

# 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»

Миловидова Т.Б., 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

Врожденные мышечные дистрофии (ВМД) представляют собой группу нервно-мышечных заболеваний, характеризующихся тяжелой гипотонией, мышечной слабостью и контрактурами. Частота ВМД оценивается в 0,8 на 100 000, вклад ВМД, мерозин-зависимой (ВМД1А) оценивают в 30–40% случаев ВМД в европейских странах. Однако частота ВМД1А и частота носительства данного заболевания в РФ не определены. Создана и внедрена в практическую деятельность ФГБНУ МГНЦ новая медицинская технология «Система детекции в одной пробирке частых мутаций при врожденных несиндромальных мышечных дистрофиях». Впервые с использованием новой технологии проведена оценка популяционной частоты шести мутаций в гене *LAMA2* среди жителей РФ и расчет частоты заболевания ВМД1А, которая составила 1 на 83 000 новорожденных.

**Ключевые слова:** врожденная мышечная дистрофия, ВМД1А, система детекции частых мутаций гена *LAMA2*

## Введение

ВМД — это группа тяжелых наследственных заболеваний детского возраста, характеризующихся тотальным поражением мышц и приводящих к ранней инвалидизации [1, 2]. По особенностям клинических проявлений выделяют синдромальные (сопровождающиеся некоторыми особенностями фенотипа или патологиями различных органов и систем) и несиндромальные ВМД. Основным симптомом несиндромальной мышечной дистрофии у детей раннего возраста является мышечная гипотония, характерная также для ряда других наследственных нервно-мышечных болезней с ранним дебютом [1–3].

Частота несиндромальных мышечных дистрофий, в среднем, составляет 0,8 на 100 000 населения [1, 4, 5].

Вследствие того, что белковые продукты генов, мутации в которых приводят к развитию ВМД, участвуют в одном патогенетическом процессе, клинические проявления всех генетических вариантов этой группы заболеваний характеризуется значительным сходством, что затрудняет их дифференциальную диагностику и снижает эффективность медико-генетического консультирования. Возникают трудности в установлении типа наследования заболевания в изолированных случаях, расчетах повторного риска рождения больного ребенка и планировании профилактических мероприятий в отягощенных семьях [1, 3, 6].

За развитие ВМД ответственны мутации нескольких генов с различными типами наследования. Наиболее частой причиной заболевания является повреждение гена, кодирующего альфа 2 цепь белка ламинина — мерозин.

Мышечная дистрофия врожденная, мерозин-негативная, тип 1А (ВМД1А) наследуется по аутосомно-рецессивному типу. По оценкам разных авторов, на долю ВМД1А приходится 30–40% случаев ВМД в европейских странах. Однако точной оценки частоты ВМД1А до сих пор не проводилось. Это связано с редкостью данной патологии и большим размером гена *LAMA2*.

В настоящее время описано более 200 мутаций гена *LAMA2*. Исследование всей последовательности гена с использованием прямого автоматического секвенирования по Сенгеру является дорогостоящей, сложной и длительной процедурой. Различными исследователями показано, что в гене *LAMA2* регистрируется целый ряд повторяющихся мутаций [6].

Разработка системы анализа частых мутаций является актуальной задачей, так как позволяет не только повысить эффективность ДНК-диагностики ВМД, но и впервые в мире определить частоты носительства и рассчитать частоту ВМД1А. Знание точных частот наследственных болезней важно при проведении медико-генетического консультирования отягощенных семей для определения последовательности проведения молекулярно-генетических тестов.

## Материалы и методы

Для определения частоты ВМД1А использовалась ДНК 1000 здоровых неродственных людей, проживающих на территории РФ.

Для детекции повторяющихся мутаций гена *LAMA2* в одной пробирке была разработана система на основе

методов полиморфизма длин амплификационных фрагментов (ПДАФ) и полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПДФ) и внедрена в практику медицинская технология «Система детекции в одной пробирке частых мутаций при врожденных несиндромальных мышечных дистрофиях».

Дизайн праймеров осуществлен в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ», синтез — в ЗАО «Евроген», Москва. Последовательности праймеров выбирали по базе данных GeneBank. Использованы последовательности генов *LAMA2* и *LMNA/C*, фланкирующие мутации с.2049\_2050del, с.6488delA, с.7536delC, с.7732C>T, с.7750-1713\_7899-2153del, с.8007delT гена *LAMA2* и с.94\_96del3 гена *LMNA/C*.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на программируемом термоциклере Терцик (ДНК-технология, Россия) с использованием ДНК-полимеразы Biotaq («БиоМастер»).

ПЦР проводили по следующей схеме: в 23 мкл реакционной смеси, содержащей 1х реакционный буфер (67 мМ Tris-HCl, 16,6 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01% Twin-20, MgCl<sub>2</sub> 4 мМ), 0,25 мкМ каждого олигопраймера, 250 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 1,5 единицы термофильной ДНК-полимеразы, добавляли 2 мкл геномной ДНК. В каждую пробирку добавляли 20 мкл минерального масла.

ПЦР проводили в следующем режиме: первоначальная денатурация при 95°C — 5 мин, затем 30 циклов сме-

ны температур: 94°C — 30 с, температура отжига праймеров 63°C — 30 с, элонгация цепи 72°C — 30 с; заключительная элонгация 72°C — 7 мин. Последовательности праймеров и условия амплификации представлены в табл. 1.

Длина амплифицированных фрагментов составляет от 59 до 437 п.н.

После проведения амплификации, продукты реакции обрабатывали эндонуклеазой рестрикции NlaIII фирмы Fermentas. Для проведения рестрикции амплифицированных фрагментов использовалась смесь в объеме 15 мкл: 10 мкл амплификата, полученного в результате ПЦР; 3,2 мкл дистиллированной воды, 1,5 мкл рестриционного буфера, 0,3 мкл (1,0 единица активности) эндонуклеазы «NlaIII». Пробирки с рестриционной смесью помещались в термостат для инкубации при температуре 37°C на 3 часа (табл. 2).

Продукт реакции детектировался методом вертикального электрофореза в 8%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) (соотношение акриламида/бисакриламида 19/1). Результаты электрофореза визуализировались после окрашивания геля раствором бромистого этидия на документирующей системе GelDoc фирмы BIO-RAD (США) в УФ-излучении с длиной волны 312 нм.

Интерпретацию результатов проводили на основании длин фрагментов, идентифицируемых на электрофорезе. Электрофореграмма представляет из себя паттерн полос, соответствующих различным нормальным

Таблица 1

Праймеры и условия амплификации, применявшиеся для детекции частых мутаций гена *LAMA2* и *LMNA/C*

Детектируемая мутация	Последовательность олигонуклеотидов (5' → 3')	t отжига	MgCl <sub>2</sub> , mM
с.2049_2050del	GAAAGGAATTTATGACAGTGCTTGC GCTTTGGGATGGATGCCATCTTC	63°C	4
с.6488delA	GCATTCGAACATACAAACCAGAAATC GGAAGTTACAATAATATTGTTGTCAAGC		
с.7536delC	GAACCTCCGTACAATATACTCAGTAGTC GATGTTCCCTGGAGGTTGGTCTG		
с.7732C>T	GACACCAGCACCCACCTAGGAGAAAA GTATCATTTATTTCTCCTCTCATCTTG		
с.7750-1713_7899-2153del	GCAGAGAAACTAGAAACAACCC GAGATGGTATTAGAAAGAAATCATAAGAG GAAACTCTAAGAATCAGCCACTG		
с.8007delT	GCTTTTCGTTGGGGGTGCTC ACTCAGAAATATTCCTCCTTTTGAAG		
с.94_96del	GCCAGCTCCACTCCGCTGTC GATCGCTTGGCGGTCTACATC		

Таблица 2

#### Эндонуклеаза рестрикции

Эндонуклеаза	Замена	Сайт узнавания	Аллель	Длины фрагментов после рестрикции, п.н.
NlaIII	с.7732C>T	5'.....CATG↓...3 3'...↑GTAC.....5	C T	172+110 147+110+25

или мутантным аллелям гена. По наличию/отсутствию полос с длинами, соответствующими нормальной/мутантной последовательности, судили о наличии/отсутствии конкретной мутации в генотипе пробанда.

### Результаты и обсуждение

Ген *LAMA2*, кодирующий  $\alpha 2$ -цепь мерозина, расположен на длинном плече хромосомы 6 (локус 6q22-q23), его протяженность составляет 633,43 т.п.н. Ген состоит из 65 экзонов. К настоящему моменту идентифицировано более 200 различных мутаций гена *LAMA2* (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=LAMA2>).

Поиск мутаций этого гена методом прямого автоматического секвенирования является долгой, трудоемкой и дорогостоящей процедурой. Однако, как показал анализ описанных на сегодняшний день мутаций гена *LAMA2*, представленных в Leiden Open Variation Database (<http://www.dmd.nl/>), для ВМД1А, как и для любого рецессивного заболевания, характерно наличие частых мутаций. Было принято решение о разработке эффективной, дешевой и информативной системы для поиска наиболее частых мутаций гена *LAMA2*. Из базы данных Leiden Open Variation Database были отобраны две мутации со сдвигом рамки считывания в экзонах 46 и 57, описанные в европейской популяции 15 и 11 раз соответственно: с.6488delA и с.8007delT и крупная делеция экзона 56 (с.7750-1713\_7899-2153del), выявленная у 31%

португальских больных [9]. Кроме того, был проведен ретроспективный анализ результатов прямого автоматического секвенирования гена *LAMA2* в образцах ДНК российских пробандов, обратившихся за ДНК-диагностикой в период с 2000 по 2015 гг. Были выбраны мутации, встретившиеся более чем на двух хромосомах неродственных больных: с.2049\_2050delAG (встретилась на 4 хромосомах), с.7536delC (на 8 хромосомах) и с.7732C>T (на 3 хромосомах). Все отобранные мутации были ранее описаны.

Дополнительно в систему была включена ранее описанная мутация с.94\_96delAAC экзона 1 гена *LMNA*, неоднократно выявленная у российских больных с ВМД при проведении ДНК-диагностики [7].

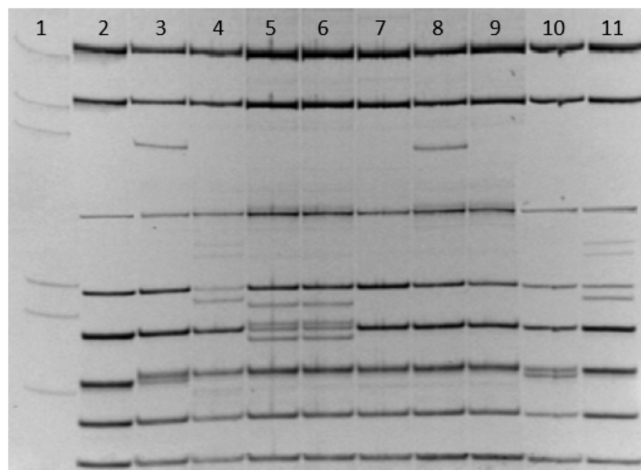
Была разработана система детекции шести частых мутаций гена *LAMA2* и одной мутации гена *LMNA* методом анализа ПДАФ и ПДРФ. На рисунке представлены результаты визуализации продуктов мультиплексной ПЦР/ПДРФ с использованием вертикального электрофореза в ПААГ. В табл. 3 приведены длины фрагментов, соответствующих нормальным и мутантным аллелям.

Информативность системы была определена на основании частот встречаемости, вошедших в неё мутаций у российских пробандов с ВМД1А. Мутации, входящие в систему, были выявлены на 15 хромосомах у 26 неродственных пробандов [8]. Таким образом, информативность диагностики ВМД1А с использованием новой медицинской технологии «Система детекции в одной пробирке частых мутаций при врожденных не-синдромальных мышечных дистрофиях» составляет 28,8%.

С использованием новой медицинской технологии были исследованы образцы ДНК 1000 здоровых человек, взятые из банка ДНК лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ». В двух образцах были выявлены мутации с.7536delC (p.Asp2513Ilefs\*34) и с.2049\_2050del2 (p.Arg683Serfs\*21) в гетерозиготном состоянии. Таким образом, частота носительства мутаций, входящих в систему частых составляет 1:500 чел. Так как доля мутаций, входящих в систему частых от всех мутаций гена *LAMA2* у российских больных составляет 28,8% (с 11,6—47,8%) [8], по закону Харди—Вайнберга определена популяционная частота носительства мутаций гена *LAMA2* — 1:144 здоровых жителей РФ. Исходя из этого, расчетная частота ВМД1А в России составляет 1:83 000 (95% ДИ 1:59 000—1:239 000) новорожденных.

Точная частота врожденной мерозин-негативной мышечной дистрофии определена впервые в мире. Расчетная частота ВМД1А в России (1:83 000 новорожденных) совпадает с мировыми данными о частотах встречаемости врожденных мышечных дистрофий (0,8:100 000 новорожденных).

Таким образом, впервые разработана и внедрена в практику медицинская технология детекции в одной пробирке шести повторяющихся мутаций гена *LAMA2*: с.2049\_2050del2, с.6488delA, с.7536delC, с.7732C>T,



Визуализация результатов анализа частых мутаций при ВМД:  
 Дорожка 1. Маркер молекулярного веса I/PstI  
 Дорожка 2. Мутация с.7536delC в гомозиготном состоянии  
 Дорожка 3. Мутации с.7536delC и с.7732C>T в компаунд-гетерозиготном состоянии  
 Дорожка 4. Мутация в гене *LMNA* в гетерозиготном состоянии  
 Дорожка 5. Мутация с.2049\_2050del в гетерозиготном состоянии  
 Дорожка 6. Мутация с.2049\_2050del в гетерозиготном состоянии  
 Дорожка 7. Норма  
 Дорожка 8. Мутация с.7732C>T в гетерозиготном состоянии  
 Дорожка 9. Норма  
 Дорожка 10. Мутация с.7536delC в гетерозиготном состоянии  
 Дорожка 11. Мутация в гене *LMNA* в гетерозиготном состоянии.

Мутации генов *LAMA2* и *LMNA*, вошедшие в систему частых, и интерпретация результатов

Ген, экзон	Мутация	Детектируемый аллель	Длина	Статус точки
<i>LAMA2</i> , EX46	p.Lys2163Argfs*12	c.6488delA	59	Мутация
			60	Норма
<i>LAMA2</i> , EX57	p.Gln2670Asnfs*58	c.8007delT	67	Мутация
			68	Норма
<i>LAMA2</i> , EX54	p.Asp2513Ilefs*34	c.7536delC	74	Мутация
			75	Норма
<i>LAMA2</i> , EX14	p.Arg683Serfs*21	c.2049_2050del2	81	Мутация
			83	Норма
<i>LMNA/C</i> , EX1	p.Lys32del	c.94_96del3	90	Мутация
			93	Норма
<i>LAMA2</i> , EX55	p.Arg2578*	c.7732T	147+110+25*	Мутация
		c.7732C	172+110	Норма
<i>LAMA2</i> , EX56	ex56del	Ex56	347	Норма
		c.7750-1713_7899-2153del	437	Мутация

Примечание. \* — фрагмент, соответствующий длине 25 п.н. выходит из геля и не визуализируется на фореze

c.7750-1713\_7899-2153del, c.8007delT и одной мутации гена *LAMINA/C* — c.94\_96del3, ответственных за несиндромальные ВМД. Технология была применена для точной оценки популяционной частоты ВМД1А и определения частот носительства мутаций гена *LAMA2* у жителей РФ.

Показаниями для использования технологии являются:

1. Поиск молекулярно-генетических причин ВМД в отягощенных семьях;
2. Диагностика гетерозиготного носительства ВМД 1А у родственников больного;
3. Проведение пренатальной диагностики в отягощенных семьях;
4. Популяционные исследования частот носительства ВМД1А.

Противопоказания для использования данной технологии отсутствуют.

Дороговизна и длительность анализа всей последовательности генов придает особую значимость разработке систем поиска повторяющихся мутаций, ответственных за несиндромальные ВМД. Система детекции шести частых мутаций гена *LAMA2*: c.2049\_2050del2, c.6488delA, c.7536delC, c.7732C>T, c.7750-1713\_7899-2153del, c.8007delT и одной мутации гена *LAMINA/C* — c.94\_96del3 позволяет выявить причину ВМД, не прибегая к секвенированию всей последовательности генов *LAMA2* и *LAMINA/C*, что снижает финансовые и временные затраты на проведение ДНК-диагностики данного заболевания.

Применение технологии «Система детекции в одной пробирке частых мутаций при врожденных несиндромальных мышечных дистрофиях» позволило впер-

вые в мире определить частоту носительства мутаций гена *LAMA2*, которая у жителей РФ составила 1:144, и рассчитать частоту врожденной мышечной дистрофии типа 1А — 1:83 000 новорожденных (95% ДИ 1:59 000—1:239 000).

### Список литературы

1. Sparks S, Quijano-Roy S, Harper A, et al. Congenital Muscular Dystrophy Overview. 2001 Jan 22 [Updated 2012 Aug 23]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. Gene Reviews® [Internet]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1291/>
2. Mendell JR, Boue DR, Martin PT. The Congenital Muscular Dystrophies: Recent Advances and Molecular Insights. Pediatric and developmental pathology: the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society. 2006;9(6):427-443.
3. Дадали Е.Л., Руденская Г.Е., Шагина О.А. и др. Мерозин-дефицитная врожденная мышечная дистрофия. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2010;110(3):83-89.
4. Mostacciuolo ML, Miorin M, Martinello F, et al. Genetic epidemiology of congenital muscular dystrophy in a sample from north-east Italy. Human Genetic. 1996 Mar; 97(3):277-279.
5. Darin N, Tulinius M. Neuromuscular disorders in childhood: a descriptive epidemiological study from western Sweden. Neuro-muscular Disorder. 2000;10:1-9.
6. 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; 10:91-4.
7. Дадали Е.Л., Шаркова И.В., Адян Т.А. и др. Клинико-генетические характеристики больных с врожденной мышечной дистрофией, обусловленной мутациями в гене *LMNA*. Журнал

неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2016;116(1):70-75.

8. Миловидова Т.Б., Дадали Е.Л., Руденская Г.Е., Поляков А.В. Молекулярно-генетическая диагностика врожденной мышечной дистрофии типа 1А (мерозин-негативной) в России. Тезисы VII Съезда Российского общества медицинских генети-

ков, Санкт-Петербург, 19-23 мая 2015 г., Медицинская генетика, 2015;14(3): 42

**Информация о конфликте интересов**

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

**Population frequency of *LAMA2* gene mutations among residents of the Russian Federation by medical technology «Detection system in one test tube for frequent mutations at congenital muscular dystrophies»**

**Milovidova T.B., 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

Congenital Muscular Dystrophies (CMD) is the group of the neuromuscular diseases which are characterized by heavy hypotonia, muscular weakness and contractures. Incidence of CMD is estimated as 0,8 on 100 000, and the contribution of congenital muscular dystrophy, merozin-negative (CMD1A) makes in 30–40% of cases of CMD in the European countries. However, the exact frequency of CMD1A and frequency of a carriage of this disease are at the moment not determined. Frequent mutations of *LAMA2* gene are revealed that has allowed to create effective system of molecular and genetic diagnostics CMD1A in the burdened families. The medical technology «Detection system in one test tube for frequent mutations at congenital muscular dystrophies» is introduced in practice. The assessment of population frequency of six mutations in *LAMA2* gene among residents of the Russian Federation and settlement frequency of CMD1A disease which has made 1 on 83 000 newborns is for the first time carried out.

**Key words:** congenital muscular dystrophy, CMD1A, system of *LAMA2* gene frequent mutations