

АНАЛИЗ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ ДЕЛЕЦИЙ В ГЕНЕ ДИСТРОФИНА В КОНТЕКСТЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОПУСКА ЭКЗОНОВ КАК МЕТОДА ТЕРАПИИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ДИСТРОФИНОПАТИЙ

Е. Д. Зотова^{1,2} ✉, Д. А. Решетов¹, В. Е. Жерновков¹, Д. В. Влодавец³, Т. В. Димитриева¹, А. В. Дейкин^{1,2}

¹ Marlin Biotech, Москва

² Центр коллективного пользования,
Институт биологии гена Российской академии наук, Москва

³ Кафедра неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики, педиатрический факультет,
Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) — распространенное наследственное заболевание, развивающееся вследствие мутации в гене дистрофина и приводящее к смерти в детском возрасте. На момент написания статьи пациентам была доступна только поддерживающая терапия, однако подходы к лечению МДД активно разрабатываются, и перспективным является метод пропуска экзонов. Его суть заключается в восстановлении рамки считывания гена путем индукции альтернативного сплайсинга. В результате синтезируется укороченный дистрофин, который в той или иной степени сохраняет функциональность. В работе дана оценка функциональности укороченных форм дистрофина, получающихся при коррекции нонсенс-мутаций и внутриэкзонных инделов по методике пропуска экзонов. Оценка производилась по данным о фенотипе носителей мутаций в гене дистрофина, взятых из базы LOVD (Leiden Open Variation Database). Было обнаружено, что одни и те же мутации способны проявляться как различные фенотипы, что, возможно, объясняется разным генетическим фоном пациентов. Так, делеция экзона 48, для которой в LOVD есть 97 записей, в 2 % случаев приводила к бессимптомному течению заболевания, в 60 % — к миодистрофии Дюшенна, в 12 % — к миодистрофии Беккера (отличается более мягкой симптоматикой, чем МДД), в 26 % случаев — к промежуточному фенотипу. Высокая фенотипическая вариабельность мутаций в гене дистрофина ставит вопрос о границах применения методики пропуска экзонов для терапии наследственных миопатий.

Ключевые слова: мышечная дистрофия, миодистрофия Дюшенна, миодистрофия Беккера, пропуск экзонов

Благодарности: авторы выражают благодарность Центру коллективного пользования Института биологии гена РАН за предоставленное для экспериментов оборудование.

✉ **Для корреспонденции:** Зотова Евгения Дмитриевна
119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5; zotova@fbb.msu.ru

Статья поступила: 17.06.2016 Статья принята к печати: 24.06.2016

ANALYSIS OF PHENOTYPE EXPRESSIONS OF DELETIONS IN THE DYSTROPHIN GENE IN TERMS OF EFFICIENCY OF EXON SKIPPING AS A METHOD FOR TREATMENT OF HEREDITARY DYSTROPHINOPATHIES

Zotova ED^{1,2} ✉, Reshetov DA¹, Zhernovkov VE¹, Vlodavets DV³, Dimitrieva TV¹, Deykin AV^{1,2}

¹ Marlin Biotech, Moscow, Russia

² Shared Resource Center,
Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³ Department of Neurology, Neurosurgery and Medical Genetics, Faculty of Pediatrics,
Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a common genetic disease caused by a mutation of the dystrophin gene. It leads to death in childhood. At the time of writing this paper, patients had access to supportive therapy only. However, DMD treatment methods are actively being developed. Exon skipping is a promising method. Exon skipping involves restoration of the reading frame within a gene by inducing alternative splicing. This leads to synthesis of truncated but still functional dystrophin. The paper assesses the functionality of the truncated forms of dystrophin resulting from correction of nonsense mutations and internal exon indels by exon-skipping technique. The assessment was made based on data on the phenotype of carriers of mutations in the dystrophin gene taken from the Leiden Open Variation Database (LOVD). It was revealed that the same mutation could manifest itself as a variety of phenotypes. This, perhaps, is as a result of the patients having different genetic background. For example, deletion of exon 48, for which there is 97 records in LOVD, resulted in asymptomatic diseases in 2 % of cases, Duchenne muscular dystrophy in 60 %, Becker muscular dystrophy (characterized by milder symptoms than DMD) in 12 % and intermediate phenotype in 26 % of cases. High phenotypic variability of mutations of the dystrophin gene raises the issue of limits of applying exon skipping for treatment of inherited myopathies.

Keywords: muscular dystrophy, Duchenne muscular dystrophy, Becker muscular dystrophy, exon skipping

Acknowledgement: authors thank the Shared Resource Center of the Institute of Gene Biology of Russian Academy of Sciences for the equipment provided for this research.

✉ **Correspondence should be addressed:** Evgeniya Zotova
ul. Vavilova, d. 34/5, Moscow, Russia, 119334; zotova@fbb.msu.ru

Received: 17.06.2016 Accepted: 24.06.2016

Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) — рецессивное, сцепленное с X-хромосомой наследственное заболевание, которое поражает примерно 1 из 3600 новорожденных мальчиков и является наиболее распространенным наследственным заболеванием, приводящим к смерти в детском возрасте [1, 2]. При МДД может происходить поражение скелетной, сердечной и гладкомышечной мускулатуры, пищеварительной и выделительной систем, причем скелетная мускулатура поражается в первую очередь. Помимо прогрессирующей мышечной слабости у пациентов наблюдается задержка в развитии, проблемы с дыханием и речью и сердечная недостаточность [3]. При постановке диагноза в среднем в возрасте 5 лет уже к 13 годам более 95 % пациентов оказываются прикованными к инвалидному креслу, а средний возраст, в котором умирает больной, не получивший специального лечения, составляет 19 лет [4].

Так как МДД является X-сцепленной патологией, ей страдают в большинстве случаев мужчины, которые являются гемизиготами по X-хромосоме. Болезнь обычно передается сыну от матери-носителя вместе с X-хромосомой, однако также может возникать *de novo* в результате мутации в гене дистрофина (*DMD*) [5]. Ген дистрофина считается самым длинным в геноме человека (2,4 млн пар нуклеотидов [6]) и насчитывает 79 экзонов, а кодируемый им белок содержит около 3700 аминокислотных остатков [7]. Время синтеза мРНК дистрофина составляет около 16 ч [8].

Дистрофин — это структурный белок, который входит в состав костамера, белкового комплекса, отвечающего за соединение актомиозиновых комплексов (саркомеров), плазматической мембраны мышечного волокна (сарколеммы) и белков внеклеточного матрикса [9]. Дистрофин имеет вытянутую форму и одним своим концом крепится к актину, а другим — к мембранному дистрогликановому комплексу, также заякоренному к белку цитоскелета спектрину изнутри и белкам внеклеточного матрикса снаружи клетки.

В отсутствие дистрофина комплексы ассоциированных с ним белков теряют свою стабильность. Известно, что в состав костамеров входят два белковых комплекса: дистрофин-гликопротеиновый и интегрин-винкулин-талиновый, по-видимому, выполняющие сходные функции. Повреждения различных звеньев этой сложной и не до конца изученной системы могут приводить к наследственным миопатиям различных типов [10, 11]. Однако, по-видимому в силу сложного строения системы и дублирования белками костамеров функций друг друга, даже полное отсутствие экспрессии дистрофина, приводящее к МДД, не полностью нарушает связь между акто-миозиновыми комплексами, мембраной и внеклеточным матриксом, а лишь сильно ослабляет ее прочность. Из-за этого хрупкая сарколемма подвергается механическим повреждениям при сокращении. Потеря целостности сарколеммы приводит к некрозу мышечных волокон и воспалению. В первые годы жизни больного его мышечные волокна регенерируют за счет пула миосателлитов — стволовых клеток мышечного дифферона. Однако пул миосателлитов постепенно истощается, что приводит к дегенерации мышц и фиброзу [12].

Дистрофин человека содержит 4 структурных домена: N-концевой актин-связывающий домен; центральный домен, содержащий 24 спектрин-подобных повтора и 4 «шарнирных» участка; цистеин-богатый домен, связывающий β -дистрогликан, и C-концевой домен, связывающий дистробревины и синтрофины. Центральный домен име-

ет сильно вытянутую форму, и, поскольку каждый спектрин-подобный повтор состоит из трех α -спиралей, по-видимому, является достаточно гибким и эластичным [12]. По данным анализа известных мутантов, небольшое изменение числа спектриновых повторов, в результате не нарушающих рамку считывания делеций, не сильно сказывается на нормальной работе белка [13].

Обычно к возникновению МДД приводит сдвиг рамки считывания в гене дистрофина, вызывающий преждевременную терминацию трансляции и nonsense-опосредованный распад мРНК, nonsense-мутации, а также крупные делеции в участках гена, кодирующие N- и C-концы дистрофина, в результате чего полностью нарушается связывание либо с актином, либо с мембранным комплексом дистрогликанов. Среднего же размера делеции в середине гена, не нарушающие рамки считывания, обычно связаны с другой миопатией: мышечной дистрофией Беккера (МДБ), симптомы которой гораздо менее тяжелые: многие пациенты сохраняют способность к самостоятельному передвижению и в зрелом возрасте [14].

Разрабатывается ряд методов лечения МДД, которые направлены не только на подавление воспаления и фиброза и снижение токсического эффекта избытка кальция в цитоплазме, но и на восстановление экспрессии дистрофина [15]. Один из наиболее перспективных — пропуск экзона (*exon skipping*). Суть метода заключается в том, что с помощью природных олигонуклеотидов или их синтетических аналогов можно исключить некоторые экзоны из зрелой мРНК в ходе сплайсинга за счет стерических помех в работе сплайсеосомы. Таким образом, при наличии сдвигающей рамку считывания делеции или nonsense-мутации с помощью исключения одного или нескольких экзонов можно добиться того, чтобы вся последующая часть гена транслировалась в правильной рамке [16]. Трансляция неполного, но сохраняющего хотя бы частичную функциональность белка, может значительно улучшить состояние пациентов с МДД, особенно если лечение было начато в раннем возрасте [1].

Одно из первых исследований по коррекции МДД методом пропуска экзона провели с участием четырех пациентов, носителей гена дистрофина с нарушающей рамку считывания делецией одного или нескольких экзонов: 50, 52, 49–50 и 48–50. Во всех четырех случаях индукция пропуска 51-го экзона теоретически восстанавливала рамку считывания гена. Лечение проводили путем внутримышечных инъекций антисенс-олигонуклеотидов, и хотя эффективность пропуска экзона составила 46–90 %, показатели стандартных физиологических тестов не улучшились [17].

Тем не менее, по оценке Aartsma-Rus и van Ommen [18], пропуск экзона может помочь большинству пациентов с МДД. Исключения будут составлять мутации, расположенные между экзонами 64 и 70, которые, по-видимому, являются необходимыми для функционирования дистрофина, а также делеции, разрушающие актин-связывающие домены в N-концевой области или затрагивающие первый или последний экзон, и крупные хромосомные перестройки вроде транслокаций. Однако вышеперечисленные мутации достаточно редки и вместе составляют менее 10 % от всех описанных мутаций в гене дистрофина. Таким образом, теоретически примерно у 90 % пациентов с МДД экспрессию функционального или частично функционального белка можно восстановить при помощи пропуска экзона.

Предсказание и анализ эффективности терапии методом пропуска экзона является важной прикладной

задачей, т. к. из-за большого размера гена частота мутаций в нем весьма велика и примерно каждый третий пациент обладает *de novo* мутацией [13]. Важным теоретическим аспектом применимости метода является оценка функциональности форм дистрофина, укороченного в результате пропуска экзонов. Именно такая оценка являлась целью данной работы. Для ее проведения следовало определиться с тем, какие мутации можно проанализировать, как их можно корректировать (т. е. пропуск каких экзонов приведет к восстановлению экспрессии дистрофина) и какие методы анализа фенотипического проявления мутаций можно использовать. Мы изучили и обобщили литературные данные по этим аспектам исследования.

Самый простой случай для коррекции гена *DMD* — это наличие нонсенс-мутаций или приводящих к сдвигу рамки считывания вставок и делеций (инделов) в пределах одного экзона. Теоретически такие мутации можно корректировать путем пропуска одного или группы соседних экзонов, удаление которых из зрелой мРНК не приведет к сдвигу рамки считывания. При этом могут быть пропущены не более 7 экзонов — именно столько метод позволяет не включать в зрелую мРНК без потери эффективности [18].

Из 79 экзонов гена дистрофина 34 можно удалить без нарушения рамки считывания, а мутации еще в 29 корректируют удалением самого экзона вместе с одним из соседних. Причем для восьми экзонов из этих 29 совместно удаляемым может быть как предшествующий, так и следующий экзон (рис. 1). Ошибки в оставшихся четырнадцати экзонах корректируют удалением большего числа экзонов: экзоны 6–8 без сдвига рамки считывания удаляют только вместе, также как и экзоны 76–78; экзоны 61 и 71 удаляют только с двумя предшествующими, а экзон 67 — с двумя соседними; экзоны 72 и 73 — только вместе со всеми предшествующими вплоть до 69-го (четыре и пять экзонов соответственно); экзон 74 можно удалить по тому же принципу или же в составе блока экзонов 70–75 (шесть экзонов в обоих вариантах), а экзон 75 — только с пятью предыдущими. Для коррекции экзона 2 требуется удаление шести экзонов, однако, по данным Wein и соавт. [19],

делеция экзона 2 приводит к бессимптомному или очень слабому течению заболевания, т. к. трансляция начинается с внутреннего сайта посадки рибосомы в экзоне 5, и в этом случае укороченный дистрофин сохраняет функциональность. Коррекция же мутаций в первом и последнем экзонах считается невозможной (хотя в свете наличия внутреннего сайта посадки рибосомы в экзоне 5 это может оказаться неверно). Таким образом, теоретически мутации в 75 экзонах можно скорректировать пропуском не более шести экзонов, что соответствует оговоренному ограничению метода пропуска экзонов.

Число возможных коррекций простых одиночных замен, вставок или делеций в гене дистрофина чрезвычайно велико, и экспериментальная проверка всех комбинаций на животных моделях вряд ли представляется возможной. Кроме того, даже на мышах не удастся хорошо воспроизвести человеческий фенотип МДД [20]. Более реальным подходом к решению поставленной задачи является анализ большого массива клинических данных пациентов с мутациями в гене дистрофина, приводящими к МДД или МДБ. Получение достаточной выборки по литературным источникам — это трудоемкий процесс, осложняемый тем, что не для всех мутаций есть опубликованные данные. К счастью, существуют базы данных генетических вариаций. Одна из них, LOVD (Leiden Open Variation Database — Лейденская открытая база генетических вариаций) [21], содержит записи о различных мутациях в гене дистрофина, информацию о половой и популяционной принадлежности их носителей, методе, которым был выполнен анализ и, что наиболее ценно, данные о фенотипе, к которому приводит та или иная мутация у конкретного пациента: МДД, МДБ или бессимптомное течение. Пользователи со всего мира могут самостоятельно пополнять LOVD, что является как достоинством (обширность данных), так и недостатком (потенциально большое количество ошибок) базы. По состоянию на июнь 2016 г. LOVD содержит более 16 000 не уникальных записей о мутациях в гене дистрофина, затрагивающих целиком один или несколько экзонов. Среди них 83 % составляют делеции.

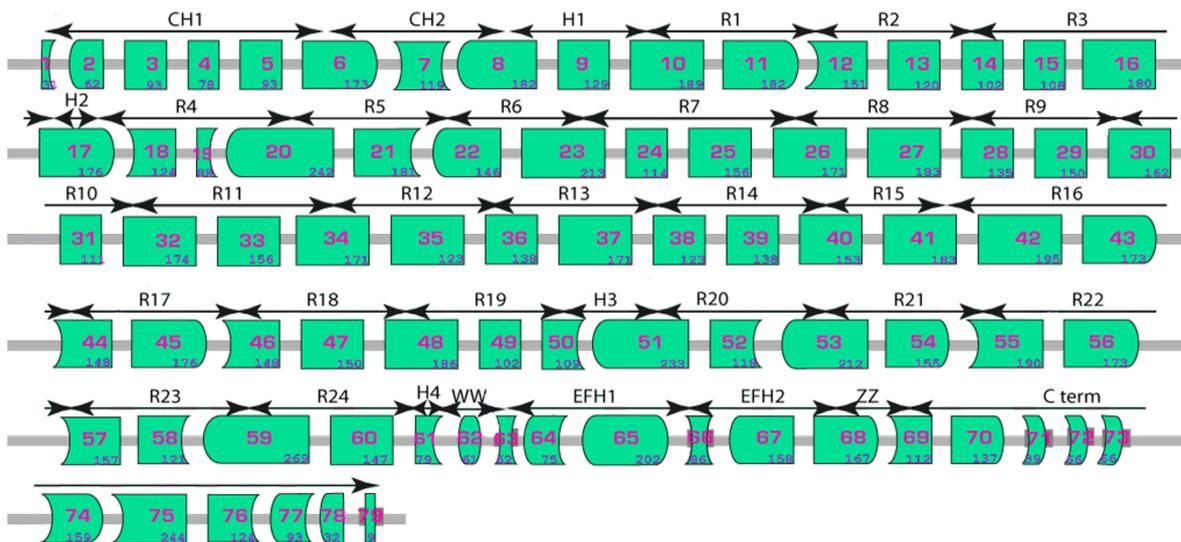


Рис. 1. Экзонная структура гена дистрофина

Зелеными блоками показаны экзоны; справа внизу указан размер экзона (в парах нуклеотидов), а в середине — его порядковый номер. Три вида стыков (прямые, вогнутые и выпуклые) соответствуют трем рамкам считывания, в которые попадают границы экзонов. Стрелками отмечены границы участков гена, кодирующих структурные домены дистрофина: CH1 и CH2 — элементы N-концевого актин-связывающего домена, R1–R24 и H1–H4 — спектриновые повторы и «шарнирные» участки центрального домена соответственно, WW, ZZ, EFH1 и EFH2 — структурные элементы домена, богатого цистеином, и C term — уникальный для дистрофина и его гомологов C-концевой домен (Nicolas и соавт., 2012 [29]).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Данные о мутациях находили при помощи встроенного текстового поиска LOVD [22]. Поисковый запрос вводили в поле Exon. Его составляли в соответствии с номенклатурой базы данных: для экзона N — N-1i_Ni, что означает, что мутация должна затрагивать соседние с экзоном интроны. Например, для поиска делеции экзона 3 составляли запрос 2i_3i. Для делеции группы экзонов запрос осуществляли аналогично. Для анализа брали только записи, содержащие информацию о полных делециях целевых экзонов (экзонов, с помощью которых можно корректировать нонсенс-мутации или внутриэкзонные инделы). Из полученного списка исключали дубликации, а также мутации, носителями которых являлись женщины.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Соотношение фенотипов, соответствующих выбранным для коррекции рамки считывания комбинациям экзонов, представлено на рис. 2. Для 25 делеций в LOVD не нашлось ни одной записи, причем большая часть таких делеций находится в области центрального домена, а также в районе экзонов 65–78. Лишь у 11 комбинаций количество найденных в базе данных случаев превышало 5. Распределение этих 11 комбинаций по доменам дистрофина крайне неравномерно: 7 из них относятся к комбинациям, корректирующим экзоны 45–55 (С-концевая часть центрального домена), еще одна — делеция экзона 13 — затрагивает N-концевую часть центрального домена, а 3 перекрывают N-концевой актин-связывающий домен.

Среди всех представленных в базе данных случаев, соответствующих выбранным делециям, в 45 % регистрируют МДБ или отсутствие симптомов заболевания, тогда как крупные делеции экзонов, приводящие к сдвигу рамки считывания, реализуются как МДБ менее чем в 4 % случаев, что говорит о более мягком течении мышечной дистрофии у пациентов с не нарушающими рамку считывания делециями.

Было также обнаружено, что одни и те же мутации способны проявляться как различные фенотипы. Так, делеция экзона 48, которая встречается в базе данных 97 раз, может протекать бессимптомно (2 % случаев) или приводить к МДБ (60 % случаев), МДД (12 % случаев) или промежуточному фенотипу (26 % случаев). Еще любопытнее делеции экзонов 50–51 и 51–52, для которых описаны 14 и 11 случаев соответственно: если для первой количество случаев бессимптомного течения заболевания или МДБ составляет 6 (43 %), то для второй — ни одного, хотя обе делеции не затрагивают ничего, кроме «шарнирного» участка и одного из спектриновых повторов центрального домена, и, казалось бы, не должны оказывать значимого влияния на структуру белка. Другой часто встречающейся делецией (13 случаев), не нарушающей рамку считывания и не затрагивающей ничего, кроме спектринового повтора, но при этом в 100 % случаев проявляющейся как МДД или смешанный фенотип, является делеция экзона 47.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Количество записей о пациентах-носителях различных делеций в базе данных достаточно сильно варьирует. Причиной этого могут быть как неодинаковая частота мутаций

в разных участках гена, так и недопредставленность какой-либо группы мутаций в базе данных. Действительно, такое распределение вполне можно объяснить наличием описанных в литературе «горячих точек» мейотической рекомбинации в районе экзонов 7 и 44 [23]. Отсутствие же информации о делециях в области центрального домена можно объяснить в основном бессимптомным течением заболевания при таких делециях, что, скорее всего, сильно снижает вероятность обнаружения таких мутаций. Однако необычным является тот факт, что в базе данных не представлена ни одна из комбинаций для коррекции мутаций в экзонах 65–78. Одним из объяснений может служить большой размер перекрывающихся С-конец комбинаций по сравнению с остальными.

По данным Aartsma-Rus и соавт. [24], 91 % мутаций в базе данных LOVD подчиняются следующему правилу: мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания и трансляции укороченного нефункционального дистрофина, являются причиной МДД, а мутации, не приводящие к сдвигу рамки считывания, обычно почти не отражаются на функциональности дистрофина и вызывают МДБ, если не затрагивают ключевых для работы белка доменов, расположенных на его N- и С-концах.

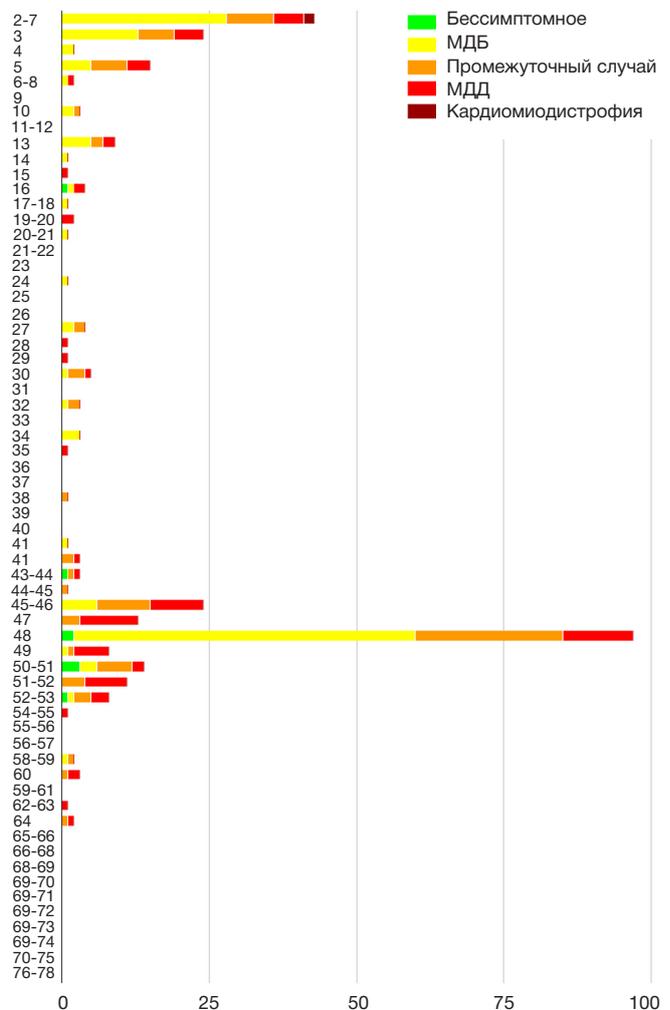


Рис. 2. Распределение фенотипических проявлений делеций в гене дистрофина при пропуске экзонов для восстановления рамки считывания (по данным базы LOVD)

По вертикальной оси отмечены номера экзонов, которые вошли в делецию, по горизонтальной — число содержащихся в базе данных LOVD записей с упоминанием делеции. Секции горизонтальных столбиков соответствуют представленности отдельных фенотипов.

Подтверждением этого правила, по-видимому, является случай, описанный в статье Passos-Vueno и соавт. [25]. В работе речь идет о пациенте с МДБ, которую вызывает крупная не нарушающая рамку считывания делеция (с 13-го по 48-й экзону). Эта делеция захватывает 18 из 24 спектральных повторов центрального домена, но не трогает N- и C-концы. От всей аминокислотной последовательности белка остается примерно половина, чего, по мнению авторов работы, достаточно для частичного выполнения дистрофином своей функции. Однако из этого правила есть интересные исключения. Например, в работе Takeshima и соавт. [26] описывается случай крупной N-концевой делеции (с 3-го по 41-й экзону), не нарушающей рамку считывания, которая проявляется в форме промежуточного фенотипа между МДД и МДБ. Отсутствие N-концевого домена делает дистрофин нефункциональным, тем не менее, фенотип пациента не соответствует классической картине течения МДД.

Другим исключением является описываемая в работе Suminaga и соавт. [27] нонсенс-мутация в экзоне 76, которая приводит к синтезу укороченной формы дистрофина, обнаруживаемой иммуногистохимически на препаратах из биоптата мышц. При этом за исключением повышенного уровня креатинфосфаткиназы в крови (что является одним из основных маркеров МДД и МДБ) других симптомов мышечной дистрофии у пациента не выявлено. Авторы работы пишут, что не могут как-либо объяснить полученную картину: другая описанная в литературе нонсенс-мутация, которая обрезает белок лишь на 10 аминокислот ближе к началу, чем найденная в работе, приводит к типичной картине течения МДД [28]. В работе были проверены разные предположения о возможных причинах такого фенотипа: соматический мозаицизм, восстановление рамки считывания из-за альтернативного сплайсинга, компенсаторный высокий уровень экспрессии утروпина, белка-гомолога дистрофина, однако все они были отвергнуты.

Как видно из анализа базы данных и перечисленных выше случаев, одни и те же мутации в гене дистрофина могут приводить к различным фенотипам. Причины этого явления до конца не ясны, но, вероятно, его можно объяснить разным генетическим фоном пациентов. Это проблема, т. к. даже если у пациента удастся вызвать эффективный пропуск экзона или экзонов, приводящий к восстановлению рамки считывания, и будет наблюдаться синтез укороченного дистрофина, нет гарантий, что его состояние улучшится. Кроме того, из-за недостаточной изученности

проблемы не существует достоверной методики предсказания того, поможет ли восстановление рамки считывания конкретному пациенту. Статистический анализ в данном случае затруднен, поскольку лишь для небольшого числа делеций достаточно фенотипических данных.

В нашей работе не были рассмотрены некоторые варианты укороченных дистрофинов, получаемых при коррекции методом пропуска экзонов более сложных для анализа мутаций: крупных делеций, затрагивающих минимум один экзон целиком и вызывающих сдвиг рамки считывания, и дупликаций одного или нескольких экзонов. Часть из них может быть скорректирована пропуском тех же экзонов, что и в случае с внутриэкзонными мутациями, например дупликация экзона, делеция которых не вызывает сдвиг рамки считывания, или делеция одного экзона, которые могут быть скорректированы пропуском соседнего. Так, дупликация экзона 13 при пропуске обеих копий экзона сведется к делеции экзона 13, а делеция экзона 51 может быть скорректирована пропуском экзона 50 или экзона 52. Коррекция некоторых дупликаций двух и более экзонов и крупных, приводящих к сдвигу рамки считывания и затрагивающих два и более экзона делеций также осуществима. Так, делеция с 7-го по 34-й экзон может быть скорректирована пропуском 6-го. Полученная делеция не будет нарушать рамку считывания, однако неизвестно, будет ли такая форма дистрофина функциональной, а данные в LOVD о подобной мутации отсутствуют. В итоге решено было не проводить детальный анализ таких мутаций из-за большого количества комбинаций и недостатка данных о функциональности получающихся в результате их коррекции форм дистрофина.

ВЫВОДЫ

Проведенный в работе анализ данных о фенотипических проявлениях мутаций в гене дистрофина показал, что одни и те же мутации могут реализовываться различными фенотипами. Это указывает на то, что успех применения метода пропуска экзонов для лечения мышечной дистрофии Дюшенна имеет вероятностный характер даже в случае высокой эффективности индукции альтернативного сплайсинга и точная оценка вероятности успеха для конкретного варианта терапии затруднена из-за недостатка данных. Можно, однако, надеяться, что с развитием методов высокопроизводительного секвенирования ДНК и их удешевлением ситуация изменится.

Литература

1. van Deutekom JC, van Ommen GJ. Advances in Duchenne muscular dystrophy gene therapy. *Nat Rev Genet.* 2003 Oct; 4 (10): 774–83.
2. Rodino-Klapac LR, Chicoine LG, Kaspar BK, Mendell JR. Gene therapy for duchenne muscular dystrophy: expectations and challenges. *Arch Neurol.* 2007 Sep; 64 (9): 1236–41.
3. Bushby K, Finke R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. DMD Care Considerations Working Group. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.* 2010 Jan; 9 (1): 77–93. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70271-6. Epub 2009 Nov 27.
4. Boland BJ, Silbert PL, Groover RV, Wollan PC, Silverstein MD. Skeletal, cardiac, and smooth muscle failure in Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Neurol.* 1996 Jan; 14 (1): 7–12.
5. Hoffman EP, Kunkel LM. Dystrophin abnormalities in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Neuron.* 1989 Jan; 2 (1): 1019–29.
6. Homo sapiens dystrophin (DMD), RefSeqGene (LRG_199) on chromosome X [Интернет]. The National Center for Biotechnology Information [дата обращения: 8 июля 2015 г.]. Доступно по ссылке: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/256355061>.
7. Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell.* 1988 Apr 22; 53 (2): 219–28.
8. Tennyson CN, Klamut HJ, Worton RG. The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced. *Nat Genet.* 1995 Feb; 9 (2): 184–90.
9. Peter AK, Cheng H, Ross RS, Knowlton KU, Chen J. The costamere bridges sarcomeres to the sarcolemma in striated muscle. *Prog Pediatr Cardiol.* 2011 May; 31 (2): 83–8.
10. Jaka O, Casas-Fraile L, López de Munain A, Sáenz A. Costamere proteins and their involvement in myopathic processes. *Expert Rev Mol Med.* 2015 Jun 19; 17: e12.
11. Iannaccone ST, Castro D. Congenital muscular dystrophies

- and congenital myopathies. *Continuum (Minneapolis Minn)*. 2013 Dec; 19 (6 Muscle Disease): 1509–34.
12. Davies KE, Nowak KJ. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Oct; 7 (10): 762–73. Epub 2006 Sep 13.
 13. Aartsma-Rus A, Ginjaar IB, Bushby K. The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet*. 2016 Mar; 53 (3): 145–51. doi: 10.1136/jmedgenet-2015-103387. Epub 2016 Jan 11.
 14. Campbell KP. Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell*. 1995 Mar 10; 80 (5): 675–9.
 15. Blat Y, Blat S. Drug Discovery of Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy. *J Biomol Screen*. 2015 Dec; 20 (10): 1189–203. Epub 2015 May 14.
 16. Kole R, Leppert BJ. Targeting mRNA splicing as a potential treatment for Duchenne muscular dystrophy. *Discov Med*. 2012 Jul; 14 (74): 59–69.
 17. van Deutekom JC, Janson AA, Ginjaar IB, Frankhuizen WS, Aartsma-Rus A, Bremmer-Bout M, et al. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med*. 2007 Dec 27; 357 (26): 2677–86.
 18. Aartsma-Rus A, van Ommen GJ. Antisense-mediated exon skipping: a versatile tool with therapeutic and research applications. *RNA*. 2007 Oct; 13 (10): 1609–24. Epub 2007 Aug 7.
 19. Wein N, Vulin A, Falzarano MS, Szigyarto CA, Maiti B, Findlay A, et al. Translation from a DMD exon 5 IRES results in a functional dystrophin isoform that attenuates dystrophinopathy in humans and mice. *Nat Med*. 2014 Sep; 20 (9): 992–1000. Epub 2014 Aug 10.
 20. Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science*. 1989 Jun 30; 244 (4912): 1578–80.
 21. White SJ, den Dunnen JT. Copy number variation in the genome; the human DMD gene as an example. *Cytogenet Genome Res*. 2006; 115 (3–4): 240–6.
 22. Leiden Open Variation Database, Leiden Muscular Dystrophy pages [Интернет]. Leiden University Medical Center. c2004–2014 [дата обращения: 6–15 июня 2016 г.]. Доступно по ссылке: <http://www.dmd.nl/nmdb2/home.php>.
 23. Oudet C, Hanauer A, Clemens P, Caskey T, Mandel JL. Two hot spots of recombination in the DMD gene correlate with the deletion prone regions. *Hum Mol Genet*. 1992 Nov; 1 (8): 599–603.
 24. Aartsma-Rus A, Van Deutekom JC, Fokkema IF, Van Ommen GJ, Den Dunnen JT. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve*. 2006 Aug; 34 (2): 135–44.
 25. Passos-Bueno MR, Vainzof M, Marie SK, Zatz M. Half the dystrophin gene is apparently enough for a mild clinical course: confirmation of its potential use for gene therapy *Hum Mol Genet*. 1994 Jun; 3 (6): 919–22.
 26. Takeshima Y, Nishio H, Narita N, Wada H, Ishikawa Y, Ishikawa Y, et al. Amino-terminal deletion of 53 % of dystrophin results in an intermediate Duchenne-Becker muscular dystrophy phenotype. *Neurology*. 1994 Sep; 44 (9): 1648–51.
 27. Suminaga R, Takeshima Y, Wada H, Yagi M, Matsuo M. C-terminal truncated dystrophin identified in skeletal muscle of an asymptomatic boy with a novel nonsense mutation of the dystrophin gene. *Pediatr Res*. 2004 Nov; 56 (5): 739–43. Epub 2004 Sep 15.
 28. Prior TW, Bartolo C, Pearl KP, Papp AC, Snyder PJ, Sedra MS, et al. Spectrum of small mutations in the dystrophin coding region. *Am J Hum Genet*. 1995 Jul; 57: 22–33.
 29. Nicolas A, Lucchetti-Miganeh C, Yaou RB, Kaplan JC, Chelly J, Leturcq F, et al. Assessment of the structural and functional impact of in-frame mutations of the DMD gene, using the tools included in the eDystrophin online database. *Orphanet J Rare Dis*. 2012 Jul 9; 7: 45.

References

1. van Deutekom JC, van Ommen GJ. Advances in Duchenne muscular dystrophy gene therapy. *Nat Rev Genet*. 2003 Oct; 4 (10): 774–83.
2. Rodino-Klapac LR, Chicoine LG, Kaspar BK, Mendell JR. Gene therapy for duchenne muscular dystrophy: expectations and challenges. *Arch Neurol*. 2007 Sep; 64 (9): 1236–41.
3. Bushby K, Finke R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. DMD Care Considerations Working Group. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol*. 2010 Jan; 9 (1): 77–93. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70271-6. Epub 2009 Nov 27.
4. Boland BJ, Silbert PL, Groover RV, Wollan PC, Silverstein MD. Skeletal, cardiac, and smooth muscle failure in Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Neurol*. 1996 Jan; 14 (1): 7–12.
5. Hoffman EP, Kunkel LM. Dystrophin abnormalities in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Neuron*. 1989 Jan; 2 (1): 1019–29.
6. Homo sapiens dystrophin (DMD), RefSeqGene (LRG_199) on chromosome X [Internet]. The National Center for Biotechnology Information. [cited 2015 Jul 8]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/256355061>.
7. Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*. 1988 Apr 22; 53 (2): 219–28.
8. Tennyson CN, Klamut HJ, Worton RG. The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced. *Nat Genet*. 1995 Feb; 9 (2): 184–90.
9. Peter AK, Cheng H, Ross RS, Knowlton KU, Chen J. The costamere bridges sarcomeres to the sarcolemma in striated muscle. *Prog Pediatr Cardiol*. 2011 May; 31 (2): 83–8.
10. Jaka O, Casas-Fraile L, López de Munain A, Sáenz A. Costamere proteins and their involvement in myopathic processes. *Expert Rev Mol Med*. 2015 Jun 19; 17: e12.
11. Iannaccone ST, Castro D. Congenital muscular dystrophies and congenital myopathies. *Continuum (Minneapolis Minn)*. 2013 Dec; 19 (6 Muscle Disease): 1509–34.
12. Davies KE, Nowak KJ. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Oct; 7 (10): 762–73. Epub 2006 Sep 13.
13. Aartsma-Rus A, Ginjaar IB, Bushby K. The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet*. 2016 Mar; 53 (3): 145–51. doi: 10.1136/jmedgenet-2015-103387. Epub 2016 Jan 11.
14. Campbell KP. Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell*. 1995 Mar 10; 80 (5): 675–9.
15. Blat Y, Blat S. Drug Discovery of Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy. *J Biomol Screen*. 2015 Dec; 20 (10): 1189–203. Epub 2015 May 14.
16. Kole R, Leppert BJ. Targeting mRNA splicing as a potential treatment for Duchenne muscular dystrophy. *Discov Med*. 2012 Jul; 14 (74): 59–69.
17. van Deutekom JC, Janson AA, Ginjaar IB, Frankhuizen WS, Aartsma-Rus A, Bremmer-Bout M, et al. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med*. 2007 Dec 27; 357 (26): 2677–86.
18. Aartsma-Rus A, van Ommen GJ. Antisense-mediated exon skipping: a versatile tool with therapeutic and research applications. *RNA*. 2007 Oct; 13 (10): 1609–24. Epub 2007 Aug 7.
19. Wein N, Vulin A, Falzarano MS, Szigyarto CA, Maiti B, Findlay A, et al. Translation from a DMD exon 5 IRES results in a functional dystrophin isoform that attenuates dystrophinopathy in humans and mice. *Nat Med*. 2014 Sep; 20 (9): 992–1000. Epub 2014 Aug 10.
20. Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science*. 1989 Jun 30;

- 244 (4912): 1578–80.
21. White SJ, den Dunnen JT. Copy number variation in the genome; the human DMD gene as an example. *Cytogenet Genome Res.* 2006; 115 (3–4): 240–6.
 22. Leiden Open Variation Database, Leiden Muscular Dystrophy pages [Internet]. Leiden University Medical Center. c2004–2014 [cited 2016 Jun 6–15]. Available from: <http://www.dmd.nl/nmdb2/home.php>.
 23. Oudet C, Hanauer A, Clemens P, Caskey T, Mandel JL. Two hot spots of recombination in the DMD gene correlate with the deletion prone regions. *Hum Mol Genet.* 1992 Nov; 1 (8): 599–603.
 24. Aartsma-Rus A, Van Deutekom JC, Fokkema IF, Van Ommen GJ, Den Dunnen JT. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve.* 2006 Aug; 34 (2): 135–44.
 25. Passos-Bueno MR, Vainzof M, Marie SK, Zatz M. Half the dystrophin gene is apparently enough for a mild clinical course: confirmation of its potential use for gene therapy *Hum Mol Genet.* 1994 Jun; 3 (6): 919–22.
 26. Takeshima Y, Nishio H, Narita N, Wada H, Ishikawa Y, Ishikawa Y, et al. Amino-terminal deletion of 53 % of dystrophin results in an intermediate Duchenne-Becker muscular dystrophy phenotype. *Neurology.* 1994 Sep; 44 (9): 1648–51.
 27. Suminaga R, Takeshima Y, Wada H, Yagi M, Matsuo M. C-terminal truncated dystrophin identified in skeletal muscle of an asymptomatic boy with a novel nonsense mutation of the dystrophin gene. *Pediatr Res.* 2004 Nov; 56 (5): 739–43. Epub 2004 Sep 15.
 28. Prior TW, Bartolo C, Pearl KP, Papp AC, Snyder PJ, Sedra MS, et al. Spectrum of small mutations in the dystrophin coding region. *Am J Hum Genet.* 1995 Jul; 57: 22–33.
 29. Nicolas A, Lucchetti-Miganeh C, Yaou RB, Kaplan JC, Chelly J, Leturcq F, et al. Assessment of the structural and functional impact of in-frame mutations of the DMD gene, using the tools included in the eDystrophin online database. *Orphanet J Rare Dis.* 2012 Jul 9; 7: 45.