

# Результаты ДНК-диагностики наследственной нейропатии с подверженностью параличам от сдавления с использованием новой медицинской технологии «Способ детекции числа копий гена PMP22»

Булах М.В., Щагина О.А., Миловидова Т.Б., Поляков А.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр»,  
Москва, 115478, ул. Москворечье, д. 1, e-mail: polyakov@med-gen.ru

Наследственная нейропатия с подверженностью параличам от сдавления (ННПС) – заболевание из группы наследственных полинейропатий, обусловленное мутациями гена *PMP22*. Наиболее частой причиной болезни является делеция гена, на долю которой приходится не менее 70% случаев ННПС. Разработана и внедрена в практическую деятельность ФГБНУ «МГНЦ» новая медицинская технология, позволяющая определить количество копий всех кодирующих экзонов гена *PMP22* на основе мультиплексной проба-зависимой лигазной реакции с последующей амплификацией. Показана эффективность использования данной технологии для поиска делеций и дупликаций. Проведено исследование числа копий экзонов гена *PMP22* у 110 неродственных пробандов, направленных на диагностику ННПС в лабораторию ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ» с 1997 по 2016 гг.

**Ключевые слова:** наследственная нейропатия с подверженностью параличу от сдавления, *PMP22*, мультиплексная лигазная реакция

## Введение

ННПС относится к группе наследственных нейропатий. Манифестация заболевания обычно приходится на вторую-третью декаду жизни, однако описаны случаи манифестации и в раннем детском возрасте, и после 70 лет [1–3]. В основе данного заболевания лежит повышенная чувствительность периферических нервов к сдавлению, что проявляется повторяющимися эпизодами компрессионных нейропатий. Провоцирующие факторы развития параличей при ННПС неспецифичны и однотипны для всех компрессионных нейропатий: мелкие травмы, длительное нахождение в одной позе при выполнении физической работы или за письменным столом, ношении тяжелого рюкзака, наложении гипса, беременность и т.д. Однако, в отличие от ненаследственных компрессионных нейропатий, при ННПС парез возникает после непродолжительного воздействия провоцирующего фактора, симптоматика носит более стойкий характер и имеет склонность к повторению [1, 3, 4]. При электронейромиографическом исследовании вне зависимости от наличия или отсутствия клинических признаков заболевания выявляют билатеральное увеличение дистальной моторной латенции, коррелирующее с замедлением проведения импульса по чувствительным волокнам срединного нерва на ладонно-запястном уровне, а также изменение хотя бы одного показателя (дистальной латенции или скорости проведения) при исследовании малоберцового нерва. Морфологическим субстратом ННПС являются особые «колбасообразные» утолщения миелиновой оболочки — томакулы, обнаруживаемые как в чувствительных, так и в двига-

тельных нервах; отсюда происходит второе название ННПС — «томакулярная невропатия» [1, 4, 5].

ННПС является следствием функциональной потери одной из копий гена *PMP22*. Наиболее частой причиной этой потери является субмикроскопическая делеция на хромосоме 17p11.2-p12, включающая в себя ген белка периферического миелина *PMP22*. По данным различных источников она обуславливает не менее 70% всех молекулярно-генетически подтвержденных случаев ННПС [3, 6]. Данная делеция образуется на хромосоме 17 реципрокно дупликации, являющейся причиной наследственной моторно-сенсорной нейропатии IA типа (НМЧН1А). Два высокогомологичных участка размером примерно 30 т.п.н., представляющих собой внегенные повторяющиеся палиндромные последовательности (НМЧН1А-REPs, repetitive extragenic palindroms), flankируют регион размером 1,5 млн п.н., дуплицированный при НМЧН1А и делеции при ННПС. Гомология между дистальным и проксимальным REPs составляет 98%. Таким образом, причиной возникновения НМЧН1А-дупликации/ННПС-делеции является неравный кроссинговер.

Только в 10% случаев выявляется делеция *de novo*, происходящая, как правило, в гаметогенезе отца [5, 6]. В большинстве семей один из родителей является бессимптомным носителем данной мутации или имеет минимальные признаки заболевания. Часто семейный характер данной болезни можно установить только при углубленном неврологическом обследовании всех членов семьи с применением электронейромиографических методов, подтверждающих поражение миелиновой

оболочки [1, 4, 5] Этот факт, как и рекурентный характер течения заболевания, является одной из причин того, что, несмотря на домinantный характер наследования, больные с ННПС сравнительно редко попадают в поле зрения врача-генетика.

Примерно 70–80% случаев ННПС не диагностируют или диагностируют неправильно из-за отсутствия или стертости симптомов. Даже в пределах одной семьи может наблюдаться существенный клинический полиморфизм нейропатии [1, 7]. В то же время существуют высокоэффективные превентивные профилактические мероприятия, позволяющие избежать осложнений при своевременной постановке диагноза. Это делает особенно актуальной задачу разработки диагностического протокола, позволяющего быстро и без семейного анализа исследовать наиболее частую причину ННПС — делецию гена *PMP22*, на долю которой приходится не менее 70% случаев этой нейропатии.

### Материалы и методы

Из базы лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ» отобраны образцы ДНК 110 неродственных пробандов, направленных на диагностику ННПС с 1997 по 2016 гг.

ДНК выделена из цельной крови, забранной в пробирку с антикоагулянтом ЭДТА с помощью набора реагентов для выделения Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA) по протоколу производителя.

Для определения числа копий гена *PMP22* была разработана система, в основе которой лежит мультиплексная проба-зависимая лигазная реакция с последующей амплификацией (Multiplex ligation-dependent probe am-

plification, MLPA), представленная впервые в 2002 г. компанией-разработчиком MRC-Holland.

Дизайн олигонуклеотидных проб для лигирования, универсальных праймеров, включая FAM-меченный праймер, осуществлен в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ», синтез в НПО «Синтол» и ЗАО «Евроген», Москва.

Последовательности проб, входящих в реакцию, выбирали согласно базе данных GeneBank. Использованы последовательности всех кодирующих экзонов гена *PMP22*, а также последовательности генов *TBP*, *B2M*, *SIRT3* и *USP3*, выбранных в качестве внутренних контролей (табл. 1).

Лигазную реакцию проводили на программируемом плашечном термоциклире DNA EngineTetrad 2 Cycler («Bio-Rad») с использованием ДНК-лигазы *Pfu* («Stratagene»).

Лигирование проводили в 5 мкл реакционной смеси, содержащей 1x реакционный буфер (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Igepal, 0,01 mM rATP, 1 mM DTT), 26 специфических проб, 0,04 единицы активности термофильной ДНК-лигазы, 0,1–1 мкг геномной ДНК.

Лигазную реакцию осуществляли в следующем режиме: первоначальная денатурация при 95°C — 5 минут, затем лигирование при 62°C — 3 часа.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на программируемом плашечном термоциклире DNA Engine Tetrad 2 Cycler («Bio-Rad») с использованием ДНК-полимеразы Biotaq («БиоМастер») и пары универсальных праймеров, один из которых мечен FAM (табл. 2).

ПЦР проводили по следующей схеме: в 15 мкл реакционной смеси, содержащей 1x реакционный буфер (67 mM Tris-HCl, 16,6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01% Twin-20), 0,25 мКМ каждого олигопраймера, 250 мКМ каждого

Таблица 1

### Пробы и условия лигирования, применявшиеся для анализа числа копий гена *PMP22*

Фрагмент	Последовательность проб 5' → 3'	Размер, п.н.	t гибридизации
mPMP22 2R mPMP22 2F	GTCGTACGTGAATCGCGTACGCTCCTCTGTGCTGAGTATCATC GTCCTCCACGTGCGGGATGCGATCCGATGCCATCATG	87	62°C
MPMP22 3F MPMP22 3R	CTCTCCTCAGGAAATGTCCACCACTttttatgtGATGCGATCCGATGCCATCATG GTCGTACGTGAATCGCGGTACCTGATCTCTGGCAGAACTGTAGCAC	103	62°C
mPMP22 4F mPMP22 4R	GTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTATCCAGGCCACCATGATCCTGTC GATCATCTTCAGCATTCTGTCTCTGTTCCGATGCGATCCGATGCCATCATG	100	62°C
mPMP22 5R mPMP22 5F	GTCGTACGTGAATCGCGGTACGCATCTCAACTCGGATTACTCCTACG GTTTCGCCTACATCCTGGCCTGGATGCGATCCGATGCCATCATG	92	62°C
MLPSIRT 3R MLPSIRT 3F	GTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATTATCTGTGGGTGCTTCAAGTGTGTTG GAAGTGGAGGCAGCAGTGACAAGCTTATAATTGATGCCGATGCCATCATG	110	62°C
MLPUSP 3F MLPUSP 3R	GTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATTGATGCCGATGCCATCATG CATAAGAAAATCAGAAAAGCAAGATAAAGTCAGCACGTTATTGATGCCGATGCCATCATG	126	62°C
TBPMPLP F TBPMPLP R	CCACCAACAATTAGTAGGTAAGTCTGAAAGGATGCGATCCGATGCCATCATG GTCGTACGTGAATCGCGGTACGGTTAGAACGGCCATTGTGCTCAC	97	62°C
MLPB2M F MLPB2M R	GTCGTACGTGAATCGCGGTACCATATTACCTTATTTCAATTATGGATGAGTATGCCCTGCCGTGAA C CATGTGACTTTGTCACGCCAAGGTTTATTCATTTATAATTGATGCCGATGCCATCATG	147	62°C

Таблица 2

## Праймеры и условия амплификации применяющиеся для ПЦР-реакции в методе MLPA

Последовательность праймеров, 5' → 3'	t отжига
F: GTTCGTACGTGAATCGCGGTAC	
R: CATGAAGGCATCGGATCGCATC	66°C

Таблица 3

## Интерпретация результатов (Coffalyser V8, MRC-Holland)

	0 копий	1 копия	2 копии	3 копии	4 копии
Полученное отношение	0–0,3	0,3–0,7	0,7–1,3	1,3–1,7	1,7–2,3

дезоксиинукулеозидтрифосфата, 1,5 единицы термофильной ДНК-полимеразы, добавляли 5 мкл лигата.

ПЦР проводили в следующем режиме: первоначальная денатурация при 95°C — 5 минут, затем 25 циклов смены температур: 94°C — 2 с, температура отжига праймеров 66°C — 2 с, элонгация цепи 72°C — 2 с; заключительная элонгация 72°C — 7 мин. Для проведения ПЦР использовали режим точной регуляции.

Продукт реакции детектировался методом фрагментного анализа на приборе ABI Prism 3130 («Applied Biosystems»).

Полученная методом фрагментарного анализа электрофорограмма представляет собой паттерн сигналов, соответствующих пробам, входящим в систему. Уже при визуальной оценке в образцах с гомозиготной делецией можно увидеть отсутствие «пиков», соответствующих делецированным экзонам.

Для точного количественного анализа данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Coffalyser V8 предоставляемого компанией-разработчиком MLPA (<http://mrc-holland.com>).

Полученные числовые значения представляют собой нормализованное отношение BR (balance ratio) между соотношением параметров (площадь пика) анализируемых проб экзонов гена *PMP22* в образце ДНК пробанда к параметрам референсных генов в этом образце и соотношением параметров (площадь пика) анализируемый проб экзонов гена *PMP22* в образце ДНК здорового контроля к параметрам референсных генов в этом образце. Эти значения распределяются по известным интервалам, которые соответствуют тому или иному числу копий генов (табл. 3).

## Результаты и обсуждение

Всем пробандам было проведено исследование с использованием новой медицинской технологии «Способ детекции числа копий гена *PMP22*». На рис. 1 и 2 представлен пример визуализации результатов количественной детекции числа копий гена *PMP22* методом капиллярного электрофореза и математической обработки результатов с использованием программного обеспечения Coffalyser V8.

В результате анализа у 32 пробандов выявлена одна копия всех экзонов гена *PMP22*, у 72 — две копии и у шести — три копии. Таким образом, диагноз ННПС был подтвержден у 29% пробандов. Еще у 5% больных была выявлена причина полинейропатии — дупликация гена *PMP22*, которая ответственна за развитие НМЧН1А.

Процент выявленных делеций оказался существенно ниже ожидаемого. По данным литературы, делеции региона 17p11.2, включающего последовательность гена *PMP22*, являются причиной не менее чем 70% случаев наследственной ННПС. Необходимо отметить, что семейный анамнез был известен лишь для малого числа пробандов из исследованной выборки. Больные родственники с ННПС имелись в родословных у 10 неродственных пробандов. В группе больных с семейным анамнезом нейропатии делеция экзонов 2–5 гена *PMP22* была выявлена у 8 из 10 неродственных пробандов. Полученные результаты, по-видимому, являются следствием присутствия в исследованной выборке большого числа фенокопий ННПС и в очередной раз доказывают трудности дифференциальной диагностики компрессионных мотонейропатий на клиническом этапе обследования.

Присутствие в выборке больных с дупликацией гена *PMP22* связано с высоким клиническим полиморфизмом НМЧН1А типа и наличием перекрывающихся фенотипов прогрессирующей полинейропатии в группах пациентов с ННПС и НМЧН1А.

Впервые в России разработана новая количественная методика анализа всех экзонов гена *PMP22*, ответственного за развитие НМЧН1А и ННПС, на основе мультиплексной проба-зависимой лигазной реакции с последующей амплификацией, позволяющая определять абсолютное число копий экзонов гена *PMP22*.

Показана эффективность использования новой медицинской технологии для определения числа копий экзонов гена *PMP22*. Точность детекции числа копий генов выше, чем у других существующих на сегодняшний день количественных методик. Система позволяет не только выявить делецию при ННПС, но и определять наличие 3 и более копий гена, что важно для диагностики НМЧН1А.

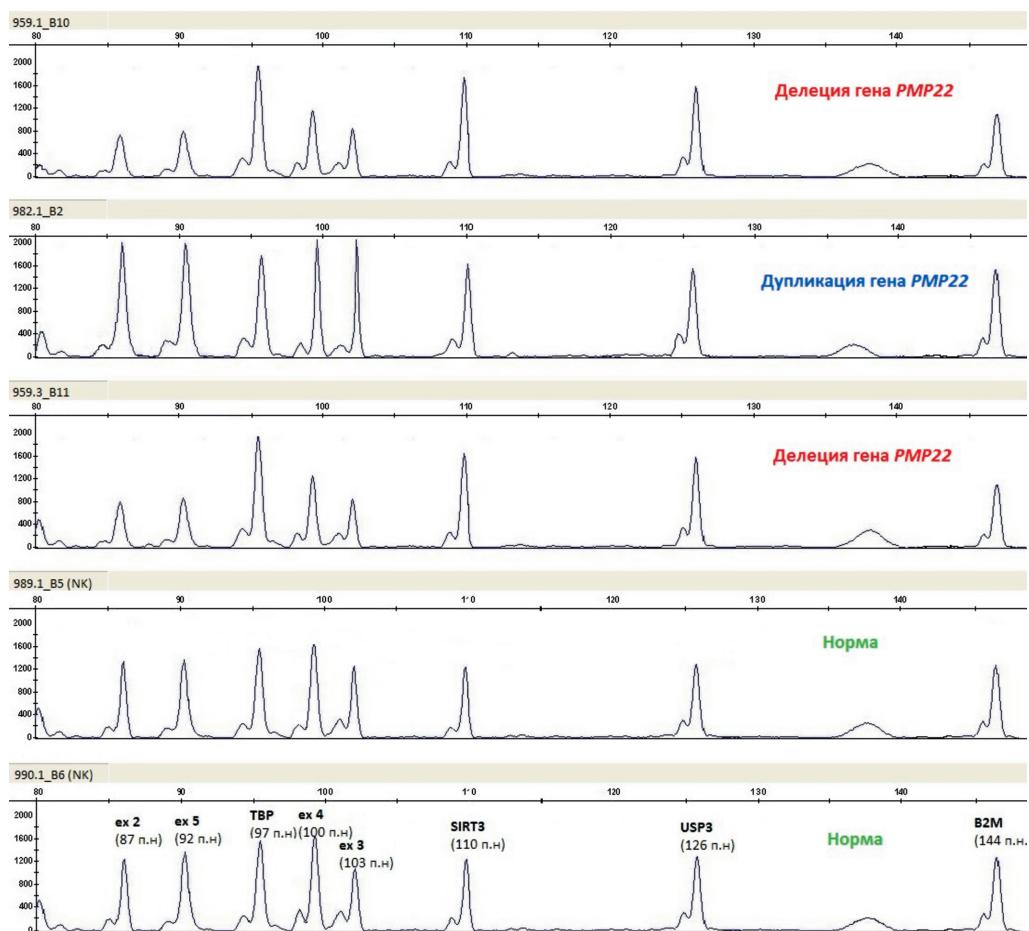


Рис. 1. Фрагментный анализ продукта реакции MLPA на приборе ABI Prism 3130 («Applied Biosystems»). На электрофорограммах визуализирован паттерн сигналов, в котором каждый пик соответствует последовательностям экзонов 2–5 гена PMP22 и референсных генов TBP, USP3, SIRT3, B2M для различных генотипов, выявленных у пробандов.

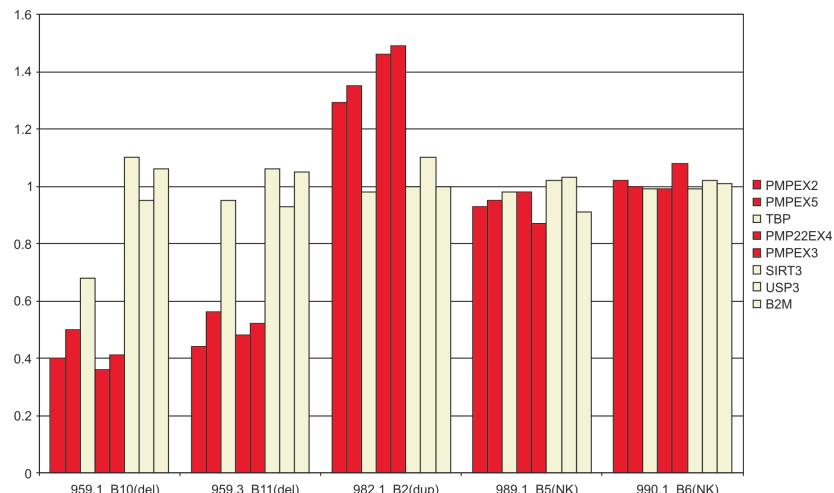


Рис. 2. Результаты обработки числовых параметров фрагментного анализа продуктов реакции количественного MLPA, выполненных программным обеспечением Coffalyser V8.

Столбчатые диаграммы характеризуют количество копий гена PMP22 в образцах ДНК пробандов; высота каждого столбца в диаграмме соответствует числу копий отдельных экзонов гена PMP22, а также референсных генов. Делеция определяется диапазоном значений по оси Y от 0 до 0,3, одна копия — от 0,3 до 0,7, две копии — от 0,7 до 1,3, три копии — от 1,3 до 1,7, четыре копии — 1,7–2,3. Диаграмма 959.1\_B10 — делеция гена PMP22; диаграмма 959.3\_B11 — делеция гена PMP22; диаграмма 982.1\_B2 — дупликация гена PMP22; диаграммы 989.1\_B5 и 990.1\_B6 — нормальное количество копий гена PMP22.

Новая методика может быть использована для ДНК-диагностики, в том числе и пренатальной, НМЧН и ННПС. Показаниями для использования технологии «Способ детекции числа копий гена *PMP22*» являются:

1. Диагностика НМЧН1A;
2. Диагностика ННПС;
3. Диагностика бессимптомного носительства deleций *PMP22* у родственников больного;
4. Пренатальная диагностика.

Противопоказания для использования новой медицинской технологии отсутствуют.

Использование этого метода сделает более эффективным медико-генетическое консультирование отягощенных семей. Становится возможным проведение диагностики ННПС без использования материала родственников больного, выявление частичных deleций и дупликаций гена *PMP22*.

Результаты данного исследования доказывают, что на сегодняшний день наиболее точным и адекватным методом обследования больных с клиническими признаками ННПС является ДНК-диагностика.

### Список литературы

1. Савицкая Н.Г., Илларионшкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А. и др. Клинико-электрофизиологический анализ семейных случаев наследственной невропатии с предрасположенностью к параличам от сдавления. Неврологический вестник. 2001; XXXIII (3-4): 5-9.
2. Chance PF. Overview of hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. Ann.N.Y.Acad.Sci. 1999; (14): 14-21.
3. Dubourg O, Mouton P, Brice A, et al. Guidelines for diagnosis of hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. Neuromuscul Disord. 2000; 10(3): 206-208.
4. Verhagen WI. Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies: a clinical, electrophysiological and morphologic study. J. Neurol. Sci. 1993; (116): 176-184.
5. Mouton P, Tardieu S, Gouider R, et al. Spectrum of clinical and electrophysiologic features in HNPP patients with the 17p11.2 deletion. Neurology. 1999; (52): 1440-1446.
6. Nelis E, Van Broekhoven C, De Jonghe P et al. Estimation of the mutation frequencies in Charcot-Marie-Tooth disease type 1 and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies: European collaborative study. Eur. J. Hum. Genet. 1996; (4):25-33.
7. Del Colle R, Fabrizi GM, Turazzini M, et al. Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies: electrophysiological and genetic study of a family with carpal tunnel syndrome as only clinical manifestation. Neurol Sci. 2003 Jun; 24(2):57-60.

### Информация о конфликте интересов

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

## Results of the hereditary neuropathy with liability to pressure palsies DNA-diagnostics with utilizing the new medical technology «The method for detection of the *PMP22* gene copy number»

Bulakh M.V., Shchagina O.A., Milovidova T.B., Polyakov A.V.

Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics»,  
115409, Moscow, Moskvorechie 1, e-mail: polyakov@med-gen.ru

Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies (HNPP) belongs to hereditary polyneuropathies disease group which caused by mutations in the *PMP22* gene. The gene deletion is the most frequent cause of this disease and it amounts no less than 70 % of all HNPP. Quantification of the copy number of all *PMP22* encoding exons is the novel medical technology based on MLPA with the subsequent amplification which has been designed and implemented in practical activities in Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics» (FSBI «RCMG»). The efficacy of using this technology has been determined for detection of deletions and duplications. The quantitative analyze of the *PMP22* exons copy number was applied to 110 unrelated individuals with the HNPP diagnosis who were directed to the DNA-laboratory in FSBI «RCMG» since 1997 till 2016 years.

**Key words:** hereditary neuropathy with liability to pressure palsies, *PMP22*, MLPA