

Соматический мозаицизм при спорадической ретинобластоме

Алексеева Е.А.^{1,2}, Карандашева К.О.¹, Бабенко О.В.¹, Козлова В.М.³,
Ушакова Т.Л.³, Казубская Т.П.³, 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, д. 1

2 — ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства
здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)
119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

3 — ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения
Российской Федерации
115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24

Введение. Спорадическая ретинобластома развивается в результате мутаций *de novo* в обоих аллелях гена *RB1* в клетках сетчатки глаза. При спорадической ретинобластоме первоначальная мутация в гене *RB1* нередко является мозаичной, то есть образуется в постзиготической ранней эмбриональной клетке, что приводит к неравномерному распределению мутантных клонов между различными тканями организма. Возможность идентифицировать мозаичный вариант мутации в гене *RB1* имеет значение как для медико-генетического консультирования, так и для клинического ведения пациентов, поскольку мозаицизм влияет на развитие клинической картины заболевания, риск развития опухоли в другом глазу и других опухолей и на риск передачи мутации следующему поколению.

Цель: установить частоту и спектр постзиготических мозаичных мутаций в гене *RB1* в выборке больных со спорадической ретинобластомой, определить содержание мутантного аллеля в образцах с мозаицизмом.

Метод. Исследование проведено на материале ДНК лимфоцитов крови больных со спорадической ретинобластомой. Скрининг точковых мутаций, малых инсерций/делеций в гене *RB1* осуществляли методом полупроводникового высокопроизводительного параллельного секвенирования (ВПС). Исключение протяженных делеций в гене *RB1* проводили методом MLPA. Для поиска мозаичных мутаций с очень низким содержанием (менее 10%) мутантного аллеля был разработан и проведен углубленный анализ данных ВПС, основанный на биоинформатических и статистических подходах. Для верификации выявленных мозаичных патогенных мутаций использовали секвенирование ДНК по Сэнгеру.

Результаты. В исследованной выборке больных со спорадической унилатеральной формой ретинобластомы мозаичные мутации встречаются чаще, чем при спорадической билатеральной форме; различия статистически достоверны. В то же время, частоты мозаичных мутаций с высокой и низкой представленностью мутантных аллелей между группами больных с унилатеральной и билатеральной ретинобластомой достоверно не различаются. Все мозаичные мутации, представлены нуль-аллелями; мозаичных миссенс-мутаций в нашей выборке не обнаружено. Не выявлено мозаичных мутаций в 1-м и 2-м экзонах гена *RB1*, расположенных проксимальнее альтернативного промотора, импринтинг которого определяет пенетрантность мутаций в зависимости от родительского происхождения мутантного аллеля.

Заключение. Применение глубокого ВПС в сочетании с усовершенствованным алгоритмом анализа результатов, направленным на выявление мозаичных мутаций, повышает эффективность ДНК-диагностики ретинобластомы, способствуя совершенствованию медико-генетического консультирования и лечения больных.

Ключевые слова: спорадическая ретинобластома, *RB1*, соматический мозаицизм, высокопроизводительное параллельное секвенирование ДНК.

Для цитирования: Алексеева Е.А., Карандашева К.О., Бабенко О.В., Козлова В.М., Ушакова Т.Л., Казубская Т.П., Танас А.С., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. Соматический мозаицизм при спорадической ретинобластоме. *Медицинская генетика* 2021; 20(4): 9-18.

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.04.9-18

Автор для корреспонденции: Стрельников Владимир Викторович; **e-mail:** vstrel@list.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «МГНЦ» на выполнение НИР в 2021 году. Высокопроизводительное секвенирование ДНК выполнено на оборудовании Центра коллективного пользования (ЦКП) «Геном» ФГБНУ «МГНЦ».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Поступила: 23.03.2021.

Somatic mosaicism in sporadic retinoblastoma

Alekseeva E.A.^{1,2}, Karandasheva K.O.¹, Babenko O.V.¹, Kozlova V.M.³,
Ushakova T.L.³, Kazubskaya T.P.³, Tanas A.S.¹, Zaletaev D.V.^{1,2}, Strelnikov V.V.¹

1 — Research Centre for Medical Genetics

Moskvorechye str.1, Moscow, 115522, Russian Federation

2 — I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University)

Trubetskaya str. 8, Moscow, 119991, Russian Federation

3 — N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation

Kashirskoe highway, 24, Moscow, 115478, Russian Federation

Background. Sporadic retinoblastoma develops as a result of *de novo* mutations in both alleles of the *RB1* gene. Often in sporadic retinoblastoma, the initial mutation in *RB1* is mosaic, that is, it is formed in a postzygotic, early embryonic cell, which leads to an uneven distribution of mutant clones between different tissues of the body. The ability to identify a mosaic variant of a mutation in the *RB1* gene is important for both medical genetic counseling and clinical management of patients, since mosaicism affects the development of the clinical picture of the disease, the risk of developing a tumor in the other eye, as well as other tumors, and the risk of mutation transmission to the next generation.

Aim: to establish the frequency and spectrum of somatic mosaic mutations in the *RB1* gene in patients with sporadic retinoblastoma and to quantify the content of the mutant allele in cases with mosaicism.

Methods. The study was carried out on the DNA of blood lymphocytes from patients with sporadic retinoblastoma. Screening of point mutations, small insertions/deletions in the *RB1* gene was performed by semiconductor high-throughput parallel sequencing (NGS). Exclusion of gross deletions in the *RB1* gene was performed by MLPA. To search for mosaic mutations with a very low representation (less than 10%) of the mutant allele, an in-depth analysis of the NGS data was developed an in-house algorithm based on bioinformatic and statistical approaches. To verify mosaic pathogenic mutations identified with NGS, Sanger sequencing was used.

Results. Mosaic mutations were found more common among patients with sporadic unilateral form of retinoblastoma than in those with sporadic bilateral form; the differences are statistically significant. At the same time, the frequencies of mosaic mutations with a high and low representation of mutant alleles between the groups of patients with unilateral and bilateral retinoblastoma did not differ significantly. All mosaic mutations are null alleles; mosaic missense mutations were not found in our patients' cohort. No mosaic mutations were detected in the 1st and 2nd exons of the *RB1* gene, located proximal to the alternative promoter, the imprinting of which determines the penetrance of mutations depending on the parental origin of the mutant allele.

Conclusion. The use of deep high-throughput parallel sequencing in combination with an improved algorithm for analyzing the NGS results, aimed at identifying mosaic mutations, increases the efficiency of DNA diagnostics of retinoblastoma, contributing to the improvement of medical genetic counseling and treatment of patients.

Keywords: sporadic retinoblastoma, *RB1*, somatic mosaicism, NGS.

For citation: Alekseeva E.A., Karandasheva K.O., Babenko O.V., Kozlova V.M., Ushakova T.L., Kazubskaya T.P., Tanas A.S., Zaletaev D.V., Strelnikov V.V. Somatic mosaicism in sporadic retinoblastoma. *Meditinskaya genetika [Medical genetics]* 2021; 20(4): 9-18. (In Russ.).

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.04.9-18

Corresponding author. Vladimir V. Strelnikov; e-mail: vstrel@list.ru

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

Conflict of interest. The authors declare no conflicts of interest.

Accepted: 23.03.2021.

Ретинобластома — наиболее распространенная детская интраокулярная злокачественная опухоль сетчатки глаза, возникающая с частотой 1:15000–20000 новорожденных. Основной молекулярной причиной развития ретинобластомы является биллельная инактивация супрессорного гена *RB1* в клетках опухоли [1, 2].

Примерно у 60% пациентов с ретинобластомой выявляется спорадическая (ненаследственная) форма заболевания, при которой обе мутации в гене *RB1* являются соматическими. При наследственной ретинобластоме, обнаруживаемой примерно в 40% случаев, герминальная мутация в одном из аллелей гена

RB1 обуславливает предрасположенность к заболеванию, а развитие опухоли инициируется соматической мутацией в другом аллеле гена в клетке сетчатки, которая случается внутриутробно или в раннем детстве. Наследственная форма ретинобластомы передается по аутосомно-доминантному типу, манифестирует, как правило, в первый год жизни и носит в большинстве случаев мультифокальный и билатеральный характер. Дополнительно, больные с наследственной формой заболевания подвержены повышенному риску развития опухолей другой локализации [3, 4]. Герминальная мутация в одном из аллелей гена *RB1*, которая присутствует во всех клетках организма, может

быть унаследована от одного из родителей (семейная форма) или образоваться в процессе гаметогенеза [5].

Соматический мутационный мозаицизм является общей чертой моногенных заболеваний, особенно тех, для которых характерна высокая частота возникновения мутаций *de novo* [6]. Соматический мозаицизм возникает в результате мутации в постзиготической ранней эмбриональной клетке и характеризуется присутствием мутантного клона в части клеток организма и неравномерным распределением этого клона между различными тканями, включая сетчатку, лимфоциты и гонады. Распределение мутантного клона в организме имеет значение для генетического консультирования, в особенности при поражении гонад [5, 7]. Частота соматического мозаицизма, выявляемого различными группами авторов, при билатеральной ретинобластоме варьирует от 5,5% до 30% [5–7], а при унилатеральной форме заболевания — от 3,8% до 38% [5, 8–10]. Такие различия в частотах связаны с использованием различных подходов для определения мозаицизма, а также с размерами изучаемых выборок пациентов с ретинобластомой.

Детекция мозаичных мутаций и количественная оценка содержания мутантного клона имеют значение для генетического консультирования, поскольку при мозаичной форме имеет место риск развития опухоли в другом глазу, а также опухолей другой локализации и передачи мутации следующему поколению. Кроме того, в настоящее время количественное содержание мутантного клона связывают с возрастом дебюта заболевания и его прогрессией [5]. Соматический мозаицизм при ретинобластоме может быть причиной фенотипической вариабельности проявления одной и той же мутации у различных членов семьи [3].

Выявление соматического мозаицизма долго оставалось сложной задачей. Недооценка частоты мозаичных мутаций при ретинобластоме связана, главным образом, с ограниченной чувствительностью методов, традиционно использовавшихся для поиска мутаций в гене *RB1* [2]. «Золотой стандарт» в диагностике ретинобластомы — секвенирование гена *RB1* по Сэнгеру — позволяет надёжно идентифицировать мутантный минорный аллель с представленностью не менее 15%, что ограничивает возможности ДНК-диагностики у пациентов с соматическим мозаицизмом [5, 8]. Кроме того, секвенирование по Сэнгеру является полуколичественным методом, который не позволяет определять точное содержание мутантного минорного клона в исследуемом материале [5].

Альтернативный высокочувствительный метод детекции мутаций, такой как аллель-специфическая ПЦР, может быть использован для выявления моза-

ичных мутаций в образцах с низким содержанием мутантного клона [8, 9]. Однако он ограничен изучением наиболее частых мутаций в гене *RB1* и не может быть использован для полного скрининга всех изменений в гене, особенно в случае ретинобластомы, при которой очень высока частота уникальных мутаций [5].

Высокопроизводительное параллельное секвенирование ДНК (ВПС) позволяет с большей чувствительностью и точностью определить аллельную частоту генетических вариантов, что делает поиск соматического мозаицизма, даже низкого уровня, эффективным при различных заболеваниях, в том числе при ретинобластоме [2, 5, 7, 8, 11–13].

Цель работы: охарактеризовать частоту и спектр мозаичных мутаций в гене *RB1* в выборке больных со sporadic ретинобластомой, определить содержание мутантного аллеля в образцах с мозаицизмом.

Материалы и методы

Клинический материал

Исследование проведено на материале ДНК лимфоцитов крови, полученном от 343 неродственных больных со sporadic ретинобластомой, наблюдавшихся в ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина», среди которых 223 пациента с унилатеральной формой заболевания и 120 — с билатеральной.

Скрининг однонуклеотидных замен и коротких инсерций/делеций

Поиск точковых мутаций, малых инсерций/делеций в гене *RB1* осуществляли методом ВПС на приборах Ion Torrent PGM или Ion S5 (Life Technologies, США). Интерпретацию патогенности выявленных генетических вариантов проводили согласно отечественному руководству [14]. В качестве референсной последовательности транскрипта *RB1* использовали NM_000321. С целью верификации выявленных изменений применяли секвенирование по Сэнгеру с предварительной амплификацией целевых фрагментов методом ПЦР.

Скрининг протяженных делеций

Поиск протяженных делеций в гене *RB1* проводили методом MLPA (MRC-Holland, Нидерланды).

Выделение ДНК, ВПС гена *RB1*, секвенирование по Сэнгеру с целью верификации выявленных точковых мутаций, анализ протяженных делеций гена *RB1* проводили в полном соответствии с ранее разработанной авторами медицинской технологией комплексной ДНК-диагностики ретинобластомы [15].

При обнаружении молекулярного изменения в гене *RB1* у пробанда образцы ДНК родителей также исследу-

довали на наличие идентифицированной молекулярной патологии методом секвенирования по Сэнгеру или методом MLPA в зависимости от выявленного изменения.

Биоинформатический и статистический анализ

Биоинформатический анализ данных ВПС осуществляли при помощи программного обеспечения Torrent Suite v.5.10: для картирования прочтений использовали модуль Torrent Mapping Alignment Program (TMAP) map4 и сборку референсного генома GRCh37 (hg19), для поиска генетических вариантов — Torrent Variant Caller (TVC). Для увеличения чувствительности TVC в отношении мозаичных генетических вариантов исключали неверно картированные прочтения и использовали параметры TVC, рекомендованные для поиска соматических мутаций [16].

Достоверность различий частот генетических вариантов в группах больных оценивали точным тестом Фишера.

Результаты и обсуждение

Мозаичные мутации, выявленные в группе больных с билатеральной формой ретинобластомы

В настоящей работе с помощью комплексного подхода, включающего ВПС и MLPA, проведен анализ 120 образцов ДНК лимфоцитов, полученных от пациентов с билатеральной формой ретинобластомы. В исследованной группе патогенные измене-

ния в гене *RB1* обнаружены в 95% (114/120) случаев, в том числе у 7 из 120 больных выявлен мозаичный вариант мутации (табл. 1). Таким образом, доля мозаичных мутаций среди всех выявленных в этой группе патогенных генетических вариантов составила 6% (7/114).

Мозаичные мутации, выявленные при билатеральной форме ретинобластомы, были подтверждены методом секвенирования по Сэнгеру (рис. 1). Следует отметить, что секвенограмма на рис. 1В демонстрирует пример сложности дифференцировки мозаичной мутации с низким содержанием мутантного аллеля от «технического шума» по результатам секвенирования по Сэнгеру без данных ВПС.

Мозаичные мутации, выявленные в группе больных с унилатеральной формой ретинобластомы

В группе пациентов с унилатеральной формой ретинобластомы с помощью комплексного подхода патогенные молекулярные изменения в гене *RB1* выявлены в 20% (44/223) случаев в гетерозиготном состоянии, в том числе, соматический мозаицизм обнаружен у 8% (17/223) больных (табл. 2). Доля мозаичных мутаций среди всех выявленных патогенных генетических вариантов в этой группе составила 39% (17/44), то есть среди больных со sporadической унилатеральной формой РБ мозаичные мутации встречаются в 6,5 раз чаще, чем при sporadической билатеральной форме; различия статистически достоверны ($p < 0,00001$).

Таблица 1

Патогенные мозаичные мутации в гене *RB1*, выявленные методом ВПС в группе больных с билатеральной ретинобластомой

№ пациента	Геномные координаты	Номенклатура мутации	Частоты аллелей	Манифестация
446	chr13:48923090	интрон 5 / экзон 6: c.540-2A>G	A:61%, G:39%	10 месяцев
453	chr13:49039341	экзон 23: c.2326delC:p.P776fs	дт:80% дел.:20%	3 недели
505	chr13:48916765-48916766	Exon 3: c.295_296del:p.W99fs	дт:90%, дел.:10%	н/д
524	chr13:48916753	Exon 3: c.A283T:p.K95*	A:79%, T:21%	н/д
574	chr13:48954327-48954328	экзон 16: c.1448_1449del:p.H483fs	дт:78%, дел.:21%	н/д
593	chr13:49030378	экзон 19: c.1853delC:p.S618*	дт:82%, дел.:18%	н/д
661	chr13:448953730	экзон 14: c.C1333T:p.R445*	C:85%, T:15%	н/д

Примечание: н/д — нет данных; дт — дикий тип; дел — делеция.

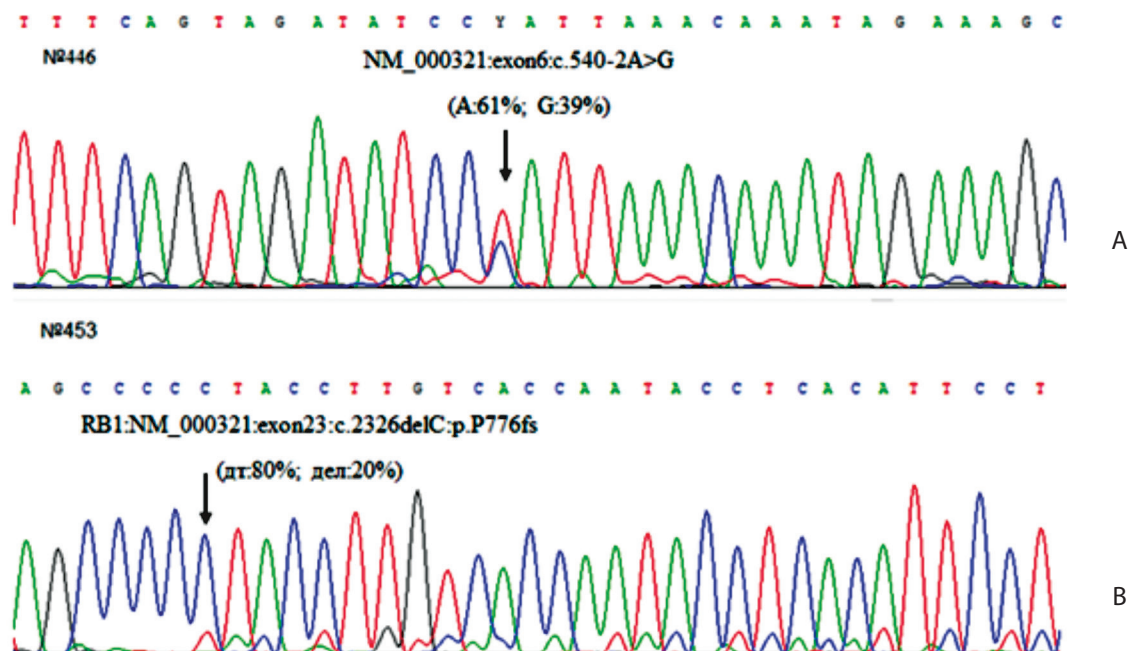


Рис. 1. Примеры секвенограмм по Сэнгеру образцов ДНК, в которых при ВПС был выявлен соматический мозаицизм.

Таблица 2

Патогенные мозаичные мутации, выявленные методом ВПС в группе больных с унилатеральной ретинобластомой

№ пациента	Геномные координаты	Номенклатура мутации	Частоты аллелей	Манифестация
386	chr13:48953760	экзон 14:c.C1363T:p.R455*	C:80%, T:20%	6 месяцев
378	chr13:49039405	экзон 23:c.T2390A:p.L797*	T:85%, A:15%	н/д
448	chr13:48953760	экзон 14:c.C1363T:p.R455*	C:74%, T:26%	1 год 8 месяцев
455	chr13:48941648	экзон 10:c.C958T:p.R320*	C:80%, T:20%	3 года
464	chr13:48881512	экзон 2: c.G234A:p.W78*	G:71%, T:29%	3 месяца
470	chr13:48936983	экзон 8: c.C751T:p.R251*	C:84%, T:16%	3 месяца
498	chr13:48947629	экзон 12: c.1215+1G>A	G:87%, A:13%	1 год 8 месяцев
499	chr13:49027168	экзон 18: c.C1735T:p.R579*	C:79%, T:21%	8 месяцев
506	chr13:49039405	экзон 15: c.C1399T:p.R467*	C:80%, T:20%	н/д
521	chr13:48942685	экзон 11: c.C1072T:p.R358*	C:76%, T:24%	н/д
526	chr13:48942685	экзон 11: c.C1072T:p.R358*	C:83%, T:17%	н/д
592	chr13:48942685	экзон 11: c.C1072T:p.R358*	C:66%, T:34%	н/д
599	chr13:48953760	экзон 14: c.C1363T:p.R455*	C:88%, T:12%	н/д
604	chr13:48942685	экзон 11: c.C1072T:p.R358*	C:86%, T:14%	н/д
607	chr13:48954221-48954238	экзон 15: c.1421+1_1421+18del	дт:80%, дел:20%	н/д
615	chr13:49030460-49030461	экзон 19: c.1935_1936del:p.T645fs	дт:78%, дел:22%	н/д
666	chr13:49039157-49039161	экзон 22: c.2235_2239del:p.K745fs	дт:85%, дел:15%	н/д

Примечание: н/д — нет данных; дт — дикий тип; дел — делеция.

Углубленный биоинформатический анализ данных ВПС

Суммарно в исследованной группе пациентов со спорадической ретинобластомой, включающей как билатеральную, так и унилатеральную формы заболевания, частота мутаций в мозаичном варианте составила 7% (24/343). Как уже было описано ранее, частота соматического мозаицизма, выявляемого разными группами исследователей, при различных формах ретинобластомы сильно варьирует. Разница в результатах, как правило, связана с использованием различных методик определения мозаицизма, а также с различиями размеров изучаемых выборок. Как правило, исследования, выполненные до эры широкого использования ВПС, выявляли соматический мозаицизм в меньшем проценте случаев, что связано с ограничением чувствительности используемых методик [5, 8–10]. Так Rushlow D. с соавт. методом аллель-специфической ПЦР определили мозаицизм в группе больных с билатеральной формой ретинобластомы в 5,5% (23/421) случаев, а в группе больных с унилатеральной формой заболевания — в 3,8% (22/572) [9]. В работе Chen Z. с соавт. методом ВПС было выявлено 30% (6/20) случаев мозаичных мутаций с низким содержанием мутантного клона при билатеральной форме заболевания и 6% (4/70) при унилатеральной ретинобластоме. Однако полученные Chen Z. с соавт. относительно высокие значения частоты мозаицизма связаны с включением в расчет не всей выборки больных, а только тех, у которых ранее секвенирование по Сэнгеру не выявило мутаций в гене *RBI* [8].

Мы провели углубленный биоинформатический анализ данных ВПС 185 пациентов, среди которых 6 — с билатеральной формой ретинобластомы и 179 — с уни-

латеральной, у которых в ДНК периферической крови нами не было выявлено патогенных генетических вариантов стандартным анализом ВПС. Биоинформатический анализ включал разделение прочтений в соответствии с принадлежностью пулу праймеров и исключение нуклеотидных последовательностей, картированных вне таргетных участков, предопределенных дизайном эксперимента, что позволяет снизить вклад нецелевой амплификации и ошибок картирования в оценку аллельной частоты генетических вариантов [16]. Генетические варианты, наблюдаемые в исследуемой выборке систематически, исключили, расценивая их как ошибки секвенирования, обусловленные используемой технологической платформой или дизайном панели праймеров, также исключили и распространенные в популяции непатогенные полиморфизмы.

В результате дополнительного анализа в исследованной группе пациентов выявлено 2% (1/6) и 3% (6/179) случаев мозаичных патогенных мутаций с низким содержанием мутантного аллеля при билатеральной и унилатеральной формах ретинобластомы, соответственно (табл. 3).

Выявленные с помощью углубленного биоинформатического анализа мозаичные мутации не были подтверждены методом секвенирования по Сэнгеру, поскольку чувствительность метода не позволяет детектировать мозаичный аллель с содержанием менее 15% от общего числа аллелей [17].

Мутация в образце 569 была также определена методом ВПС группой исследователей из Израиля (личное сообщение).

Таким образом, в исследованной группе больных с ретинобластомой частота соматического мозаицизма при билатеральной форме заболевания определена в 7% (8/120) случаев и при унилатеральной фор-

Таблица 3

Патогенные мозаичные мутации с низким содержанием мутантного аллеля, выявленные в группе больных со спорадической ретинобластомой усовершенствованным алгоритмом анализа результатов ВПС

№ пациента	Геномные координаты	Номенклатура мутации	Частоты аллелей	Форма
476	chr13:48953760	экзон 14: с.С1363Т:р.Р455*	С:96%, Т:4%	Билатеральная
569	chr13:48955550	экзон 17: с.С1666Т:р.Р556*	С:98%, Т:2%	Унилатеральная
582	chr13:49039134	экзон 22: с.А2212Г:р.Т738А (сайт сплайсинга)	Т:98%, А:2%	Унилатеральная
616	chr13:48954187	экзон 15: с.1390-2insTC	дт:98%, инс.:2%	Унилатеральная
630	chr13:48936983	экзон 8: с.С751Т:р.Р251*	С:96%, Т:4%	Унилатеральная
657	chr13:48953760	экзон 14: с.С1363Т:р.Р455*	С:94%, Т:6%	Унилатеральная
668	chr13:48953760	экзон 19: с.1815-3Т>С	Т:99%, С:1%	Унилатеральная

Примечание: н/д — нет данных; дт — дикий тип; дел — делеция; инс — инсерция.

ме – в 10% (23/223) случаев. Суммарно частота соматических мутаций в гене *RB1* в исследованной группе больных со спорадической ретинобластомой составила 9% (31/343).

Мозаичные мутации, выявленные у родителей пациентов с РБ

Нами были также проанализированы методом секвенирования по Сэнгеру 280 образцов ДНК лимфоцитов крови родителей пациентов со спорадической ретинобластомой, у которых были выявлены патогенные мутации в гене *RB1*. Среди исследованных семей выявлено 2 случая бессимптомного носительства мутации в мозаичном варианте в гене *RB1* одним из родителей (**рис. 2 и 3**). Таким образом, наши результаты подтверждают, что соматический мозаицизм является одной из причин фенотипической варибельности проявления одинаковой мутации у разных членов родословной [3], а также подтверждают повышенный риск развития ретинобластомы у потомков носителей мозаичных мутаций.

Можно предположить, что частота носительства мозаичной мутации в гене *RB1* одним из родителей выше, чем показано в нашем и некоторых других исследованиях, поскольку методом секвенирования по Сэнгеру сложно, во-первых, дифференцировать мозаицизм с высоким содержанием мутантного аллеля и гетеро-

зиготность, а, во-вторых, выявить мозаичные мутации с очень низким (менее 15%) содержанием мутантного аллеля [17]. Возможно, в целях совершенствования медико-генетического консультирования следует изучить вопрос о целесообразности использования ВПС для исключения носительства мозаичных мутаций бессимптомными родителями, у которых методом секвенирования по Сэнгеру не выявляются мутации, приводящие к развитию ретинобластомы у пробандов.

*Спектр мозаичных мутаций в гене *RB1**

Все мозаичные мутации в гене *RB1*, выявленные в настоящем исследовании, представлены нуль-аллелями: это nonsense-мутации, мутации сдвига рамки считывания и мутации сайтов сплайсинга. Мозаичных missense-мутаций в нашей выборке не обнаружено. Кроме того, не выявлено мозаичных мутаций в 1-м и 2-м экзонах гена *RB1*, расположенных проксимальнее альтернативного промотора, импринтинг которого определяет пенетрантность мутаций этого гена в зависимости от родительского происхождения мутантного аллеля [18]. Возможно, перечисленные характеристики выявленных мозаичных мутаций, отличающие их от истинно гетерозиготных мутаций у больных с ретинобластомой [15], обусловлены эффектом наблюдателя. Missense-мутации и мутации в 1-м и 2-м экзонах гена *RB1*, возникающие сома-

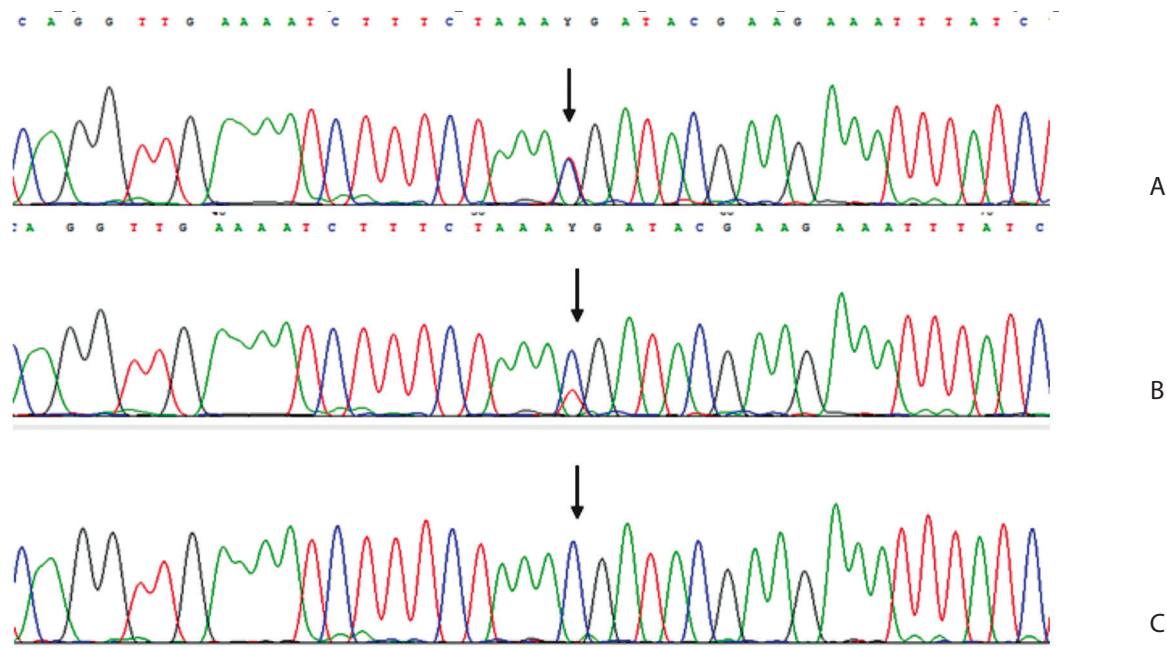


Рис. 2. Секвенограммы по Сэнгеру образцов ДНК членов семьи с отцом, являющимся бессимптомным носителем мозаичной мутации *RB1*:NM_000321:exon10:c.C958T:p.R320X (№327). А: пробанд; В: отец; С: нормальный контроль.

тически в аллеле отцовского происхождения, могут не проявляться фенотипически вследствие эффекта геномного импринтинга, и носители таких мутаций не попадают в поле зрения врачей офтальмологов и онкологов.

Фенотипическое проявление мозаичных мутаций в гене *RB1*

В исследованной выборке пациентов с ретинобластомой с выявленным соматическим мозаицизмом в гене *RB1* частота случаев с высоким содержанием мутантного аллеля составила 67% (21/31), в том числе 19% (6/31) при билатеральной форме заболевания и 48% (15/31) при унилатеральной. Мутации с низким содержанием мутантного аллеля выявлены в 32% (10/31) случаев, в том числе 3% (1/31) при билатеральной ретинобластоме и 29% (9/31) — при унилатеральной. Различия частот мозаичных мутаций с высоким и низким содержанием мутантного аллеля в группах больных с унилатеральной и билатеральной ретинобластомой статистически недостоверны ($p=0,38$).

В исследованной группе пациентов выводов относительно взаимосвязи наличия мутации в гене *RB1*

и возраста манифестации заболевания сделать невозможно в связи с отсутствием достаточного количества информации. В исследовании других авторов показана достоверная корреляция между более поздним возрастом постановки диагноза и наличием мозаичной мутации в гене *RB1* с низким содержанием мутантного клона [5].

Заключение

Полученные результаты подтверждают эффективность использования ВПС для выявления соматических мозаичных мутаций в гене *RB1*, которые имеют значение для медико-генетического консультирования в отношении прогноза развития болезни, передачи следующему поколению и развития опухолей другой локализации. Возможность идентифицировать мозаичные мутации даже с очень низким содержанием мутантного клона позволяет выявлять генетическую причину развития ретинобластомы у пациентов, которые ранее при использовании секвенирования по Сэнгеру оставались без молекулярного диагноза. Кроме того, способность ВПС определять точное содержание мутантного аллеля полезна для дифференциации мо-

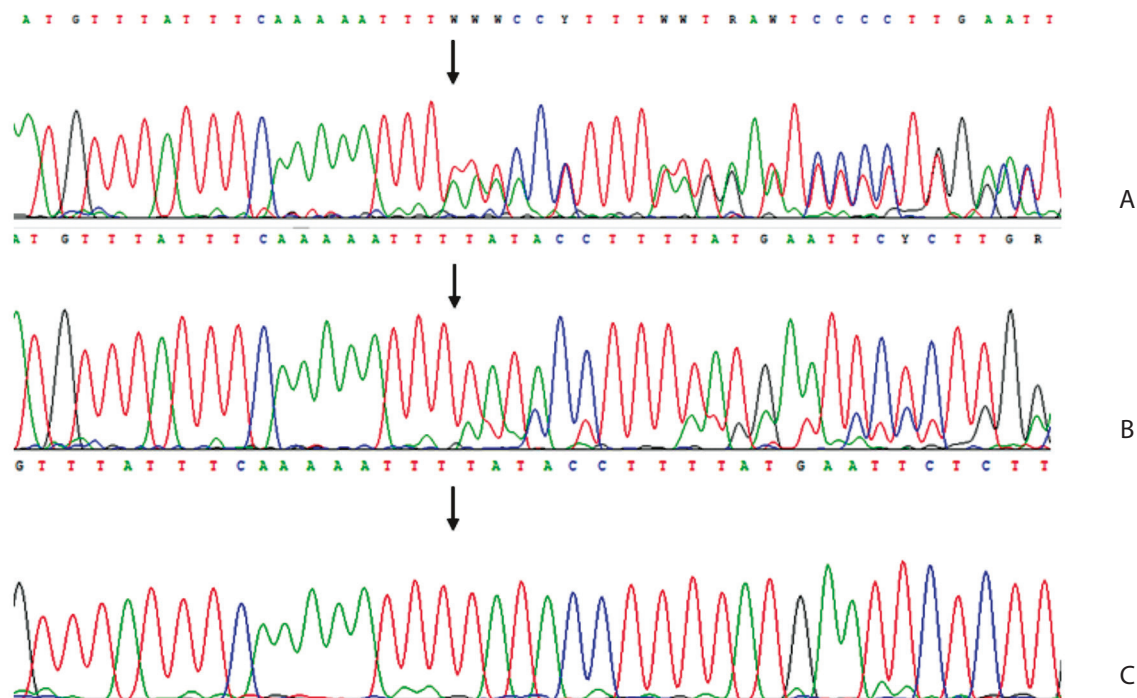


Рис. 3. Секвенограммы по Сэнгеру образцов ДНК членов семьи с матерью, являющейся бессимптомным носителем мозаичной мутации *RB1*:NM_000321:exon9:c.887delT:p.F296fs (№482). А: пробанд; В: мать; С: нормальный контроль.

заичных мутаций с высоким содержанием мутантного клона от истинной гетерозиготности, что важно с точки зрения медико-генетического консультирования. Поскольку пробанд с мозаичной мутацией наследует мутантный аллель от своих родителей, такие родители имеют общепопуляционный риск рождения детей с ретинобластомой. Также, выявление у пробанда мутации в гене *RB1* в мозаичном варианте означает отсутствие необходимости проведения молекулярно-генетического исследования сибсов.

Литература

- Babenko O.V., Zemlyakova V.V., Saakyan S.V., Brovkina A.F., Strel'nikov V.V., Zaletaev D.V., Nemtsova M.V. RB1 and CDKN2A functional defects resulting in retinoblastoma. *Molecular Biology*. 2002; 36(5): 625–630. doi:10.1023/A:1020607010296.
- Amitrano S., Marozza A., Somma S., Imperatore V., Hadjistilianou T., De Francesco S. et al. Next generation sequencing in sporadic retinoblastoma patients reveals somatic mosaicism. *Eur J Hum Genet*. 2015; Nov 23(11): 1523–30. doi: 10.1038/ejhg.2015.6.
- Imperatore V., Pinto A.M., Gelli E., Trevisson E., Morbidoni V., Fullanti E. et al. Parent-of-origin effect of hypomorphic pathogenic variants and somatic mosaicism impact on phenotypic expression of retinoblastoma. *Eur J Hum Genet*. 2018; Jan 26(7):1026–1037. doi: 10.1038/s10038-019-0696-z.
- Lohmann D.R., Gallie B.L. Retinoblastoma. *GeneRev* [Internet]. Last update november 21, 2018.
- Rodriguez-Martin C., Robledo C., Gomez-Mariano G., Monroz S., Sastre A., Abelairas J. et al. Frequency of low-level and high-level mosaicism in sporadic retinoblastoma: genotype-phenotype relationships. *J Hum Genet*. 2020; Jan 65(2):165–174. doi: 10.1038/s10038-019-0696-z.
- Biesecker L.G., Spinner N.B. A genomic view of mosaicism and human disease. *Nat Rev Genet*. 2013; May 14(5):307–320. doi:10.1038/nrg3424.6
- Dehainault C., Golmard L., Millot G.A., Charpin A., Lauge A., Tarabeux J. et al. Mosaicism and prenatal diagnosis options: insights from retinoblastoma. *Eur J Hum Genet*. 2017; Feb 25(3):381–383. doi: 10.1038/ejhg.2016.174. Epub 2016 Dec 21.
- Chen Z., Moran K., Richrds-Yutz J., Torrens E., Gerhart D., Ganguly T. et al. Enhanced Sensitivity for Detection of Low-Level Germline Mosaic *RB1* Mutations in Sporadic Retinoblastoma Cases Using Deep Semiconductor Sequencing. *Hum Mutat*. 2014; Mar 35(3): 384–391. doi:10.1002/humu.22488.
- Rushlow D., Piovesan B., Zhang K., Prigoda-Lee N.L., Marchong M.N., Clark R.D. et al. Detection of mosaic *RB1* mutations in families with retinoblastoma. *Hum Mutat*. 2009; 30: 842–851. doi:10.1002/humu.20940.
- Price E., Price K., Kolkiewicz K., Hack S., Reddy M.A., Hungerford J.L., et al. Spectrum of RB1 mutations identified in 403 retinoblastoma patients. *J Med Genet*. 2014; 51: 208–14. doi:10.1136/jmed-genet-2013-101821.
- Cohen A.S., Wilson S.L., Trinh J., Ye X.C. Detecting somatic mosaicism: considerations and clinical implications. *Clin Genet*. 2015; 87:554–62. doi:10.1111/cge.12502.
- Pagnamenta A.T., Lise S., Harrison V., Stewart H., Jayawant S., Quaghebeur G. et al. Exome sequencing can detect pathogenic mosaic mutations present at low allele frequencies. *J Hum Genet*. 2012; 57:70–2. doi:10.1038/jhg.2011.128. Epub 2011 Dec 1.
- Li W.L., Buckley J., Sanchez-Lra P.A., Maglinte D.T., Viduetsky L., Tatarinova T.V. et al. A Rapid and Sensitive Next-Generation Sequencing Method to Detect *RB1* Mutations Improves Care for Retinoblastoma Patients and Their Families. *J Mol Diagn*. 2016; Jul 18(4):480–493. doi: 10.1016/j.jmoldx.2016.02.006.
- Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б., Коновалов Ф.А., Масленников А.Б., Степанов В.А., Афанасьев А.А., Залязминская Е.В., Ребриков Д.В., Савостьянов К.В., Глотов А.С., Костарева А.А., Павлов А.Е., Голубенко М.В., Поляков А.В., Куцев С.И. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2). *Медицинская генетика*. 2019; 18(2):3–23.
- Алексеева Е.А., Бабенко О.В., Козлова В.М., Ушакова Т.Л., Саакян С.В., Танас А.С. и др. Результаты использования новой медицинской технологии комплексной ДНК-диагностики ретинобластомы. *Медицинская генетика* 2017; 16(10): 41–46.
- Карандашева К.О., Аношкин К.И., Володин И.В., Кузнецова Е.Б., Залетаев Д.В., Стрельников В.В., Танас А.С. Исключение неверно картированных прочтений при таргетном высокопроизводительном секвенировании ДНК с использованием технологии Ion AmpliSeq. *Медицинская генетика*. 2018; 17(5):19–22. doi: 10.25557/2073-7998.2018.05.19-22.
- Rohlin, A., Wernersson, J., Engwall, Y., Wiklund, L., Björk, J., & Nordling, M. (2009). Parallel sequencing used in detection of mosaic mutations: comparison with four diagnostic DNA screening techniques. *Human mutation*, 30(6), 1012–1020. doi: 10.1002/humu.20980.
- Алексеева Е.А., Бабенко О.В., Козлова В.М., Ушакова Т.Л., Казубская Т.П., Саакян С.В., Танас А.С., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. Эффект родительского происхождения мутации в гене *RB1* при наследственной ретинобластоме с низкой пенетрантностью. *Медицинская генетика*. 2019; 18(8):21–28. doi: 10.25557/2073-7998.2019.08.21-28.

References

- Babenko O.V., Zemlyakova V.V., Saakyan S.V., Brovkina A.F., Strel'nikov V.V., Zaletaev D.V., Nemtsova M.V. RB1 and CDKN2A functional defects resulting in retinoblastoma. *Molecular Biology*. 2002; 36(5): 625–630. doi:10.1023/A:1020607010296.
- Amitrano S., Marozza A., Somma S., Imperatore V., Hadjistilianou T., De Francesco S. et al. Next generation sequencing in sporadic retinoblastoma patients reveals somatic mosaicism. *Eur J Hum Genet*. 2015; 23(11): 1523–30. doi: 10.1038/ejhg.2015.6.
- Imperatore V., Pinto A.M., Gelli E., Trevisson E., Morbidoni V., Fullanti E. et al. Parent-of-origin effect of hypomorphic pathogenic variants and somatic mosaicism impact on phenotypic expression of retinoblastoma. *Eur J Hum Genet*. 2018; Jan 26(7):1026–1037. doi: 10.1038/s10038-019-0696-z.
- Lohmann D.R., Gallie B.L. Retinoblastoma. *GeneRev* [Internet]. Last update november 21, 2018.
- Rodriguez-Martin C., Robledo C., Gomez-Mariano G., Monroz S., Sastre A., Abelairas J. et al. Frequency of low-level and high-level mosaicism in sporadic retinoblastoma: genotype-phenotype relationships. *J Hum Genet*. 2020; Jan 65(2):165–174. doi: 10.1038/s10038-019-0696-z.
- Biesecker L.G., Spinner N.B. A genomic view of mosaicism and human disease. *Nat Rev Genet*. 2013; May 14(5):307–320. doi:10.1038/nrg3424.6
- Dehainault C., Golmard L., Millot G.A., Charpin A., Lauge A., Tarabeux J. et al. Mosaicism and prenatal diagnosis options: insights from retinoblastoma. *Eur J Hum Genet*. 2017; Feb 25(3):381–383. doi: 10.1038/ejhg.2016.174. Epub 2016 Dec 21.

8. Chen Z., Moran K., Richrds-Yutz J., Torrens E., Gerhart D., Gan-guly T. et al. Enhanced Sensitivity for Detection of Low-Level Germline Mosaic *RB1* Mutations in Sporadic Retinoblastoma Cases Using Deep Semiconductor Sequencing. *Hum Mutat.* 2014; Mar 35(3): 384–391. doi:10.1002/humu.22488.
9. Rushlow D., Piovesan B., Zhang K., Prigoda-Lee N.L., Marchong M.N., Clark R.D. et al. Detection of mosaic *RB1* mutations in families with retinoblastoma. *Hum Mutat.* 2009; 30: 842–851. doi:10.1002/humu.20940.
10. Price E., Price K., Kolkiewicz K., Hack S., Reddy M.A., Hungerford J.L., et al. Spectrum of *RB1* mutations identified in 403 retinoblastoma patients. *J Med Genet.* 2014;51: 208–14. doi:10.1136/jmed-genet-2013-101821.
11. Cohen A.S., Wilson S.L., Trinh J., Ye X.C. Detecting somatic mosaicism: considerations and clinical implications. *Clin Genet.* 2015;87:554–62. doi:10.1111/cge.12502.
12. Pagnamenta A.T., Lise S., Harrison V., Stewart H., Jayawant S., Quaghebeur G. et al. Exome sequencing can detect pathogenic mosaic mutations present at low allele frequencies. *J Hum Genet.* 2012;57:70–2. doi:10.1038/jhg.2011.128. Epub 2011 Dec 1.
13. Li W.L., Buckley J., Sanchez-Lra P.A., Maglente D.T., Viduetsky L., Tatarinova T.V. et al. A Rapid and Sensitive Next-Generation Sequencing Method to Detect *RB1* Mutations Improves Care for Retinoblastoma Patients and Their Families. *J Mol Diagn.* 2016; Jul 18(4):480–493. doi: 10.1016/j.jmoldx.2016.02.006.
14. Ryzhkova O.P., Kardymon O.L., Prokhorchuk E.B., et al. Rukovodstvo po interpretatsii dannykh posledovatel'nosti DNK cheloveka, poluchennykh metodami massovogo parallel'nogo sekvenirovaniya (MPS) (redaktsiya 2018, versiya 2). [Guidelines for the interpretation of massive parallel sequencing variants (update 2018, v2)]. *Meditsinskaya genetika* [Medical genetics] 2019; 18(2): 3–24. DOI: 10.25557/2073-7998.2019.02.3-23. (In Russ.)
15. Alekseeva E.A., Babenko O.V., Kozlova V.M. et al. Rezultaty ispolzovaniya novoy meditsinskoy tekhnologii kompleksnoy DNK-diagnostiki retinoblastomy [The results of the use of new medical technology for comprehensive DNA analysis in retinoblastoma]. *Meditsinskaya genetika* [Medical Genetics] 2017; 16(10): 41–46. (In Russ.)
16. Karandasheva K.O., Anoshkin K.I., Volodin I.V., et al. Iskluchenie neverno kartirovannykh prochtenij pri targetnom vysokoproizvoditel'nom sekvenirovanii DNK s ispolzovaniem tekhnologii targetnogo obogashcheniya Ion AmpliSeq [Elimination of incorrectly mapped reads from the results of Ion AmpliSeq targeted NGS]. *Meditsynskaya genetika* [Medical Genetics]. 2018;17(5):19–22. (In Russ.)
17. Rohlin, A., Wernersson, J., Engwall, Y., Wiklund, L., Björk, J., & Nordling, M. (2009). Parallel sequencing used in detection of mosaic mutations: comparison with four diagnostic DNA screening techniques. *Human mutation*, 30(6), 1012–1020. doi: 10.1002/humu.20980.
18. Alekseeva E.A., Babenko O.V., Kozlova V.M., Ushakova T.L., Kazubskaya T.P., Sahakyan S.V., Tanas A.C., Zaletaev D.V., Strelnikov V.V. Effekt roditel'skogo proiskhozhdeniya mutatsii v gene *RB1* pri nasledstvennoy retinoblastome s nizkoy penetrantnost'yu [The effect of parental origin of *RB1* mutations in hereditary retinoblastoma with low penetrance]. *Meditsynskaya genetika* [Medical Genetics]. 2019;18(8):21–28. (In Russ.) doi: 10.25557/2073-7998.2019.08.21-28.