

Результаты использования новой медицинской технологии «Система детекции наиболее частых мутаций гена *FGFR3*, ответственного за ахондроплазию и гипохондроплазию» в ДНК-диагностике

Вассерман Н.Н., 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

Ахондроплазия — это аутосомно-доминантное врожденное заболевание, в основе патогенеза которого лежит нарушение процессов энхондрального окостенения на фоне нормальных процессов эпистального и периостального окостенений. Основным фенотипическим признаком является карликовость за счет недоразвития длинных костей, сопровождающаяся аномалиями строения черепа и тазовых костей. Гипохондроплазия — форма карликовости, имеющая сходный патогенез с ахондроплазией, но проявляющееся менее выраженными скелетными аномалиями. Причиной ахондроплазии и гипохондроплазии являются различные мутации одного гена — *FGFR3*, кодирующего фактор роста фибробластов. Частота ахондроплазии составляет 1 на 100 000 новорожденных, частота гипохондроплазии на сегодняшний день точно не установлена, так как из-за мягкости проявлений она часто не диагностируется. В работе представлены результаты ДНК-диагностики 200 пробандов с ахондроплазией и гипохондроплазией с использованием новой медицинской технологии «Система детекции наиболее частых мутаций гена *FGFR3*, ответственного за ахондроплазию и гипохондроплазию».

Ключевые слова: ахондроплазия, гипохондроплазия, *FGFR3*, мультиплексная лигазная реакция

Введение

Ахондроплазия — это аутосомно-доминантное врожденное заболевание, в основе патогенеза которого лежит нарушение процессов энхондрального окостенения на фоне нормальных процессов эпистального и периостального окостенений. Основным фенотипическим признаком является карликовость за счет недоразвития длинных костей, сопровождающаяся аномалиями строения черепа и тазовых костей. Больные имеют низкий рост (при рождении — 46—48 см, у взрослых — 120—130 см), большой череп с выступающим затылком, западающую переносицу, прогнатизм у взрослых. Конечности укорочены за счет проксимальных отделов, широкие и короткие кисти, пальцы расположены в виде трезубца, часто у больных наблюдается изодактилия, выражен поясничный лордоз. Дети отстают в двигательном развитии. Интеллект, как правило, нормальный. Рентгенологически выявляется диспропорция лицевой и мозговой частей черепа, укорочение основания черепа, уменьшение затылочного отверстия. Трубчатые кости укорочены и утолщены, типичная форма таза — развернутые крылья подвздошной кости, крыша вертлужных впадин утолщена [1, 2].

Гипохондроплазия — форма карликовости, имеющая сходный патогенез с ахондроплазией, но проявляющееся менее выраженными скелетными аномалиями. В отличие от ахондроплазии, при гипохондроплазии голова и лицо нормальных размеров, строение таза нор-

мальное. Пальцы короткие, но их расположение нормальное, а не в форме трезубца, как при ахондроплазии. Нет искривления большеберцовой кости. Нет неврологических нарушений. Малая берцовая кость не укорочена. У больных широкие кисти и стопы. Спинномозговой канал сужается в каудальном направлении. Расстояние между корнями дужек поясничных позвонков в каудальном направлении не суживается, как при ахондроплазии, но и не расширяется, как в норме, а остается примерно одинаковым. У больных рентгенологически выявляются вогнутые контуры задней поверхности поясничных позвонков, укорочение и утолщение плечевых и бедренных костей, «квадратная» форма эпифизов коленных суставов, укорочение локтевой кости в области лучезапястного сустава. Симптомы заболевания проявляются в 3—4 года [3].

Причиной ахондроплазии и гипохондроплазии являются различные мутации одного гена — *FGFR3*. Ген картирован на хромосоме 4p16.3. Ген *FGFR3* является членом семьи генов рецепторов факторов роста фибробластов — (fibroblast growth factor receptor 3). Он имеет длину 16,5 т.п.н. и состоит из 19 экзонов.

Частота ахондроплазии составляет 1 на 100 000 новорожденных, частота гипохондроплазии на сегодняшний день точно не установлена, так как из-за мягкости проявлений она часто не диагностируется [4, 5].

За развитие обоих заболеваний ответственны мутации в «горячих» точках гена *FGFR3*: 99% случаев ахонд-

роплазии обусловлено мутацией в кодоне 380 приводящей к аминокислотной замене Gly380Arg и являющейся следствием нуклеотидных замен с.1138G>A или с.1123G>C [1]. В редких случаях встречается мутация с.1123G>T, проводящая к аминокислотной замене Gly375Cys [6]. Половина случаев гипохондроплазии обусловлена мутациями, приводящими к аминокислотной замене в кодоне 540: Asn540Lys (с.1620C>A, с.1620C>G), Asn540Ser (с.1619A>C) и Asn540Thr (с.1619A>C) [7]. Показано, что причиной 80% случаев данных болезней являются мутации *de novo*, происходящие, как правило, в процессе сперматогенеза [1, 6, 7].

Вероятность передачи ахондроплазии и гипохондроплазии из поколения в поколение составляет 50%. Для данных форм карликовости особенно важны своевременная постановка и подтверждение диагноза на молекулярно-генетическом уровне, так как они не поддаются терапии соматотропным гормоном, зато достигнуты хорошие результаты хирургического удлинения трубчатых костей с использованием аппарата Илизарова [8–10].

Высокий генетический риск, особенности терапии данных форм карликовости, обуславливают необходимость разработки диагностических систем, позволяющих быстро и точно провести ДНК-диагностику ахондроплазии и гипохондроплазии, в том числе и пренатальную диагностику в отягощенных семьях.

Материалы и методы

В период с 10.01.2014 по 01.02.2016 в лабораторию ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ» было направлено 200 неродственных больных с карликовостью. Из них 120 пробандов с предполагаемым диагнозом *ахондроплазия* и 80 с диагнозом *гипохондроплазия*.

ДНК была 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 ахондроплазии и гипохондроплазии в практику ФГБНУ «МГНЦ» была внедрена медицинская технология: «Система детекции наиболее частых мутаций гена *FGFR3*, ответственного за ахондроплазию и гипохондроплазию». В основу данной технологии положена мультиплексная проба-зависимая лигазная реакция с последующей амплификацией (Multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA), представленная впервые в 2002 г. компанией-разработчиком MRC-Holland [11].

Последовательности проб, входящих в реакции, выбирали согласно базе данных GeneBank. В медицинской технологии использованы последовательности гена *FGFR3*, фланкирующие мутации с.1138G>A, с.1138G>C, с.1123G>T, с.1620C>A, с.1620C>G, с.1619A>G, с.1619A>C (табл. 1).

Длина амплифицированных фрагментов составляет от 82 до 115 п.н.

Таблица 1

Пробы, применявшиеся для детекции мутаций гена *FGFR3*

Название олигонуклеотида	Последовательность олигонуклеотидов (5' → 3')
1619Rmg	GCTGCTGGGCGCCTGCAC TTTTGTATC GATGCGATCCGATGCCTTCATG
1619Rma	ACTGCTGGGCGCCTGCACG TTATTTGTTATTC GATGCGATCCGATGCCTTCATG
1620FMG-	GTTTCGTACGTGAATCGCGGTAC T CGGGAAACACAAAAACATCATCAAG
1620FMG+	GTTTCGTACGTGAATCGCGGTAC TTT CGGGAAACACAAAAACATCATCAAG
1619R	CCTGCTGGGCGCCTGCAC TTATTGTTTATTCTTTTATC GATGCGATCCGATGCCTTCATG
1619FMG	GTTTCGTACGTGAATCGCGGTAC gtt GATCGGGAAACACAAAAACATCATCAG
1619FMC	GTTTCGTACGTGAATCGCGGTAC GTTTAT GATCGGGAAACACAAAAACATCATCAC
1619FN	GTTTCGTACGTGAATCGCGGTAC GATCGGGAAACACAAAAACATCATCAA
1620R	CTGCTGGGCGCCTGCACG TATTGTTTATTC GATGCGATCCGATGCCTTCATG
1620FMG	GTTTCGTACGTGAATCGCGGTAC TT CGGGAAACACAAAAACATCATCAAG
1620FMA	GTTTCGTACGTGAATCGCGGTAC TT GATCGGGAAACACAAAAACATCATCAA
1620FN	GTTTCGTACGTGAATCGCGGTAC GGGAAACACAAAAACATCATCAAC
380R	GTAGCTGAGGATGCCTGCATACAC tttc GATGCGATCCGATGCCTTCATG
380FMC	GTTTCGTACGTGAATCGCGGTAC TT CAGGAAGAAGCCACCCG
380FMA	GTTTCGTACGTGAATCGCGGTAC TT GAACAGGAAGAAGCCACCCCT
380FN	GTTTCGTACGTGAATCGCGGTAC AGGAAGAAGCCACCCG
375R	GCATCCTCAGCTACGGGGT GATGCGATCCGATGCCTTCATG
375FM	GTTTCGTACGTGAATCGCGGTAC TT GGCGGGCAGTGTGTATGCAT
375FN	GTTTCGTACGTGAATCGCGGTAC GCGGGCAGTGTGTATGCAG

Лигазную реакцию проводили на программируемом термоциклере Терцик (ДНК-технология, Россия) 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 гАТФ, 1 mM DTT), 19 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 минут, затем лигирование при 65°C — 3 часа.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на программируемом термоциклере Терцик (ДНК-технология, Россия) с использованием ДНК-полимеразы Biotaq («БиоМастер») и пары универсальных праймеров (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 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 вертикального электрофореза в 8%-ном полиакриламидном

геле (ПААГ) (соотношение акриламида/бисакриламида 19/1). Результаты электрофореза визуализировали после окрашивания геля раствором бромистого этидия с помощью документирующей системы GelDoc фирмы BIO-RAD (США) в УФ-излучении с длиной волны 312 нм. Электрофореграмма представляла собой паттерн полос, соответствующих различным нормальным или мутантным аллелям гена. По наличию/отсутствию полос с длинами, соответствующих нормальной/мутантной последовательности судили о наличии/отсутствии конкретной мутации в генотипе пробанда (табл. 3).

Результаты и обсуждение

Всем 200 пробандам была проведена ДНК-диагностика с использованием новой медицинской технологии «Система детекции наиболее частых мутаций гена *FGFR3*, ответственного за ахондроплазию и гипохондроплазию». На рисунке представлены результаты визуализации мультиплексной лигазной реакции с использованием вертикального электрофореза в ПААГ.

Мутации были выявлены у 64 из 120 пробандов с направительным диагнозом «ахондроплазия». Мутация Gly380Arg (с.1138G>A) была зарегистрирована у 59 чел., а мутация Gly380Arg (с.1138G>C) — у пяти больных. Мутации Gly375Cys в исследованных образцах ДНК выявлено не было. Среди образцов ДНК, выделенных из крови 80 больных с направительным диагнозом «гипохондроплазия», мутация гена *FGFR3* была обнаружена в 16 случаях. Мутации Asn540Lys (с.1620C>A) и Asn540Lys (с.1620C>G) вы-

Таблица 2

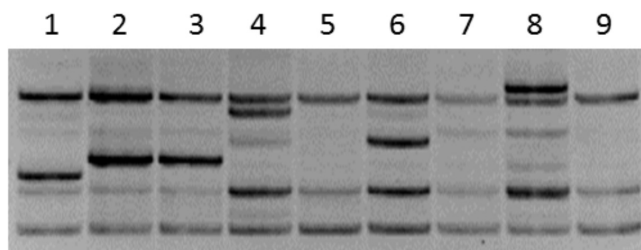
Универсальные праймеры и условия амплификации, применяемые в технологии

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

Таблица 3

Интерпретация результатов ДНК-диагностики ахондроплазии и гипохондроплазии, полученных с использованием медицинской технологии «Система детекции наиболее частых мутаций гена *FGFR3*, ответственного за ахондроплазию и гипохондроплазию»

Детектируемая мутация	Позиция	Длина фрагмента	Статус точки	Заболевание
Asn540Thr Asn540Ser Asn540Lys	с.1619C	115	Мутация	Гипохондроплазия
	с.1619G	112	Мутация	
	с.1619A, с.1620C	109	Норма	
	с.1620A	105	Мутация	
	с.1620G	99	Мутация	
Gly380Arg	с.1138A	95	Мутация	Ахондроплазия
	с.1138C	92	Мутация	
	с.1138G	89	Норма	
Gly375Cys	с.1123T	85	Мутация	
	с.1123G	82	Норма	



Визуализация результатов мультиплексной лигазной реакции с использованием электрофореза в ПААГ:

дорожка 1: гетерозигота по мутации Gly380Arg (с.1138G>C);
 дорожки 2 и 3: гетерозиготы по мутации Gly380Arg (с.1138G>A);
 дорожка 4: гетерозигота по мутации Asn540Lys (с.1620C>A);
 дорожка 6: гетерозигота по мутации Asn540Lys (с.1620C>G);
 дорожка 8: гетерозигота по мутации Asn540 Ser (с.1619A>G);
 дорожки 5, 7, 9: норма.

явлены у семи пробандов каждая. Еще в двух образцах была обнаружена мутация Asn540Ser. Мутации Asn540Thr выявлено не было. Спектры мутаций при ахондроплазии и гипохондроплазии соотносятся с мировым данным о частотах встречаемости различных изменений нуклеотидной последовательности гена *FGFR3*.

Доля образцов ДНК с выявленными мутациями оказалась существенно ниже ожидаемой с учетом частот встречаемости включенных в систему мутаций. По данным исследователей разных стран, причиной 99% случаев ахондроплазии являются мутации «горячей» точки гена *FGFR3* — кодона 380 (нуклеотидные замены с.1138G>A или с.1138G>C) [1]. Для гипохондроплазии описана другая «горячая» точка — кодон 540 (мутации Asn540Lys, Asn540Ser, Asn540Thr), на долю мутаций которого приходится не менее 50% всех случаев данного заболевания [7]. Относительно низкая выявляемость мутаций может быть обусловлена трудностями дифференциальной диагностики различных форм карликовости и доказывает актуальность и необходимость использования ДНК-диагностики с целью определения точного диагноза и планирования тактики лечения больных.

В результате работы было установлено, что новая медицинская технология для диагностики ахондроплазии и гипохондроплазии обладает высокой информативностью. Высокая точность детекции мутаций обусловлена применением высокоспецифичного фермента ДНК-лигазы для детекции изменений нуклеотидной последовательности.

Впервые в России разработана система детекции в одной пробирке семи наиболее частых мутаций гена *FGFR3*: с.1138G>A, с.1138G>C, с.1123G>T — ответственных за ахондроплазию и с.1620C>A, с.1620C>G, с.1619A>G, с.1619A>C — ответственных за гипохондроплазию на основе метода мультиплексной лигазной реакции. Суммарная информативность системы составляет 99% для диагностики ахондроплазии и 60% для гипохондроплазии. Информативность технологии для диагностики ахондроплазии и гипохондроплазии рассчитана исходя из частот встречаемости мутаций, входя-

щих в диагностическую систему у больных с карликовостью, обусловленной мутациями гена *FGFR3*.

Показаниями к использованию технологии являются:

1. Диагностика ахондроплазии;
2. Диагностика гипохондроплазии;
3. Оптимизация тактики наблюдения и лечения пациентов с данными формами карликовости;
4. Проведение пренатальной диагностики.

Противопоказания для использования технологии «Система детекции наиболее частых мутаций гена *FGFR3*, ответственного за ахондроплазию и гипохондроплазию» отсутствуют.

Детекция мутаций позволяет подтвердить диагноз на молекулярно-генетическом уровне, провести, в случае необходимости, пренатальную диагностику. Неэффективность терапии карликовости при ахондроплазии и гипохондроплазии соматотропным гормоном и хорошие результаты хирургической коррекции длины трубчатых костей делают особенно актуальной своевременную диагностику данных болезней.

Список литературы

1. Bellus GA, Hefferon TW, Ortiz de Luna RI et al. Achondroplasia is defined by recurrent G380R mutations of FGFR3. *Am J Hum Genet.* 1995 Feb;56(2):368-73.
2. Hunter AG, Bankier A, Rogers JG et al. Medical complications of achondroplasia: a multicentre patient review. *J Med Genet.* 1998 Sep;35(9):705-12.
3. Walker BA, Murdoch JL, McKusick VA et al. Hypochondroplasia. *Am J Dis Child.* 1971 Aug;122(2):95-104.
4. Andersen PE Jr, Hauge M. Congenital generalised bone dysplasias: a clinical, radiological, and epidemiological survey. *J Med Genet.* 1989 Jan;26(1):37-44.
5. Waller DK, Correa A, Vo TM et al. The population-based prevalence of achondroplasia and thanatophoric dysplasia in selected regions of the US. *Am J Med Genet A.* 2008 Sep 15;146A(18):2385-9.
6. Superti-Furga A, Eich G, Bucher HU et al. A glycine 375-to-cysteine substitution in the transmembrane domain of the fibroblast growth factor receptor-3 in a newborn with achondroplasia. *Eur J Pediatr.* 1995 Mar;154(3):215-9.
7. Ramaswami U, Rumsby G, Hindmarsh PC, Brook CG. Genotype and phenotype in hypochondroplasia. *J Pediatr.* 1998 Jul;133(1):99-102.
8. Shohat M, Tick D, Barakat S et al. Short-term recombinant human growth hormone treatment increases growth rate in achondroplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996 Nov;81(11):4033-7.
9. Аранович А.М., Диндиберя Е.В., Климов О.В. Особенности удлинения голени у больных ахондроплазией в зависимости от возраста. *Гений ортопедии.* 2003; (2):69-71
10. Корабельников М.А., Дьячкова Г.В., Аранович А.М. и др. Количественная оценка репаративного костеобразования при удлинении конечностей у больных ахондроплазией. *Гений ортопедии.* 2001; (1):92-97
11. Kozłowski P, Jasinska AJ, Kwiatkowski DJ. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis.* 2008 Dec;29(23):4627-36.

Информация о конфликте интересов:

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

**Results of the use the new medical technologies
«Detection system the most frequent mutations in *FGFR3* gene,
liability for achondroplasia and hypochondroplasia» in DNA-diagnostics**

Vasserman N.N., 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

Achondroplasia and Hypochondroplasia are the most frequent form of short-limb dwarfism. Affected individuals exhibit short stature caused by rhizomelic shortening of the limbs, characteristic facies with frontal bossing and midface hypoplasia, exaggerated lumbar lordosis, limitation of elbow extension, genu varum, and trident hand. Hypochondroplasia is much milder and can be distinguished on clinical and radiographic grounds. Hypochondroplasia and achondroplasia are indeed allelic disorders that cause by mutation in *FGFR3* «hot spots». The paper presents the results of DNA diagnostics 200 probands with short-limb dwarfism using embedded into practice FSBI «RCMG» new medical technology «Detection system the most frequent mutations in *FGFR3* gene, liability for achondroplasia and hypochondroplasia».

Keywords: achondroplasia, hypochondroplasia, *FGFR3*, MLPA