

В. И. Гришко, С. Г. Малайчук, Л. А. Лившиц

## ПОЛИМОРФИЗМ *pERT*-ЛОКУСА ГЕНА ДИСТРОФИНА В СЕМЬЯХ С ВЫСОКИМ РИСКОМ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ ДЮШЕННА И СРЕДИ ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН УКРАИНЫ

*Анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) в полиморфных системах *pERT87-8-BamHI*, *pERT87-8-XmnI*, *pERT87-15-TaqI* гена дистрофина проведен в 28 семьях с высоким риском мышечной дистрофии Дюшенна. Системы оказались диагностически информативными для 26 семей. Получены данные по распределению ПДРФ-генотипов среди 97 здоровых женщин Украины.*

*Обсуждается необходимость анализа внутригенных и фланкирующих ПДРФ-маркеров для эффективной диагностики мышечной дистрофии Дюшенна в Украине.*

**Введение.** Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) — тяжелое моногенное наследственное заболевание с X-сцепленным характером наследования, встречающееся с частотой примерно 1 : 3500 новорожденных мальчиков [1]. Ген, мутации в котором вызывают развитие МДД, открыт в 1985 году [2]. Позже был описан белковый продукт гена, названный дистрофином [3]. Рядом авторов показано, что МДД вызывает целый спектр разнообразных мутаций, среди которых преобладают мутации делеционного типа [4].

Несмотря на успехи, достигнутые в исследовании гена дистрофина и происходящих в нем мутаций, 30 % всех известных на сегодняшний день случаев заболевания МДД представляют собой неидентифицированные нарушения экспрессии гена и функционирования его белкового продукта [5]. В этих случаях для эффективной диагностики МДД и прогноза потомства применяют метод внутрисемейного анализа сцепления МДД-мутаций с маркерами полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ). В настоящее время описан и используется в диагностических целях целый ряд ПДРФ-маркеров как внутригенных, так и фланкирующих ген дистрофина [6]. Одним из наиболее широко известных и используемых сейчас является полиморфизм последовательностей *pERT*-локуса гена дистрофина, впервые описанного Л. М. Кункелем с соавт. [7].

Целью данной работы был анализ ПДРФ по трем полиморфным системам *pERT*-локуса (*pERT87-8-BamHI*, *pERT87-8-XmnI*, *pERT87-15-TaqI*) в семьях с высоким риском МДД и анализ распределения ПДРФ-генотипов в данных системах среди здоровых женщин Украины.

**Материалы и методы.** В качестве материала для проведенных исследований использовали образцы крови со стандартным консервантом глюцидром больных мышечной дистрофией Дюшенна и их родителей, которые были получены из медико-генетических учреждений Украины, а также образцы крови здоровых доноров женского пола.

Праймеры для специфической амплификации полиморфных последовательностей были синтезированы в АО «Экотур» (Литва), термостабильная ДНК-полимераза и рестриктазы производства НПО «Биопол» (Россия).

ДНК из лейкоцитов периферической крови выделяли по методу Веннерта и др. [8]. ПДРФ-анализ проводили с помощью специфической амплификации *in vitro* внутригенных полиморфных последовательностей *pERT*-локуса гена дистрофина на основе полимеразной цепной реакции с последующей рестрикцией продуктов амплификации.

Полимеразную цепную реакцию осуществляли в автоматическом режиме на термоджиклере «Perkin Elmer» фирмы «Cetus» (США). Состав реакционной смеси и условия описаны ранее [9]. Последовательности олигонуклеотидных праймеров приведены в работе [10]. После завершения полимеразной цепной реакции в реакционную смесь добав-

ляли 5—10 ед. активности соответствующей эндонуклеазы рестрикции. Продукты амплификации гидролизovali в течение 8—12 ч, после чего образовавшиеся фрагменты ДНК разделяли в 1,4 %-м агарозном геле. Электрофорез проводили по стандартным методикам [11]. Гели окра-

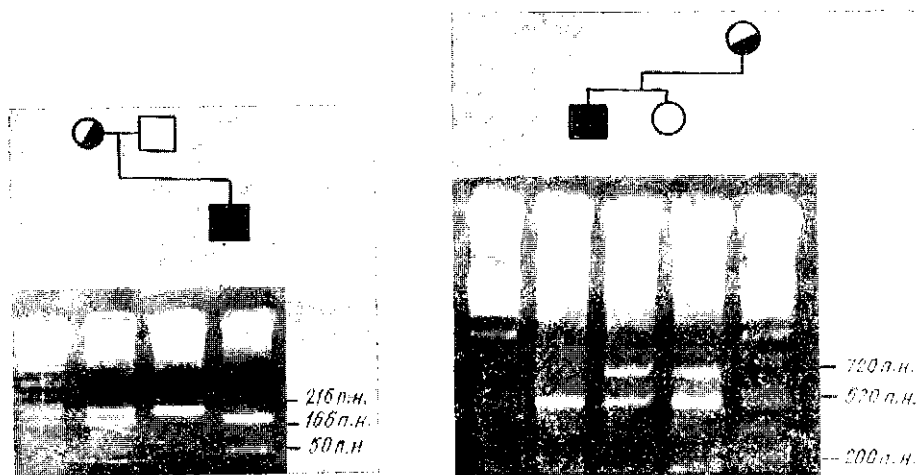


Рис. 1. ПДРФ-анализ в полиморфной системе *pERT87-8-BamHI*. Здесь и на рис. 2, 3: 1,4 %-й агарозный гель, маркер молекулярной массы — ДНК фага  $\lambda$ , гидролизованная рестриктазой *PstI*

Рис. 2. ПДРФ-анализ в полиморфной системе *pERT87-8-XmnI*

шивали бромистым этидием, в качестве маркеров молекулярной массы использовали ДНК фага  $\lambda$ , гидролизованную эндонуклеазой рестрикции *PstI*.

**Результаты и обсуждение.** В данной работе осуществлен ПДРФ-анализ в трех полиморфных системах *pERT*-локуса гена дистрофина: *pERT87-8-BamHI*, *pERT87-8-XmnI*, *pERT87-15-TaqI* у членов семей с высоким риском МДД из различных регионов Украины.

В случае первой системы продукты амплификации размером 216 п. н. гидролизovali рестриктазой *BamHI* и при наличии сайта для эндонуклеазы рестрикции образовывались фрагменты размером 166 и 50 п. н. (рис. 1).

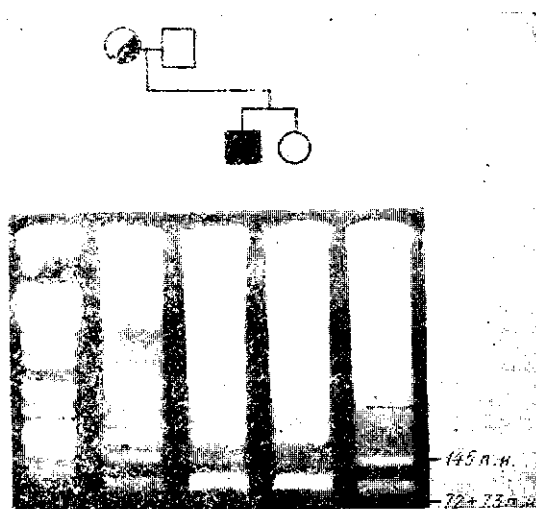


Рис. 3. ПДРФ-анализ в полиморфной системе *pERT87-15-TaqI*

При использовании второй системы продукты амплификации размером 720 п. н. гидролизovali рестриктазой *XmnI* и при наличии сайта рестрикции образовывались фрагменты 520 и 200 п. н. (рис. 2).

В случае полиморфной системы *pERT87-15-TaqI* продукты амплификации размером 145 п. н. образовывали при наличии сайта рестрикции фрагменты размером 72 и 73 п. н., которые на электрофореграмме выглядят как один фрагмент (рис. 3).

ПДРФ-анализ, проведенный у пробандов, показал, что МДД-мутации преимущественно ассоциированы с наличием сайта рестрикции

для *BamHI*, *XmnI*, *TaqI* в соответствующих полиморфных системах (табл. 1). Как видно, абсолютное большинство X-хромосом пробандов имело сайт рестрикции в проанализированных последовательностях.

Таблица 1

*ПДРФ-анализ полиморфных систем pERT-локуса гена дистрофина в семьях с высоким риском мышечной дистрофии Дюшенна*

Полиморфная система	Число проанализированных генотипов	Распределение ПДРФ-генотипов				
		Больные дети		Матери пробандов		
		+	-	++	+-	--
<i>pERT87-8-BamHI</i>	28 28	22 —	6 —	— 8	— 19	— 1
<i>pERT87-15-TaqI</i>	28 28	25 —	3 —	— 13	— 13	— 2
<i>pERT87-8-XmnI</i>	16 16	14 —	2 —	— 12	— 3	— 1

Примечание. «+» — X-хромосома с сайтом рестрикции в полиморфной последовательности; «-» — отсутствие сайта.

В случае МДД, как и других X-сцененных наследственных заболеваний, диагностически информативной считается полиморфная система, в которой предполагаемая носительница мутантного гена (мать пробанда) имеет гетерозиготный ПДРФ-генотип, т. е. на одной X-хромосоме в полиморфном участке имеется сайт рестрикции, а на другой — аналогичный сайт отсутствует. В этом случае, анализируя рестрикционный полиморфизм в семье, можно проследить передачу хромосомы с мутантным геном сыновьям. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что по всем трем полиморфным системам наблюдался большой процент гетерозиготных генотипов у матерей пробандов (табл. 1). Наиболее эффективным для проанализированных нами семей оказался полиморфизм последовательности *pERT87-8-BamHI*, где 19 из 28 женщин имели гетерозиготный ПДРФ-генотип. Большинство из проанализированных нами семей обнаружили информативный полиморфизм хотя бы в одной из проанализированных нами ПДРФ-систем, только 2 семьи оказались полностью неинформативными ни по одной системе.

В двух случаях нам удалось показать дедовское происхождение МДД-мутации, когда мать передала пробанду X-хромосому, полученную ею от отца. В одной семье была обнаружена делеция *pERT*-последовательности у обоих пробандов.

Кроме того, для предварительной оценки уровня гетерозиготности по данным полиморфным системам в популяции нами был проведен анализ распределения ПДРФ-генотипов среди здоровых женщин Украины. Результаты этого анализа приведены в табл. 2. Можно видеть, что в популяции здоровых женщин также наблюдается преобладание

Таблица 2

*Распределение ПДРФ-генотипов полиморфных систем pERT-локуса гена дистрофина среди здоровых женщин Украины*

Полиморфная система	ПДРФ-генотипы (n=97)		
	++	+-	--
<i>pERT87-8-BamHI</i>	58	35	4
<i>pERT87-8-XmnI</i>	45	48	4
<i>pERT87-15-TaqI</i>	35	54	8

Примечание. n — число проанализированных генотипов; «+» — X-хромосома с сайтом рестрикции в полиморфной последовательности; «-» — отсутствие сайта.

X-хромосом с сайтами рестрикции для соответствующих рестриктаз в тех же трех полиморфных последовательностях *pERT*-локуса гена дистрофина. Около половины проанализированных нами женщин имели гетерозиготный ПДФ-генотип в системах *pERT87-8-XmnI* и *pERT87-15-TaqI*, и только у 35 из 97 женщин был обнаружен гетерозиготный генотип в полиморфной системе *pERT87-8-BamHI*.

Таким образом, у здоровых женщин также было выявлено преобладание сайтов рестрикции в полиморфных последовательностях *pERT*-локуса гена дистрофина.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования данных полиморфных систем для диагностики МДЦ в Украине прежде всего благодаря высокому уровню гетерозиготности по этим локусам в проанализированных выборках. При этом ДНК-анализ по внутригенным полиморфным системам обязательно должен быть дополнен анализом полиморфизма фланкирующих ген дистрофина последовательностей из-за возможного внутривенного кроссинговера вследствие гигантского размера исследованного гена.

**Summary.** RFLP-analysis in polymorphic systems *pERT87-8-BamHI*, *pERT87-8-XmnI*, *pERT87-15-TaqI* of dystrophin gene performed in 28 families with high risk of muscular Duchenne dystrophy. This systems were diagnostically informative for 26 families. The distribution of RFLP-genotypes of *pERT* locus was found for 97 healthy women from Ukraine.

The necessity of analysis of intragenic and flanking markers RFLP for effective diagnosis of muscular Duchenne dystrophy is discussed in this report.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Emery A. E. H. Duchenne muscular dystrophy // Oxford monographs on medical genetics.— Oxford: Univ. press, 1987.— N 15.— 277 p.
2. Kunkel L. M., Monaco A. P., Middlesworth W. et al. Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with an X chromosome deletion // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1985.— 82.— P. 4778—4782.
3. Hoffman E. P., Brown R. H., Kunkel L. M. et al. Dystrophin: The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus // Cell.— 1987.— 51.— P. 919—928.
4. Forrest S. M., Cross G. S., Speer A. et al. Preferential deletion of exons in Duchenne and Becker muscular dystrophies // Nature.— 1987.— 329.— P. 638—640.
5. Koenig M., Hoffman E. P., Bertelson C. J. et al. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals // Cell.— 1987.— 50.— P. 509—517.
6. Hojker M. H., Wapenaar M. C., Goor N. et al. Isolation of probes detecting restriction fragment length polymorphisms from X chromosome-specific libraries: potential use for diagnosis of Duchenne muscular dystrophy // Hum. Genet.— 70.— P. 148—156.
7. Kunkel L. M., Boyce F. M., Beggs A. H. Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy // Nature.— 1986.— 322.— P. 73—77.
8. Wehnert M., Herrmann G. H., Metzke H., Tille H. Erste Ergebnisse bei der Genomischen Carrierdiagnostik in Risikofamilien mit Haemophilie A und B in der DDR // Z. gesamte Inn. Med.— 1988.— 43.— S. 441—444.
9. Roberts R. G., Cole C. G., Hart K. E. et al. Rapid carrier and prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy // Nucl. Acids. Res.— 1989.— 17.— P. 811.
10. Лифшиц Л. А., Гришко В. И., Кравченко С. А. и др. Анализ полиморфизма ДНК в участках, тесно сцепленных с геном муковисцидоза в популяции Киева // Биополимеры в клетке.— 1990.— 6, № 2.— С. 60—64.
11. Маннатис Т., Сэлбрук Ф., Фриш Т. Молекулярное клонирование — М.: Мир, 1983.— 453 с.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН Украины, Киев

Получено 21.08.92