

Печеночные порфирии в России: мутационный анализ

Селиванова Д.С., Сурин В.Л., Лучинина Ю.А., Финк О.С., Пустовойт Я.С., Картова И.В., Кравченко С.К., Пивник А.В.
ФГБУ Гематологический научный центр МЗ РФ (Москва)

Введение

Порфирии – это группа наследственных заболеваний, обусловленных дефицитом одного из ферментов системы биосинтеза гема, приводящим к избыточному накоплению в организме токсичных порфиринов и их предшественников. Различают семь основных нозологических форм этой патологии. Группа печеночных порфирий объединяет порфирию, обусловленную дефицитом дегидратазы δ-аминолевулиновой кислоты, острую перемежающуюся порфирию (ОПП), вариегатную порфирию (ВП), врожденную копропорфирию (ВКП) и позднюю кожную порфирию (ПКП). Первые четыре заболевания выделяются в группу острых печеночных порфирий. Для них характерен доминантный тип наследования и, за очень редкими исключениями, пациенты являются гетерозиготами по дефектному гену: для ОПП это ген порфобилиногендезаминазы (HMBS), для ВКП – ген копропорфириногенаксидазы (CPOX), для ВП – ген протопорфириногенаксидазы (PPOX). Эти заболевания проявляются в виде приступов разной степени тяжести, провоцируемых различными экзогенными и эндогенными факторами, и имеют достаточно низкую пенетрантность мутантного гена (15-20%). Поздняя кожная порфирия (ПКП) имеет две формы – наследственную и спорадическую. Наследственная ПКП обусловлена мутациями в гене уропорфириноген-1-декарбоксилазы (UROD).

Цель

Работа посвящена анализу мутаций у российских пациентов с печеночными порфириями (ОПП, ВКП, ВП и ПКП) и их родственников.

Материалы и методы

В исследование включены неродственные больные, поступившие в Гематологический научный центр в период с 1997 по 2014 гг – ОПП (125), ВКП (4), ВП (7) и ПКП (19), а также родственники больных ОПП из 86 семей (248). Диагностика типа порфирии проводилась по сочетанию клинических и биохимических данных.

Анализировали образцы ДНК и мРНК, выделенные из ядерных клеток периферической крови. Поиск мутаций проводили с использованием секвенирования кДНК или всех функционально важных фрагментов генов HMBS, CPOX, PPOX и UROD, полученных при помощи ПЦР или ОТ-ПЦР. Для скрининга мутаций в семьях больных ОПП применяли рестрикционный или гетеродуплексный анализ. У больных ВКП методом рестрикционного анализа определяли также наличие мутаций в гене HFE.

Результаты и обсуждения

ОПП. У 125 больных обнаружено 77 различных мутаций в гене ПБГД: 27 миссенс-мутаций, 8 нонсенс-мутаций, 12 микроделетий, 1 микроинсерция, 29 мутаций сплайсинга, из них 47 являются новыми и ранее в мировой популяции не встречались (Табл.1). Такие данные говорят о гетерогенности ОПП в России. Тем не менее наиболее распространенными оказались 5 мутаций: 53delT, Arg173Trp, Gly111Arg, Arg149Term и Cys247Arg (рис. 1).

С помощью гаплотипирования показано, что мутация 53delT, обнаруженная только в России и наиболее распространенная в российской популяции, имеет монофилетическое происхождение, так же как и мутация IVS13 (825+2) T→G(+6)insC

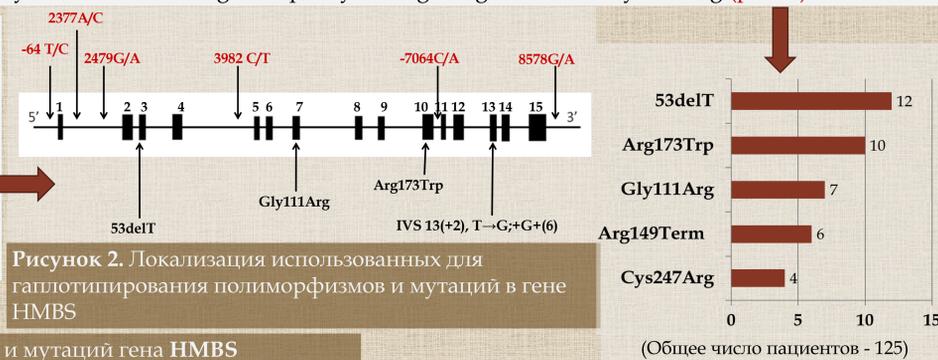


Рисунок 2. Локализация использованных для гаплотипирования полиморфизмов и мутаций в гене HMBS

Рисунок 1. Мутации гена HMBS, представленные более чем в трёх семьях

Таблица 2. Комбинации гаплотипов и мутаций гена HMBS

Гаплотипы						Общее число аллелей	53delT	Arg173Trp	Gly111Arg	IVS13(+2) T→G(+6)insC	N(6)*
-64 t/c	2377 a/c	2479 g/a	3982 c/t	7064 c/a	8578 g/a						
C	A	A	T	A	G	6	5				
C	A	A	T	C	G	10		P219			3
C	A	A	T	C	A	8		1			3
C	A	A	T	A	A	4		1			1
C	C	A	T	C	G	5		1		2	
C	C	A	T	A	G	1					
C	C	A	T	C	A	1			1		
T	C	G	C	A	A	1					
T	C	G	C	C	G	10		P88	1	P219	5
T	C	G	T	A	A	1					1
T	C	G	T	C	A	1		P88			1
T	C	G	C	A	G	3					2
T	C	G	C	C	A	5		1			
T	A	A	T	A	G	1			1		
T	A	A	T	C	A	1					
Total						58					

* - N(6) – нормальные аллели HMBS, сонаследуемые с мутантными, у больных ОПП

ВП. У 7 больных ВП в гене PPOX были обнаружены 7 различных мутаций. Пять из них: 356 ins19bp, IVS9+1 G→A, IVS10-2 delA, CD 369-370(1107_1109) delG и Arg113Lys ранее в мировой популяции не встречались. (Табл.3).

ВКП. Анализ гена CPOX у 4 больных выявил 3 мутации, одна из которых (His327Arg) встретилась дважды и оказалась новой, как и мутация сплайсинга IVS1+1 G→A. (Табл.4).

ПКП. Проведен полный мутационный анализ гена UROD для 19 пациентов ПКП. У 6 из них установлена наследственная форма заболевания. Выявлены в гетерозиготном состоянии мутации 3 различные мутации: Val90Ala, Val134Gln и Gln206Term. (Табл.5).

Таблица 6. Сочетание мутаций гена HFE и UROD у больных ПКП

№	Мутации в гене UROD	Мутации в гене HFE	Кол-во гаплотипов
1.	Val134Gln	H63D G/G	2
2.	N	H63D G/G	2
3.	Val90Ala	H63D C/G	1
4.	Gln206Term	H63D C/G	2
5.	N	H63D C/G	6
6.	Val134Gln	C282Y G/A	1
7.	N	N	5

Мы также проанализировали всех больных ПКП на 3 основные мутации (H63D, S65C и C282Y) в гене HFE (Табл.6). Наиболее распространенной оказалась мутация H63D – частота встречаемости мутантного аллеля составила 44.7%. Мутация C282Y была обнаружена только у одного пациента в гетерозиготном состоянии. Мутация S65C не встретилась ни разу.

Таблица 4. Спектр мутаций гена CPOX у больных ВКП

№	Положение	Мутация	Тип мутации	Ссылка (впервые описана)
IVS1				
1	556+1	G→A	Дефект сплайсинга	Новая!
Exon 4				
2	854	C→T (Pro285Leu)	Миссенс	Doss et al., 2002
Exon 5				
3*(2)	980	A→G (His327Arg)	Миссенс	Новая!

Таблица 5. Спектр мутаций гена UROD у больных ПКП

№	Положение	Мутация	Тип мутации	Ссылка (впервые описана)
Exon 4				
1	269	T→C (Val90Ala)	Миссенс	Новая!
Exon 5				
2*(3)	399-401	TGT→CCA (Val134Gln)	Миссенс	Новая!
Exon 6				
3*(2)	616	C→T (Gln206term)	Нонсенс	Martinez di Ippolito et al., 1999

Таблица 1. Спектр мутаций гена HMBS у больных ОПП

№	Положение	Мутация	Тип мутации	Ссылка (впервые описана)
IVS1				
1	33+1	G→A	Дефект сплайсинга	Grandchamp et al., 1989
2	33+1	G→C	Дефект сплайсинга	Новая!
3	33+2	T→C	Дефект сплайсинга	Petrides et al., 2000
4	33+5	G→A	Дефект сплайсинга	Новая!
Exon 3				
5*(12)	53	delT	Делеция	Новая!
6	71	G→A (Gly24Asp)	Миссенс	Новая!
7*(3)	76	C→T (Arg26Cys)	Миссенс	Kaappinen et al., 1995
8*(2)	77	G→A (Arg26His)	Миссенс	Llewellyn et al., 1996
9	85	C→T (Gln29Term)	Нонсенс	Новая!
10	87	G→C (Gln29His)	Миссенс	Новая!
IVS3				
11	87+5	G→T	Дефект сплайсинга	Новая!
Exon 4				
12	92	C→T (Ala31Val)	Миссенс	Новая!
13	95	G→C (Arg32Pro)	Миссенс	Новая!
14	125	T→C (Leu42Ser)	Миссенс	Whalley et al., 1999
15	160_160+1	delAG	Делеция	Новая!
IVS4				
16	161-6	C→G	Дефект сплайсинга	Новая!
17	161-2	A→G	Дефект сплайсинга	Новая!
Exon 5				
18	178	G→A (Gly60Arg)	Миссенс	Новая!
19	202_203	delCT	Делеция	Новая!
IVS5				
20	211-1	G→C	Дефект сплайсинга	Новая!
21	211-2	A→C	Дефект сплайсинга	Новая!
Exon 7				
22	278	T→A (Val93Asp)	Миссенс	Новая!
23*(7)	331	G→A (Gly111Arg)	Миссенс	Gu et al., 1993
24	335	C→A (Ala112Asp)	Миссенс	Новая!
IVS7				
25	344+1	G→A	Дефект сплайсинга	Robreau-Fraolini et al., 2000
26	344+2	T→A	Дефект сплайсинга	Новая!
27	344+2_5	delTAAG	Дефект сплайсинга	Новая!
28	345-1	G→C	Дефект сплайсинга	Von Brashch et al., 2004
Exon 8				
29	346	C→T (Arg116Trp)	Миссенс	Gu et al., 1993
30	358_379	del 22bp	Делеция	Новая!
31	359_361	del ATG	Делеция	Новая!
32	415	G→T (Glu139Term)	Нонсенс	Новая!
IVS8				
33	423-1	G→A	Дефект сплайсинга	Новая!
Exon 9				
34*(6)	445	C→T (Arg149Term)	Нонсенс	Kaappinen et al., 1995
Exon 10				
35*(10)	517	C→T (Arg173Trp)	Миссенс	Lee et al., 1991
36*(3)	518	G→A (Arg173Gln)	Миссенс	Delfau et al., 1990
37	530	T→G (Leu177Trp)	Миссенс	Mgone et al., 1992
38	575	G→A (Gly192Asp)	Миссенс	Новая!
39	600_601	del C	Делеция	Новая!
40	610	C→T (Gln204Term)	Нонсенс	Mgone et al., 1994
IVS10				
41	613-1	C→G	Дефект сплайсинга	Новая!
Exon 11				
42	635	T→G (Met212Arg)+11 int	Миссенс	Новая!
43	645	del G	Делеция	Новая!
44*(2)	646_647	insA	Инсерция	Новая!
45*(2)	647	G→A (Gly216Asp)	Миссенс	Lundin et al., 1997
46	649	C→T (Gln217Term)	Нонсенс	Новая!
47	652	G→A (Gly218Arg)	Миссенс	Yang et al., 2008
48	652	G→T (Gly218Trp)	Миссенс	Новая!
IVS11				
49	652-5_4	AT→TC	Дефект сплайсинга	Новая!
50	625-1	G→C	Дефект сплайсинга	Puy et al., 1997
Exon 12				
51*(3)	637	C→T (Arg225Term)	Нонсенс	Kaappinen et al., 1995
52	715_725	del 10bp	Делеция	Новая!
53*(2)	728_729	del CT	Делеция	Mgone et al., 1993
54*(4)	739	T→C (Cys247Arg)	Миссенс	Mgone et al., 1993
55	748	G→C (Glu250Gln)	Миссенс	Lundin et al., 1997
56	749	A→C (Glu250Ala)	Миссенс	Новая!
IVS12				
57	771+1	G→C	Дефект сплайсинга	De Servi et al., 1999
58	771+1	G→T	Дефект сплайсинга	Rosipal et al., 1997
59	772-17	A→G	Дефект сплайсинга	Новая!
60	772-11_13	del CTT	Дефект сплайсинга	Новая!
IVS13				
61	825+1	G→A	Дефект сплайсинга	Llewellyn et al., 1996
62	825+2	T→A	Дефект сплайсинга	Gross et al., 1999
63*(2)	825+2	T→G; +G(+6)	Дефект сплайсинга	Новая!
64*(3)	825+3_6	del AAGT	Дефект сплайсинга	Pishik et al., 2005
65	825+5	G→C	Дефект сплайсинга	Pishik et al., 2005
Exon 14				
66	839	G→A (Gly280Glu)	Миссенс	Новая!
67	849	G→A (Trp283Term)	Нонсенс	Schreiber et al., 1995
IVS14				
68	912+2	T→C	Дефект сплайсинга	Новая!
69	913-1	G→A	Дефект сплайсинга	Новая!
Exon 15				
70	973	C→T (Arg325Term)	Нонсенс	Lam et al., 2001
71	1008	delC	Делеция	Новая!
72	1013	T→C (Leu338Pro)	Миссенс	Новая!
73	1013	T→G (Leu338Arg)	Миссенс	Новая!
74	1024_1091	del 67 bp	Делеция	Новая!
75	1028	T→C (Leu343Pro)	Миссенс	Floderus et al., 2002
76	1029_1033	del GAGCA	Делеция	Новая!
77	1042_1043	del AA	Делеция	Новая!

* - мутация встретилась более 1 раза

Таблица 3. Спектр мутаций гена PPOX у больных ВП

№	Положение	Мутация	Тип мутации	Ссылка (впервые описана)
Exon 2				
1	77-82	ins C (CD 26-28)	Инсерция	von und zu Fraunberg et al., 2001
Exon 4				
2	338	G→A (Arg113Lys)	Миссенс	Новая!
Exon 5				
3	356	ins19bp (CD 119)	Инсерция	Новая!
Exon 6				
4	509	G→T (Arg168His)	Миссенс	Frank et al., 1998
IVS 9				
5	987+1	G→A	Дефект сплайсинга	Новая!
6	988-2	del A	Дефект сплайсинга	Новая!
Exon 11				
7	1107_1109	del G (CD 369-370)	Делеция	Новая!

* - мутация встретилась более 1 раза

Почтовый адрес: 125167, г. Москва, Новый Зыковский пр., д. 4а, ФГБУ Гематологический научный центр МЗ РФ, Лаборатория геномной инженерии e-mail: vadsurin@mail.ru