

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЯСНО-КОНЕЧНОСТНОЙ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ 2D В ВЫБОРКАХ БОЛЬНЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ ПРОГРЕССИРУЮЩИХ МЫШЕЧНЫХ ДИСТРОФИЙ

© 2019 г. М. В. Булах¹, *, Н. М. Галеева¹, Д. А. Полякова¹,
О. П. Рыжкова¹, Е. Л. Дадали¹, А. В. Поляков¹, **

¹Медико-генетический научный центр, Москва, 115522 Россия

*e-mail: mariya.bulakh@gmail.com

**e-mail: apol@dnalab.com

Поступила в редакцию 15.03.2018 г.

После доработки 06.06.2018 г.

Принята к публикации 19.06.2018 г.

Поясно-конечностная мышечная дистрофия 2D (ПКМД 2D) является самой частой в мире формой саркогликанопатий — аутосомно-рецессивных ПКМД, обусловленных различными молекулярными дефектами в генах, кодирующих белки саркогликанового семейства (α , β , γ и δ). ПКМД 2D возникает при наличии мутаций в гене *SGCA*, кодирующем α -саркогликан, и в целом по своей клинической картине сложно отличима как от других псевдогипертрофических форм ПКМД, так и от мышечной дистрофии Дюшенна/Беккера (МДД/Б). В настоящей работе проведено исследование ПКМД 2D на основании анализа встречаемости повторяющихся вариантов гена *SGCA* (с.229С>Т, с.271G>А и с.850С>Т) в трех выборках больных прогрессирующими мышечными дистрофиями, манифестирующими после периода нормального моторного развития. В выборке больных с направляющим диагнозом “мышечная дистрофия Эмери–Дрейфуса” не было выявлено ни одного больного ПКМД 2D. В выборке больных с направляющим диагнозом “ПКМД” доля ПКМД 2D составила не менее 1.9%, а в выборке больных с направляющим диагнозом “МДД/Б” — не менее 0.6%. Примечательно, что в этих двух выборках на долю самого частого в мире варианта гена *SGCA* — с.229С>Т и варианта с.271G>А, зарегистрированного всего в одной итальянской семье, приходится практически одинаковое число больных хромосом. Следовательно, больные ПКМД 2D из РФ отличаются от больных во всем мире наличием двух мажорных вариантов этого гена (с.229С>Т и с.271G>А). Информативность тест-системы для поиска трех вариантов гена *SGCA* (способность выявить хотя бы один мутантный аллель) оказалась в среднем довольно высокой (70% в группе больных ПКМД и 50% в группе больных МДД/Б), следовательно, данная тест-система может быть рекомендована в качестве первичного этапа молекулярной диагностики ПКМД 2D у больных с соответствующей клинической картиной.

Ключевые слова: ПКМД 2D, мышечные дистрофии, спектр мутаций, *SGCA*, саркогликанопатия.

DOI: 10.1134/S0016675819020048

Еще на рубеже ХХI в. зарубежными исследователями в группе поясно-конечностных мышечных дистрофий (ПКМД) была обособлена подгруппа саркогликанопатий. К данной подгруппе заболеваний относятся четыре аутосомно-рецессивные формы, вызываемые молекулярными дефектами в генах, кодирующих белки саркогликаны (α , β , γ и δ). Эти четыре белка представляют собой субъединицы, формирующие тетрамерный трансмембранный саркогликановый подкомплекс, который является частью большого дистрофин-гликопротеинового комплекса, участвующего в соединении цитоскелета мышечных волокон с окружающим их внеклеточным матриксом [1]. Наиболее частая

саркогликанопатия во всем мире — α -саркогликанопатия, по номенклатуре, принятой на международном семинаре экспертов в 1995 г., именуемая ПКМД 2D. Доля ПКМД 2D среди всех ПКМД, включая аутосомно-доминантные формы, составляет от 4% (США) до 26.9% (Индия) [2, 3], в Чехии на эту форму приходится 2.8% случаев ПКМД с аутосомно-рецессивным типом наследования [4]. При этом в подгруппе саркогликанопатий доля ПКМД 2D составляет от 34 до 55% [5–7]. Первые упоминания о ПКМД 2D в научной литературе появились в 1994 г., когда двумя независимыми авторами в семьях с тяжелой “дюшенноподобной” детской аутосомно-рецессивной

мышечной дистрофией была установлена связь заболевания с локусом 17q21, идентифицирован ген *SGCA* и его белковый продукт, названный адгалином (α -саркогликан) [8, 9]. На сегодняшний день по информации, предоставляемой непрерывно пополняемой базой данных HGMD (Human Gene Mutation Database Professional 2017.4), зарегистрировано 98 патогенных и вероятно патогенных вариантов гена *SGCA* (NM_000023), большинство из которых приходится на однонуклеотидные миссенс- и нонсенс-замены; реже встречаются нуклеотидные варианты, приводящие к сдвигу рамки считывания (18%) либо затрагивающие донорные или акцепторные сайты сплайсинга (8%). Для гена *SGCA* выявлена общая гено-фенотипическая корреляция типа молекулярного дефекта и тяжести клинической картины. Наиболее тяжелый — “дюшенноподобный” — вариант течения мышечной дистрофии с манифестацией в раннем возрасте развивается при наличии так называемых null-мутаций (Loss-of-function вариантов, приводящих к сдвигу рамки считывания или образованию преждевременного терминирующего кодона), обуславливающих резкое снижение или тотальное отсутствие α -саркогликана в мышечной ткани [10]. Миссенс-варианты меньше влияют на экспрессию гена, приводя к снижению биосинтеза белка в той или иной степени, вследствие чего у больных формируется более мягкий фенотип [11]. Основные клинические симптомы ПКМД 2D типичны для всей группы ПКМД, выражаются прогрессирующей слабостью и атрофией скелетной мускулатуры верхнего и нижнего поясов конечностей, а также проксимальных мышечных групп, снижением и исчезновением рефлексов, постепенным формированием контрактур крупных суставов и сколиоза. К особенностям как данной формы, так и группы саркогликанопатий в целом относятся псевдогипертрофии икроножных мышц; у некоторых больных развивается кардиомиопатия. Как и при большинстве первично мышечных заболеваний, в периферической крови больных наблюдается повышение сывороточной креатинфосфокиназы (КФК) (в 5–100 раз). Возраст манифестации заболевания варьирует от 2 до 30 лет, инвалидизация наступает, как правило, после 10–20 лет от начала заболевания. Интеллект больных при этом заболевании остается сохранным. Таким образом, по совокупности клинических и лабораторных признаков ПКМД 2D зачастую сложно дифференцировать не только от других аутосомных форм ПКМД, но и от мышечной дистрофии Дюшенна/Беккера (МДД/Б), особенно в изолированных случаях. Некоторое время назад в РФ было проведено первичное молекулярно-генетическое исследование саркогликанопатий на выборке больных женского пола, которым в связи с тяжестью клинических прояв-

лений и несмотря на половую принадлежность был установлен диагноз “МДД/Б”. В результате исследования патогенные варианты идентифицированы у 13.2% пробандов, при этом большинство патологических аллелей пришлось всего на два варианта: с.229C>T (p.Arg77Cys) и с.271G>A (p.Gly91Ser) [12]. Согласно литературным данным вариант с.229C>T является самой распространенной в мире мутацией этого гена, причем в Финляндии она выявляется практически в 100% случаев ПКМД 2D [13–15]. Вариант нуклеотидной последовательности с.271G>A (p.Gly91Ser) описан единожды в компаунд-гетерозиготном состоянии у двоих сибсов в итальянской семье [5]. Таким образом, поскольку ранее у российских больных уже были выявлены повторяющиеся варианты гена *SGCA*, очевидна целесообразность создания простой в техническом исполнении диагностической системы для их детекции на основании уже существующих рутинных лабораторных методик. Такая система могла бы найти применение как первичный этап для диагностики ПКМД 2D у больных с подходящей клинической картиной.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили образцы ДНК 516 больных с входящим диагнозом “ПКМД” (303 женщины и 213 мужчин), 1355 больных мужского пола с входящим диагнозом “МДД/Б” и 104 больных (76 мужчин и 28 женщин) с входящим диагнозом “мышечная дистрофия Эмери–Дрейфуса” (МДЭД). Диагностические критерии для включения пациентов в исследование различались в зависимости от выборки:

- Выборка больных ПКМД: 1) преимущественное поражение мышц тазового и плечевого поясов; 2) повышение уровня креатинфосфокиназы; 3) первично-мышечный характер поражения на ЭМГ; 4) отсутствие вертикального типа наследования (применялся только в семейных случаях).

- Выборка больных МДД/Б: 1) преимущественное поражение мышц тазового и плечевого поясов; 2) мужской пол; 3) резкое повышение уровня креатинфосфокиназы.

- Выборка больных МДЭД: 1) преимущественное поражение тазово-перонеальных и плече-лопаточных мышц; 2) контрактуры крупных суставов, тугоподвижность позвоночника; 3) наличие признаков аритмогенной кардиомиопатии у пробанда или его родственников; 4) умеренно повышенный уровень КФК; 5) первично-мышечный характер поражения на ЭМГ.

Контрольную выборку составили 528 образцов ДНК биобанка лаборатории ДНК-диагностики

Таблица 1. Олигонуклеотидные пробы и праймеры, применявшиеся для детекции искомых вариантов гена *SGCA*

Детектируемый вариант	Последовательность олигонуклеотидов (5' → 3')	Длина фрагмента, пн
с.229С>Т, экзон 3	FN: GTTCGTACGTGAATCGCGGTACGACCTGCCCCGGTGCTCC	85 – С (норма), 88 – Т (с.229С>Т)
	FM: GTTCGTACGTGAATCGCGGTACTCAGACCTGCCCCGGTGCTCT	
	RN: GCTACACCCAGCGCAGCCTTTTCGATGCGATCCGATGCCTTCATG	
с.271G>А, экзон 3	FN: GTTCGTACGTGAATCGCGGTACCACCCTGGCTTCCTCTACG	98 – G (норма), 102 – Т (с.271G>А)
	FM: GTTCGTACGTGAATCGCGGTACTCACCACCCTGGCTTCCTCTACA	
	RN: GCTCTGCCACCCAGAAGATCTTTATTGTTATTTTC GATGCGATCCGATGCCTTCATG	
с.850С>Т, экзон 7	FN: GTTCGTACGTGAATCGCGGTACCCACTGAGGCCCCAGACC	124 – С (норма), 128 – Т (с.850С>Т)
	FM: GTTCGTACGTGAATCGCGGTACTCACCACCTGAGGCCCCAGACT	
	LINKER: GTGACTTCTTGGTGGATGCTCTGGTCA	
	RN: CCTCCTGGTGCCCTGCTGTTTATTGTTATTTTCGATGCGATCCGATGCCTTCATG	
Универсальные MLPA-праймеры	F: GTTCGTACGTGAATCGCGGTAC R: CATGAAGGCATCGGATCGCATC	—

ФГБНУ “МГНЦ”, полученных от необследованных неродственных жителей различных регионов РФ.

Забор биологического материала проводили в лабораторных кабинетах медико-генетических консультаций и лечебно-профилактических учреждений разных регионов РФ и стран СНГ. От всех пациентов получено информированное согласие на проведение исследования, а в случае несовершеннолетних пациентов – от их родителей или законных представителей.

Выделение ДНК осуществляли из образцов цельной венозной крови или сухих пятен крови с помощью наборов реактивов для выделения Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, США) и DLAto™ DNA Prep100 (ООО “Изоген”, Россия) по стандартным протоколам производителей. Поиск повторяющихся вариантов гена *SGCA* выполнен методом мультиплексной проба-зависимой лигазной реакции с последующей амплификацией (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification – MLPA). Дизайн олигонуклеотидных проб проведен в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ “МГНЦ” таким образом, чтобы в “одной пробирке” детектировать три варианта гена *SGCA* (табл. 1). MLPA-реакция осуществлялась на программируемом термоциклере MC2 фирмы “ДНК-технология” (Россия) в течение двух часов в реакционной смеси следующего состава: 1) 0–50 нг геномной ДНК, 2) 7–10 фМ/мл каждого оригинального олигонуклеотида, 3) 0.4 ед. активности Pfu-DNA-лигазы, 4) буфер для лигирования (20 мМ трис-НСl с pH 7.5, 20 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 0.1% Igepal, 0.01 мМ гАТР, 1 мМ DTT), 5) 20–30 мл минерального масла. На втором этапе проводили стандартную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с олигопраймерами (универсальными), комплементарными участкам последовательно-

стей, специально для данной реакции синтезированным в олигонуклеотидных пробах. В смесь, в которой предварительно провели лигазную реакцию, добавляли реакционную смесь для ПЦР следующего состава: 1) по 0.25 мМ каждого оригинального олигопраймера, 2) по 200 мМ каждого нуклеозидтрифосфата, 3) 1.0 ед. активности ДНК-полимеразы Biotaq (БиоМастер, Россия), 4) буфер для ПЦР (67 мМ трис-НСl, 16.6 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.01% твин-20, pH 8.8). Амплификацию проводили со следующими параметрами: I этап – предварительная денатурация при 95°C – 5 мин; лигирование олигонуклеотидных проб при температуре 62°C – 1 ч; II этап – предварительная денатурация при 95°C – 5 мин, 94°C – 2 с, температура отжига праймера – 2 с, элонгация при 72°C – 2 с, 30–32 цикла, с последующей окончательной достройкой при 72°C в течение 5 мин.

Визуализацию результатов амплификации проводили методом электрофореза в 8%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) 20 × 20 см с массовым соотношением акриламида (АА) и бисакриламида (БА) 19 : 1. В качестве электрофорезного буфера использовали 1× ТВЕ. Результаты электрофореза визуализировались после окрашивания геля раствором бромистого этидия с помощью документирующей системы GelDoc фирмы Bio-Rad (США) в УФ-излучении с длиной волны 312 нм.

Поиск второго патологического аллеля у пациентов с частым вариантом гена *SGCA* в гетерозиготном состоянии осуществлялся прямым секвенированием фрагментов нуклеотидных последовательностей всех кодирующих и некодирующих экзонов этого гена по методу Сенгера на приборе ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, США) согласно протоколу фирмы-производителя. Матрицы для секвени-

Таблица 2. Олигонуклеотидные праймеры и условия амплификации, применявшиеся для анализа последовательности гена *SGCA*

Фрагмент	Последовательность праймеров, 5' → 3'	Размер, пн	Температура отжига*	MgCl ₂ , мМ
<i>SGCA</i> Экзон 1	F: GGGAGGCTGACGCTGGGAC R: CCACACCTCCGTCTTACCACC	195	65°C	4
<i>SGCA</i> Экзоны 2–3	F: GCCCAGGACTGAGGCTGGC R: CTCCTAGGAGGCCACTCTGGC	475	68°C	2
<i>SGCA</i> Экзоны 4–5	F: CACGTTTCTCCCCTAACCCAC R: GCCACAAGCTGCATCCTCCTC	730	68°C	2
<i>SGCA</i> Экзон 6	F: CCCCTGGCAGAGTGGTGCC R: GAGACGGAGATAGGAAGCAGC	300	68°C	2
<i>SGCA</i> Экзоны 7–8	F: GTGTCCAGCCAGCCACTTCC R: CAACAACGTCTAGGTGGGCTC	620	68°C	2
<i>SGCA</i> Экзоны 9–10	F: GGGCAGCTGACTCCCAGAGC R: GAATCAGCAGGTGGGATGTGC	590	58°C	2

* Амплификацию проводили в режиме Matrix regulation.

рования получали методом стандартной ПЦР с использованием ДНК-полимеразы Biotaq (Биомастер) в объеме 25 мкл реакционной смеси состава, аналогичного смеси для этапа II в реакции MLPA, но с добавлением MgCl₂ в указанной в табл. 2 концентрации. Праймеры и условия амплификации, используемые в данной работе, приведены в табл. 2.

Для поиска протяженных делеций/дупликаций гена *SGCA* использовался набор SALSA MLPA P116 SGC probemix (MRC-Holland, Нидерланды); реакцию проводили по протоколам фирмы-производителя. Для точного количественного анализа данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Coffalyser V8, предоставляемого компанией-разработчиком MLPA [16].

Биоинформатический анализ клинической значимости выявленных изменений нуклеотидной последовательности проводили с помощью интернет-ресурсов SIFT, Provean, UMD-Predictor, FATHMM, PolyPhen-2 и NetGene2 [17–21]. Для статистической обработки данных применялись пакеты программы STATISTICA 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Используя полученные в предыдущем исследовании данные [12], была разработана диагностическая MLPA-система для поиска повторяющихся вариантов с.229C>T (p.Arg77Cys) и с.271G>A (p.Gly91Ser), в которую включили еще один патогенный вариант гена *SGCA* — с.850C>T (p.Val247Met), отобранный из базы данных Leiden Open (source) Variation Database на основании высокой частоты встречаемости среди европейских

больных (рис. 1). С помощью этой системы протестированы три выборки больных мышечными дистрофиями, манифестирующими после периода нормального моторного развития, сформированные на основании направляющего клинического диагноза.

В выборке больных ПКМД анализ проведен 371 больному; для 145 пациентов молекулярно-генетический диагноз был подтвержден ранее, при этом мутации выявлялись в широком спектре генов, ответственных за развитие различных форм мышечных дистрофий с разными типами наследования, а также спинальной мышечной атрофии: *CAPN3*, *FKRP*, *DMD*, *SMN1*, *LMNA*, *ANO5*, *ZNF9*, *POMT1*, *LAMA2* [22]. В данной выборке «частые» варианты гена *SGCA* выявлены у девяти пациентов (1.7%) на 14 хромосомах (1.4%). Варианты с.229C>T и с.271G>A встретились как в гомозиготном, так и в гетерозиготном состоянии, причем на каждый из них приходится одинаковое число хромосом больных — 6; вариант с.850C>T встретился на двух хромосомах в гетерозиготном состоянии с другими вариантами. Для четырех больных с повторяющимся вариантом в гетерозиготном состоянии с целью поиска второго патологического аллеля проведено секвенирование всей кодирующей последовательности гена *SGCA* по методу Сенгера. В результате идентифицированы нонсенс-варианты с.402C>G (Tyr134Ter) и с.574C>T (p.Arg192Ter), миссенс-вариант с.308T>C (p.Ile103Thr) и прежде не описанный в литературе вариант с.223delT (p.Trp75Glyfs*136), приводящий к сдвигу рамки считывания и образованию преждевременного терминирующего кодона. Таким образом, у всех девяти больных выявлены два

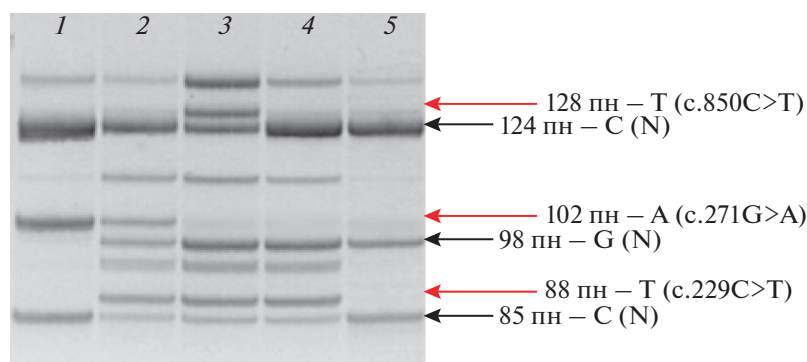


Рис. 1. Электрофореграмма результатов тест-системы для детекции трех вариантов гена *SGCA* методом MLPA. 1 – про- банд с вариантом с.271G>А в гомозиготном состоянии; 2 – пробанд с вариантами с.229С>Т и с.271G>А в компаунд- гетерозиготном состоянии; 3 – пробанд с вариантами с.229С>Т и с.850С>Т в компаунд-гетерозиготном состоянии; 4 – пробанд с вариантом с.229С>Т в гетерозиготном состоянии; 5 – пробанд без мутаций.

патологических аллеля (табл. 3). Исходя из урав- нения Харди–Вайнберга, на основании наблюда- емого числа гомо- и гетерозигот повторяющихся вариантов в исследованной выборке рассчитано ожидаемое число больных ($N_{ож}$, “идеальный” ва- риант событий, при котором все 100% патологи- ческих аллелей у 100% больных обнаружены), в данном случае $N_{ож} = 10$. Соответственно, доля ПКМД 2D в этой выборке составила не менее 1.9%, а суммарная аллельная частота трех повто- ряющихся вариантов (из уравнения Харди– Вайнберга) составляет 71.4%. Информативность MLPA-системы для поиска повторяющихся ва- риантов гена *SGCA*, под которой понимается спо- собность с помощью настоящей тест-системы вы- явить хотя бы один тестируемый мутантный ал- лель, у больных в группе с ПКМД достигает 70%.

В выборке 1355 больных МДД/Б анализ прове- ден 548 больным, поскольку для 608 из них ранее был установлен молекулярно-генетический диа- гноз на основании анализа мутаций гена *DMD* (делеции/дупликации одного или нескольких эк- зонов) и “частых” в РФ вариантов генов *CAPN3* (с.550delA, с.598_612del15), *FKRP* (с.826C>A, с.229C>Т) и *SMN1* (делеция экзонов 7–8); мате- риал 199 пациентов оказался непригоден для ис- следования используемой методикой. Искомые варианты гена *SGCA* выявлены у четырех пациен- тов (0.3%) на семи хромосомах (0.3%) (табл. 3). У больного с вариантом с.229С>Т в гетерозиготном состоянии дополнительно проведено секвениро- вание всей кодирующей последовательности и областей экзон-интронных соединений гена *SGCA*, а также произведен поиск протяженных

Таблица 3. Генотипы больных, идентифицированные в исследованных выборках

Пациент	Пол	Входящий диагноз	Генотип: нуклеотидный вариант	Генотип: аминокислотная замена
C306	Ж	ПКМД	с.229C>Т/с.229C>Т	p.Arg77Cys/p.Arg77Cys
F100	Ж	ПКМД	с.271G>А/с.271G>А	p.Gly91Ser/p.Gly91Ser
L468	Ж	ПКМД	с.271G>А/с.271G>А	p.Gly91Ser/p.Gly91Ser
F4.1	М	ПКМД	с.271G>А/с.229C>Т	p.Gly91Ser/p.Arg77Cys
C140	Ж	ПКМД	с.850C>Т/с.229C>Т	p.Val247Met/p.Arg77Cys
C70.1	Ж	ПКМД	с.850C>Т/с.402C>G	p.Val247Met/p.Tyr134Ter
AA9085	М	ПКМД	с.271G>А/с.308T>C	p.Gly91Ser/p.Ile103Thr
FKRP121	Ж	ПКМД	с.229C>Т/с.223delT	p.Arg77Cys/p.Trp75Glyfs*136
LGMD 486	М	ПКМД	с.229C>Т/с.574C>Т	p.Arg77Cys/p.Arg192Ter
1330	М	МДД/Б	с.229C>Т/с.229C>Т	p.Arg77Cys/p.Arg77Cys
2080	М	МДД/Б	с.271G>А/с.271G>А	p.Gly91Ser/p.Gly91Ser
2380	М	МДД/Б	с.271G>А/с.271G>А	p.Gly91Ser/p.Gly91Ser
2435*	М	МДД/Б	с.229C>Т/N	p.Arg77Cys/N

* Вероятно является популяционным носителем заболевания.

делеций/инсерций этого гена, однако второй патологический аллель выявить не удалось.

Как известно, вариант с.229C>T является самым частым патогенным вариантом гена *SGCA* в мире (частота аллеля T = 0.0004562, данные базы-агрегатора gnomAD). В настоящей работе выявлено, что в контрольной выборке ($n = 528$) вариант с.229C>T выявлен у одного человека в гетерозиготном состоянии. Следовательно, при довольно грубой оценке каждый 528-й житель РФ является популяционным носителем этой мутации, в то время как в группе больных также выявлен один предположительно носитель варианта с.229C>T. Применение точного критерия Фишера для двух независимых групп с целью определения статистической значимости в данном случае невозможно вследствие большого объема выборок. Поэтому статистическая значимость оценивалась путем расчета показателя отношения шансов (OR) популяционного носительства (фактор) в выборке больных и в контрольной группе (исходы), при этом получили значение $OR = 0.96$ (95%-ный доверительный интервал от 0.06 до 15.44). При отношении шансов, близком к единице, шансы обнаружить фактор риска в сравниваемых группах приблизительно одинаковы; при этом доверительный интервал включает в себя 1, что свидетельствует об отсутствии статистической значимости связи между фактором и исходом при уровне значимости $p > 0.05$. Из этого следует, что больной с вариантом с.229C>T в гетерозиготном состоянии вероятнее всего — его популяционный носитель и выявленный вариант не имеет отношения к развитию заболевания.

Поскольку в выборке больных МДД/Б не встретилось пробандов с генотипами, образованными комбинацией повторяющегося и любого другого патогенного варианта гена *SGCA*, расчет ожидаемого числа больных ПКМД 2D производился на основании значений, полученных из уравнения Харди–Вайнберга для выборки больных ПКМД. Вычислив $N_{ож} = 6$ для выборки больных МДД/Б, которым удалось провести анализ МЛРА-системой ($n = 548$), был осуществлен перерасчет этого значения на число всех больных без мутаций в других исследованных генах ($n = 747$, $N_{ож} = 8$). Таким образом рассчитали долю ПКМД 2D в данной выборке, которая составила не менее 0.6%. При этом информативность МЛРА-системы в группе больных МДД/Б оказалась ниже, чем в первой выборке, и составила 50%.

В выборке больных МДЭД МЛРА-системой протестировано 49 пациентов, у которых ранее не было выявлено мутаций в генах, ответственных за три формы МДЭД (*LMNA*, *EMD*, *FHL1*), а также частых в РФ мутаций в генах *CAPN3* и *FKRP* [23]. Ни у одного пациента искомые варианты не обнаружены.

ОБСУЖДЕНИЕ

ПКМД 2D (α -саркогликанопатия) является самой частой в мире формой в группе саркогликанопатий, на которые в общей сложности в зависимости от популяции приходится от 2 до 53.8% всех ПКМД [24]. В настоящей работе продемонстрировано, что в выборке больных ПКМД из РФ на ПКМД 2D приходится не менее 1.9% случаев всех аутосомно-рецессивных ПКМД, в то время как среди больных МДД/Б мужчин доля этой формы составляет не менее 0.6%, что в 3 раза ниже по сравнению с первой выборкой. Данный результат может быть объяснен в рамках особенностей клинической картины МДД/Б, которые изначально подразумевают более тяжелое, злокачественное течение с обязательным вовлечением миокарда и более ранним возрастом манифестации заболевания. В то время как ПКМД 2D характеризуется более вариабельной по тяжести клинической картиной и характером течения, а кардиомиопатия развивается гораздо реже. Следовательно, большинство болеющих ПКМД 2D мужчин уже на этапе клинического обследования попадали в выборку больных ПКМД, а наличие больных ПКМД 2D в выборке больных МДД/Б обусловлено формированием у них тяжелого “дюшенноподобного” фенотипа, клинически неотличимого от МДД/Б. Свойство мутаций гена *SGCA* приводить к тяжелой “дюшенноподобной” мышечной дистрофии также объясняет значительно более высокую долю ПКМД 2D среди женщин с направляющим диагнозом “МДД/Б” (13.2%, результаты исследования [12]), по сравнению с двумя исследованными в этой работе выборками. Столь явное различие значений доли ПКМД 2D в настоящем и предыдущем исследованиях очевидно обусловлено тем, что выборка больных женщин с направляющим диагнозом “МДД/Б” являлась более подходящим объектом исследования для определения вклада саркогликанопатий в спектр ПКМД по большинству критериев (женский пол, с высокой долей вероятности исключающий диагноз “МДД/Б”, тяжелая клиническая картина проксимальной миопатии, ранняя манифестация заболевания), нежели исследуемые в этой работе. Следовательно, с высокой долей вероятности можно утверждать, что доля ПКМД 2D в РФ ни в одной из выборок больных ПКМД (за исключением тех, для которых доступны результаты иммуногистохимического исследования биоптатов мышечной ткани) не может превышать 13.2%, что и было подтверждено в настоящей работе.

Спектр мутаций гена *SGCA* и их относительная аллельная частота различались в зависимости от выборки. В группе больных МДД/Б выявлены только два “частых” варианта с.229C>T и с.271G>A, на которые приходится соответственно 33 и 66%

Таблица 4. Результаты интерпретации выявленных вариантов гена *SGCA*

Нуклеотидный вариант	Аминокислотная замена	Критерии патогенности	Клиническая значимость
c.271G>A	p.Gly91Ser	PM2, 5 + PP1, 3	Вероятно патогенный
c.223delT	p.Trp75Glyfs*136	PVS1 + PM2	Вероятно патогенный
c.308T>C	p.Ile103Thr	PM2, 5 + PP3	Неопределенного клинического значения
c.402C>G	p.Tyr134Ter	PVS1 + PM2	Вероятно патогенный
c.574C>T	p.Arg192Ter	PVS1 + PM2 + PP1	Патогенный

выявленных вариантов. Тот факт, что в этой группе не встретился вариант c.850C>T, можно считать закономерным, поскольку по литературным источникам больные, имеющие в генотипе данный вариант в гомо- или компаунд-гетерозиготном состоянии, отличаются более мягкой клинической картиной ПКМД и относительно доброкачественным течением заболевания с поздней инвалидизацией [7, 14, 25].

Спектр мутаций гена *SGCA* в группе больных ПКМД шире, чем в выборке больных МДД/Б. На долю трех искомым вариантов гена *SGCA* (c.229C>T, c.271G>A и c.850C>T) в этой группе больных приходится 78% всех выявленных вариантов. При этом доля вариантов c.229C>T и c.271G>A среди больных хромосом оказалась одинакова (33%). Сравнение долей этих вариантов, полученных в данной работе для двух выборок (ПКМД и МДД/Б), со значениями, полученными в предыдущей работе (50% для варианта c.229C>T и 30% для варианта c.271G>A [12]), не позволяет выявить наличие статистически значимых различий между сопоставляемыми значениями в этих трех выборках вследствие малого числа выявленных хромосом с данными вариантами [12]. Отдельно стоит отметить, что в исследованных выборках больных доля варианта c.271G>A, который по литературным источникам встретился всего в одной итальянской семье, сравнима с долей патогенного варианта c.229C>T. Следовательно, настоящая работа в совокупности с результатами предыдущего исследования подтверждает, что больные ПКМД 2D в РФ, в отличие от больных в остальных популяциях мира, имеют две преобладающие (мажорные) мутации гена *SGCA*: c.229C>T и c.271G>A. Вариант c.850C>T встретился в группе больных ПКМД дважды и только в гетерозиготном состоянии с другими вариантами. Для больного с генотипом c.850C>T(;)229C>T были доступны анамнез и минимальное описание клинических особенностей. Пробанд 27 лет с дебютом заболевания в 12 лет, на момент осмотра отмечались мышечные боли и признаки мышечной слабости в проксимальных отделах, гипотрофия мышц бедер и умеренные псевдогипертрофии икроножных мышц, данных за кардиомиопатию нет. При этом пробанд оставался амбулаторным, но пере-

двигался с поддержкой. Этот случай подтверждает данные литературных источников, что вариант c.850C>T является “мягким” и даже в компаунд-гетерозиготном состоянии приводит к развитию сравнительно мягкого фенотипа ПКМД.

Помимо трех искомым вариантов гена *SGCA* в выборке больных ПКМД выявлены четыре неповторяющихся варианта нуклеотидной последовательности, три из них зарегистрированы в литературных источниках и внесены в базу данных HGMD: c.574C>T (p.Arg192Ter), c.402C>G (p.Tyr134Ter) и c.308T>C (p.Ile103Thr). Нонсенс-вариант c.574C>T (p.Arg192Ter) описан в одной публикации в гомозиготном состоянии у двух албанских sibсов, имеющих клиническую картину ПКМД 2D и высокий уровень сывороточной креатинфосфокиназы в крови; при иммуногистохимическом исследовании у обоих sibсов обнаружили снижение α- и δ-саркогликана в образцах мышечной биопсии [26]. Нонсенс-вариант c.402C>G (p.Tyr134Ter) прежде был упомянут в двух публикациях, причем только в одной из них указано, что он выявлен у больного с клинической картиной МДД/Б [27, 28]. Миссенс-вариант c.308T>C (p.Ile103Thr) описан также в одной публикации в компаунд-гетерозиготном состоянии у больного из Европы с “дюшенноподобным” фенотипом и ранней инвалидизацией (12 лет). Поскольку каждый из трех ранее описанных вариантов в экспериментальных работах упомянут единожды, как и один из тестируемых MLPA-системой вариантов (c.271G>A), для них проведено определение клинической значимости согласно существующим в РФ критериям интерпретации вариантов, представленным в “Руководстве по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS)” [29]. Та же процедура проведена для ранее не описанного в литературе варианта c.223delT (p.Trp75Glyfs*136). Результаты представлены в табл. 4.

Необходимо отметить, что при интерпретации вариантов не был задействован критерий категории “средней тяжести” PM3, поскольку материал родителей пробандов с идентифицированными вариантами не был доступен и проверка цис/транс-положения этих вариантов не проводилась. Следовательно, клиническая зна-

чимостью проанализированных вариантов занижена по объективным причинам. Из всех проанализированных вариантов только один оказался вариантом неопределенного клинического значения (с.308T>C). При этом постановка молекулярно-генетического диагноза возможна на основании наличия в генотипе больного либо двух патогенных вариантов, либо комбинации патогенного и вероятно патогенного вариантов или же двух вероятно патогенных вариантов, в последнем случае — при наличии четко очерченной и специфической клинической картины заболевания. Это означает, что для установления молекулярно-генетического диагноза у пробанда, имеющего в генотипе этот вариант (с.271G>A(;)308T>C), требуется как минимум либо исследование цис/транс-положения выявленных вариантов, либо накопление сегрегационных данных для варианта с неопределенным клиническим значением, что позволило бы перевести его в категорию “вероятно патогенный”.

В случае с обследованной нами выборкой больных МДЭД следует отметить, что пациенты с этой клинической картиной довольно хорошо распознаются опытными врачами-генетиками или неврологами уже на клиническом уровне. Однако нужно помнить, что МДЭД, как и остальные исследуемые в данной работе заболевания, характеризуется прогрессирующим течением. Следовательно, существует вероятность, что отличительные для МДЭД признаки (отсутствие гипертрофий, ранние контрактуры крупных суставов, ретракция ахилловых сухожилий) могли отсутствовать или быть незначительно выраженными на момент обследования, либо паттерн вовлеченных в патологический процесс мышечных групп не позволял однозначно заподозрить ту или иную форму миопатии. Исходя из этих соображений, в группе больных МДЭД также проведен поиск повторяющихся вариантов гена *SGCA*, который оказался неэффективен. Данный результат в очередной раз демонстрирует существование очевидных различий клинических проявлений МДЭД и ПКМД 2D уже на ранних этапах развития этих заболеваний.

Подводя итоги работы, мы получаем возможность усовершенствовать существующий алгоритм молекулярно-генетической диагностики ПКМД 2D. На группе больных ПКМД было продемонстрировано, что эффективность разработанной MLPA-системы для детекции повторяющихся вариантов гена *SGCA* оказалась довольно высокой (70%). Следовательно, данная система рекомендуется как первичный этап молекулярной диагностики в первую очередь для больных с клинической картиной ПКМД и наличием псевдогипертрофий, а также для женщин с тяжелой “дюшенноподобной” формой проксимальной мышечной дистрофии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Davies K.E., Nowak K.J. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. V. 7. № 10. P. 762–773. doi 10.1038/nrm2024
2. Moore S.A., Shilling C.J., Westra S. et al. Limb-girdle muscular dystrophy in the United States // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2006. V. 65. № 10. P. 995–1003. doi 10.1097/01.jnen.0000235854.77716.6c
3. Meena A.K., Sreenivas D., Sundaram C. et al. Sarcoglycanopathies: a clinico-pathological study // *Neurol. India.* 2007. V. 55. № 2. P. 117–121. doi 10.4103/0028-3886.32781
4. Ginjaar H.B., van der Kooi A.J., Ceelie H. et al. Sarcoglycanopathies in Dutch patients with autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy // *J. Neurol.* 2000. V. 247. № 7. P. 524–529.
5. Guglieri M., Magri F., D'Angelo M.G. et al. Clinical, molecular, and protein correlations in a large sample of genetically diagnosed Italian limb girdle muscular dystrophy patients // *Hum. Mutat.* 2008. V. 29. № 2. P. 258–266. doi 10.1002/humu.20642
6. Duggan D.J., Gorospe J.R., Fanin M. et al. Mutations in the sarcoglycan genes in patients with myopathy // *N. Engl. J. Med.* 1997. V. 336. № 9. P. 618–624. doi 10.1056/nejm199702273360904
7. Trabelsi M., Kavian N., Daoud F. et al. Revised spectrum of mutations in sarcoglycanopathies // *Eur. J. Hum. Genet.* 2008. V. 16. № 7. P. 793–803. doi 10.1038/ejhg.2008.9
8. Roberds S.L., Leturcq F., Allamand V. et al. Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy // *Cell.* 1994. V. 78. № 4. P. 625–633.
9. McNally E.M., Yoshida M., Mizuno Y. et al. Human adhalin is alternatively spliced and the gene is located on chromosome 17q21 // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. № 21. P. 9690–9694.
10. Campbell K.P. Adhalin gene mutations and autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy // *Ann. Neurol.* 1995. Sep. V. 38. № 3. P. 353–354. doi 10.1002/ana.410380302
11. Eymard B., Romero N.B., Leturcq F. et al. Primary adhalinopathy (alpha-sarcoglycanopathy): clinical, pathologic, and genetic correlation in 20 patients with autosomal recessive muscular dystrophy // *Neurology.* 1997. V. 48. № 5. P. 1227–1234.
12. Щагина О.А., Полякова Д.А., Рыжкова О.П. и др. Причины мышечной дистрофии у женщин с направляющим диагнозом “мышечная дистрофия Дюшена/Беккера” // *Мед. генетика.* 2017. Т. 16. № 11. С. 17–22.
13. Moreira E.S., Vainzof M., Suzuki O.T. et al. Genotype-phenotype correlations in 35 Brazilian families with sarcoglycanopathies including the description of three novel mutations // *J. Med. Genet.* 2003. V. 40(2):E12. doi 10.1136/jmg.40.2.e12
14. Hackman P., Juvonen V., Sarparanta J. et al. Enrichment of the R77C alpha-sarcoglycan gene mutation in Finnish LGMD2D patients // *Muscle Nerve.* 2005. V. 31. № 2. P. 199–204. doi 10.1002/mus.20267

15. *Carrie A., Piccolo F., Leturcq F. et al.* Mutational diversity and hot spots in the alpha-sarcoglycan gene in autosomal recessive muscular dystrophy (LGMD2D) // *J. Med. Genet.* 1997. V. 34. № 6. P. 470–475.
16. <http://mrc-holland.com>.
17. <http://provean.jcvi.org/index.php>.
18. <http://umd-predictor.eu/>.
19. <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>.
20. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>.
21. <http://fathmm.biocompute.org.uk/>.
22. Рыжкова О.П. Клинико-молекулярно-генетический анализ изолированных поясно-конечностных мышечных дистрофий, являющихся ферментопатиями: Автореф. дис. ... канд. мед. наук, 2011. 27 с.
23. Адян Т.А. Клинико-генетическое разнообразие и молекулярная диагностика мышечной дистрофии Эмери–Дрейфуса: Автореф. дис. ... канд. мед. наук, 2015. 24 с.
24. *Mahmood O.A., Jiang X.M.* Limb-girdle muscular dystrophies: where next after six decades from the first proposal (Review) // *Mol. Med. Rep.* 2014. V. 9. № 5. P. 1515–1532. doi 10.3892/mmr.2014.2048
25. *Klinge L., Dekomien G., Aboumoussa A. et al.* Sarcoglycanopathies: can muscle immunoanalysis predict the genotype? // *Neuromuscul. Disord.* 2008. V. 18. № 12. P. 934–941.
26. *Babameto-Laku A., Tabaku M., Tashko V. et al.* The first case of primary alpha-sarcoglycanopathy identified in Albania, in two siblings with homozygous alpha-sarcoglycan mutation // *Genet. Couns.* 2011. V. 22. № 4. P. 377–383.
27. *Schara U., Gencik M., Mortier J. et al.* Alpha-sarcoglycanopathy previously misdiagnosed as Duchenne muscular dystrophy: implications for current diagnostics and patient care // *Eur. J. Pediatr.* 2001. V. 160. № 7. P. 452–453.
28. *Xiong H.Y., Alipanahi B., Lee L.J. et al.* The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease // *Science*. 2015. V. 347. № 6218:1254806. Epub. 2014. Dec. 18. doi 10.1126/science.1254806
29. Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б. и др. Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) // *Мед. генетика*. 2017. Т. 16. № 7. С. 4–17.

Molecular and Genetic Study of Limb-Girdle Muscular Dystrophy 2D in Patient Cohorts with Various Forms of Progressive Muscular Dystrophy

**M. V. Bulakh^{a,*}, N. M. Galeeva^a, D. A. Polyakova^a,
O. P. Ryzhkova^a, E. L. Dadali^a, and A. V. Polyakov^{a,**}**

^a*Research Centre for Medical Genetics, Moscow, 115522 Russia*

*e-mail: mariya.bulakh@gmail.com

**e-mail: apol@dnalab.com

Limb-girdle muscular dystrophy 2D (LGMD 2D) is the most common form of sarcoglycanopathies which include autosomal recessive LGMDs caused by various molecular defects in the genes encoding sarcoglycan family proteins (α , β , γ and δ). LGMD 2D occurs due to mutations in the *SGCA* gene that encodes the α -sarcoglycan. In general, it is difficult to distinguish clinical features of LGMD 2D from other pseudohypertrophic LGMDs and Duchenne/Becker muscular dystrophy (MDD/B). This research of LGMD 2D based on the analysis of the recurrent *SGCA* gene variants (C.229C>T, C.271G>A and c.850C>T) in three patient cohorts with progressive muscular dystrophies (plural) manifesting after a normal motor development period. No LGMD 2D patients were found within the cohort with clinical diagnosis of Emery-Dreifuss muscular dystrophy. In the cohort of patients with “LGMD” clinical diagnosis LGMD 2D accounts at least 1.9% and within a group of patients with clinical diagnosis “MDD/B” it accounts at least 0.6%. It is noteworthy that the most common *SGCA* variant in the world – c.229C>T and another one (c.271G>A which was found in only one Italian family) in our cohorts were revealed on almost the same number of patients chromosomes. Therefore, there are two major variants of this gene (c.229C>T and c.271G>A) in Russian LGMD 2D patients that differ them from LGMD 2D patients all over the world. The information value of the test system for detection of three *SGCA* variants (capability to find out at least one mutant allele) was on average rather high (70% in the group of patients with LGMD and 50% in the group of patients with MDD/B), therefore this test system could be recommended as the primary step of LGMD 2D molecular diagnostics for patients with the appropriate clinical features.

Keywords: LGMD 2D, muscular dystrophy, mutation spectrum, *SGCA*, sarcoglycanopathy.