

Исследование гена *ATP7B* с помощью массового параллельного секвенирования у пациентов с болезнью Вильсона-Коновалова

Скрябин Н.А., Васильева О.Ю., Сивцев А.А., Жалсанова И.Ж., Постригань А.Е., Минайчева Л.И., Агафонова А.А., Петрова В.В., Сивоха В.М., Филимонова М.Н., Сеитова Г.Н., Назаренко Л.П.

Научно-исследовательский институт медицинской генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»
634050, г. Томск, Набережная реки Ушайки, 10

Болезнь Вильсона-Коновалова (БВК) – аутосомно-рецессивное заболевание, развивающееся вследствие накопления меди в организме при повреждениях гена *ATP7B*. В настоящем исследовании проводился поиск мутаций в этом гене методом массового параллельного секвенирования у больных с БВК. Для целевого обогащения интересующих регионов была разработана панель праймеров для ПЦР длинных фрагментов. У 6 пациентов из 12 проанализированных выявлены патогенные и вероятно патогенные варианты нуклеотидной последовательности гена *ATP7B*. Полученные результаты указывают на то, что разработанный метод таргетного массового параллельного секвенирования позволяет эффективно выявлять мутации в гене *ATP7B*.

Ключевые слова: болезнь Вильсона-Коновалова, *ATP7B*, мутации

Для цитирования: Скрябин Н.А., Васильева О.Ю., Сивцев А.А., Жалсанова И.Ж., Постригань А.Е., Минайчева Л.И., Агафонова А.А., Петрова В.В., Сивоха В.М., Филимонова М.Н., Сеитова Г.Н., Назаренко Л.П. Исследование гена *ATP7B* с помощью массового параллельного секвенирования у пациентов с болезнью Вильсона-Коновалова. *Медицинская генетика* 2020; 19(7): 97-98.

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.07.97-98

Автор для корреспонденции: Скрябин Николай Алексеевич; **e-mail:** nikolay.skryabin@medgenetics.ru

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ в рамках государственного задания № АААА-А19-119090990020-0.

Конфликт интересов. Потенциальных и явных конфликтов интересов, связанных с рукописью, у авторов нет.

Поступила: 20.05.2020

ATP7B gene study using massively parallel sequencing in patients with Wilson's disease

Skryabin N.A., Vasilyeva O.Yu., Sivtsev A.A., Zhalsanova I.Zh., Postrigan A.E., Minaicheva L.I., Agafonova A.A., Petrova V.V., Sivoha V.M., Filimonova M.N., Seitova G.N., Nazarenko L.P.

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences
Nab. r. Ushaiiki, 10, Tomsk, 634050, Russia

Wilson's disease is an autosomal recessive disease that develops as a result of the accumulation of copper in the organism when the *ATP7B* gene is damaged. The present study searched for mutations in this gene using massively parallel sequencing in patients with Wilson's disease. For targeted enrichment of the regions of interest, a primer panel for PCR of long fragments was developed. In 6 patients out of 12 analyzed, pathogenic and probably pathogenic variants of the nucleotide sequence of the *ATP7B* gene were identified. The obtained results indicate that the developed method of targeted massively parallel sequencing allows efficient detection of mutations in the *ATP7B* gene.

Keywords: Wilson's disease, *ATP7B*, mutations

For citation: Skryabin N.A., Vasilyeva O.Yu., Sivtsev A.A., Zhalsanova I.Zh., Postrigan A.E., Minaicheva L.I., Agafonova A.A., Petrova V.V., Sivoha V.M., Filimonova M.N., Seitova G.N., Nazarenko L.P. *ATP7B* gene study using massively parallel sequencing in patients with Wilson's disease. *Medical genetics*. 2020; 19(7): 97-98. (In Rus)

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.07.97-98

Corresponding author: Skryabin Nikolay Alekseevich; **e-mail:** nikolay.skryabin@medgenetics.ru

Funding. This study was supported by buget projects АААА-А19-119090990020-0.

Conflict of interest. The authors declare that they have no conflict of interest.

Accepted: 20.05.2020

Болезнь Вильсона-Коновалова (гепатоцеребральная дистрофия, гепатолентикулярная дегенерация) – хроническое прогрессирующее генетически обусловленное заболевание с аутосомно-рецессив-

ным типом наследования, в основе которого лежит нарушение обмена меди с избыточным накоплением ее в висцеральных органах и центральной нервной системе [1]. Частота встречаемости БВК составляет от

1:30000 до 1:100000 человек. Ген *ATP7B*, ответственный за развитие БВК, локализован на длинном плече хромосомы 13 (13q14.3), состоит из 28 экзонов, его длина — более 79 тысяч пар оснований. В настоящее время известно более 900 мутаций гена *ATP7B* [2].

Цель: поиск мутаций в гене *ATP7B* методом массового параллельного секвенирования у больных с болезнью Вильсона-Коновалова.

Материалы и методы

Молекулярно-генетический анализ проводился 12 пациентам с направительным диагнозом «болезнь Вильсона-Коновалова» и членам их семей. Исследование было выполнено с использованием оборудования центра коллективного пользования «Медицинская геномика» на базе НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Все семьи, принявшие участие в исследовании, подписали информированное согласие. Проведение работы было одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Геномную ДНК обследуемых выделяли из венозной крови методом фенол-хлороформной экстракции. Для анализа мутаций в гене *ATP7B* была разработана панель праймеров для секвенирования полной последовательности генов методом таргетного массового параллельного секвенирования. Обогащение интересующих регионов генома проводилось с помощью ПЦР длинных фрагментов. Присутствие амплифицированных продуктов проверялось методом электрофореза в агарозном геле. Приготовление ДНК-библиотек для секвенирования производилось с использованием набора Nextera Flex (Illumina, США) по протоколу, рекомендованному производителем. Массовое параллельное секвенирование осуществлялось на секвенаторе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора для секвенирования MiSeq Reagent Kit V2 (Illumina, США) по рекомендованному производителем протоколу. Все выявленные мутации были подтверждены методом секвенирования по Сэнгеру.

Результаты

В результате проведенной работы у 6 пациентов (6/12) выявлены патогенные и вероятно патогенные варианты нуклеотидной последовательности гена *ATP7B*. У одного пациента выявлена мутация с.3207C>A в экзоне 14 в гомозиготном состоянии, приводящая к замене аминокислоты в позиции 1069 белка (p.H1069Q, NM_000053). Данная мутация является наиболее ча-

сто встречающейся в российской популяции, популяционная частота составляет 1:100 [2]. У двух пациентов выявлена аналогичная мутация в гетерозиготном состоянии, кроме нее обнаружены дополнительные вероятно патогенные варианты нуклеотидной последовательности гена *ATP7B*: в сайте сплайсинга экзона 16 (с.3556+1G>T) и дупликация в экзоне 13, приводящая к сдвигу рамки считывания (с.3036insC:p.G1012fs). Оба выявленных редких варианта нуклеотидной последовательности не зарегистрированы в базах данных популяционных выборок (ExAC, gnomAD, 1000 genomes). У двух пациентов с БВК, являющихся сибсами, найдена только одна частая мутация с.3207C>A. Возможно вторая патогенная мутация расположена в некодирующих регуляторных регионах, кроме того, есть вероятность нарушения функционирования гена вследствие крупных делеций или дупликаций.

Таким образом, у половины пациентов диагноз «болезнь Вильсона-Коновалова» был подтвержден с использованием молекулярно-генетической диагностики. У 6 пациентов не было найдено ни одного патогенного варианта в гене *ATP7B*. Вероятно данные пациенты страдают не БВК, а заболеваниями со схожими клиническими проявлениями. Разработанный метод таргетного массового параллельного секвенирования позволяет эффективно выявлять мутации в гене *ATP7B*, при этом более доступен по сравнению с используемыми в настоящее время альтернативными подходами. Широкое применение молекулярно-генетической диагностики у пациентов с БВК позволит более эффективно проводить терапию заболевания со снижением инвалидизации пациентов.

Литература

1. Кляритская И.Л., Работягова Ю.С. Болезнь Вильсона: клинические рекомендации по диагностике и лечению. *Крымский терапевтический журнал* 2012; 2: 51–57.
2. Баязутдинова Г.М., Шагина О.А., Карунас А.С., и др. Спектр мутаций в гене *ATP7B* у российских больных с болезнью Вильсона-Коновалова. *Генетика*. 2019;55(12):1433–1441.

References

1. Klyaritskaya I.L., Rabotyagova Y.S. Bolezn' Vil'sona: klinicheskie rekomendacii po diagnostike i lecheniyu. [Wilson's disease: clinical guidelines for diagnosis and treatment]. *Krymskij terapevticheskij zhurnal [Crimean Journal of Internal Diseases]*. 2012; 2: 51–57. (In Russ.)
2. Bayazutdinova G. M., Shchagina O. A., Karunas A. S., et al. Spektr mutacij v gene ATP7B u rossijskix bol'nyh s bolezny'yu Vil'sona—Konovalova. [Mutation Spectrum in ATP7B Gene in WD-Russian Patients]. *Genetika [Russian Journal of Genetics]*. 2019;55(12): 1433–1441. (In Russ.)