

Молекулярно-генетический анализ врожденной мерозин-дефицитной мышечной дистрофии в России

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

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»

Врожденные мышечные дистрофии (ВМД) представляют собой генетически гетерогенную группу заболеваний, основным клиническим проявлением которых является синдром «вялого» ребенка, характеризующийся мышечной слабостью, возникающей сразу после рождения или в первые шесть месяцев жизни. Наиболее частой среди ВМД является мерозин-дефицитная мышечная дистрофия, обусловленная мутациями в гене *LAMA2*. В настоящей работе представлены результаты молекулярно-генетического анализа гена *LAMA2* у 29 неродственных пациентов с направительным диагнозом ВМД. Описан спектр мутаций гена *LAMA2* у российских больных. Детектированы новые аллельные варианты гена *LAMA2*: с.6992+1G>T, с.3829C>T, с.5422C>T, с.6406C>T, с.7888C>T, с.172T>C, с.3dupG, с.4254insCCAT, с.4665dupG, с.7308insGATTGGCTATATCAATTGTATCTATA и с.7701delTinsGTGTCCCTAGGTGTCCCTA. Показан эффект основателя для самой частой в России мутации гена *LAMA2* — с.7536delC, определен наиболее вероятный предковый гаплотип для хромосом с данной мутацией.

Ключевые слова: ВМД1А, ген *LAMA2*, частая мутация с.7536delC, эффект основателя.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Molecular genetic analysis of congenital merozin-negative muscular dystrophy in Russia

Milovidova T.B., Bulach M.V., Schagina O.A., Polyakov A.V.

Federal State budgetary institution «Research centre for medical genetics»

Congenital muscular dystrophy (CMD) is a genetically heterogeneous group of diseases, the main clinical manifestation of which is the «floppy» child syndrome, characterized by muscle weakness that occurs immediately after birth or during the first six months of life. The merozin-deficiency muscular dystrophy, caused by mutations in the *LAMA2* gene, is the most common form of CMD. This paper presents results of molecular genetic analysis of the *LAMA2* gene in 29 unrelated patients with CMD. The spectrum of *LAMA2* gene mutations in Russia is described. New allelic variants of the *LAMA2* gene have been detected: с.6992+1G>T, с.3829C>T, с.5422C>T, с.6406C>T, с.7888C>T, с.172T>C, с.3dupG, с.4254insCCAT, с.4665dupG, с.7308insGATTGGCTATATCAATTGTATCTATA and с.7701delTinsGTGTCCCTAGGTGTCCCTA. The founder effect for the most frequent in Russia mutation of the *LAMA2* gene — с.7536delC is shown, the most probable ancestral haplotype for chromosomes with this mutation is determined.

Key words: CMD1A, *LAMA2* gene, frequent mutation с.7536delC, founder effect.

Введение

Мерозин-дефицитная мышечная дистрофия в зависимости от клинических проявлений и возраста манифестации подразделяется на две группы: врожденная мерозин-дефицитная мышечная дистрофия (ВМД1А) с классическим фенотипом и более мягкой мышечная дистрофия с манифестацией в более позднем детском возрасте [1]. К развитию обоих фенотипов приводят рецессивные мутации в гене *LAMA2*, расположенного на хромосоме 6q22-23 и состоящего из 65 экзонов [2]. Этот ген кодирует $\alpha 2$ -цепь ламинина-211, внеклеточного гликопротеина, экспрессирующегося преимущественно в базальной мембране скелетных мышечных волокон, в нервно-мышечных синапсах и шванновских клетках [3, 4], что определяет специфичность его функционирования: посредством $\alpha 2$ -цепи происходит взаимодействие с дистрогликановым комплексом сарколеммы, ко-

торый, в свою очередь, взаимодействует с компонентами дистрофина и кальвеолином [5] (рисунок).

Вследствие такого сложного взаимодействия белков дистрофин-гликопротеинового комплекса повреждение генов, кодирующих любой из них, приводит к развитию сходных клинических симптомов, объединенных общим понятием — врожденная мышечная дистрофия (ВМД). В целом, распространенность всех форм ВМД составляет, по данным различных авторов, 0,7—2,5 на 100 000 населения. ВМД1А представляет собой наиболее частую форму врожденных мышечных дистрофий в западных странах, на ее долю приходится от 30 до 50% всех случаев ВМД [1, 4, 6, 7]. Частота заболевания ВМД1А в России определена в нашей предыдущей работе и составляет 1 на 83 000 новорожденных [8]. Типичные клинические признаки включают тяжелую гипотонию, ассоциированную с мышечной слабостью, проявляющейся при рождении или в раннем младенчестве, контрактуры проксималь-

ных суставов, повышенный уровень креатинкиназы (КК), аномалии белого вещества головного мозга и задержку моторного развития [1, 9, 10]. Проблемы с глотанием и респираторная недостаточность являются наиболее частыми осложнениями при ВМД1А, требующими гастростомии и/или искусственной вентиляции легких [11]. Другие клинические особенности, такие, как сердечная недостаточность, сенсорная и моторная демиелинизирующая нейропатия, эпилепсия и умственная отсталость были также описаны в некоторых случаях мерозин-дефицитной мышечной дистрофии с поздней манифестацией [12–14]. Считалось, что важным диагностическим признаком ВМД1А является отсутствие экспрессии ламинина- $\alpha 2$ при иммуногистохимическом (ИГХ) анализе скелетных мышц. Однако в последнее время появились данные о нормальной или частично сниженной экспрессии белка при ИГХ у пациентов, имеющих мутации в гене *LAMA2*. Подобные случаи мерозин-дефицитной мышечной дистрофии расширяют фенотипический спектр болезни, создавая при этом дополнительные трудности в дифференциальной диагностике мерозин-дефицитной мышечной дистрофии от других форм ВМД [15, 16].

ВМД1А наследуется по аутосомно-рецессивному типу, и для подтверждения соответствующего диагноза у больного с ВМД необходимо выявление двух мутаций в гене *LAMA2*. Сложность исследования данного гена заключается в трудоемкости, длительности и дороговизне. До настоящего момента в России не проводилось исследование гена *LAMA2* на большой выборке пациентов, отсутствуют данные о характерном для российских больных спектре мутаций.

Материалы и методы

В исследование вошли 29 пациентов с классическим фенотипом ВМД (синдром вялого ребенка и возраст манифестации заболевания до 6 месяцев) из разных регионов России. Популяционную выборку составила ДНК 18 здоровых россиян, не являющихся родственниками больных с ВМД1А.

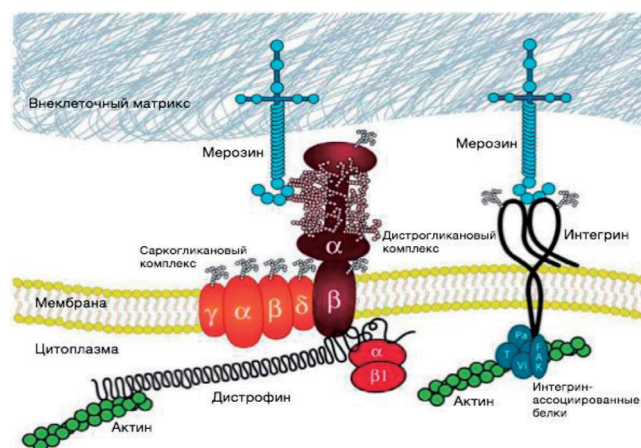
Выделение геномной ДНК из лейкоцитов периферической крови было выполнено с использованием стандартного набора реактивов *DIAtom™ DNA Prer100* (Isogene Lab.ltd., Россия) по протоколу производителя. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на программируемом термоциклере *MC2* производства фирмы «ДНК-технология» (Россия) с использованием ДНК-полимеразы *Viotaq* («Биомастер») в объеме 25 мкл реакционной смеси. 29 пациентам анализ гена *LAMA2* проводился методом прямого автоматического секвенирования по Сенгеру, как с прямого, так и с обратного праймеров, на приборе *ABI Prism 3100* (Applied Biosystems) с использованием протокола фирмы производителя. В качестве матрицы для секвенирования использовали фрагменты ДНК, полученные после проведения ПЦР с использованием оригинальных олиго-

нуклеотидных праймеров, которые синтезировались в НПФ «Литех» или НПО «SYNTOL». Анализ результатов секвенирования осуществлялся с использованием программ *Chromas* и *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

При исследовании повторяющейся мутации в гене *LAMA2* для построения гаплотипов хромосом были использованы четыре высокополиморфных микросателлитных маркера, расположенных в интервале 3,2 сМ (4,4 млн п.н.) в стороны теломеры и центромеры от мутации *c.7536delC* гена *LAMA2*: *D6S406*, *D619658*, *D6S1040* и *D6S1620* (Marshfield genetic linkage maps). Анализ производился методом ПЦР-ПДАФ с использованием оригинальных праймеров.

Результаты

Данные подробного клинического обследования были доступны только по 21 пациенту, прошедшему генетическое консультирование в ФГБНУ «МГНЦ». Клинические проявления у всех больных манифестировали с рождения и до шести месяцев в виде диффузной мышечной гипотонии и сухожильной арефлексии. Самостоятельных навыков хождения не наблюдалось ни у одного из обследованных пациентов. Множественные контрактуры возникали с рождения и до полугода жизни больных. Уровень КК в сыворотке крови обследо-



Дистриофин-гликопротеиновый комплекс по Mendell JR с соавт. с изменениями [5]. В цитоплазме мышечного волокна N-терминальный конец дистриофина связывается с цитоскелетом актина, в то время как богатая цистеином C-терминальная область дистриофина связывается с мембраной через дистриогликановый комплекс. Дистриогликановый комплекс состоит из β -дистриогликана, являющегося трансмембранным белком, и α -дистриогликана, представляющего собой высокогликозилированный внеклеточный мембранный белок. Несколько G-доменов мерозина посредством α -дистриогликана образуют комплекс от экстрацеллюлярного матрикса через мембрану к актиновому цитоскелету. Одним из компонентов внеклеточного матрикса является белок коллагена VI типа. Сарколемма дополнительно связана с интегрином- $\alpha 7\beta 1$, который, в свою очередь, ассоциирован с G-доменами мерозина, и таким образом связывает внеклеточный матрикс с актиновым цитоскелетом через интегрин-ассоциированные белки.

ванных пациентов в основном был значительно повышен, однако не превышал 2500 ед/л на первом году жизни. На всех предоставленных снимках магнитно-резонансной томографии (МРТ) было выявлено усиление МР-сигнала от перивентрикулярного и подкоркового белого вещества головного мозга. Однако у обследованных больных не наблюдались ни умственная отсталость, ни очаговая неврологическая симптоматика. Такие изменения являются важной и характерной особенностью ВМД1А.

В результате прямого автоматического секвенирования всего гена у 23 (79% всех случаев) из 29 больных была выявлена хотя бы одна мутация в гене *LAMA2*: у 19 больных выявлены две мутации, у четырех больных —

одна мутация. У шести пробандов мутации выявлено не было. Все выявленные в ходе данного исследования мутации представлены в табл. 1. Ссылки на источники в таблице даны по международным базам данных The Human Gene Mutation Database (HGMD) и Leiden Open Variation Database (LOVD) — для патогенного варианта с.7536delC.

Из 25 выявленных мутаций 14 были описаны ранее, 11 мутаций выявлены в ходе исследования впервые, а именно:

- мутация сайта сплайсинга: с.6992+1G>T, приводящая к исчезновению донорного сайта сплайсинга;
- нонсенс-мутации: с.3829C>T, с.5422C>T, с.6406C>T, с.7888C>T, приводящие к синтезу укороченного функционально неполноценного белка;

Таблица 1

Спектр мутаций гена *LAMA2* (NM_000426.3) у российских больных

№	Экзон/интрон	Мутация гена <i>LAMA2</i>	Эффект в белке	Число хромосом	Домен белка	Источник
1	1	с.3dupG	p.Pro2Alafs*48	1	VI	Данное исследование
2	2	с.172T>C	p.Cys58Arg	1	VI	Данное исследование
3	2i	с.283+1G>A	Исчезновение донорного сайта сплайсинга	1	VI	CS102090
4	14	с.2049_2050delAG	p.Arg683Serfs*21	3	IVb	CD982727
5	16	с.2230C>T	p.Arg744*	1	IIIb	CM130400
6	23	с.3283C>T	p.Arg1095*	1	IIIb	CM151370
7	26	с.3829C>T	p.Arg1277*	1	IVa	Данное исследование
8	27	с.4048C>T	p.Arg1350*	1	IVa	CM102055
9	29	с.4254insCCAT	p.Cys1420Serfs*5	1	IIIa	Данное исследование
10	32	с.4665dupG	p.Lys1556Glufs*3	1	I+II	Данное исследование
11	32	с.4692_4695dupTGCA	p.Arg1566Cysfs*13	3	I+II	CI054467
12	36	с.5116C>T	p.Arg1706*	1	I+II	CM981165
13	37	с.5422C>T	p.Gln1808*	1	I+II	Данное исследование
14	45	с.6406C>T	p.Gln2136*	1	I+II	Данное исследование
15	49	с.6955C>T	p.Arg2319*	2	G	CM981166
16	49i	с.6992+1G>T	Исчезновение донорного сайта сплайсинга	2	G	Данное исследование
17	49i	с.6993-2A>C	Исчезновение акцепторного сайта сплайсинга	1	G	CS151385
18	50	с.7074C>A	p.Tyr2358*	1	G	CM981167
19	50	с.7147C>T	p.Arg2383*	1	G	CM004723
20	52	с.7308insGATTGGCTA-TATCAATTGTATCTATA	p.Ser2437Aspfs*12	1	G	Данное исследование
21	54	с.7536delC	p.Asp2513Ilefs*34	9	G	#0000166154
22	55	с.7701delTinsGTGTCC-STAGGTGTCCCTA	p.Ser2567Argfs*3	1	G	Данное исследование
23	55	с.7732C>T	p.Arg2578*	4	G	CM032280
24	56	с.7888C>T	p.Arg2630*	1	G	Данное исследование
25	58i	с.8245-2A>G	Исчезновение акцепторного сайта сплайсинга	1	G	CS1311884
Всего хромосом с мутациями				42		

• миссенс-мутация: с.172Т>С, не выявленная на сегодняшний момент в проектах ExAC и 1000Genome; согласно пяти программам предсказания патогенности генетического варианта (Mutation taster, Provean, SIFT, UMD-predictor и Polyphen-2) данная замена является патогенной. Согласно критериям для интерпретации вариантов [17], замену с.172Т>С следует считать вероятно патогенной;

• небольшие делеции и дупликации: с.3dupG, с.4254insCCAT, с.4665dupG, с.7308insGATTGGCTATAT-CAATTGTATCTATA и с.7701delTinsGTGTCCCTAGGT-GTCCCTA, результатом которых является синтез укороченного функционально неполноценного белка вследствие образования преждевременного стоп-кодона.

Подавляющее число мутаций (84%) локализовано в кодирующей части гена, и лишь в четырех случаях (16%) обнаружены мутации сайта сплайсинга на границах 2, 49 и 58 интронов. На 23 из 42 хромосом мутации в исследуемой нами выборке больных располагаются в интервале с 49 по 56 экзон гена *LAMA2* включительно, что соответствует 55% от всех поврежденных хромосом.

Большинство выявленных мутаций гена *LAMA2* являются точковыми и представляют собой нонсенс-варианты, приводящие к синтезу укороченной полипептидной цепи. На небольшие делеции и дупликации приходится 32%, на мутации сайта сплайсинга — 16% выявленных мутаций, что совпадает с данными HGMD. Суммарная доля точковых мутаций (41% в HGMD и 52% в России) имеет незначительное отличие, однако в России в 2 раза чаще причиной ВМД1А являются нонсенс-мутации. Исследование крупных делеций/дупликаций и комплексных перестроек не проводилось в силу ограничений метода прямого автоматического секвенирования, что, однако, не исключает их наличия у российских больных. Сравнение частот встречаемости различных типов мутаций гена *LAMA2* у российских больных с ВМД1А и данных, представленных в HGMD обобщены в табл. 2.

Следует отметить, что в изучаемой выборке выявлены шесть повторяющихся мутаций. Мутации экзона 49 (с.6955С>Т — описана в LOVD 6 раз) и интрона 49 (с.6992+1G>Т — выявлена в ходе данного исследования впервые) зарегистрированы у больных в гомозиготном состоянии, а у их здоровых родителей — в гетерозиготном состоянии. При проведении генетического кон-

сультирования установлено, что родители больных детей состоят в кровнородственных браках. Мутация с.4692_4695dupTGCA экзона 32 по данным LOVD описана 4 раза, мутация с.2049_2050delAG экзона 14 описана 42 раза и мутация с.7732С>Т экзона 55 описана в LOVD 12 раз. Для различных мутаций гена *LAMA2* авторами показаны локальные эффекты основателя [18-20]. Так как ВМД1А является редким наследственным заболеванием с АР типом наследования, мы считаем, что наличие повторяющихся мутаций гена *LAMA2* у российских больных, вероятно, является следствием эффекта основателя.

Особый интерес представляет собой мутация с.7536delC экзона 54 (в табл. 1 выделена жирным шрифтом), встретившаяся в нашей выборке больных на 9 хромосомах, а в LOVD описанная всего один раз. У двух пациентов, родители которых не приходятся друг другу родственниками, данная мутация выявлена в гомозиготном состоянии, у пяти пациентов — в гетерозиготном состоянии. Для того чтобы установить возможную общность происхождения хромосом, несущих данную мутацию, или их независимое происхождение, были проанализированы гаплотипы хромосом 6 с использованием четырех высокополиморфных микросателлитных маркеров. Все хромосомы 6, несущие данный патогенный вариант, были генотипированы по четырем маркерам. Результаты представлены в табл. 3.

У пациентов М22 и М41 мутация с.7536delC зарегистрирована в гомозиготном состоянии. У пациента М19 был доступен биологический материал родителей, благодаря чему удалось построить гаплотипы хромосом и, соответственно, определить аллели, сцепленные с мутацией с.7536delC. Оставшиеся четыре пациента, мутация с.7536delC у которых зарегистрирована в гетерозиготном или компаунд-гетерозиготном состоянии с другими мутациями гена *LAMA2*, были также протипированы по всем маркерам. Так как невозможно определить гаплотип мутантной хромосомы, в расчет неравновесия по сцеплению δ были включены лишь аллели, зарегистрированные в гомозиготном состоянии. Таким образом, в расчет были включены аллели (в табл. 3 выделены жирным начертанием) шести хромосом по маркерам D6S1958, D6S407 и D6S1620: М19, М21, М22 и М41, а

Таблица 2

Суммарные данные о типах мутаций гена *LAMA2*

Тип мутации	Доля в HGMD, %	Доля в России, %
Миссенс-	17	4
Нонсенс-	24	48
Сайт сплайсинга	20	16
Небольшие делеции/дупликации	31	32
Крупные делеции/дупликации	7	n/t
Комплексные перестройки	1	n/t
Всего	100	100

по маркеру D6S1040 — аллели восьми хромосом: M2, M13, M15, M19, M22 и M41. Популяционную выборку составили хромосомы 18 здоровых россиян, не являющихся родственниками больных. Результаты анализа для всех микросателлитных маркеров в виде аллельных частот среди хромосом, несущих мутацию, и хромосом без мутации представлены в табл. 4.

В момент появления в популяции мутации возникает полное неравновесие по сцеплению этой мутации с аллелями маркеров, что и составляет в итоге гаплотип

основателя, который размывается с течением времени в результате рекомбинаций. Аллели из гаплотипа основателя должны характеризоваться максимальным неравновесием по сцеплению с локусом заболевания по сравнению с другими аллелями маркеров. Кроме того, они должны иметь большее накопление в хромосомах с мутацией по сравнению с другими аллелями.

Для оценки достоверности ассоциации данного аллеля маркера с мутацией с.7536delC гена *LAMA2* был применен точный критерий Фишера. При определении

Таблица 3

Аллели, выявленные на хромосомах 6 у пациентов, имеющих в генотипе мутацию с.7536delC

Маркер	Координата, сМ	Координата, т.п.н.	M2	M13	M15	M19	M21	M22	M41
D6S1958	125,71	126568	3/5	1/5	1/5	1/5	1/1	1/5	1/5
D6S407	125,71	128814	1/7	10/13	3/13	14/11	11/11	7/7	13/7
<i>LAMA2</i> , с.7536delC	129,8	129799	M/m	M/m	M/n	M/m	M/m	M/M	M/M
D6S1620	128,93	129947	3/4	2/4	3/4	4/2	4/4	4/4	4/4
D6S1040	128,93	130985	4/4	1/1	3/3	1/2	1/5	4/1	1/1

Примечание. n — нормальная последовательность гена *LAMA2*; M — мутация с.7536delC гена *LAMA2*; m — любая другая мутация гена *LAMA2*, M2-M41 — номер пациента с ВМД. Жирным начертанием в таблице выделены аллели, включенные в обсчет неравновесия по сцеплению δ .

Таблица 4

Аллельные частоты микросателлитных маркеров из области гена *LAMA2* на хромосомах с мутацией с.7536delC и в популяционной выборке

Маркер	D6S1958		D6S407		D6S1620		D6S1040	
	бол	зд	бол	зд	бол	зд	бол	зд
N	6	36	6	36	6	36	8	36
-2						5,6		
-1				2,8		25,0		
0		16,7		16,7		5,6		5,6
1	66,7	47,2		2,8		5,6	62,5	30,6
2		5,6		2,8		27,8		11,1
3		22,2		2,8		22,2	12,5	11,1
4		2,8		8,3	100,0	5,6	25,0	22,2
5	33,3	5,6		11,1		2,8		16,7
6				16,7				2,8
7			50,0	22,2				
8				13,9				
9								
10								
11			16,7					
12								
13			16,7					
14			16,7					

Примечание. N — количество исследованных хромосом. Жирным начертанием выделены значения частот аллелей, характеризующихся наибольшей неравновесностью сцепления с мутацией с.7536delC

предкового аллеля учитывалось наибольшее положительное значение δ и наименьшее значение p . Результаты представлены в табл. 5.

Из табл. 5 видно, что δ уменьшается по мере удаления маркера от гена *LAMA2*. Такая зависимость характерна для популяций, в которых распространение какого-либо редкого аллеля произошло в результате эффекта основателя. Таким образом, наиболее вероятным представляется следующий гаплотип основателя: D6S1958-D6S407-c.7536delC-D6S1620-D6S1040: 5-7-M-4-1.

Обсуждение

С момента описания первой мутации в гене *LAMA2* ежегодно базы данных пополняют все новые и новые варианты. При анализе данных базы LOVD очевидно, что мутации затрагивают все 65 экзонов гена *LAMA2* и нарушают структуру всех доменов белка. Однако, существуют частые мутации, описание которых многократно встречается в литературе. Для некоторых из них показаны локальные эффекты основателя [20–23]. Ламинин- $\alpha 2$ (мерозин) состоит из шести доменов: альфа-спиральные домены I и II, взаимодействуя с другими ламининами, формируют свернутую в кольцо (a coiled coil) структуру и входят в состав длинного плеча белка; домены IIIa, IIIb и V содержат цистеин-богатые EGF-подобные повторы и определяют жесткую стержневидную структуру; домены IVa, IVb, VIa и VIb определяют форму глобулярной структуры. N-терминальный домен IV является высоко консервативным в ряду многочисленных человеческих и животных изоформ ламининов, принимает участие в кальций-зависимых межмолекулярных взаимодействиях и участвует в связывании интегрин. Глобулярный C-терминальный регион (G) построен из гомологичных повторов и включает в себя крайне важные сайты узнавания для мембранных рецепторов поперечнополосатых мышечных клеток, α -дистрогликана и интегрин $\alpha 7\beta 1$ [9]. Мерозин принимает участие в межклеточном взаимодействии, развитии нервов и миграции шванновских клеток. Распределение выявленных в ходе исследования мутаций по доменам белка приведено в табл. 2.

В ходе исследования описан спектр мутаций у российских больных с ВМД1А, идентифицировано 14 ранее описанных и 11 новых мутаций гена *LAMA2*. Нами идентифицированы нонсенс и миссенс варианты, небольшие делеции и дупликации, приводящие к дефектам всех доменов мерозина, а также мутации сайта сплайсинга.

В результате анализа спектра мутаций гена *LAMA2* у российских больных выделены «горячие» экзоны 49–56, мутации в которых приводят к повреждению C-терминального региона мерозина, что, в свою очередь, приводит к нарушению связывания внеклеточного матрикса с актиновым цитоскелетом и, как следствие, — к нарушению миогенеза и выживания миофибрилл. У 18 больных из 29 после исследования гена *LAMA2* методом прямого автоматического секвенирования была выявлена хотя бы одна мутация в экзонах 49–56. Таким образом, суммарная информативность секвенирования данных экзонов гена *LAMA2* составляет 62%. При одновременном анализе системы частых мутаций, описанной нами ранее [8], и «горячих» экзонов гена *LAMA2* выявляемость хотя бы одной мутации у больного с ВМД1А составляет 69%, что позволяет оптимизировать ДНК-диагностику в российских семьях с ВМД1А. В результате стратегия молекулярного обследования семей с ВМД1А заключается в поэтапном анализе гена *LAMA2*: сначала осуществляется поиск частых мутаций с использованием медицинской технологии, на втором этапе рекомендовано выполнить поиск мутаций в «горячих» экзонах гена, на третьем этапе проводится поиск мутаций в оставшихся 57 экзонах гена *LAMA2*.

На долю крупных делеций, затрагивающих целые экзоны, приходится 20–40% мутаций гена *LAMA2* [1, 22], что может объяснить отсутствие второй мутации у четырех пациентов (14% всех обследованных в ходе исследования больных) с ВМД1А.

У шести пациентов, мутации в гене *LAMA2* у которых выявлены не были, целесообразно проведение повторного обследования с целью выявления новых симптомов, которые могли бы проявиться с возрастом, для уточнения клинического статуса больного, а также выполнение МРТ головного мозга и измерение уровня КК в сыворотке крови. Вследствие сложного взаимодейст-

Таблица 5
Ассоциация и неравновесие по сцеплению аллелей маркеров с мутацией с.7536delC гена *LAMA2*

Маркер	Аллель	p	$\delta \pm 95\% \text{ ДИ}$
D6S1958	5	0,091	0,294 \pm 0,411
D6S407	7	0,007	0,485 \pm 0,421
<i>LAMA2</i>	с.7536delC		
D6S1620	4	<0,001	1,000 \pm 0,000
D6S1040	1	0,117	0,460 \pm 0,510

Примечание. p — односторонняя вероятность для точного критерия Фишера; δ — мера неравновесности сцепления аллелей полиморфных маркеров с мутацией с.7536delC гена *LAMA2*

вия белков дистрофин-гликопротеинового комплекса, одним из компонентов которого является и блок мерозин, повреждение генов, кодирующих любой из них, приводит к развитию сходных клинических симптомов. Основным клиническим проявлением ВМД1А является инфантильная гипотония (синдром вялого ребенка), часто сочетающаяся с респираторным дистресс-синдромом и задержкой моторного развития. ВМД1А следует дифференцировать от [1]:

- других форм ВМД: коллагенопатий, дистрофиногликанопатий, SEPNI-связанной миопатии и LMNA-связанной ВМД;

- врожденной миопатии;
- врожденной метаболической миопатии;
- врожденной миотонической дистрофии;
- врожденного миастенического синдрома;
- спинальной мышечной атрофии.

Для дифференциальной диагностики ВМД1А от других ВМД, сопровождающихся похожими клиническими проявлениями необходимым условием является проведение МРТ головного мозга, на которой выявляющие очаги перивентрикулярной лейкопатии, не приводящие к нарушению когнитивных функций у пациента.

Для мутации с.7536delC в выборке российских больных с ВМД1А показан эффект основателя. Мутация возникает на хромосоме с определенным гаплотипом. При передаче этой хромосомы в череде поколений ее гаплотип изменяется в результате кроссинговера между гомологичными хромосомами. При этом рекомбинации вблизи мутации происходят тем реже, чем меньше расстояние между ней и маркерами, и процесс «размывания» исходного «родительского» гаплотипа вблизи мутации будет происходить медленнее. В итоге, все мутантные хромосомы несут одинаковый гаплотип в области вокруг мутации, и чем древнее мутация, тем эта область уже. В ходе исследования у гомозигот по мутации с.7536delC не выявлено полного неравновесия по сцеплению заблагования со всеми исследуемыми маркерами. Такое неравновесие зарегистрировано только для маркера D6S1620, теснее всех сцепленного с геном *LAMA2*: все хромосомы с мутацией несли один и тот же аллель — 4, доля которого среди хромосом популяционной выборки незначительна. Полученные в ходе исследования данные демонстрируют процесс «размывания» родительского гаплотипа. Наиболее вероятным для российских больных с мутацией с.7536delC представляется следующий гаплотип основателя: D6S1958-D6S407-M-D6S1620-D6S1040: 5-7-M-4-1. Таким образом, очевидно, что мутация с.7536delC, на долю которой приходится 21% всех поврежденных хромосом, у российских больных произошла от общего древнего предка. Однако возраст мутации определить не представляется возможным в силу малого размера выборки больных с данной мутацией. При анализе данных литературы показаны только локальные эффекты основателя для различных мутаций гена *LAMA2* на примерах двух-трех семей. Наша работа является первым крупным

исследованием мутации с.7536delC для выявления эффекта основателя в пределах одной когорты больных с ВМД1А.

В настоящей работе представлены результаты исследования гена *LAMA2* в большой выборке российских больных с ВМД1А. Определен спектр мутаций гена *LAMA2*, выявлены «горячие» экзоны, что позволяет сделать молекулярную диагностику ВМД1А в отягощенных семьях более эффективной. Показано, что основной причиной ВМД1А в российских семьях являются нонсенс-мутации и их доля среди всех типов мутаций почти в 2 раза выше, чем доля нонсенс-мутаций, по данным HGMD. У российских больных выявлена мажорная мутация — с.7536delC, на долю которой приходится 21% всех поврежденных хромосом. Для данной мутации показан эффект основателя и определен предковый гаплотип. По итогам работы предложен эффективный алгоритм анализа гена *LAMA2* в отягощенных семьях.

Список литературы

1. Quijano-Roy S, Sparks S, Rutkowski A. LAMA2-Related Muscular Dystrophy. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K, editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2014. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK97333/>
2. Zhang X, Vuolteenaho R, Tryggvason K. Structure of the human laminin alpha2-chain gene (*LAMA2*), which is affected in congenital muscular dystrophy. *J Biol Chem.* 1996 Nov 1;271(44):27664-9.
3. Leivo I, Engvall E. Merosin, a protein specific for basement membranes of Schwann cells, striated muscle, and trophoblast, is expressed late in nerve and muscle development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988 Mar;85(5):1544-8.
4. Holmberg J, Durbeek M. Laminin-211 in skeletal muscle function. *Cell Adh Migr.* 2013; 7(1): 111-121.
5. Mendell JR, Boue DR, Martin PT. The congenital muscular dystrophies: recent advances and molecular insights. *Pediatr Dev Pathol.* 2006 Nov-Dec;9(6):427-43.
6. Reed UC. Congenital muscular dystrophy. Part I: a review of phenotypical and diagnostic aspects. *Arq Neuropsiquiatr.* 2009 Mar;67(1):144-68.
7. Muntoni F, Voit T. The congenital muscular dystrophies in 2004: a century of exciting progress. *Neuromuscul Disord.* 2004 Oct;14(10):635-49.
8. Миловидова ТБ, Шагина ОА, Поляков АВ. Оценка частоты врожденной мышечной дистрофии 1А в РФ с использованием новой медицинской технологии «Система детекции в одной пробирке частых мутаций при врожденных несиндромальных мышечных дистрофиях». *Медицинская генетика.* 2016;15(3): 30-34.
9. Allamand V, Guicheney P. Merosin-deficient congenital muscular dystrophy, autosomal recessive (MDC1A, MIM#156225, *LAMA2* gene coding for alpha2 chain of laminin). *Eur J Hum Genet.* 2002 Feb;10(2):91-4.
10. Дадали ЕЛ, Руденская ГЕ, Шагина ОА. и др. Мерозин-дефицитная врожденная мышечная дистрофия (ВМД1А). *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова.* 2010; 110 (3): 83-89.

11. Philpot., Bagnall A, King C. et al. Feeding problems in merosin deficient congenital muscular dystrophy. *Arch Dis Child*. 1999; 80(6): 542-547.
12. Geranmayeh F, Clemen, E, Feng LH. et al. Genotype-phenotype correlation in a large population of muscular dystrophy patients with LAMA2 mutations. *Neuromuscul Disord*. 2010; 20(4): 241-250.
13. Carboni N, Marrosu G, Porcu M. et al. Dilated cardiomyopathy with conduction defects in a patient with partial merosin deficiency due to mutations in the laminin- α 2-chain gene: A chance association or a novel phenotype? *Muscle Nerve*. 2011; 44(5): 826-828.
14. Marques J, Duarte ST, Costa S. et al. Atypical phenotype in two patients with LAMA2 mutations. *Neuromuscul Disord*. 2014; 24(5): 419-424.
15. Tan E, Topaloglu H, Sewry C. et al. Late onset muscular dystrophy with cerebral white matter changes due to partial merosin deficiency. *Neuromuscul Disord*. 1997; 7(2): 85-89.
16. Kevelam SH, van Engelen BG, van Berkel CG. et al. LAMA2 mutations in adultonset muscular dystrophy with leukoencephalopathy. *Muscle Nerve*. 2014; 49(4): 616-617.
17. Рыжкова ОП, Кардымон ОЛ, Прохорчук ЕБ. и др. Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS). // *Медицинская генетика*. 2017;16(7): 4-17.
18. Di Blasi C, Piga D, Brioschi P et. al. LAMA2 gene analysis in congenital muscular dystrophy: new mutations, prenatal diagnosis, and founder effect. *Arch Neurol*. 2005 Oct;62(10):1582-6.
19. Pegoraro E, Marks H, Garcia CA et. al. Laminin alpha2 muscular dystrophy: genotype/phenotype studies of 22 patients. *Neurology*. 1998 Jul;51(1):101-10.
20. Di Blasi C, Bellafore E, AM Salih M et. al. Variable disease severity in Saudi Arabian and Sudanese families with c.3924 + 2 T > C mutation of *LAMA2*. *BMC Res Notes*. 2011 Dec 13;4:534.
21. Oliveira J, Santos R, Soares-Silva I. et. al. LAMA2 gene analysis in a cohort of 26 congenital muscular dystrophy patients. *Clin Genet*. 2008; 74(6): 502-512.
22. Oliveira J, Goncalves A, Oliveira ME et al. Reviewing Large LAMA2 Deletions and Duplications in Congenital Muscular Dystrophy Patients *Journal of Neuromuscular Diseases* 1 (2014) 169-179.
23. Guicheney P, Vignier N, Zhang X et al. PCR based screening of the laminin α 2 chain gene (LAMA2): application to prenatal diagnosis and search for founder effects in congenital muscular dystrophy. *J Med Genet* 1998;35:211-217.