

Результаты использования новой медицинской технологии комплексной ДНК-диагностики нейрофиброматоза

Чаплыгина М.С.¹, Кузнецова Е.Б.^{1,2}, Танас А.С.¹, Бессонова Л.А.¹, Матющенко Г.Н.¹, Галкина В.А.¹, Петухова М.С.¹, Анисимова И.В.¹, Демина Н.А.¹, Залетаев Д.В.^{1,2}, Стрельников В.В.¹

¹ — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», Москва, 115478, Москворечье д.1; e-mail: vstrel@list.ru

² — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 119991, Ул. Трубецкая д.8, стр.2, e-mail: kuznetsova.k@bk.ru

Проведено комплексное молекулярно-генетическое обследование больных с клиническим диагнозом «нейрофиброматоз». Для диагностики нейрофиброматоза 1-го и 2-го типов использовался внедренный в практическую деятельность ФГБНУ «МГНЦ» комплекс новых медицинских технологий, включающий методы таргетного высокопроизводительного параллельного секвенирования ДНК и мультиплексной амплификации лигированных зондов (MLPA). Поиск точковых мутаций, небольших инсерций/делеций/дупликаций в генах *NF1* и *NF2* осуществлялся с применением секвенирования нового поколения на приборе Ion Torrent PGM. Для выявления протяженных делеций в генах *NF1* и *NF2* использовали метод MLPA. В выборке из 200 больных мутации в генах *NF1* и *NF2* обнаружены в 48,5% случаев. Методом MLPA у 14 из 100 больных определены делеции в гене *NF1*. В случае выявления мутации у больного с нейрофиброматозом возможны исключение или подтверждение носительства мутации у близких родственников и ранняя диагностика.

Ключевые слова: нейрофиброматоз 1 типа, нейрофиброматоз 2 типа, медицинская технология, высокопроизводительное параллельное секвенирование ДНК, MLPA

Введение

Нейрофиброматоз — группа аутосомно-доминантных генетических заболеваний с преимущественным поражением кожи и нервной системы. Различают нейрофиброматоз 1 типа (болезнь фон Реклингхаузена), нейрофиброматоз 2 типа и шванноматоз [1]. Нейрофиброматоз 1 типа (*NF1*, MIM # 162200) встречается с частотой 1 на 2500—3000 новорождённых, характеризуется высокой пенетрантностью [2]. Примерно в 50% случаев заболевание является результатом мутации *de novo* [3].

Основными фенотипическими признаками нейрофиброматоза 1 типа являются пятна цвета «кофе с молоком», веснушки в области паха и подмышек, узелки Лиша, нейрофибромы, глиома зрительного нерва, умственная отсталость, костные аномалии [1, 4]. Нейрофиброматоз имеет довольно широкий спектр симптомов, и в пределах одной семьи степень проявлений признаков может варьировать [2—4].

Причиной развития нейрофиброматоза 1 типа являются структурные нарушения в гене супрессора опухолевого роста нейрофибромина [5]. Ген *NF1* (MIM# 613113) картирован на длинном плече хромосомы 17 в районе 17q11.2, состоит из 58 экзонов. Белок нейрофибромин состоит из 2818 аминокислот и имеет молекулярную массу 327 кДа [5].

Нейрофиброматоз 2 типа (MIM #101000) в популяции встречается гораздо реже, чем нейрофиброматоз 1 типа. Частота заболевания составляет 1 на 25 000 новорожденных [6]. Главным диагностическим критерием нейрофиброматоза 2 типа является двусторонняя невринома слухового нерва. Симптомы обычно проявляются в конце подросткового периода или в раннем зрелом возрасте (около 20 лет). В возрасте 60 лет и старше пенетрантность заболевания достигает 100% [6].

Развитие нейрофиброматоза 2 типа и шванноматоза обусловлено мутациями в гене *NF2*. Ген *NF2* (MIM # 607379) локализован на длинном плече хромосомы 22 (22q12), кодирует синтез супрессора опухолевого роста — белка мерлина, или шванномина. Ген *NF2* состоит из 17 экзонов [5].

Молекулярные нарушения, описанные в генах *NF1* и *NF2*, представлены целым спектром генетических изменений: точковые мутации (нонсенс-мутации, миссенс-мутации, мутации сдвига рамки считывания), протяженные делеции [2—5].

Мутации распределены по кодирующим последовательностям генов *NF1* и *NF2* равномерно, что делает диагностику заболевания трудоемкой и продолжительной по времени.

Применение метода высокопроизводительного параллельного секвенирования позволяет сделать поиск структурных изменений в генах *NF1* и *NF2* более эффективным и относительно экономичным. Однако, по-

сколько методы секвенирования позволяют выявлять только однонуклеотидные замены, небольшие инсерции и делеции, возникла необходимость включить в протокол комплексной диагностики нейрофиброматоза метод MLPA для обнаружения протяженных делеций, которые также характерны для рассматриваемой группы заболеваний.

Совокупность данных методов позволяет охватить полный спектр генетических нарушений у больных с нейрофиброматозом, что способствует проведению грамотного и объективного медико-генетического консультирования и определению прогноза для больного члена семьи и родственников.

Материалы и методы

Клинический материал

Скрининг точковых мутаций, малых инсерций/делеций/дупликаций в генах *NF1* и *NF2* методом высокопроизводительного параллельного секвенирования проведён на выборке 198 образцов ДНК из лимфоцитов периферической крови пациентов и двух образцов ДНК из фиксированных формалином тканей опухолей, представленных ФГБНУ «МГНЦ».

Скрининг протяженных делеций в генах *NF1* и *NF2* методом MLPA проведён на 100 и 47 образцах ДНК из лимфоцитов периферической крови пациентов, соответственно.

Выделение ДНК из тканей и лимфоцитов периферической крови проводили стандартным методом фенол-хлороформной экстракции.

Выделение ДНК из фиксированных формалином тканей опухолей проводили с использованием коммерческого набора «QIAamp DNA FFPE Tissue Kit» («QIAGEN», Германия) по протоколу, рекомендованному производителем.

Высокопроизводительное параллельное секвенирование генов *NF1* и *NF2* проводили на приборе IonTorrent PGM (Life Technologies, США) в ФГБНУ «МГНЦ». Панель праймеров для секвенирования разработана с использованием программного обеспечения AmpliSeq Designer (Life Technologies). Таргетные регионы включают все кодирующие последовательности генов *NF1* и *NF2*, прилегающие области интронов и 5', 3'-нетранслируемые области (UTR). Для создания библиотек использовались реагенты Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (Life Technologies). Реакцию проводили по стандартному протоколу, рекомендованному производителем.

Клональную эмульсионную ПЦР проводили с использованием PGM Template OT2 200 Kit (Life Technologies) на приборе Ion One Touch 2 в соответствии с протоколом производителя. Секвенирование мультиплектированных образцов выполняли на секвенаторе Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) на чипах Ion 318 с использованием Ion PGM Sequencing 200 Kit (Life Technologies) по руководству производителя.

Результаты секвенирования анализировали с использованием программного обеспечения Torrent Suite, в составе: Base Caller (первичный анализ результатов секвенирования); Torrent Mapping Alignment Program — TMAP (выравнивание последовательностей относительно референсного генома NCBI build 37 — hg19); Variant Caller (анализ вариаций нуклеотидных последовательностей). Аннотацию функционального значения генетических вариаций и фильтрацию известных полиморфизмов с использованием базы данных dbSNP проводили с помощью компьютерной программы ANNOVAR. Визуальный анализ данных, ручную фильтрацию артефактов секвенирования и выравнивания последовательностей осуществляли с использованием программы Integrative Genomics Viewer — IGV.

С целью верификации выявленных точковых мутаций применяли секвенирование по Сэнгеру, с предварительной амплификацией целевых фрагментов генов методом ПЦР.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

В состав реакционной смеси для ПЦР входили следующие реагенты: 2,5 мкл 10х буфера для ПЦР (50 mM KCl, 10 mM трис-HCl, pH 8.4), по 200 мкМ каждого dNTP, 0,2 е.а. Taq-полимеразы. Оптимальное содержание MgCl₂ и праймеров в буфере подбирали экспериментальным путем. В реакционную смесь добавляли 100 нг геномной ДНК. Объем реакционной смеси довели деионизованной водой до 25 мкл. Сверху наслаивали 40–60 мкл вазелинового масла. Прогревали смесь при 94°C в течение 10 мин и проводили 35 циклов по следующей программе: 95°C — 1 мин, T_{отжига} праймеров (56–66°C, подбиралась экспериментальным путем) — 1 мин, 72°C — 30 с.

ПЦР проводили в программируемом термоциклере MC2 фирмы «ДНК-технология», Москва.

Продукты реакции детектировали методом вертикального электрофореза в 8% ПААГ при напряжении 600 В. Визуальный контроль пробега фрагментов ДНК осуществляли по красителям ксиленицианолу и бромфеноловому синему. По окончании электрофореза гель окрашивали нитратом серебра. Маркером молекулярного веса служили фрагменты плазмиды pUC19, полученные в результате ее обработки рестриктазой HpaII («СибЭнзим», Новосибирск).

Секвенирование ДНК по Сэнгеру

Определение нуклеотидных последовательностей продуктов ПЦР проводили с использованием секвенирования по Сэнгеру в соответствии с протоколом фирмы-производителя «Applied Biosystems», США. Капиллярный электрофорез меченых фрагментов осуществляли на генетическом анализаторе ABI3500 по протоколу ABI Prism 3500 Genetic Analyzer Kits («Applied Biosystems»). Полученные результаты секвенирования анализировали с использованием программы Chromas и сопоставляли с базой данных GenBank с помощью алгоритма BLAST.

Анализ количества копий генов NF1 и NF2

Анализ протяженных делеций генов NF1 и NF2 в ДНК крови пациентов осуществляли с использованием мультиплексной протравиваемой лигазной реакции (MLPA, multiplex ligation-dependent amplification). Реакцию MLPA проводили по стандартному протоколу, рекомендованному производителем (MRC-Holland, <http://www.mlpa.com>). В работе использовали два набора:

1. MRC-Holland SALSA® MLPA® P081 NF1 mix 1;
2. MRC-Holland SALSA® MLPA® P044 NF2.

Капиллярный электрофорез продуктов MLPA проводили на генетическом анализаторе ABI3500 в соответствии с протоколом ABI Prism 3500 Genetic Analyzer Kits («Applied Biosystems»). Данные обрабатывали с использованием программного обеспечения Coffalyser.NET, представленного компанией MRC-Holland.

Результаты и обсуждение

В рамках настоящей работы применен комплексный подход к выявлению молекулярно-генетических изменений у больных с предполагаемым клиническим диагнозом «нейрофиброматоз».

В результате скрининга небольших структурных нарушений в генах NF1 и NF2 методом секвенирования нового поколения в выборке из 200 больных, изменения обнаружены в 48,5% случаев. Выявлен практически полный спектр аномалий (табл. 1), представленный нонсенс-мутациями (37,1%), миссенс-мутациями (25,7%), мутациями сайтов сплайсинга (17,5%) и малыми делециями/инсерциями/дупликациями, приводящими к сдвигу рамки считывания (20,6%).

В результате проведенного исследования на всем протяжении кодирующих и прилежащих областей гена

Таблица

Спектр выявленных мутаций в генах NF1 и NF2

Тип мутации/ген	NF1	NF2
Нонсенс-мутации	31	4
Миссенс-мутации	21	4
Мутации сайтов сплайсинга	17	0
Мутации сдвига рамки считывания, в том числе:	19	1
— делеции	14	1
— инсерции	2	0
— дупликации	3	0
Всего	88 (90,7%)	5 (9,3%)

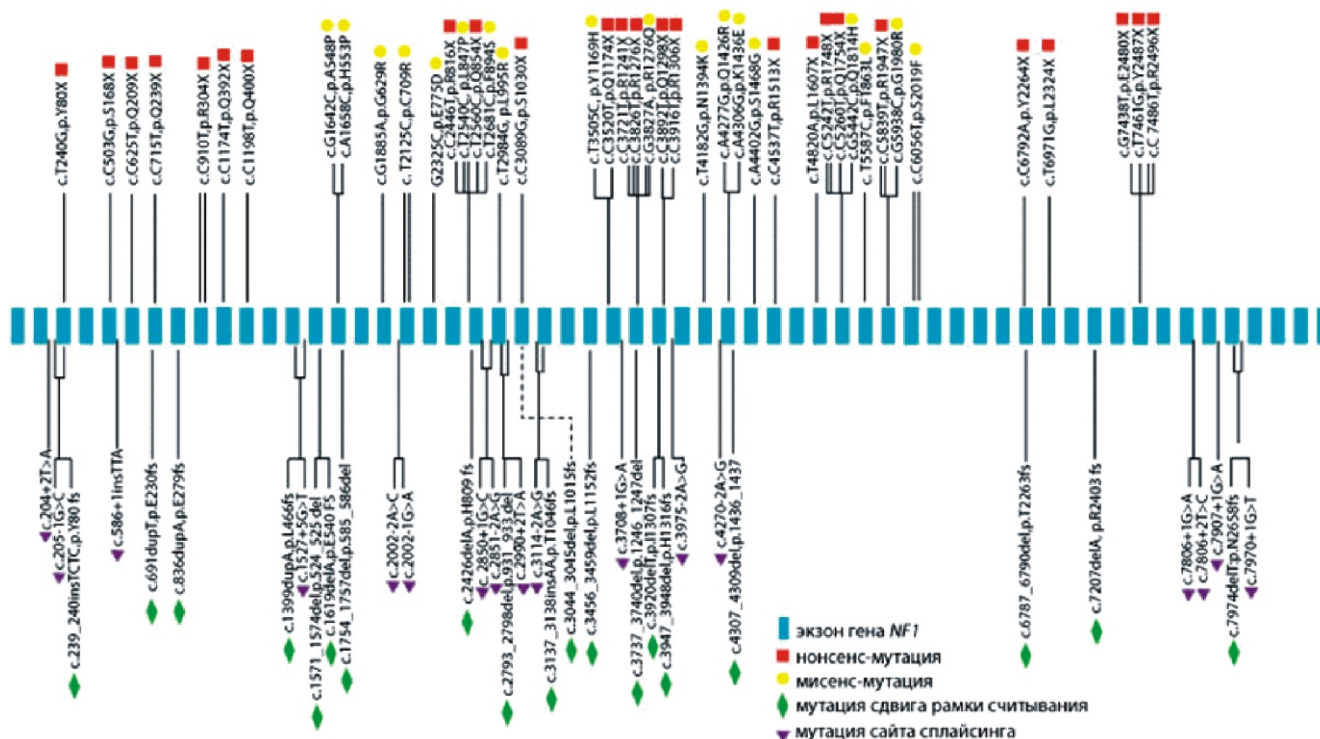


Рис. 1. Спектр мутаций, обнаруженных в гене NF1, по результатам высокопроизводительного параллельного секвенирования ДНК (собственные данные).

NF1 выявлено 88 мутаций. Как видно из табл. 1, в нашем исследовании самым распространенным классом мутаций *NF1* являются нонсенс-мутации. Обычно данный вид мутаций приводит к преждевременной терминации синтеза белка [3]. Кроме того, нами были выявлены и другие структурные изменения в гене *NF1*, полный спектр которых представлен на рис. 1.

Наряду с выявленными мутациями в гене *NF1*, были обнаружены структурные нарушения в гене *NF2*. В силу того, что частота встречаемости нейрофиброматоза 2 типа значительно ниже, чем нейрофиброматоза 1 типа, в нашей выборке количество пациентов, для которых были верифицированы мутации, меньше. В результате скрининга гена *NF2* найдено 9 мутаций (9,3%). Полный спектр выявленных нарушений при нейрофиброматозе 2 типа представлен на рис. 2.

По данным разных авторов, протяженные делеции встречаются при нейрофиброматозе 1 типа в 7,7–11% случаев [7, 8], что делает необходимым включение метода детекции делеций в протокол молекулярного исследования пациентов с соответствующим клиническим диагнозом.

В нашей работе использование метода MLPA позволило обнаружить делеции в гене *NF1* у 14 из 100 пациентов. Делеции включали один или несколько экзонов, либо захватывали весь ген (рис. 3). Поиск структурных нарушений методом мультиплексной пробазависимой лигазной реакции в гене *NF2*, проведенный у 43 больных, не выявил протяженных делеций.

В настоящей работе методом высокопроизводительного параллельного секвенирования молекулярные нарушения, приводящие к нейрофиброматозу, выявлены в 48,5% случаев. Методом мультиплексной пробазависимой лигазной реакции у 14 из 100 пациентов были определены делеции гена *NF1*. Доля образцов с выявленными мутациями оказалась существенно ниже ожидаемой по сравнению с результатами зарубежных коллег [8–10]. Мы предполагаем, что причиной этому может



Рис. 2. Спектр мутаций, обнаруженных в гене *NF2*, по результатам высокопроизводительного параллельного секвенирования ДНК (собственные данные).

быть неоднозначность клинической картины у пациентов, направленных на молекулярно-генетическую диагностику. В нашем исследовании часть пациентов представлена детьми до 2 лет, с минимальными признаками в виде одного или нескольких пятен. Наличие таких признаков не всегда предполагает генетическую патологию. Нельзя также исключать наличие в исследованной выборке пациентов с другими генетическими заболеваниями, симптомы которых аналогичны таковым при нейрофиброматозе.

Проведение комплексной молекулярно-генетической диагностики у пациентов с клиническим диагнозом *нейрофиброматоз* позволит повысить эффективность диагностики заболевания и установить характер генетического нарушения. Результаты работы найдут

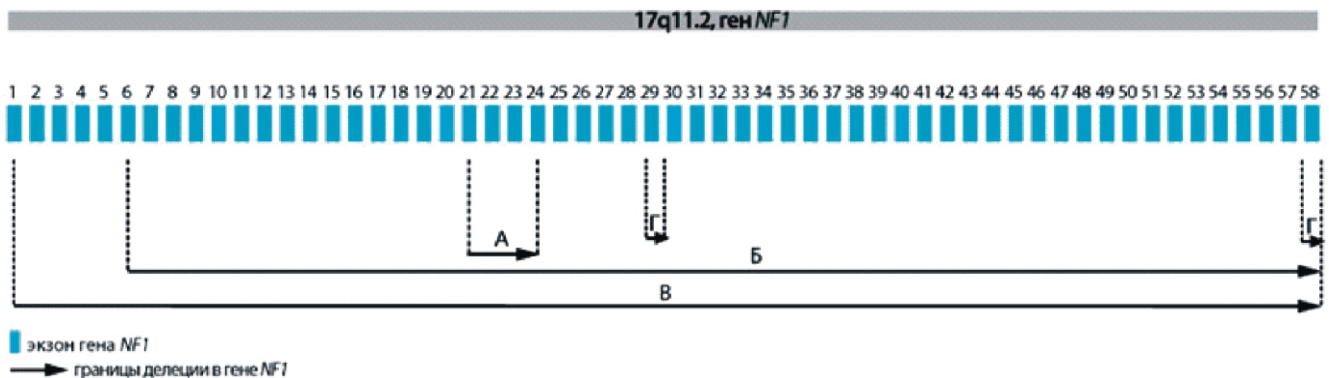


Рис. 3. Протяженные делеции в гене *NF1*, выявленные у 14 пациентов методом MLPA:

А. 1/14 пациентов с делецией гена *NF1* (экзоны 21–24).

Б. 1/14 пациентов с делецией *NF1* (экзоны 6–58).

В. 10/14 пациентов с делецией гена *NF1* (экзоны 1–58). В одной из семей определена полная делеция гена *NF1*, унаследованная пробандом от отца.

Г. 2/14 пациентов с делецией экзона 1 гена *NF1* (экзон 29 и экзон 58).

применение в практике врачей-генетиков при определении тактики ведения пациентов с признаками нейрофиброматоза, а также при проведении медико-генетического консультирования членов их семей.

Список литературы

1. Blakeley, J.O., & Plotkin, S.R. Therapeutic advances for the tumors associated with neurofibromatosis type 1, type 2, and schwannomatosis. *Neuro-oncology*. 2016; 18(5): 624-638.
2. Alkindy, A., Chuzhanova, N., Kini, U., Cooper, D.N., Upadhyaya, M. Genotype-phenotype associations in neurofibromatosis type 1 (NF1): an increased risk of tumor complications in patients with NF1 splice-site mutations? *Human genomics*. 2012; 6(12): 1-7.
3. Землякова В.В. Молекулярно-генетическая диагностика нейрофиброматоза I типа. Учебное пособие под ред. М.А.Пальцева и Д.В.Залетаева «Введение в молекулярную диагностику», том 2 «Молекулярно-генетические методы в диагностике наследственных и онкологических заболеваний». М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2011. — 506 с.: ил. (Учеб. лит. для студ. мед. вузов): 215-228.
4. Rodrigues LO, Batista PB, Goloni-Bertollo EM, et al. Neurofibromatoses: part 1 — diagnosis and differential diagnosis. *Arq Neuropsiquiatr*. 2014; 72(3): 241-250

5. <http://www.omim.org>
6. Asthagiri, A.R., Parry, D.M., Butman, J.A., Kim, H.J., Tsiolou, E.T., Zhuang, Z., Lonser, R.R. Neurofibromatosis type 2. *The Lancet*. 2009; 373(9679): 1974-1986.
7. Laczmanska I, Szczepaniak M, Jakubiak A, Stembalska. A Exonic deletions in the NF1 gene in patients with neurofibromatosis type I from the lower Silesian region of Poland. *Adv Clin Exp Med*. 2014; 23(4): 517-521.
8. Ryo Maruoka, Toshiki Takenouchi, Chiharu Torii, et al. The Use of Next-Generation Sequencing in Molecular Diagnosis of Neurofibromatosis Type 1: A Validation Study. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2014; 18(11): 722-735.
9. Pasmant E, Louvrier C, Luscan A, Cohen J. Neurofibromatosis type 2 French cohort analysis using a comprehensive NF2 molecular diagnostic strategy. *Neurochirurgie*. 2015 Jun 11; 718: 1-7.
10. Lassaletta L, Torres-Martin M, Pena-Granero C, Roda JM. NF2 genetic alterations in sporadic vestibular schwannomas: clinical implications. *Otol Neurotol*. 2013; 34(7): 1355-1361.

Информация о конфликте интересов:

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

The results of the use of the new medical technology for comprehensive DNA analysis in neurofibromatosis

Chaplygina M.S.¹, Kuznetsova E.B.^{1,2}, Tanas A.S.¹, Bessonova L.A.¹, Matyushchenko G.N.¹, Galkina V.A.¹, Petukhova M.S.¹, Anisimova I.V.¹, Demina N.A.¹, Zaletaev D.V.^{1,2}, Strelnikov V.V.¹

¹ — Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation, 115478, Moskvorechye St, 1, e-mail: vstrel@list.ru

² — I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation, 119991, Trubetskaya St, 8, e-mail: zalnem@mail.ru

We report the results of comprehensive molecular genetic examination of patients with a clinical diagnosis of neurofibromatosis. To detect molecular genetic alterations characteristic for type 1 or type 2 neurofibromatosis we applied a set of new medical technologies, including targeted high-throughput parallel DNA sequencing (NGS) and multiplex ligation probe amplification (MLPA). Search for point mutations, small insertions / deletions / duplications in *NF1* and *NF2* genes was carried out with next generation sequencing on the Ion Torrent PGM. To identify extended deletions in *NF1* and *NF2* genes MLPA method was used. In a sample of 200 patients, mutations in *NF1* and *NF2* genes were detected in 48.5% of cases. MLPA technique has allowed us to identify deletions in the *NF1* gene in 14 out of 100 patients tested. In case of detection of a mutation in a patient with neurofibromatosis, carrier status exclusion or confirmation in close relatives, and early diagnosis.

Keywords: neurofibromatosis, medical technology, NGS, MLPA.