

УДК 616.5-008.921.8-55.71-07:616.153.1.074

©Букина, Цветкова

ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАЦИЙ ГЕНА КИСЛОЙ β -D-ГЛЮКОЗИДАЗЫ (GBA) СРЕДИ 68 РОССИЙСКИХ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ГОШЕ

Т.М. Букина^{1}, И.В. Цветкова²*

¹Медико-генетический научный центр РАМН, 115478 Москва, ул. Москворечье, д.1; тел./факс: (495) 111-83-66; e-mail: tbookina@mail.ru
²ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121 Москва, Погодинская ул., 10

Болезнь Гоше (БГ) - наиболее широко распространенное заболевание из группы лизосомных болезней накопления, встречающееся во всех популяциях. Причиной развития БГ служат мутации в гене кислой β -D-глюкозидазы (GBA), приводящие к снижению или полной утрате ферментативной активности кислой β -D-глюкозидазы. Приведены результаты молекулярно-генетического анализа 68 российских пациентов из 65 семей с разными типами БГ. Генотип полностью установлен у 58 пациентов, и у всех пациентов был обнаружен хотя бы один мутантный аллель (92,6%). Кроме частых мутаций (p.N370S; c.1263_1317del55bp; p.L444P; p.R463C; RecNciI (p.L444P; p.A456P; p.V460V)) были выявлены редкие мутации (p.R184W; p.R120W; p.R170C; p.G202R; Rec C (p.R120W; p.W184R; p.N188K; p.V191G; p.S196P; p.G202R; p.F213I)), встречающиеся у пациентов с БГ в других популяциях, и мутации, описанные впервые (p.P236T, p.L288P, p.L249Q, p.P319S, p.V352M, p.W381X, p.A384D). Приведены результаты сравнения мутаций GBA в изученной российской выборке пациентов с мутациями GBA пациентов ряда других европейских популяций. Обсуждаются гено-фенотипические взаимодействия при БГ.

Ключевые слова: болезнь Гоше, кислая β -D-глюкозидаза, ген кислой β -D-глюкозидазы (GBA), молекулярно-генетический анализ, мутации.

ВВЕДЕНИЕ. Болезнь Гоше (БГ) (MIM (менделирующий индекс человека) 230800; 230900; 231000) относится к группе редких наследственных нарушений обмена веществ – сфинголипидозам, среди которых она является наиболее распространенной. БГ, впервые описанная в 1882 г. Филиппом Гоше, наследуется по аутосомно-рецессивному типу и является результатом наследственного недостатка активности лизосомного фермента кислой β -D-глюкозидазы (КФ 3.2.1.45), ведущего к снижению скорости гидролиза глюкоцереброзида. В результате последний накапливается у пациентов с БГ преимущественно в лизосомах макрофагов. Эти клетки (“клетки Гоше”) обнаруживаются во всех тканях и органах, но в наибольшем количестве в селезенке, печени и костном мозге, вызывая развитие гепатомегалии, спленомегалии, анемии, панцитопении, поражений скелета.

Традиционно, в зависимости от наличия и скорости развития неврологических признаков выделяют три типа БГ [1]. 1 тип (MIM #230800) – взрослый или хронический неневрологический. 2 тип БГ (MIM #230900) – детский, или острый неврологический. 3 тип БГ (MIM #231000) – юношеский, или хронический неврологический. БГ характеризуется множеством клинических форм – от тяжелой, приводящей к внутриутробной гибели плода, до лёгкой, протекающей почти бессимптомно [2, 3].

* - адресат для переписки

Частота клинических типов БГ различна. Наиболее широко распространён 1 тип БГ (среди евреев ашкенази – 1:850, а в различных нееврейских европейских популяциях – от 1:60000 до 1:40000). 2 и 3 типы БГ встречаются реже (1:100 000 и от 1:50 000 до 1:100 000 соответственно).

БГ обусловлена мутациями в гене β -D-глюкозидазы (GVA). Ген GVA протяженностью 7,5 т.п.н. расположен на длинном плече хромосомы 1 в локусе 1q21 и состоит из 11 экзонов (GenBank No. J03059). На расстоянии 16 т.п.н. от GVA располагается его псевдоген (pGVA) на 97% гомологичный функциональному гену. Первичная структура псевдогена отличается несовпадением некоторых нуклеотидов, рассеянных по всей длине pGVA, “делеции” 55 п.н. в 9 экзоне, а также наличием 4 больших “делеций” во 2, 4, 6 и 7 интронах (313, 626, 320 и 277 п.н. соответственно), которые делают псевдоген короче функционального гена [4].

В настоящее время описано около 200 мутаций гена GVA. Согласно тяжести их фенотипического проявления, мутации делятся на мягкие, грубые и летальные. Мутация считается мягкой, если она встречается только у пациентов с 1 типом БГ (вне зависимости от других аллелей). Грубые мутации ассоциируются с неврологическими типами БГ, а летальные мутации никогда не встречаются в гомозиготном или гетерозиготном состоянии с другими летальными мутациями [5].

Среди мутаций структурного гена и его псевдогена были найдены нуклеотидные замены, приводящие либо к аминокислотным заменам, либо к мутациям нарушения сайта сплайсинга, инсерции, делеции, мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания и комплексные аллели, объединяющие несколько мутаций. Так как некоторые мутации гена (например, p.L444P, p.R120W, c.1213_1317del55bp, p.G202R) входят в состав нормальной последовательности псевдогена, то необходимо использовать методы, позволяющие избежать влияния pGVA на результаты молекулярно-генетического анализа пациента [4].

Частота и состав мутантных аллелей в разных популяциях различаются. Например, среди пациентов еврейского происхождения с БГ 1 типа мутации N370S, c.84 insG, p.L444P, IVS2+1G>A составляют более 96%, а среди пациентов, не имеющих еврейских корней - около 75% [1,6]. У японских пациентов с БГ частыми являются мутации p.L444P и p.F213I, а мутации p.N370S и c.84insG не встречаются [7, 8]. У португальских пациентов с БГ мутация p.N370S составляет 63%, а редкие мутации p.G377S и p.N396T являются частыми [9, 10].

Несмотря на многочисленные попытки объяснить природу клинических различий у пациентов с одинаковым типом БГ, корреляции между генотипом и фенотипом болезни еще не определены и касаются в основном только некоторых особенностей мягкой мутации N370S и тяжелой мутации L444P [11]. Однако изучение гено-фенотипических корреляций при БГ представляется существенным, поскольку оно могло бы помочь в предсказании развития заболевания и решения вопроса об оптимальном времени начала заместительной энзимотерапии.

В этой работе мы приводим результаты молекулярно-генетического анализа 68 пациентов из 65 семей с разными типами БГ и результаты сравнения соотношения мутантных аллелей БГ среди российских пациентов и пациентов других популяций.

МЕТОДИКА.

Биохимические методы исследования. Диагноз БГ основывался на результатах биохимического исследования активности кислой β -D-глюкозидазы в гомогенате лейкоцитов и маркерного фермента лизосомных болезней - хитотриозидазы (ХТ) - в плазме крови пациентов с использованием флуорогенных субстратов 4-метилумбеллиферил- β -D-глюкопиранозида (Koch-Light) и 4-метилумбеллиферил-бета-D-N,N',N''-триацетилхитотриозида (Sigma) [12].

Молекулярно-генетические методы исследования. Геномную ДНК выделяли из образцов периферической крови пациентов и их клинически здоровых родственников стандартным методом [13].

ДНК-диагностика основывалась на использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим анализом конформационного полиморфизма однонитевой ДНК (SSCP-анализом) [14] в сочетании с секвенированием и рестрикционным анализом. Имея в виду 97% гомологию первичной структуры GBA и pGBA, был использован метод “гнездовой амплификации” [15]. Для этого с помощью специально подобранных праймеров были синтезированы фрагменты от 1,5 до 2,5 т.п.н., соответствующие только последовательности гена GBA, которые затем использовали в качестве матрицы для синтеза отдельных экзонов [16].

Обнаружение частых мутаций в гене GBA. Образцы ДНК всех пациентов проверяли на частые мутации с.84insG, IVS2+1G→A, p.N370S, p.D409H, p.L444P, p.R463C, с.1263_1317del55bp и Rec Nci I (p.L444P; p.A456P; p.V460V). Скрининг мутаций IVS2+1G→A, p.N370S, p.D409H, p.L444P, p.R463C основывался на рестрикционном анализе продуктов амплификации функционального гена. Скрининг мутации с.84insG проводили с использованием аллель-специфической амплификации, а с.1263-1317del55bp – анализом продуктов амплификации 9 экзона в 8% полиакриламидном геле. Образцы, содержавшие мутацию p.L444P, анализировали методом SSCP с последующим секвенированием для исключения комплексных мутантных аллелей.

Обнаружение редких и новых мутаций в гене GBA. Амплифицированные фрагменты экзонов гена GBA анализировали методом SSCP с последующим секвенированием. Обнаруженные мутации подтверждали аллель-специфической амплификацией или рестрикционным анализом. В случае отсутствия сайта рестрикции для данной замены, синтезировали модифицированные праймеры, создающие соответствующие сайты.

Характеристика выборки пациентов. Нами было обследовано 68 пациентов из 65 семей. Выборка состояла из 61 пациента с 1 типом БГ, 5 пациентов со 2 типом БГ и 2 пациентов с 3 типом БГ. Приведенные данные включают и ранее опубликованные [13]. Первичное обследование пациентов проводилось врачами-генетиками Медико-генетического научного центра РАМН, а также врачами региональных клинических больниц. Пациенты были направлены из разных регионов России.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Биохимическая диагностика. Активности кислой β-D-глюкозидазы и ХТ измеряли в группе пациентов с БГ, в контроле и в группе облигатных гетерозигот (родителей пациентов) (табл. 1, 2). Средние значения активности кислой β-D-глюкозидазы и ХТ, рассчитанные для этих трех групп соответствуют литературным данным [17, 18].

Таблица 1. Активность кислой β-D-глюкозидазы в лейкоцитах.

Обследованная группа	Активность (нмоль/мг/ч)	Интервал значений (нмоль/мг/ч)	Активность (нмоль/мг/ч) [17]
Контроль (n=219)	10,8 ± 6,3	2,4 – 52,7	8,2 ± 3,1
Гетерозиготы (n=50)	6,8 ± 2,7	2,8 – 12,9	-
Пациенты (n=86)	1,9 ± 0,9	0 – 4,2	0,3 – 3

Примечание: Здесь и в таблице 2 представлены средние значения ± стандартное отклонение.

Таблица 2. Значения активности хитотриозидазы плазмы при БГ.

Обследованная группа	Активность (нмоль/мл/ч)	Интервал значений (нмоль/мл/ч)	Интервал значений (нмоль/мл/ч) [18]
Контроль (n=760)	20,5±1,3	0,0 – 200,0	5-199,4
Гетерозиготы (n=50)	23,1±5,5	0,0 – 94,0	-
Пациенты (n=85)	11328±1850,5	1175 - 35550	5580-51800

МУТАЦИЯ ГЕНА ПРИ БОЛЕЗНИ ГОШЕ

Анализ активности ХТ в группах генотипированных пациентов с БГ, облигатных гетерозигот и в контроле показал, что в случае пограничных значений активности кислой β -D-глюкозидазы диагноз БГ может быть подтвержден на основании значительного возрастания активности ХТ.

Ряд авторов считает, что тяжесть БГ зависит от уровня остаточной активности фермента кислой β -D-глюкозидазы и более низкие значения активности фермента определяют неврологические формы болезни [19]. При сопоставлении результатов измерения активности кислой β -D-глюкозидазы с клиническим фенотипом у наших пациентов мы не выявили прямой корреляции между ними. В нашей выборке были пациенты с неврологическим типом БГ, у которых активность кислой β -D-глюкозидазы составляла 3 нмоль/мг/ч, и пациенты с неневрологическим типом БГ, у которых активность кислой β -D-глюкозидазы составляла 0,6 нмоль/мг/ч. Таким образом, снижение активности кислой β -D-глюкозидазы позволяет только подтвердить диагноз БГ, но не определить её тип.

Молекулярно-генетическая диагностика. В результате исследования ДНК 68 пациентов с подтвержденным биохимическими методами диагнозом БГ было идентифицировано 126 мутантных аллелей (92,6%).

Начальный скрининг всех образцов, включавший частые мутации с.84insG, IVS2+1G>A, p.N370S, c.1263_1317del55bp, p.D409H, p.L444P, p.R463C и Rec Nci I (p.L444P, p.A456P, p.V460V), позволил выявить 98 мутантных аллелей (72,1%). Самой частой оказалась замена p.N370S (61/136 аллелей БГ) (44,9%) в 9 экзоне, обнаруженная у пяти пациентов в гомозиготном состоянии. Второй по частоте явилась замена p.L444P (35/136 аллелей БГ) в 10 экзоне, обнаруженная в гомозиготном состоянии также у пяти пациентов. Но только у 22 пациентов из 30 (27/136 аллелей БГ) (19,9%) замена p.L444P была самостоятельной мутацией, а у восьми пациентов (8/136 аллелей БГ) (5,9%) она входила в состав комплексной мутации RecNciI, где ассоциировалась с двумя заменами p.A456P и p.V460V того же 10 экзона. Отсутствие мутаций p.D409H и del 55 bp в сочетании с p.L444P позволило исключить наличие других комплексных мутаций с участием p.L444P. У одного пациента в гетерозиготном состоянии была обнаружена делеция 55 нуклеотидов (c.1263_1317del55bp) в 9 экзоне гена GBA как самостоятельная мутация (0,7%). У другого пациента также в гетерозиготном состоянии встретилась замена p.R463C (0,7%). Мутации p.D409H, c.84insG и IVS2+1G>A среди пациентов нашей выборки отсутствовали.

На втором этапе исследования были обнаружены еще две частые для российских пациентов мутации: p.W184R и p.A384D. Замена p.W184R в 6 экзоне, встретилась у восьми пациентов в гетерозиготном состоянии (5,9%) (причём у одного из них в составе комплексной мутации Rec C (**p.R120W**; p.W184R; **p.N188K**; **p.V191G**; **p.S196P**; **p.G202R**; **p.F213I**), которую образуют 7 точечных замен, 6 из которых происходят из псевдогена pGBA (выделены жирным шрифтом) [20]). Замена p.A384D в 9 экзоне, встретилась в гетерозиготном состоянии у пяти пациентов (3,7%). У трех пациентов была найдена замена p.R120W (2,1%), у двух – p.G202R (1,4%), у двух – p.L288P (1,4%), у одного – p.V352M (1,4%) (в гомозиготном состоянии), у двух – p.W381X (1,4%). Мутации p.R170C, Rec C (p.R120W, p.W184R, p.N188K, p.V191G, p.S196P, p.G202R, p.F213I), p.P236T, p.L249Q, p.P319S встретились только однажды (по 0,7%). Семь мутаций (p.P236T, p.L288P, p.L249Q, p.P319S, p.V352M, p.A384D, p.W381X) ранее описаны не были.

Рестрикционный анализ соответствующих амплификационных фрагментов 100 аллелей гена GBA здоровых индивидуумов не выявил ни одной из вновь описанных мутаций. Это позволило предположить, что найденные мутации не являются проявлениями ДНК-полиморфизма.

У пациентов нашей выборки мутации были обнаружены в 5-10 экзонах (табл. 3). Именно этими экзонами контролируется протеолитическая стабильность

и каталитическая активность фермента. Наибольшее количество ранее обнаруженных мутаций располагалось в 6, 9, и 10 экзонах. В этих же экзонах располагались мутации у большинства наших пациентов.

Таблица 3. Распределение обнаруженных мутаций среди экзонов гена GBA.

№	Изменение в нуклеотидной последовательности	№ экзона	Изменение в аминокислотной последовательности	Количество мутантных аллелей в выборке	Ссылка
1	с. 475 C>T	5	p.R120W	3	27
2	с. 625 C>T	6	p.R170C	1	6
3	с. 667 T>C		p.W184R	7	20
4			Rec C (p.R120W, p.W184R, p.N188K, p.V191G, p.S196P, p.G202R, p.F213I)	1	20
5	с. 721 G>A		p.G202R	2	5
6	с. 823 C>A	7	p.P236T	1	Новая мутация
7	с. 980 T>C		p.L288P	2	Новая мутация
8	с. 863 T>A		p.L249Q	1	Новая мутация
9	с. 1072 C>T	8	p.P319S	1	Новая мутация
10	с. 1171 G>A		p.V352M	2	Новая мутация
11	с. 1226 A>G	9	p.N370S	61	30
12	с.1263_1317del55bp		p.N382FS, stop386	1	34
13	с. 1259 G>A		p.W381X	2	Новая мутация
14	с. 1268 C>A		p.A384D	5	Новая мутация
15	с. 1448 T>C	10	p.L444P	27	30
16	с. 1448 T>C; с. 1483 G>C; с. 1497 G>C		Rec NciI (p.L444P, p.A456P, p.V460V)	8	21
17	с. 1504 C>T		p.R463C	1	31

Примечание. Для обозначения мутаций использованы традиционная аминокислотная номенклатура, в которой не учитываются первые 39 аминокислотных остатков, составляющих сигнальную последовательность пептида.

Среди 12 обнаруженных мутаций p.W381X является нонсенс-мутацией, делеция 55 п.н. в 9 экзоне гена GBA приводит к сдвигу рамки считывания и преждевременному образованию кодона терминации в середине 9 экзона. Комплексные мутации RecNciI (p.L444P, p.A456P, p.V460V) и Rec C (p.R120W, p.W184R, p.N188K, p.V191G, p.S196P, p.G202R, p.F213I) образованы по типу рекомбинации между геном и псевдогеном в 10 и 5-6 экзонах, соответственно [20, 21].

Как в большинстве европейских популяций, наиболее частыми в выборке российских пациентов оказались три мутации: p.N370S, p.L444P и RecNciI, которые составили 44,9%, 19,9% и 5,9% от общего числа аллелей соответственно. Количественное распределение мутаций p.N370S, p.L444P и recNciI в российской, чешской и немецкой выборках сходно (табл. 4). В отличие от других европейских популяций в выборке российских пациентов обнаружены еще две частые мутации:

МУТАЦИЯ ГЕНА ПРИ БОЛЕЗНИ ГОШЕ

p.W184R, обнаруженная в гетерозиготном состоянии у восьми пациентов из семи семей, и p.A384D, обнаруженная у шести неродственных пациентов. Замена триптофана в 184 положении белковой цепи на аргинин ранее была описана как тяжелая, определяющая 2 тип БГ. У семи наших пациентов с 1 типом БГ она встретилась в сочетании с p.N370S и/или Rec C. У одного пациента со 2 типом БГ эта замена наследовалась в сочетании с неустановленной пока мутацией (табл. 5). Новая ранее не описанная замена аланина на аспаргат в 384 положении белковой цепи встретилась у пяти пациентов с 1 типом БГ в сочетании с p.N370S. А у одного пациента – в сочетании с p.L444P, что определило развитие 2 типа БГ. Функциональный анализ мутаций p.N382K, p.L383R, p.L385P, которые в сочетании с p.L444P определили развитие БГ 2 типа у китайских пациентов, показал, что их нужно отнести к группе грубых мутаций [22]. Исходя из этих фактов, мы предполагаем, что и p.A384D относится к группе тяжелых мутаций.

Таблица 4. Мутационный профиль популяций пациентов с БГ [8, 9, 28, 29, 32, 33].

Мутации	Россия (n=68)	Чехия (n=29)	Англия (n=46)	Испания (n=35)	Германия (n=21)	Португалия (n=16)	Япония (n=32)
N370S	61/136	28/58	36/92	31/70	17/42	20/32	0
L444P	27/136	11/58	31/92	18/70	8/42	7/32	26/64
Rec Nci I	8/136	5/58	4/92	1/70		2/32	
прочие	40/136	14/58	21/92	20/70	17/42	3/32	38/64

Таблица 5. Распределение генотипов среди российских пациентов с разными типами БГ.

Тип	Генотип	Количество пациентов
1 тип	p.N370S/p.N370S	5/68 (6,7%)
	p.N370S/p.L444P	14/68 (20,6%)
	p.N370S/Rec Nci I	8/68 (11,8%)
	p.N370S/p.W184R	6/68 (8,8%)
	p.N370S/p.A384D	5/68 (7,4%)
	p.N370S/p.R120W	2/68 (2,9%)
	p.N370S/p.G202R	2/68 (2,9%)
	p.N370S/p.W381X	2/68 (2,9%)
	p.N370S/p.P236T	1/68 (1,5%)
	p.N370S/p.L249Q	1/68 (1,5%)
	p.N370S/p.L288P	1/68 (1,5%)
	p.N370S/Rec C	1/68 (1,5%)
	p.N370S/ c.1263_1317del55bp	1/68 (1,5%)
	p.L444P/p.R463C	1/68 (1,5%)
	p.R120W/p.R170C	1/68 (1,5%)
	p.L288P/p.P319S	1/68 (1,5%)
	p.V352M/p.V352M	1/68 (1,5%)
	p.N370S/?	8/68 (11,8%)
	p.L444P/?	1/68 (1,5%)
2, 3 тип	p.L444P/p.L444P	5/68 (7,4%)
	p.A384D/p.L444P	1/68 (1,5%)
	p.W184R/?	1/68 (1,5%)

Наиболее частыми генотипами в обследованной выборке оказались p.N370S/p.L444P – 14/68 (20,6%), p.N370S/Rec Nci I – 8/68 (11,8%), p.N370S/p.W184R - 6/68 (8,8%), p.N370S/p.A384D – 5/68 (7,4%), p.N370S/p.N370S – 5/68 (7,4%), p.L444P/p.L444P – 5/68 (7,4%). Остальные 12 генотипов встретились в 1 – 2 случаях (табл. 5).

Гено-фенотипические корреляции. Изучение гено-фенотипических корреляций при БГ - сложный и довольно медленный процесс, что связано с широкой вариабельностью всех трех типов БГ. Различия в клинической картине наблюдаются у пациентов с одинаковым генотипом, а также у родственников и даже у монозиготных близнецов [23]. Причины этой вариабельности пока не выяснены и могут быть вызваны как определенными мутациями, изменяющими ферментную функцию белка, так и влиянием эпигенетических факторов.

Ферментативная активность кислой β -D-глюкозидазы требует взаимодействия фермента, фосфолипидов и/или рецептора на внутренней лизосомной мембране, сфинголипидного активаторного белка сапозина С (SAP C) и нерастворимого субстрата глюкозилцерамида [24]. В условиях *in vitro* SAP C в миллимолярных концентрациях активирует кислую β -D-глюкозидазу в присутствии отрицательно заряженных фосфолипидов. Grabowski с соавторами предложил кинетическую модель активного центра фермента β -D-глюкозидазы, которая предполагает наличие трёх подцентров: гидрофильного гликонсвязывающего подцентра, агликонсвязывающего подцентра, взаимодействующего с ацильной цепью глюкозилцерамида, и подцентра, взаимодействующего со сфингозильной цепью глюкозилцерамида. Возможная область связывания SAP C находится в С-терминальной области фермента [25]. Liou с соавторами, исследовавшие и охарактеризовавшие 42 аминокислотные замены, приводящие к развитию БГ, отмечают, что в большинстве вариантов мутантных молекул кислой β -D-глюкозидазы (исследовались ферментная активность, протеолитическая стабильность и кинетика) наблюдалось нарушение их активации отрицательно заряженными молекулами фосфолипидов. В наибольшей степени это было характерно для мутаций p.N370S и p.V394L. Вариант глюкозидазы с заменой p.L444P показал низкую эффективность связывания с SAP C и снижение активности глюкозидазы [26].

Несмотря на трудности определения гено-фенотипических корреляций, для некоторых мутаций удалось установить связь с определенными типами БГ. Так, гомозиготность по мутациям p.W184R, p.G202R или p.L444P приводит к неврологическим формам БГ, в то время как генотип p.N370S/p.N370S обнаруживается только у пациентов с 1 типом БГ. Наличие хотя бы одного аллеля p.N370S обычно предотвращает развитие неврологических форм заболевания. Тяжесть течения БГ у гетерозиготных носителей p.N370S, вероятно, обусловлена вторым мутантным аллелем. Но так как большинство мутаций, определяющих развитие БГ, являются редкими, то оценить вклад каждой из вновь описанных мутаций в развитие БГ можно либо при нахождении её в гомозиготном состоянии у пациента, либо при анализе клинической картины значительного количества пациентов с одинаковым генотипом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. БГ - наиболее распространенное среди сфинголипидозов заболевание. Для него характерен широкий спектр клинических форм: от мягких бессимптомных до тяжелых с поражением центральной нервной системы. Определение активности β -D-глюкозидазы в лейкоцитах позволяет точно верифицировать диагноз БГ, не прибегая к гистологическим методам исследования. Исследование активности ХТ плазмы является также важным в диагностике БГ, т.к. в некоторых случаях значения остаточной активности β -D-глюкозидазы пациентов могут перекрываться со значениями активности у гетерозигот. В этом случае уровень активности ХТ становится дополнительным маркером при верификации диагноза БГ.

МУТАЦИЯ ГЕНА ПРИ БОЛЕЗНИ ГОШЕ

В результате молекулярно-генетического анализа 68 пациентов было верифицировано 92,6% мутантных аллелей. Как в большинстве европейских популяций, частыми оказались три - p.N370S, p.L444P и RecNciI, - которые составили 44,8%, 19,8% и 5,9% от общего числа аллелей соответственно. Отличительной особенностью выборки российских пациентов явилось обнаружение семи аллелей p.W184R и пяти аллелей p.A384D у не родственных пациентов. В числе редких и единичных мутаций были обнаружены p.R120W, p.G202R, p.W381X, p.R170C, p.P236T, recC, L288P, p.L288Q, p.P319S, p.R463C и del55. 7,4% мутантных аллелей пока остались неидентифицированными. У пациентов нашей выборки обнаружилась значительная молекулярная гетерогенность (16 различных мутантных аллелей и 17 генотипов). Наиболее частыми генотипами в обследованной популяции были N370S/L444P – 10/55 (18%), N370S/Rec Nci I – 8/55 (15%), N370S/N370S – 5/55 (9%), L444P/L444P – 4/55 (7%).

1. Проведен молекулярно-генетический анализ 68 пациентов. При скрининге частых мутаций были обнаружены пять преобладающих аллеля в 6, 9 и 10 экзонах гена GBA: p.W184R, p.N370S, p.A384D, p.L444P и RecNciI. В процессе исследования идентифицировано 16 мутаций, из которых 7 описаны впервые: p.P236T, p.L288P, p.L288Q, p.P319S, p.V352M, p.W381X и p.A384D.

2. Выявлены чёткие корреляции тяжести течения БГ с обнаруженными мутациями. Мутация p.N370S в гомозиготном состоянии обуславливает лёгкую или промежуточную форму БГ 1 типа. Клиническое проявление БГ у гетерозиготных носителей p.N370S обусловлено вторым мутантным аллелем. Наличие мутации p.L444P в гомозиготном состоянии обуславливает развитие неврологической формы БГ 2 или 3 типов, а в сочетании с мутацией p.A384D она определяет 2 тип БГ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Beutler E., Grabowski G.A.* (2001) in: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (C.R. Scriver, A.L. Beaudet, D. Valle, W.S. Sly eds.), McGraw-Hill, New York, pp. 3635-3668.
2. *Sidransky E., Sherer D.M., Ginns E.I.* (1992) *Pediatr. Res.*, **32**, 494-498.
3. *Berrebi A., Wishnitzer R., Von-der-Walde U.* (1984) *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, **26**, 201-203.
4. *Horowitz M., Wilder S., Horowitz Z., Reiner O., Gelbart T., Beutler E.* (1989) *Genomics*, **4**, 87.
5. *Beutler E., Demina A., Gelbart T.* (1994) *Mol. Med.*, **1**, 82-92.
6. *Koprivica V., Stone D.L., Park J.K., Callahan M., Frisch A., Cohen I.J., Tavebi N., Sidransky E.* (2000) *J. Hum. Genet.*, **66**, 1777-1786.
7. *Kawame H., Maekawa K., Eto Y.* (1993) *Hum. Mut.*, **2**(5), 362-367.
8. *Eto Y., Ida H.* (1999) *Neurochem. Res.*, **24** (2), 207-211.
9. *Amaral O., Lacerda L., Santos R., Pinto R.A., Aerts J., SaMirada M.C.* (1993) *Biochem. Med. Metab. Biol.*, **49**, 97-107.
10. *Amaral O., Pinto F., Fortunato M., Lacerda L., SaMirada M.C.* (1996) *Hum. Mut.*, **8**, 280-281.
11. *McGabe E.R.B., Fine B.A., Globus M.S. et al* (1996) *JAMA*, **275**, 548-553.
12. *Бейер Е.М., Букина Т.М., Цветкова И.И.* (2000) *Вопросы мед. химии*, **46**, 451-454.
13. *Букина Т.М.* (2002) *Вестник РГМУ*, **25**, №4, 39-42.
14. *Condie A., Borresen A-L., Eeles R., Eeles R., Borresen A.L., Cotes C., Cooper C., Prosser J.* (1993) *Hum. Mut.*, **2**, 58-66.
15. *Stone D.L., Tayebi N., Orvisky E., Stubblefield B., Madike V., Sidransky E.* (2000) *Hum. Mut.*, **15**, 181-188.

16. Букина Т.М. (2005) Биохимическая и молекулярно-генетическая характеристика болезни Гоше у российских больных. Дисс.канд. наук, ГУ МГНЦ РАМН, Москва.
17. Galjaard H. (1980) Genetic metabolic diseases. Early diagnosis and prenatal diagnosis. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Amsterdam-New York-Oxford.
18. Guo Y., He W., Boer A.M., Wevers R.A., de Bruun A.M., Groener J.E.M., Hollak C.E.M., Aerts J.M., Galjaard H., van Diggelen O.P. (1995) *J. Inher. Metab. Dis.*, **18**, 717-722.
19. Sandhoff K., van Echten G., Schroder M., Schnabel D., Suzuki K. (1992) *Biochem. Soc. Trans.*, **20**, 695.
20. Latham T.E., Theophilus B.D., Grabowsky G.A., Smith F.I. (1991) *DNA Cell Biol.*, **10**, 15-21.
21. Latham T., Grabowski G.A., Theophilus B.D., Smith F.I. (1990) *Am. J. Hum. Genet.*, **47**(1), 79-86.
22. Tang N.L.S., Zhang W., Grabowski G.A., To K.F., Choy F.Y.M., Ma S.L., Shi H.P. (2005) *Hum. Mut.*, **26**(1), 59-60.
23. Lachman R.H., Grant I.R., Halsall D., Cox T.M. (2004) *QJM*, **97**, 199-204.
24. Berent S.L., Radin N.S. (1981) *Biochim. Biophys. Acta*, **664**, 572-582.
25. Grabowski G.A., Horowitz M. (1997) *Baillieres Clin. Haematol.*, **10**, 635-656.
26. Liou B., Kazimierczuk A., Zhang M., Scott C.R., Hegde R.S., Grabowski G. (2005) *J. Biol. Chem.*, **281**, 4242-4253.
27. Beutler E., Gelbart T. (1996) *Hum. Mut.*, **8**, 207-213.
28. Countre P., Demina A., Beutler T., Beck M., Petrides P.E. (1997) *Hum. Genet.*, **99**, 816-820.
29. Cormand B., Grinbeg D., Gort L., Chabas A., Vilageliu L. (1998) *Hum. Mut.*, **11**, 295-305.
30. Tsuji S., Choudary P.V., Martin B.M., Stubblesfield B.K., Mayor J.A., Barranger J.A., Ginns E.L. (1987) *N. Engl. J. Med.*, **316**, 570-574.
31. Hong C.M., Ohashi T., Yu X.J., Weiler S., Barranger J.A. (1990) *DNA Cell Biol.*, **9**, 233.
32. Hatton C.E., Cooper A., Whitehouse C., Wraith J.E. (1997) *Arch. Dis. Childhood*, **77**, 17-22.
33. Hodanova K., Hrebicek M., Cervenkova M., Mzazova L., Veprekova L., Zemen J. (1999) *Blood Cell Mol. Dis.*, **25**(18), 287-298.
34. Beutler E., Gelbart T., West C. (1993) *Genomics*, **15**, 203-205.

Поступила: 21. 12. 2006.

**DISTRIBUTION OF MUTATIONS OF ACID β -D-GLUCOSIDASE GENE (GBA)
AMONG 68 RUSSIAN PATIENTS WITH GAUCHER'S DISEASE**

T.M. Boukina¹, I.V. Tsvetkova²

¹Research Centre for Medical Genetics RAMS, Moskvorechie ul., 1, Moscow, 115478 Russia;
tel./fax: (495) 111-8366; e-mail: tbookina@mail.ru

²Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Pogodinskaya ul., 10, Moscow 119121, Russia

Gaucher disease (GD) is the most frequent lysosomal storage disease presenting in all populations. Mutations in the acid β -D-glucosidase gene (GBA) cause development of GD, resulting in a decrease or full loss of activity of this enzyme. We report here the results of the molecular-genetic analysis in 68 Russian GD patients from 65 families with the three types of the disease. We have identified 126 mutation alleles from 136 investigate alleles. In addition to known mutations p.N370S, c.1263-1317del (del55), p.L444P, p.R463C, Rec NciI, we identified rare mutations p.R120W, p.R170C, p.W184R, p.G202R, Rec C, presenting in other populations and mutations p.P236T, p.L249Q, p.L288P, p.P319S, p.V352M, p.W381X, p.A384D which are had not been described before.

Key words: Gaucher's disease, acid β -D-glucosidase, acid β -D-glucosidase gene (GBA), molecular-genetic analysis, mutations.