

Результаты анализа носительства спинальной мышечной атрофии с использованием новой медицинской технологии «Количественный метод детекции числа копий генов локуса СМА»

Забненкова В.В., Щагина О.А., Поляков А.В.

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

Проксимальная спинальная мышечная атрофия (СМА) — одно из наиболее тяжелых нейромышечных заболеваний с ауто-сомно-рецессивным типом наследования. Ген СМА картирован на хромосоме 5 в локусе 5q12.2-q13.3 и кодирует белок выживаемости мотонейронов — Survival Motor Neuron. Ген *SMN* имеет центромерную (*SMNc*) и теломерную копии (*SMNt*). К возникновению проксимальных СМА приводят мутации в теломерной копии гена *SMNt*. Разработана и внедрена в практическую деятельность ФГБНУ «МГНЦ» новая количественная методика анализа числа копий генов локуса 5q13 — *SMNt*, *SMNc*, *NAIP*, *GTF2H2* и *RAD17* на основе мультиплексной проба-зависимой лигазной реакции с последующей амплификацией. Проведена диагностика носительства делеции *SMNt* у 432 обратившихся.

Ключевые слова: спинальная мышечная атрофия, количественный анализ, медицинская технология

Введение

Проксимальная спинальная мышечная атрофия (СМА) — одно из наиболее тяжелых нейромышечных заболеваний с аутосомно-рецессивным типом наследования. Клинические проявления заболевания характеризуются прогрессирующими симптомами вялого паралича вследствие дегенерации α -мотонейронов передних рогов спинного мозга. Выделяют четыре клинических типа заболевания на основе различий в возрасте начала, тяжести течения и продолжительности жизни. Эти типы СМА являются аллельными генетическими вариантами, развитие которых обусловлено мутациями в гене *SMN*. Ген картирован на хромосоме 5 в локусе 5q12.2-q13.3 и имеет центромерную (*SMNc*) и теломерную копии (*SMNt*). К возникновению проксимальных СМА приводят мутации в теломерной копии гена *SMNt*, который состоит из девяти экзонов (1, 2a, 2b, 3—8) и кодирует белок выживаемости мотонейронов (survival motor neuron). Основным типом мутаций в этом гене являются делеции экзонов 7 и/или 8, которые выявлены у 95% больных. Остальные 5% больных являются компаунд-гетерозиготами по делеции в одной копии гена *SMNt* и точковой мутации в другой [1, 2].

Обнаружение делеции экзонов 7 и/или 8 в гомозиготном состоянии позволяет подтвердить диагноз СМА у больного. Однако при проведении медико-генетического консультирования возникает проблема расчета повторного риска рождения больного ребенка в отягощенной семье или в новом браке родителей пробанда с проксимальной СМА. Это требует уточнения генетического статуса консультирующихся, выявления носительства ими

мутации в гене *SMNt* в гетерозиготном состоянии. Учитывая значительную частоту заболевания, проведение анализа носительства мутаций в этом гене показано для вновь созданных супружеских пар. Принимая во внимание, что показатели частоты заболевания в различных популяциях варьируют от 1:6000 до 1:10 000 новорожденных, можно рассчитать, что гетерозиготным носителем мутации в гене *SMNt* является каждый 40—50 чел. [3]. У жителей Московского региона частота носительства делеций гена *SMNt* составляет 1 на 36 чел. [4].

Традиционная молекулярная диагностика СМА представляет собой качественную детекцию делеции экзонов 7 и/или 8 гена *SMNt*, которая не дает возможность выявлять всех носителей мажорной мутации в гене *SMNt* в гетерозиготном состоянии. Это связано с тем, что используемый метод определяет не число копий генов на геном, а соотношение числа центромерных и теломерных копий гена *SMN*. Отклонение данного соотношения от единицы может быть обусловлено как снижением числа копий гена *SMNt*, так и увеличением числа копий гена *SMNc*. Ограничения, возникающие при использовании качественных методов детекции гетерозиготного носительства мутаций в гене *SMNt*, могут создать значительные трудности при проведении медико-генетического консультирования отягощенных семей. Отсутствие уверенности в существовании гетерозиготного носительства не позволяет:

- подтвердить диагноз СМА у умершего ребенка, биологический материал которого недоступен, рассчитать риск рождения больного ребенка в семье и провести дородовую диагностику;

- точно определить статус носительства мутации в гене *SMN1* у партнера obligатного носителя при вступлении им в новый брак;

- сформировать группу больных со СМА, имеющих делецию в гетерозиготном состоянии для поиска точковых мутаций в другой копии гена [5—7].

Эти проблемы могут быть решены при разработке методов количественного анализа числа копий генов *SMN1* и *SMNc*, использование которых позволит не только диагностировать СМА, но и оптимизировать процесс определения гетерозиготного носительства, а также проводить тестирование донорских половых клеток при проведении экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Значительная распространенность СМА обуславливает необходимость проведения скрининга доноров спермы и яйцеклеток, и в случае выявления носительства, исключать его из данной программы.

Материалы и методы

В период с 10.01.2015 по 01.02.2016 в лабораторию ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ» было направлено 432 чел. с целью диагностики носительства СМА. Среди них 58 супружеских пар (116 чел.), планирующих деторождение. Из них 35 являлись родителями ребенка с неподтвержденным молекулярно-генетическими методами диагнозом СМА, однако на момент обращения больного уже не было в живых, и его биологический материал не был доступен. В 9 семьях один из супругов являлся родителем больного ребенка и в 14 парах у одного из супругов были кровные родственники с диагнозом СМА. Остальные обратившиеся проходили генетическое обследование в рамках мероприятий по планированию семьи, с целью определения носительства частых рецессивных заболеваний, не имея больных родственников.

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

Для определения числа копий гена *SMN1* была разработана система, в основе которой лежит мультиплексная проба-зависимая лигазная реакция с последующей амплификацией (Multiplex ligation-dependent probe amplification, 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 ЗАО «Синтол», Москва, и ЗАО «Евроген», Москва.

Последовательности проб, входящих в реакцию, выбрали согласно базе данных GeneBank. Использованы последовательности экзонов 7,8 гена *SMN1*, экзонов 7,8 гена *SMNc*, экзонов 1,6 генов *SMN*, экзона 5 гена *NAIP* (два фрагмента), экзона 4 гена *GTF2H2*, последовательности гена *RAD17*, играющего роль индикатора

целостности региона 5q13, а также последовательности генов *TBP*, *B2M*, *SIRT3* и *USP3*, выбранных в качестве внутренних контролей (табл. 1).

Лигазную реакцию проводили на программируемом плащечном термоциклере DNA Engine Tetrad 2 Cyclor («Bio-Rad») с использованием ДНК-лигазы Pfu («Stratagene»).

Лигирование проводили в 5 мкл реакционной смеси, содержащей 1х реакционный буфер (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0,1% Igepal, 0,01 mM rATP, 1 mM DTT), 26 специфичных 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 мин, затем лигирование при 63°C — 3 часа.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на программируемом плащечном термоциклере DNA Engine-Tetrad 2 Cyclor («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 1х реакционный буфер (67 mM Tris-HCl, 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Twin-20), 0,25 мкМ каждого олигопраймера, 250 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 1,5 единицы термофильной ДНК-полимеразы, добавляли 5 мкл лигата.

ПЦР проводили в следующем режиме: первоначальная денатурация при 95°C — 5 мин, 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 электрофореграмма представляет собой паттерн сигналов, соответствующих пробам, входящим в систему. Уже при визуальной оценке в образцах с гомозиготной делецией можно увидеть отсутствие «пигов», соответствующих делетированным экзонам.

Для точного количественного анализа данные образцы батывали с помощью программного обеспечения CoffalyserV8 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 генов локуса 5q13 в образце ДНК больного СМА к параметрам референсных генов в этом образце и соотношением параметров (площадь пика) анализируемых проб генов локуса 5q13 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).

Для определения эффективности и информативности новой медицинской технологии использовался традиционный качественный метод поиска делеций гена *SMN*. Детекция проводилась по протоколу и с использованием праймеров, описанных в диссертации Шагиной И.А. [7]. Данный метод заключается в амплификации последовательностей фрагментов, соответствующих экзонам 7 и 8 гена и псевдогена *SMN*, после чего фраг-

менты обрабатываются эндонуклеазами рестрикции, специфичными к точкам различия гена и псевдогена, что позволяет получить разницу длин продукта гена и псевдогена. Результаты визуализируются в полиакриламидном геле (ПААГ) и по разной интенсивности свечения полос, соответствующих *SMN*i и *SMN*c судят о предполагаемом наличии или отсутствии делеции в гетерозиготном состоянии (рис. 1).

Таблица 1

Пробы и условия лигирования, применявшиеся для анализа числа копий генов локуса 5q13

Ген		Последовательность олигонуклеотидов (5'→3')		t лиги- рова- ния
		5'-проба	3'-проба	
TBP		GTTCGTACGTGAATCGCGGTACGGTTAGAAGGCCTGTGCTCAC	CCACCAACAATTTAGTAGGTAAGTCTGAAAGGATGC GATCCGATGCCTTCATG	63°C
SIRT3		GTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATTATCTGTGGGTGCTTCAAGTGTTGTTG	GAAGTGGAGGCAGCAGTGACAAGCTTTATAATTGATGCGATCCGATGCCTTCATG	
USP3		GTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATCATTATGAAGATGCACAAGTACCTTTAACCAAC	CATAAGAAATCAGAAAAGCAAGATAAAGTTTCAGCACGTTTATTGATGCGATCCGATGCCTTCATG	
B2M		GTTCGTACGTGAATCGCGGTACCATATTTACCTTATATTCAATTTATATTGGATGAGTATGCCTGCCGTGTGAAC	CATGTGACTTTGTACAGCCCAAGGTTTATATTCTTTTATAATTTATGGATGCGATCCGATGCCTTCATG	
SMN	Экз.7 (ген)	GTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTGAGCACCTTCCTTCTTTTGTATTTGTCTG	P-AAACCCTGTAAGGAAAAATAAAGGAAGTTAAAAAAATAGCTC GATGCGATCCGATGCCTTCATG	
	Экз.7 (п-ген)	GTTCGTACGTGAATCGCGGTACGAATGTGAGCACCTTCCTTCTTTTGTATTTGTCTA		
SMN	Экз.8 (ген)	GTTCGTACGTGAATCGCGGTACGGCCTCCACCCCCACCC	P-CAGTCTTTTACAGATGGTTTTTCAAATGATGCGATCCGATG CCTTCATG	
	Экз.8 (п-ген)	GTTCGTACGTGAATCGCGGTACCTGGCCTCCACCCCACCT		
SMN	Экз.1 (ген/п-ген)	GTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTCCCAGGAGCAGGAGGATTC	CGTGCTGTTCCGGCGCGGGATGCGATCCGATGCC TTCATG	
SMN	Экз.6 (ген/п-ген)	GTTCGTACGTGAATCGCGGTACCAGTCCAGATTCTCTTGATGATGCTGATG	CTTTGGGAAGTATGTTAATTTTCATGGTACATGAGGATGCGATCCGATGCCTTCATG	
NAIP	Экз.5 (фр.1)	GTTCGTACGTGAATCGCGGTACGGTAAACAGGACACGGTACAGTGTTTTTC	CTGTGGTGGATGTTTAGGAAATTGGGTTTTTCGATGCGATCCGATGCCTTCATG	
NAIP	Экз.5 (фр.2)	GTTCGTACGTGAATCGCGGTACCTTTTATTCTGGAGATGATCCTTGGAAAGAACATG	CCAAATGGTTCGCCAAGTAAGTAGATAATTTTGGATGCGATCCGATGCCTTCATG	
GTF2H2	Экз.4	GTTCGTACGTGAATCGCGGTACGGAATTACATTAAAAATGTTTGATAATTTTAAACAGAGTATTTGAGCAC	CATGGACAAGTTCGACTTGGAATGGATTCTTCTTTTATTTCTATTATTCGATGCGATCCGATGCCTTCATG	
RAD17		GTTCGTACGTGAATCGCGGTACCTTTTATTCTTTATCATCATTTGATGATTTTCTAGAGTGTAGTGG	CGTCTCTACTATTACTGCCACATCATTAGGTGTTTCTTTATTTTTCGATGCGATCCGATGCCTTCATG	

Таблица 2

Праймеры и условия амплификации применявшиеся 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

Результаты и обсуждение

Всем обратившимся за диагностикой носительства было проведено исследование с использованием стандартного качественного метода диагностики СМА (рис. 1) и с применением новой медицинской технологии (рис. 2).

При использовании традиционного качественного метода соотношение числа копий гена *SMNt* к псевдогену *SMNc* 1:1 было детектировано у 307 из 432 обратившихся, соотношение 1:2, косвенно свидетельствующее о наличии делеции в гетерозиготном состоянии, — у 106 чел. В 19 случаях качественный анализ на носительство был не информативен из-за отсутствия в генотипе пробанда псевдогена *SMNc*.

При использовании новой медицинской технологии «Количественный метод детекции числа копий генов локуса СМА» было выявлено 123 носителя делеции гена *SMNt*. У 23 чел. установлено наличие в генотипе одной копии гена и одной копии псевдогена *SMNc* и при использовании качественных методов у них было зарегистрировано соотношение числа копий ген/псевдоген 1:1. Таким образом, из 123 реальных носителей делеции *SMNt* — 23 являлись «скрытыми» носителями — делецию гена у них оказалось возможным детектировать только количественными методами. Кроме того, у 6 чел. выявлена не имеющая клинической значимости дупликация псевдогена при нормальном числе копий гена *SMNt*. Соотношение ген/псевдоген у данных людей при использовании качественного метода было 1:2, что, без использования количественного метода, относило бы их в группу вероятных носителей СМА. С использованием разработанной медицинской технологии удалось установить статус в отношении носительства СМА и у тех 19 чел., качественный анализ которых был не информативен — у всех из них зарегистрировано две копии гена *SMNt* и ни один из них не является носителем делеции.

Результаты сравнения традиционного качественного метода и новой медицинской технологии «Количественный метод детекции числа копий генов локуса СМА» в диагностике носительства СМА представлены в табл. 4.

Как видно из таблицы, применение новой медицинской технологии «Количественный метод детекции числа копий генов локуса СМА» позволяет существенно повысить точность и эффективность диагностики носительства спинальной мышечной атрофии.

Необходимо отметить, что 100% точность диагностики с использованием метода количественного МЛРП относится к определению количества копий гена на геном. Однако 0,1% носителей в популяции имеют обе копии гена *SMNt* на одной хромосоме, т.е. в цис-положении — так называемый генотип «2+0». Они являются носителями делеции, поскольку одна их хромосома 5 несет на себе две копии гена *SMNt*, а на второй — ген *SMNt* отсутствует. На сегодняшний день ни один метод не позволяет различить генотипы «2+0» — скрытый носитель,

и «1+1» — не носитель, поэтому информативность диагностики носительства СМА не может достигнуть 100%.

Впервые в России разработана и внедрена в практику новая количественная методика анализа генов локуса 5q13, ответственных за развитие проксимальной СМА I—IV типов, на основе мультиплексной проба-зависимой лигазной реакции с последующей амплификацией, позволяющая определять абсолютное число копий генов *SMNc* и *SMNt*.

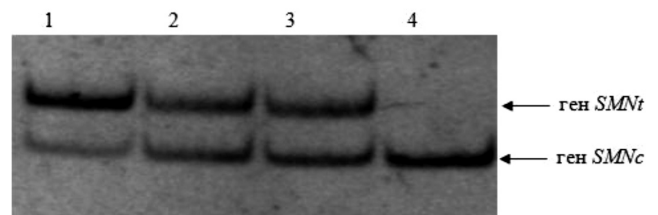
Новая методика может быть использована, для скрининга гетерозиготного носительства гена проксимальной СМА у доноров, участвующих в программе ЭКО, а также для оценки популяционной частоты носительства гена проксимальной СМА. Показаниями к использованию данной технологии являются:

1. Диагностика спинальной мышечной атрофии;
2. Диагностика гетерозиготного носительства СМА у родственников больного;
3. Скрининг гетерозиготного носительства у доноров, участвующих в программе ЭКО;
4. Оценка популяционной частоты носительства СМА.

Противопоказания для использования технологии «Количественный метод детекции числа копий генов локуса СМА» отсутствуют.

К недостаткам данной технологии можно отнести относительную дороговизну исследования и необходи-

А — анализ делеции 7 экзона гена *SMNt*



Б — анализ делеции 8 экзона гена *SMNt*

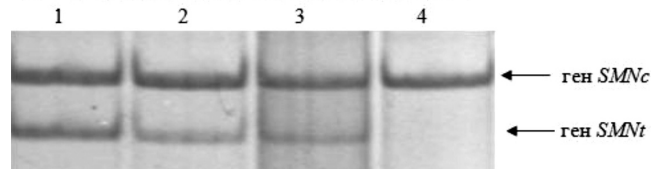


Рис. 1. Поиск носительства делеции гена *SMNt* с использованием качественного метода.

Представлены фрагменты электрофореграмм с анализами образцов ДНК больного спинальной мышечной атрофией (дорожка 4), его родителей (дорожки 2,3) и здорового контроля (дорожка 1). Делеция регистрируется при отсутствии полосы соответствующей длины (дорожка №4). При соотношении интенсивности полос генов *SMNt* и *SMNc* 1:2 регистрируется гетерозиготное носительство делеции (дорожки 2, 3). В случае нормы регистрируется соотношение интенсивности полос генов *SMNt* и *SMNc* 1:1 (дорожка 1). При анализе соотношения интенсивности полос фрагментов экзона 7 в норме фрагмент гена *SMNt* выглядит ярче, чем при гетерозиготном носительстве делеции, что может быть обусловлено преимущественной амплификацией фрагмента, соответствующего экзону 7 гена *SMNt*.

Анализ числа копий генов SMN и других генов локуса 5q13

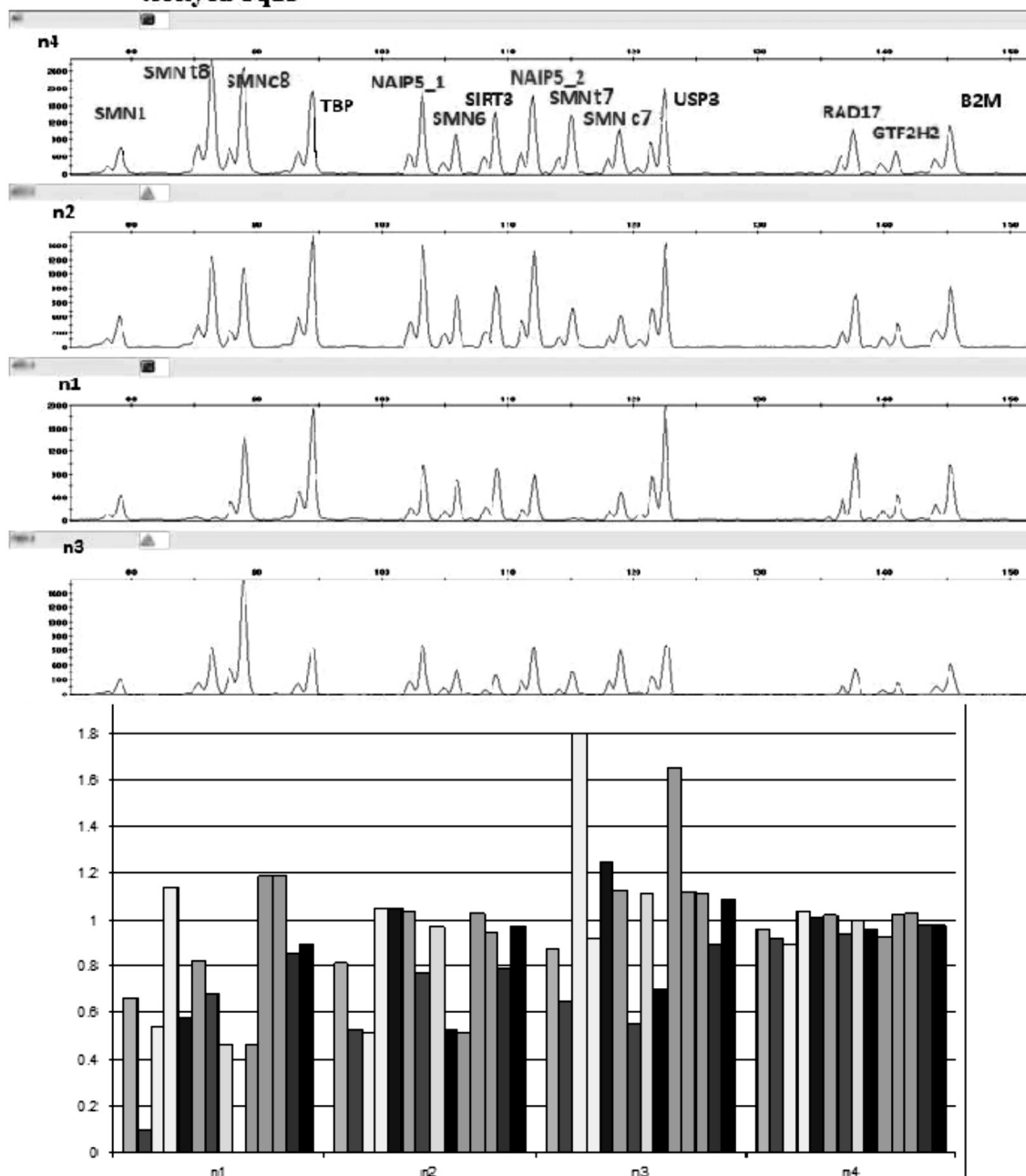


Рис. 2. Поиск носительства делеции гена *SMN* с использованием количественного метода.

Представлен фрагментный анализ продукта реакции MLPA на приборе ABI Prism 3130 («Applied Biosystems») и результаты обработки его числовых параметров с помощью программы Coffalyser V8. На электрофореграмме представлен паттерн сигналов, соответствующий последовательностям генов *TBP*, *B2M*, *SMNt* (экзоны 7, 8), *SMNc* (экзоны 7, 8), *SMN(t+c)* (экзоны 1, 6), *NAIP* (экзон 5, два фрагмента), *GTF2H2* (экзон 4), *RAD17*, для различных вариантов генотипов.

На диаграмме каждый столбец соответствует анализируемым последовательностям в системе. Высота столбца характеризует число копий соответствующего фрагмента ДНК. Делеции соответствует диапазон значений по оси Y от 0 до 0,3, одной копии — от 0,3 до 0,7, двум копиям — от 0,7 до 1,3, трем копиям — от 1,3 до 1,7, четырем копиям — 1,7–2,3.

Образец n1: делеция гена *SMNt* в гомозиготном состоянии, делеция гена *SMNc* в гетерозиготном состоянии, делеция гена *NAIP* в гетерозиготном состоянии. Тяжелое течение заболевания, врожденная СМА.

Образец n2: делеция гена *SMNt* в гетерозиготном состоянии, делеция гена *SMNc* в гетерозиготном состоянии. Генотип «1:1».

Образец n3: делеция гена *SMNt* в гетерозиготном состоянии, дупликация гена *SMNc*.

Образец n4: норма.

Таблица 4

**Сравнение качественного метода и новой медицинской технологии
«Количественный метод детекции числа копий генов локуса СМА» в диагностике носительства СМА**

	Качественный метод	Новая медицинская технология «Количественный метод детекции числа копий генов локуса СМА»
Исследовано образцов	432	432
Выявлено носителей или пробандов с соотношением SMNt:SMNc 1:2	106	123
Невозможно определить статус	19	0
Гипердиагностика носительства	6	0
«Скрытое» носительство	23	0
Информативность диагностики носительства СМА	96%	99,9%
Точность диагностики носительства СМА	93%	100%

мость наличия специального высокотехнологичного оборудования.

Использование этого метода делает более эффективным медико-генетическое консультирование семей, в которых недоступен материал больного ребенка или вновь созданных супружеских пар, в которых один из супругов является облигатным гетерозиготным носителем гена проксимальной СМА.

Список литературы

1. Lefebvre S., Burglen L., Reboullet S. et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*. 1995. V.80: P. 155-165.
2. Sumner C.J. Molecular mechanisms of spinal muscular atrophy. *J Child Neurol*. 2007. V. 22: P. 979-989.

3. Pearn J.H., Walton J.N. A clinical and genetic study of adult-onset spinal muscular atrophy. The autosomal recessive form as a discrete disease entity. *Brain*. 1978. V. 101: P. 591-606.

4. Забненкова В.В., Дадали Е.Л., Поляков А.В. Проксимальная спинальная мышечная атрофия типов I-IV: особенности молекулярно-генетической диагностики. *Нервно-мышечные болезни*, 2013, № 3: стр. 6-10.

5. Shagina I., Dadali H.L., Sitnikov V.P., Pugachev V.V., Malygina N.A., Evgrafov O.V. Prenatal diagnosis of spinal muscular atrophy in Russia. *Prenatal Diagnosis*. 1995. Vol. 15.: P. 27-34.,

6. Шагина И.А., Дадали И.А., Тверская С.М., Поляков А.В. ДНК-диагностика проксимальной спинальной амиотрофии типов I-III. *Вестник РГМУ*. 2002. №4 (25): стр. 16-19.

7. Шагина И.А. Молекулярно-генетическое исследование различных форм спинальной амиотрофии. Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. — М., 2002.

Информация о конфликте интересов

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Carrier screen of spinal muscular atrophy using a new medical technology «Quantitative detection methods of copy number analysis of SMA locus genes»

Zabnenkova V.V., Shchagina O.A., Polyakov A.V.

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

Spinal muscular atrophy (SMA) is one of the most severe autosomal recessive disorders. SMA gene has been mapped to chromosome 5q12.2-q13.3. Gene codes for a survival motor neuron protein (SMN). It has the telomeric and centromeric copies. SMA is caused by mutation in the telomeric copy of SMN gene (*SMNt*). New quantitative method of copy number analysis of SMA locus genes has been developed and introduced into practice at the Research Centre for Medical Genetics. This method is based on Multiplex Ligase Probe-Amplification. The SMA Carrier screen was carried out in 432 patients.

Key words: spinal muscular atrophy, quantitative analysis, medical technology