

УДК 616.056.7.577.156.575.24.

©Коллектив авторов

НЕДОСТАТОЧНОСТЬ ТРИПЕПТИДИЛ ПЕПТИДАЗЫ 1 ПРИ НЕЙРОНАЛЬНОМ ЦЕРОИДНОМ ЛИПОФУСЦИНОЗЕ. НОВАЯ МУТАЦИЯ.

А.М. Букина¹, И.В. Цветкова², А.Н. Семячкина³, Е.С. Ильина⁴

¹ГУ Медико-генетический научный центр РАМН,
117478, Москва, ул. Москворечье, д.1; эл.почта: sigorag@org.ru;
факс: (095)324-20-04

²ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича РАМН;
119121, Москва, ул. Погодинская, д.10; факс: (095) 245-08-57

³Институт педиатрии и детской хирургии МЗ РФ; 125412, Москва, ул.
Талдомская, д.2; факс: (095) 483-33-35

⁴Российская детская клиническая больница МЗ РФ; 117513, Москва,
Ленинский пр-т, д.117; факс: (095) 434-11-77

Представлены данные по биохимической и молекулярно-генетической диагностике наследственной лизосомной болезни накопления - позднего детского нейронального цероидного липофусциноза (НЦЛ2). Заболевание связано с наследственной недостаточностью нечувствительной к пепстатину пептидазы (трипептидил пептидазы 1 (ТПП1)), обусловленной мутациями в кодирующем ТПП1 гене CLN2. Среди обследованных нами 30 больных с характерными для НЦЛ клиническими признаками выявлено 6 пациентов с резким снижением активности этого фермента, что позволило диагностировать у них НЦЛ2. Анализ выделенной ДНК обнаружил у всех пациентов наличие наиболее распространенной в мире мутации g3670C>T (R208X), приводящей к преждевременной терминации синтеза ТПП1. Показано, что у 5 пациентов эта мутация присутствует в гомозиготном состоянии, а у одного - в гетерозиготном. У этого пациента была обнаружена неизвестная ранее мутация g3665G>A (R206H). Обсуждается вопрос о патогенетической значимости этой мутации, а также важность биохимической и молекулярно-генетической диагностики НЦЛ для медико-генетического консультирования и пренатальной диагностики заболевания.

Ключевые слова: трипептидилпептидаза 1, наследственная недостаточность, нейрональный цероидный липофусциноз (НЦЛ), мутации.

ВВЕДЕНИЕ. Трипептидил пептидаза 1 (ТПП 1) - гликопротеин (молекулярная масса 46 кДа) с оптимумом pH 4-5. Этот лизосомный фермент принадлежит к семейству пепстатин-нечувствительных карбоксипептидаз и обладает широкой субстратной специфичностью. ТПП 1 расщепляет олигопептиды, образующиеся после воздействия эндопептидаз на белки, на трипептиды, причем гидролиз олигопептидов осуществляется со стороны NH2-концевого остатка молекулы [1].

Было показано, что ген, кодирующий ТПП1 идентичен гену CLN 2, мутации в котором приводят к возникновению позднего инфантильного нейронального цероидного липофусциноза (НЦЛ 2) [2].

НЕДОСТАТОЧНОСТЬ ТРИПЕПТИДИЛ ПЕПТИДАЗЫ 1 ПРИ ЛИПОФУСЦИНОЗЕ

Нейрональный цероидный липофусциноз (НЦЛ) - группа генетически обусловленных нейродегенеративных заболеваний, характеризующаяся накоплением аутофлуоресцентных веществ (цероида и липофусцина) в лизосомах нейронов и клетках других тканей. Выделяют, по меньшей мере, 4 различные клинические формы НЦЛ: инфантильную (НЦЛ 1), позднюю инфантильную (НЦЛ 2), ювенильную (НЦЛ 3) и взрослую (НЦЛ 4), различающиеся по возрасту манифестации и скорости прогрессирования, а также довольно большое количество атипичных клинических форм (около 15), объединяющих 10 - 20% больных НЦЛ [3, 4].

В клинической картине доминируют прогрессирующая потеря зрения (исключение - взрослая форма), деменция, судороги, миоклонии, регресс моторного развития. Все формы НЦЛ наследуются по аутосомно-рецессивному типу, кроме взрослой формы, которая может наследоваться и по аутосомно-рецессивному, и по аутосомно-доминантному типу, что создает дополнительные проблемы для дифференциальной диагностики и медико-генетического консультирования [5].

Недавние исследования показали, что разные формы НЦЛ - результат мутаций, по крайней мере, восьми генов, обозначенных *CLN1* - *CLN8*. Предполагается, что продукты этих генов играют важную роль в катаболизме белков в клетке [6]. Некоторые из этих продуктов являются мембранными белками (продукты генов *CLN3*, *CLN5*, *CLN8*), функция которых еще не установлена. Продукты генов *CLN1* и *CLN2* являются ферментами, а именно пальмитоил-протеин тиоэстеразой и ТПП1 соответственно. В статье представлены данные по выявлению недостаточности ТПП1 и связанных с ней мутаций гена *CLN2* у пациентов с подозрением на НЦЛ.

МЕТОДИКА. Пациенты. Обследованы 30 пациентов с характерными для НЦЛ 2 клиническими признаками: эпилептическими припадками, деменцией, миоклонией, атаксией, снижением остроты зрения, приводящей к полной слепоте вследствие дегенерации сетчатки, регрессом моторного развития.

Измерение активности ТПП 1. Активность ТПП 1 измеряли в гомогенате лейкоцитов или в культуре кожных фибробластов (ККФ) с помощью флуорогенного субстрата - Ala-Ala-Phe-7 аминокислот-4 метилкумарина [7].

Выделение геномной ДНК. Геномную ДНК пациентов из ККФ (~10⁷ клеток) или лимфоцитов периферической крови (500 мкл), собранной в 0,5М ЭДТА pH 8,0, выделяли стандартным фенол-хлороформным методом [8]. Геномную ДНК хранили при - 20° С.

Мутационный анализ. Мутационный анализ гена *CLN2* проводился при помощи стандартной ПЦР, SSCP, прямого нерадиоактивного секвенирования и аллель-специфической амплификации. Для этого амплифицировали 13 экзонов гена *CLN2*, которые потом скринировали SSCP методом для отбора образцов с измененной электрофоретической подвижностью. Методом прямого нерадиоактивного автоматизированного секвенирования была определена первичная нуклеотидная последовательность обеих (прямой и обратной) цепей ДНК для каждого предположительно мутантного экзона. Результаты сравнивали с известной нуклеотидной последовательностью ДНК экзонов нормального гена (рис. А,Б,В). Новые мутации подтверждались аллель-специфичной ПЦР.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Среди обследованных нами больных у шести пациентов была выявлена резкая недостаточность ТПП 1. Активность фермента у пациентов составила 0,3 - 0,8 нмоль/мг/час в лейкоцитах и 0 - 1,6 нмоль/мг/час в ККФ при норме 50,0 - 150 нмоль/мг/час и 70 - 300 нмоль/мг/час соответственно (табл.). Таким образом, активность ТПП1 у пациентов была менее 10% от нормы, что позволило диагностировать у них НЦЛ2.

Мутационный анализ показал, что все шесть пациентов - носители мутации g3670C>T (R208X), приводящей к преждевременной терминации синтеза ТПП 1. Причем 5 пациентов - гомозиготы, а один - гетерозигота по данной мутации

Таблица. Результаты энзимо- и ДНК-диагностики больных с нейрональным цероидным липофузином 2 типа.

Пациенты	Активность ТПП 1 (нмоль/час/ мг белка)	ДНК – диагностика	
		1 аллель	2 аллель
Норма: л. ф.	50 – 150 70 – 300	-	-
1	0,3 (л.)	R208X	R208X
2	0 (ф.)	R208X	R208X
3	0,7 (л.)	R208X	R208X
4	0,8 (л.)	R208X	R206H
5	1,2(ф)	R208X	R208X
6	1,6 (ф.)	R208X	R208X

Примечание: л. - лейкоциты. ф. - фибробласты

(рис.Б,В). У гетерозиготного пациента обнаружена ранее неизвестная миссенс-мутация g3665G>A (R206H), вызывающая замену аргинина на гистидин в 206 положении (табл., рис. В). Обследование 100 хромосом методом аллель-специфической амплификации не выявило этой мутации у здоровых представителей популяции и у других пациентов с НЦЛ 2. Но, так как эта мутация не затрагивает высоко консервативную область фермента, то определить ее

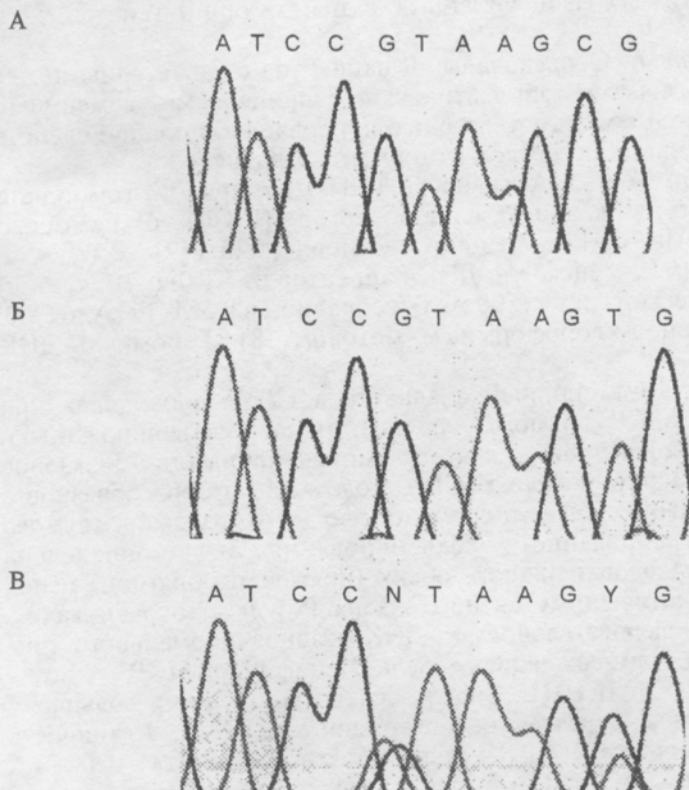


Рисунок.

А - фрагмент гена *CLN2* в норме; Б - nonsense-мутация g3670C>T (R208X) в гомозиготном состоянии; В - новая миссенс-мутация g3665G>A (R206H) и nonsense-мутация g3670C>T (R208X).

НЕДОСТАТОЧНОСТЬ ТРИПЕПТИДИЛ ПЕПТИДАЗЫ 1 ПРИ ЛИПОФУСЦИНОЗЕ

патогенетическую значимость поможет только дальнейший структурно-функциональный анализ ТПП1.

Найденная у всех шести больных мутация g3670C>T - одна из наиболее частых в мире. Однако полученные результаты не позволяют однозначно считать, что и в России сохраняется та же тенденция распределения этой мутации, что и в других странах, поскольку выборка больных с НЦЛ 2 у нас была небольшой. Что касается пациентов, гомозиготных по мутации R208X, то возможно предположить, что они обладают классической для этого типа заболевания клиникой. Однако в любом случае для определенных выводов необходимо накопить значительно больше материала.

Механизм, с помощью которого недостаточность ТПП1 приводит к возникновению НЦЛ2, неясен. Известно, что при заболевании в лизосомах накапливается субъединица с АТР-синтазы [9], которая входит в состав ионного канала митохондриального комплекса. Такое накопление может указывать на дисфункцию протеолиза в лизосомах. Однако связана ли с этим накоплением массовая гибель нейронов при НЦЛ2 неизвестно, как неизвестно и то, является ли накопление субъединицы с АТР-синтазы причиной или следствием болезни. Возможно, что субъединица с представляет собой природный субстрат для ТПП1 и потому накапливается при ее недостаточности. Однако накопление этой субъединицы показано и при других формах НЦЛ, где нет дефекта ТПП1.

Как при любых наследственных лизосомных болезнях, лечение которых пока невозможно, при НЦЛ 2 помощь семьям с детьми, страдающими НЦЛ 2, ограничивается медико-генетическим консультированием и пренатальной диагностикой. В связи с этим клинический диагноз НЦЛ 2 должен быть подтвержден на биохимическом и/или молекулярно-генетическом уровне.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Aberg L., Jarvela I., Rapola J., Autti T. et al. (1998) *Acta Neuropathol.* **95**, 306 - 312.
2. Sleat D.E., Donnelly R.J., Lackland H., Liu C.-G. et al. (1997) *Science*, **19**, 277 (5333): 1802 - 1805.
3. Dyken P., Wisniewski K. (1995) *Am. J. Med. Genet.*, **57**, 150 - 154.
4. Goebel H.H.. (1995) *J. Child. Neurol.*, **10**, 424 - 437.
5. Martin J.-J.M.. (1993) *J. Inher. Metab. Dis.*, **16**, 237 - 240.
6. Savukoski B.M., Klockars T., Holmberg V., Santavuori P. et al. (1998), *Nature Genet.*, **19**, 286 - 288.
7. Vines D.J., Warbuton M.J.. (1999) *FEBS Letts*, **443**, 131 - 135.
8. Sambrook J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
9. Sohar I., Sleat D.E., Jadot M. and Lobel P. (1999) *J. Neurochem.*, **73**, 700-711.

Поступила 22.08.2002.

DEFICIENCY OF TRIPEPTIDYL PEPTIDASE 1 IN NEURONAL
CEROID LIPOFUSCINOSIS.
A NOVEL MUTATION.

*A.M.Boukina¹, I.V.Tsvetkova², A.N.Semyachkina³,
E.S.Ilyina⁴*

¹Research Centre for Medical Genetics RAMS, 117478, Moscow Moscvorechij St. 1;
e-mail: sigorag@orc.ru; fax: (095)324-20-04.

²Orechovich Institute of Biomedical Chemistry RAMS;

119121 Moscow, Pogodinskaya St., 10; fax: (095) 245-08-57.

³Institute of Pediatrics and Child Surgery, Ministry of Public Health of Russian Federation;
125412 Moscow, Taldomskaya St. 2; fax: (095) 483-33-35.

⁴Russian Child Clinical Hospital, Ministry of Public Health of Russian Federation; 117513,
117513 Moscow, Leninskij Prospect, 117; fax: (095) 434-11-77.

The data on biochemical and molecular-genetic diagnostics of a hereditary lysosomal storage disease, late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN2) are presented. The disease is associated with a hereditary deficiency of pepstatin-unsensitive peptidase - tripeptidylpeptidase 1 (TPP1) - caused by mutations in the TPP1-coding gene *CLN2*. Among the 30 patients with clinical manifestations of CLN, six patients with a pronounced decrease in TPP1 activity were revealed; these data were interpreted as indicating the presence of CLN2 in these patients. The analysis of the isolated DNA indicated the availability of the most widespread mutation g3670C>T(R208X) leading to the untimely termination of TPP1 synthesis. It was shown that in 5 patients this mutation is present in homozygous state and in one patient, in the heterozygous state. In this patient a hitherto unknown mutation, g3665G>A (R206H), was revealed. The pathogenetic significance of this mutation and the importance of molecular-genetic diagnosis of CLN are discussed with regard to medico-genetic consulting and prenatal diagnosis of this disease.

Key words: tripeptidyl-peptidase 1 (TPP 1), hereditary deficiency, neuronal ceroid lipofuscinosis (NCL), mutations.