

Результаты использования технологии молекулярно-генетической диагностики туберозного склероза

Аношкин К.И.¹, Карандашева К.О.¹, Алексеева Е.А.^{1,2}, Кузнецова Е.Б.^{1,2}, Демина Н.А.¹, Гусева Д.М.¹, Танас А.С.¹, Залетаев Д.В.^{1,2}, Стрельников В.В.¹

1 — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
115522, г. Москва, ул. Москворечье, 1

2 — Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ,
119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр.2.

Проведено комплексное молекулярно-генетическое обследование пациентов с диагнозом туберозный склероз. Комплекс включает высокопроизводительное параллельное секвенирование с глубоким покрытием для выявления точковых мутаций и инделов, MLPA для выявления протяженных делеций и секвенирование по Сэнгеру. В выборке из 202 пациентов мутации найдены в 96,5% случаев; из них точковые мутации и инделы – в 93,3%, а протяженные делеции – в 6,7%. В 5,9% были найдены мутации с низкой аллельной представленностью (мозаицизм).

Ключевые слова: TSC1, TSC2, NGS, MLPA, мозаицизм.

Для цитирования: Аношкин К.И., Карандашева К.О., Алексеева Е.А., Кузнецова Е.Б., Демина Н.А., Гусева Д.М., Танас А.С., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. Результаты использования технологии молекулярно-генетической диагностики туберозного склероза. *Медицинская генетика* 2020; 19(6): 8-9.

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.06.8-9

Автор для корреспонденции: Аношкин Кирилл Игоревич; **e-mail:** anoshkinki@gmail.com

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «МГНЦ» на выполнение НИР.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Поступила: 20.05.2020

The results of the use of molecular genetic technology for the diagnosis of tuberous sclerosis

Anoshkin K.I.¹, Karandasheva K.O.¹, Alekseeva E.A.^{1,2}, Kuznetsova E.B.^{1,2}, Demina N.A.¹, Guseva D.M.¹, Tanas A.S.¹, Zaletaev D.V.^{1,2}, Strelnikov V.V.¹

1 — Research Centre for Medical Genetics
Moskvorechye st., 1, Moscow, 115522, Russia

2 — I.M. Sechenov First Moscow State Medical University
Trubetskaya st. 8., Moscow, 119991, Russia

A comprehensive molecular genetic examination of patients with diagnosis of tuberous sclerosis was carried out. The complex includes NGS with deep sequencing for detecting point mutations and indels, MLPA for identification of extended deletions, and Sanger sequencing. Mutations was found in 96,5% cases from 202 samples. Point mutation and indels were found in 93,3% cases, extended deletions were found in 6,7%. Mutations with low allelic representation were found in 5,9%.

Keywords: TSC1, TSC2, NGS, MLPA, mosaicism.

For citation: Anoshkin K.I., Karandasheva K.O., Alekseeva E.A., Kuznetsova E.B., Demina N.A., Guseva D.M., Tanas A.S., Zaletaev D.V., Strelnikov V.V. The results of the use of molecular genetic technology for the diagnosis of tuberous sclerosis. *Medical genetics*. 2020; 19(6): 8-9 (In Rus)

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.06.8-9

Corresponding author: Anoshkin Kirill Igorevich, **e-mail:** anoshkinki@gmail.com

Funding. The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for RCMG.

Conflict of interest. The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Accepted: 20.05.2020

Туберозный склероз (ТС) — орфанное заболевание с частотой 1 на 10 000 человек, со 100% пенетрантностью и вариабельной экспрессивностью даже у носителей одинаковых мутаций в семьях. Причиной

возникновения ТС являются молекулярно-генетические изменения в генах TSC1 и TSC2. Они включают в себя точковые мутации и инделы (>90% случаев), а также протяженные делеции. Наиболее часто мутации фик-

сируются в гене *TSC2* – в 70% случаев, а в 30% случаев – в *TSC1* [1]. Примерно в 9–15% случаев пациенты с явными фенотипическими проявлениями ТС являются носителями мозаичных мутаций или глубоких интронных вариантов, что усложняет выявление молекулярно-генетических причин [2]. Как итог, вовлеченность двух генов, разнообразие представленных типов мутаций, отсутствие явных “горячих точек”, а также наличие мозаичных форм делают диагностику ТС трудоемкой и финансово затратной. Применение таких методов как высокопроизводительное параллельное секвенирование (ВПС) с глубоким покрытием, мультиплексная амплификация лигированных зондов (MLPA) и секвенирование по Сэнгеру позволяет более эффективно и экономично выявлять молекулярно-генетическую причину ТС, что способствует объективному проведению медико-генетического консультирования.

Материалы и методы

Исследование проведено на материале ДНК лимфоцитов периферической крови 202 пациентов с клиническим диагнозом ТС. Выделение ДНК проводили согласно стандартному протоколу фенол-хлороформной экстракции. Секвенирование библиотек фрагментов ДНК проводили на секвенаторе Ion S5 согласно протоколу производителя (Thermo Fisher, USA). Анализ протяженных делеций генов *TSC1* и *TSC2* осуществляли с использованием MLPA согласно протоколу производителя (MRC Holland, Netherlands). Подтверждение найденных однонуклеотидных замен и инделов проводили методом секвенирования по Сэнгеру.

Результаты и обсуждение

В результате применения комплексного подхода [3], молекулярно-генетические изменения у пациентов с ТС выявлены в 195/202 случаев (96,5%), из них методом ВПС выявлено 93,3% мутаций (182/195), методом MLPA – 13 протяженных делеций (6,7%). Большинство мутаций обнаружены в гене *TSC2* – 72,8%, и 23,8% – в гене *TSC1*.

Наиболее частый тип мутаций в гене *TSC1* – нонсенс-мутации (41,7%) и инделы (37,5%), тогда как в гене *TSC2* – миссенс-мутации (30,6%) и инделы (32,6%). Миссенс-мутации в гене *TSC1* зафиксированы в 14,6% случаев. Мутации в сайте сплайсинга в генах *TSC1* и *TSC2* наблюдались в 4,2 и 12,9%. Сравнение исследуемой выборки с выборкой, основанной на базе данных LOVD [1], выявило статистически значимое различие представленности типов мутаций в гене *TSC1*. В нашей выборке чаще встречаются миссенс-мутации (4,4% и 16,7% соответственно) и реже – мутации в сайте сплайсинга (11,7 и 4,2% соответственно).

Протяженные делеции в исследуемой выборке зафиксированы в 2,8% и 8% в гене *TSC1* и *TSC2* соответственно, что отличается от данных LOVD (в *TSC2* 5%, из них 4,5% делеций затрагивают часть гена, а 0,5% – весь ген *TSC2*). В исследуемой выборке 4% протяженных делеций затрагивают часть гена *TSC2*, а остальные 4% – весь ген.

Распределение мутаций в генах *TSC1* и *TSC2* является неравномерным [1]. В гене *TSC1* наибольшее количество мутаций фиксируется в 15–18 экзонах, а в гене *TSC2* – в 17, 33, 34 и 41 экзонах. Накопление мутаций в экзонах 15 и 34 генов *TSC1* и *TSC2* соответственно, является закономерным, так как они являются наибольшими среди экзонов исследуемых генов – 558 и 487 п.н., соответственно. Мы подтвердили ранее описанные неравномерность и характер плотности распределения мутаций; отличие наблюдается лишь в экзонах 24 и 25 гена *TSC2* (большее количество мутаций) и в экзоне 34 этого же гена (отсутствием мутаций).

Применяемый алгоритм диагностики ТС также позволил выявить 12 случаев (5,9%) с низкой представленностью патогенного аллеля с наиболее низким значением 0,6%. Согласно международным исследованиям, в 9–15% случаев молекулярно-генетические причины так и оставались невыявленными [2]. В нашем исследовании применяемая технология позволила повысить выявляемость мозаичных мутаций, тем самым снизить долю невыявленных причин до 3,5% (7/202).

Пытливый, разработанная нами технология молекулярно-генетической диагностики ТС позволила выявить молекулярно-генетические причины у пациентов с ТС в 96,5% случаев, что показывает её эффективность.

Литература

1. Salussolia C.L., Klonowska, K., Kwiatkowski, D.J., Sahin, M. Genetic Etiologies, Diagnosis, and Treatment of Tuberous Sclerosis Complex. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2019 Aug 31;20:217–240.
2. Peron A., Vignoli A., Briola F. et al. Deep phenotyping of patients with Tuberous Sclerosis Complex and no mutation identified in *TSC1* and *TSC2*. *Eur J Med Genet.* 2018 Jul;61(7):403–410.
3. Аношкин К.И., Карандашева К.О., Танас А.С., Бессонова Л.А., Демина Н.А., Петухова М.С., Анисимова И.В., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. Медицинская технология комплексной ДНК-диагностики tuberозного склероза. *Медицинская генетика.* 2018;17(8):32–37.

References

1. Salussolia C.L., Klonowska, K., Kwiatkowski, D.J., Sahin, M. Genetic Etiologies, Diagnosis, and Treatment of Tuberous Sclerosis Complex. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2019 Aug 31;20:217–240.
2. Peron A., Vignoli A., Briola F. et al. Deep phenotyping of patients with Tuberous Sclerosis Complex and no mutation identified in *TSC1* and *TSC2*. *Eur J Med Genet.* 2018 Jul;61(7):403–410.
3. Anoshkin K.I., Karandasheva K.O., Tanas A.S., Bessonova L.A., Demina N.A., Petukhova M.S., Anisimova I.V., Zaletaev D.V., Strelnikov V.V. Meditsinskaya tekhnologiya kompleksnoy DNK-diagnosticski tuberoznogo skleroza [Medical technology for comprehensive DNA analysis in tuberous sclerosis]. *Meditsinskaya genetika. [Medical Genetics].* 2018;17(8):32–37. (In Russ.)