

МАЖОРНАЯ МУТАЦИЯ В ГЕНЕ *SPAST* У ПАЦИЕНТОВ С АУТОСОМНО-ДОМИНАНТНОЙ СПАСТИЧЕСКОЙ ПАРАПЛЕГИЕЙ ИЗ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН

© 2019 г. И. М. Хидиятова^{1,2,*}, А. Ф. Ахметгалеева¹, Е. В. Сайфуллина³, Р. Ф. Идрисова⁴,
М. А. Янкина¹, В. В. Шавалиева², Р. В. Магжанов³, Э. К. Хуснутдинова^{1,2}

¹Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра
Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

²Башкирский государственный университет, Уфа, 450076 Россия

³Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, 450000 Россия

⁴Республиканская клиническая больница им. Г.Г. Куватова, Уфа, 450005 Россия

*e-mail: imkhid@mail.ru

Поступила в редакцию 16.02.2018 г.

После доработки 20.03.2018 г.

Принята к публикации 10.04.2018 г.

Наследственные спастические параплегии (НСП) – группа нейродегенеративных болезней с преимущественным поражением пирамидного тракта. На сегодняшний день мутации, ответственные за заболевание, идентифицированы более чем в 70 генных локусах. К наиболее частым причинам развития НСП относятся мутации в гене спастина (*SPAST*), однако мажорные мутации являются редкостью для данного заболевания. При исследовании пациентов из 63 неродственных семей с НСП, проживающих в Республике Башкортостан (РБ), в гене *SPAST* была идентифицирована мутация с.283delG (p.Ala95Profs*66), обнаруженная в семьях татарской этнической принадлежности с высокой частотой. В общей выборке неродственных больных из РБ ее частота составила 19%, а в выборке пациентов-татар – 44%. Было установлено, что во всех семьях с данной мутацией НСП наследуется по аутосомно-доминантному типу, а клинические симптомы заболевания в большинстве случаев соответствуют типичному неосложненному фенотипу, характерному для НСП формы SPG4.

Ключевые слова: наследственная спастическая параплегия, ген *SPAST*, таргетное NGS секвенирование экзона.

DOI: 10.1134/S0016675819020103

Наследственные спастические параплегии (НСП) – генетически и клинически гетерогенная группа дегенеративных заболеваний нервной системы, обусловленных дистальным поражением длинных аксонов кортикоспинального тракта. Клинически НСП проявляются спастичностью мышц нижних конечностей. В зависимости от того, является ли основной симптом единственным или сочетается с другими неврологическими или экстракраниальными симптомами, выделяют неосложненные или осложненные формы [1]. Распространенность НСП, как в целом, так и ее отдельных генетических форм, значительно варьирует в различных популяциях, составляя от 0.5 до 12 на 100000 населения (<http://www.hspersunite.org.au>); в Республике Башкортостан (РБ) – 3.5 на 100000 населения [2].

В настоящее время известно более 70 генетических локусов, идентифицировано 59 генов, мутации в которых обуславливают развитие НСП с различными типами наследования [3, 4] (<http://neuromuscular.wustl.edu/spinal/fsp.html>). По современной номенклатуре генные локусы и соответствующие формы НСП обозначают аббревиатурой SPG (от англ. Spastik Paraplegia Gene), с порядковыми номерами в хронологической последовательности [5]. Эпидемиологические и молекулярно-генетические исследования НСП в отдельных регионах и этнических группах представляются весьма актуальными, позволяющими разрабатывать наиболее эффективные подходы ДНК-диагностики и медико-генетического консультирования в семьях с данной патологией.

Мутации в гене спастина (*SPAST*) являются наиболее частой причиной НСП, они ответствен-

ны за 45% случаев аутосомно-доминантных НСП (АД НСП), 12–18% sporadических случаев заболевания [6]. Ранее нами были представлены результаты исследований гена *SPAST* у пациентов с НСП из РБ, проведенных частично методами прямого секвенирования (в отдельных экзонах гена), частично – методами SSCP-анализа с последующим секвенированием образцов с измененной электрофоретической подвижностью одноцепочечной ДНК. В ходе этих исследований были идентифицированы новые, ранее не описанные мутации с.322del29 (p.Val108SerfsX18), с.885del10 (p.Thr295ThrfsX16), с.1114A>G (p.Arg372Gly) [7, 8].

В настоящее время общую обследуемую выборку пациентов с НСП из РБ представляют члены 63 неродственных семей (из них 27 – татарских; пять – башкирских; 14 – русских; по одной семье – чувашской, украинской, марийской; восемь – метисных семей, а также шесть семей с неустановленной этнической принадлежностью). С целью продолжения поиска генетических причин развития НСП у жителей исследуемого региона в трех неродственных семьях с аутосомно-доминантной формой заболевания у пробандов было проведено таргетное секвенирование экзона, включающее анализ кодирующих последовательностей более 700 генов, ответственных за возникновение ряда неврологических заболеваний, в том числе 54 генов НСП.

Секвенирование проведено на приборе MiSeq, Illumina. Обработка данных секвенирования была проведена с использованием автоматизированного алгоритма, включающего выравнивание прочтений на референсную последовательность генома человека (hg19), постпроцессинг выравнивания, выявление вариантов и фильтрацию вариантов по качеству, а также аннотацию выявленных вариантов по всем известным транскриптам каждого гена из базы RefSeq с применением ряда методов предсказания патогенности замен (SIFT, PolyPhen2-HDIV, PolyPhen2-HVAR, MutationTaster, LRT), а также методов расчета эволюционной консервативности позиций (PhyloP, PhastCons). Для оценки популяционных частот выявленных вариантов использованы выборки проектов “1000 геномов”, ESP6500 и Exome Aggregation Consortium.

Предположительно патогенный вариант, обнаруженный в гене *SPAST*, был подтвержден секвенированием по Сэнгеру. Далее был проведен скрининг на его наличие/отсутствие у других членов семей обследованных пациентов, затем – в 63 неродственных семьях с НСП из РБ, а также в контрольной выборке здоровых индивидов (60 чел.). У всех обследуемых лиц кровь была получена с их ин-

формированного согласия. Исследования одобрены биоэтическим комитетом ИБГ УФИЦ РАН.

В результате проведенного исследования у всех трех неродственных пациентов идентифицирована однонуклеотидная гетерозиготная делеция в первом экзоне гена *SPAST*: с.283delG (p.Ala95Profs*66). Делеция подтверждена секвенированием по Сэнгеру (рис. 1). Было установлено, что данная делеция может быть выявлена с помощью рестриктазы *Bsa*II, для которой при наличии мутации сайт рестрикции теряется. Также ее можно идентифицировать методом SSCP-анализа или электрофореза двухцепочечной ДНК в полиакриламидном геле, получив первоначально достаточно короткие для данных методов фрагменты (ранее, в предшествующем исследовании, мы не выявили изменений картины SSCP-анализа образцов с данной делецией при длине исследуемого фрагмента 320 пн). Так, при использовании эндонуклеазы *Msp*I исходный амплификат разрезается на фрагменты размерами 128, 124, 35, 22, 6, 6 пн, при этом участок ДНК с делецией с.283delG попадает во фрагмент 35 пн. При наличии делеции в гетерозиготном состоянии образуются соответствующие фрагменты 35 и 34 пн, разделяющиеся электрофоретически в 8%-ном ПААГ. Этим методом был проведен дальнейший скрининг на наличие данной делеции в гене *SPAST* в семьях пациентов и в контрольной выборке. В семьях трех обследуемых пациентов делеция с.283delG была обнаружена только у больных родственников. В общей обследуемой выборке пациентов с НСП (63 неродственных пациента и члены их семей) делеция была выявлена у больных из 12 неродственных семей. Примечательным оказалось то, что все эти семьи принадлежат к этнической группе татар. В результате последующего скрининга на наличие/отсутствие делеции с.283delG в контрольной группе здоровых неродственных индивидов татарской этнической принадлежности (60 чел.) данная мутация не была обнаружена.

Делеция с.283delG (p.Ala95Profs*66) в гене *SPAST* не зарегистрирована в контрольных выборках “1000 геномов”, ESP6500 и ExAC, но, описанная в одной британской семье с НСП [9], представлена в базе мутаций HGMD (www.hgmd.org).

Клиническая картина всех обследованных пациентов с мутацией p.Ala95Profs*66 соответствовала неосложненной форме НСП, что характерно для большинства случаев формы SPG4, описанных в ряде работ [6, 9–11].

Белок спастин является представителем семейства AAA – белков, АТФаз особого класса с множественными видами клеточной активности [12]. Главная функция спастина – обеспечение динамики микротрубочек цитоскелета. Нарушение

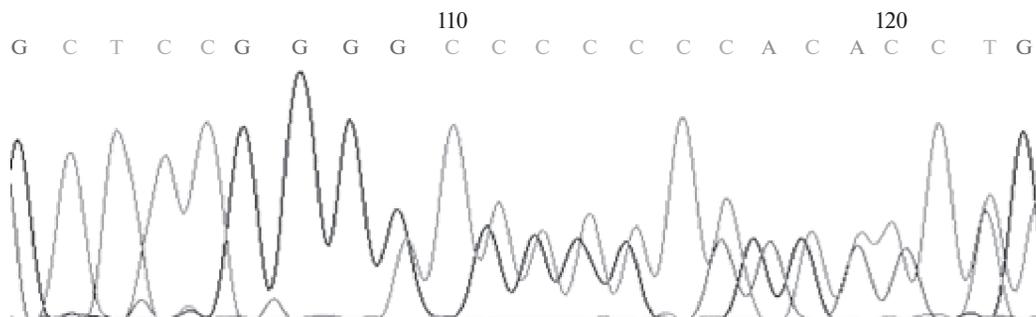


Рис. 1. Секвенирование образца ДНК с мутацией с.283delG (p.Ala95Profs*66).

этого процесса приводит к развитию заболевания формы SPG4. В результате делеции с.283delG в первом экзоне гена *SPAST*, приводящей к сдвигу рамки считывания, синтезируется укороченный белок, в котором отсутствуют домены, выполняющие основные функции белка: MIT-домен (116–194 AA), от которого зависит способность спастина участвовать в цитокинезе и эндосомальном транспорте [13, 14]; MTBD-домен (270–328 AA), играющий важную роль в морфогенезе ЭПР [15–18]; АТФазный домен (342–599 AA), ответственный за разборку спастином микротрубочек – одну из главных функций белка [19].

Исследования роли спастина в динамике микротрубочек показали, что при мутациях, приводящих к преждевременному окончанию синтеза белка, НСП развивается из-за недостатка его количества [20], о чем свидетельствует и отсутствие детектируемых уровней количества укороченных спастинов в клеточных линиях [21–23]. Следовательно, гаплонедостаточность – самый ожидаемый механизм для объяснения развития спастической параплегии в случае с синтезом укороченного белка [6, 24]. Кроме того, появились и новые данные, указывающие на возможность и другого отрицательного типа воздействия укороченных белков спастина на нейроны: усеченная изоформа M1 спастина, необходимая для взаимодействия трубочек ЭПР и ЭПР с микротрубочками, является более стабильной, чем усеченная M87 изоформа, и может оказывать токсический эффект на нейроны путем нарушения аксонального ретроградного транспорта и из-за ограниченной способности нейронов устранять поврежденные органеллы и белки [25].

Таким образом, учитывая все описанные выше сведения – локализацию делеции в первом экзоне гена, приводящую к сдвигу рамки считывания и преждевременной терминации синтеза белка, наличие ее только у пациентов с НСП и отсутствие у здоровых членов семей, а также в контрольной группе здоровых индивидов, можно с

достаточной уверенностью считать ее патогенной мутацией. В гене спастина на сегодняшний день описано более 680 различных мутаций (www.hgmd.org), в том числе приводящих к появлению преждевременного стоп-кодона и нарушению синтеза полноразмерного белка: это нонсенс-мутации [26], различные делеции со сдвигом рамки считывания [6, 11, 27, 28], дупликации и инсерции [26, 29]. Однако в основном все описанные мутации были идентифицированы в отдельных семьях с НСП, и в целом мажорные мутации являются редкостью для данного заболевания. Обнаруженная нами делеция с.283delG (p.Ala95Profs*66) была идентифицирована в 12 семьях татарской этнической принадлежности, ее частота составила среди татарских семей 44%, а среди всех обследованных неродственных семей с НСП из Республики Башкортостан – 19%. Распространение мутации в семьях татарской этнической принадлежности, проживающих в РБ, предположительно можно связать с эффектом основателя, что характерно для многих известных мутаций, частых среди больных с наследственной патологией, проживающих в этом регионе. В целом делеция с.283delG (p.Ala95Profs*66) в гене *SPAST* расширила спектр идентифицированных мутаций у пациентов с НСП из РБ и, являясь самой частой (мажорной), вносит существенный вклад в создание алгоритма ДНК-диагностики НСП в данном регионе.

Работа выполнена на оборудовании ЦКП “Биомика” (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП “Агидель”) и УНУ “КОДИНК”. Исследование поддержано грантом РФФИ р_а № 17-44-020951; образцы ДНК для исследования взяты из “Коллекции биологических материалов человека” ИБГ УФИЦ РАН, поддержанной Программой биоресурсных коллекций ФАНО России (соглашение № 007-030164/2).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Harding A.E.* Classification of the hereditary ataxias and paraplegias // *The Lancet*. 1983. V. 321. № 8334. P. 1151–1155.
2. *Магжанов Р.В., Сайфуллина Е.В., Идрисова Р.Ф. и др.* Эпидемиологическая характеристика наследственных спастических параплегий в Республике Башкортостан // *Мед. генетика*. 2013. № 7. С. 12–16.
3. *Novarino G., Fenstermaker A.G., Zaki M.S.* Exome sequencing links corticospinal motor neuron disease to common neurodegenerative disorders // *Science*. 2014. V. 343. № 6170. P. 506–511. doi 10.1126/science.1247363
4. *Klebe S., Stevanin G., Depienne C.* Clinical and genetic heterogeneity in hereditary spastic paraplegias: from SPG1 to SPG72 and still counting // *Rev. Neurol.* 2015. V. 171. № 6. P. 505–530. doi 10.1016/j.neurol.2015.02.017
5. *Fink J.K.* Hereditary spastic paraplegia: clinico-pathologic features and emerging molecular mechanisms // *Acta Neuropathologica*. 2013. V. 126. № 3. P. 307–328. doi 10.1007/s00401-013-1115-8
6. *Fonknechten N., Mavel D., Byrne B. et al.* Spectrum of SPG4 mutations in autosomal dominant spastic paraplegia // *Hum. Mol. Genet.* 2000. V. 9. № 4. P. 637–644.
7. *Ахметгалеева А.Ф., Хидиятова И.М., Сайфуллина Е.В. и др.* Две новые мутации в гене *SPG4* у пациентов с аутосомно-доминантной спастической параплегией // *Генетика*. 2016. Т. 52. № 6. С. 691–696.
8. *Ахметгалеева А.Ф., Хидиятова И.М., Сайфуллина Е.В. и др.* Клинический случай спорадической спастической параплегии при новой мутации в гене *SPAST* // *Мед. генетика*. 2016. Т. 15. № 7. С. 11–13.
9. *Lindsey J.C., Lusher M.E., McDermott C.J. et al.* Mutation analysis of the spastin gene (SPG4) in patients with hereditary spastic paraparesis // *J. Med. Genet.* 2000. V. 37. № 10. P. 759–765.
10. *Hentati A., Deng H.X., Zhai H. et al.* Novel mutations in spastin gene and absence of correlation with age at onset of symptoms // *Neurology*. 2000. V. 55. № 9. P. 1388–1390.
11. *Basri R.I., Yabe I., Soma H. et al.* Four mutations of the spastin gene in Japanese families with spastic paraplegia // *J. Hum. Genet.* 2006. V. 51. № 8. P. 711–715. doi 10.1007/s10038-006-0412-7
12. *Lumb J.H., Connell J.W., Allison R., Reid E.* The AAA ATPase spastin links microtubule severing to membrane modelling // *Biochim. Biophys. Acta* 2012. V. 1823. № 1. P. 192–197. doi 10.1016/j.bbamcr.2011.08.010
13. *Guizzetti J., Schermelleh L., Mäntler J. et al.* Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments // *Science*. 2011. V. 331. № 6024. P. 1616–1620. doi 10.1126/science.1201847
14. *Allison R.I., Lumb J.H., Fassier C. et al.* An ESCRT-spastin interaction promotes fission of recycling tubules from the endosome // *J. Cell Biol.* 2013. V. 202. № 3. P. 527–543. doi 10.1083/jcb.201211045
15. *White S.R., Lauring B.* AAA+ ATPases: achieving diversity of function with conserved machinery // *Traffic*. 2007. V. 8. № 12. P. 1657–1667. doi 10.1111/j.1600-0854.2007.00642.x
16. *Park S.H., Zhu P.P., Parker R.L., Blackstone C.* Hereditary spastic paraplegia proteins REEP1, spastin, and atlastin-1 coordinate microtubule interactions with the tubular ER network // *J. Clin. Invest.* 2010. V. 120. № 4. P. 1097–1110. doi 10.1172/JCI40979
17. *Blackstone C., O’Kane C.J., Reid E.* Hereditary spastic paraplegias: membrane traffic and the motor pathway // *Nat. Rev. Neurosci.* 2011. V. 12. № 1. P. 31–42. doi 10.1038/nrn2946
18. *Blackstone C.* Cellular pathways of hereditary spastic paraplegia // *Annu. Rev. Neurosci.* 2012. V. 35. P. 25–47. doi 10.1146/annurev-neuro-062111-150400
19. *Evans K.J., Gomes E.R., Reisenweber S.M. et al.* Linking axonal degeneration to microtubule remodeling by Spastin-mediated microtubule severing // *J. Cell. Biol.* 2005. V. 168. № 4. P. 599–606.
20. *Errico A., Ballabio A., Rugarli E.I.* Spastin, the protein, mutated in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia, is involved in microtubule dynamics // *Hum. Mol. Genet.* 2002. V. 11. № 2. P. 153–163.
21. *Solowska J.M., Baas P.W.* Hereditary spastic paraplegia SPG4: what is known and not known about the disease // *Brain*. 2015. P. 2471–2484.
22. *Rebbapragada I., Lykke-Andersen J.* Execution of nonsense-mediated mRNA decay: what defines a substrate? // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2009. V. 21. № 3. P. 394–402. doi 10.1016/j.ceb.2009.02.007
23. *Lykke-Andersen S., Jensen T.H.* Nonsense-mediated mRNA decay: an intricate machinery that shapes transcriptomes // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2015. V. 16. № 11. P. 665–677. doi 10.1038/nrm4063
24. *Burger J., Fonknechten N., Hoeltzenbein M. et al.* Hereditary spastic paraplegia caused by mutations in the SPG4 gene // *Eur. J. Hum. Genet.* 2000. V. 8. № 10. P. 771–776. doi 10.1038/sj.ejhg.5200528
25. *Solowska J.M., Rao A.N., Baas P.W.* Truncating mutations of SPAST associated with hereditary spastic paraplegia indicate greater accumulation and toxicity of the M1 isoform of spastin // *Mol. Biol. Cell*. 2017. V. 28. № 13. P. 1728–1737. doi 10.1091/mbc.E17-01-0047
26. *de Bot S.T., van den Elzen R.T., Mensenkamp A.R.* Hereditary spastic paraplegia due to SPAST mutations in 151 Dutch patients: new clinical aspects and 27 novel mutations // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2010. V. 81. № 10. P. 1073–1078. doi 10.1136/jnnp.2009.201103
27. *Sauter S., Mitterski B., Klimpe S. et al.* Mutation analysis of the spastin gene (SPG4) in patients in Germany with autosomal dominant hereditary spastic paraplegia // *Hum. Mutat.* 2002. V. 20. № 2. P. 127–132. doi 10.1002/humu.10105
28. *Magariello A., Muglia M., Patitucci A. et al.* Novel spastin (SPG4) mutations in Italian patients with hereditary spastic paraplegia // *Neuromusc. Disorders*. 2006. V. 16. № 6. P. 387–390. doi 10.1016/j.nmd.2006.03.009

29. *Crippa F., Panzeri C., Martinuzzi A. et al.* Eight novel mutations in SPG4 in a large sample of patients with hereditary spastic paraplegia // *Arch. Neurol.* 2006. V. 5. P. 750–755. doi 10.1001/archneur.63.5.750

Major Mutation in the *SPAST* Gene in Patients with Autosomal Dominant Spastic Paraplegia from Bashkortostan Republic

I. M. Khidiyatova^{a, b, *}, A. F. Akhmetgaleyeva^a, E. V. Saifullina^c, R. F. Idrisova^d, M. A. Yankina^a, V. V. Shavaliyeva^b, R. V. Magzhanov^c, and E. K. Khusnutdinova^{a, b}

^a*Institute of Biochemistry and Genetics Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

^b*Bashkir State University, Ufa, 450076 Russia*

^c*Bashkir State Medical University, Ufa, 450000 Russia*

^d*Republican Clinic Hospital, Ufa, 450005 Russia*

*e-mail: imkhid@mail.ru

Hereditary spastic paraplegia (HSP) – a group of neurodegenerative disorders with a predominant lesion of the pyramidal tract. To date, mutations responsible for the disease have been identified in more than 70 gene loci. The main causes of HSP development are mutations in the *SPAST* gene, but major mutations are rare for this disease. Study of HSP patients from 63 unrelated families from Bashkortostan Republic (BR) identified c.283delG (p.Ala95Profs*66) mutation in the *SPAST* gene in families of Tatar ethnicity with a high frequency. In the general cohort of unrelated patients from Bashkortostan Republic its frequency was 19%, and in the cohort of Tatar patients – 44%. HSP was found to be inherited in an autosomal dominant manner in all families with this mutation. The clinical symptoms of the disease in most of these families correspond to the typical uncomplicated phenotype, true to SPG4 form of HSP.

Keywords: hereditary spastic paraplegia, *SPAST* gene, NGS target exome sequencing.