

19. *Moderately severe hemophilia A resulting from Glu-Gly substitution in exon 7 of Factor III gene* / H. Youssoufian, C. Wong, S. Aronis et al. // *Amer. J. Hum. Genet.*— 1988.— 42.— P. 867—871.

НИИ акушерства и гинекологии АМН СССР, Ленинград

Получено 05.07.90

УДК 576.116.4

О. В. Малышева, В. Н. Горбунова, В. В. Красильников, В. С. Баранов

ПДРФ-АНАЛИЗ И СКРИНИНГ ДЕЛЕЦИЙ В СЕМЬЯХ БОЛЬНЫХ МИОДИСТРОФИЕЙ ДЮШЕННА (МДД)*

Методами обычной и множественной полимеразной цепной реакции синтеза ДНК, а также блот-гибридизации по Саузерну исследованы аллельный полиморфизм пяти сайтов ДНК, тесно сцепленных с геном дистрофина, и наличие делеций этого гена у пробандов и в семьях высокого риска. Информативными по одному или нескольким полиморфным сайтам оказались 29 и 36 обследованных семей, т. е. они пригодны для пренатальной диагностики и определения гетерозиготного носительства мутации. У 11 из 32 больных МДД выявлены различные делеции гена дистрофина. Приведены конкретные примеры пренатальной диагностики МДД на ранних сроках беременности. Обсуждаются преимущества и недостатки ПДРФ-анализа и метода прямого определения мутаций гена дистрофина для выявления гетерозиготного носительства и пренатальной диагностики МДД.

Введение. Миодистрофия Дюшенна — тяжелое сцепленное с полом наследственное заболевание, встречающееся в среднем у одного из 3 500 новорожденных мальчиков. МДД вызывается мутациями в гене дистрофина, расположенном в коротком плече X-хромосомы (Xp21.3). Начиная со второй половины 80-х годов были разработаны молекулярно-генетические методы, позволяющие проводить пренатальную диагностику и определять гетерозиготное носительство у женщин из группы высокого риска. В настоящее время существуют два принципиальных подхода в молекулярной диагностике МДД: анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) и прямое определение мутаций в гене дистрофина. Суть первого подхода состоит в том, что в консультируемой семье удается маркировать хромосому матери по наличию или отсутствию определенных сайтов рестрикции в тесно сцепленных с геном дистрофина локусах ДНК или внутри самого гена. Это делает возможным различить «больную» и «здоровую» хромосомы и проследить их наследование в данной семье. Со скидкой на вероятность кроссинговера между маркерным сайтом и мутацией (5—10 %) этот путь позволяет провести достоверную пренатальную диагностику и выявить гетерозиготное носительство.

Второй метод — прямое определение мутации. В настоящее время он может быть использован в 50—70 % семей с МДД, где удается обнаружить делеции гена дистрофина у пробанда, и является практически абсолютно достоверным способом пренатальной диагностики. Однако определение гетерозиготного носительства этим способом затруднено.

В данном сообщении представлены данные по изучению ПДРФ по пяти полиморфным сайтам в семьях больных МДД, а также приведены результаты скрининга делеций этого гена у больных.

Материалы и методы. ДНК из лейкоцитов периферической крови и клеток хориона выделяли, как описано ранее [1]. Для блот-гибри-

* Работа частично финансируется ВОЗ (Грант G 3/181/139).

дизации около 10 мкг геномной ДНК обрабатывали в течение 6—12 ч соответствующей рестриктазой (*TaqI* — при использовании зондов *XJI.1* и *pERT87-15* и *PstI* — для зонда *p754*) и после электрофореза и щелочного переноса на фильтры Hybond-N гибридизовали с меченой плазмидной ДНК по стандартной методике [2].

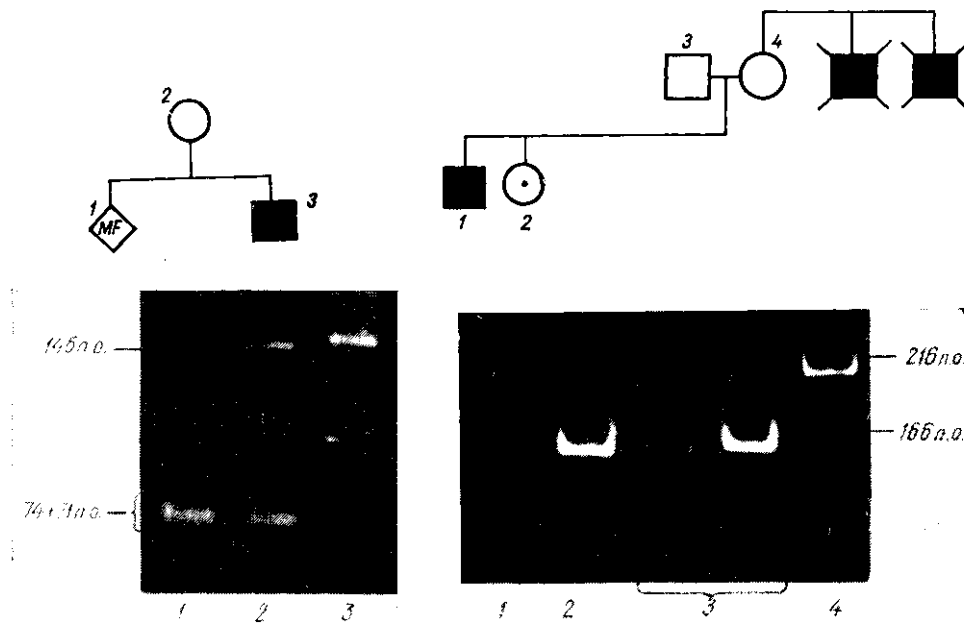


Рис. 1. Пренатальная диагностика МДД в семье С. Семья информативна по сайту *pERT87-8/TaqI*

Fig 1. Prenatal diagnosis of DMD in family S. Site *pERT87-8/TaqI*

Рис. 2. Родословная и ПДРФ-анализ семьи Ш. Сайт *pERT87-15/BamHI*

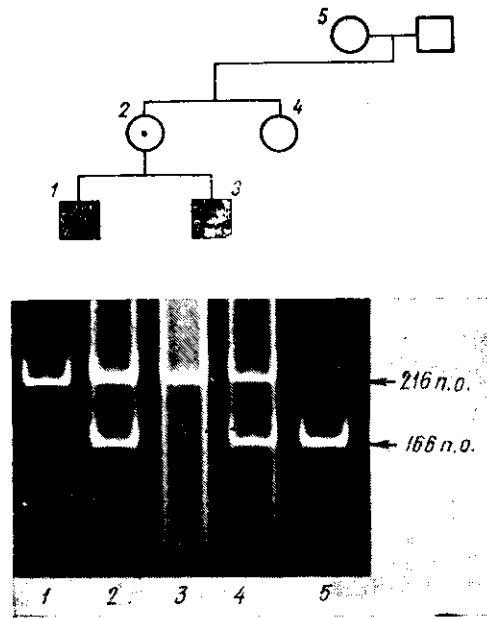
Fig. 2. Pedigree and RFLP-analysis in family Sh. Site *pERT87-15/BamHI*

Для обнаружения ПДРФ с помощью полимеразной цепной реакции проводили амплификацию ДНК с термостабильной ДНК-полимеразой *Thermus thermophilus* на автоматическом термоциклере Techne (Великобритания). Для амплификации участков ДНК, имеющих полиморфные сайты, использовали праймеры *pERT87-15/BamHI* и *pERT87-8/TaqI* [3]. Каждый из 35 циклов амплификации включал денатурацию — 94 °С (0,5 мин), отжиг — 55 °С (1 мин), синтез — 72 °С (1 мин). Затем пробы обрабатывали соответствующей рестриктазой и разделяли полученные фрагменты в 7 %-ном ПААГ [4]. Множественная полимеразная реакция включала 25 циклов со следующими параметрами: денатурация — 94 °С (0,5 мин), отжиг — 55 °С (0,7 мин), синтез — 72 °С (3,5 мин). На одну реакцию использовали 3 ед. *Taq*-полимеразы. Электрофорез проб проводили в 5 %-ном ПААГ.

Таблица 1
ПДРФ-анализ в семьях с МДД
RFLP-analysis in DMD families

Изучено семей	Информативны по сайтам, %					Всего	
	<i>XJI.1</i>	<i>pERT87-15</i>		<i>pERT87-8</i>	<i>p754</i>	Информативны	Неинформативны
	<i>TaqI</i>	<i>TaqI</i>	<i>BamHI</i>	<i>TaqI</i>			
36	43,7	50	11	27,7	46	29	7

Результаты и обсуждение. Обследованы 36 семей (35 больных и 75 близких родственников). Результаты ПДРФ-анализа представлены в табл. 1. В 29 семьях консультируемые оказались гетерозиготными по



одному и более полиморфным сайтам, что позволило провести в этих семьях пренатальную диагностику и определить носительство. Пренатальная диагностика на раннем сроке беременности осуществлена в семье С. (рис. 1). На сроке 9 недель была сделана биопсия хориона и цитогенетически определен плод мужского пола. Консультируемая гетерозиготна по сайту *pERT87-8/TaqI*. Больной ребенок имеет аллель без сайта рестрикции, в то время как у плода этот

Рис. 3. Семья Т.: мутация возникла в половых клетках отца консультируемой. Сайт *pERT87-15/BamHI*

Fig. 3. Family T.: the grandprenatal origin of mutation causing DMD. Site *pERT87-15/BamHI*

сайт присутствует. Следовательно, с вероятностью 96 % плод несет нормальный аллель гена дистрофина.

Нам удалось отвергнуть гетерозиготное носительство у 10 женщин из группы высокого риска и подтвердить его у одной. Последняя семья представлена на рис. 2. Анализ проведен по сайту *pERT87-15/BamHI*. У больного мальчика не амплифицируется соответствующий фрагмент ДНК. Это может быть объяснено делецией данного локуса, что и подтверждено последующим анализом. У матери пробанда обнаружен только один фрагмент, лишенный сайта рестрикции («—»-аллель). Отец был гемизиготен по наличию сайта рестрикции («+»-аллель). У сестры пробанда обнаружен только один фрагмент, соответствующий «+»-аллелю, который она получила от отца. Наиболее вероятно, что мать, являющаяся облигатной носительницей делеции, передала ее обоим детям. Таким образом, у дочери подтверждено гетерозиготное носительство мутации.

В семье Т. (рис. 3) удалось показать, что мутация гена дистрофина произошла в половых клетках отца консультируемой. Семья информативна по сайту *pERT87-15/BamHI*. Мать больных мальчиков

Таблица 2
Делеции у больных МДД, выявляемые методом множественной полимеразной цепной реакции
DMD deletions detected by multiples polymerase chain reaction

№	ex8	ex17	ex19	ex44	ex45	ex18	№	ex8	ex17	ex19	ex44	ex45	ex48
2	--	+	+	+	+	+	10	+	+	+	+	--	--
9	--	--	+	+	+	+	23	+	+	+	+	--	--
13	--	--	--	--	+	+	26	+	+	+	+	--	--
25	--	--	--	--	+	+	19	+	+	+	+	--	+
24	--	--	--	--	--	--	16	+	+	+	+	+	--
32	+	+	+	--	--	+							

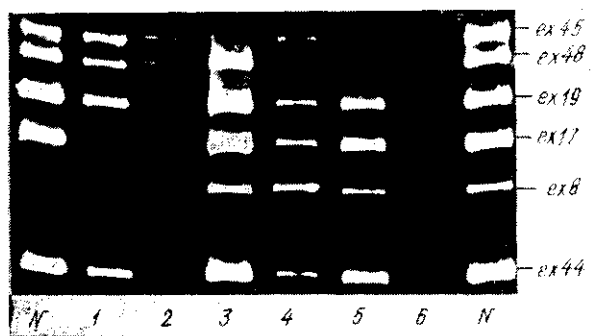
Примечание. «—» — наличие делеции; «+» — отсутствие делеции.

(облигатная носительница) гетерозиготна по этому сайту, причем «+»-аллель (наличие сайта рестрикции), имеющийся у обоих мальчиков, она получила от своего здорового отца. С вероятностью более 90 % отвергнуто гетерозиготное носительство у ее сестры.

Другая часть работы касалась поиска де-

Рис. 4. Примеры делеций у больных МДД, выявляемых методом множественной полимеразной цепной реакции

Fig. 4. Different DMD patients deletions detected by multiplex DNA amplification



лений у больных МДД. Набор праймеров, описанный в работе Чемберлена с соавт. [5], позволяет амплифицировать 8, 17, 19, 44, 45 и 48-й экзоны гена дистрофина и выявлять до 70 % делеций. Результаты представлены в табл. 2 и на рис. 4.

Всего исследованы 32 пробанда. У 21 из них, так же как и в контроле, амплифицировались шесть фрагментов ДНК соответствующих

экзонов гена МДД. У 11 больных были выявлены делеции разной протяженности (от одного до шести экзонов). Частота делеций в наших исследованиях хорошо согласуется с таковой, приведенной в работах американских авторов [5]. Используя этот метод, осуществлена пренатальная диагностика в семье К. в первом триместре беременности (рис. 5). У пробанда обнаружена протяженная делеция, затрагивающая четыре экзона (8, 17, 19 и 44-й). В образце ДНК из биоптата хориона плода мужского пола произошла амплификация всех шести экзонов, что с вероятностью более 99 % позволяет предсказать рождение здорового ребенка.



Рис. 5. Пренатальная диагностика МДД методом множественной полимеразной цепной реакции

Fig. 5. Prenatal diagnosis of DMD by multiplex DNA amplification

Таким образом, оба методических подхода — анализ ПДРФ и непосредственное выявление мутаций — позволяют с успехом проводить пренатальную диагностику и определять гетерозиготное носительство. Вместе с тем оба метода следует рассматривать как аддитивные, так как каждый из них имеет свои преимущества и недостатки. Основной недостаток первого метода — возможность диагностической ошибки в связи с высокой частотой кроссинговера между мутацией и маркерным сайтом — может быть в значительной мере преодолен при помощи фланкирующих маркеров и за счет применения ДНК-зондов, соответствующих «горячим точкам» мутаций — например, зонда P20 [6]. К недостаткам второго подхода следует отнести затруднения, возникающие при определении гетерозиготного носительства, а также то, что выявляемые в настоящее время мутации (делеции) встречаются лишь у 50—70 % больных, тогда как остальные случаи заболевания обусловлены какими-то другими нарушениями гена дистрофина. Оче-

видно, что только комбинированное использование обоих подходов позволяет с уверенностью проводить дородовую диагностику и выявлять гетерозиготное носительство. В заключение уместно отметить, что благодаря успехам иммунохимического определения дистрофина непосредственно в мышечной ткани проблему выявления гетерозиготного носительства и верификации результатов диагностики по материалам абортированных плодов можно считать в значительной степени решенной [7].

Резюме

Методами звичайної та множинної полімеразної ланцюгової реакції синтезу ДНК, а також блот-гібридації по Саузерну досліджений алейний поліморфізм п'яти сайтів ДНК, що щільно пов'язані з геном дистрофіну, і наявність делеції цього гену у пробандів та в сім'ях високого ризику. Із 36 обстежених сімей 29 виявились інформативними по одному чи кільком поліморфним сайтами, тобто у них можна провести пренатальну діагностику та визначити гетерозиготних носіїв. У 11 із 32 хворих МДД знайдені різні делеції гену дистрофіну. Приведені конкретні приклади пренатальної діагностики МДД на ранніх строках вагітності. Обговорюються переваги та недоліки ПДРФ-аналізу і методу прямого визначення мутацій гену дистрофіну для виявлення гетерозиготних носіїв і пренатальної діагностики МДД.

Summary

Allelic polymorphism of 5 loci closely linked or inside the dystrophin gene has been studied by Southern's blot analysis and polymerase chain reaction in high risk families. Method of multiplex polymerase chain reaction has been used for detection of dystrophin gene deletions. 29 of 36 families studied have been informative for prenatal diagnosis and carrier detection with one or more DNA probes. Different deletions of dystrophin gene have been detected in 11 of 32 DMD patients. Prenatal diagnosis of DMD has been carried out in two families at the first trimester of pregnancy. Advantages and disadvantages of RFLP analysis and direct deletions identification for DMD carrier detection and prenatal diagnosis are discussed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. ПДРФ-анализ гена миодистрофии Дюшенна в ленинградской популяции и в семьях высокого риска / В. Н. Горбунова, В. В. Красильников, М. В. Асеев и др. // Биополимеры и клетка.— 1990.— 6, № 2.— С. 52—55.
2. Манитис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1986.— 420 с.
3. Rapid carrier and prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy / R. G. Roberts, C. G. Cole, K. A. Hart et al. // Nucl. Acids Res.— 1989.— 17, N 2.— P. 811.
4. Анализ рестрикционного полиморфизма ДНК-локуса *D7S23* при помощи зонда *KM-19* методом цепной реакции синтеза ДНК в популяции и в семьях больных муковисцидозом / Т. Э. Иващенко, В. Н. Горбунова, М. В. Асеев и др. // Биополимеры и клетка.— 1990.— 6, № 2.— С. 55—60.
5. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification / J. S. Chamberlain, R. A. Gibbs, Y. E. Ranier et al. // Nucl. Acids Res.— 1988.— 16, N 23.— P. 11141—11155.
6. A deletion not spot in the Duchenne muscular dystrophy gene / M. C. Wapenaar, T. Kievits, K. A. Hart et al. // Genomics.— 1988.— 2.— P. 101—108.
7. Dystrophin diagnosis: comparison of dystrophin abnormalities by immunofluorescence and immunoblot analysis / K. Arahata, E. P. Hoffman, L. M. Kunkel et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1989.— 86.— P. 7154—7158.

Ин-т акушерства и гинекологии АМН СССР, Ленинград

Получено 05.07.90