

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Т.М. Сивцева, Л.Г. Гольдфарб, Т.К. Давыдова, Н. Самбуугин, К. Торо, А. Сандборгер, Ф.А. Платонов, Н. Ренвик, Х.А. Куртанов, А.Т. Дьяконова, Э.Э. Конникова, М.А. Варламова, А.Е. Адамова, О.Г. Сидорова, Дж. Хиншоу, В.Л. Осаковский

АУТОСОМНО-ДОМИНАНТНАЯ СПАСТИЧЕСКАЯ ПАРАПЛЕГИЯ В ЧЕТЫРЕХ ПОКОЛЕНИЯХ ЯКУТСКОЙ СЕМЬИ, ВЫЗЫВАЕМАЯ МУТАЦИЕЙ В ДИНАМИНЕ-2

DOI 10.25789/YMJ.2020.69.01

УДК 616.8-009.11-031.58 (=512.157)

В статье приводятся результаты клинического и генетического исследования якутской семьи с наследственной спастической параплегией (НСП). Изучены заболевшие и здоровые члены семьи. Болезнь клинически характеризуется как прогрессирующая спастическая параплегия нижних конечностей в сочетании с далеко зашедшим случаем периферической нейропатии. Применены методы экзомного секвенирования всего генома, молекулярное моделирование динамина-2 и экспериментальное воспроизведение ключевых элементов патогенеза НСП. Генетический анализ выявил мутацию с.2155C> T, p.R719W в высоко устойчивом GTP-эффекторном домене гена динамин-2. В экспериментах на клетках *HeLa* показано, что мутантный динамин-2 подавляет процесс эндоцитоза. Моделирование *in-silico* определило, что выявленная мутация расположена в сигнальном комплексе динамина-2 и потенциально нарушает сборку и функциональные свойства белка. Тестирование этой мутации в других якутских семьях с НСП показало отрицательный результат, что еще раз подтверждает генетическую гетерогенность этой патологии.

Ключевые слова: спастическая параплегия, динамин, периферическая нейропатия, экзомное секвенирование, эндоцитоз.

The article presents the results of a clinical and genetic study of a Yakut family with hereditary spastic paraplegia (HSP). Patients with clinically diagnosed HSP and healthy family members were studied. The disease is clinically characterized as a progressive spastic paraplegia of the lower extremities concomitant peripheral neuropathy in advanced case. The methods of exome sequencing of the entire genome, molecular modeling of dynamin-2 and experimental reproduction of key elements of the HSP pathogenesis have been applied. Genetic analysis revealed a novel missense c.2155C> T, p.R719W mutation in the highly conserved GTP-effector domain of the dynamin-2 gene (DNM2). In experiments on *HeLa* cells, it was shown that mutant dynamin-2 affected endocytosis process. In-silico modeling determined that the identified mutation is located in the DNM2 bundle-signaling element and potentially disrupts the assembly and functional properties of the protein. Testing of this mutation in other Yakut families with HSP showed a negative result, which once again confirms the genetic heterogeneity of this pathology.

Keywords: spastic paraplegia, dynamin, peripheral neuropathy, exome sequencing, endocytosis.

Введение. Нозологическая группа под названием «Наследственная спастическая параплегия» (НСП) объединяет клинически и генетически гетерогенные заболевания, при которых поражены центральные двигательные нейроны и их аксонные проекции. Раз-

личные формы НСП связаны с мутациями в более чем 60 генах [10]. НСП возникает вследствие мутационных изменений в генах, регулирующих разнообразные функции: эффективность трансмембранного обмена, формирование эндоплазматического ретикула, миелинизация, метаболизм липидов, а также скорость передвижения молекул в эндосомной и микротрубочной системах [5, 20]. Несмотря на разнообразие патогенетических механизмов, типичным проявлениям НСП является прогрессирующая дегенерация кортикоспинальных путей и тонкого пучка (*fasciculus gracilis*) [10]. Ключевыми диагностическими признаками служат слабость мышц нижних конечностей, повышение мышечного тонуса, гиперрефлексия, экстензорные подоживные реакции и спастичность походки [26]. Самые ранние патологические изменения отмечаются в длинных волокнах спинного мозга, они предшествуют изменениям в клеточных телах. Это привело к предположению, что НСП можно рассматривать как спинно-мозговой аналог периферической нейропатии Шарко-Мари-Тута [18].

Хронические неврологические заболевания широко распространены в Республике Саха (Якутия) [1]. Нами в якутской популяции выявлено 6 семейных случаев НСП с количеством больных от 2 до 5 чел. с различными типами наследования. Целью настоящего исследования было выявить генетические варианты, ответственные за НСП в якутских семьях.

В данной работе описан выявленный нами в якутской семье новый тип аутосомно-доминантной НСП, связанной с гетерозиготной мутацией в гене динамина-2. Динамины относятся к ГТФаза, группе ферментов, обладающих способностью гидролизировать гуанозинтрифосфат (ГТФ). Они функционируют, главным образом, в процессе эндоцитоза – помогают сформировать везикулу, наполнить её нужным грузом, провести сквозь клеточную мембрану и выпустить содержимое в цитоплазму [17]. В развивающихся нейронах эндоцитоз и экзоцитоз приобретают решающее значение для доставки питательных веществ и строительных материалов. Этот процесс играет особенно важную роль в ней-

НИЦ Медицинского института СВФУ им. М.К. Аммосова: **СИВЦЕВА Татьяна Михайловна** – к.б.н., с.н.с., tm.sivtseva@s-vfu.ru, **ПЛАТОНОВ Федор Алексеевич** – д.м.н., **ОСАКОВСКИЙ Владимир Леонидович** – к.б.н., гл.н.с.; **КОННИКОВА Эдиллия Эдуардовна** – с.н.с. Клиники Медицинского института СВФУ. Национальные Институты Здравоохранения (США): **ГОЛЬДФАРБ Лев Герцевич** – MD, PhD, **ТОРО Камило** – PhD, **САНДБОРГЕР Анна** – PhD, **ХИНШОУ Джесси** – PhD; **САМБУУГИН Ньямхишиг** – PhD, Университет Охраны Здравоохранения, г. Бетезда; **РЕНВИК Нил** – PhD, Королевский Университет, г. Кингстон (Канада). ФГБНУ ЯНЦ КМП: **ДАВЫДОВА Татьяна Кимовна** – к.м.н., в.н.с., -руковод., tanya.davydova.56@inbox.ru, **КУРТАНОВ Харитон Алексеевич** – к.м.н., гл.н.с.-руковод. отдела, **ДЬЯКОНОВА Александра Тимофеевна** – м.н.с., **ВАРЛАМОВА Марина Алексеевна** – н.с., **АДАМОВА Алина Евгеньевна** – м.н.с., **СИДОРОВА Оксана Гаврильевна** – н.с.

рональных синапсах [19]. Динамин-2 встречается повсеместно, участвуя в нескольких других клеточных процессах, а его изоформы динамин-1 и динамин-3 экспрессированы только в нейронах [22].

Материалы и методы исследования. Родословная исследуемой семьи и клиническая характеристика пациентов. В ходе многолетнего систематического исследования по выявлению и диагностике виллозного энцефаломиелимита была идентифицирована семья Н. с ярко выраженным синдромом спастической параплегии у многочисленных членов семьи. Надежные данные получены относительно 9 пациентов. Член семьи I:2 (рис. 1) страдал затрудненной походкой с молодости, прогрессирующая же мышечная слабость в нижних конечностях у него развилась примерно в 50 лет. Больной умер в возрасте 63 лет. Его три сына от двух браков (II:1, II:4 и II:6) унаследовали заболевание и наблюдались у невролога с диагнозом «наследственная

состояния, функции черепных нервов, степени парезов конечностей (шкала MRC), координаторных нарушений, сухожильных рефлексов, наличие атрофий или гипотрофий, мышечного тонуса, патологических рефлексов, установление скелетных деформаций и нарушения походки. Оценка чувствительных нарушений включала клиническое тестирование болевой, температурной, вибрационной и мышечно-суставной чувствительности. Электрофизиологическое исследование, проведенное у 3 пациентов (III:3, III:5 и IV:1), включало оценку скорости моторной и сенсорной нервной проводимости (NCV), амплитуды потенциала мышц (CMAP), дистальной моторной задержки (DML), сенсорной NCV и SNAP амплитуды, регистрируемых в стандартных условиях от срединного, локтевого, малоберцового, большеберцового и супрального нервов. Клиническая MPT спинного мозга также была проведена в этих трех случаях. Кровь для экстракции ДНК взята у 9 членов семьи.

Экзомное секвенирование всего генома. Секвенирование проводили с геномной ДНК, экстрагированной из периферических лейкоцитов пациентов II:6 и III:3. Для выделения экзонов использовали TruSeq Kit v1 (Illumina, San Diego, California) в соответствии с инструкциями производителя. Создание библиотеки, генерацию последовательностей, сопоставление с эталонным геномом (UCSC GRCh37/hg19), поиск генетических вариантов и идентификацию потенциально патогенных мутаций проводили, как рекомендовано Центром исследования всего генома при Национальных Институтах Здоровья США [4] для аутосомно-доминантной генетической модели. Были исключены мутации в других генах, вызывающих НСП или подобные заболевания. Отобранные гены-кандидаты были проверены на сегрегацию у 5 пациентов с подтвержденным диагнозом НСП и 4 непораженных членов семьи с использованием стандартного секвенирования амплифицированных фрагментов ДНК по методу Sanger.

Экспериментальное воспроизведение нарушений эндоцитоза в культуре клеток HeLa. Для определения механизма повреждающего действия мутации p.R719W проверена эффективность клатрин-зависимого

эндоцитоза в клетках *HeLa*, экспрессирующих мутантный и нормальный динамин-2. Клетки *HeLa* выращивали в среде Eagle («Life Technologies», Grand Island, NY), дополненной 10%-ной фетальной бычьей сывороткой. Фрагменты человеческой ДНК вводили в плазмиду pmM2 pmCherry-N1 («Agilent Technologies», Santa Clara, CA). В выращенные клетки *HeLa* вводили плазмиды, содержащие исследуемую мутацию p.R719W, либо немутированный ген динамина-2, с использованием трансфекционного реактива HilyMax («Dojindo Molecular Technologies», Rockville, MD). Клетки инкубировали в среде роста. Через 20 ч после трансфекции клетки *HeLa* подвергали обработке 25 мкг/мл Alexa-Fluor 488 с конъюгированным трансферрином («Life Technologies», Frederick, MD) в течение 15 мин при 37°C. Затем клетки, помеченные флуоресцентным трансферрином, фиксировали 4%-ным параформальдегидом и фотографировали с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 510. Интенсивность флуоресценции сначала измеряли в фоновом режиме; затем скорректированный общий сигнал флуоресценции трансферрина сравнивали между клетками, экспрессирующими мутантный и нормальный динамин-2. Статистическую значимость различия оценивали с использованием t-теста Стьюдента. Уровень $P < 0,05$ считали значимым.

Исследование белковой структуры мутантного динамина-2. Молекулярные модели мутантного и нормального динамина-2 получены с применением I-TASSER [12, 25, 29]. В качестве матрицы использован более исследованный динамин-1 [7]. Нуклеотидные последовательности динамина-1 и динамина-2 идентичны на 78%, а домен GTPазы – на 87%. Тетрамерное изображение белка основано на анализе кристаллических структур динамина-1 [28].

Генотипирование мутации c.2155C>T, p.R719W в гене динамин-2. Для поиска выявленной мутации в других якутских семьях были исследованы образцы ДНК от 9 больных и 6 здоровых из 7 семей с НСП. Генотипирование проводили с использованием следующей пары праймеров: F: GGGTTGGGGTGATACACAAG и R: ATGCTTGAGGGTAGGGGAAC. В результате амплификации получили фрагмент длиной 315 п.о. При обработке рестриктазой Fau I в контрольном образце получилось 4 фрагмента: 108, 87, 69 и 50 п.о., мутантный аллель имел 3 фрагмента: 195, 69 и 50 п.о.

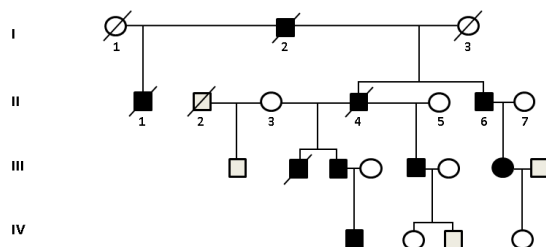


Рис. 1. Родословная семьи Н. Закрашенные символы представляют пациентов с наследственной спастической параплегией, незакрашенные – соответствуют незаболевшим членам семьи. Мутация p.R719W была идентифицирована у II:6, III:2, III:3, III:7 и IV:1; тест на мутацию был отрицательным у III:1, IV:2, IV:3 и IV:4

спастическая параплегия». В третьем поколении у трех сыновей пациента II:4, тоже от различных браков, и у дочери пациента II:6 развилось такое же заболевание (III:2, III:3, III:5 и III:7). Наконец, НСП была диагностирована у IV:1, самого молодого из наших пациентов.

Родословная была построена на основе перекрестного опроса пациентов и их ближайших родственников. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Якутского научного центра комплексных медицинских проблем (протокол №39 от 26 июня 2014 г.). После получения письменного информированного согласия от каждого участника 5 больных и 4 незаболевших члена семьи прошли стандартное неврологическое обследование, которое включало оценку психического

Результаты и обсуждение. Клиническая характеристика. Анализ родословной (рис. 1) указывает на аутосомно-доминантное наследование. Клиническая информация, полученная при оценке 5 пораженных членов семьи (II:6, III:3, III:5, III:7 и IV:1), в целом была однотипной, но имелись различия в степени выраженности парезов, прогрессивности заболевания, нарушения вибрационной чувствительности, наличия когнитивных нарушений и спастической дизартрии. Болезнь начиналась постепенно в возрасте от 10 до 37 лет с нарушения походки и мышечной слабости в нижних конечностях. Дальнейшее прогрессирование болезни у пациентов II:6 и III:5 привело к тяжелой инвалидности к 28 и 23 годам после начала заболевания. Три пациента (I:2, II:1 и III:2) умерли после болезни, продолжавшейся 23-32 года, и один (II:4) умер в результате несчастного случая.

При объективном исследовании у III:5 была обнаружена умеренная задержка когнитивного развития (по шкале MoCA 25 баллов). У всех пациентов обнаружены «стопа Фридрейха» и умеренная гипотрофия нижних конечностей. Черепные нервы были сохранены, бульбарные функции сохранялись до самой поздней стадии болезни. Типичные проявления спастической параплегии присутствовали в нижних конечностях у всех пациентов и только у одного пациента (III:3) имелась умеренно выраженная спастическая дизартрия и спастический тетрапарез с преимущественным вовлечением нижних конечностей. Коленные сухожильные рефлексы резко повышены у всех пациентов, при этом с клонусом коленной чашечки у трех (III:3, III:5, III:7) и двусторонним симптомом Бабинского у четырех больных (III:3, III:5, III:7, II:6). У всех пациентов отмечена характерная спастическая походка. Нарушение функции сфинктеров в виде задержки мочеиспускания наблюдалось в позднем периоде болезни у двух пациентов (II:6 и III:5). У III:3 и у IV:1 были обнаружены низкие ахилловы рефлексы. У пациента II:6 выявлена сгибательная контрактура мышц ног. Болевая, температурная и суставно-мышечная чувствительность не нарушены. У пациентов II:6, III:3 и III:5 обнаружено негрубое ослабление вибрационной чувствительности на стопах. Сколиоз присутствовал у одного пациента. МРТ спинного мозга, проведенная у пациентов III:3, III:5 и IV:1, не выявила признаков компрессии, атрофии или каких-либо других

изменений со стороны спинного мозга.

Таким образом, многолетние клинические наблюдения пяти пациентов согласуются с картиной прогрессирующей спастической параплегии. Только на сравнительно поздней стадии болезни появились симптомы, свидетельствующие о мягких сенсорных изменениях и дистрофической атрофии мышц.

Проводимость моторных и сенсорных нервов у пациентов III:3, III:5 и IV:1 исследовалась на 17-м, 32-м и 7-м годах после начала заболевания соответственно. Стимуляция n. peroneus profundus и n. tibialis posterior показала снижение проводимости (NCV) и подавление двигательного потенциала активности (СМАР), выраженные у пациентов с наиболее продолжительным заболеванием. Амплитуды сенсорного потенциала активности (SNAP) в n. suralis значительно снижены у тех же двух пациентов. Таким образом, электродиагностическое исследование показало нарушение аксональной проводимости в моторных и сенсорных периферических нервах нижних конечностей.

Представленные клинические и электрофизиологические данные укладываются в картину НСП с вовлечением периферического мотонейрона. Аксональная периферическая нейропатия в дистальных отделах нижних конечностях не противоречит диагнозу НСП, она описана при других подтипах этого заболевания [23]. Другие диагнозы исключены на основании результатов клинических и рутинных лабораторных исследований.

Генетический анализ. Экзомное секвенирование выполнено на материалах от больных II:6 и III:3. Ряд шагов фильтрации применены для выбора генетических вариантов, предположительно связанных с возникновением НСП, начиная с требования о том, что

вариант должен присутствовать у обоих исследованных больных в гетерозиготном состоянии. Варианты в некодирующих регионах и кодирующие аминокислоты-синонимы были исключены. Также удалены варианты, которые встречались у здоровых (на основании данных из доступных каталогов: ClinSeq (www.genome.gov/20519355), проекта 1000 геномов (<http://browser.1000genomes.org>) и ExAC (<http://exac.broadinstitute.org>)). Варианты были дополнительно оценены на основании характера функциональных нарушений, предсказанных PolyPhen-II (www.genetics.bwh.harvard.edu/pph2), SIFT (<http://sift-dna.org/sift4g>), MutationTaster (www.mutationtaster.org), ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>) и CADD ([https://cadd.gs.washington.edu](http://cadd.gs.washington.edu)). Учитывая, что у наших пациентов нейродегенеративное расстройство возникло в зрелом возрасте, мы также исключили гены, не экспрессированные в ЦНС и участвующие исключительно в раннем эмбриональном развитии. Четыре гетерозиготных варианта в нижеуказанных генах соответствовали всем вышеуказанным требованиям: *DLGAP2*, *DSCAML1*, *DNAH10*, *DNM2* (динамин-2). Эти четыре отобранных кандидата были проверены на сегрегацию в семье Н. (таблица). Единственный из четырех исследованных генетических вариантов, p.R719W в гене *DNM2*, присутствует у каждого исследованного пациента с НСП. Заболевшие члены семьи II:6, III:2, III:3, III:7 и IV:1 гетерозиготны по p.R719W мутации, в то время как незаболевшие III:1, IV:2, IV:3 и IV:4 не имеют этой мутации (таблица). Секвенирование не выявило патогенных мутаций в ранее известных НСП-ассоциированных генах.

Генотипирование выявленной мутации в других якутских семьях не выявило варианта c.2155C>T, p.R719W в гене динамин-2. Пока описанная семья

Сегрегация четырех вариантов-кандидатов в родословной семьи Н.

Член семьи	Диагноз НСП	Мутация: Ген/Вариант			
		<i>DLGAP2</i> /p.D758N	<i>DSCAML1</i> /p.I1742N	<i>DNAH10</i> /p.V3539M	<i>DNM2</i> /p.R719W
II:6	подтвержден	Мут	Мут	Мут	Мут
III:2	подтвержден	Мут	Не мут	Не мут	Мут
III:3	подтвержден	Мут	Мут	Мут	Мут
III:7	подтвержден	Мут	Мут	Мут	Мут
IV:1	подтвержден	Не иссл	Не иссл	Не иссл	Мут
III:1	исключен	Мут	Не мут	Не мут	Не мут
IV:2	исключен	Мут	Не мут	Не мут	Не мут
IV:3	исключен	Не мут	Не иссл	Не мут	Не мут
IV:4	исключен	Не мут	Не иссл	Не мут	Не мут

Мут – мутированная аллель; Не мут – не мутированная аллель; Не иссл – не исследовано

является единственным случаем НСП, связанной с этой мутацией.

О варианте с.2155C>T, p.R719W в гене динамин-2. Выявленная мутация находится на 19-й хромосоме гена динамин-2 экзон 19, в позиции 2155 (NM_001005360: c.2155C>T; Chr19 [GRCh37]: g.109398 08C>T). Нуклеотидная мутация C>T приводит на белковом уровне к замене аргинина триптофаном (R->W; рис. 2,А). Аргинин в этой позиции устойчиво сохраняется в эволюции от червя до че-

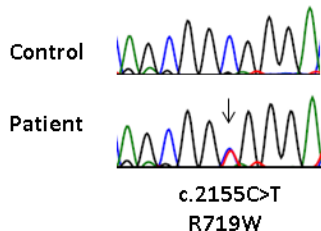
формирование полноценной структуры динамина-2. Ранее описанные мутации в динамине-2 вызывают другие известные болезни, включая две формы периферической нейропатии Шарко-Мари-Тута: аксональную CMT2M (MIM # 606482) и промежуточную CMTDIB (MIM # 606482), а также центроядерную миопатию ADCNM (MIM # 160150) (рис. 3). Мутации, ответственные за обе формы Шарко-Мари-Тута, расположены главным образом в домене РН, в то время как отдельный набор

мутаций вызывает центроядерную миопатию.

Функциональное исследование. Мутантный p.R719W динамин-2 вызывает пятнистое окрашивание в цитоплазме клеток *HeLa* (рис. 4,А, обозначено стрелками). Аналогичные морфологические феномены наблюдались и при других мутациях в динамине-2 [14]. Отмечается значительное снижение поглощения трансферрина в клетках, экспрессирующих мутантный динамин-2, по сравнению с клетками, экспрессирующими нормальный динамин-2. Это снижение было очевидным во всех трансфицированных клетках и было особенно значительным, более 50% (рис. 4,В), в клетках, отмеченных стрелками. Гранулы локализуются наиболее заметно в перинуклеарной области, где обычно накапливаются эндосомы. Эти результаты показывают, что ингибция эндоцитоза является фактором патогенеза НСП в исследуемой семье.

Структура белковой молекулы. Мутация p.R719W находится в домене GTPase белка динамин-2, его сигнальном элементе, предшествующем участку тройной спирали (BSE) (рис. 5,А). Мутации в белковых молекулах со сложной спиральной конфигурацией, как известно, ведут к наиболее серьезным структурным нарушениям при сборке. Дефект в сигнальном элементе может изменить конформацию всей молекулы [3, 11]. Кроме того, p.R719W мутация расположена вблизи критической точки соединения между BSE и стеблем. Далее, аргинин

А.



В.

DNMB2

Human: ADQAQRDDMLRM^{YH}
 Dog: ADQAQRDDMLRM^{YH}
 Pig: ADQAQRDDMLRM^{YH}
 Mice: AEQAQRDDMLRM^{YH}
 Zebra fish: AEQAQRDEMLRM^{YH}
 Worm: QIEAQKREEMLRMY^H

DNMB1

Human: AEQAQRDEMLRM^{YH}

DNMB3

Human: AEQAQRDEMLRM^{YQ}

Рис. 2. Идентификация генетического варианта, ответственного за наследственную спастическую параплегию: А - хроматограмма фрагмента гена динамин-2, показывающая замещение нуклеотида С нуклеотидом Т в позиции 2155 (показано стрелкой), что ведет к замене аргинина триптофаном на аминокислотном уровне (R -> W); В - аминокислотная последовательность эффекторного домена GTPазы в динамине-2 у различных биологических видов от червя до человека и в динамине-1 и -3 у человека. Аргинин (обозначен красной буквой R) консервативно сохраняется в эволюции и присутствует в других известных вариантах динамина

ловека (рис. 2,В), а также неизменно присутствует в динамине 1 и 2. Поиск варианта p.R719W в трех каталогах выявил только одного здорового носителя в Юго-Восточной Азии среди 60 тыс. исследованных людей (www.exac.broadinstitute.org). Динамин-2 представляет собой многодоменный белок 100 кДа, состоящий из каталитического N-концевого домена GTPase; домена MD, ответственного за олигомеризацию динамина; домена РН для взаимодействия с мембранными фосфоинозитидами; эффекторного домена GED, который активирует ГТФазу при сборке олигомеров в структуры более высокого порядка; и, наконец, С-концевого домена PRD, богатого пролином и аргинином, который служит сайтом для взаимодействия с другими белками [8, 13] (рис. 3). Мутация p.R719W находится в эффекторном домене GED, который гарантирует активацию ГТФазы и, что важнее в контексте нашего исследования, является ответственным за

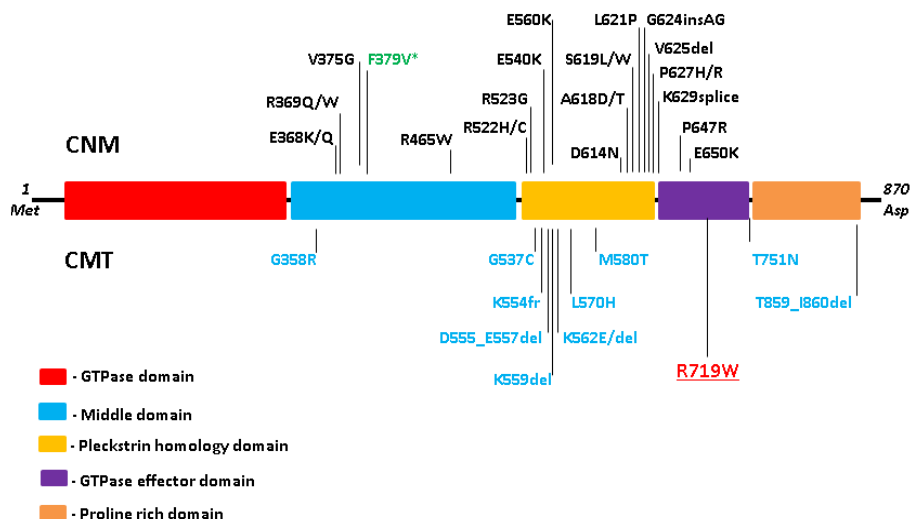


Рис. 3. Доменная структура динамина-2 и расположение мутаций, вызывающих центроядерную миопатию ADCNM (показаны в черном цвете над схемой), подтипы болезни Шарко-Мари-Тута CMT2M и CMTDIB (показаны в синем цвете под схемой) и наследственную спастическую параплегию (показана красным цветом)

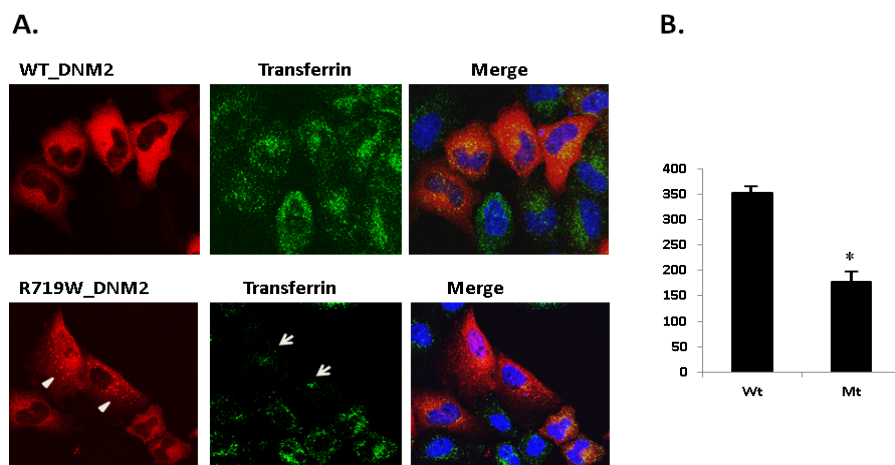


Рис. 4. Результаты функционального анализа мутации p.R719W в динамине-2: А - клетки *HeLa* с трансгенными векторами, содержащими нормальный (верхняя панель) и мутантный (нижняя панель) динамин-2. Экспрессия мутантного динамина-2 в клетках *HeLa* значительно ограничена (показано стрелками) по сравнению с нормальным. Поглощение трансферрина тоже снижено в клетках, экспрессирующих мутантный динамин-2. Трансферрин окрашен зеленым цветом (Alexa-Fluor 488) ядра выглядят синими; В - количественная оценка поглощения трансферрина. Гистограмма представляет интенсивность флуоресценции трансферрина (средняя оценка \pm стандартная ошибка) в клетках, экспрессирующих нормальный ($n = 30$ клеток) и мутированный ($n = 25$ клеток) динамин-2; $P < 0,001$

в нормальном белке обеспечивает 3 водородные связи в этом месте, тогда как мутантный триптофан только одну (рис. 5,В), что ведет к дополнительной нестабильности. Структурные изменения, связанные с p.R719W мутацией, препятствуют формированию нормального тетрамера (рис. 5,С). Мутация p.R719W, вызывающая НСП, расположена в ином структурном домене и приводит к нестабильности белковой молекулы по другому механизму в сравнении с мутациями, вызывающими периферическую нейропатию Шарко-Мари-Тута и центродерную миопатию (рис. 5,А).

На сегодняшний день в динамине-2 найдено более 40 патологических мутаций, связанных с различными заболеваниями. Мутации в этом гене ответственны за аутосомно-доминантные двигательные и сенсорные периферические нейропатии CMT2M (MIM # 606482) и CMTDIB (MIM # 606482). CMT2M и CMTDIB относят к большой группе болезней под общим названием нейропатия Шарко-Мари-Тута. Обе формы характеризуются медленно прогрессирующей мышечной слабостью и атрофией, преимущественно в дистальных отделах нижних конечностей; подтягиванием стопы при ходьбе; пониженными или отсутствующими сухожильными рефлексам; снижением болевой, температурной и вибрационной чувствительности в дистальных отделах конечностей. Часто встре-

чаются скелетные аномалии, включая сколиоз, *pes cavus* и пальцы-молоточки [21, 27]. У некоторых больных с формой CMTDIB найдено умеренное понижение скорости проводимости и дегенерация аксонов в периферических нервах [13]. Примесь признаков периферической нейропатии у наших пациентов придает некоторое своеобразие типичной в других отношениях описываемой НСП, но не противоречит диагнозу. При обсуждении вопроса о присутствии признаков спастической параплегии и периферической нейропатии у того же больного в литературе упоминается общность механизмов поражения спинно-мозговых и периферических аксонов [18].

Другое заболевание, ассоциированное с мутациями в динамине-2, центродерная миопатия ADCNM (MIM # 160150) – это врожденная миопатия, которая характеризуется прогрессирующей слабостью мышц, включая мышцы шеи, туловища и конечностей [16]. Степень тяжести варьирует от неонатальной формы с генерализованной мышечной слабостью, гипотонией и контрактурами до более легкого заболевания с поздним началом [9, 15]. У некоторых пациентов наблюдаются признаки периферической нейропатии [24]. Биопсия скелетных мышц выявляет гипотрофию миофибрил 1-го типа и аномальную централизацию ядер [6].

Функциональный анализ динамина-2 указывает на его важную роль в

процессе клатрин-зависимого эндоцитоза. Мутация p.R719W существенно нарушает этот процесс, необходимый для обеспечения синаптических связей между нейронами [19]. Результаты наших экспериментов на транскрибированных клетках *HeLa* подтверждают этиологическую роль динамина-2 в НСП.

Остается определить, почему разные мутации в динамине-2 приводят к патологическим изменениям либо в двигательных нейронах спинного мозга и кортикоспинальных путях, либо в аксонах периферических нервов или в скелетных мышцах. Существующие гипотезы основаны на учете характера деструкции белковой молекулы динамина-2 мутациями в различных доменах. Мутации, вызывающие обе формы нейропатии Шарко-Мари-Тута, расположены в домене PH, тогда как ADCNM мутации находятся на границе между доменами Stalk и PH [12]. Мутация p.R719W, вызывающая НСП, является пока единственной известной мутацией, которая уникально расположена в устойчиво-консервированном в эволюции сигнальном элементе BSE, который структурно и функционально отличается от областей, где локализуются другие мутации [22]. Моделирование *in-silico* показало, что мутация в этой области вызывает конформационное изменение спиральной конфигурации и нарушает сборку динамина. Ослабление водородных связей вокруг 719-й позиции также привносит нестабильность белковой молекуле [3, 11]. Деструкция конкретных доменов динамина-2 приводит к развитию различных нейродегенеративных заболеваний.

Заключение. Члены четырех поколений якутской семьи страдают от прогрессирующей формы наследственной спастической параплегии. Наши молекулярные, функциональные и молекулярно-структурные исследования позволили идентифицировать мутацию c.2155C> T, p.R719W в гене *DNM2*, кодирующего белок динамин-2, как причину этого заболевания. Мутантный белок становится неспособным выполнять функцию эндоцитоза, что является фактором патогенеза НСП в исследуемой семье. Мутация расположена в функционально и структурно уникальном фрагменте динамина-2, потенциально нарушая конфигурацию и синтез этого белка. Идентификация причинной мутации, вызывающей НСП с примесью периферической нейропатии, направит будущие исследования к лучшему пониманию клеточных био-

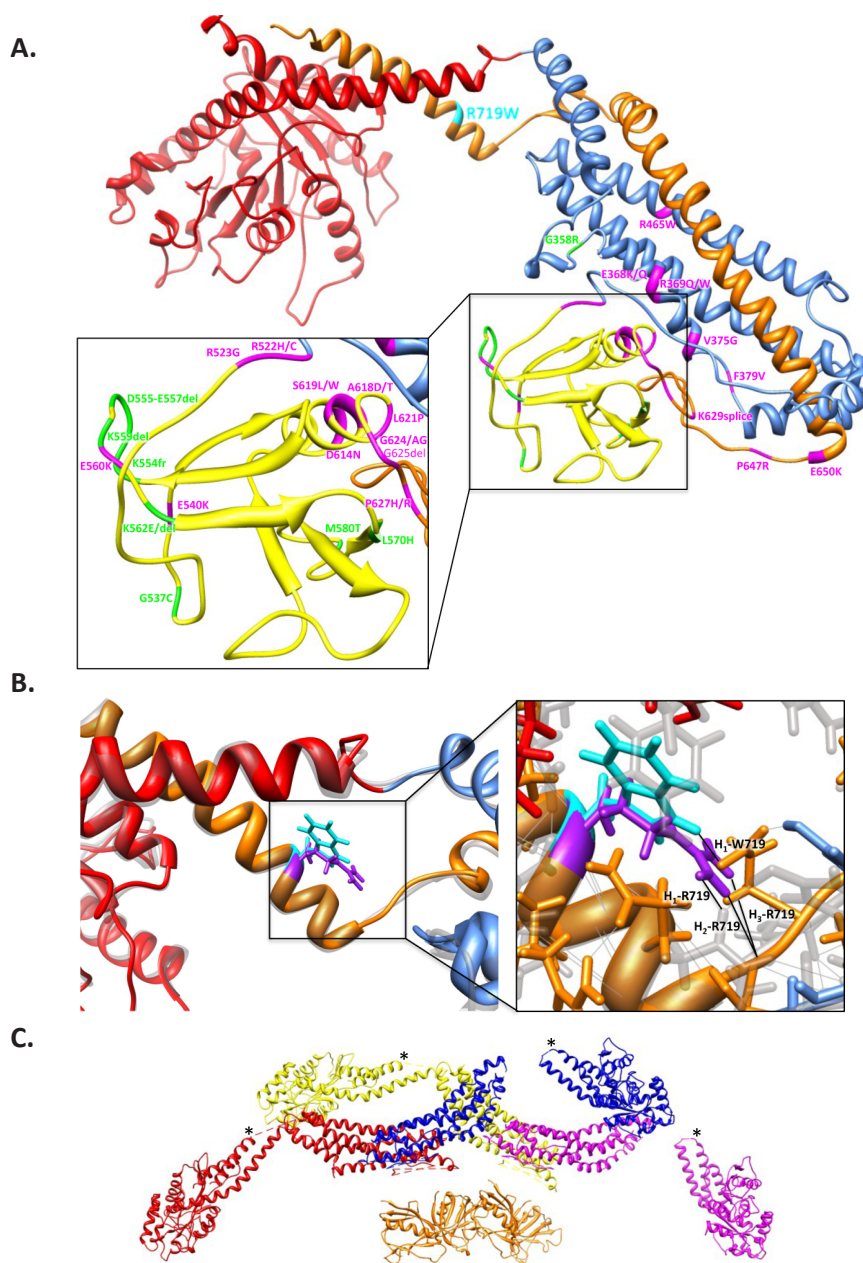


Рис. 5. Молекулярная модель белка динамин-2, построенная на основе кристаллической структуры динамина-1 [7]: А - положение мутации p.R719W, вызывающей наследственную спастическую параплегию, отмечено голубым цветом, мутации центроядерной миопатии обозначены пурпурным, мутации Шарко-Мари-Тута – зеленым цветом. Домены динамина окрашены: GTPase – красным, MD – синим, PH – желтым и GED – оранжевым цветом. Мутация p.R719W расположена в области шарнира между BSE (три пучка спиральных элементов, состоящих из N и C-концов G-области и C-концов GED) и стебель (средний и GED) динамина; В - водородные связи аргинина (R719) и заместившего его в результате мутации триптофана (W719), выявленные при наложении молекулярных моделей нормального и мутированного динамина-2. Аргинин протягивает три водородные связи (H1-3-R719) к другим частям молекулы, тогда как триптофан предлагает только одну (H1-W719); С - тетрамер динамина, синтезированный из стыковочных кристаллических структур в трехмерную карту плотности K44A-динамин-1 [2]. Мономеры окрашены в разные цвета. Звездочки указывают местоположение R725 (эквивалентно R719 в динамине-2)

логических процессов, участвующих в этих частично перекрывающихся клинических синдромах, и будет способствовать выявлению причин подобных расстройств в других семьях.

Выяснение этиологической причастности мутантного динамина-2 к НСП и патологических механизмов развития данного заболевания создает основу для разработок в направлении пред-

упреждения развития заболевания у носителей мутации.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ 2020-2022 гг. (проект «Широкогеномные исследования генофонда коренного населения арктического побережья Якутии»).

Литература

1. Николаева Т.Я. Динамика спектра наследственных болезней нервной системы в Республике Саха (Якутия) / Т.Я. Николаева, Т.Е. Попова, З.М. Кузьмина // Проблема вилуиского энцефаломиелита и дегенеративных заболеваний мозга в Якутии: тез. докл. IV междунар. науч.-практич. конф. Якутск, 2011. – С. 65-67.
2. Nikolaeva T.Ya. The dynamics of the spectrum of hereditary diseases of the nervous system in the Republic of Sakha (Yakutia). / T.Ya. Nikolaeva, T.E. Popova, Z.M. Kuzmina // The problem of Viliuisk encephalomyelitis and degenerative brain diseases in Yakutia. Abstracts of the IV International Scientific and Practical Conference. August 24-26, 2011. Yakutsk. - P. 65-67.
3. A dynamin mutant defines a superconstricted pre-fission state / AC Sundborger, S Fang, JA Heymann, et.al. // Cell Rep. – 2014. – 8. – P. 734-742. doi: 10.1016/j.celrep.2014.06.054.
4. A pseudoatomic model of the dynamin polymer identifies a hydrolysis-dependent power-stroke. / JS Chappie, JA Mears, S Fang, et.al. // Cell. – 2011. – 147. – P. 209–222. doi: 10.1016/j.cell.2011.09.003.
5. Analysis of DNA sequence variants detected by high-throughput sequencing / DR Adams, M. Sincan, K. Fuentes Fajardo, et al. // Hum Mutat. – 2012. – 33. – P. 599-608. doi: 10.1002/humu.22035
6. Blackstone C. Cellular pathways of hereditary spastic paraplegia / C. Blackstone // Annu Rev Neurosci. – 2012. – 35. – P. 25-47. doi: 10.1146/annurev-neuro-062111-150400
7. Characterization of the muscle involvement in dynamin 2-related centronuclear myopathy / D Fischer, M Herasse, M Bitoun, et.al. // Brain. – 2006. – 129. – P. 1463-1469. DOI: 10.1093/brain/awl071
8. Crystal structure of nucleotide-free dynamin / K Faelber, Y Posor, S Gao, et.al. // Nature. – 2011. – 477. – P. 556-560. doi: 10.1038/nature10369.
9. Domain structure and intramolecular regulation of dynamin GTPase / A.B. Muhlberg, D.E. Warnock, S.L. Schmid // EMBO J. – 1997. – 16. – P. 6676-6683. DOI: 10.1093/emboj/16.22.6676
10. Dynamin 2 mutations associated with human diseases impair clathrin-mediated receptor endocytosis. / M. Bitoun, AC Durieux, B Prudhon, et.al. // Hum Mutat. – 2009. – 30. – P. 1419–1427. doi: 10.1002/humu.21086.
11. Fink J.K. Hereditary spastic paraplegia: clinical principles and genetic advances / J.K. Fink // Semin Neurol. – 2014. – 34. – P. 293-305. doi: 10.1055/s-0034-1386767
12. G domain dimerization controls dynamin's assembly-stimulated GTPase activity. / JS Chappie, S Acharya, M Leonard, et.al. // Nature. – 2010. – 465. – P. 435–440. doi: 10.1038/nature09032
13. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. / A Roy,

A Kucukural, Y Zhang // Nature Protocols. – 2010. – 5. – P. 725-738. doi: 10.1038/nprot.2010.5.

13. Kenniston J.A., Lemmon M.A. Dynamin GTPase regulation is altered by PH domain mutations found in centronuclear myopathy patients / J.A. Kenniston, M.A. Lemmon // EMBO J. – 2010. – 29. – P.3054–3067. doi: 10.1038/emboj.2010.187.

14. Mild functional differences of dynamin 2 mutations associated to Centronuclear myopathy and Charcot-Marie-Tooth peripheral neuropathy / OS Koutspoulos, C Koch, V Tosch, et.al. // PloS One. – 2011. – 6. – e277498. doi: 10.1371/journal.pone.0027498.

15. MRI in DNM2-related centronuclear myopathy: evidence for highly selective muscle involvement / J Schessl, L Medne, Y Hu, et.al. // Neuromuscul Disord. – 2007. – 17. – P.28-32. DOI: 10.1016/j.nmd.2006.09.013

16. Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy / M. Bitoun, S. Maugenre, PY Jeannet, et. al. // Nat Genet. – 2005. – 37. – P. 1207–1209. DOI: 10.1038/ng1657

17. Neumann S. Dual role of BAR domain-containing proteins in regulating vesicle release catalyzed by the GTPase, dynamin-2 / S. Neumann, S.L. Schmid // J Biol Chem. – 2013. – 288. – P. 25119-25128. doi: 10.1074/jbc.M113.490474

18. Overlapping molecular pathological themes link Charcot-Marie-Tooth neuropathies and hereditary spastic paraplegias / V Timmerman, VE Clowes, E Reid // Exp Neurol. – 2013. – 246. – P.14-25. doi: 10.1016/j.expneurol.2012.01.010.

19. Overlapping role of dynamin isoforms in synaptic vesicle endocytosis / A Raimondi, SM Ferguson, X Lou, et.al. // Neuron. – 2011. – 70. – P.1100-1114. doi: 10.1016/j.neuron.2011.04.031

20. Pharmacologic rescue of axon growth defects in a human iPSC model of hereditary spastic paraplegia SPG3A / PP Zhu, KR Denton, TM Pierson, et.al. // Hum Mol Genet. – 2014. – 23. – P. 5638-5648. doi: 10.1093/hmg/ddu280.

21. Phenotypic spectrum of dynamin 2 mutations in Charcot-Marie-Tooth neuropathy / KG Claeys, S Züchner, M Kennerson, et.al. // Brain. – 2009. – 132. – P. 1741-1752. doi: 10.1093/brain/awp115

22. Praefcke G.J. The dynamin superfamily: universal membrane ablation and fission molecules? / GJ Praefcke, HT McMahon // Nature Rev Mol Cell Biol. – 2004. – 5. – P. 133-147. DOI: 10.1038/nrm1313

23. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm / P. Kumar, S. Henikoff, P.C.

Ng // Nat Protoc. – 2009. – 4. – P.1073-1081. doi: 10.1038/nprot.2009.86.

24. Romero N.B. Centronuclear myopathies / N.B. Romero, M. Bitoun // Semin Pediatr Neurol. – 2011. – 18. – P.250-256. doi: 10.1016/j.spen.2011.10.006.

25. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction / J Yang, R Yan, A Roy, et.al. // Nature Methods. – 2015. – 12. – P. 7-8. doi: 10.1038/nmeth.3213.

26. The phenotype of "pure" autosomal dominant spastic paraplegia / A Durr, A Brice, M Serdaru, et.al. // Neurology. – 1994. – 44. – P. 1274–1277. DOI: 10.1212/wnl.44.7.1274

27. Two novel mutations in dynamin-2 cause axonal Charcot-Marie-Tooth disease / GM Fabrizi, M Ferrarini, T Cavallaro, et.al. // Neurology. – 2007. – 69. – P. 291-295. DOI: 10.1212/01.wnl.0000265820.51075.61

28. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis / E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, et.al. // J Comput Chem. – 2004. – 25. – P. 1605–1612. DOI: 10.1002/jcc.20084

29. Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction / Y. Zhang // BMC Bioinformatics. – 2008. – 9. – P. 40. doi: 10.1186/1471-2105-9-40.

Н.Г. Плехова, Е.В. Крукович, Д.А. Каблуков, Т.А. Шуматова, В.С. Елисеева

ВАРИАНТЫ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ КОЛЛАГЕНА I ТИПА (COL1A1), РЕЦЕПТОРОВ К КАЛЬЦИТОНИНУ (CALCR) И ВИТАМИНУ D (VDR) И ПАРАМЕТРЫ КОСТНО-МЫШЕЧНОЙ СИСТЕМЫ ПОДРОСТКОВ ПРИМОРСКОГО КРАЯ

DOI 10.25789/YMJ.2020.69.02

УДК 616.71-007.1-053(571.63)

В соотношении с физиологическими параметрами состояния костно-мышечной системы (КМС) у здоровых подростков Приморского края изучена распространенность вариантов нуклеотидной последовательности генов rs1800012 IVS1 c.2046 G>T коллагена COL1A1; rs1801197 c.1377 T>C рецептора кальцитонина CALCR и rs731236 c.1056 T>C внутриклеточного рецептора витамина D VDR. Генетическое тестирование позволило выявить распространенность «неблагоприятных» аллелей и их сочетаний в изученных генах, регулирующих обмен кальция у подростков, и определить связь между генотипами и наличием переломов, нарушением осанки, что дает возможность выделения группы обследуемых с высоким риском развития заболеваний КМС.

Ключевые слова: ген коллагена I типа, ген рецептора кальцитонина, ген рецептора витамина D, костно-мышечная система.

The prevalence of nucleotide sequence variants of genes collagen COL1A1 rs1800012 IVS1 c.2046 G>T, and receptors of calcitonin CALCR rs1801197 c.1377 T>C and the intracellular vitamin D VDR rs731236 c.1056 T>C in healthy teenagers of the Primorsky Territory was studied in correlation with physiological parameters of the musculoskeletal system status. Genetic testing made it possible to identify the prevalence of "unfavorable" alleles and their combinations in the studied genes, regulating calcium metabolism in teenagers, and to determine the relationship between genotypes and the presence of fractures and impaired posture, that allowed distinguishing a group of subjects with a high risk of developing MSS diseases.

Keywords: gene of type I collagen, gene of calcitonin receptor, gene of vitamin D receptor, musculoskeletal system.

Тихоокеанский ГМУ, г. Владивосток: **ПЛЕХОВА Наталья Геннадьевна** – д.б.н., зав. ЦНИЛ, проф., pl_nat@hotmail.com, **КРУКОВИЧ Елена Валентиновна** – д.м.н., проф. Ин-та педиатрии, bim1964@mail.ru, **КАБЛУКОВ Денис Александрович** – аспирант Ин-та педиатрии, kablukovdenis@mail.ru; **ШУМАТОВА Татьяна Александровна** – д.м.н., проф., директор Ин-та педиатрии, shumatova@gmail.ru, **ЕЛИСЕЕВА Виктория Сергеевна** – н.с. ЦНИЛ, vic-eliseeva@mail.ru.

Введение. В подростковый период наряду с перестройкой гормональной системы происходит окончательное формирование опорно-двигательного аппарата, что сопровождается максимальным повышением минеральной плотности костной ткани [1, 7]. Показано, что метаболические нарушения формирования костной ткани приводят к торможению линейного роста детей и могут являться причиной возникновения сколиоза и ювенильного остеопороза [5, 9]. В структуре функциональных и хронических заболеваний у детей нарушения и заболевания костно-мышечной системы (КМС) находятся на I–III ранговом месте, и, по некоторым данным, у 67 % определяется вторая группа здоровья, связанная