

Сравнительный анализ генотипа с клиническими проявлениями периодической болезни при наличии трех мутаций гена MEFV

И.Т. Арзуманян

Центр медицинской генетики НАН РА

375010, Ереван, ул. Закияна, 5/1

Ключевые слова: генные мутации, периодическая болезнь, молекулярно-генетический анализ

Настоящая публикация является фрагментом работы, проводимой в Центре медицинской генетики НАН РА Армении, посвященной генетическому исследованию и консультированию больных, страдающих периодической болезнью (ПБ). Как известно, ПБ относится к аутосомнорецессивно наследуемым заболеваниям с характерными периодически повторяющимися приступами лихорадки, сопровождающимися абдоминальными, торакальными, суставными болями, рожеватым воспалением кожи и иными симптомами. Наиболее тяжелыми осложнениями заболевания являются амилоидоз почек и острый перитонит.

Ген MEFV, ответственный за развитие ПБ, размером в 15 кб, представлен 10 экзонами и кодирует белок маренострин, или пирин, состоящий из 781 аминокислоты. Имеются сведения об экспрессии данного белка в нейтрофилах с предполагаемой функцией регуляции воспалительных процессов в организме. Описано более 60 полиморфизмов и мутаций гена MEFV, многие из которых ответственны за развитие заболевания [2, 9, 10]. Большинство генетических нарушений представляют собой миссенс-мутации, в результате которых происходит замена одной аминокислоты на другую. Путем прямого секвенирования мутантной ДНК или отдельных ее экзонов могут быть обнаружены любые типы мутаций в генах человека. В связи с этим определение миссенс-мутаций, вызывающих ПБ, следует отнести к научным достижениям последних лет в области молекулярной диагностики. Имеющиеся данные позволяют полностью представить взаимосвязь мутаций гена ПБ с клиническими проявлениями заболевания.

Как было показано нашими совместными исследованиями с Лабораторией генетики НН США [5, 6], существование комплексных аллелей, несущих мутации с различной степенью ожидаемой пенетрантности, обеспечивает возможность дополнительной генетической модуляции в манифестации ПБ [3]. Исследование взаимодействия комплексных аллелей может иметь важное клиническое значение для прогноза развития заболевания. Это необычное свойство мутан-

ных аллелей, вызывающих развитие ПБ, выдвигает следующую проблему – как интерпретировать результаты MEFV-генотипирования при наличии нескольких различных мутаций. Несомненный интерес представляет проблема *cis*- или *trans*-положения исследуемых мутаций [4].

Различные комбинации мутаций гена MEFV способствуют развитию заболевания в легкой, умеренной или тяжелой форме. Генетический анализ разных популяций свидетельствует об ассоциации тяжелой формы заболевания с двумя мутациями, локализованными в "горячих точках" (кодоны 680, 694, 726) [7, 8]. Полученные результаты анализа мутаций у армянских больных из разных регионов свидетельствуют о наличии популяционных особенностей, связанных с частотой и спектром мутаций гена MEFV [4]. Степень тяжести и форма заболевания достоверно обусловлены спектром мутантных аллелей MEFV. К наиболее распространенным в армянской популяции относятся 4 мутации сегмента "В 30-2" экзона 10. Полученные результаты являются подтверждением предыдущих исследований разных популяций, в которых указанные мутации также относятся к наиболее характерным, вызывающим фенотип ПБ. Согласно результатам, полученным А.С. Айрапетян (2000), по степени тяжести фенотипических проявлений мутации располагаются следующим образом: M694V, M680I, V726A, R761H, F479L, E148Q и M694I.

Актуальность данного исследования обусловлена необходимостью выяснения особенностей сочетания нескольких мутаций гена MEFV в генотипе у больных с наиболее характерными клиническими симптомами на основе молекулярно-генетического анализа, впервые в Армении осуществленного в Центре медицинской генетики НАН РА. Проводимые с 1997 г. исследования гено-фенотипических корреляций у 3000 больных ПБ позволили констатировать наличие четкой и достоверной зависимости прогноза развития различных клинических форм ПБ от спектра мутаций, определяемых клинико-генеалогическими и молекулярно-генетическими критериями.

Целью представленной публикации является генетическое исследование ПБ среди армян при наличии нескольких мутантных аллелей гена MEFV.

Материал и методы

Материалом исследования служила цельная периферическая венозная кровь больных ПБ и здоровых индивидов. Забор крови производился в специальные пробирки с ЭДТА для последующей экстракции ДНК.

Для сравнительного анализа исследованы две группы индивидов: I группу составили 10 больных ПБ, у которых обнаружены по 3–4 мутации. Во II группу включены 11 лиц без клинических симптомов заболевания, но также являющихся носителями 3–4 мутаций гена MEFV. Молекулярно-генетический анализ проведен на 42 независимых аллелях. Основные клинические симптомы заболевания (лихорадка, возраст начала заболевания, абдоминалгия, торакалгия, суставной синдром, протенинурия, гепатоспленомегалия, кожные высыпания) отмечались клиницистами в специально разработанных анкетах, применяемых в клиниках Франции и США.

Геномную ДНК выделяли по стандартной методике и амплифицировали с помощью соответствующих праймеров с получением продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР). Продукты ПЦР подвергали электрофорезу в агарозном геле. Эксперименты проводились с целью детекции генетических изменений в последовательностях 2, 3, 5, 10-го экзонов.

Результаты и обсуждение

Учитывая чрезвычайно высокую частоту заболевания среди армян, в Центре медицинской генетики разработан и проводится молекулярно-генетический анализ, на основании которого определены восемь распространенных в армянской популяции мутаций гена MEFV: M694V, V726A, M680I, R761H, F479L, M694I, E148Q, P369S.

А.С. Айрапетян (2002) был проведен молекулярно-генетический анализ наиболее патогенных мутаций и показана четкая взаимосвязь мутантных генотипов, относящихся к разным экзонам, с фенотипом заболевания. Следует отметить мутацию M694V, которая встречается с частотой 50,6%, по сравнению с остальными исследованными аллелями. Наиболее часто встречаемые сочетания генотипов в гомозиготном и компаунд-гетерозиготном состояниях составляют три мутации 10-го экзона, вызывающие фенотип заболевания: M694V, V726A, M680I. Остальные мутации (M694I, E148Q, F479L, R761H, P369S, R408Q) встречаются у армян значительно реже и обнаруживаются в основном в компаунд-гетерозиготном состоянии. Гомозиготы по указанным мутациям встречаются крайне редко, без выраженных клинических симптомов заболевания [7].

Корреляцию между клиническими симптомами и сайтами мутаций (генотип с фенотипом) определяли путем сравнения спектра генных мутаций с клиническими симптомами в двух группах больных. У 10 из 3000 исследованных больных отмечено сочетание 3–4 мутаций гена MEFV с типичной клинической картиной ПБ.

Таблица 1

Сравнение спектра генных мутаций с клиническими симптомами у больных I группы

Генотип	Лихорадка	Манифестация (возраст)	Абдоминалгия	Торакалгия	Суставной синдром	Протенинурия	Гепатоспленомегалия	Кожный синдром
M694V/F479L/R761H	+	3	+	+	+	–	–	+
M694V/V726A/M680I	+	22	+	–	–	–	+	+
M694V/M680I/F479L	+	1,5	+	+	–	+	–	+
M694I/M680I/E148Q	+	5	+	–	–	–	–	–
M694I/M680I/V726A	+	5	+	–	–	–	–	–
M680I/E148Q/R761H	+	13	+	+	–	–	–	–
V726A/R761H/E148Q	+	14	+	+	+	–	–	–
M694V/R761H/E148Q	+	20	+	–	–	–	+	–
V726A/V726A/F479L	+	10	+	+	–	–	–	–
M694V/V726A/M680I/M680I	+	20	+	–	–	–	–	–

Из многочисленных работ Т. Саркисян, А. Айрапетян следует, что у носителей двух мутаций, а у 11,5% гетерозиготных носителей одной из мутаций гена MEFV наблюдаются некоторые клинические симптомы заболевания.

При параллельном молекулярно-генетическом анализе контрольной выборки, состоящей из 450 здоровых индивидов, также была определена группа из 11 лиц с 3-4 комплексными мутантными аллелями MEFV, однако без клинических симптомов.

При исследовании I группы больных с выявленными 3-4 мутациями гена MEFV отмечен средний возраст манифестации ПБ – 10,5 лет; лихорадка и абдоминальные наблюдения у всех, торакалгия – у половины, суставной синдром – у двоих, протеинурия – у одного, гепатоспленомегалия – у двух, кожные проявления – у трех больных. Наличие третьей, а в одном случае – четвертой мутации в данной группе не отразилось на более тяжелом течении заболевания. Клиническая картина болезни по степени тяжести полностью адекватна клинике больных с двумя мутациями данного гена в гомозиготном или компаунд-гетерозиготном состоянии. Полученные результаты являются полным подтверждением предположения о наличии именно “горячих точек” генома (т.е. тех кодонов, где данные мутации возникли) независимо от их числа. Полученные результаты представлены в табл. 1.

Проведено сравнение полученных результатов у больных I группы со II – без клинических проявлений ПБ, но с генотипами, также несущими по 3-4 комплексных мутантных аллеля. При сравнении мутантных генотипов в двух группах четким различием между ними явилось присутствие мутации P369S третьего экзона у всех 11 здоровых индивидов. На основании полученных результатов можно подтвердить ранее высказанное предположение о том, что мутация P369S в положении *cis* обладает протекторным эффектом в присутствии разных сочетаний мутаций 10-го экзона, проявляющихся сильным фенотипическим эффектом при ПБ [1]. Генотипы II группы индивидов представлены в табл. 2.

Таблица 2

Изучение связи генотипа с фенотипом
во II группе исследованных лиц

Генотип	Фенотип ПБ
P369S/M680I/M694V	отсутствует
P369S/M694V/V726A	>>
P369S/M694V/V726A	>>
P369S/M694V/V726A	>>
P369S/V726A/V726A	>>
P369S/E148Q/M680I	>>
P369S/E148Q/M694V	>>
P369S/F479L/M694V	>>
P369S/M694V/M694V	>>
P369S/R408Q/M694I	>>
P369S/M694V/M694V/ M680I	>>

На основе сопоставления данных генетического анализа с клиническими проявлениями установлена ведущая роль мутантного гена в развитии полиморфного клинического фенотипа.

Таким образом, можно заключить, что наличие третьей-четвертой мутации в генотипе больных ПБ не усугубляет клинической картины заболевания. Основной генетический эффект при развитии ПБ связан с внутригенным взаимодействием мутантных последовательностей, влияющим как на пенетрантность, так и на степень патогенности. ПБ является болезнью, зависящей в каждом конкретном случае от ряда генетических факторов, причем степень тяжести проявления болезни зависит не от количества сочетаемых мутантных аллелей, а от степени патогенности каждой из мутаций в генотипе больного.

Поступила 12.09.03

Պարբերական հիվանդության կլինիկական արտահայտվածությամբ MEFV գենի երեք մուտացիա ունեցող հիվանդների գենոտիպի համեմատական վերլուծություն

Ի.Տ. Արզումանյան

Պարբերական հիվանդությունը (ՊՀ) առատաժնեցեսիվ ձևով ժառանգվող հիվանդություն է, որը հանդիպում է միջերկրածովային ավազանի պոպուլյացիաներում: ՊՀ-ը բոլոր պարբերական

տենդերից այն առաջին ժառանգական հիվանդությունն է, որի պատճառը կետային մուտացիաների առկայությունն է այն գենում, որը «Մարդու Գենոմ» ծրագրի համաձայն բորբոքային պրոցեսի կարևորա-

գույն կարգավորիչն է հանդիսանում: Ներկա ուսումնասիրությունում հետազոտվել են հայ ՊՀ հիվանդ անձիք, որոնք ունեն 3, 4 մուտացիաներ:

Հայտնաբերված են կլինիկական առանձնահատկությունների և MEFV գենի մուտացիաների սպեկտրի տարբերությունները:

Comparative analysis of the genotype of patients with three mutations of MEFV gene with clinical manifestations of FMF

I.T. Arzumanyan

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 as one of the most attractive targets in Human Genome project due to its defined regulatory role in inflammatory response. In Armenian FMF patients with 3 and 4 MEFV gene mutations the differences in clinical features of FMF and spectrum of mutations were investi-

gated.

Our results have shown that existence of the 3rd and 4th mutation of MEFV gene has no influence on the severity of phenotype of FMF patients. This conclusion is based on the comparison with the results of molecular study of patients with two homozygous or compound heterozygous mutant alleles common for Armenian population.

Литература

1. Саркисян Т.Ф., Айрапетян А.С., Мнджоян Е.О. Медицинская наука Армении. 2001, т.XLI, 2, с. 31.
2. Booth D.R., Gillmore J.D. et al. QJM, 1998, 91:603.
3. Cazenueve C., Sarkisian T., Ajrapetyan H., Amselen S. et al. Am. J. Hum. Genet., 1999, 65:88.
4. Cazenueve C., Sarkisian T., Ajrapetyan H., Babloyan A. et al. Am. J. Hum. Genet., 2000, 67:1136.
5. Centola M., Akentijevich I., Kastner D.L. Human Molecular Genetics, 1998, 7, 10: 1581.
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. Kisilevsky R. Nat. Med., 2000, 6:633.
9. Kluve-Beckerman B., Yamada T. et al. Biochem. J., 2000, 332:663.
10. The French FMF Consortium Nat. Genet., 1997, 17:25-31.