

УДК: 575.17:575.224:615.5-0566.3

Мутации *R501X* и *2282del4* гена *FLG* у больных аллергодерматозами М.И.Зуева

ГП «Институт дерматологии и венерологии АМН Украины» (Харьков, Украина)
mahaqq@yandex.ru

Был проведен анализ мутаций с потерей функции гена *FLG* у 262 больных аллергодерматозами (атопический дерматит, аллергический дерматит, экзема) и 96 здоровых доноров. Мутация *R501X* была обнаружена у 3,8% больных и 2,1% здоровых доноров. Мутация *2282del4* была обнаружена у 9,9% больных и 1,0% здоровых доноров. Было показано, что мутации с потерей функции (*R501X* и *2282del4*) гена *FLG*, обуславливающие нарушение барьерной функции кожи, приводят к повышенному риску возникновения экземы, атопического и аллергического дерматита.

Ключевые слова: *атопии, аллергодерматозы, экзема, атопический дерматит, мутации, ген FLG.*

Мутації *R501X* та *2282del4* гена *FLG* у хворих на алергодерматози М.І.Зуєва

Був проведений аналіз мутацій з втратою функції гена *FLG* у 262 хворих на алергодерматози (атопічний дерматит, алергічний дерматит, екзема) та 96 здорових донорів. Мутація *R501X* була виявлена у 3,8% хворих і 2,1% здорових донорів. Мутація *2282del4* була виявлена у 9,9% хворих та 1,0% здорових донорів. Було показано, що мутації із втратою функції (*R501X* і *2282del4*) гена *FLG*, що обумовлюють порушення бар'єрної функції шкіри, призводять до підвищеного ризику виникнення екземи, атопічного і алергічного дерматиту.

Ключові слова: *атопії, алергодерматози, екзема, атопічний дерматит, мутації, ген FLG.*

R501X and *2282del4* mutations of *FLG* gene in allergodermatoses patients M.I.Zuyeva

The analysis of loss-of-function mutations in *FLG* gene in 262 patients with allergodermatoses (atopic dermatitis, allergic dermatitis, eczema) and 96 healthy controls has been carried out. Mutation *R501X* has been found in 3.8% of patients and in 2.1% of healthy donors. Mutation *2282del4* has been found in 9.9% of patients and in 1.0% of healthy donors. It has been shown that loss-of-function mutations (*R501X* and *2282del4*) in *FLG* gene, which cause violation of the barrier function of skin, lead to an increased risk of eczema, atopic and allergic dermatitis.

Key words: *atopy, allergodermatoses, eczema, atopic dermatitis, mutations, FLG gene.*

Введение

В последние годы в мире отмечается значительный рост частоты и распространённости аллергических заболеваний кожи, к которым относятся атопический и аллергический дерматиты, экзема. По данным различных авторов аллергодерматозы составляют до 20% всех аллергических заболеваний (Бакстон, 2005). Также наблюдается нарастание тяжести течения и усиление невосприимчивости этих патологий к проводимой терапии. Несмотря на многочисленные исследования, этиология и патогенез аллергодерматозов во многом еще остаются неясными, однако очевидным является то, что кроме влияния внешних факторов, обуславливающих их развитие, важное значение имеет генетическая составляющая. Именно нарушения в генетическом аппарате, скорее всего, и запускают патологический воспалительный процесс в коже. Показано, что особенно высокие показатели генетической предрасположенности к аллергии отмечаются у больных атопическим дерматитом (Бакстон, 2005; Walley et al., 2001; Elias, Schmuth, 2009).

Одним из генов, контролирующим различные процессы в коже, является ген *FLG* (filaggrin), расположенный в хромосоме 1, локус q21.3. Изменения в данном гене вызывают развитие ряда заболеваний, связанных с нарушением барьерной функции кожи (ихтиоз, экзема, атопический дерматит и другие аллергодерматозы) (Hubiche et al., 2007; Meyer-Hoffert, 2009). Данный ген кодирует белок профилагрин (филамент-агрегирующий белок), который является предшественником и позже разрезается протеазами на мономеры филагрина, каждый из которых состоит из 324 аминокислот массой 37 кДа. Профилагрин входит в состав кератогиалиновых гранул кератиноцитов гранулярного

слоя эпителия и выполняет одну из ключевых функций в дифференцировке кератиноцитов и превращении их в ороговевшие чешуйки. Филагрин связывается с цитоскелетом кератиноцитов и участвует в формировании кожного барьера. Кроме того, белок *FLG* после распада на гидрофильные аминокислоты участвует в поддержании водного баланса кожи. Мутации с потерей функции в гене *FLG* приводят к терминации экспрессии белка. Это нарушает барьерную функцию кожи, делает её более чувствительной к воздействию неблагоприятных факторов внешней среды и может приводить к возникновению алергодерматозов (Howell et al., 2007; Palmer et al., 2006; Sandilands et al., 2009). Особое внимание уделяется, в частности, двум мутациям в экзоне 3 гена *FLG* – *2282del4* и *R501X*. Первая – делеция (выпадение четырёх нуклеотидов), приводит к сдвигу рамки считывания. Вторая – транзигция 1501 С/Т, приводит к появлению стоп-кодона на 107 нуклеотидов ниже (Sandilands et al., 2009).

Цель работы – проанализировать наличие мутаций *2282del4* и *R501X* в 3 экзоне гена *FLG* у больных алергодерматозами и здорового населения Харьковской области.

Материалы и методы

Обследованы 262 больных алергодерматозами в возрасте от 16 до 82 лет, находившихся на лечении в отделении дерматологии ГП «Институт дерматологии и венерологии АМН Украины». Среди них больны экземой 177 человек (85 женщин и 92 мужчины), больны atopическим дерматитом 45 (30 женщин и 15 мужчин), больны аллергическим дерматитом 36 человек (25 женщин и 11 мужчин). Контрольную группу составили 96 человек в возрасте от 16 до 80 лет (37 мужчин и 59 женщин) без признаков алергодерматозов. Образцы крови здоровых людей собраны в Харьковском областном центре службы крови. Исследование генотипов по гену *FLG* проводили методом анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Выделение ДНК проводили фенольным методом из лейкоцитов периферической крови по методике (Маниатис и др., 1984). Для выявления мутаций использовали метод ПЦР-ПДРФ. Для выявления мутации *R501X* использовали праймеры (FiiH1F3/RPT1P6): CACGGAAAGGCTGGGCTGA / ACCTGAGTGTCCAGACCTATT. Для выявления мутации *2282del4* использованы праймеры RPT1P7/RPT2P1: AATAAGTCTGGACACTCAGGT / GGGAGGACTCAGACTGTTT (Palmer et al., 2006). Объем амплификационной смеси – 30 мкл. ПЦР проводили с использованием амплификатора «Терцик» (Россия). Для выявления мутации *2282del4* использовали температурный режим: 95°C 30 сек, 57°C 30 сек, 72°C 1 мин. Для выявления мутации *R501X* использовали температурный режим: 95°C 30 сек, 58°C 30 сек, 72°C 40 сек. Фрагмент гена *FLG*, используемый для определения мутации *R501X*, имел длину 312 п.н., для мутации *2282del4* – 811 п.н. Продукты амплификации определяли по результатам электрофореза в 1% агарозном геле. Ампликон *FLG R501X* подвергали воздействию рестриктазы *Hin1II* (NlaIII) (Fermentas, Литва), разрезающей сайт с последовательностью CATG↓. Рестриктазу добавляли в расчёте 3 единицы на 30 мкл смеси после ПЦР. Ампликон *FLG 2282del4* обрабатывали рестриктазой *Adel* (DraIII) (Fermentas, Литва), разрезающей сайт с последовательностью CACNNN ↓ GTG. Рестриктазу добавляли в расчёте 3 единицы на 30 мкл смеси после ПЦР. Для проведения рестрикции образцы инкубировали в течение ночи при 37°C (Palmer et al., 2006). Определение генотипов проводили по результатам электрофореза в 3% агарозном геле. Для определения молекулярной массы фрагментов ДНК использовались стандартные маркеры молекулярного веса (100–1500 п.н.). Гипотезу о равенстве частот аллелей в группах больных и здоровых мужчин и женщин, а также равенстве распределений фактических и теоретических рядов генотипов проверяли с помощью критерия χ^2 на уровне значимости 0,05 (Гланц, 1998).

Результаты и обсуждение

Рестриктаза *Hin1II* (NlaIII) разрезает фрагмент гена *FLG R501X* на 3 или 2 фрагмента в зависимости от наличия или отсутствия мутации. Если мутация присутствует, то ампликон *FLG* разрезается на три фрагмента, а если она отсутствует, то на два фрагмента. Рестриктаза *Adel* (DraIII) не разрезает ампликон *FLG 2282del4*, если во фрагменте нет делеции. При наличии делеции во фрагменте появляется сайт для *Adel*, происходит расщепление ампликона эндонуклеазой, и на электрофореграмме это проявляется в виде появления двух полосок ДНК.

В результате проведённого анализа указанных выше мутаций в гене *FLG* были выявлены рестрикционные фрагменты, принадлежащие трём генотипам – нормальному, гетерозиготному и гомозиготному по исследуемым мутациям (рис. 1, 2).

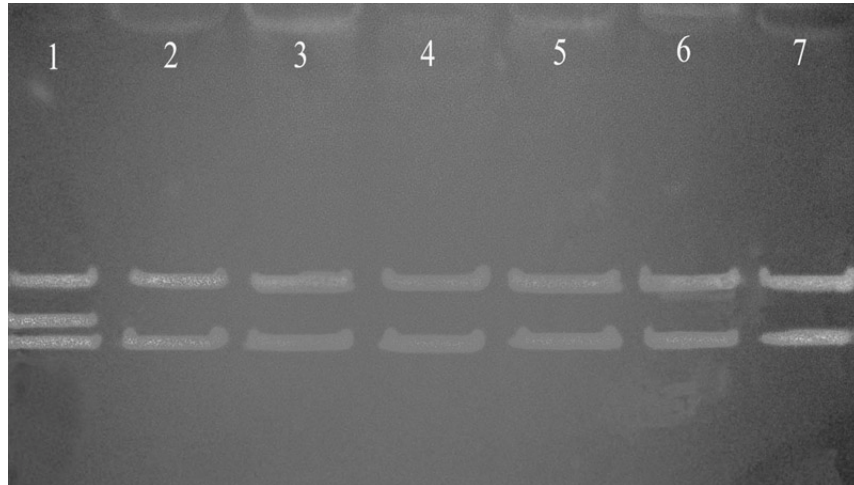


Рис. 1. Электрофореграмма ПЦР-продуктов ДНК семи человек, генотипированных на наличие мутации *R501X* гена *FLG* (1 – гетерозигота по мутации *FLG R501X*; 2–7 – нормальные генотипы)

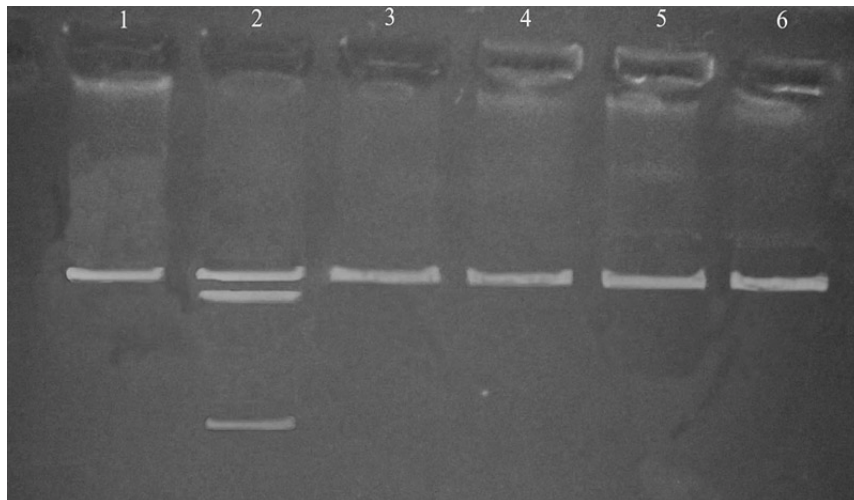


Рис. 2. Электрофореграмма ПЦР-продуктов ДНК шести человек, генотипированных на наличие мутации *2282del4* гена *FLG* (1, 3–6 – нормальные генотипы; 2 – гетерозигота по мутации *FLG 2282del4*)

В контрольной группе мутация *R501X* в гетерозиготном состоянии была обнаружена у одной женщины и одного мужчины (2,1%). Мутация *R501X* в гетерозиготном состоянии чаще встречалась в общей группе больных мужчин (6,8%), мужчин, больных экземой (5,4%), атопическим (13,3%) и аллергическим дерматитами (9,1%) по сравнению с контролем (2,7%, $p < 0,01$). Гомозиготы по данной мутации обнаружены не были (табл. 1).

Мутация *2282del4* в гетерозиготном состоянии в контроле была обнаружена у одного мужчины, что составило по группе в целом 2,7%, а в группе больных мужчин – 1%. Частота этой делеции в гетерозиготном состоянии у больных была в несколько раз выше (табл. 2). В общей группе больных данная мутация встречалась примерно у 10%, а у больных экземой у 6%. Самые высокие показатели наблюдались в группе больных атопическим (40% у мужчин, 17% у женщины, 25% – в целом, $p < 0,01$) и аллергическим (9% – мужчины, 12% – женщины, 11% – в целом, $p < 0,01$) дерматитами.

Кроме того, больной X. (мужчина, 45 лет), у которого присутствовала мутация *2282del4* в гомозиготном состоянии, имел наиболее тяжёлую форму атопического дерматита по сравнению с другими больными (как с мутациями в гетерозиготном состоянии, так и без мутаций).

Таблиця 1.

Распределение генотипов по мутации FLG R501X у больных алергодерматозами и здоровых людей

Группа	Пол	n	Генотипы FLG R501X					
			wt/wt		wt/R501X		R501X/R501X	
			f	%	f	%	f	%
Здоровые	Мужской	37	36	97,3	1	2,7	0	0,0
	Женский	59	58	98,3	1	1,7	0	0,0
	Всего	96	94	97,9	2	2,1	0	0,0
Больные алергодерматозами	Мужской	118	110	93,2	8	6,8	0	0,0
	Женский	144	142	98,6	2	1,4	0	0,0
	Всего	262	252	96,2	10	3,8	0	0,0
Больные экземой	Мужской	92	87	94,6	5	5,4	0	0,0
	Женский	85	83	97,6	2	2,4	0	0,0
	Всего	177	170	96,0	7	4,0	0	0,0
Больные атопическим дерматитом	Мужской	15	13	86,7	2	13,3	0	0,0
	Женский	30	30	100,0	0	0,0	0	0,0
	Всего	45	43	95,6	2	4,4	0	0,0
Больные аллергическим дерматитом	Мужской	11	10	90,9	1	9,1	0	0,0
	Женский	25	25	100,0	0	0,0	0	0,0
	Всего	36	35	97,2	1	2,8	0	0,0

Примечания: n – количество обследованных, f – частота, wt/wt – нормальный генотип, wt/R501X – гетерозигота по мутации R501X, R501X/R501X – гомозигота по мутации R501X.

Таблиця 2.

Распределение генотипов по мутации FLG 2282del4 у больных алергодерматозами и среди здоровых людей

Группа	Пол	n	Генотипы FLG 2282del4					
			wt/wt		wt/2282del4		2282del4/2282del4	
			f	%	f	%	f	%
Здоровые	Мужской	37	36	97,3	1	2,7	0	0,0
	Женский	59	59	100	0	0,0	0	0,0
	Всего	96	95	99,0	1	1,0	0	0,0
Больные алергодерматозами	Мужской	118	105	89,0	12	10,2	1	0,8
	Женский	144	130	90,3	14	9,7	0	0,0
	Всего	262	235	89,7	26	9,9	1	0,4
Больные экземой	Мужской	92	87	94,6	5	5,4	0	0,0
	Женский	85	79	92,9	6	7,1	0	0,0
	Всего	177	166	93,8	11	6,2	0	0,0
Больные атопическим дерматитом	Мужской	15	8	53,3	6	40,0	1	6,7
	Женский	30	25	83,3	5	16,7	0	0,0
	Всего	45	33	73,3	11	24,5	1	2,2
Больные аллергическим дерматитом	Мужской	11	10	90,9	1	9,1	0	0,0
	Женский	25	22	88,0	3	12,0	0	0,0
	Всего	36	32	88,9	4	11,1	0	0,0

Примечания: n – количество обследованных, f – частота, wt/wt – нормальный генотип, wt/2282del4 – гетерозигота по мутации 2282del4, 2282del4/2282del4 – гомозигота по мутации 2282del4.

Таким образом, гетерозиготы по мутациям 2282del4 и R501X значительно чаще встречались в группе больных. Это может свидетельствовать о том, что наличие этих двух мутаций с потерей функции гена повышает риск возникновения алергодерматозов. Наличие данных мутаций может

являться діагностическим критерієм виявлення предрасположенности к atopическому и аллергическому дерматитам и экземе.

Благодарности

Автор выражает благодарность заведующей отделением дерматологии, кожных и паразитарных болезней ГП «Институт дерматологии и венерологии АМН Украины» канд. мед. наук В.В.Савенковой и главному врачу Харьковского областного центра службы крови В.В.Яворскому за содействие в проведении исследования.

Список литературы

- Бакстон П. Дерматология. – М.: Бином, 2005. – С. 29–38. /Bakston P. Dermatologiya. – М.: Binom, 2005. – S. 29–38./
- Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1998. – 459с. /Glants S. Mediko-biologicheskaya statistika. – М.: Praktika, 1998. – 459s./
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы геной инженерии. Молекулярное клонирование / Пер. с англ. – М.: Мир, 1984. – 480с. /Maniatis T., Frich E., Sembruk Dzh. Metody gennoy inzhenerii. Molekulyarnoye klonirovaniye / Per. s angl. – М.: Mir, 1984. – 480s./
- Elias P.M., Schmuth M. Abnormal skin barrier in the etiopathogenesis of atopie dermatitis // Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. – 2009. – Vol.9, №5. – P. 437–446.
- Howell M., Eui Kim B., Gao P., Audrey V. Cytokine modulation of atopie dermatitis filaggrin skin expression // J. Allergy Clin. Immunol. – 2007. – №7. – P. 150–155.
- Hubiche T., Ged C., Benard A., Léauté-Labrèze C. et al. Analysis of SPINK 5, KLK 7 and FLG genotypes in a French atopie dermatitis cohort // Acta Derm. Venereol. – 2007. – Vol.87, №6. – P. 499–505.
- Meyer-Hoffert U. Reddish, scaly, and itchy: how proteases and their inhibitors contribute to inflammatory skin diseases // Arch. Immunol. Ther. Exp. – 2009. – Vol.52, №8. – P. 345–354.
- Palmer C.N., Irvine A.D., Terron-Kwiatkowski A., Zhao Y. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopie dermatitis // Nat. Genet. – 2006. – Vol.38, №2. – P. 441–446.
- Sandilands A., Sutherland C., Irvine A.D., McLean W.H. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease // J. Cell Sci. – 2009. – Vol.122, №9. – P. 1285–1294.
- Walley A.J., Chavanas S., Moffatt M.F. Gene polymorphism in Netherton and common atopie disease // Nat. genetics. – 2001. – Vol.29, №2. – P. 175–178.

Представлено: С.І.Похил / Presented by: S.I.Pokhyl
Рецензент: В.В.Навроцька / Reviewer: V.V.Navrotskaya
Подано до редакції / Received: 20.04.2011.