

УДК 616-009.7+577.112

Перспективы изучения роли белка S100A4 при периодической болезни

Д. В. Севумян

*Центр медицинской генетики и первичной охраны здоровья
0001, Ереван, ул. Абовяна, 34/3*

Ключевые слова: периодическая болезнь, S100A4, мутации гена MEFV

Согласно имеющимся литературным данным, белок S100A4 обладает способностью стимулировать процесс метастазирования. Как показано, при исследовании функций белка в клетках человека, экспериментальных животных и в клеточных культурах грызунов, S100A4 является наиболее очевидным прогностическим маркером образования метастаз в опухолевых клетках [1,13]. S100A4 относится к Ca^{2+} -связывающим белкам типа “EF-hand” суперсемейства мультигенных белков S100 (9–14 кДа) и обладает способностью внутри- и межклеточной экспрессии. Известно более 20 белков семейства S100, некоторые из которых экспрессируются в тканях позвоночных [8,20]. Впервые обнаруженные в тканях головного мозга указанные белки способны растворяться в насыщенном 100% растворе сульфата аммония, чем и обусловлено их название (S100: “Soluble in 100%”) [22]. Посредством внутриклеточных взаимодействий белок способствует изменению функции белка-супрессора опухолей, p53, миозина II и липрина $\beta 1$ [15,21]. Межклеточная активность белка стимулирует разрастание первичных нейронов гиппокампа, астроцитов опухолевых клеток и ангиогенез [5]. Белки S100 имеют два EF-hand-мотива: С-концевой и N-концевой, из которых более высокой аффинностью к Ca^{2+} обладает С-концевой, из-за наличия двух дополнительных аминокислот N-концевого неканонического мотива. Два участка EF-hand связаны петлей или шарнирным участком, с расширением С-концевого мотива. Биологическая активность белков S100 связана с процессом димеризации: связывание Ca^{2+} способствует резкому изменению структуры белка путем перпендикулярного расположения спиралей III и IV и образования активного центра, формирующегося участками H4 и L2 (рис. 1).

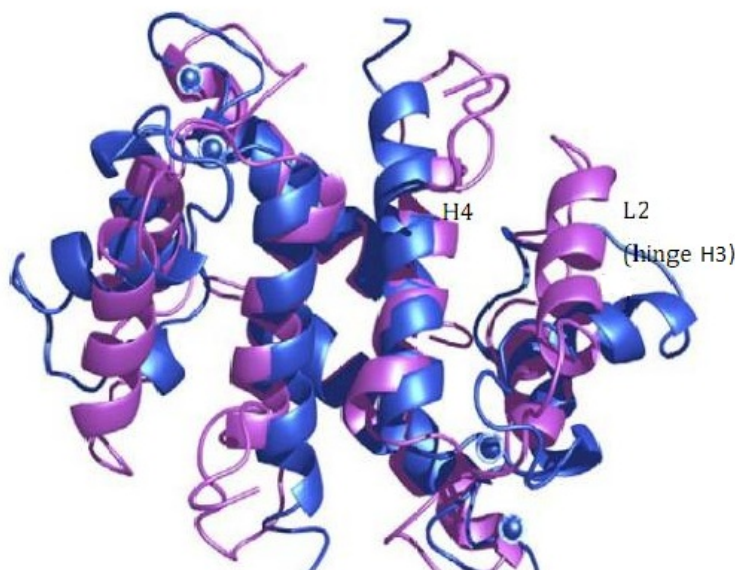


Рис. 1. Суперпозиция апо-S100A4 димера с Ca^{2+} -связанным димером S100A4.

Ионы Ca^{2+} изображены в виде сфер. Участок H3 перестраивается под воздействием связывания с Ca^{2+} , принимая перпендикулярное положение относительно H4, открывая сайт связывания с мишенью, образованную участками H4 и L2 [22]

Изменение структурной ориентации может способствовать связыванию с белком-мишенью.

Разные названия белка S100A4, а именно: p9Ka [4], CAPL [10], кальваскулин [27], mts1 [9], Fsp1 [24], pEL-98 [12], 18A2 [16], 42A [18], обусловлены его клонированием разными группами исследователей. S100A4 состоит из 101-й аминокислоты с молекулярной массой 11,6 кДа. Ген S100A4 транскрибируется генным кластером S100, расположенным в хромосоме 1q21 у человека и 3f3 у мыши. Мышиный S100A4 состоит из трех экзонов и двух интронов [17], а человеческий – содержит дополнительный, некодирующий экзон в нетранслируемом регионе 5' (UTR) и встречается в двух вариантах альтернативного сплайсинга [2]. Олигомерная структура S100A4 является биологически более активной, чем димерная [3,21]. Межклеточный белок S100A4 способен модулировать активность транскрипционных факторов p53 и NF-Kb, а также протеолитическую активность металлопротеиназ матрикса опухолевых и эндотелиальных клеток. Данные исследования свидетельствуют о важной роли S100A4 в микросреде в процессе формирования первичных и вторичных опухолей [14].

Впервые роль белков семейства S100 в стимуляции воспалительных процессов была выявлена более 20 лет назад [19]. Белки S100A8, S100A12,

S100A9, которые экспрессируются в клетках миелоидного ряда (нейтрофилы и моноциты), оказывают провоспалительное воздействие в межклеточной среде при хронических воспалительных заболеваниях. В частности, активная экспрессия белка S100A12 выявлена в воспалительной синовиальной жидкости, содержащей иммунозависимые клеточные инфильтраты, что не наблюдается в синовиальных тканях здоровых лиц и после лечения пациентов. При ревматоидном артрите, а в дальнейшем и при других воспалительных заболеваниях, установлена взаимосвязь патогенеза с активностью S100A4 и повышением регуляции мРНК. Была показана очевидная схожесть между биологическими процессами формирования опухолей и воспаления, обусловленными активацией фибробластов, иммунных клеток, p53 и NF-Kb, а также ангиогенеза. Установлено, что S100A4, являясь модулятором активации транскрипционных факторов, изменяет генную экспрессию и выполняет важнейшую функцию в патогенезе воспалительных заболеваний (на примере ревматоидного артрита).

В настоящее время выделяют группу врожденных периодических (или аутовоспалительных) синдромов, течение которых характеризуется приступами периодической лихорадки в сочетании с симптомами системного воспаления. Аутовоспалительные синдромы могут быть моногенными или полигенными, с нарушениями врожденного иммунитета. Известно, что система врожденного иммунитета реагирует не только на бактериальные и вирусные компоненты, но и на некоторые эндогенные молекулы, ассоциированные с повреждением собственных клеток. К ним относятся ядерные или цитоплазматические белки, образующиеся при повреждении клеток организма. Наиболее известными являются белок высокомолекулярной группы HMGB-1, белки теплового шока (HSPs), мочевиная кислота, поврежденные белки матрикса, амилоидный белок А (SAA), белки S100, активирующие воспалительный ответ.

Семейная средиземноморская лихорадка (периодическая болезнь – ПБ) является моногенным, аутосомно-рецессивным аутовоспалительным заболеванием, характеризующимся периодическими, самокупирующимися приступами лихорадки и локальным воспалением, с обычным поражением перитонеума, плевры, суставов, кожи. Эпизоды воспаления, главным образом, опосредованы притоком большого количества нейтрофилов в серозные полости, что сопровождается повышением уровней цитокинов острой фазы воспаления. Период атаки острого воспаления обычно недлительный (1-3 дня) и проходит спонтанно. У некоторых пациентов атаки продолжительны (более недели, до 1 месяца, редко дольше), сопровождающиеся в основном артритом, сакроилеитом или персистирующей лихорадящей миалгией. Большинство больных остаются без симптомов между атаками [23].

В Армении у 98% пациентов, страдающих ПБ, обнаруживаются мутации в гене MEFV (Mediterranean fever). Ген, который локализован в

коротком плече 16-й хромосомы, был идентифицирован в 1997 г. методами позиционного клонирования. Ген MEFV экспрессируется преимущественно в гранулоцитах и кодирует белок пирин/маренострин, состоящий из 781 аминокислоты [11,26]. Анализ аминокислотной последовательности белка свидетельствует о его экспрессии по типу ядерного фактора, регулирующего процессы транскрипции. Ген MEFV образован 10 экзонами, составляющими 14 kb геномной ДНК. Таким образом, с помощью идентификации мутаций разных экзонов гена MEFV стало возможным уточнение и установление раннего диагноза заболевания [6,26]. Пирин является частью комплекса инфламماسомы, внутриклеточной органеллы, продуцирующей интерлейкин (IL)-1 β [7]. Данный цитокин секретируется мононуклеарными клетками и триггерует каскад молекулярных реакций, результатом чего является воспаление. Мутированные формы пирина могут вовлекаться в ряд последовательных реакций, что в конечном итоге приводит к нарушению экспрессии IL-1 β . В свою очередь, избыточная экспрессия IL-1 β приводит к нарушению активации нейтрофилов и взрыву системного воспаления [7].

Распределение и частота встречаемости редких мутаций в различных этнических группах и популяциях зависят от мутагенных эффектов, действия факторов отбора, в частности, миграции, инбридинга, а также географической и этнической изолированности. Во многих популяциях (чаще всего изолятах и при высоком уровне инбридинга) широко распространены некоторые специфические рецессивные мутации; причем в определенных случаях высокая концентрация мутантных аллелей обусловлена селективным преимуществом гетерозигот. Во многих регионах разработаны специальные программы генетического скрининга для обнаружения генных мутаций у пациентов разного этнического происхождения с целью профилактики наследственных заболеваний и определения частот определенных мутаций.

В связи с широкой распространенностью рецессивно наследуемой ПБ в Армении, нами налажены методы молекулярной идентификации мутантных аллелей, при помощи которых проводится успешное выявление генных мутаций у больных и среди бессимптомных гетерозиготных носителей. В настоящей публикации представлено молекулярно-генетическое исследование мутаций гена MEFV у 100 пациентов, страдающих ПБ, а также изучена экспрессия противовоспалительного белка S100A4 вне и во время приступа с целью исследования его роли в процессах аутовоспаления.

Материал и методы

Больные

Для проведения комплексного молекулярно-генетического и имму-

ноферментного исследования отобрана группа 100 больных с клиническими проявлениями ПБ. Клинические симптомы заболевания (лихорадка, абдоминолгия, торакалгия, артриты, кожные проявления и др.) отмечали в специально разработанных международных протоколах и по рекомендациям, принятым Международным Консорциумом по аутовоспалительным заболеваниям (Брюгге, 2011 г.) [28]. Согласно клиническим симптомам и данным медицинской анкеты больные были разделены на следующие подгруппы:

1. 48 больных с подтвержденным диагнозом ПБ и до лечения колхицином.
2. 10 больных с подтвержденным диагнозом ПБ, страдающих амилоидозом почек (АП).
3. 36 больных без клинических признаков заболевания на момент исследования при наличии мутаций гена MEFV.
4. 6 больных с подтвержденным диагнозом ПБ, исследованных несколько раз во время приступа и в период между приступами до получения колхицина.

Контрольную группу составили 25 здоровых лиц соответствующего с группой пациентов возраста.

Данная работа, включая клиническое обследование больных, лабораторные анализы, инструментальные исследования, молекулярно-генетическое тестирование, забор крови и отделение плазмы у больных с подтвержденным диагнозом ПБ, проводилась в Центре медицинской генетики и первичной охраны здоровья (ЦМГ). В качестве контроля исследована группа здоровых лиц того же возраста.

Образцы плазмы крови разделены на три группы:

- больных во время приступа,
- больных в период между приступами,
- больных с АП.

Определение экспрессии белка S100A4 осуществлялось методом сэндвич ИФА, с применением S100A4-специфических поли- и моноклональных антител (запатентованный Датским обществом рака).

Молекулярно-генетический анализ мутаций гена MEFV

Геномную ДНК выделяли из периферической крови по стандартной методике. Для скрининга мутаций гена MEFV применяли методы молекулярно-генетического анализа, включающие методы ПЦР-амплификации, молекулярной гибридизации и детекции мутаций методами гель-электрофореза. Указанными методами выявляли 12 наиболее распространенных мутаций гена MEFV: E148Q (2-й экзон), P369S, R408Q (3-й экзон), F491L (5-й экзон), M680I, V726A, M694V, R761H, K695R, M694I, A744S, R42W (10-й экзон).

Определение экспрессии белка S100A4

Экспрессию белка S100A4 определяли методом сэндвич-иммуноферментного анализа (ИФА), разработанным и предложенным сотрудниками Датского института биологии рака и Института неврологии и фармакологии Университета Копенгагена (Дания). Для калибровки системы использовались очищенные рекомбинантные белки His-tagged -S100A4 в концентрационных пределах от 0.31-200 нг/мл. В 96-луночные плашки с F-образным дном лунки (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) добавляли 100 мкл предварительно разбавленных в 0.0025M буфере карбоната натрия (pH 9.5) поликлональных анти-S100A4 антител в концентрации 1.25 мкг/мл и инкубировали в холодных условиях. Для промывки использовали раствор PBS – 0.1 % Твина 20 (отмывочный буфер – ОБ) и блокирующий буфер SuperBlock PBS (Pierce). Образцы плазмы в объеме 200 мкл в различных разведениях добавляли в блокирующий буфер и инкубировали в течение 1 ч. при температуре 30°C с последующей инкубацией с моноклональными анти-S100A4 антителами. После промывки с ОБ добавляли антимышьи кроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (1:2000, DAKO, Denmark) в разбавлении 1:5 с PBS с последующей инкубацией в течение 1 ч. при температуре 30°C. После промывания плашку проявляли с помощью 3,3'-тетраметилбензидина, пероксида водорода при 30°C. Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм (VersaMax, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, USA).

Результаты и обсуждение

Нами проведено комплексное клиническое и молекулярно-генетическое исследование для постановки диагноза ПБ у 100 больных с наличием клинических симптомов заболевания. С этой целью в образцах геномной ДНК определяли спектр мутаций гена MEFV. Молекулярно-генетический анализ независимых хромосом позволил отобрать группу больных, позитивную по панели из 12 мутаций гена MEFV. Из них 97% явились носителями одной из трех наиболее пенетрантных мутаций: M694V, V726A, M680I. Как было показано ранее, в ЦМГ данные исследования ведутся с 1997 г., когда впервые были описаны генные мутации, ответственные за развитие ПБ. Исходя из полученных данных ЦМГ по частотам трех мутаций экзона 10, обладающих высокой пенетрантностью (M694V, M680I, V726A), частота больных среди армян теоретически может достигнуть 1:25 [27].

Больные были подразделены на группы согласно клинической активности заболевания: во время приступа (П), период между приступами (МП) и больные ПБ с АП. Анализ данных исследованных групп выявил значительно высокий уровень белка S100A4 в плазме крови больных

как во время приступа, так и в период между приступами и низкий уровень S100A4 у больных с диагнозом АП (рис. 2).

При проведении исследования у 36 больных ПБ было показано значительное повышение уровня белка S100A4 в плазме больных в сравнении с контрольной группой (рис. 3).

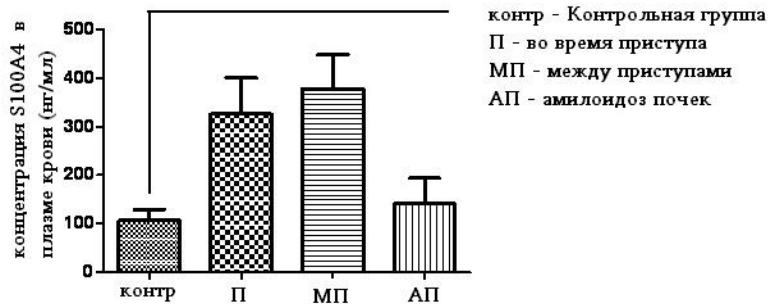


Рис. 2. Уровень белка S100A4 в плазме

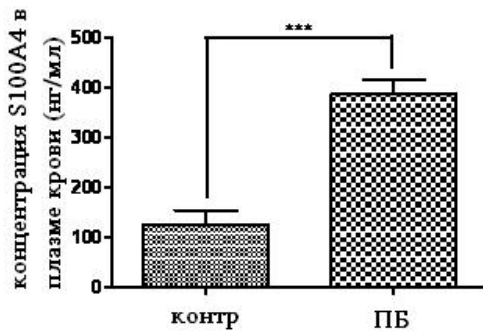


Рис. 3. Уровень белка S100A4 в плазме крови больных ПБ и контрольной группы

Согласно полученным результатам, нами отмечена корреляция мутантного генотипа и уровня белка S100A4 в плазме крови больных ПБ. В частности, в плазме крови 22 (61%) больных ПБ была отмечена повышенная концентрация белка S100A4, составившая 300 нг/мл. В данной группе 15 пациентов (68%) явились компаунд-гетерозиготами по мутациям гена MEFV, главным образом, по наиболее патогенным мутациям экзона 10, а именно M694V, V726A и M680I.

У 14 больных (39%) концентрация белка была ниже 300 нг/мл, из которых только 5 (35%) пациентов являлись гетерозиготными носителями мутаций гена MEFV (рис. 4).

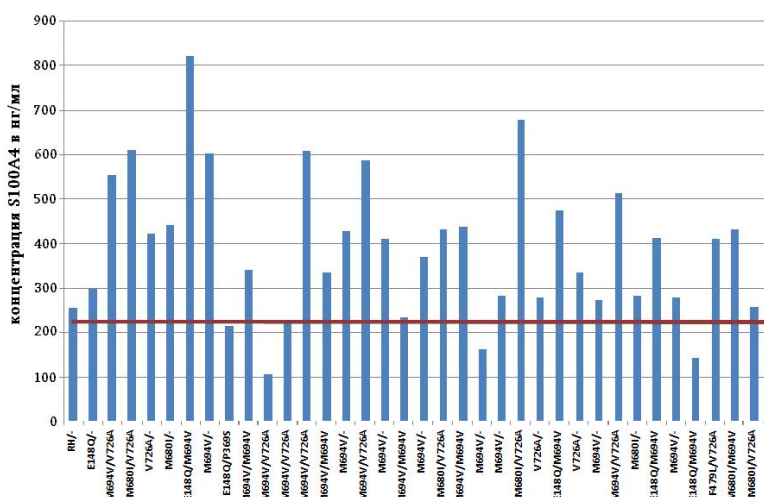


Рис. 4. Уровень белка S100A4 в зависимости от генотипа

При проведении исследования активности других белков семейства S100 у 10 больных ПБ, в частности белка S100A7, их реактивности в плазме образцов выявлено не было, в связи с чем исследование не было продолжено.

Таким образом, белок S100A4 следует отнести к одному из основных биомаркеров для мониторинга состояния пациентов, страдающих ПБ. Данный маркер может проявлять чувствительность даже в случаях субклинического воспаления у больных при отсутствии фебрильных приступов. Следует идентифицировать специфические конформационные формы белка S100A4, которые вероятнее всего играют важнейшую роль в патогенезе заболевания, в особенности у пациентов с высоким риском развития АП.

Поступила 19.02.13

**S100A4 սպիտակուցի հետազոտության հեռանկարները
պարբերական հիվանդության ժամանակ**

Դ.Վ.Սևումյան

Պարբերական հիվանդությամբ (ՊՀ) տառապող 100 անձանց մոտ կատարվել է MEFV գենի մուտացիաների մոլեկուլային-գենետիկական ուսումնասիրություն, որի արդյունքում հայտնաբերված է MEFV գենի մուտացիաների սպեկտրը ազգությամբ հայ հիվանդների մոտ: Շարու-

նակվող հետազոտությունները հնարավորություն են տվել բացահայտել MEFV գենի և ՊՀ ֆենոտիպի հարաբերակցության փաստը:

ՊՀ-ը պատկանում է աուտոբոլորբային ժառանգական պարբերական տենդերի ցանկին: Հայտնի է նաև նախաբոլորբային S100A4 սպիտակուցի կապը բոլորբային և աուտոբոլորբային հիվանդությունների պաթոգենեզի հետ:

Աշխատանքի նպատակն էր բացահայտել S100A4 սպիտակուցի դերը բրոնիկ բոլորբային խանգարումների դեպքում: Ստացված արդյունքները ցույց են տվել S100A4 սպիտակուցի զգալի աճ ՊՀ տառապող հիվանդների արյան պլազմայում՝ նրա հնարավոր մասնակցությամբ տվյալ հիվանդության պաթոգենեզի գործընթացում: Վերլուծվել է նաև S100A4 սպիտակուցի քանակի հարաբերակցությունը MEFV գենի տարբեր մուտացիաների դեպքում:

Perspectives of investigation of S100A4 protein in patients suffering from familial mediterranean fever

D.V.Sevumyan

In a group of 100 Armenian patients suffering from familial Mediterranean fever (FMF) mutations of MEFV gene have been identified. We report the results of molecular diagnostics and screening of MEFV mutations in Armenian FMF patients. An ongoing survey gives information about correlation between MEFV mutations and FMF phenotype in Armenians. FMF belongs to the group of autoinflammatory hereditary periodic fevers. Association of the pro-inflammatory event with the pathogenesis of inflammatory and autoinflammatory diseases is firmly documented.

The aim of the work was to explore furtherly the involvement of S100A4 in chronic inflammatory disorders. We have obtained data demonstrating a significant increase of S100A4 in plasma of patients with FMF and its possible involvement in the pathogenesis of the disease. Correlation of S100A4 concentration in plasma with the pattern of the genetic point mutations in MEFV gene has been analyzed.

Литература

1. Ambartsumian N.S., Grigorian M.S., Larsen I.F., Karlstrom O., Sidenius N., Rygaard J. *et al.* Metastasis of mammary carcinomas in GRS/A hybrid mice transgenic for the mts1 gene. *Oncogene*, 1996;13:1621–30.
2. Ambartsumian N., Tarabykina S., Grigorian M. *et al.* Characterization of two splice variants of metastasis associated human mts1 gene. *Gene*, 1995; 159: 125–130.
3. Ambartsumian N., Klingelhofer J., Grigorian M. *et al.* The metastasis associated Mts1(S100A4) protein could act as an angiogenic factor. *Oncogene*, 2001; 20: 4685–4695.

4. Barraclough R., Savin J., Dube S.K., Rudland P.S. Molecular cloning and sequence of the gene for p9Ka. A cultured myoepithelial cell protein with strong homology to S 100, a calcium binding protein. *J. Mol. Biol.*, 1987; 198: 13–20.
5. Belot N., Pochet R., Heizmann C.W., Kiss R., Decaestecker C. Extracellular S100A4 stimulates the migration rate of astrocytic tumor cells by modifying the organization of their actin cytoskeleton. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002;1600:74–83.
6. Chae J. J., Aksentijevich I. & Kastner D. L. Advances in the understanding of familial Mediterranean fever and possibilities for targeted therapy. *Br. J. Haematol.*, 2009, 146, 467-478.
7. Dinarello C. A. Interleukin-1beta and the autoinflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.*, 2009, 360, p. 2467-2470.
8. Donato R. S100: a multigenic family of calcium modulated proteins of the EF hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2001; 33: 637–668.
9. Ebralidze A., Tulchinsky E., Grigorian M. et al. Isolation and characterization of agene specifically expressed in different metastatic cells and whose deduced gene product has a high degree of homology to a Ca²⁺ binding protein family. *Genes Dev.*, 1989; 3: 1086-1093.
10. Engelkamp D., Schafer B.W., Erne P., Heizmann C.W. S100 alpha, CAPL, and CACY: molecular cloning and expression analysis of three calcium binding proteins from human heart. *Biochemistry*, 1992; 31: 10258–10264.
11. French FMF Consortium. A candidate gene for familial Mediterranean fever. *Nat. Genet.*, 1997, 17, p.25-31.
12. Goto K., Endo H., Fujiyoshi T. Cloning of the sequences expressed abundantly in established cell lines: identification of a cDNA clone highly homologous to S 100, a calcium binding protein. *J. Biochem.*, 1988; 103: 48–53.
13. Grigorian M., Ambartsumian N., Lykkesfeldt A.E., Bastholm L., Elling F., Georgiev G., et al. Effect of mts1 (S100A4) expression on the progression of human breast cancer cells. *Int. J. Cancer*, 1996;67:831–41.
14. Grum-Schwensen B., Klingelhofer J., Berg C.H., El-Naaman C., Grigorian M., Lukanidin E. et al. Suppression of tumor development and metastasis formation in mice lacking the S100A4 (mts1) gene. *Cancer Res.*, 2005;65:3772–80.
15. Kriajevska M., Fischer-Larsen M., Moertz E., Vorm O., Tulchinsky E., Grigorian M. et al. Liprin 1, a member of the family of LAR transmembrane tyrosine phosphatase-interacting proteins, is a new target for the metastasis-associated protein S100A4 (Mts1). *J. Biol. Chem.*, 2002;277:5229–35.
16. Linzer D.I., Nathans D. Growth related changes in specific mRNAs of cultured mouse cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983; 80: 4271–4275.
17. Lukanidin E.M., Georgiev G.P. Metastasis related mts1 gene. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1996; 213 (Pt 2): 171–195.
18. Masiakowski P., Shooter E.M. Nerve growth factor induces the genes for two proteins related to a family of calcium binding proteins in PC12 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988; 85: 1277–1281.
19. Mohr W., Kuhn C., Pelster B., Wessinghage D. S-100 protein in normal, osteoarthrotic, and arthritic cartilage. *Rheumatol. Int.*, 1985;5:273–7.
20. Moore B.W. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1965; 19: 739–744.
21. Novitskaya V., Grigorian M., Kriajevska M. et al. Oligomeric forms of the metastasis related Mts1 (S100A4) protein stimulate neuronal differentiation in cultures of rat hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 41278–41286.
22. Pathuri P., Vogeley L., Luecke H. Crystal structure of metastasis associated protein S100A4 in the active calcium bound form. *J. Mol. Biol.*, 2008; 383: 62–77.
23. Sarkisian T., Hayrapetyan H., Yegiazaryan A., Shahsuvaryan G. (2009) MEFV genotyping for diagnostics and treatment of FMF. *European Journal of Human Genetics*, 2009, 17:2; 191-222.

-
24. *Strutz F., Okada H., Lo C.W. et al.* Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J. Cell Biol.*, 1995; 130: 393–405.
 25. *Stojanov S. & Kastner D.L.* Familial autoinflammatory diseases: genetics, pathogenesis and treatment. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 2005, 17, p. 586-599.
 26. The International FMF Consortium. Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. *Cell*, 1997, 90, p. 797-807.
 27. *Watanabe Y., Usuda N., Tsugane S., Kobayashi R., Hidaka H.* Calvasculin, an encoded protein from mRNA termed pEL-98, 18A2, 42A, or p9Ka, is secreted by smooth muscle cells in culture and exhibits Ca(2+) dependent binding to 36 kDa microfibril associated glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, 1992; 267: 17136–17140.
 28. *Shinar Y., Obici L., Aksentijevich I. et al.* Guidelines for the genetic diagnosis of hereditary recurrent fevers. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2012, 4, p. 25.