

Молекулярная структура бокового амиотрофического склероза в российской популяции

Н.Ю. Абрамычева, Е.В. Лысогорская, Ю.С. Шпилюкова,
А.С. Ветчинова, М.Н. Захарова, С.Н. Иллариошкин

ФГБНУ «Научный центр неврологии»; Россия, 125367 Москва, Волоколамское шоссе, 80

Контакты: Сергей Николаевич Иллариошкин snllario@gmail.com

Материалы и методы. Были обследованы 285 российских пациентов с боковым амиотрофическим склерозом (БАС), включая 260 пациентов со спорадической и 25 с семейной формой, на предмет носительства мутаций в генах *SOD1*, *C9orf72*, *TARDBP*, *ANG* и др., а также на наличие ассоциаций с полиморфными сайтами в генах *ATXN2* (полиCAG) и *VEGF* (-2578C/A).

Молекулярно-генетический анализ выполняли с использованием методов прямого секвенирования, фрагментного анализа и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. На последнем этапе оценивали редкие кандидатные гены БАС с использованием секвенирующей панели нового поколения (next generation sequencing, NGS).

Результаты. Суммарная частота выявленных мутаций в обследованной когорте пациентов с БАС составила 9,5 %. Наиболее частыми оказались повреждения в генах *SOD1* (24,0 % при семейной форме БАС и 4,6 % при спорадической) и *C9orf72* (патологическая экспансия гексануклеотидных повторов в нем обнаружена в 1,8 % случаев БАС, все случаи спорадические). Мутаций в гене *TARDBP* не обнаружено, однако в группе БАС значимо чаще по сравнению с контролем встречалась делеция с.715-126delG, локализованная в интроне 5 гена *TARDBP*, – 38,0 % против 26,6 % ($\chi^2 = 13,17$; $p = 0,002$). Мутации в гене *ANG* выявлены у 1,05 % обследованных больных БАС (все случаи спорадические). В 1 (0,35 %) спорадическом случае выявлена мутация G1082A в гене *DCTN1*. В обследованной группе значимо чаще по сравнению с контролем встречается носительство рискового аллеля гена *ATXN2* с «промежуточным» (28–33) числом копий CAG-повторов – 5,0 % против 1,7 % ($\chi^2 = 3,89$; $p = 0,0486$). У российских пациентов с БАС выявлена ассоциация болезни с носительством рискового A-аллеля и гомозиготного генотипа A/A по полиморфизму -2578C/A в гене *VEGF* (соответственно $\chi^2 = 7,14$; $p = 0,008$ и $\chi^2 = 13,46$; $p = 0,001$ при сравнении частот у больных БАС и в контроле), что подтверждается анализом отношения шансов.

Заключение. В работе раскрыта молекулярная структура БАС в российской популяции, установлены частота отдельных генетических форм и спектр мутаций, что имеет большое значение для медико-генетического консультирования и профилактики заболевания в отягощенных семьях.

Ключевые слова: боковой амиотрофический склероз, генетика, мутационный скрининг, молекулярная структура, российская популяция

DOI: 10.17650/2222-8721-2016-6-4-21-27

Molecular structure of amyotrophic lateral sclerosis in Russian population

N.Yu. Abramycheva, E.V. Lysogorskaya, Yu.S. Shpilyukova, A.S. Vetchinova, M.N. Zakharova, S.N. Illarioshkin
Research Center of Neurology; 80 Volokolamskoe Shosse, Moscow 125367, Russia

Materials and methods. 285 Russian patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) including 260 patients with a sporadic form and 25 with a familial form were examined for mutations in *SOD1*, *C9orf72*, *TARDBP*, *ANG* and other genes and the presence of associations among polymorphic sites in *ATXN2* (polyCAG) and *VEGF* (-2578C/A) genes.

Molecular genetic analysis was performed using direct sequencing, fragment analysis and real-time polymerase chain reaction. On the last stage, rare ALS candidate genes were evaluated using a next generation sequencing (NGS) panel.

Results. Total rate of the identified mutations in the examined ALS cohort was 9.5 %. The most frequently observed defects were mutations in the *SOD1* (24.0 % in familial ALS and 4.6 % in sporadic ALS) and *C9orf72* (pathological hexanucleotide repeat expansion was identified in 1.8 % cases of ALS, all sporadic) genes. The *TARDBP* gene didn't contain any mutations, though in the ALS group deletion c.715-126delG located in intron 5 of the *TARDBP* gene was significantly over-represented – 38.0 % vs. 26.6 % ($\chi^2 = 13.17$; $p = 0.002$). Mutations in the *ANG* gene were identified in 1.05 % of ALS patients (all cases were sporadic). In 1 (0.35 %) sporadic case a G1082A mutation in the *DCTN1* gene was identified. The examined group significantly more frequently carried a risk allele of the *ATXN2* gene with an “intermediate” (28–33) number of CAG repeats – 5.0 % vs. 1.7 % in the control group ($\chi^2 = 3.89$; $p = 0.0486$). In Russian ALS patients, an association between the disease and the presence of a risk A-allele and homozygote genotype A/A of -2578C/A polymorphism in the *VEGF* gene was identified ($\chi^2 = 7.14$; $p = 0.008$ and $\chi^2 = 13.46$; $p = 0.001$ for the rates in the ALS population and in the control population, respectively), which is confirmed by the odds ratio.

Conclusion. In the current article, molecular structure of ALS in the Russian population was examined, rates of individual genetic forms and mutation spectrum were established. This work is of considerable significance for medical genetic counseling and prevention of the disease in the affected families.

Key words: amyotrophic lateral sclerosis, genetics, mutation screening, molecular structure, Russian population

Введение

Боковой амиотрофический склероз (БАС) — тяжелое, некурабельное нейродегенеративное заболевание, характеризующееся поражением верхнего и нижнего мотонейронов и смертельными исходами больных, как правило, от нарастающих дыхательных нарушений. Выделяют более 25 генетических локусов, ассоциированных с семейными и спорадическими формами заболевания [1]. Выявляемость мутаций в тех или иных генах у пациентов с БАС варьирует в зависимости от исследуемой популяции [2], при этом идентифицировать генетический дефект удастся в 68 % семейных случаев заболевания и лишь у 11 % больных со спорадической формой БАС [3].

Наиболее часто развитие заболевания связано с мутациями в генах *SOD1*, *TARDBP* и *C9orf72* [1]. Первым при БАС был открыт ген, кодирующий Cu/Zn-супероксиддисмутазу (*SOD1*); проведенные исследования показали, что мутации в нем возникают в 15–20 % случаев при семейной форме БАС и значительно реже — при спорадической [4, 5]. Ген *TARDBP*, кодирующий белок TDP-43, вовлекается в 0,7–8,0 % случаев семейного БАС [6, 7]. Экспансия гексануклеотидных повторов GGGGCC в интроне 1 гена *C9orf72* считается самым частым повреждением в европейской и североамериканской популяциях: она выявляется при семейной форме БАС в среднем в 40 % случаев, при спорадической — в 7–11 % случаев [8–10]. Вовлечение других генов является значительно более редким.

Цель исследования. Проведение детального мутационного скрининга кандидатных генов с оценкой частоты встречаемости отдельных молекулярных форм и установлением ведущих генетических факторов риска развития БАС у пациентов в российской популяции.

Материалы и методы

Были обследованы 285 пациентов с достоверным или вероятным диагнозом БАС по критериям El Escorial [11]. Все пациенты принадлежали преимущественно славянской этнической группе и проживали на европейской территории России. Группа обследованных лиц включала 260 пациентов со спорадической формой заболевания и 25 неродственных пациентов с положительным семейным анамнезом по БАС (8,8 % семейных случаев). Заболевание было распространено во всех возрастных подгруппах и манифестировало чаще на 5–7-м десятилетии жизни. Тяжесть неврологических проявлений БАС определяли с помощью шкалы ALS FRS-R (revised ALS functional rating scale).

Молекулярно-генетический анализ включал секвенирование кодирующей области гена *SOD1*, 6-го (наиболее мутационного) экзона гена *TARDBP*, единственного экзона гена *ANG*, исследование частоты tandemных тринуклеотидных (CAG)_n-повторов в гене *ATXN2* и гексануклеотидных повторов ($GGGGCC$)_n в гене *C9orf72*, а также типирование однонуклеотидного полиморфизма -2578C/A (rs699947) в гене *VEGF*.

Прямое секвенирование экзонов изучаемых генов проводили на капиллярном генетическом анализаторе ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США) с помощью программного обеспечения Data Collection Software версии 3.0, Sequencing Analysis Software версии 5.2 и SeqScape Software версии 2.5.

Количество tandemных CAG-повторов в гене *ATXN2* оценивали методом фрагментного анализа на генетическом анализаторе ABI Prism 3130 с помощью программного обеспечения Data Collection Software версии 3.0. Полученные результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения GeneMapper v. 4.0 (Applied Biosystems, США).

Контрольная группа для сопоставления аллельных частот включала 357 клинически здоровых лиц.

Скрининг GGGGCC-повторов в гене *C9orf72* проводили в 2 этапа. На 1-м этапе на генетическом анализаторе ABI Prism 3130 с помощью программы GeneMapper v. 4.0 (Applied Biosystems, США) анализировали длины ампликонов, содержащих гексануклеотидную область. На 2-м этапе для всех образцов ДНК, идентифицированных как гомозиготные, точный анализ ампликона с большим количеством повторов проводили с помощью метода полимеразной цепной реакции с дополнительным обратным праймером на область повторов [12, 13].

Типирование полиморфизма -2578C/A в гене *VEGF* выполняли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. В качестве контроля использовали 149 образцов ДНК лиц славянской этнической группы, сопоставимой с группой БАС по половому и возрастному составу.

Генетический анализ с применением секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS) проводили с помощью оригинальной мультигенной панели, созданной совместно с ЗАО «Синтол» (Россия) [14].

Статистическую обработку результатов выполняли с использованием пакета компьютерных прикладных программ Statistica 8.0. При этом применяли методы описательной статистики, непараметрические методы: анализ 2 групп по количественному признаку с использованием U-критерия Манна–Уитни, анализ таблиц сопряженности, сопоставление наблюдаемой и ожидаемой частот, анализ отношения шансов (ОШ) с применением логистической регрессии. Для проведения ROC-анализа (receiver operating characteristic) использовали онлайн-калькулятор Simple ROC Curve Analysis (<http://www.vassarstats.net/roc1.html>). При оценке малых выборок вносили поправку Йейтса. Данные были представлены в виде медианы, 25 и 75 % квартилей (Me (25 %; 75 %)). Результаты считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Ген *SOD1*. При секвенировании *SOD1* в обследованной группе из 285 лиц выявлено 12 гетерозиготных мутаций у 21 неродственного пациента с БАС, в том числе 9 мутаций у 17 человек в кодирующей области гена и 3 мутации у 4 пациентов в некодирующих областях

Таблица 1. Выявленные кодирующие мутации в гене *SOD1*

Table 1. Identified coding mutations in the *SOD1* gene

| № пациента Patient No | Мутация Mutation | Область гена Gene region | Возраст/пол Age/sex | Форма заболевания Disease form |
|--------------------------|---------------------|--------------------------------------|-------------------------|---|
| 187 | Gly16Ala | Экзон 1 Exon 1 | 31/женский 31/female | Шейно-грудная, sporadic Cervical thoracic, sporadic |
| 246 | Gly16Ala | Экзон 1 Exon 1 | 32/женский 32/female | Шейно-грудная, семейная Cervical thoracic, familial |
| 15 | His48Arg | Экзон 2 Exon 2 | 50/мужской 50/male | Шейно-грудная, sporadic Cervical thoracic, sporadic |
| 120 | Leu84Val | Экзон 4 Exon 4 | 39/мужской 39/male | Бульбарная, семейная Bulbar, familial |
| 145 | Leu84Val | Экзон 4 Exon 4 | 29/мужской 29/male | Шейно-грудная, семейная Cervical thoracic, familial |
| 247 | Leu84Val | Экзон 4 Exon 4 | 37/мужской 37/male | Шейно-грудная, семейная Cervical thoracic, familial |
| 155 | Asn86Ser | Экзон 4 Exon 4 | 54/женский 54/female | Шейно-грудная, sporadic Cervical thoracic, sporadic |
| 224 | Asn86Ser | Экзон 4 Exon 4 | 50/женский 50/female | Пояснично-крестцовая, семейная Lumbosacral, familial |
| 206 | Asp90Ala | Экзон 4 Exon 4 | 62/женский 62/female | Пояснично-крестцовая, sporadic Lumbosacral, sporadic |
| 346 | Asp90Ala | Экзон 4 Exon 4 | 61/женский 61/female | Шейно-грудная, sporadic Cervical thoracic, sporadic |
| 116 | Ser105Leu | Экзон 4 Exon 4 | 46/мужской 46/male | Пояснично-крестцовая, семейная Lumbosacral, familial |
| 255 | Ser108fr | Экзон 4 Exon 4 | 59/мужской 59/male | Шейно-грудная, sporadic Cervical thoracic, sporadic |
| 176 | Glu133Gly | Экзон 5 Exon 5 | 34/женский 34/female | Шейно-грудная, sporadic Cervical thoracic, sporadic |
| 17 | Leu144Phe | Экзон 5 Exon 5 | 44/женский 44/female | Пояснично-крестцовая, sporadic Lumbosacral, sporadic |
| 62 | c.-46C>T | Область промотора Promotor region | 42/мужской 42/male | Пояснично-крестцовая, sporadic Lumbosacral, sporadic |
| 130 | c.169+50delAACAGTA | Инtron 2 Intron 2 | 63/женский 63/female | Бульбарная, sporadic Bulbar, sporadic |
| 163 | c.169+50delAACAGTA | Инtron 2 Intron 2 | 65/женский 65/female | Шейно-грудная, sporadic Cervical thoracic, sporadic |
| 191 | c.*249T>C | 5'-область 5'-region | 46/женский 46/female | Шейно-грудная, sporadic Cervical thoracic, sporadic |

SOD1 (табл. 1, рис. 1). Таким образом, суммарная частота мутаций в гене *SOD1* составила 7,4 %, в том числе в семейных случаях БАС – 36 % (9 семей из 25 человек), в спорадических случаях – 4,6 %.

Из 9 выявленных кодирующих мутаций 8 (Gly16Ala, His48Arg, Leu84Val, Asn86Ser, Asp90Ala, Ser105Leu, Glu133Gly и Leu144Phe) встречаются в других популяциях мира и описаны в базе данных <http://alsod.iop.kcl.ac.uk/>. Кодирующая мутация Ser108fr (делеция 2 нуклеотидов

NC_000021.9: g.31667340delTC со сдвигом рамки) является новой. В числе некодирующих мутаций были выявлены: делеция 7 пар нуклеотидов c.169+50delAACAGTA в интроне 2, замена c.-46C>T в промоторной области гена и замена c.*249T>C (rs16988412) в интроне 5 в области сплайсинга. Делеция c.169+50delAACAGTA была обнаружена в 2 неродственных случаях спорадического БАС. У обеих пациенток-носительниц заболевание дебютировало в возрасте после 60 лет, однако феноти-

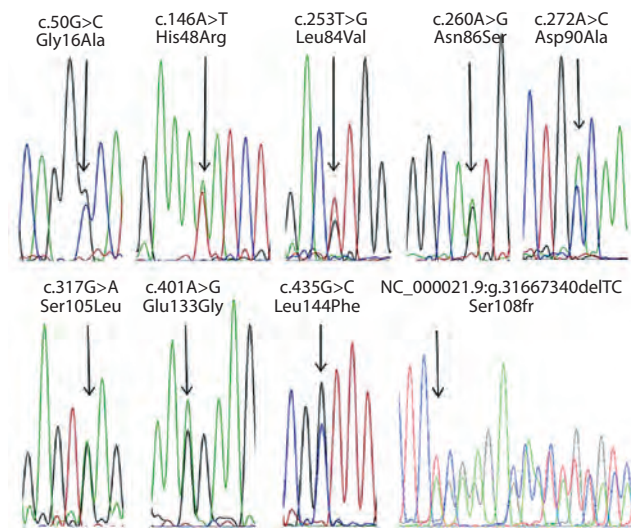


Рис. 1. Обнаруженные кодирующие мутации в гене *SOD1*

Fig. 1. Identified coding mutations in the *SOD1* gene

пические проявления БАС были различными: в одном случае — медленно прогрессирующая шейно-грудная форма, в другом — быстро прогрессирующая бульбарная форма. При исследовании 100 контрольных образцов ДНК (здоровые лица) ни одного случая носительства данной делеции не выявлено.

Ген *C9orf72*. У 5 пациентов (2 мужчин и 3 женщины) со спорадической формой БАС выявлена гетерозиготная мутация по типу гексануклеотидной GGGGCC-экспансии в интроне 1 гена *C9orf72* (рис. 2). Во всех случаях число повторов превышало патологический порог в 50 копий (по 1 больному — 54 и 55 повторов и 3 пациента с 61 повтором). Возраст дебюта болезни варьировал от 38 до 65 лет и не имел четкой связи с числом копий GGGGCC-повторов; у 1 пациента была пояснично-крестцовая форма БАС, у 1 — шейная и у 2 — бульбарная. Все больные с данным типом мутации имели быстрое прогрессирование заболевания с генерализацией процесса уже к концу 1-го года. Таким образом, общая частота мутаций в гене *C9orf72* составила 1,8 %.

В контрольных образцах (203 здоровых добровольца) экспансии GGGGCC-повторов в данном гене не обнаружено.

Ген *TARDBP*. В работе был исследован экзон 6 гена *TARDBP*, в котором расположено подавляющее число описанных при БАС мутаций. У российских пациентов с БАС ($n = 208$) при прямом секвенировании экзона 6 гена *TARDBP* кодирующих мутаций не выявлено. У 1 пациента была обнаружена замена с.*44A>G (*NT_021937.19) и у 79 (38 %) больных — делеция с.*715-126delG (rs3835416), в том числе у 72 пациентов в гетерозиготном и у 7 — в гомозиготном состоянии. Указанная замена с.*44A>G не выявлена в контроле (203 образца ДНК); частота носительства делеции с.*715-126delG в контроле составила 26,6 %

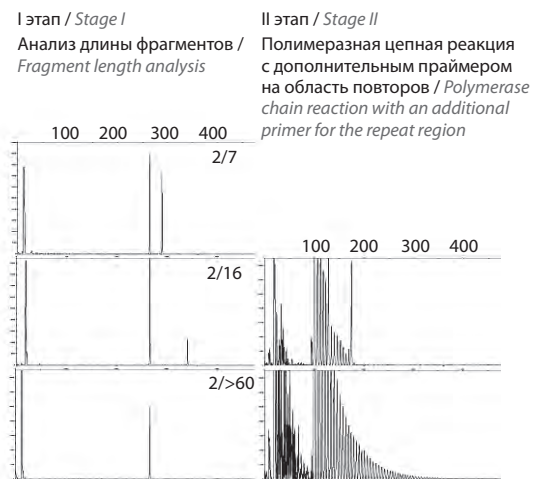


Рис. 2. Двухэтапное определение GGGGCC-экспансии в гене *C9orf72*: а — норма (на I этапе видны 2 пика от аллелей с числом копий тандемных повторов 2 и 7); б — норма (на I этапе видны 2 пика от аллелей с числом копий тандемных повторов 2 и 16, на II этапе — «малая» решетка с ограниченным числом амплифицируемых пиков); в — экспансия повторов (на I этапе виден только пик от аллеля с числом копий повторов 2, на II этапе — «протяженная» решетка с большим числом амплифицируемых пиков, соответствующих экспансии GGGGCC-повторов > 60 копий)

Fig. 2. Two-stage identification of GGGGCC expansion in the *C9orf72* gene: а — norm (2 peaks from the alleles with 2 and 7 tandem repeats are evident in stage I); б — norm (2 peaks from the alleles with 2 and 16 tandem repeats are evident in stage I, a “small” array with a limited number of amplification peaks in stage II); в — repeat expansion (a single peak from the allele with 2 repeat copies is evident in stage I, an “extended” array with a large number of amplification peaks corresponding to GGGGCC repeat expansion > 60 copies is evident in stage II)

(49 человек — гетерозиготы, 5 — гомозиготы). При исследовании распределения аллелей и генотипов по локусу rs3835416 путем сравнения наблюдаемой и ожидаемой частот наблюдалось статистически значимое увеличение частоты встречаемости данной делеции в группе пациентов с БАС ($\chi^2 = 13,17$; $p = 0,002$) (табл. 2).

При анализе ОШ было установлено, что в группе больных с БАС шанс носительства описанной делеции в 1,7 раза выше, чем у носителей других аллелей (доверительный интервал (ДИ) 1,11–2,57; $p = 0,013$). Анализ частоты встречаемости данной делеции в других популяционных когортах пациентов с БАС ранее не проводился.

Ген *ANG*. При исследовании единственного кодирующего экзона гена *ANG* были выявлены 2 гетерозиготные мутации у 3 неродственных пациентов, страдающих спорадической формой БАС (рис. 3). У 2 неродственных пациентов была обнаружена замена в области сигнальной последовательности Pro21Ser, у 1 больной — мутация Ile46Val. Таким образом, частота мутаций при спорадическом БАС в обследованной группе составила 1,05 %. Среди пациентов, страдающих семейной формой заболевания, носительства мутаций в гене *ANG* не выявлено.

Таблица 2. Частота встречаемости генотипов в локусе rs3835416 гена TARDBP

Table 2. Genotype incidence rate in locus rs3835416 of the TARDBP gene

| Показатель Parameter | Число пациентов с БАС, n (%) Number of ALS patients, n (%) | Число лиц в группе контроля, n (%) Number of patients in the control group, n (%) | χ^2 | p |
|--|---|--|----------|-------|
| Аллели Alleles G delG | 331 (80,0) 85 (20,0) | 347 (85,5) 59 (14,5) | 13,17 | 0,002 |
| Генотипы Genotypes G/delG delG/delG GG | 71 (34,0) 7 (3,4) 130 (62,6) | 49 (24,0) 5 (2,5) 149 (73,5) | 14,24 | 0,008 |

Примечание. Здесь и в табл. 3: БАС – боковой амиотрофический склероз.

Note. Here and in table 3: ALS – amyotrophic lateral sclerosis.

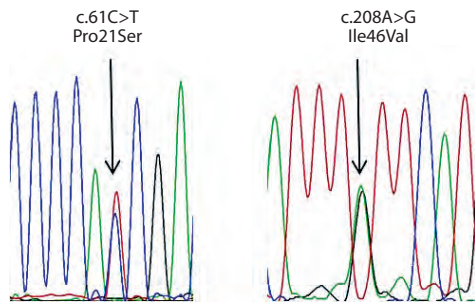


Рис. 3. Кодирующие мутации в гене ANG

Fig. 3. Coding mutations in the ANG gene

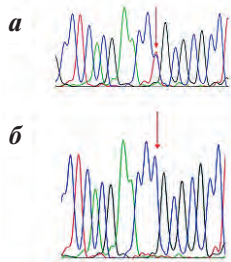


Рис. 4. Мутация G1082A в гене DCTN1 (стрелкой указана область мутации): а – мутантный сиквенс; б – контроль (нормальный сиквенс)

Fig. 4. Mutation G1082A in the DCTN1 gene (arrow shows the mutation region): a – mutant sequence; б – control (normal sequence)

Ген ATXN2. Экзон 1 гена *ATXN2* несет участок CAG-повторов, определяющий полиглутаминовую последовательность его продукта – белка атаксина 2. Значительная степень CAG-экспансии (> 33 копий) в данном гене обуславливает развитие спиноцереbellарной атаксии 2-го типа. Изменение копийности CAG при БАС соответствует экспансии промежуточного числа повторов («предэкспансии») – в диапазоне от 24 до 33. Для оценки порогового значения числа CAG-повторов, ассоциированного с развитием забо-

левания у российских пациентов, нами был выполнен ROC-анализ. Результаты показали, что для развития заболевания значимым является носительство 28 и более CAG-повторов в гене *ATXN2*. В обследованной группе больных ($n = 208$) было выявлено 10 (5,0 %) случаев «предэкспансии» у пациентов со спорадической формой БАС. В контрольной группе ($n = 357$) обнаружено 6 (1,7 %) случаев «предэкспансии» в гене *ATXN2*. Частота встречаемости данной мутации гена *ATXN2* среди больных была статистически значимо выше ($\chi^2 = 3,89$; $p = 0,0486$). При анализе ОШ установлено, что шанс развития заболевания у носителей «предэкспансии» CAG составляет 3,36 (ДИ 1,1–10,4; $\chi^2 = 4,98$; $p = 0,026$).

Ген DCTN1. У 1 пациента со спорадической формой БАС при панельном NGS-анализе была выявлена мутация G1082A в гене *DCTN1*. Данная замена была подтверждена стандартным прямым секвенированием (рис. 4).

Ген VEGF. Анализ ассоциации БАС с полиморфизмом -2578C/A гена *VEGF* проведен у 192 пациентов; группу сравнения составили 149 клинически здоровых лиц. При оценке распределения аллелей и генотипов по данному локусу в 2 группах были получены статистически значимые различия как для рискового аллеля А ($\chi^2 = 7,14$; $p = 0,008$), так и для рискового гомозиготного генотипа А/А ($\chi^2 = 13,46$; $p = 0,001$).

При анализе ОШ было установлено, что у носителей рискового генотипа А/А шанс развития заболевания в 1,7 раза выше, чем у носителей других аллелей (ДИ 1,05–2,93; $\chi^2 = 4,85$; $p = 0,027$). При этом в подгруппе мужчин у носителей генотипа А/А наблюдалось увеличение шанса развития заболевания до 2,1 раза (ДИ 1,06–4,17; $\chi^2 = 4,7$; $p = 0,03$).

Обсуждение

В настоящей работе нами впервые представлены результаты комплексного молекулярно-генетическо-

Таблица 3. Частота встречаемости аллелей и генотипов в локусе rs69994 гена *VEGF*

Table 3. Allele and genotype incidence rates in locus rs69994 of the *VEGF* gene

| Показатель Parameter | Число пациентов с БАС, n (%) Number of ALS patients, n (%) | Число лиц в группе контроля, n (%) Number of patients in the control group, n (%) | χ^2 | <i>p</i> |
|-------------------------|---|--|----------|----------|
| Аллели Alleles | | | | |
| А | 196 (51,0) | 132 (44,3) | 7,14 | 0,008 |
| С | 188 (49,0) | 166 (55,7) | | |
| Генотипы Genotypes | | | | |
| СА | 82 (42,7) | 74 (49,7) | 13,46 | 0,001 |
| АА | 57 (29,7) | 29 (19,4) | | |
| СС | 53 (27,6) | 46 (30,9) | | |

го анализа невыборочной российской когорты пациентов с БАС. Внимание было сфокусировано на 3 генах (*SOD1*, *C9orf72* и *TARDBP*), признаваемых наиболее значимыми в патогенезе БАС для большинства популяций мира [1]. Был проанализирован вклад *ATXN2* в развитие БАС в российской популяции, поскольку данный ген, наряду с *TARDBP* и *C9orf72*, вовлечен в ключевое звено молекулярного патогенеза БАС – нарушение метаболизма РНК [14, 15]. Гены *ANG* и *VEGF*, кодирующие гипоксия-индуцибельные ангиогенные факторы, привлекают внимание исследователей при разработке подходов к терапии БАС, поскольку эти пептиды являются критическими факторами выживаемости мотонейронов в условиях гипоксии [16, 17].

В данном исследовании суммарная частота обнаруженных в различных генах мутаций у пациентов с БАС составила 9,5 %. При этом мутации были выявлены в 24,0 % случаев семейной формы заболевания (во всех случаях – ген *SOD1*) и в 8,1 % случаев спорадического БАС. Мы наблюдали клиническую и молекулярно-генетическую гетерогенность заболевания как при семейной, так и при спорадической его форме,

поскольку у носителей мутаций отмечены все известные фенотипы БАС.

Частота семейной формы заболевания в нашей когорте пациентов составила 8,8 %, что несколько ниже, чем описано в других европейских популяциях [5, 18]. У всех носителей мутаций, имеющих семейный анамнез заболевания, был обнаружен дефект гена *SOD1*. Мы выявили 9 кодирующих и 3 некодирующие мутации в данном гене. Общая частота мутаций *SOD1* составила 4,6 % для спорадического БАС и возрасла до 6,3 % во всей обследованной когорте пациентов.

В проведенном исследовании было показано, что *C9orf72* является 2-м после *SOD1* по частоте повреждения геном в российской выборке больных с БАС. Частота повреждения в нем составила 1,8 %. Также в данном исследовании в 1,05 % случаев были обнаружены мутации в гене *ANG* и в 0,35 % – в гене *DCTN1*. Выявленные нами частоты мутаций для вышеназванных генов сопоставимы с таковыми для других европейских популяций [19, 20].

В выполненной работе не обнаружены мутации в гене *TARDBP*. Однако выявленные ассоциации развития заболевания с носительством делеции с.715-126delG могут свидетельствовать о вовлечении данного гена в патогенез БАС. В нашей когорте пациентов также наблюдалась ассоциация заболевания с полиморфизмом в гене *VEGF* и носительством промежуточного числа повторов в гене *ATXN2*.

Заключение

Таким образом, в настоящей работе раскрыта молекулярная структура БАС в российской популяции, установлены частота отдельных генетических форм и спектр мутаций, что имеет большое значение для медико-генетического консультирования и профилактики заболевания в отягощенных семьях. Планируемые в дальнейшем молекулярно-генетические исследования российской когорты пациентов с БАС будут включать мутационный скрининг дополнительных генов *FUS*, а также применение стремительно развивающейся технологии полноэкзомного секвенирования, что позволит найти новые мишени для развития терапевтических стратегий БАС.

Конфликт интересов

Авторы статьи заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование исследования

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-04-01662).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ingre C., Roos P.M., Piehl F. Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Epidemiol* 2015;12(7):181–93. DOI: 10.2147/CLEP.S37505. PMID: 25709501.
2. Kenna K.P., McLaughlin R.L., Byrne S. et al. Delineating the genetic heterogeneity of ALS using targeted high-throughput sequencing. *J Med Genet* 2013;50(11):776–83. DOI: 10.1136/jmedgenet-2013-101795. PMID: 23881933.
3. Renton A., Chiò A., Traynor B. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat Neurosci* 2014;17(1):17–23. DOI:10.1038/nn.3584. PMID: 24369373.
4. Rosen D.R., Siddique T., Patterson D. et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993;362(6415):59–62. DOI: 10.1038/362059a0. PMID: 8446170.
5. Kaur S.J., McKeown S.R., Rashid S. Mutant SOD1 mediated pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Gene* 2016;577(2):109–18. DOI: 10.1016/j.gene.2015.11.049. PMID: 26657039.
6. Corrado L., Ratti A., Gellera C. et al. High frequency of TARDBP gene mutations in Italian patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mutat* 2009;30(4):688–94. DOI: 10.1002/humu.20950. PMID: 19224587.
7. Daoud H., Valdmanis P.N., Kabashi E. et al. Contribution of TARDBP mutations to sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Med Genet* 2009;46(2):11–4. DOI: 10.1136/jmg.2008.062463. PMID: 18931000.
8. Liu Y., Yu J.-T., Zong Y. et al. C9orf72 mutations in neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol* 2014;49(1):386–98. DOI: 10.1007/s12035-013-8528-1. PMID: 23934648.
9. Gijssels I., van Langenhove T., van der Zee J. et al. A C9orf72 promoter repeat expansion in a Flanders-Belgian cohort with disorders of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum: a gene identification study. *Lancet Neurol* 2012;11(1):54–65. DOI: 10.1016/S1474-4422(11)70261-7. PMID: 22154785.
10. Majounie E., Renton A.E., Mok K. et al. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol* 2012;11(4):323–30. DOI: 10.1016/S1474-4422(12)70043-1. PMID: 22406228.
11. Brooks B.R., Miller R.G., Swash M. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2000;1(5):293–9. PMID: 11464847.
12. Warner J.P., Barron L.H., Goudie D. et al. A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR. *J Med Genet* 1996;33(12):1022–6. PMID: 9004136.
13. DeJesus-Hernandez M., Mackenzie I.R., Boeve B.F. et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 2011;72(2):245–56. DOI: 10.1016/j.neuron.2011.09.011. PMID: 21944778.
14. Абрамычева Н.Ю., Федотова Е.Ю., Устинова В.В., Алексеев Я.И. Секвенирование нового поколения в диагностике заболеваний, сопровождающихся расстройствами движений. Бюллетень Национального общества по изучению болезни Паркинсона и расстройств движений 2016;(2):16–23. [Abramycheva N.Yu., Fedotova E.Yu., Ustinova V.V., Alekseev Ya.I. Next generation sequencing in diagnostics of diseases accompanied by movement disorders. Bulletin' Natsional'nogo obschestva po izucheniyu bolezni Parkinsona i rasstroystv dvizheniy = Bulletin of the Russian National Society of Parkinson's Disease and Movement Disorders 2016;(2):16–23. (In Russ.)].
15. Caballero-Hernandez D., Toscano M.G., Cejudo-Guillen M. et al. The 'Omics' of amyotrophic lateral sclerosis. *Trends Mol Med* 2016;22(1):53–67. DOI 10.1016/j.molmed.2015.11.001. PMID: 26691296.
16. Benatar M., Boylan K., Jeromin A. et al. ALS biomarkers for therapy development: State of the field and future directions. *Muscle Nerve* 2016;53(2):169–82. DOI: 10.1002/mus.24979. PMID: 26574709.
17. Vijayalakshmi K., Ostwal P., Sumitha R. et al. Role of VEGF and VEGFR2 receptor in reversal of ALS-CSF induced degeneration of NSC-34 motor neuron cell line. *Mol Neurobiol* 2015;51(3):995–1007. DOI: 10.1007/s12035-014-8757-y. PMID: 24880751.
18. Исмаилов Ш.М., Барыкова Ю.А., Шмаров М.М. и др. Экспериментальный подход к генной терапии болезни двигательного нейрона на основе использования генов гипоксия-индуцибельных факторов. Генетика 2014;(5):591–601. [Ismailov S.M., Barykova Yu.A., Shmarov M.M. et al. Experimental approach to gene therapy of motor neuron disease based on hypoxia-inducible factors genes. Genetika = Genetics 2014;(5):591–601. (In Russ.)].
19. Chio A., Calvo A., Mazzini L. et al. Extensive genetics of ALS: a population-based study in Italy. *Neurology* 2012;79(19):1983–9. DOI: 10.1212/WNL.0b013e3182735d36. PMID: 23100398.
20. Greenway M.J., Andersen P.M., Russ C. et al. ANG mutations segregate with familial and 'sporadic' amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 2006;38(4):411–3. DOI: 10.1038/ng1742. PMID: 16501576.
21. Pfister T., Sekhon R., White M. et al. Familial amyotrophic lateral sclerosis in Alberta, Canada. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 2013;14(4):273–7. DOI: 10.3109/21678421.2012.754044. PMID: 23286750.