

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2024.02.34-45>

Особенности валидации герминальных вариантов в гене *PMS2* у пациентов с наследственными опухолевыми синдромами

Ревкова М.А.¹, Криницина А.А.¹, Немцова М.В.^{1,2,3}, Макарова М.В.^{1,4}, Черневский Д.К.^{1,5}, Сагайдак О.В.¹, Михайлов В.С.¹, Уланова П.В.¹, Цуканов А.С.⁶, Бяхова М.М.⁷, Семенова А.Б.⁷, Галкин В.Н.⁷, Бабаджанова Ч.В.⁷, Данишевич А.М.⁸, Бодунова Н.А.⁸, Гаджиева С.М.⁹, Белинкин М.С.¹

- 1 – ООО «Эвоген»
115162, г. Москва, Россия, ул. Лестева, д. 18
- 2 – ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)
119991, г. Москва, Россия, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
- 3 – ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
115522, г. Москва, Россия, ул. Москворечье, д. 1
- 4 – ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России
117997, г. Москва, Россия, ул. Профсоюзная, д. 86
- 5 – ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет»
603005, г. Нижний Новгород, Россия, пл. Минина и Пожарского, д.10/1
- 6 – ФГБУ «НМИЦ колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Минздрава России
123423, г. Москва, Россия, ул. Саляма Адила д. 2
- 7 – ГБУЗ «Городская клиническая онкологическая больница №1 Департамента здравоохранения города Москвы»
117152, г. Москва, Россия, Загородное ш., 18А, строение 7
- 8 – ГБУЗ «МКНЦ им. А.С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы»
111123, г. Москва, Россия, ул. Новогиреевская, д.1, к.1
- 9 – Департамент здравоохранения г. Москвы
127006, г. Москва, Россия, Оружейный пер., д. 43, стр.1

Введение. Метод секвенирования по Сэнгеру в последние годы активно используется для валидации выявленных методом высокопроизводительного параллельного секвенирования (NGS) вариантов. Использование метода Сэнгера необходимо, когда выявленный вариант локализуется в гене, имеющем некоторое количество псевдогенов. Наличие псевдогенов осложняет поиск патогенных вариантов в белок-кодирующих участках. Ген *PMS2*, ассоциированный с синдромом Линча, имеет большое число псевдогенов *PMS2P1-PMS2P14* и *PMS2CL*, поэтому для верификации выявленных патогенных вариантов требуются дополнительные методические подходы.

Цель: отработать протокол валидации выявленных патогенных вариантов в гене *PMS2* с учетом большого количества псевдогенов, имеющих высокий процент гомологии с участками, на которых расположены валидируемые варианты.

Методы. В статье представлены два случая с выявленными патогенными герминальными вариантами гена *PMS2*: chr7:5982823C>T (rs267608172) и chr7:6003716del (hg38).

Результаты. Для валидации варианта chr7:5982823C>T (экзон 12 гена *PMS2*), выявленного методом полногеномного секвенирования, разработана схема с использованием ПЦП с вложенными праймерами. В первом раунде проведена амплификация длинного фрагмента, содержащего 9-12 экзоны, во втором раунде – амплификация целевого фрагмента, пригодного для секвенирования методом Сэнгера. Для валидации варианта chr7:6003716del (экзон 4 гена *PMS2*) праймеры подобраны так, чтобы различия нуклеотидной последовательности гена и псевдогена располагались на 3'-конце прямого праймера. В результате для дальнейшего секвенирования методом Сэнгера используется целевой фрагмент без примеси псевдогена. Таким образом, чтобы избежать ошибок при анализе *PMS2* методом секвенирования по Сэнгеру необходимо использовать специфические методические подходы, чтобы высокогомологичные последовательности псевдогенов не мешали прочтению последовательности функционального гена.

Ключевые слова: *PMS2*, высокопроизводительное секвенирование, секвенирование по Сэнгеру, наследственные опухолевые синдромы.

Для цитирования: Ревкова М.А., Криницина А.А., Немцова М.В., Макарова М.В., Черневский Д.К., Сагайдак О.В., Михайлов В.С., Уланова П.В., Цуканов А.С., Бяхова М.М., Семенова А.Б., Галкин В.Н., Бабаджанова Ч.В., Данишевич А.М., Бодунова Н.А., Гаджиева С.М., Белинкин М.С. Особенности валидации герминальных вариантов в гене *PMS2* у пациентов с наследственными опухолевыми синдромами. *Медицинская генетика* 2024; 23(2): 34-45.

Автор для корреспонденции: Макарова Мария Владимировна; e-mail: makarova@evogenlab.ru

Финансирование. Исследование проведено за счет средств гранта Департамента здравоохранения г. Москвы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 20.01.2024

Validation of *PMS2* germline variants in patients with hereditary cancer syndromes

Revkova M.A.¹, Krinitsina A.A.¹, Nemtsova M.V.^{1,2,3}, Makarova M.V.^{1,4}, Chernevskiy D.K.^{1,5}, Sagaydak O.V.¹, Mikhailov V.S.¹, Ulanova P.V.¹, Tsukanov A.S.⁶, Byakhova M.M.⁷, Semenova A.B.⁷, Galkin V.N.⁷, Babajanova Ch.V.⁷, Danishevich A.M.⁸, Bodunova N.A.⁸, Gadzhieva S.M.⁹, Belinikin M.S.¹

1 – LLC «Evogen»

18, Lesteva st., Moscow, 115162, Russian Federation

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

8, bldg. 2, Trubetskaya st., Moscow, 119991, Russian Federation

3 – Research Centre for Medical Genetics

1, Moskvorechie st., Moscow, 115478, Russian Federation

4 – Russian Scientific Center of Roentgenoradiology

86, Profsoyuznaya st., 86, Moscow, 117997, Russian Federation

5 – Privolzhsky Research Medical University

10/1, Minin and Pozharsky Sq., Nizhny Novgorod, 603005, Russian Federation

6 – National Medical Research Center of Coloproctology named after A. N. Ryzhikh

2, Salyama Adilya st., Moscow, 123423, Russian Federation

7 – Moscow City Oncological Hospital No.1, Moscow Healthcare Department

18A bldg.7, Zagorodnoe shosse, Moscow, 117152, Russian Federation

8 – Moscow Clinical Scientific Center named after Loginov

1, Novogireevskaya st., Moscow, 111123, Russian Federation

9 – Moscow Healthcare Department

43, bldg. 1 Oruzheyny per., Moscow, 127006, Russian Federation

Background. Next generation sequencing (NGS) has achieved unprecedented development in recent years. The Sanger sequencing method is actively used to validate variants identified using NGS. The use of the Sanger method is necessary when the identified variant is localized in a gene that has several pseudogenes. The presence of pseudogenes complicates the detection of pathogenic variants in protein-coding regions. The *PMS2* gene, associated with Lynch syndrome, has a large number of pseudogenes *PMS2P1-PMS2P14* and *PMS2CL*, so additional methodological approaches are required to verify the identified pathogenic variants.

Aim. Testing a validation protocol for identified *PMS2* gene pathogenic variants, taking into consideration the presence of numerous pseudogenes, which exhibit a high percentage of homology with the regions where the validated variants are found.

Methods. The article presents two cases with identified *PMS2* gene pathogenic germline variants: chr7:5982823C>T (rs267608172) and chr7:6003716del (hg38).

Results. We developed an algorithm using nested PCR primers to validate the chr7:5982823C>T variant (*PMS2* gene, exon 12) identified by whole-genome sequencing. In the first round, a long fragment containing exons 9-12 is amplified; in the second round, a target fragment suitable for Sanger sequencing is amplified. To validate the chr7:6003716del variant (*PMS2* gene, exon 4), the primers were selected in a special way: the differences in the nucleotide sequence of the gene and the pseudogene were located at the 3'-end of the forward primer. As a result, further Sanger sequencing uses the target fragment without pseudogene contamination.

Conclusions. Specialized algorithms for Sanger sequencing of the *PMS2* gene are necessary to ensure that highly homologous pseudogene sequences do not interfere with reading the functional gene sequence.

Keywords: *PMS2*, next-generation sequencing, Sanger sequencing, hereditary cancer syndromes.

For citation: Revkova M.A., Krinitsina A.A., Nemtsova M.V., Makarova M.V., Chernevskiy D.K., Sagaydak O.V., Mikhailov V.S., Ulanova P.V., Tsukanov A.S., Byakhova M.M., Semenova A.B., Galkin V.N., Babajanova Ch.V., Danishevich A.M., Bodunova N.A., Gadzhieva S.M., Belinikin M.S. Validation of *PMS2* germline variants in patients with hereditary cancer syndromes. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]* 2024; 23(2): 34-45. (In Russ.)

Corresponding author: Maria V. Makarova; email: makarova@evogenlab.ru

Funding. This research was supported by the Moscow Healthcare Department.

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

Accepted: 20.01.2024

Введение

Псевдогены представляют собой нефункциональные аналоги структурных белок-кодирующих генов, эволюционно утративших способность кодировать белок [1]. У некоторых генов степень гомологии с псевдогенами может достигать 100%, что представляет определенную сложность для идентификации генетических вариантов, выявленных в исследуемых районах. Существует риск получения ложноположительных результатов, когда последовательность псевдогена «принимается» за последовательность гена, и нуклеотидная замена в псевдогене выносятся в заключение как выявленный генетический вариант. Также существует риск ложноотрицательных результатов, когда чувствительность метода не позволяет идентифицировать генетический вариант из-за вклада последовательности псевдогена. Также наличие псевдогенов необходимо учитывать при обращении к геномным базам данных, поскольку результаты, полученные при полном секвенировании экзона/генома, могут быть контаминированы последовательностями псевдогенов [2].

В зависимости от различных факторов, таких как длина псевдогена, степень гомологии последовательностей, расположение и др. существуют варианты идентификации последовательности гена. К ним относятся анализ последовательностей РНК [3], получение длинных ампликонов «long-range» [4, 5] или анализ более протяженных участков генома методом высокопроизводительного параллельного секвенирования (NGS) с учетом особенностей обогащения последовательностями гена на этапе пробоподготовки и/или использование специальных алгоритмов биоинформационной обработки [2]. Выявленные таким образом варианты для указания их в заключении необходимо валидировать альтернативным методом, согласно «Руководству по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования» [6].

Ген *PMS2* является сложным для тестирования, поскольку некоторые его участки имеют высокое сходство с его нефункциональными аналогами (псевдогенами). Ген *PMS2*, наряду с генами *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, ассоциирован с синдромом Линча (наследственным неполипозным колоректальным раком), одним из наиболее частых наследственных опухолевых синдромов [7]. Несмотря на то, что ген *PMS2* был охарактеризован примерно в то же время, что и *MSH2* и *MLH1* [8], долгое время считалось, что его роль в развитии син-

дрома Линча незначительна. В первую очередь это связано с тем, что мутации в гене *PMS2* характеризуются более низкой пенетрантностью. Поэтому родственники пациента с меньшей вероятностью соответствуют Амстердамским критериям синдрома Линча, которые подразумевают наличие семейного анамнеза с проследиванием заболевания по крайней мере у трех родственников в двух поколениях [9]. По некоторым данным пенетрантность колоректального рака среди гетерозиготных носителей патогенных вариантов *PMS2* составляет 13% для мужчин и 12% для женщин, рака эндометрия – 13%, а риск развития опухолей внекишечных локализаций остается неясным [10]. Одним из объяснений относительно низкой пенетрантности патогенных мутаций в гене *PMS2* считается то, что гетеродимер *MLH1-MLH3* (*MutL γ*) частично компенсирует дисфункцию гетеродимера *MLH1-PMS2* (*MutL α*) в процессе репарации непарных оснований [9,11-13].

Частота мутаций в гене *PMS2* при синдроме Линча согласно отечественным [14] и зарубежным [15] исследованиям невысокая и составляет до 10%. Такую низкую встречаемость сегодня связывают с наличием пятнадцати высоко гомологичных псевдогенов различной длины, которые затрудняют поиск мутаций в гене *PMS2*. Все псевдогены, как и ген *PMS2* (*7p22.1*), расположены на хромосоме 7 и имеют высокую степень гомологии до 99%. Экзоны 1-5 гена *PMS2* перекрываются с последовательностями четырнадцати псевдогенов (*PMS2P1-PMS2P14*). При верификации патогенных вариантов, локализованных в этих экзонах, трудно избежать контаминации последовательностями псевдогенов. Чтобы избежать этого, необходимо применение методических особенностей, таких как подбор экзонспецифичных праймеров [16] или использование метода «long-range PCR» [17, 18].

Кроме того, молекулярное тестирование затруднено из-за псевдогена *PMS2CL*, который представляет собой инвертированную дупликацию 3'-конца гена размером 100 т.п.н., расположенную примерно на 700 т.п.н. центромнее функционального гена *PMS2* [19]. *PMS2CL* имеет высокое сходство с экзонами 9 и 11-15 гена *PMS2* [20]. Было показано, что ген *PMS2* и псевдоген *PMS2CL* обмениваются последовательностями на 3'-конце, что приводит к формированию функциональных аллелей гена *PMS2*, содержащих нефункциональные аллели псевдогена *PMS2CL*, и наоборот [21-23]. Высказаны предположения, что такой обмен последовательностями в результате генной конверсии еще продолжается и является одним из механизмов введения патогенных аллелей в функциональный ген [3, 23].

Для проведения анализа гена *PMS2* методом секвенирования по Сэнгеру необходимо, чтобы высоко гомологичные последовательности псевдогенов не мешали секвенированию функционального гена во избежание ложноположительных/ложноотрицательных результатов, что требует подбора определенной методики тестирования.

Цель исследования: отработать протокол валидации выявленных патогенных вариантов в гене *PMS2* с учетом большого количества псевдогенов, имеющих высокий процент гомологии с участками, на которых расположены валидируемые варианты.

Методы

В статье представлены особенности валидационных исследований методом секвенирования по Сэнгеру патогенных герминальных вариантов гена *PMS2* chr7:5982823C>T (rs267608172) и chr7:6003716del (hg38), выявленных у пациентов с диагностированными злокачественными новообразованиями и признаками наследственного опухолевого синдрома в результате полногеномного секвенирования в рамках научного исследования «Внедрение в практику инновационных методов лечения злокачественных новообразований, обусловленных наследственными опухолевыми синдромами» (приказ Департамента здравоохранения города Москвы от 01.02.2021 № 69 «Об организации онкогенетических исследований в городе Москве»). Методика полногеномного секвенирования и обработки данных молекулярно-генетических исследований описана в работе «Возможности молекулярно-генетических методов для эффективного выявления наследственных форм онкологических заболеваний среди лиц с повышенными рисками их развития» [24].

Валидация варианта chr7:5982823C>T (rs267608172)

Валидацию варианта chr7:5982823C>T (rs267608172) методом Сэнгера проводили с использованием метода ПЦР с вложенными праймерами. Для получения относительно длинного участка гена *PMS2*, содержащего 9-12 экзоны, использовали праймеры собственного дизайна, а также праймеры, рекомендованные в работах Clendenning с соавт. [4] и Vaughn с соавт. [5]. Дизайн праймеров осуществляли с помощью специализированных сервисов и баз данных: NCBI Reference Sequence Databa, Multiple Primer Analyzer Thermo Scientific Browser с учетом следующих критериев: равные температуры плавления праймеров в диапазоне ~ 60-64°C, GC-состав праймеров ~ 35-60%, отсутствие образования вторичных структур.

Схема расположения праймеров представлена на рис. 1, праймеры, длина продуктов и температура отжига приведены в таблице.

Для первого раунда ПЦР использовали праймеры F1R1 и F2R2, 20 нг высокомолекулярной ДНК пациента и набор реактивов БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (Биолабмикс, Россия). Реакционную смесь готовили согласно инструкции производителя. ПЦР проводили в амплификаторе Veriti (ThermoFisher Scientific, USA) по программе 94°C – 3 мин, 10 циклов в режиме: 94°C – 15 сек, 56-66°C – 30 сек, 68°C – 6 мин; 20 циклов в режиме: 94°C – 15 сек, 62-66°C – 30 сек, 68°C – 6 мин + 10 сек в каждом последующем цикле; 68°C – 15 мин. Визуализацию продуктов проводили в 0,6% агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием. Продукты ожидаемых размеров очищали из реакционной смеси Cleanup Mini (Евроген, Россия) с добавлением изопропанола согласно инструкции производителя, нормализовали до 5 нг/мкл и использовали в качестве матрицы для ПЦР с парой праймеров F3R3.

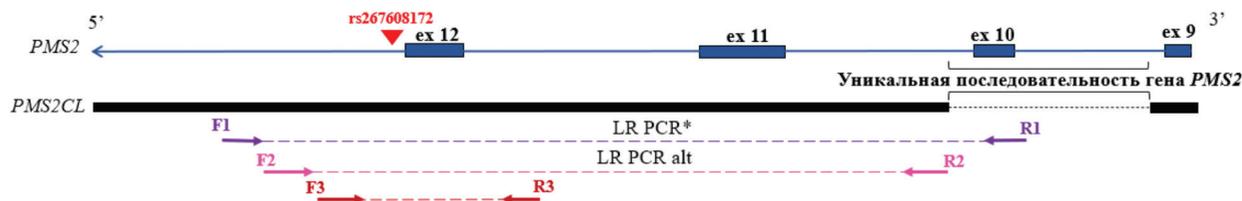


Рис. 1. Схема расположения последовательностей гена *PMS2*, псевдогена *PMS2CL* и продуктов амплификации с праймеров F1R1, F2R2, F3R3 для валидации варианта rs267608172.

Fig. 1. Scheme of the *PMS2* gene, the *PMS2CL* pseudogene and amplification products from primers F1R1, F2R2, F3R3 location for validation of the rs267608172

Для ПЦР второго раунда использовали 10 нг очищенного ПЦР-продукта, праймеры F3R3, высокоточную полимеразу SNP-detect (Евроген, Россия), реакционную смесь готовили согласно инструкции производителя, ПЦР проводили в амплификаторе Veriti по программе 95°C – 5 мин, 30 циклов в режиме: 95°C – 25 сек, 56–58°C – 20 сек, 72°C – 30 сек; 72°C – 5 мин. Визуализацию продуктов ПЦР проводили с использованием электрофореза в 1,5% агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием.

Секвенирование по Сэнгеру проводили с использованием праймеров F3R3 (прямое и обратное прочтение, соответственно) и набора реактивов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit по стандартному протоколу производителя. Капиллярный электрофорез выполняли на генетическом анализаторе ABI 3500 (Applied Biosystems, USA). Анализ полученных данных осуществляли с использованием программного обеспечения Chromas (Technelysium, Австралия), вырав-

нивание – с использованием программного обеспечения BioEdit (Nucleics, Австралия).

Валидация варианта chr7:6003716del

Чтобы избежать одновременной амплификации целевой последовательности и сходных участков псевдогенов *PMS2P1-PMS2P14* для валидации варианта chr7:6003716del были подобраны специфические праймеры F4R4 и F5R5 (таблица), схема расположения праймеров приведена на **рис. 2**.

Дизайн пары праймеров F4R4 осуществляли таким образом, чтобы обеспечить специфичность амплификации. Для этого место отжига выбрали так, чтобы нуклеотид на 3'-конце праймера R4 был комплементарен нуклеотиду в последовательности гена *PMS2*, но не псевдогенам (**рис. 36**). Поскольку анализируемые участки *PMS2* имеют высокую степень гомологии с псевдогенами *PMS2P1-PMS2P14* (степень гомологии с экзоном 4 гена *PMS2* 93–99%), таких по-

Таблица. Последовательности праймеров, длины продуктов амплификации и температуры отжига, используемые для валидации вариантов chr7:5982823C>T (rs267608172) (12 экзон) и chr7:6003716del (4 экзон) методом секвенирования по Сэнгеру

Table. Primers sequences, amplification products lengths and annealing temperatures used to validate variants chr7:5982823C>T (rs267608172) (exon 12) and chr7:6003716del (exon 4) by Sanger sequencing

Валидируемый вариант	Название праймера	Последовательность праймера 5' – 3'	Tm, °C	Длина, п.н.
chr7:5982823C>T	F1*	AGTAGTCAGGGTAAAACATTCAGT	62	8812
	R1*	GCGTTGATATCAATGTTACTCCAGA	65	
	F2	GAAGGATCTTCTGGCTAACCA	63	8138
	R2	TGCTGGATGTTGAAGGTAAGA	63	
	F3	CCTCCTTCCTAGATCTCTTCT	56	330
	R3	AGTAAAACGATGTTTGCAGA	58	
chr7:6003716del	F4	AATAGTGCTTTGGTGAATGTT	56	688
	R4	TTAAGGACTATGGAGTGGATCTT	58	
	F5	GCTCACATTCAGAAGTACTATGA	60	462
	R5	CGAAGGCTTAAGTAAGTTGACTT	60	

Примечание: праймеры F1* и R1* рекомендованы в работах [4,5], остальные праймеры собственного дизайна.

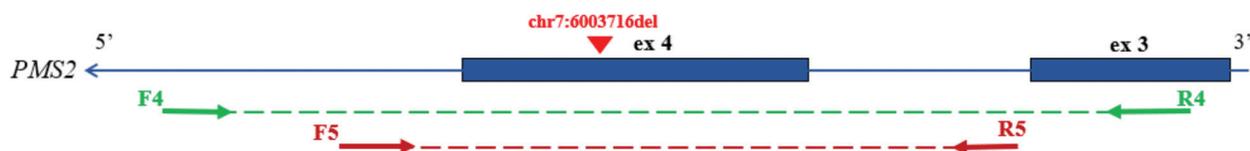


Рис. 2. Схема расположения пар праймеров F4R4 и F5R5, используемых для валидации варианта chr7:6003716del, расположенного в 4 экзоне

Fig. 2. Layout of primer pairs F4R4 and F5R5 used to validate the chr7:6003716del variant located in exon 4

зиций очень мало. Праймер F4 специфичен как по последовательности гена *PMS2*, так и последовательностям всех псевдогенов (*PMS2P1*, *PMS2P3-PMS2P14*) (рис. 3а). Выравнивание последовательностей гена, псевдогенов *PMS2P1-PMS2P14* и праймера R4 представлено на рис. 3.

Дизайн дополнительной пары праймеров F5R5 для секвенирования более короткого фрагмента осуществляли так, чтобы они располагались внутри участка, фланкированного парой F4R4, а длина последовательности не превышала 450 п.н. Их выравнивание приведено на рис. 4.

Аmplification с праймеров F4R4 проводили с использованием трех вариантов высокоточных полимераз SNP-detect, Encyclo (Евроген, Россия) и TaqF (ИЛС, Россия). Впоследствии по причине одинаковых резуль-

татов, полученных для трех полимераз, использовали полимеразу SNP-detect. В качестве матрицы использовали 10 нг высокомолекулярной ДНК. Реакционную смесь готовили согласно инструкциям производителей, ПЦР проводили с использованием амплификатора Veriti (Thermo Scientific) по программе 95°C – 5 мин, 30 циклов в режиме: 95°C – 25 сек, 56-62°C – 20 сек, 7°C – 30 сек; 7°C – 5 мин. Визуализацию продуктов амплификации проводили при помощи электрофоретической детекции в 1,5% агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием. Очистку продуктов амплификации осуществляли при помощи набора реагентов Cleanup Mini (Евроген, Россия)

Для секвенирования использовали как праймеры F4R4 (продукт праймеров F4R4 в качестве матрицы, полученный с использованием трех вариантов по-

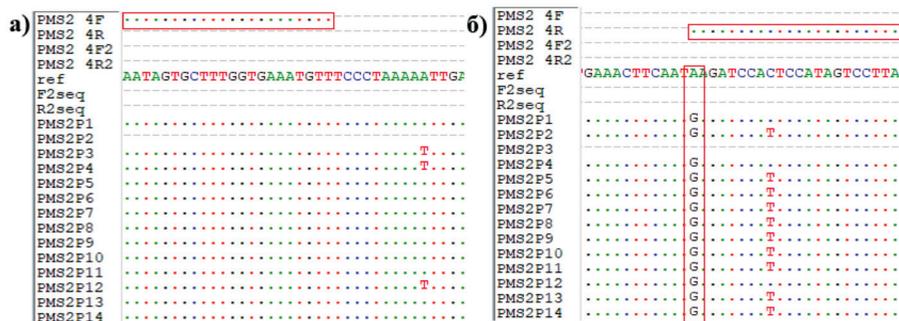


Рис. 3. Выравнивание последовательностей гена, обозначенного как ref, псевдогенов *PMS2P1-PMS2P14* и праймеров (выделены в рамки) F4 (а) и R4 (б). В рамку также выделен нуклеотид последовательности гена (аденин) и псевдогенов (гуанин), расположенный на 3'-конце праймера R4, обеспечивающий специфичность отжига.

Fig. 3. Sequence alignment of the gene designated as ref, pseudogenes *PMS2P1-PMS2P14* and primers F4 (a) and R4 (b) (boxed). The nucleotides adenine of the gene and guanine of the pseudogenes at the 3' end of the R4 primer, which provides annealing specificity, are also boxed.



Рис. 4. Выравнивание последовательностей гена, обозначенного как ref, псевдогенов *PMS2P1-PMS2P14* и праймеров (выделены в рамки) F5 (а) и R5 (б). Также в рамки заключены нуклеотиды, различающиеся в последовательностях гена и псевдогенов.

Fig. 4. Alignment of the gene designated as ref, pseudogenes *PMS2P1-PMS2P14* and primer F5 (a) and R5 (b) (boxed) sequences. Nucleotides that differ in the sequences in the gene and pseudogenes are also framed.

лимераз), так и праймеры F5R5 (продукты праймеров F4R4 и F5R5 в качестве матрицы), последовательно представлены в таблице.

Реакцию секвенирования проводили с использованием набора реактивов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit по стандартному протоколу производителя. Капиллярный электрофорез выполняли на ге-

нетическом анализаторе ABI 3500 (Applied Biosystems, USA). Анализ полученных данных осуществляли с использованием программного обеспечения Chromas (Technelysium, Австралия), выравнивание – с использованием программного обеспечения BioEdit (Nucleics, Австралия).

Результаты

Анализируемые участки гена *PMS2* имеют высокую степень гомологии с псевдогенами *PMS2P1-PMS2P14* (степень гомологии с экзоном 4 гена *PMS2* 93-99%) и *PMS2CL* (степень гомологии с участком, содержащим экзон 12 и интрон 12 гена *PMS2*, 99%).

Результаты валидации варианта chr7:5982823C>T (rs267608172)

Для валидации варианта chr7:5982823C>T (rs267608172), расположенного в интроне 12 (NM_000535.7), методом секвенирования по Сэнгеру, чтобы избежать контаминации последовательностями псевдогена *PMS2CL* использовали ПЦР с вложенными праймерами. ПЦР-продукт после первого раунда в зависимости от используемой пары праймеров имел длину F1R1=8812 п.н. и F2R2=8138 (рис. 5). Для второго раунда ПЦР использовали пару праймеров F3R3 (таблица). Ампликон после второго раунда ПЦР с длиной фрагмента 330 п.н. использован для секвенирования по Сэнгеру (рис. 6).

Анализ секвенограммы на примеси последовательности псевдогена не представляется возможным, так как последовательности, ограниченные праймерами F3R3, идентичны со степенью гомологии 100%.

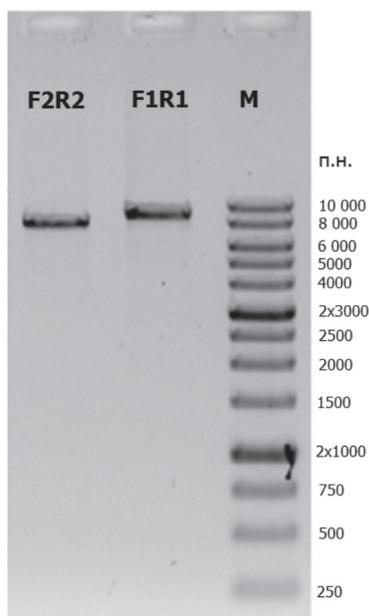


Рис. 5. Результат электрофореза продуктов амплификации с праймеров F1R1 и F2R2.

Fig. 5. Amplification products from primers F1R1 and F2R2 electrophoresis result

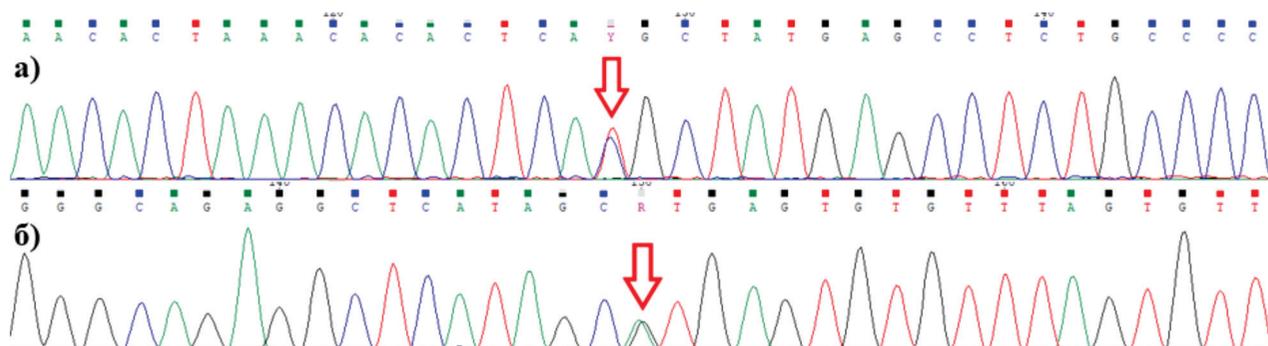


Рис. 6. Секвенограмма прямого (а) и обратного (б) прочтения праймеров F3R3, подтверждающая наличие на проанализированном участке гена *PMS2* варианта, соответствующего rs267608172 (chr7:5982823C>T) в гетерозиготном состоянии.

Fig. 6. Sequenceogram of forward (a) and reverse (b) reads of F3R3 primers, confirming the presence of a heterozygous variant corresponding to rs267608172 (chr7:5982823C>T) in the analyzed region of the *PMS2* gene.

Чтобы убедиться в достоверности результатов, было выполнено контрольное исследование. В качестве контроля была выбрана ДНК пациента, у которого не выявлено замены chr7:5982823C>T (рис. 7). Результаты секвенирования свидетельствуют об отсутствии патогенного варианта chr7:5982823C>T у пациента, что подтверждает секвенирование гена *PMS2* без примеси псевдогенов (рис. 7)

Результаты валидации варианта chr7:6003716del

Для валидации варианта chr7:6003716del продукт ПЦР F4R4 секвенировали как с одноименных праймеров, так и с дополнительной пары F5R5. В результате валидирована делеция Т в гетерозиготном состоянии chr7:6003716del с использованием прямых (рис. 8) и обратных праймеров (рис. 9). На рис. 8а и 8б, а также 9а и 9б очевидно отсутствие контаминации после-

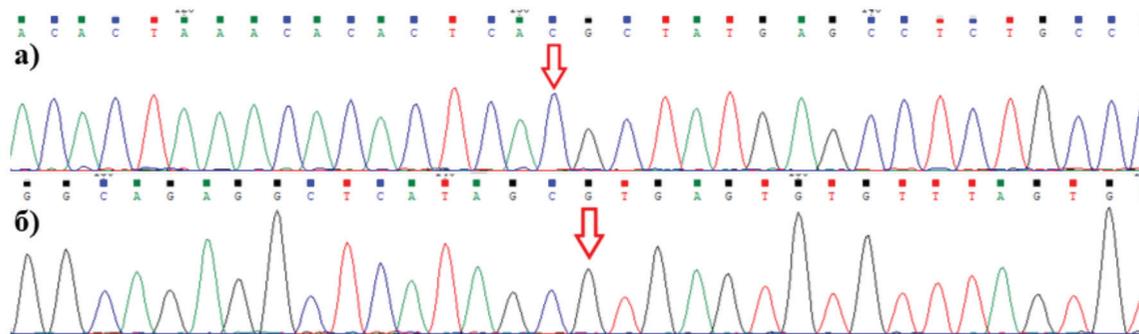


Рис. 7. Секвенограмма прямого (а) и обратного (б) прочтения праймеров F3R3: изменения нуклеотидной последовательности гена *PMS2*, соответствующие rs267608172 (chr7:5982823C>T), не обнаружены, как и примесь псевдогенов.

Fig. 7. Sequencegram of forward (a) and reverse (b) reads of F3R3 primers: changes in the nucleotide sequence of the *PMS2* gene corresponding to rs267608172 (chr7:5982823C>T) were not detected, as well as an admixture of pseudogenes.

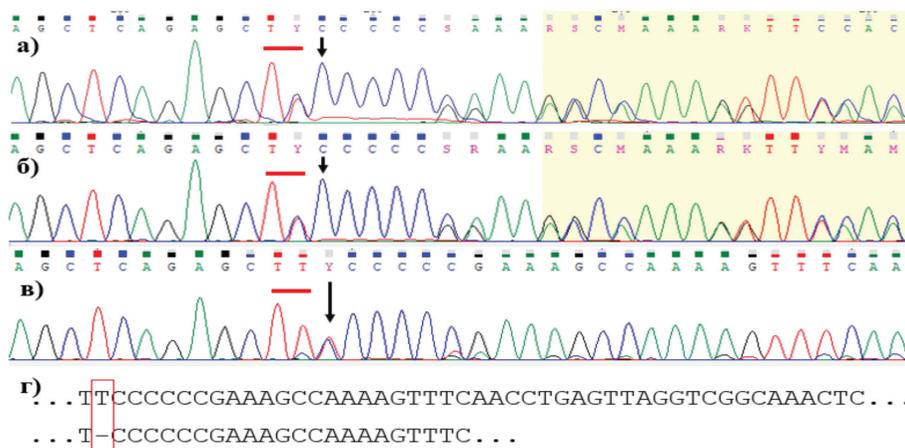


Рис. 8. Секвенограммы прямых чтений, полученных в результате секвенирования: а) продукта с праймера F4, полученного с праймеров F4R4, – делецию валидируем; б) продукта с праймера F5, полученного с праймеров F4R4, – делецию валидируем; в) продукта с праймера F5, полученного с праймеров F5R5 (исследование недостоверно); г) выравнивание последовательности с делецией на референсную. Красной линией обозначено место валидируемого варианта chr7:6003716del. Черной стрелкой обозначена позиция, в которой наличие примеси дополнительного пика свидетельствует об вкладе последовательности псевдогенов (в).

Fig. 8. Sequencegrams from direct primers: а) product from the F4 primer obtained from the F4R4 primers – we validate the deletion; б) product from primer F5 obtained from primers F4R4 – we validate the deletion; в) a product from the F5 primer obtained from the F5R5 primers (the study is unreliable); г) alignment of the sequence with deletion to the reference one. The red line indicates the location of the validated variant chr7:6003716del. The black arrow indicates the position in which the presence of an additional peak indicates the contribution of the psvedogen sequences (в).

довательностями псевдогенов, наложение пиков объясняется только сдвигом последовательности в результате делеции Т.

Продукт амплификации с праймеров F5R5 секвенировали с тех же праймеров, результат прямого прочтения F5 представлен на рис. 8 (в), с обратного – на рис. 9(в). Наличие смешанных пиков (фон) на секвеннограмме прямого прочтения свидетельствует о примеси по-

следовательностей псевдогенов, а высчитать делецию на секвеннограмме обратного прочтения не представляется возможным. Таким образом показано, что нельзя использовать пару F5R5 для валидации варианта по причине неспецифического отжига праймеров и контаминации последовательностями псевдогенов.

Подтверждением того, что при использовании праймеров F5R5 псевдогены контаминируют после-

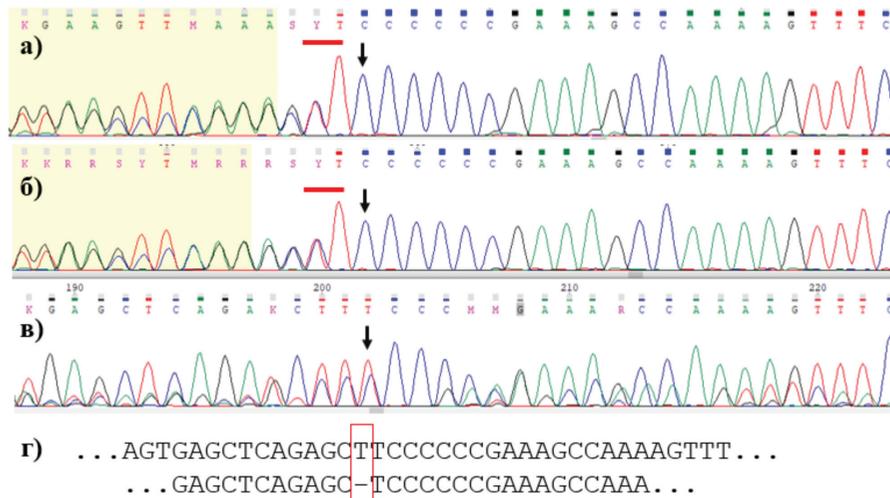


Рис. 9. Секвеннограммы с обратных праймеров: а) с праймера R4 продукта F4R4, – делецию валидируем; б) с праймера R5 продукта F4R4, – делецию валидируем; в) с праймера R5 продукта F5R5, – делецию нельзя валидировать; г) выравнивание последовательности с делецией на референсную. Красной линией обозначено место валидируемого варианта chr7:6003716del. Черной стрелкой обозначена позиция, в которой наличие примеси дополнительного пика свидетельствует об вкладе последовательности псевдогенов (в).

Fig. 9. Sequencegrams from reverse primers: a) product from the R4 primer obtained from the F4R4 primers – we validate the deletion; б) product from primer R5 obtained from primers F4R4 – we validate the deletion; в) a product from the R5 primer obtained from the F5R5 primers – the deletion cannot be validated; г) alignment of the sequence with deletion to the reference one. The red line indicates the location of the validated variant chr7:6003716del. The black arrow indicates the position in which the presence of an additional peak indicates the contribution of the psvedogen sequences (в).



Рис. 10. Выравнивание последовательностей гена, обозначенного как ref, и псевдогенов PMS2P1-PMS2P14, объясняющее пик C/T (Y) в позиции, близкой от места валидируемого варианта chr7:6003716del (обозначен красной линией).

Fig. 10. Sequence alignment of the gene designated ref and the PMS2P1-PMS2P14 pseudogenes explaining the C/T peak (Y) at a position close to the site of the validated variant chr7:6003716del (indicated by the red line).

довательность гена и делают исследование недостоверным является наличие смешанного пика С/Т отмеченного стрелкой на секвенограммах 8 (в) и 9 (в). На секвенограммах 8 (а, б) и 9 (а, б), детектируется только чистый пик С без примеси пика Т в соответствующей позиции (указано стрелкой). Такая секвенограмма характерна для неконтаминированной последовательности гена *PMS2*. Происхождение смешанного пика С/Т в случае ПЦР с праймеров F5R5 объясняется наличием нуклеотида Т в соответствующей позиции в псевдогенах *PMS2P6-PMS2P11*, *PMS2P13*, *PMS2P14*. Нуклеотиды С (ген) и Т (псев-

догены) при амплификации с праймеров F5R5, накладываются друг на друга и вносят существенный вклад в получаемую нуклеотидную последовательность на секвенограмме. Выравнивание последовательностей приведено на **рис. 10**.

Таким же образом, проверены на наличие смешанных пиков продукты с праймеров F4R4 для оценки вклада последовательностей псевдогенов (**рис. 11, 12**). На рисунке видно отсутствие наложения пиков, что соответствует отсутствию примеси псевдогенов. При наличии смеси целевой последовательности и псевдогена на хроматограмме должны присутствовать сме-

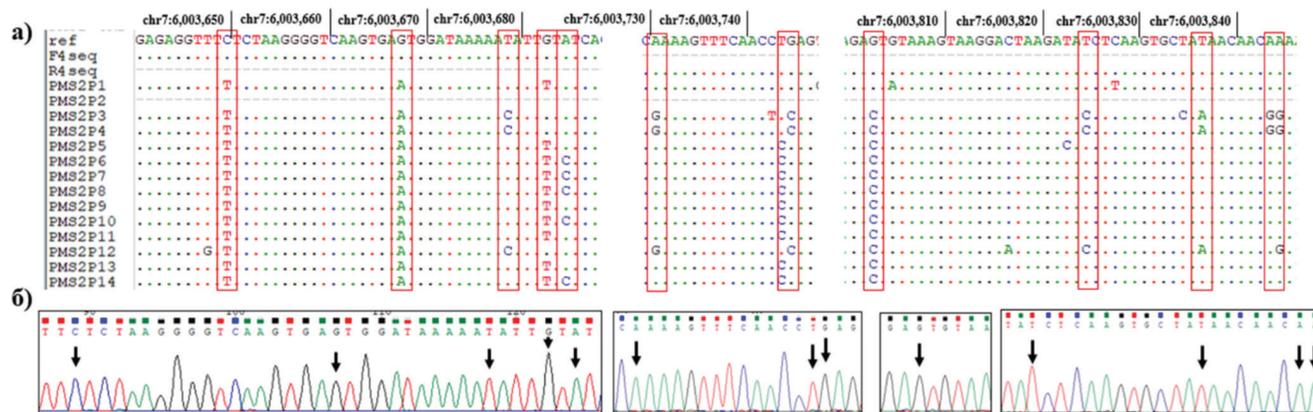


Рис. 11. Анализ секвенограммы на примеси псевдогенов, приведена секвенограмма прочтения с ампликона F4R4. Секвенограмма без примесей последовательностей псевдогенов, фона нет.

Fig. 11. Analysis of the sequenceogram for pseudogene impurities, reads from the F4R4 amplicon are shown. Sequenceogram without admixtures of pseudogene sequences.

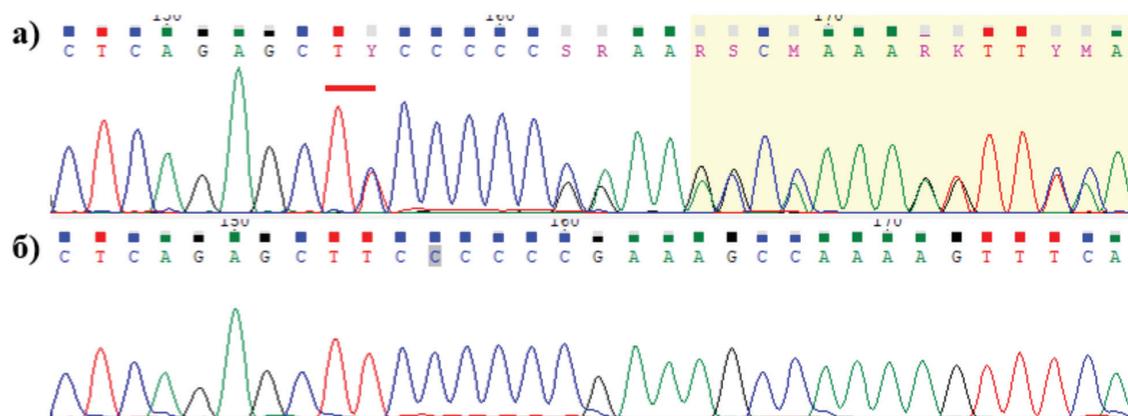


Рис. 12. Секвенограмма анализируемого образца (а) в сравнении с образцом (б) без валидируемого варианта chr7:6003716del (отрицательный контроль).

Fig. 12. Sequenceogram of the analyzed sample (a) in comparison with the sample (b) without the validated variant chr7:6003716del (negative control)

шанные пики в позициях chr7:6003650, chr7:6003668, chr7:6003679, chr7:6003683, chr7:6003685 (рис. 12а) и в позициях chr7:6003731, chr7:6003744, chr7:6003745, chr7:6003803, chr7:6003825, chr7:6003837, chr7:6003844, chr7:6003845 (рис. 11а, б). Однако на полученной нами последовательности никаких дополнительных пиков на секвенограмме в указанных позициях обнаружено не было (рис. 11б, 12б).

Для исключения получения ложноположительного результата с подобранными праймерами проведено исследование образца, в котором не было выявлено валидируемого варианта (отрицательный контроль) (рис. 12).

Обсуждение

Исследование мутаций в гене *PMS2* требует применения определенных лабораторных подходов и является методически не простым. В настоящее время существует несколько методических подходов, которые позволяют определять патогенные варианты в гене *PMS2*, исключая контаминацию последовательностями псевдогенов. Для того, чтобы отсеять последовательности псевдогенов при подборе праймеров необходимо учитывать степень гомологии в районе отжига праймеров. Отличия целевой последовательности от последовательностей псевдогенов даже на 1 нуклеотид достаточно для дизайна специфических праймеров, особенно если нуклеотид находится на 3'-конце праймера. Неспаренный нуклеотид праймера препятствует взаимодействию ДНК и полимеразы и повышает специфичность реакции.

Выводы

Ген *PMS2*, ассоциированный с синдромом Линча, имеет большое число псевдогенов *PMS2P1-PMS2P14* и *PMS2CL*, которые затрудняют верификацию выявленных вариантов и снижают эффективность диагностики. Чтобы избежать ошибок при анализе патогенных вариантов в гене *PMS2* у пациентов с наследственными онкологическими синдромами необходимо использовать специфические методические подходы, в каждом отдельном случае необходимо тщательно продумывать дизайн праймеров и условия ПЦР для верификации полученных результатов.

Благодарность

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории, участвовавшим в проведении разных эта-

пов лабораторной работы Доморацкой Е.А., Маркову Д.Д., Сафиной С.А., Соколовой Н.Р., Чесноковой О.В., Шичковой Ю.С.

Литература

1. Vanin E.F. Processed pseudogenes: characteristics and evolution. *Annu Rev Genet.* 1985;19:253-72. doi: 10.1146/annurev.ge.19.120185.001345.
2. Claes K.B.M., Rosseel T., De Leeneer K. Dealing with Pseudogenes in Molecular Diagnostics in the Next Generation Sequencing Era. *Methods Mol Biol.* 2021;2324:363-381. doi: 10.1007/978-1-0716-1503-4_22.
3. van der Klift H.M., Tops C.M., Bik E.C., et al. Quantification of sequence exchange events between PMS2 and PMS2CL provides a basis for improved mutation scanning of Lynch syndrome patients. *Hum Mutat.* 2010 May;31(5):578-87. doi: 10.1002/humu.21229.
4. Clendenning M., Hampel H., LaJeunesse J., et al. Long-range PCR facilitates the identification of PMS2-specific mutations. *Hum Mutat.* 2006 May;27(5):490-5. doi: 10.1002/humu.20318. Erratum in: *Hum Mutat.* 2006;27(11):1155.
5. Vaughn C.P., Robles J., Swensen J.J., et al. Clinical analysis of PMS2: mutation detection and avoidance of pseudogenes. *Hum Mutat.* 2010;31(5):588-93. doi: 10.1002/humu.21230.
6. Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б., и др. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2). *Медицинская генетика.* 2019;18(2):3-23. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2019.02.3-23>
7. Hereditary Cancer Syndromes and Risk Assessment: ACOG COMMITTEE OPINION, Number 793. *Obstet Gynecol.* 2019;134(6):e143-e149. doi: 10.1097/AOG.0000000000003562.
8. Nicolaides N.C., Papadopoulos N., Liu B., et al. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature.* 1994;371(6492):75-80. doi: 10.1038/371075a0.
9. Senter L., Clendenning M., Sotamaa K., et al. The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germ-line PMS2 mutations. *Gastroenterology.* 2008;135(2):419-28. doi: 10.1053/j.gastro.2008.04.026.
10. Ten Broeke S.W., van der Klift H.M., Tops C.M.J., et al. Cancer Risks for PMS2-Associated Lynch Syndrome. *J Clin Oncol.* 2018;36(29):2961-2968. doi: 10.1200/JCO.2018.78.4777. Erratum in: *J Clin Oncol.* 2019 Mar 20;37(9):761.
11. Cannavo E., Marra G., Sabates-Bellver J., et al. Expression of the MutL homologue hMLH3 in human cells and its role in DNA mismatch repair. *Cancer Res.* 2005;65(23):10759-66. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2528.
12. Korhonen M.K., Raevaara T.E., Lohi H., Nyström M. Conditional nuclear localization of hMLH3 suggests a minor activity in mismatch repair and supports its role as a low-risk gene in HNPCC. *Oncol Rep.* 2007;17(2):351-4.
13. ten Broeke S.W., Brohet R.M., Tops C.M., et al. Lynch syndrome caused by germline PMS2 mutations: delineating the cancer risk. *J Clin Oncol.* 2015;33(4):319-25. doi: 10.1200/JCO.2014.57.8088.
14. Шельгин Ю.А., Ачкасов С.И., Семёнов Д.А., и др. Генетические и фенотипические характеристики 60 российских семей с синдромом Линча. *Колопроктология.* 2021;20(3):35-42. <http://dx.doi.org/10.33878/2073-7556-2021-20-3-35-42>
15. Kasela M., Nyström M., Kansikas M. PMS2 expression decrease causes severe problems in mismatch repair. *Hum Mutat.* 2019;40(7):904-907. doi: 10.1002/humu.23756.
16. Hendriks Y.M., Jagmohan-Changur S., van der Klift H.M., et al. Heterozygous mutations in PMS2 cause hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome). *Gastroenterology.* 2006;130(2):312-22. doi: 10.1053/j.gastro.2005.10.052.

17. Clendenning M., Hampel H., LaJeunesse J., et al. Long-range PCR facilitates the identification of PMS2-specific mutations. *Hum Mutat.* 2006;27(5):490-5. doi: 10.1002/humu.20318. Erratum in: *Hum Mutat.* 2006;27(11):1155.
18. Vaughn C.P., Robles J., Swensen J.J., et al. Clinical analysis of PMS2: mutation detection and avoidance of pseudogenes. *Hum Mutat.* 2010;31(5):588-93. doi: 10.1002/humu.21230.
19. Li J., Dai H., Feng Y., et al. A Comprehensive Strategy for Accurate Mutation Detection of the Highly Homologous PMS2. *J Mol Diagn.* 2015;17(5):545-53. doi: 10.1016/j.jmoldx.2015.04.001.
20. Nicolaides N.C., Kinzler K.W., Vogelstein B. Analysis of the 5' region of PMS2 reveals heterogeneous transcripts and a novel overlapping gene. *Genomics.* 1995;29(2):329-34. doi: 10.1006/geno.1995.9997.
21. Hayward B.E., De Vos M., Valleley E.M., et al. Extensive gene conversion at the PMS2 DNA mismatch repair locus. *Hum Mutat.* 2007;28(5):424-30. doi: 10.1002/humu.20457. PMID: 17253626.
22. Auclair J., Leroux D., Desseigne F., et al. Novel biallelic mutations in MSH6 and PMS2 genes: gene conversion as a likely cause of PMS2 gene inactivation. *Hum Mutat.* 2007;28(11):1084-90. doi: 10.1002/humu.20569.
23. Ganster C., Wernstedt A., Kehrer-Sawatzki H., et al. Functional PMS2 hybrid alleles containing a pseudogene-specific missense variant trace back to a single ancient intrachromosomal recombination event. *Hum Mutat.* 2010;31(5):552-60. doi: 10.1002/humu.21223.
24. Семенова А. Б., Бяхова М. М., Галкин В. Н., и др. Возможности молекулярно-генетических методов для эффективного выявления наследственных форм онкологических заболеваний среди лиц с повышенными рисками их развития. *Здоровье мегаполиса.* 2023; 4(2):30-40. doi:10.47619/2713-2617.zm.2023.v.4i2;30-40.
9. Senter L., Clendenning M., Sotamaa K., et al. The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germ-line PMS2 mutations. *Gastroenterology.* 2008;135(2):419-28. doi: 10.1053/j.gastro.2008.04.026.
10. Ten Broeke S.W., van der Klift H.M., Tops C.M.J., et al. Cancer Risks for PMS2-Associated Lynch Syndrome. *J Clin Oncol.* 2018;36(29):2961-2968. doi: 10.1200/JCO.2018.78.4777. Erratum in: *J Clin Oncol.* 2019 Mar 20;37(9):761.
11. Cannavo E., Marra G., Sabates-Bellver J., et al. Expression of the MutL homologue hMLH3 in human cells and its role in DNA mismatch repair. *Cancer Res.* 2005;65(23):10759-66. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2528.
12. Korhonen M.K., Raevaara T.E., Lohi H., Nyström M. Conditional nuclear localization of hMLH3 suggests a minor activity in mismatch repair and supports its role as a low-risk gene in HNPCC. *Oncol Rep.* 2007;17(2):351-4.
13. ten Broeke S.W., Brohet R.M., Tops C.M., et al. Lynch syndrome caused by germline PMS2 mutations: delineating the cancer risk. *J Clin Oncol.* 2015;33(4):319-25. doi: 10.1200/JCO.2014.57.8088.
14. Shelygin Y.A., Achkasov S.I., Semenov D.A., et al. Geneticheskiye i fenotipicheskiye kharakteristiki 60 rossiyskikh meny s sindromom Lincha [Genetic and phenotypic characteristics of 60 Russian families with Lynch syndrome]. *Koloproktologiya [Coloproctology].* 2021;20(3):35-42. (In Russ.) <http://dx.doi.org/10.33878/2073-7556-2021-20-3-35-42>
15. Kasela M., Nyström M., Kansikas M. PMS2 expression decrease causes severe problems in mismatch repair. *Hum Mutat.* 2019;40(7):904-907. doi: 10.1002/humu.23756.
16. Hendriks Y.M., Jagmohan-Changur S., van der Klift H.M., et al. Heterozygous mutations in PMS2 cause hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome). *Gastroenterology.* 2006;130(2):312-22. doi: 10.1053/j.gastro.2005.10.052.
17. Clendenning M., Hampel H., LaJeunesse J., et al. Long-range PCR facilitates the identification of PMS2-specific mutations. *Hum Mutat.* 2006;27(5):490-5. doi: 10.1002/humu.20318. Erratum in: *Hum Mutat.* 2006;27(11):1155.
18. Vaughn C.P., Robles J., Swensen J.J., et al. Clinical analysis of PMS2: mutation detection and avoidance of pseudogenes. *Hum Mutat.* 2010;31(5):588-93. doi: 10.1002/humu.21230.
19. Li J., Dai H., Feng Y., et al. A Comprehensive Strategy for Accurate Mutation Detection of the Highly Homologous PMS2. *J Mol Diagn.* 2015;17(5):545-53. doi: 10.1016/j.jmoldx.2015.04.001.
20. Nicolaides N.C., Kinzler K.W., Vogelstein B. Analysis of the 5' region of PMS2 reveals heterogeneous transcripts and a novel overlapping gene. *Genomics.* 1995;29(2):329-34. doi: 10.1006/geno.1995.9997.
21. Hayward B.E., De Vos M., Valleley E.M., et al. Extensive gene conversion at the PMS2 DNA mismatch repair locus. *Hum Mutat.* 2007;28(5):424-30. doi: 10.1002/humu.20457. PMID: 17253626.
22. Auclair J., Leroux D., Desseigne F., et al. Novel biallelic mutations in MSH6 and PMS2 genes: gene conversion as a likely cause of PMS2 gene inactivation. *Hum Mutat.* 2007;28(11):1084-90. doi: 10.1002/humu.20569.
23. Ganster C., Wernstedt A., Kehrer-Sawatzki H., et al. Functional PMS2 hybrid alleles containing a pseudogene-specific missense variant trace back to a single ancient intrachromosomal recombination event. *Hum Mutat.* 2010;31(5):552-60. doi: 10.1002/humu.21223.
24. Semenova A. B., Byakhova M. M., Galkin V. N., et al. Vozmozhnosti molekulyarno-geneticheskikh metodov dlya effektivnogo vyyavleniya nasledstvennykh form onkologicheskikh zabozevaniy sredi lits s povyshennymi riskami ikh razvitiya [Capabilities of Molecular Genetic Methods for Effective Hereditary Cancers Detection in Individuals with High Cancer Risk Factors]. *Zdorov'ye megapolisa [City Healthcare Journal].* 2023; 4(2):30-40. (In Russ.) doi:10.47619/2713-2617.zm.2023.v.4i2;30-40.

References

1. Vanin E.F. Processed pseudogenes: characteristics and evolution. *Annu Rev Genet.* 1985;19:253-72. doi: 10.1146/annurev.ge.19.120185.001345.
2. Claes K.B.M., Rosseel T., De Leeneer K. Dealing with Pseudogenes in Molecular Diagnostics in the Next Generation Sequencing Era. *Methods Mol Biol.* 2021;2324:363-381. doi: 10.1007/978-1-0716-1503-4_22.
3. van der Klift H.M., Tops C.M., Bik E.C., et al. Quantification of sequence exchange events between PMS2 and PMS2CL provides a basis for improved mutation scanning of Lynch syndrome patients. *Hum Mutat.* 2010 May;31(5):578-87. doi: 10.1002/humu.21229.
4. Clendenning M., Hampel H., LaJeunesse J., et al. Long-range PCR facilitates the identification of PMS2-specific mutations. *Hum Mutat.* 2006 May;27(5):490-5. doi: 10.1002/humu.20318. Erratum in: *Hum Mutat.* 2006;27(11):1155.
5. Vaughn C.P., Robles J., Swensen J.J., et al. Clinical analysis of PMS2: mutation detection and avoidance of pseudogenes. *Hum Mutat.* 2010;31(5):588-93. doi: 10.1002/humu.21230.
6. Ryzhkova O.P., Kardymon O.L., Prokhorchuk E.B., et al. Rukovodstvo po interpretatsii dannykh posledovatel'nosti DNK cheloveka, poluchennykh metodami massovogo parallesnogo sekvenirovaniya (MPS) (redaktsiya 2018, versiya 2) [Guidelines for the Interpretation of Human DNA Sequence Data Obtained by Massive Parallel Sequencing (MPS) Methods (Edition 2018, Version 2)]. *Meditsinskaya genetika [Medical genetics].* 2019;18(2):3-23. (In Russ.) <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2019.02.3-23>
7. Hereditary Cancer Syndromes and Risk Assessment: ACOG COMMITTEE OPINION, Number 793. *Obstet Gynecol.* 2019;134(6):e143-e149. doi: 10.1097/AOG.0000000000003562.
8. Nicolaides N.C., Papadopoulos N., Liu B., et al. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature.* 1994;371(6492):75-80. doi: 10.1038/371075a0.