

ДНК-диагностика атаксии Фридрейха с использованием новой медицинской технологии «Способ поиска экспансии GAA-повтора гена *FXN*, ответственного за атаксию Фридрейха»

Галеева Н.М., Миронович О.Л., 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

В работе представлены результаты молекулярно-генетического исследования 201 пробанда, направленного в лабораторию ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ» для поиска частых мутаций в гене *FXN* в период с 01.01.2014 по 01.03.2016. Для ДНК-диагностики использовалась внедренная в практическую деятельность ФГБНУ «МГНЦ» новая медицинская технология. Установлено, что применение данной технологий делает более эффективным медико-генетическое консультирование отягощенных семей, позволяет с наименьшими временными и материально-техническими затратами провести ДНК-диагностику атаксии Фридрейха (АФ), в том числе диагностику носительства для родственников пробанда и пренатальную диагностику в отягощенных семьях.

Ключевые слова: атаксия Фридрейха, *FXN*, экспансия, гетерозиготное носительство

Введение

АФ — это нейродегенеративное заболевание с ауто-сомно-рецессивным типом наследования. Является наиболее распространенной наследственной атаксией. Частота встречаемости данной болезни в различных странах составляет 2—7 на 100 000 населения, средняя частота носительства 1/120 [1, 2].

Первые симптомы заболевания возникают обычно в первой-второй декаде жизни. Они характеризуются сочетанием типичных неврологических и экстра-невральных проявлений. Сначала появляется атаксия при ходьбе (неловкость, неуверенность, пошатывание, спотыкание), затем присоединяются нарушение координации в руках, изменение почерка, слабость в ногах, дизартрия. Ранним и важным признаком АФ является исчезновение сухожильных и надкостничных рефлексов (в первую очередь ахилловых и коленных), которое затем приводит к тотальной арефлексии. Наблюдаются нарушение глубокой (суставно-мышечной и вибрационной) чувствительности, мышечная гипотония. Постепенно нарастают мозжечковая и сенситивная атаксия, слабость и атрофия мышц ног. В поздней стадии болезни парезы, амиотрофии и расстройства глубокой чувствительности распространяются на руки. Больные перестают самостоятельно ходить и обслуживать себя. В ряде случаев наблюдаются нистагм, снижение слуха, атрофия зрительных нервов, нарушение функций тазовых органов, деменция (слабоумие). К экстра-невральным проявлениям относятся: кардиомиопатия (более чем у 90% больных); скелетные деформации: сколиоз, «стопа Фридрейха» (высокий вогнутый свод стопы с переразгибанием пальцев в основных фалангах и сгибанием в дистальных), деформация пальцев рук и ног; эндокринные

расстройства (сахарный диабет, гипогонадизм, инфантилизм, дисфункция яичников); катаракта. АФ характеризуется неуклонно прогрессирующим течением, длительность болезни обычно не превышает 20 лет. Непосредственными причинами смерти могут быть сердечная и легочная недостаточность, инфекционные осложнения [1—3].

Ген фратаксина (*FXN*), ответственный за развитие АФ, картирован в локусе 9q13-q21.1. В интроне 1 этого гена содержится нестабильная последовательность тринуклеотидных повторов (GAA). В норме регистрируется от 7 до 22 GAA-повторов, а в 98% случаев у больных АФ на обоих хромосомах присутствует от 200 до 1700 (наиболее часто от 700 до 800) GAA-повторов. В оставшихся 2% случаев АФ может являться результатом компаунд-гетерозиготного носительства экспансии и точковых мутаций в гене *FXN*. Мутантные аллели нестабильны, что обычно приводит к нарастанию степени экспансии (увеличению числа повторов) при передаче от родителей к детям. Трудности детекции экспансии связаны с необходимостью визуализации длинного (более 2500 т.п.н.) фрагмента ДНК, для чего необходимо использование дорогостоящих и трудоемких методов молекулярно-генетического анализа: ПЦР длинных фрагментов (Long-Range PCR) или Сайзер-блоттинг [4, 5].

Высокая частота заболевания, высокий генетический риск в отягощенных семьях и наличие мажорной мутации делают актуальной задачей разработку диагностических систем поиска экспансии GAA-повторов гена *FXN* в гомо- и гетерозиготном состоянии с целью снижения стоимости ДНК-диагностики и временных затрат на её проведение.

Праймеры и условия амплификации,
применявшиеся для ПЦР-реакции при качественной детекции экспансии GAA-повтора (этап 1)

Последовательность праймеров, 5' → 3'	t отжига
AFFCTTTGGGATTGGTTGCCAGTGC AFRGACCATCATGGCCACACTTGCC SDHBBFACTCCTGAGGAGAAGTCTGCC SDHBBRAAGTGCCCTTGAGGTTGTCC	60°C

Материалы и методы

В период с 01.01.2014 по 01.03.2016 с использованием новой медицинской технологии исследованы образцы ДНК 201 человека, из них 120 чел. были направлены на диагностику атаксии, 81 чел. обследовались с целью выявления носительства, имея большого родственника или являясь донором половых клеток для экстракорпорального оплодотворения (ЭКО).

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

Для диагностики атаксии Фридрейха в практику ФГБНУ «МГНЦ» внедрена медицинская технология: «Способ поиска экспансии GAA-повтора гена *FXN*, ответственного за атаксию Фридрейха». Данная технология включает в себя два этапа. На первом этапе с помощью мультиплексного ПЦР-ПДАФ анализа детектируется экспансия в гомозиготном состоянии. На втором этапе методом фрагментного анализа осуществляется поиск экспансии в гетерозиготном состоянии. Таким образом, технология позволяет выявить экспансию GAA-повтора гена *FXN* как в гомозиготном, так и в гетерозиготном состоянии.

На первом этапе производят детекцию коротких аллелей методом мультиплексной ПЦР, включающей фрагмент соответствующий представляющей интерес области интрона 1 гена *FXN*, и контрольный фрагмент — экзон 1 гена *HBB*, в качестве контроля прохождения амплификации.

Дизайн праймеров осуществлен в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ МГНЦ, синтез — в ЗАО «Евроген», Москва.

Последовательности праймеров, входящих в реакцию, выбирали согласно базе данных GeneBank. Использованы последовательность гена *FXN1*, фланкирующая GAA повтор в интроне 1, и последовательность экзона 1 контрольного гена *HBB* (табл. 1).

Реакционную смесь для ПЦР готовили по следующей схеме: в 23 мкл смеси, содержащей 1х реакционный буфер (67 мМ Tris-HCl, 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween-20), 0,25 мкМ каждого олигопраймера, 250 мкМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата, 4 мМ MgCl₂, 1,5 единицы термофильной ДНК-полимеразы Biotaq («БиоМастер»), добавляли 2 мкл ДНК.

ПЦР проводили под минеральным маслом на программируемом термоциклере Терцик (ДНК-технология,

Россия) в следующем режиме: первоначальная денатурация при 95°C — 5 мин, затем 30 циклов смены температур: 94°C — 2 с, температура отжига праймеров 60°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 вертикального электрофореза в 8% ПААГ (соотношение акриламида/бисакриламида 29/1). Результаты электрофореза визуализируются после окрашивания геля раствором бромистого этидия с помощью документирующей системы 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 собой набор полос, соответствующих экзону 1 контрольного гена *HBB* и нормальным аллелям гена *FXN*. Аллель гена *FXN*, содержащий экспансию тринуклеотидных повторов, не амплифицируется (рис. 1). По наличию/отсутствию полос с длинами, соответствующих нормальной последовательности, судят о наличии/отсутствии аллеля с нормальным числом GAA-повторов гена *FXN* в генотипе пробанда (табл. 2).

На втором этапе исследуются образцы, в которых не зарегистрирована экспансия в гомозиготном состоянии на первом этапе диагностики. Для детекции GAA-экспансии гена *FXN* в гетерозиготном состоянии разработана трехпраймерная система выявления увеличения числа повто-

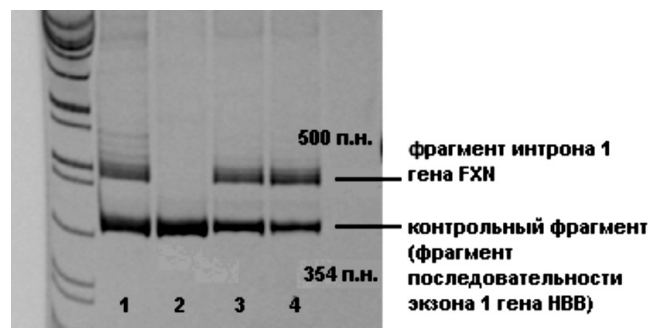


Рис. 1. Детекция коротких аллелей методом ПЦР с последующим разделением продукта в полиакриламидном геле. В образцах 1,3,4 детектирован аллель с нормальным числом GAA повторов. В образце 2 отсутствует аллель с нормальным числом повторов, присутствует только продукт амплификации контрольного гена *HBB*.

ров, в которой один из праймеров одновременно комплементарен повтору и FAM-меченному праймеру. Такая система позволяет идентифицировать экспансию методом фрагментного анализа на генетическом анализаторе.

Дизайн праймеров, включая FAM-меченный праймер, осуществлен в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ», синтез — в НПК «Синтол» (Москва), ЗАО «Евроген» (Москва). Последовательности праймеров, входящих в реакцию, выбирали согласно базе данных Gene Bank.

ПЦР проводили на программируемом плащечном термоциклере T100™ ThermalCycler («Bio-Rad») с использованием ДНК-полимеразы Biotaq («БиоМастер») и трех праймеров, один из которых мечен FAM (табл. 3).

Реакционную смесь для ПЦР готовили по следующей схеме: в 23 мкл смеси, содержащей 1х реакционный буфер (67 мМ Tris-HCl, 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween-20), 0,25 мкМ каждого олигопраймера, 250 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 2 мМ MgCl₂, 40 мкМ бетаина, 2,5 единицы термофильной ДНК-полимеразы, добавляли 2 мкл ДНК.

ПЦР осуществляли в следующем режиме: первоначальная денатурация при 95°C — 12 мин, затем 45 циклов смены температур: 94°C — 45 с, температура отжига праймеров 65°C — 45 с, элонгация цепи 72°C — 1 мин 30 с; заключительная элонгация 72°C — 7 мин.

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

Полученная методом фрагментного анализа электрофореграмма представляет собой паттерн сигналов. Каждый пик — это фрагмент ДНК с разным количеством повторов. Аллель с экспансией — непрерывный лидер таких пиков, выходящий за пределы границ нормы (рис. 2, табл. 4).

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования всем пробандам проведена диагностика с использованием мультиплексной ПЦР, позволяющая выявить гомозигот по экспансии GAA-повтора гена *FXN*.

Мутация в гомозиготном состоянии обнаружена у 14 больных (рис. 1). В оставшихся 187 образцах присутствовал продукт амплификации фрагмента с GAA-повтором. В этих образцах имелся как минимум один аллель, содержащий нормальное число повторов. Для поиска экспансии гена *FXN* у этих пробандов в гетерозиготном состоянии был проведен второй этап исследования с использованием трехпраймерной ПЦР с последующим фрагментным анализом на генетическом анализаторе.

В результате второго этапа исследования экспансия в гетерозиготном состоянии выявлена у семи обследуемых: шесть из них являлись родственниками больных и один донором половых клеток для ЭКО. Ни у одного пациента с направляющим диагнозом *атаксия Фридрейха* экспансии в гетерозиготном состоянии выявлено не было.

Трехпраймерная ПЦР позволяет выявить нормальное количество повторов, экспансию в гетерозиготном и гомозиготном состоянии. Однако последние два состояния не всегда можно визуально различить (рис. 2, образец 3). Поэтому в диагностике АФ оба этапа должны использоваться в комплексе.

Таким образом, число больных с подтвержденным молекулярно-генетическими методами диагнозом *«атаксия Фридрейха»*, т.е. с мутацией в гомозиготном состоянии, оказалось существенно ниже ожидаемого с учетом того, что экспансия GAA-повтора является причиной 98% случаев АФ. Возможно, это связано с трудностями дифференциальной диагностики атаксий на клиническом этапе обследования, в том числе наличием большого числа фе-

Таблица 2

Интерпретация результатов этапа 1

Ген	Детектируемый фрагмент	Статус	Длина, п.н.
<i>FXN</i>	(GAA) _n n=7-22/(GAA) _n n=7-22	норма/норма	~500 (464-542)
	(GAA) _n n=200-900/(GAA) _n n=7-22	мутация/норма	~500 (464-542)
	(GAA) _n n=34-61/(GAA) _n n=7-22	премутация/норма	~600 (545-626) / ~500 (464-542)
	(GAA) _n n=34-61/(GAA) _n n=200-900	премутация/мутация	~600 (545-626)
	(GAA) _n n=200-900/(GAA) _n n=200-900	мутация/мутация	Не амплифицируется
HBB	EX1	Контроль амплификации	354

Таблица 3

Праймеры и условия амплификации, применявшиеся для трехпраймерной ПЦР-реакции (этап 2)

Последовательность праймеров, 5' → 3'	t отжига
F-Fam: GTTCGTACGTGAATCGCGGTAC AF FL: GTTCGTACGTGAATCGCGGTAC AAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGA AFR: GACCATCATGGCCCACTTGCC	65°C

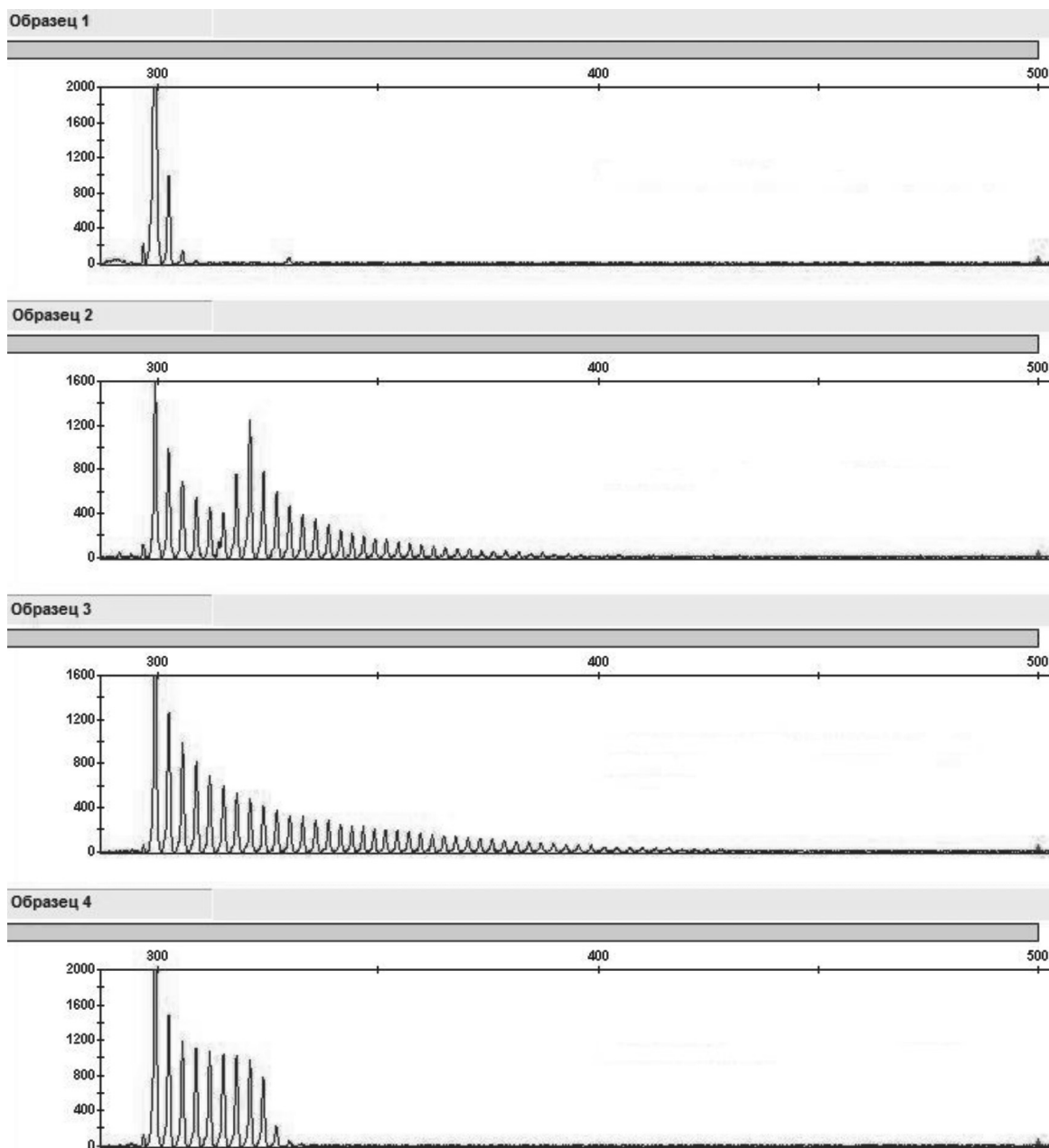


Рис. 2. Детекция экспансии методом трехпраймерной ПЦР.

В образцах 1 и 4 число GAA повторов гена *FXN* соответствует нормальному. В образце 2 число GAA повторов увеличено на обеих хромосомах, в образце 3 число повторов увеличено по крайней мере на одной из хромосом.

Интерпретация результатов этапа 2

Таблица 4

Ген	Детектируемый фрагмент	Статус	Длина, п.н.
<i>FXN</i>	(GAA) <i>nn</i> =7-22/(GAA) <i>nn</i> =7-22	норма/норма	До 350
	(GAA) <i>n</i> n=200-900/(GAA) <i>n</i> n=7-22	мутация/норма	>871
	(GAA) <i>n</i> n=34-61/(GAA) <i>n</i> n=7-22	премутация/норма	370-451
	(GAA) <i>n</i> n=34-61/(GAA) <i>n</i> n=200-900	премутация/мутация	>871
	(GAA) <i>n</i> n=200-900/(GAA) <i>n</i> n=200-900	мутация/мутация	>871

нокопий ненаследственной природы. С другой стороны, так как АФ является самой частой наследственной атаксией, оправдан первоочередный поиск мажорной мутации в гене *FXN* у любого пробанда с атаксиями при отсутствии семейного анамнеза болезни.

Впервые в России разработан и внедрен в практику способ детекции экспансии GAA-повторов гена *FXN*, позволяющий выявлять мутацию в гомо- и гетерозиготном состоянии.

Разработанный способ детекции экспансии тринуклеотидных повторов гена *FXN* повышает эффективность диагностики наследственных атаксий. Позволяет оптимизировать финансовые и временные затраты поиска генетического варианта в семьях с АФ.

Новая методика может быть использована, для подтверждающей диагностики АФ в том числе и на ранних стадиях заболевания, диагностики носительства, проведения пренатальной диагностики в отягощенных семьях.

Показаниями к использованию данной технологии являются:

1. Поиск молекулярно-генетических причин АФ в отягощенных семьях;
2. Диагностика гетерозиготного носительства АФ;
3. Проведение пренатальной диагностики в отягощенных семьях;
4. Популяционные исследования частот носительства АФ;

5. Скрининг гетерозиготного носительства у доноров, участвующих в программе ЭКО.

Противопоказания для использования технологии «Способ поиска экспансии GAA-повтора гена *FXN*, ответственного за атаксию Фридрейха» отсутствуют.

Список литературы

1. Anheim M, Fleury M, Monga B et al. Epidemiological, clinical, paraclinical and molecular study of a cohort of 102 patients affected with autosomal recessive progressive cerebellar ataxia from Alsace, Eastern France: implications for clinical management. *Neurogenetics*. 2010 11(1):1-12.
2. Delatycki MB, Williamson R, Forrest SM. Friedreich ataxia: an overview. *J Med Genet*. 2000 37(1):1-8.
3. De Biase I, Rasmussen A, Endres D et al. Progressive GAA expansions in dorsal root ganglia of Friedreich's ataxia patients. *Ann Neurol*. 2007 61(1):55-60.
4. De Biase I, Rasmussen A, Monticelli A et al. Somatic instability of the expanded GAA triplet-repeat sequence in Friedreich ataxia progresses throughout life. *Genomics*. 2007 90(1):1-5.
5. Potdar P.D., Raghu A. Review on Molecular Diagnostic Techniques in Friedreich's Ataxia. *Annual Review & Research in Biology*. 2013 3(4): 659-677.

Информация о конфликте интересов

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

DNA diagnosis of Friedreich's ataxia using a new medical technology «Detection GAA expansion in *FXN* gene, liability for Friedreich's ataxia»

Galeeva N.M., Mironovich O.L., 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

Since 01.01.2014 to 01.03.2016 the most common *FXN* gene mutation was investigated in 201 patients of DNA Diagnostics Laboratory of the Research Centre of Medical Genetics. There are results in current study. The new medical technology introduced into practice at the Centre of Medical Genetics was used. It was found that this technology makes more effective a medical and genetic counseling of families affected by Friedreich's ataxia. It permits to carry out genetic test of Friedreich's ataxia, including carrier screening for proband's relatives and prenatal diagnosis, more quickly and with lower maintenance costs.

Key words: Friedreich's ataxia, *FXN*, expansion, heterozygous carrier