

На правах рукописи

БЛАГОДАТСКИХ ЕКАТЕРИНА ГРИГОРЬЕВНА

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ДНК И мРНК ДЛЯ
НЕИНВАЗИВНОГО ПРЕНАТАЛЬНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛА, РЕЗУС-
ФАКТОРА И ДИАГНОСТИКИ СИНДРОМА ДАУНА У ПЛОДА**

03.01.03 – молекулярная биология

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук**

Москва – 2010

Работа выполнена в лаборатории молекулярной диагностики и геномной дактилоскопии (заведующий – доктор биологических наук, профессор Носиков Валерий Вячеславович) ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ФГУП «ГосНИИ генетика»).

Научный руководитель:

кандидат биологических наук,
ФГУП «ГосНИИ генетика»,
г. Москва

Серёгин Юрий Александрович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор,
Медико-Генетический Научный Центр
РАМН, г. Москва

Зинченко Рена Абульфазовна

кандидат биологических наук,
Институт Молекулярной Биологии
им. В.А. Энгельгардта РАН, г. Москва

Грядунов Дмитрий Александрович

Ведущая организация:

Научно-исследовательский Институт
Биомедицинской Химии имени
В.Н. Ореховича РАМН, г. Москва

Защита состоится «___» октября 2010 года в 14 часов на заседании Диссертационного совета Д.217.013.01 при Государственном научно-исследовательском институте генетики и селекции промышленных микроорганизмов по адресу: 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУП «ГосНИИ генетика».

Реферат разослан «___» сентября 2010 года.

Учёный секретарь
Диссертационного совета,
кандидат химических наук

Воюшина Т.Л.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Крайне важной является разработка неинвазивных и не требующих длительного времени генетических тестов, позволяющих диагностировать трисомию хромосомы 21 у плода, а также устанавливать его пол и резус-фактор в первом – начале второго триместра беременности.

Выяснение пола плода на ранних сроках беременности может предотвратить повторные случаи рождения больных детей в семьях с отягощённой наследственностью. В настоящее время основным методом пренатального установления пола будущего ребёнка является ультразвуковая диагностика, однако на ранних сроках беременности этот метод позволяет определять пол плода только по косвенным ультразвуковым маркерам.

Для выявления резус-конфликта беременной и плода в настоящее время применяют целый комплекс дорогостоящих и длительных клинических исследований, включающий измерение уровней специфичных материнских антител к резус-фактору, а также ультразвуковое исследование для определения скорости артериального потока крови средней мозговой артерии.

С целью пренатальной диагностики хромосомных синдромов в клинической практике проводится цитогенетический анализ клеток различных тканей плода. Для проведения этого анализа требуется применение инвазивной диагностики, обладающей, наряду с высокой точностью, превышающей в среднем 99%, серьёзными недостатками, – риском инфицирования плода и нежелательного прерывания беременности.

Цель и задачи работы. Целями данной работы были разработка систем для неинвазивного пренатального определения пола и резус-фактора плода по крови беременной женщины, а также разработка подхода для диагностики синдрома Дауна у плода. Для определения пола и резус-фактора плода проводилось обнаружение в крови будущей матери циркулирующих ДНК плода, содержащих участки генов *DYS14* и *RHD*, соответственно. Для диагностики синдрома Дауна использовался метод, основанный на количественном генотипировании полиморфных маркеров в циркулирующих в крови матери РНК хромосомы 21 плода.

Для достижения этих целей были поставлены следующие задачи:

1. Определить соответствующие возможностям медицинских центров России условия выделения и длительного хранения образцов плазмы крови, а также циркулирующих ДНК и РНК.
2. Разработать пригодную для неинвазивной пренатальной диагностики систему определения ДНК, содержащую маркер *DYS14*, расположенный внутри многокопийного гена хромосомы Y, кодирующего белок TSPY1, используя в качестве материала циркулирующие ДНК плода из плазмы крови беременных.
3. Разработать систему для пренатального определения резус-фактора плода с помощью амплификации в реальном времени двух экзонов гена *RHD*, используя в качестве материала циркулирующие ДНК из плазмы крови беременных.
4. Выбрать гены хромосомы 21, которые, согласно литературным данным, преимущественно экспрессируются в плаценте. Проанализировать их экспрессию с помощью ОТ–ПЦР (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией) из РНК плазмы крови беременных женщин и контрольных образцов мужчин.
5. С помощью генотипирования образцов беременной женщины, будущего отца ребёнка и плода по полиморфным маркерам в выбранных генах оценить долю плодной РНК каждого гена в плазме материнской крови. Оценить возможность применения этого метода для диагностики трисомии по хромосоме 21.

Научная новизна работы.

- Созданы новые системы для безопасного неинвазивного определения пола и резус-фактора плода на ранних сроках беременности, обладающие большей чувствительностью по сравнению с описанными в литературе.
- Отработан оригинальный протокол хранения образцов плазмы, выделения и генетического анализа циркулирующих РНК с помощью ПЦР в реальном времени.
- Проведено комплексное исследование концентрации мРНК трёх генов хромосомы 21 в плазме крови беременных женщин и доли данных мРНК, имеющих плодное происхождение.

Практическая ценность работы. Разработанные системы могут применяться в неинвазивной пренатальной диагностике при установлении пола и резус-фактора плода. Дальнейшая оптимизация предложенного подхода для диагностики синдрома Дауна позволит выявлять наличие трисомии у плода на ранних сроках беременности.

Апробация работы. Диссертационная работа была представлена на заседании Секции молекулярной биологии Учёного Совета ФГУП «ГосНИИгенетика» 20 июля 2010 года. Результаты настоящей работы докладывались на V-ом съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (г. Москва, Россия, 2009 г.). Материалы работы были представлены на международной научной конференции по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвящённой 75-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова (г. Москва, Россия, 2009 г.), а также на VI-ом съезде Российского Общества Медицинских Генетиков (г. Ростов-на-Дону, Россия, 2010 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 печатных работ, включая 2 статьи, а также материалы съездов и международной конференции.

Структура диссертации. Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, описание использованных материалов и методов, результаты и их обсуждение, выводы и список литературы. Материалы диссертации изложены на 113 страницах машинописного текста и содержат 6 таблиц и 19 рисунков. В работе процитированы 141 зарубежный и 7 отечественных литературных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Настоящая работа была направлена на разработку методов безопасного и достоверного определения пола и резус-фактора будущего плода, а также на разработку подхода, пригодного для безопасной диагностики синдрома Дауна у плода по крови будущей матери с помощью циркулирующих плодных нуклеиновых кислот.

Циркулирующие внеклеточные плодные ДНК – это короткие участки плодных нуклеиновых кислот, циркулирующих в материнской плазме и сыворотке, которые наблюдаются иногда в несвязанной форме, свободными от обычных клеточных компонентов. Наличие плодных внеклеточных ДНК было продемонстрировано в 1997 году (Lo et al., 1997). Три года спустя было доказано наличие циркулирующих РНК в плазме (Roop et al., 2000). Эти два открытия послужили основой для развития неинвазивной пренатальной диагностики.

Появляется фетальная (от англ. «fetal» – плод) ДНК в кровотоке уже на первом месяце беременности (Тамкович и др., 2008; Lo, 2008). В целом, внеклеточные ДНК

плода составляют 3–5% от всех циркулирующих в крови беременной внеклеточных ДНК при выделении их из плазмы. Это значительно затрудняет задачу исследователя при определении специфичных плодных локусов (Lo et al., 1999).

1. Неинвазивное пренатальное определение пола плода с помощью внеклеточной ДНК и маркера *DYS14*.

Установление пола будущего ребёнка проводилось по схеме, представленной на рисунке 1:

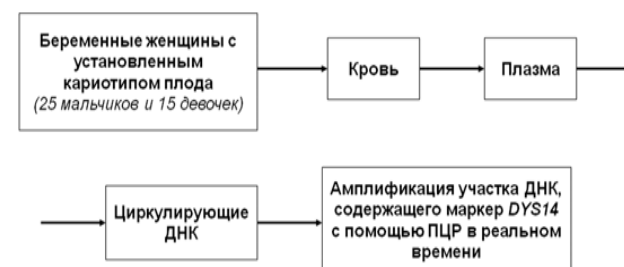


Рисунок 1. Схема неинвазивного пренатального установления пола плода по образцам крови будущей матери.

Маркер *DYS14* расположен внутри многокопийного гена хромосомы Y, кодирующего белок TSPY. Ген представлен в геноме человека в виде 50 копий. Разработанная нами система позволяет детектировать 9 гомологичных копий гена.

Известно, что концентрация внеклеточной ДНК плода в крови будущей матери составляет от 100 до 3 000 копий/мл (Farina et al., 2003; Zhong et al., 2006; Lo et al., 2007; Lo et al., 2008). Нами проведена амплификация, с помощью которой удалось доказать, что минимальное определяемое в нашем эксперименте количество ДНК, содержащей маркер *DYS14*, составило 2 000 копий/мл крови, – это позволило судить о возможности применения разработанной системы в пренатальной диагностике пола будущего ребёнка. Результаты проведения ПЦР представлены в виде графика, из которого видно, что фактическое число молекул образцов было распределено по реакционным лункам согласно математическому закону – распределению Пуассона, что свидетельствует о попадании двух копий ДНК в реакционную смесь (рисунок 2).

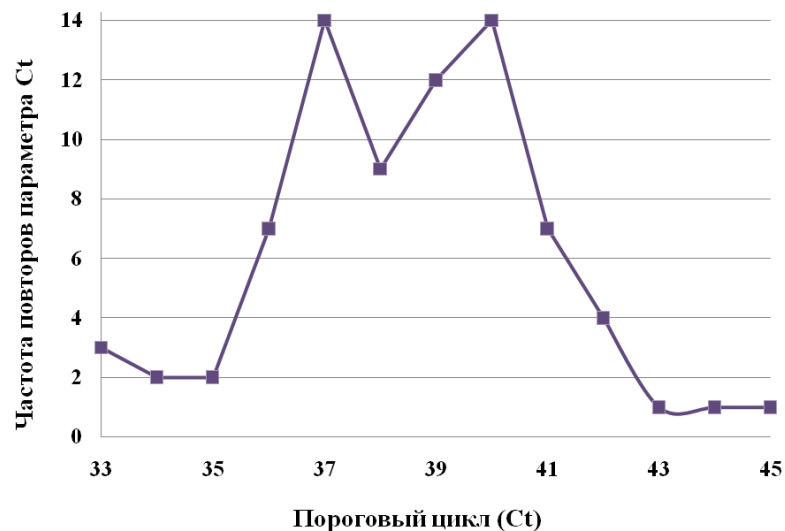


Рисунок 2. Распределение числа молекул ДНК в реакционных лунках подчиняется математическому закону Пуассона.

Представленные на рисунке 3 кривые амплификации подтверждают возможность детектирования от 2 до 20 000 копий хромосомы Y в анализируемом образце.

В качестве контроля определения хромосомы Y использовали маркер *SRY*, расположенный внутри однокопийного гена. По этому маркеру принято определять половую принадлежность образцов в судебной медицине, при малых количествах генетического материала. Положительным контролем прохождения ПЦР в реальном времени служил участок однокопийного гена «домашнего хозяйства» *GAPDH*.

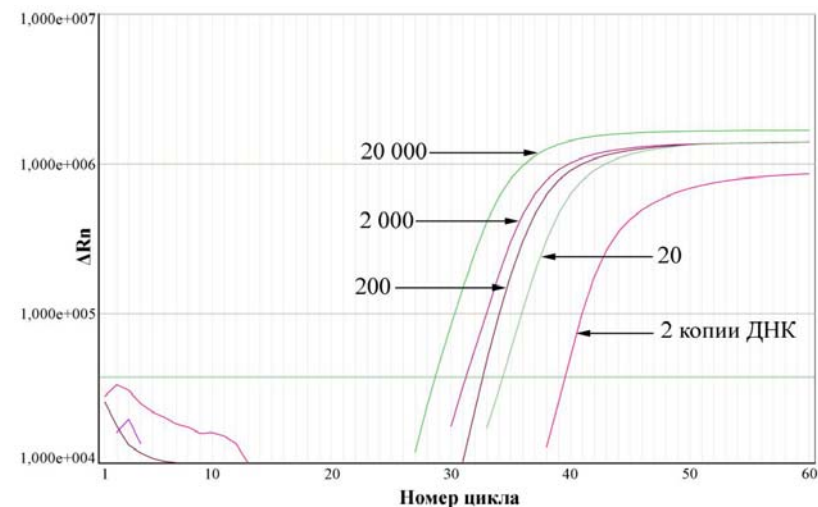


Рисунок 3. Определение нижнего предела обнаружения маркера *DYS14* с помощью ПЦР в реальном времени.

Амплификация участков ДНК, содержащих маркер *DYS14* с целью определения половой принадлежности плода по образцам плазмы крови беременных женщин

В исследовании использовали 25 образцов крови женщин, беременных мальчиками и 15 – девочками, согласно данным кариотипирования. Ниже приведены результаты проведения амплификации в реальном времени участка маркера *DYS14*, позволяющие судить о половой принадлежности плода (рисунок 4).

Анализ 39 образцов плазмы крови беременных подтвердил результаты кариотипирования – был установлен мужской пол плода в 24 случаях и женский – в 15, 1 результат оказался ложноотрицательным. Таким образом, чувствительность разработанной системы составляет 96%, а специфичность – 100%.

Для удобства отображения на рисунке приведены результаты анализа четырёх из 25 проанализированных образцов плазмы крови беременных мальчиками женщин. На рисунке также отображены результаты амплификации участка маркера *SRY*, – они не явились информативными в данной ситуации, как видно, – одна копия этого маркера не всегда детектируема при малых количествах анализируемого генетического материала.

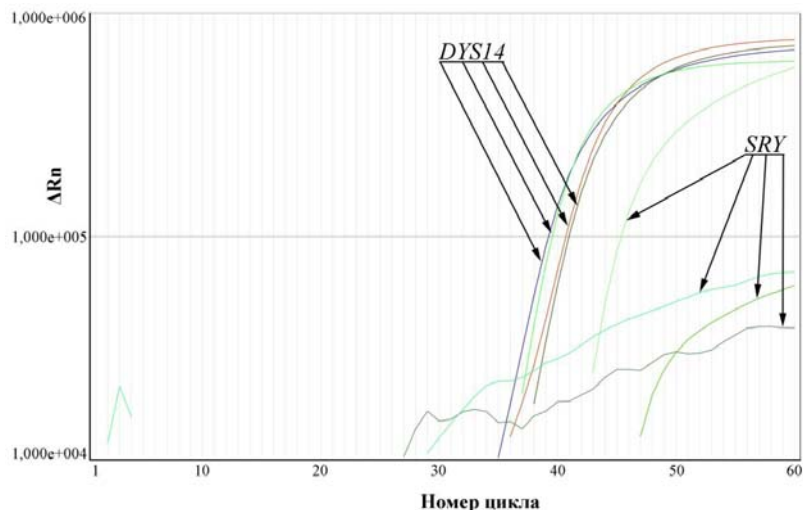


Рисунок 4. Сравнительный анализ амплификации участков маркеров *DYS14* и *SRY* проводился на образцах плазмы крови беременных мальчиками женщин. Успешная амплификация маркера *DYS14* позволила судить о мужской принадлежности плода. В нашем случае эффективность ПЦР составила 98%, что на 18% выше показателя системы, предложенной ранее (Zimmermann et al., 2008).

Таким образом, разработанная нами система позволила, с помощью амплификации маркера *DYS14*, достоверно и безопасно установить пол плодов по образцам крови беременных женщин на ранних сроках беременности.

2. Неинвазивное пренатальное определение резус-фактора плода с помощью внеклеточной ДНК и гена *RHD*.

Установление резус-фактора будущего ребёнка проводилось по схеме, представленной на рисунке 5:



Рисунок 5. Схема неинвазивного пренатального установления резус-фактора плода по образцам крови будущей матери.

Ген *RHD*, определяющий положительный резус-фактор человека, идентичен на 92% по нуклеотидной последовательности гену *RHCE*, обнаруживаемому и при отрицательном резус-факторе. Наибольшие отличия между генами наблюдаются в экзонах 7 и 10, поэтому одна из основных задач при установлении резус-статуса исследуемого образца, – это обнаружение именно этих экзонов гена *RHD*.

Апробацию разработанной системы с целью определения нижнего предела обнаружения участка ДНК, содержащего ген *RHD*, проводили на образцах крови мужчин с установленным ранее, по анализу крови, положительным резус-фактором. Проводили ряд последовательных разведений водного раствора геномной ДНК, в конечном итоге до 2 копий в мкл. В результате проведения серии опытов была установлена возможность обнаружения, как минимум, двух копий ДНК, содержащих ген *RHD* в реакционной смеси (рисунок 6), что позволило нам сделать вывод о пригодности системы для пренатальной диагностики резус-фактора по образцам плазмы крови беременных женщин.

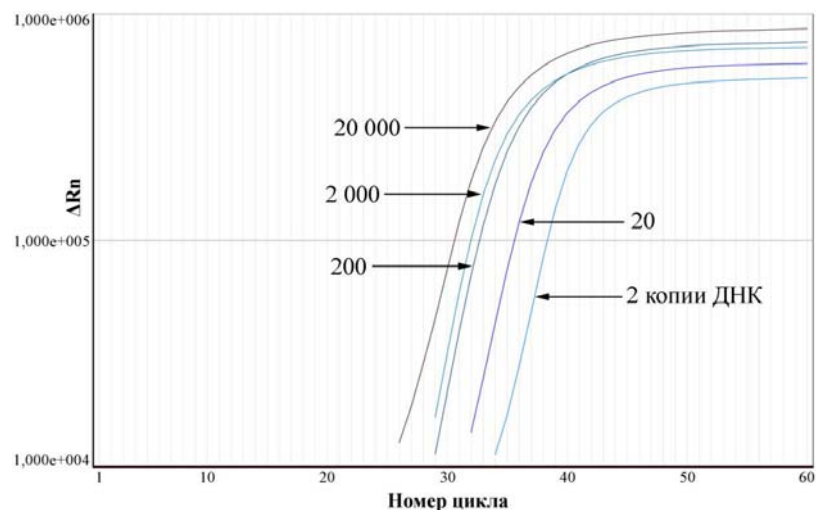


Рисунок 6. Определение нижнего предела обнаружения ДНК, содержащей ген *RHD* в реакционной смеси с помощью ПЦР в реальном времени.

Установление резус-фактора плода по образцам плазмы крови беременных женщин

В исследовании использовали 28 образцов крови беременных с установленным ранее, по анализу крови, отрицательным резус-фактором матери. Анализ 21 образца указал на положительный резус-фактор плода, в 7 случаях был установлен отрицательный резус-фактор. Результаты анализа были подтверждены анализом крови детей после их рождения. Таким образом, чувствительность и специфичность разработанной системы составляет 100%.

Ниже приведены результаты проведения ПЦР в реальном времени участков экзонов 7 и 10 гена *RHD*, позволяющие судить о резус-факторе плода (рисунок 7). Положительным контролем прохождения ПЦР в реальном времени служил участок однокопийного гена «домашнего хозяйства» *GAPDH*. Для удобства отображения приведены результаты анализа четырёх образцов плазмы крови беременных женщин.

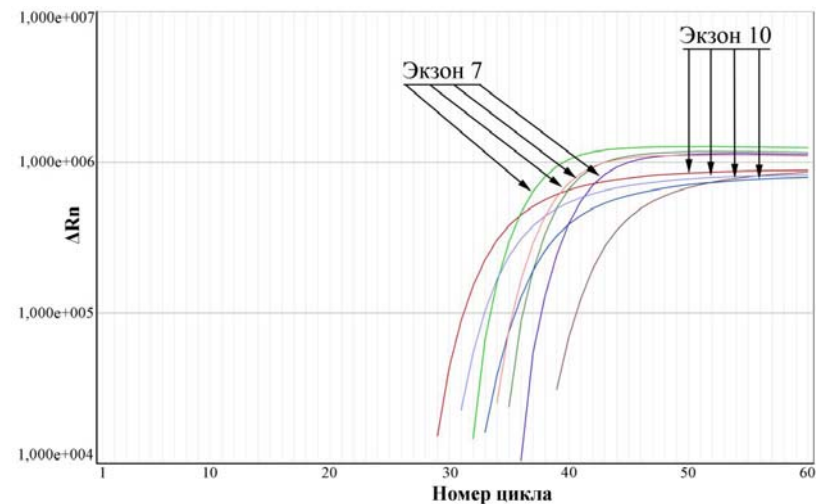


Рисунок 7. Результаты амплификации участков экзонов 7 и 10 гена *RHD* из образцов плазмы беременных женщин позволили установить положительный резус-фактор плода.

Таким образом, предложенная нами система позволяет безопасно и достоверно устанавливать резус-фактор плода по крови его будущей матери.

3. Разработка подхода для диагностики синдрома Дауна у плода по образцам плазмы крови беременных женщин.

Для разработки диагностического подхода мы использовали специфичные для плаценты мРНК (плацентарные мРНК), выделенные из крови беременной, – такой подход может предоставить достаточную для анализа информацию о плодном генотипе.

Определение количества и качества выделенной РНК

Сохранность РНК в образцах плазмы крови является одним из лимитирующих факторов разработки подхода, поэтому мы провели ряд экспериментов, чтобы отработать условия стабильного получения РНК из плазмы крови и последующую успешную амплификацию после проведения обратной транскрипции.

Для определения количества и качества выделенной РНК использовали

фрагменты генов «домашнего хозяйства» *ACTB* и *B2M*. Ген бета-актина (*ACTB*) был выбран из-за высокой экспрессии во всех клетках человека, что позволяет идентифицировать мРНК этого гена из минимальных возможных концентраций тотальной РНК. Однако для гена бета-актина обнаружено более 10 псевдогенов, геномные последовательности которых практически полностью гомологичны последовательности его мРНК. Это является большим недостатком, поскольку при наличии даже небольших следов геномной ДНК в образцах кДНК, последовательности псевдогенов также будут амплифицироваться, образуя продукты такой же длины. Для минимизации этого эффекта праймеры были подобраны таким образом, чтобы давать фрагменты разной длины в случае амплификации кДНК и геномной ДНК, что позволяет оценивать степень загрязнения геномной ДНК: один или оба праймера перекрывали границу двух экзонов или праймеры располагались внутри экзонов, разделённых интроном.

Аналогичная ситуация с наличием большого числа псевдогенов характерна для большинства генов, которые часто используются как стандарты в исследованиях экспрессии. Поэтому нами в качестве второго стандарта был выбран ген *B2M*, для которого псевдогены не обнаружены. Для него праймеры также были подобраны таким образом, чтобы амплифицировать только кДНК гена, а не геномную ДНК.

Исследование сохранности РНК в крови и плазме крови

Для исследования степени деградации циркулирующей РНК цельную кровь хранили на льду в течение 1, 4 и 24 часов, после чего из неё производилось выделение РНК. Использовали три различных метода выделения: Хомчинского (Chomczynski et al., 2006) – с помощью реагента Тризол, с применением ионообменных колонок и новый комбинированный метод, объединяющий в себе первые два.

Сохранность РНК оценивали по интенсивности сигнала ОТ–ПЦР, для которой использовали пары праймеров, позволяющие амплифицировать фрагменты генов *PLAC4*, *ACTB* и *B2M*. Аналогичный эксперимент был проведён с плазмой крови, которую после получения из цельной крови хранили при комнатной температуре, +4°C, –20°C и –70°C в течение 1, 4 и 24 часов.

Исследования показали, что хранение крови на льду в течение 24 часов не привело к существенному изменению эффективности амплификации участков

выбранных генов (различия не более 20 %). Также отмечена высокая сохранность циркулирующей РНК в плазме при +4°C и –70°C в течение 24 часов (снижение уровня сигнала не более 20%). При этом сохранность образцов при комнатной температуре и замораживании на –20°C в течение 24 часов была снижена на 50% и 30%, соответственно. Таким образом, была подтверждена достаточно высокая стабильность циркулирующей РНК, показанная и другими авторами.

Кроме того, проводилась оценка увеличения сохранности РНК после добавления двух реактивов, теоретически замедляющих деградацию РНК: «RNAlater» («Ambion», США) и Тризол. Добавление реагента «RNAlater» привело к резкому снижению выхода РНК при выделении всеми доступными методами, что делает невозможным его использование для анализа циркулирующих РНК. Напротив, добавление реагента Тризол, в состав которого входит 0,8 М гуанидин тиоционат и фенол (рН 4,0), существенно повысило сохранность РНК. В частности, было показано значительное увеличение сохранности циркулирующей РНК после хранения плазмы крови при –70°C в течение 4–6 месяцев (таблица 1).

Таблица 1.

Результаты выделения РНК из образцов плазмы крови разных сроков хранения с использованием ионообменных колонок («QIAamp® Viral RNA mini kit», «Qiagen», США) и добавлением 1,25 объёма реагента Тризол.

Срок хранения образцов РНК	Средний выход РНК, мкг		Доля успешной ОТ–ПЦР, %	
	Добавление реагента Тризол перед хранением	Добавление реагента Тризол после хранения	Добавление реагента Тризол перед хранением	Добавление реагента Тризол после хранения
1–10 дней	2,8 ± 1,3	2,4 ± 0,9	100	93
4–6 месяцев	1,9 ± 1,0	0,5 ± 0,3	67	13

В некоторых статьях, описывающих методы выделения нуклеиновых кислот из плазмы крови, часто предлагается добавлять в кровь 1% раствор формальдегида для

повышения физической прочности клеток крови, предотвращения их лизиса и выхода в плазму внутриклеточных нуклеиновых кислот (Dhallan et al., 2004).

В проведённых нами экспериментах было показано, что выделение и анализ РНК из плазмы крови, обработанной раствором формальдегида, сильно затруднены, по-видимому, из-за ковалентных сшивок между РНК и белками плазмы. В 58% образцов амплификация фрагментов выбранных генов оказалась невозможна, для других количество продукта ПЦР было снижено на 1–2 порядка. Разрушение ковалентных сшивок с помощью инкубирования раствора РНК с протеиназой К в течение 1 часа при температуре 70°C позволило повысить эффективность ОТ–ПЦР, однако различия не были существенными.

Отработка оптимального метода выделения циркулирующих мРНК

Было проведено сравнение трёх известных из литературы методов выделения РНК: два классических метода с использованием смеси фенола и гуанидин тиоцианата (с помощью реагента Тризол) (Chomczynski et al., 2006) и с использованием ионообменных колонок, а также новый комбинированный метод, объединяющий в себе первые два (Zhong, 2008). Сравнение проводилось следующим образом. Образцы плазмы разделяли на 3 равные части. Из каждой части выделяли РНК одним из трёх методов и проводили ОТ–ПЦР с использованием трёх маркерных генов. Добавление реагента Тризол, если было необходимо по протоколу, проводилось сразу перед выделением.

РНК выделяли из 30 свежих образцов плазмы (хранение: 1 – 10 дней при –70°C) и из 30 образцов плазмы длительного срока хранения (4 – 6 месяцев при –70°C). Результаты исследования подтвердили данные последних публикаций о значительном преимуществе комбинированного метода для выделения из плазмы крови РНК невирусного происхождения (таблица 2). Данный метод оказался единственным, с помощью которого удалось успешно выделять РНК из образцов плазмы после длительного хранения с достаточно высоким выходом.

Таблица 2.

Результаты выделения РНК из образцов плазмы крови разных сроков хранения тремя методами: с помощью фенола-гуанидин тиоцианата (реагент Тризол), ионообменных колонок («Viral RNA mini kit», Qiagen) и комбинированного метода.

Срок хранения образцов	Средний выход РНК, мкг			Доля успешной ОТ–ПЦР, %		
	<i>Тризол</i>	<i>Viral RNA mini kit</i>	<i>Тризол+ Viral RNA mini kit</i>	<i>Тризол</i>	<i>Viral RNA mini kit</i>	<i>Тризол+ Viral RNA mini kit</i>
1–10 дней	0,9 ± 0,7	3,1 ± 1,7	4,3 ± 2,1	66	100	100
4–6 месяцев	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,2	1,1 ± 0,5	0	14	43

Идентификация генетических маркеров, пригодных для проведения исследования

Измерение соотношений аллелей, транскрибируемых с хромосомы, приводящей к анеуплоидии, позволяет выявить анеуплоидию (Lo et al., 2007). Этот подход называется «РНК–ОНП» (ОНП – однонуклеотидный полиморфизм) и основан на наличии внутри амплифицируемой последовательности полиморфного маркера.

Преимуществами данного подхода являются: 1) наличие множества копий мРНК, транскрибируемых со специфичного для плаценты гена; 2) мРНК – маркеры могут легко быть обнаружены с помощью ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ–ПЦР) или других методов амплификации, без применения более сложного метода (Lo, 2008).

Необходимым условием для эффективного применения метода РНК–ОНП является гетерозиготный генотип данного полиморфного маркера у ребёнка. Теоретически, увеличение информативности метода РНК–ОНП может быть достигнуто включением в панель полиморфных маркеров нескольких генов, обнаруживаемых в материнской плазме.

Для анализа хромосомного дисбаланса пригодны полиморфные маркеры в циркулирующих РНК, обладающие следующим свойством:

1. РНК должны специфично экспрессироваться в плаценте, причём в той её части, которая содержит только клетки с генотипом плода.

2. Кодированные гены должны лежать в критической области, ассоциированной с синдромом Дауна, на хромосоме 21q22.

3. Поскольку для анализа подходят только гетерозиготные генотипы, то полиморфные маркеры должны обладать максимальной гетерозиготностью.

Анализ баз данных и литературных источников помог выявить несколько генов и полиморфных маркеров, обладающих всеми перечисленными свойствами. Это гены *PLAC4*, *DNMT3L* и нетранслируемая РНК *c21orf105*. В них были выбраны для анализа 3 полиморфных маркера, обладающих достаточно высокой гетерозиготностью (более 30%).

На рисунке 8 представлены схематические изображения генов и полиморфных маркеров внутри этих генов. Отображено также схематическое расположение генов внутри критического района синдрома Дауна – участка хромосомы 21, трисомия которого приводит к синдрому Дауна (Baptista et al., 2000).

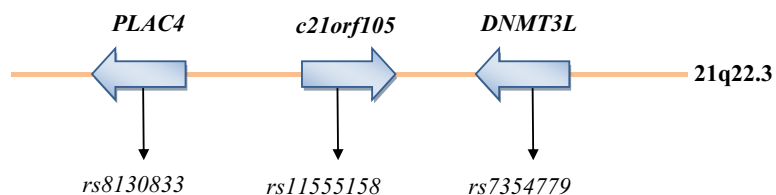


Рисунок 8. Схематическое изображение расположения выбранных для исследования генов и полиморфных маркеров внутри них в минимальном участке хромосомы 21, трисомия которого приводит к синдрому Дауна.

Проведена экспериментальная проверка частот встречаемости всех 3 полиморфных маркеров (*rs8130833*, *rs11555158* и *rs7354779*) в генах *PLAC4*, *c21orf105* и *DNMT3L*, соответственно, в выборке из 100 человек, представляющей население г. Москвы. Была подтверждена высокая гетерозиготность всех этих маркеров.

Для определения специфичности выбранных полиморфных маркеров для плаценты была проведена ОТ–ПЦР фрагментов, фланкирующих все 3 маркера, из РНК, полученной из плазмы крови беременных женщин. Одновременно с этим проводилась ОТ–ПЦР тех же маркеров из РНК контрольной группы мужчин. Было

проведено от 30 до 42 циклов ПЦР с шагом в 2 цикла, и определено количество циклов, при которых был получен специфичный сигнал (таблица 3).

Таблица 3.

Количество циклов ОТ–ПЦР участков, содержащих полиморфные маркеры в генах *PLAC4*, *c21orf105* и *DNMT3L*, из образцов РНК из плазмы крови мужчин и беременных женщин.

Группа	<i>PLAC4</i> (<i>rs8130833</i>)	<i>c21orf105</i> (<i>rs11555158</i>)	<i>DNMT3L</i> (<i>rs7354779</i>)
Беременные женщины	36	44	46
Мужчины	40	–	–

Как видно из представленных результатов, для амплификации полиморфного маркера в гене *PLAC4* потребовалось 36–40 циклов ПЦР. Однако оказалось, что экспрессия данного гена не полностью специфична для беременных женщин. При этом концентрация его РНК в плазме крови мужчин меньше в 10–20 раз, что соответствует дополнительным 4 циклам ПЦР, и это соотношение остаётся неизменным для всех проанализированных проб.

Возможно, неспецифичность экспрессии связана с тем фактом, что ген *PLAC4* полностью расположен в интроне гена *BACE2*, который экспрессируется в большинстве органов и тканей организма. Данное утверждение было проверено путём амплификации 5 участков гена *PLAC4* в 10 образцах кДНК яичников небеременных женщин, показавшей наличие экспрессии всех 5 участков гена.

По данным литературы, для амплификации фрагментов генов *c21orf105* и *DNMT3L* требуется проведение не менее 44 циклов ПЦР, что свидетельствует о крайне низком уровне их экспрессии. Поэтому нами дополнительно была проведена амплификация 3 участков данных генов, содержащих полиморфные маркеры, с использованием 44–46 циклов ПЦР. Для большинства образцов (62%) было показано наличие специфичного продукта ПЦР.

Мы считаем, что полиморфные маркеры в гене *PLAC4* предпочтительны для использования в неинвазивной диагностике синдрома Дауна у плода по крови матери ввиду наивысшей концентрации РНК данного гена. При этом мы считаем, что гены

c21orf105 и *DNMT3L* также пригодны для этой цели, однако их использование предполагает повышенные требования к чистоте лабораторных помещений из-за малого количества их РНК в материнской крови и связанной с этим опасности загрязнения.

Генотипирование полиморфных маркеров в генах *PLAC4*, *c21orf105* и *DNMT3L*

Удачная амплификация полиморфных маркеров в генах *PLAC4*, *c21orf105* и *DNMT3L* показала, что концентрация мРНК данных генов достаточна для последующего генетического анализа. Для дальнейшего использования полиморфных маркеров в данных генах следует также доказать, что их РНК происходит от плода, то есть имеет плодный генотип.

Для определения количественного соотношения между РНК с генотипами плода и матери в плазме материнской крови мы использовали следующий подход. Из собранной коллекции крови были выбраны семейные пары, в которых будущие отец и мать были, согласно данным проведенного нами генотипирования, гомозиготны по разным аллелям полиморфных маркеров *rs8130833*, *rs1155158* и *rs7354779*. Таким образом, генотип плода должен быть гетерозиготным и, в случае отсутствия трисомии у плода, соотношение между аллелями в кДНК должно быть равно 1:1. Отклонение от данного соотношения в сторону генотипа матери будет свидетельствовать о содержании в плазме РНК с генотипом матери.

Из парных образцов крови (беременная женщина и будущий отец) были выбраны 30 с разными аллелями маркера *rs8130833*, 24 – с разными аллелями маркера *rs1155158* и 27 – маркера *rs7354779*. Далее, выбрав подходящие для анализа семьи, мы провели генотипирование троек образцов: геномная ДНК и кДНК беременной, геномная ДНК будущего отца с помощью ПЦР в реальном времени с детекцией по конечной точке («TaqMan® анализ»).

Во всех случаях было установлено, что плод является носителем двух разных аллелей выбранных маркеров, унаследованных от обоих родителей. На рисунках 9–11, для удобства отображения, приведены результаты генотипирования 8 троек образцов.

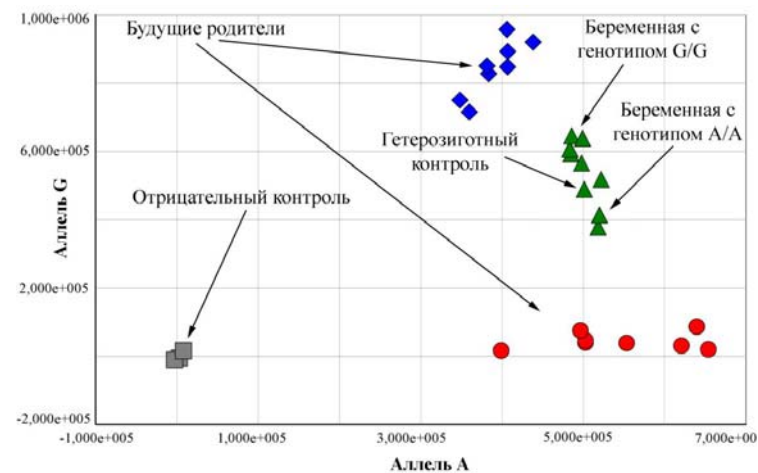


Рисунок 9. Генотипирование маркера *rs8130833* в тройках образцов: геномная ДНК и кДНК беременной, геномная ДНК будущего отца с помощью ПЦР в реальном времени с детекцией по конечной точке.

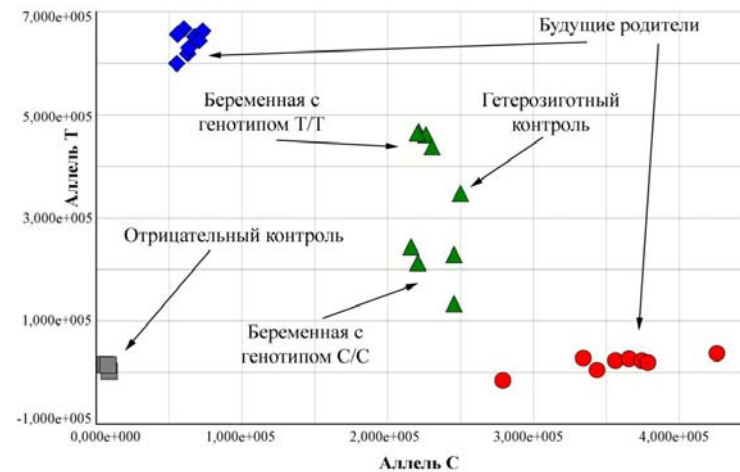


Рисунок 10. Генотипирование маркера *rs1155158* в тройках образцов: геномная ДНК и кДНК беременной, геномная ДНК будущего отца с помощью ПЦР в реальном времени с детекцией по конечной точке.

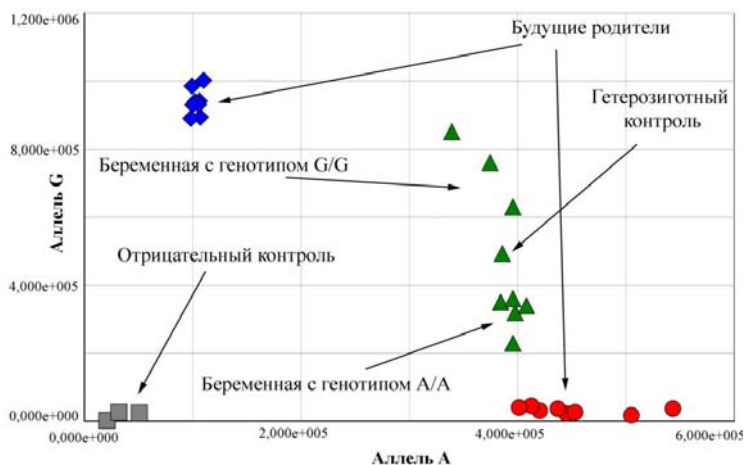


Рисунок 11. Генотипирование маркера *rs7354779* в тройках образцов: геномная ДНК и кДНК беременной, геномная ДНК будущего отца с помощью ПЦР в реальном времени с детекцией по конечной точке.

Итак, генотипирование будущего ребёнка по маркерам *rs8130833*, *rs1155158* и *rs7354779* проводилось по схеме, представленной на рисунке 12.

Таким образом, генотипирование РНК плазмы крови беременных женщин показало возможность анализа генотипа плода, что делает данный метод пригодным для пренатальной диагностики синдрома Дауна. Однако наличие РНК с материнским генотипом, обнаруженное для всех полиморфных маркеров, затрудняет определение соотношения аллелей. Для повышения достоверности диагностики синдрома Дауна необходимо привлечение информации о большем числе маркеров в других генах хромосомы 21 и использование математических

Рисунок 12. Схема проведения генотипирования полиморфных маркеров в образцах крови будущей матери.



алгоритмов, позволяющих избавиться от данной систематической ошибки. Для нахождения таких маркеров нужны широкомасштабные исследования транскриптома плазмы крови.

ВЫВОДЫ

1. Определены условия длительного хранения образцов плазмы крови и выделения циркулирующих внеклеточных ДНК и РНК, соответствующие возможностям медицинских центров России.
2. В целях неинвазивного пренатального определения пола плода разработана новая система обнаружения ДНК, содержащей маркер *DYS14*, расположенный внутри многокопийного гена хромосомы Y, кодирующего белок TSPY1 с помощью ПЦР в реальном времени. С использованием метода «цифровой ПЦР» показано, что разработанная система позволяет детектировать, как минимум, 2 копии хромосомы Y в реакционной смеси. Генотипирование 40 образцов плазмы крови беременных с установленным кариотипом плода (25 мальчиков и 15 девочек) показало, что чувствительность разработанной системы составляет 96%, а специфичность – 100%.
3. Разработана система для неинвазивного пренатального определения резус-фактора плода с помощью амплификации в реальном времени двух экзонов гена *RHD*. Анализ 28 образцов плазмы крови беременных с отрицательным резус-фактором с помощью разработанной системы показал, что чувствительность и специфичность разработанной системы составляет 100%.
4. В целях диагностики синдрома Дауна выбраны 3 гена хромосомы 21: *PLAC4*, *c21orf105* и *DNMT3L*. Подтверждена возможность амплификации фрагментов этих генов на матрице РНК плазмы крови с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени. Генотипирование полиморфных маркеров *rs8130833*, *rs1155158* и *rs7354779* в тройках образцов (геномная ДНК будущего отца, геномная ДНК беременной, кДНК плода) показало наличие в плазме крови беременной как РНК с её генотипом, так и РНК с генотипом плода.
5. Генотипирование РНК плазмы крови беременных женщин показало возможность анализа генотипа плода, что делает данный метод пригодным для пренатальной диагностики. Для повышения достоверности диагностики синдрома Дауна

необходимо привлечение информации о большем числе маркеров в других генах критического района синдрома Дауна хромосомы 21q22.3.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Благодатских Е.Г.**, Серёгин Ю.А., Маркова Ж.Г., Шилова Н.В., Носиков В.В., Золотухина Т.В. *Возможности использования циркулирующих в крови матери мРНК плацентарного происхождения для диагностики синдрома Дауна у плода.* Медицинская генетика. 8(12), 24–30 (2009).
2. **Благодатских Е.Г.**, Никитин А.Г., Серёгин Ю.А., Благодатских К.А., Носиков В.В. *Маркер *DYS14* и определение пола по биологическим образцам.* Молекулярная биология. 44(4), 646–649 (2010).
3. **Мануйлова Е.Г.** (Благодатских Е.Г.), Маркова Ж.Г., Шилова Н.В., Золотухина Т.В., Серёгин Ю.А. *Определение возможности использования циркулирующих мРНК для пренатальной диагностики синдрома Дауна.* Материалы V-ого съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров, стр. 458, г. Москва, Россия (21 – 28 июня 2009 г.).
4. **Мануйлова Е.Г.** (Благодатских Е.Г.), Маркова Ж.Г., Шилова Н.В., Золотухина Т.В., Носиков В.В., Серёгин Ю.А. *Определение возможности использования циркулирующих мРНК для пренатальной диагностики синдрома Дауна.* Материалы международной научной конференции по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвящённой 75-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова, стр. 134–138, г. Москва, Россия (28 сентября – 2 октября 2009 г.).
5. **Благодатских Е.Г.**, Никитин А.Г., Маркова Ж.Г., Шилова Н.В., Золотухина Т.В., Носиков В.В., Серёгин Ю.А. *Фоновая экспрессия затрудняет использование циркулирующих фетальных мРНК в материнской крови для диагностики трисомии по хромосоме 21 у плода.* Материалы VI-го съезда Российского Общества Медицинских Генетиков, стр. 24–25, г. Ростов-на-Дону, Россия (14 – 19 мая 2010 г.).