17:25.
11. Huang J., Wang M.D., Lenz S., Gao D., Kaltenboeck B. J.Immunol., 1999, 162:2217.
12. The International FMF Consortium, Cell, 1997, 90:797.
13. Kastner D.L. Molecular Genetics in Clinical Practice, 1999, XIII: 1-14.
14. Kisilevsky R. Nat. Med., 2000, 6:633.
15. Kluge-Beckerman B., Yamada T. et al. Biochem.J., 2000, 332:663.
16. Livneh A., Langevitz P., Zemer D. et al. In: 2<sup>nd</sup> Conference of FMF, Antalia, 2000, p.185.
17. Matzner Y. Crit. Rev.Oncol.Hematol., 1995, 18:197.
18. Sohar E., Gafni J., Pras M. FMF, Freund,London and Tel Aviv, 1997.
19. Chae J.J., Centola M., Aksentijevich I., Kastner D. et al. Mammalian Genome, 2000, 11, p. 428.