

МУТАЦИИ ГЕНА α -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ А ПРИ ДВУХ НЕОБЫЧНЫХ ВАРИАНТАХ БОЛЕЗНИ ФАБРИ.

Е.М. БЕЙЕР¹, С.В. КОПИШИНСКАЯ², И.К. ПЛООС ВАН АМСТЕЛ³,
И.В.ЦВЕТКОВА¹

¹ Институт биомедицинской химии РАМН, Погодинская ул.10, 119832 Москва, Россия, факс (7)-(095)-245-08-57

² Кафедра неврологии и психиатрии ФУВ, Н.Новгород, Россия

³ Лаборатория ДНК-диагностики, Отделение медицинской генетики, Медицинский центр Университета г.Утрехта, Нидерланды

В двух семьях с необычными случаями болезни Фабри, описанными нами ранее, проведен мутационный анализ гена α -галактозидазы А. У больных в семье П. выявлена неизвестная ранее точечная мутация E341K (замена G на A в положении 10999 ген), приводящая к замещению Glu341 на Lys в молекуле α -галактозидазы А. У больного из семьи Н., имеющего необычно высокую активность α -галактозидазы А обнаружена другая мутация R112C (замена C на T в положении 5233 гена этого фермента), вызывающая замещение Arg112 на Cys. Эта мутация была описана ранее у японского больного с полным отсутствием активности фермента, но в комбинации с другой мутацией, а именно Glu66Gln. Обсуждается связь между генетической гетерогенностью болезни Фабри и фенотипическими проявлениями болезни.

Ключевые слова: болезнь Фабри, атипичные формы, α -галактозидаза А, мутации гена

ВВЕДЕНИЕ. Болезнь Фабри относится к группе X-сцепленных рецессивных лизосомных болезней накопления, развивающихся в результате недостаточности лизосомной α -галактозидазы А (КФ 3.2.1.22). Дефицит фермента приводит к нарушению обмена гликофинголипидов, которые накапливаются в стенках сосудов и тканях многих органов [1], вызывая нарушение их структуры и функции.

Клиническими признаками болезни Фабри являются поражения кожи в виде диффузной ангиокератомы, боли в мышцах и суставах, парестезии конечностей, а в поздней стадии - почечная и сердечная недостаточности, приводящие к летальному исходу после 40 лет жизни. Диагноз болезни Фабри может быть поставлен на основе биохимического анализа активности α -галактозидазы в лейкоцитах и плазме крови.

В настоящее время за рубежом достигнуты большие успехи в молекулярно-генетическом анализе болезни Фабри. Установлено, что ген α -галактозидазы А локализован в хромосоме Xq22. Ген размером 12 kb состоит из 7 экзонов [2]. К настоящему времени идентифицировано более 100 различных мутаций в гене α -галактозидазы А [3-5], что свидетельствует о молекулярной гетерогенности болезни Фабри. Поскольку болезни Фабри свойственна и клиническая гетерогенность, то вопрос о связи последней с молекулярной гетерогенностью является предметом интереса многих исследователей.

Ранее нами были описаны необычные случаи болезни Фабри в двух русских семьях [6]. Настоящая работа является продолжением этих исследований и посвящена изучению генетических мутаций в описанных случаях.

МЕТОДИКА. Для выявления недостаточности α -галактозидазы А использовали плазму крови и лейкоциты больных и здоровых доноров, полученные по известному методу [7]. В качестве субстрата использовали 4-метилумбеллиферил- α -D-галактопиранозид (Sigma, США). Метод определения активности фермента был описан ранее [6].

Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови по методу [8]. Анализ гена α -галактозидазы А (Банк генов, номер X1448) проводили по описанному ранее методу [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. На основании клинических симптомов и биохимических исследований нами были выявлены четыре пациента с болезнью Фабри в семье П. и один больной в семье Н. [6]. Данные биохимического анализа активности α -галактозидазы А у этих больных и некоторых членов их семей представлены в табл. 1.

Таблица. Активность α -галактозидазы в лейкоцитах и плазме крови больных и их родственников из семьи П. и семьи Н. (нмоль/час/мг белка)

Обследованные	Возраст (годы)	Лейкоциты	Плазма
<u>Семья П.:</u>			
Мать	60	33,5	9,4
Отец	63	70,0	21,8
Пробанд 1	32	5,3	-
Пробанд 2	28	7,2	-
Пробанд 3	26	8,3	5,4
Пробанд 4	22	7,5	2,6
<u>Семья Н.:</u>			
Пробанд 1	23	12,6	2,1
Сестра	30	54,0	16,0
Муж сестры	32	44,3	31,4
Контроль	27	36,0	26,3

Из таблицы видно, что у всех больных из семьи П. имеется значительное снижение активности α -галактозидазы в лейкоцитах и плазме крови. Активность α -галактозидазы у матери больных составляла около 50% от нормы, что свидетельствует о ее гетерозиготности. У трех больных из семьи П. (пробанды 2,3,4) наряду с типичными для болезни Фабри признаками имелись другие патологические симптомы, не характерные для болезни Фабри. Это отличало данных больных от пациентов с классическими проявлениями болезни Фабри. Несмотря на одинаковую остаточную активность α -галактозидазы степень проявления клинических симптомов болезни Фабри у больных братьев была различной. В то же время у больного из семьи Н. на фоне высокой остаточной активности α -галактозидазы отмечалось очень сильное проявление диффузной ангиокератомы. В предыдущей работе [6] нами отмечался необычный состав множественных форм α -галактозидазы в лейкоцитах этого больного.

В связи с атипичностью болезни Фабри в описанных случаях представлялось интересным исследовать мутации в гене α -галактозидазы в указанных семьях.

Анализ геномной ДНК обследованных больных выявил наличие в гене α -галактозидазы А точковых мутаций. Так, в семье П. у обследованных пробандов и их матери была обнаружена замена G на A в положении 10999 гена α -галактозидазы А.

Эта замена в кодоне 341 (GAA-AAA) вызывает замещение Glu на Lys в молекуле α -галактозидазы А. Обнаруженная мутация E341K является новой и дополняет список известных мутаций в Human Mutation Database. Наличие одинаковой мутации у больных братьев свидетельствует о том, что варьирование в тяжести проявления болезни Фабри обусловлено, вероятно, влиянием эпигенетических факторов, роль которых сейчас широко обсуждается в литературе [9].

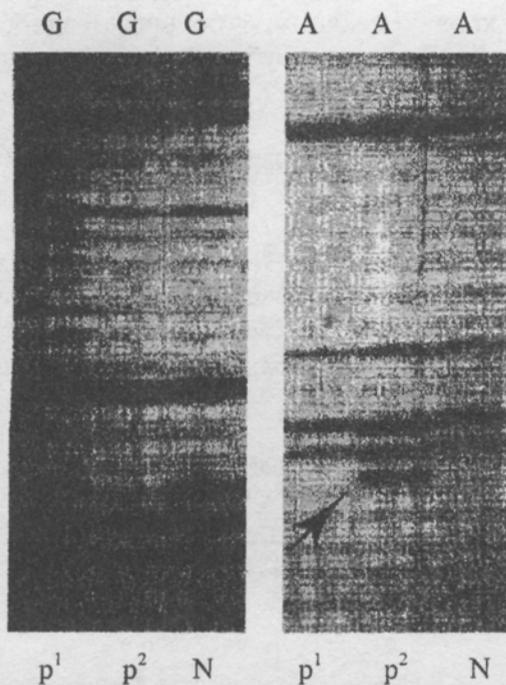


Рисунок 1.

Авторадиограмма реакции секвенирования ДНК. Стрелка показывает замену G на A в положении 10999 гена α -галактозидазы A; P¹ - пробанд с болезнью Фабри, вызванной другой известной ранее мутацией; P² - пробанд из исследованной нами семьи П.; N - нормальный индивидум.

Другая мутация была выявлена в образцах геномной ДНК больного Н. Она представляла собой замену С на Т в положении 5233 гена α -галактозидазы А, что соответствовало замещению Arg112 на Cys в молекуле фермента. Подобная мутация была описана ранее [10] у японского больного с так называемой классической формой болезни Фабри. В отличие от больного Н., у которого наблюдалась высокая остаточная активность α -галактозидазы, у японского больного активность фермента практически отсутствовала. Однако в этом случае обнаруженной мутации сопутствовала другая мутация, а именно Glu66-Gln. Анализ известных мутаций гена α -галактозидазы А при различных вариантах болезни Фабри, в том числе и наших данных, свидетельствует о том, что пока невозможно установить безусловную связь между генетической и клинической гетерогенностью болезни Фабри. Дальнейшее накопление материала, вероятно, поможет ответить на этот вопрос. Выявление мутации гена α -галактозидазы А в каждом случае болезни Фабри необходимо также для точного установления статуса гетерозиготности в семьях риска, поскольку анализ активности α -галактозидазы не всегда информативен.

Работа поддержана грантом РФФИ 98-04-48468а.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Desnick R.J., Bishop D.F. (1989). The Metabolic Bases of Inherited Diseases./ Eds. Scriver C.R. et al.- New York: McGraw-Hill, pp.1751-1796.*
2. *Kornreich R., Desnick R.J., Bishop D.F. (1989). Nucl.Acids Res., 17, 3301-3302.*
3. *Ploos van Amstel J.K., Jansen R.P.M, de Jong J.G.N., Hamel B.C.J., Wevers R.A. (1994). Hum.Mol.Genet. 3, 503-505.*
4. *Davis J.P., Eng C.N., Hill T.A. et al. (1996). Eur. J.Hum.Genet. 4, 219-224.*
5. *Guffon N., Froissart R., Chevalierporst F., Maire I. (1998). Human Mutation, Suppl. 1, pp.5288-5290.*

6. Бейер Е.М., Карнова Е.А., Удалова О.В., Цветкова И.В. (1998). *Вопр.мед.химии*, 44 (5), 494-500.
7. Kolodny E.H. (1977). *Practical Enzymology of Sphingolipidoses.* / Eds. Glew R.H., Peters S.R. - New York: A.R.Liss, pp.1-38.
8. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
9. Aerts J.M.F.G., van Weely S., Boot R., Hollak C.E.M., Tager J.M. (1993). *J.Inher., Metab.Dis.*, 16, 288-291.
10. Ishiis S., Sakuraba H., Suzuki J. (1992). *Human Genet.*, 89 (1), 29-32.

Поступила 5.05.99.

MUTATIONS OF α -GALACTOSIDASE A GENE IN TWO UNUSUAL CASES OF FABRY DISEASE

E.M.BEYER¹, S.V.KOPIHINSKAYA², J.K.PLOOS VAN AMSTEL³, I.V.TSVETKOVA¹

¹ Institute of Biomedical Chemistry, RAMS, Pogodinskaya st.10, 119832, Moscow, Russia, FAX (7)-(095)-245-08-57

² Department of Neurology and Psychiatry of Medical Institute, N.Novgorod, Russia

³ DNA Diagnostic Laboratory, Department of Medical Genetics, University Medical Center, Utrecht, The Netherlands

The mutation analysis of α -galactosidase A gene was carried out in two families with Fabry disease described by us earlier. In the family P. a new point mutation E341K (a G to A transition at position 10999 of the gene) was identified. The mutation causes a Glu341Lys substitution in α -galactosidase A molecule. Another point mutation was identified in a patient from family N. who had unusual unusually high residual activity of α -galactosidase A. The mutation was identified as R112C (a C to T transition at position 5233 of α -galactosidase A gene) and it caused the Arg112Cys substitution in the enzyme molecule. This mutation was earlier described in Japanese patient with showed a complete loss of enzyme activity. However, in this case the mutation was combined with another mutation Glu66Gln. The relationship between genetic heterogeneity and clinical manifestation of Fabry disease is discussed.

Key words: Fabry disease, atypical forms, α -galactosidase A, gene mutations