

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2024.08.13-22>

Косвенная диагностика синдрома Рубинштейна-Тэйби 1 типа с применением методов таргетного анализа уровня метилирования ДНК

Земляная О.А., Калинин А.И., Танас А.С., Ефремова А.В., Володин И.В., Исмагилова О.Р., Залетаев Д.В., Стрельников В.В.

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

Нарушение эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов, происходящее в связи с появлением патогенных вариантов в генах, кодирующих элементы эпигенетического аппарата, приводит к развитию хроматинопатий. Данная группа наследственных заболеваний насчитывает 179 синдромов, часть из которых имеет перекрывающиеся фенотипы. Несмотря на разнообразие подходов к молекулярно-генетической диагностике хроматинопатий, подтвердить клинический диагноз традиционными методами удается далеко не во всех случаях, вследствие чего сохраняет свою актуальность задача по оптимизации алгоритмов диагностики. В настоящей работе представлен оригинальный подход к косвенной диагностике хроматинопатий на примере синдрома Рубинштейна-Тэйби, заключающийся в анализе уровня метилирования ограниченных участков генома. В основе исследования лежит применение двух методов таргетного количественного анализа метилирования ДНК, которые являются относительно доступными и могут быть интегрированы в диагностическую практику.

Ключевые слова: хроматинопатии, синдром Рубинштейна-Тэйби, эписигнатура, метилирование ДНК.

Для цитирования: Земляная О.А., Калинин А.И., Танас А.С., Ефремова А.В., Володин И.В., Исмагилова О.Р., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. Косвенная диагностика синдрома Рубинштейна-Тэйби 1 типа с применением методов таргетного анализа уровня метилирования ДНК. *Медицинская генетика* 2024; 23(8): 13-22.

Автор для корреспонденции: Земляная О.А.; e-mail: o.zemlyanaya@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «МГНЦ» на 2024 год.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 12.08.2024

Indirect diagnostics of type 1 Rubinstein-Taybi syndrome using methods of targeted analysis of DNA methylation level

Zemlianaia O.A., Kalinkin A.I., Tanas A.S., Efremova A.V., Volodin I.V., Ismagilova O.R., Zaletaev D.V., Strelnikov V.V.

Research Centre for Medical Genetics
1, Moskvorechie st., Moscow, 115478, Russian Federation

Disruption of epigenetic mechanisms of gene expression regulation, occurring due to the emergence of pathogenic variants in genes encoding elements of the epigenetic machinery, leads to the development of chromatinopathies. This group of hereditary diseases includes 179 syndromes, some of which have overlapping phenotypes. Despite the fact that there is a variety of approaches to molecular diagnostics of chromatinopathies, it is not always possible to confirm the clinical diagnosis by traditional methods, thus the problem of optimizing diagnostic algorithms remains relevant. This article aims to represent an original approach to indirect diagnostics of chromatinopathies using the example of Rubinstein-Taybi syndrome, which is based on analyzing the methylation level of limited regions of the genome. The study encompasses two methods of targeted quantitative analysis of DNA methylation, which are relatively accessible and can be integrated into diagnostic practice.

Keywords: chromatinopathies, Rubinstein-Taybi syndrome, episignature, DNA methylation.

For citation: Zemlianaia O.A., Kalinkin A.I., Tanas A.S., Efremova A.V., Volodin I.V., Ismagilova O.R., Zaletaev D.V., Strelnikov V.V. Indirect diagnostics of type 1 Rubinstein-Taybi syndrome using methods of targeted analysis of DNA methylation level. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]*. 2024; 23(8): 13-22. (In Russian).

Corresponding author: O.A. Zemlianaia; e-mail: o.zemlyanaya@mail.ru

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

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

Accepted: 12.08.2024

Введение

Эпигенетическая регуляция экспрессии генов является одним из наиболее значимых факторов, определяющих функциональное состояние хроматина и обеспечивающих адекватное развитие тканей и органов. При нарушениях эпигенетических механизмов, происходящих в результате возникновения мутаций в генах-участниках эпигенетического аппарата, развиваются хроматинопатии — синдромальные расстройства, имеющие ряд общих клинических проявлений, наиболее распространенными из которых являются интеллектуальная недостаточность различной степени тяжести, судороги, лицевой дисморфизм, патология роста, а также аномалии сердца или скелета [1, 2]. Как правило, для хроматинопатий не характерно наличие патогномоничных критериев, а молекулярно-генетическая диагностика может быть затруднена в связи со сложностью интерпретации результатов массового параллельного секвенирования [3].

Синдром Рубинштейна-Тэйби (СРТ) — аутосомно-доминантное заболевание, ассоциированное с патогенными вариантами в генах *CREBBP* (СРТ: тип 1; OMIM: 180849) или *EP300* (СРТ: тип 2; OMIM: 613684). Продуктами данных генов являются соответственно белки СВР и р300, обладающие гистон-ацетилтрансферазной активностью, что определяет принадлежность СРТ к хроматинопатиям. Основными фенотипическими проявлениями СРТ являются задержка интеллектуального развития, диспептические расстройства, офтальмологические заболевания, постнатальная задержка роста, а также аномалии строения скелета, в частности, широкий большой палец рук и ног [4]. Дифференциальная диагностика проводится с синдромами Видеманна-Штейнера (OMIM: 605130), Боринга-Опица (OMIM: 605039), генитопателлярным синдромом (OMIM: 606170), синдромами Корнелии де Ланге (тип 1, OMIM: 122470; тип 2, OMIM: 300590), Кабуки (тип 1, OMIM: 147920; тип 2, OMIM: 300867), Бизикера-Янга-Симпсона (OMIM: 603736) и Флоатинг-Харбор (OMIM: 136140) [5, 6].

Одним из перспективных подходов к оптимизации диагностики хроматинопатий, активно изучаемым последнее десятилетие, является идентификация эписигнатуры — уникального паттерна метилирования генома, характерного для того или иного заболевания, сопровождаемого нарушением эпигенетического аппарата. Эписигнатуры зарекомендовали себя как высокоспецифичные биомаркеры, позволяющие с высокой точностью различать эпигеномы пациентов и здоровых

людей [7]. Кроме того, возрастает интерес к исследованию возможности использования эписигнатуры с целью классификации вариантов неопределенного значения [8]. На сегодняшний день анализ паттерна метилирования ДНК активно применяется в лабораториях западных стран в качестве дополнительного диагностического инструмента второго ряда, однако его полноценное использование для постановки диагноза может быть затруднено в связи с недостаточной изученностью взаимосвязи между конкретным патогенным вариантом и появлением эписигнатуры [9].

Как правило, детектирование эписигнатуры осуществляется широкогеномными методами, что накладывает дополнительные ограничения на применение данного анализа в рутинной диагностической практике. В связи с этим особый интерес вызывает изучение возможности использования ограниченного участка генома, обладающего наиболее значительным изменением профиля метилирования, в качестве биомаркера той или иной хроматинопатии. Существование таких репрезентативных локусов позволило бы осуществлять анализ эписигнатуры доступными таргетными методами, легко интегрируемыми в традиционный алгоритм молекулярно-генетической диагностики.

Для формирования достаточной для исследования выборки образцов, учитывая большую распространенность вариантов в гене *CREBBP* по сравнению с вариантами в гене *EP300*, было принято решение в настоящей работе рассматривать только СРТ 1 типа. Эписигнатура данной нозологической формы является интересной с точки зрения исследования границ применимости таргетных методов измерения уровня метилирования ДНК, поскольку максимальная разница в уровне метилирования отдельных CpG-динуклеотидов в разных участках генома между пациентами с СРТ 1 типа и здоровыми людьми колеблется в пределах 20–25% [3,10,11]. Интересной задачей представляется не только детектирование столь низких значений разницы в уровне метилирования ДНК доступными методами, но и изучение собственно эписигнатуры СРТ, которая ранее была определена как недостаточно чувствительная для использования в диагностической практике [12].

Методы

В работе использованы образцы ДНК пациентов, обследованных в ФГБНУ МГНЦ. В настоящем исследовании было проанализировано 60 образцов ДНК пациентов с установленными патогенными/вероятно патогенными вариантами в гене *CREBBP*, 6 образцов

ДНК пациентов с обнаруженными вариантами неопределенного значения в гене *CREBBP*, 4 образца ДНК пациентов с синдромами, фенотипически перекрывающимися с СРТ: Видеманна-Штейнера (1 образец), Флоатинг-Харбор (1 образец) и Корнелии де Ланге (2 образца), а также 34 образца ДНК здоровых людей.

В табл. 1 представлены CpG-динуклеотиды, которые были отобраны для анализа на основании исследования Tang Y. с соавт. как наиболее репрезентативные с точки зрения изменения уровня метилирования у пациентов с СРТ 1 типа [11]. Отбор CpG-динуклеотидов и формирование таргетных локусов проводили согласно трем условиям: 1) разница в уровне метилирования между патологическими и контрольными образцами должна превышать 15%; 2) взаимное расположение CpG-динуклеотидов, удовлетворяющих первому условию, должно позволять сформировать участки протяженностью 200-300 п.н., пригодные для секвенирования; 3) в одном таргетном локусе должно находиться не менее двух CpG-динуклеотидов.

Обработка электрофореграмм с помощью выбранных нами биоинформатических инструментов подразумевает расчет уровня метилирования не только в тар-

гетных CpG-динуклеотидах, отобранных для исследования по данным литературы, но и в близлежащих CpG-динуклеотидах, находящихся в рамках исследуемых локусов. Так, в работу были добавлены точки с координатами chr6:10556052, chr6:10556069, chr6:10556098, chr6:10556174, chr6:10556199, chr6:10556204, chr6:10556244 в локусе 3.2, точки с координатами chr2:206628484, chr2:206628491, chr2:206628521, chr2:206628525, chr2:206628529, chr2:206628531, chr2:206628539 в локусе 4.1, а также точки с координатами chr2:206628621, chr2:206628645 и chr2:206628714 в локусе 4.2, не представленные в оригинальном исследовании [11].

С целью уменьшения возможных погрешностей было принято решение рассматривать соседние CpG-сайты с аналогичным эпигенетическим поведением как один локус. По этому принципу были объединены точки с координатами chr6:10556204 и chr6:10556199 (локус 3.2); chr6:10556147 и chr6:10556107 (локус 3.2); chr2:206628521 и chr2:206628525 (локус 4.1); chr2:206628529 и chr2:206628531 (локус 4.1); chr2:206628645 и chr2:206628692 (локус 4.2) и chr2:206628727 и chr2:206628737 (локус 4.2).

Таблица 1. Перечень исследуемых CpG-динуклеотидов
Table 1. List of CpG dinucleotides studied

Обозначение локуса	Идентификатор зонда	Значение разницы в уровне метилирования, %	Геномная координата (сборка генома hg19)
2	cg16875104	-18,72779771	chr7:30635889
	cg03068497	-22,06949346	chr7:30635838
	cg21429551	-22,44998497	chr7:30635762
3.1	cg12242450	-20,91863895	chr6:10555808
	cg13347910	-18,95768459	chr6:10555853
	cg20812045	-21,85013189	chr6:10555881
3.2	cg12695465	-20,22041231	chr6:10556147
	cg05869816	-20,50925327	chr6:10556107
4.1	cg22308949	-17,05186729	chr2:206628553
	cg04088940	-19,00411119	chr2:206628454
4.2	cg10807027	-20,44400041	chr2:206628773
	cg05348875	-22,26405291	chr2:206628625
	cg10126788	-24,04856455	chr2:206628727
	cg14157435	-24,87043485	chr2:206628692
	cg25715429	-25,29336105	chr2:206628747
	cg20351668	-26,75453596	chr2:206628737

Молекулярно-генетические методы

Для анализа уровня метилирования ДНК использовали два метода: бисульфитное секвенирование по Сэнгеру и таргетное высокопроизводительное бисульфитное секвенирование. Исследуемые образцы ДНК подвергали бисульфитной конверсии с помощью набора EpiTect Fast Bisulfite Kit (QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя. Секвенирование по Сэнгеру локусов, имеющих максимальную разницу в уровне метилирования между опытными и контрольными образцами, осуществляли на приборе 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Для осуществления количественного анализа уровня метилирования ДНК секвенирование по Сэнгеру проводили в соответствии с модифицированным алгоритмом [13]. Данный алгоритм подразумевает создание шкалы измерения уровня метилирования в исследуемых локусах за счет секвенирования модельных ампликонов, не несущих метильных меток. В CpG-динуклеотидах вычисляли уровень неметилированного сигнала, и затем путём вычитания из уровня полного неметилированного сигнала, полученного из электрофореграмм с «нулевым» метилированием, рассчитывали уровень метилированного сигнала в опытных образцах.

Анализ уровня метилирования тех же локусов производили также с применением NGS. Библиотеки подготавливали в соответствии с протоколом производителя базового модуля Prep&Seq™ U-target DNA (Parseq Lab, Россия). Секвенирование осуществляли на приборе NextSeq500 (Illumina, США). Данные об уровне метилирования получали путем сравнения представленности цитозина и тимина в таргетных точках CpG-динуклеотидов.

Методы обработки данных

Для поиска CpG-сайтов, уровень метилирования которых наилучшим образом позволил бы разделить исследуемые образцы на два класса, проводили отбор предикторов с помощью метода «случайного леса» с применением алгоритма Борута [14]. На основе использования каждого из предикторов, признанных значимыми по отдельности, а также их возможных комбинаций создавали модели классификации образцов обучающей выборки. Для каждой из этих моделей рассчитывали параметры информативности диагностического теста, после чего локус, модель на основе которого демонстрировала лучшие результаты, отбирали для дальнейшей работы.

Для создания модели бинарной классификации использовали метод опорных векторов. Обучающую и тестовую выборки формировали путем случайного распределения нормальных и патологических образцов в соотношении 70:30, соответственно.

Результаты машинного обучения представляли с помощью линейного решающего правила, использующего пороговое значение для распределения исследуемых образцов обучающей и тестовой выборок по классам N (нормальные образцы) и P (патологические образцы).

Качество бисульфитной конверсии ДНК оценивалось в ходе биоинформатической обработки данных высокопроизводительного секвенирования. Средняя полнота бисульфитной конверсии составила 97,09%.

Результаты бисульфитного секвенирования по Сэнгеру

В ходе исследования локус 2 был исключен из работы в связи с невозможностью отработки условий для получения валидных электрофореграмм. Из 22 CpG-динуклеотидов, исследуемых методом бисульфитного секвенирования по Сэнгеру, при отборе предикторов уровня метилирования 16 точек были приняты как значимые признаки. Наибольшую значимость с точки зрения предиктивной способности в данном случае продемонстрировал локус, включающий точки с координатами chr6:10556107 и chr6:10556147 (рис. 1).

Наиболее высокие значения чувствительности, специфичности и точности продемонстрировала классифицирующая модель, использующая в качестве предиктора локус chr6:10556199_chr6:10556204. На рис. 2 представлен результат распределения нормальных и патологических образцов по двум классам в зависимости от уровня метилирования локуса chr6:10556199_chr6:10556204. В данном случае пороговое значение уровня метилирования, рассчитанное методом опорных векторов на образцах обучающей выборки, составило 80,30%. В обучающей выборке оказались один нормальный образец, который был распознан как патологический, а также 4 патологических образца, ошибочно отнесенных к классу «N». Все образцы тестовой выборки, классифицируемые в соответствии с установленным пороговым значением, были распределены по классам правильно.

На рис. 3 представлен результат анализа образцов обучающей и тестовой выборок, а также образцов с вариантами неопределенного значения в гене *CREBBP*

и образцов ДНК пациентов с синдромами, фенотипически перекрывающимися с СРТ.

Результаты таргетного высокопроизводительного бисульфитного секвенирования

На рис. 4 продемонстрирован результат отбора предикторов. Из 37 исследуемых сайтов уровни метилирования 29 CpG-динуклеотидов были определены как значимые предикторы, для двух сайтов результат оказался неопределенным. Наиболее значимым признаком был уровень метилирования локуса chr6:10556199_chr6:10556204.

С целью формирования обучающей и тестовой выборок для данной классифицирующей модели нормальные и патологические образцы вновь были перемешаны случайным образом. Пороговое значение уровня метилирования локуса chr6:10556199_chr6:10556204 в данном случае составило 84,45%. Из об-

разцов обучающей выборки неправильно были классифицированы два патологических образца, а из образцов тестовой выборки — один нормальный и два патологических образца (рис. 5).

Для оценки классифицирующей способности модели, как и в случае модели на основе бисульфитного секвенирования по Сэнгеру, были объединены все образцы, участвующие в исследовании, включая образцы с вариантами неопределенного значения в гене *CREBBP* и образцы с другими синдромами, фенотипически перекрывающимися с СРТ (рис. 6).

Обсуждение

При создании классифицирующей модели на основе бисульфитного секвенирования по Сэнгеру локус, отобранный методом «случайного леса» в качестве наиболее значимого, и локус, показавший лучший результат точности классификации, не совпали. Причиной подобного несоответствия может быть низкое качество

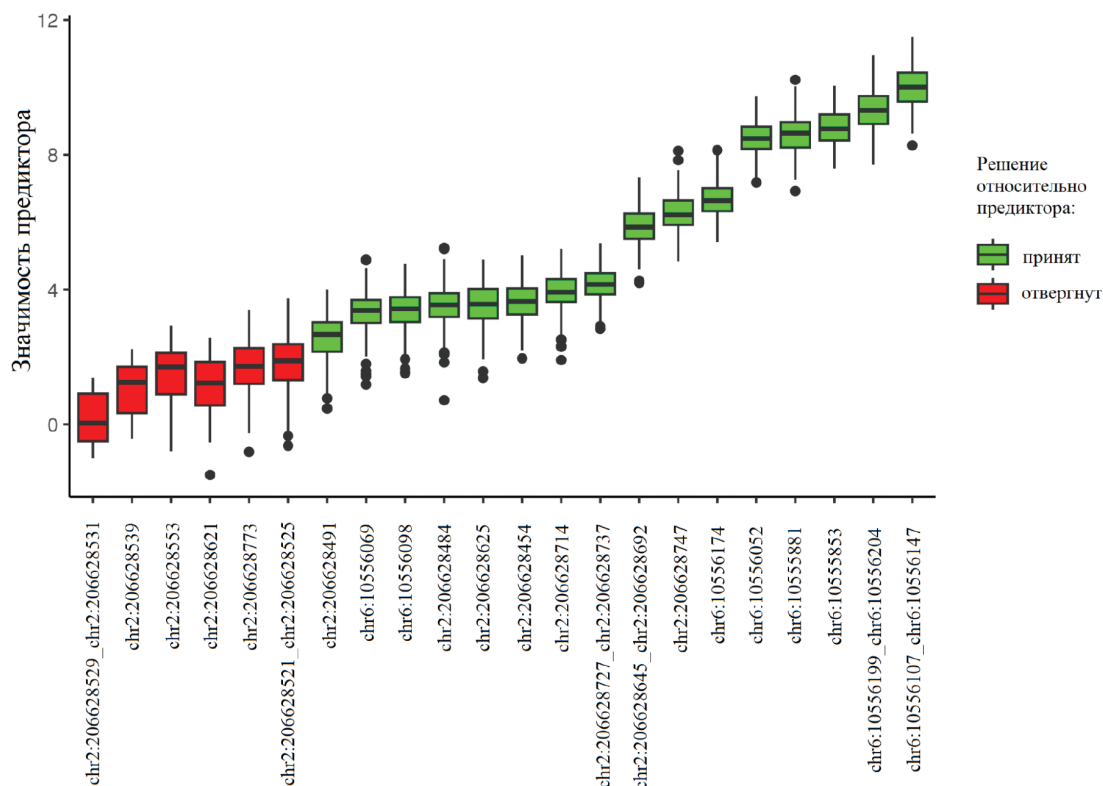


Рис. 1. Отбор предикторов для классифицирующей модели на основе бисульфитного секвенирования по Сэнгеру.

Fig. 1. Predictors selection for a classification model based on Sanger bisulfite sequencing.

распознавания точек chr6:10556147 и chr6:10556107 при секвенировании по Сэнгеру в части образцов, вследствие чего решение о значимости данного локуса в качестве предиктора принималось алгоритмом машинного обучения на основании неполных данных. Высокое качество прочтения всех CpG-динуклеотидов методом таргетного высокопроизводительного бисульфитного секвенирования, включая точки, находящиеся на крайних участках таргетных ампликонов, позволило значительно расширить перечень признаков, являющихся потенциально значимыми. Благодаря полноте данных, полученных при NGS, результат отбора предикторов подтвердил, что именно метилирование локуса chr6:10556199_chr6:10556204 является наиболее значимым для классификации образцов признаком. Стоит отметить, что уровень метилирования цито-

зина в контексте CpG с координатами chr6:10556199 и chr6:10556204 не анализировался ранее в работах, посвященных эпигенетике СРТ и базирующихся на широкогеномных методах изучения профиля метилирования ДНК. Приведенные в настоящем исследовании данные о высокой чувствительности и специфичности классифицирующих моделей с использованием в качестве предиктора локуса chr6:10556199-10556204 являются новыми и указывают на необходимость дальнейшего изучения особенностей эпигенетических заболеваний.

И бисульфитное секвенирование по Сэнгеру, и таргетное высокопроизводительное бисульфитное секвенирование продемонстрировали способность улавливать низкие значения разницы в уровне метилирования ДНК, за счет чего классифицирующие модели на

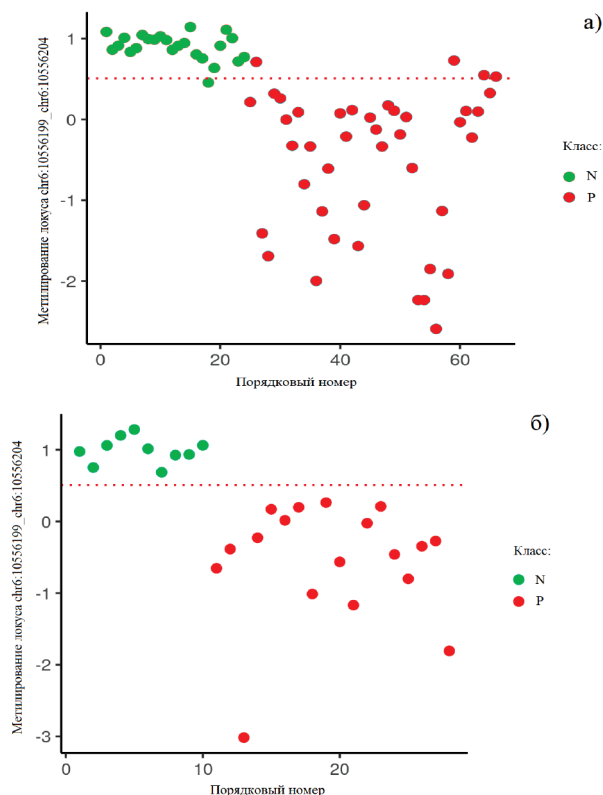


Рис. 2. Классификация образцов обучающей (а) и тестовой (б) выборок (классифицирующая модель на основе бисульфитного секвенирования по Сэнгеру). На оси ординат обозначен нормализованный уровень метилирования, полученный путем вычитания из каждого значения признака его среднего арифметического и деления полученного значения на стандартное отклонение.

Fig. 2. Classification of training (a) and test (b) samples (classification model based on Sanger bisulfite sequencing). The ordinate axis shows the normalized methylation level obtained by subtracting the arithmetic mean from each feature value and dividing the resulting value by the standard deviation.

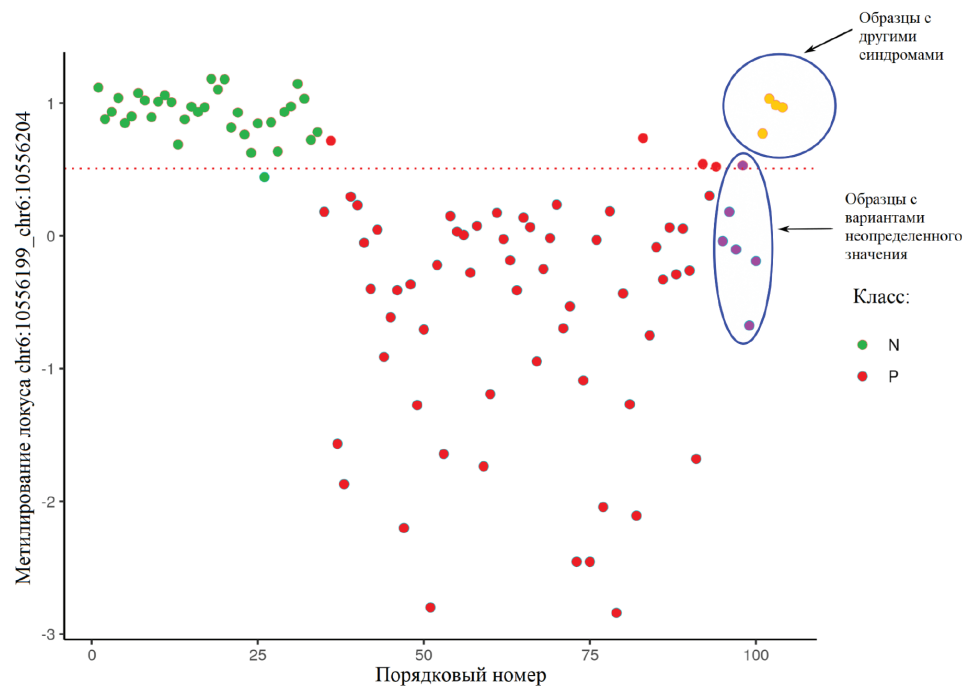


Рис. 3. Классификация полного набора образцов (классифицирующая модель на основе бисульфитного секвенирования по Сэнгеру).

Fig. 3. Full set of samples classification (Sanger bisulfite sequencing-based classification model).

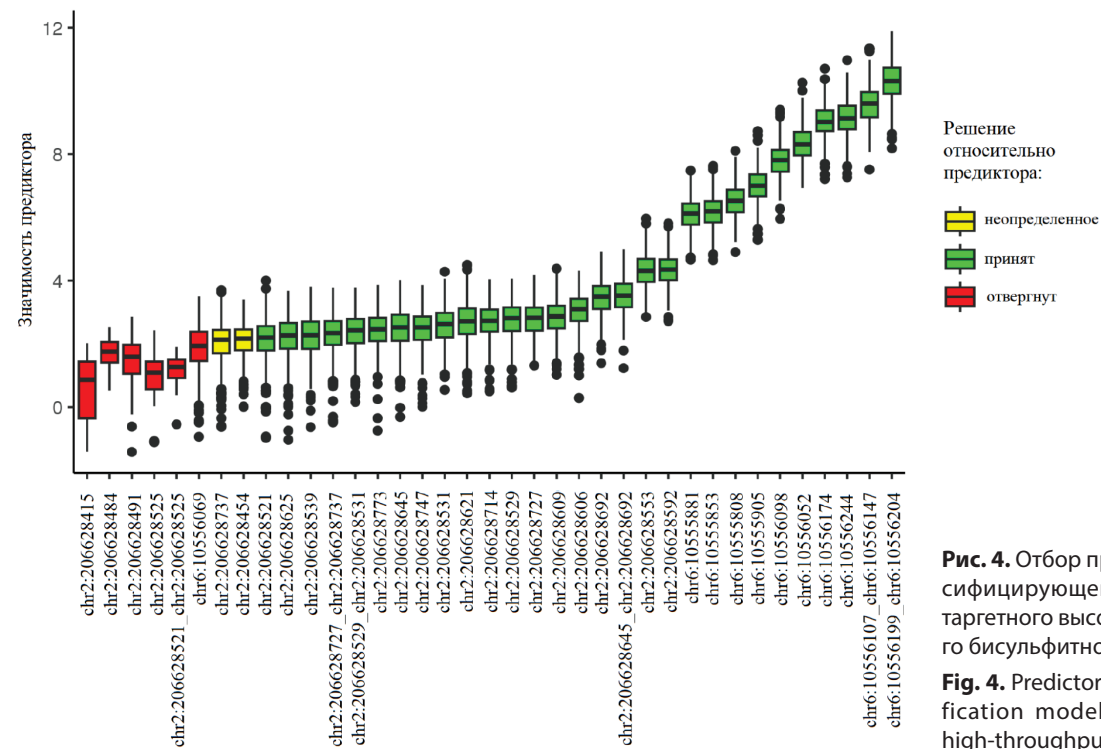


Рис. 4. Отбор предикторов для классифицирующей модели на основе таргетного высокопроизводительного бисульфитного секвенирования.

Fig. 4. Predictors selection for a classification model based on targeted high-throughput bisulfite sequencing

их основе показали высокие уровни чувствительности и специфичности. При объединении наборов данных можно наблюдать, что в обоих случаях неправильно классифицируется одинаковое количество образцов, а именно пять. Однако не все неправильно классифицированные образцы являются идентичными в двух моделях. Среди неправильно классифицированных три патологических образца — М2, М49 и М58 — были ошибочно отнесены к классу «N» в обоих случаях; оставшиеся два образца в двух моделях являются разными (табл. 2).

Значения уровня метилирования локуса chr6:10556199-10556204 каждого из этих образцов находятся относительно близко к пороговому значению и образуют «пограничную» зону, определяющую по-

грешность метода. Для ее более точного определения необходимо продолжить исследование, увеличивая размер выборки.

При добавлении в анализ образцов с установленными вариантами неопределенного значения в гене *CREBBP* для двух классифицирующих моделей наблюдается аналогичная картина: пяти образцам из шести присваивается класс «P». Несмотря на то, что идентификация эписигнатуры еще не готова для использования в качестве инструмента интерпретации значимости генетических вариантов, полученные данные могут свидетельствовать о том, что существует взаимосвязь между возникновением характерного фенотипа и изменением паттерна метилирования в соответствии с эписигнатурой синдрома.

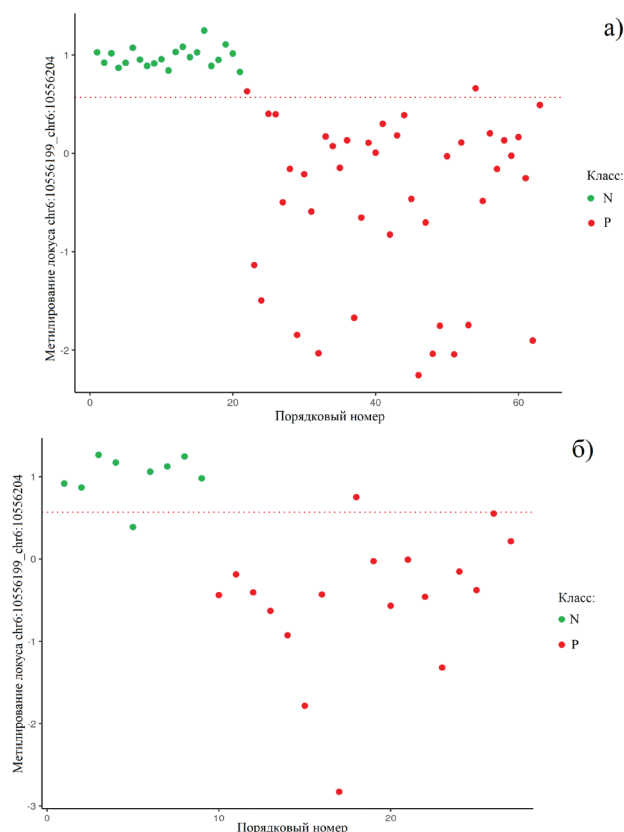


Рис. 5. Классификация образцов обучающей (а) и тестовой (б) выборок (классифицирующая модель на основе таргетного высокопроизводительного бисульфитного секвенирования). На оси ординат обозначен нормализованный уровень метилирования, полученный путем вычитания из каждого значения признака его среднего арифметического и деления полученного значения на стандартное отклонение.

Fig. 5. Classification of training (a) and test (b) samples (classification model based on targeted high-throughput bisulfite sequencing). The ordinate axis shows the normalized methylation level obtained by subtracting the arithmetic mean from each feature value and dividing the resulting value by the standard deviation.

В исследовании также демонстрируется, что уровень метилирования локуса chr6:10556199_chr6:10556204 у пациентов, страдающих синдромами, фенотипически перекрывающимися с СРТ, отличается от такового у пациентов с СРТ. Для более уверенного использования анализа эпигенотипа в целях диффе-

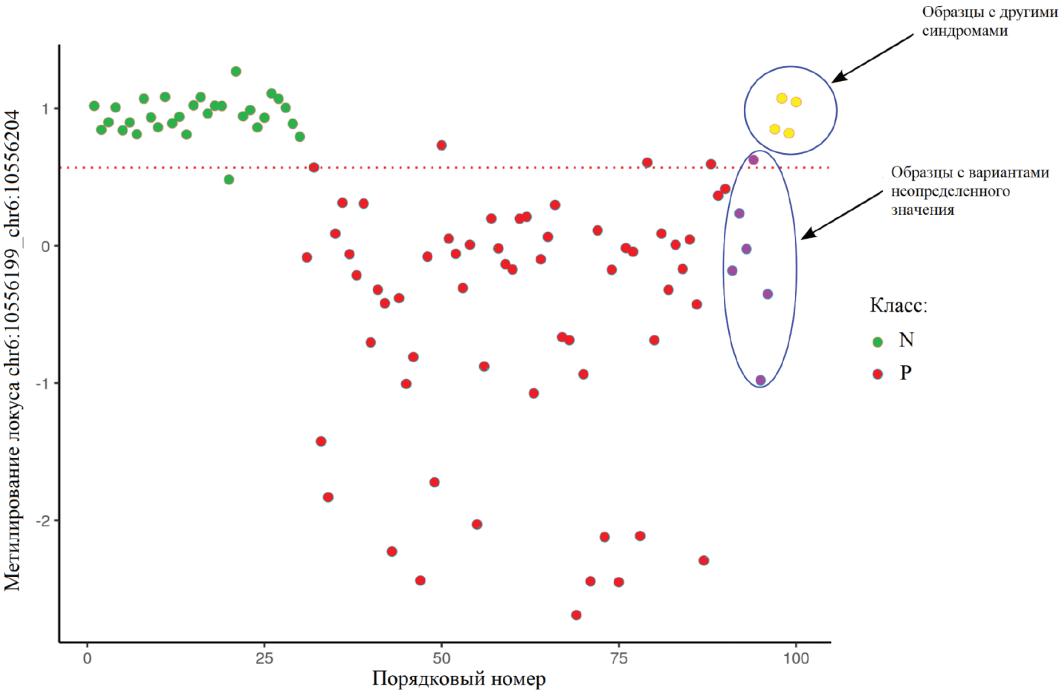


Рис. 6. Классификация полного набора образцов (классифицирующая модель на основе таргетного высокопроизводительного бисульфитного секвенирования).

Fig. 6. Full set of samples classification (classification model based on targeted high-throughput bisulfite sequencing).

Таблица 2. Образцы, неправильно классифицированные в каждой модели, и генетические варианты. Образцы N25 и N28 относятся к нормальным, образцы M2, M20, M49, M58 и M60 – к патологическим. Красный цвет ячейки таблицы соответствует ошибочному распределению образца в класс “P”, зеленый цвет – в класс “N”.

Table 2. Samples misclassified in each model and genetic variants. Samples N25 and N28 are normal, samples M2, M20, M49, M58 and M60 are abnormal. The red color of the cell corresponds to the erroneous assignment of the sample to class “P”, the green color – to class “N”.

Образец	Уровень метилирования (бисульфитное секвенирование по Сэнгеру)	Уровень метилирования (таргетное высокопроизводительное бисульфитное секвенирование)	Генетический вариант
N25	85,17%	83,48%	-
N28	79,55%	89,16%	-
M2	84,35%	84,75%	NM_004380.3(CREBBP):c.4074delT
M20	74,41%	87,09%	NM_004380.3(CREBBP):c.578_579del
M49	84,69%	85,26%	NM_004380.3(CREBBP):c.1890delA
M58	81,28%	85,1%	NM_004380.3(CREBBP):c.3610-1G>C
M60	80,93%	82,49%	NM_004380.3(CREBBP):c.4439A>G

рениальной диагностики требуется исследовать большее количество образцов ДНК пациентов с фенотипически схожими синдромами.

Таким образом, продемонстрированный подход к сокращению минимально необходимого числа исследуемых CpG-динуклеотидов для детектирования эпигенотипа представляет собой эффективный способ оптимизации диагностики хроматинопатий и может быть применен для многих других наследственных синдромов с известными эпигенотипами.

Благодарности. Высокопроизводительное секвенирование ДНК выполнено на оборудовании Центра коллективного пользования (ЦКП) «Геном» ФГБНУ МГНЦ.

References

1. Nava A.A., Arboleda V.A. The omics era: a nexus of untapped potential for Mendelian chromatinopathies. *Hum Genet.* 2024;143:475–495.
2. Larizza L., Finelli P. Developmental disorders with intellectual disability driven by chromatin dysregulation: Clinical overlaps and molecular mechanisms. *Clin Genet.* 2019;95(2):231–240.
3. Levy M.A., McConkey H., Kerkhof J. et al. Novel diagnostic DNA methylation epigenotypes expand and refine the epigenetic landscapes of Mendelian disorders. *HGG Adv.* 2021;3(1):100075.
4. Stevens C.A. Rubinstein-Taybi Syndrome. 2002 Aug 30 [Updated 2023 Nov 9]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2024. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1526/>
5. Van Gils J., Magdinier F., Fergelot P., Lacombe D. Rubinstein-Taybi Syndrome: A Model of Epigenetic Disorder. *Genes (Basel).* 2021;12(7):968.
6. Исмаилова О.Р., Бескоровая Т.С., Адян Т.А., Поляков А.В. Молекулярно-генетические основы синдрома Рубинштейна–Тейби. *Нервно-мышечные болезни.* 2023;13(2):31–41.
7. Awamleh Z., Goodman S., Choufani S. et al. DNA methylation signatures for chromatinopathies: current challenges and future applications. *Hum Genet.* 2024;143:551–557.
8. Chater-Diehl E., Goodman S.J., Cytrynbaum C., Turinsky A.L., Choufani S., Weksberg R. Anatomy of DNA methylation signatures: Emerging insights and applications. *Am J Hum Genet.* 2021;108(8):1359–1366.
9. Sadikovic B., Levy M.A., Kerkhof J. et al. Clinical epigenomics: genome-wide DNA methylation analysis for the diagnosis of Mendelian disorders. *Genet Med.* 2021;23:1065–1074.
10. Aref-Eshghi E., Kerkhof J., Pedro V.P. et al. Evaluation of DNA Methylation Epigenotypes for Diagnosis and Phenotype Correlations in 42 Mendelian Neurodevelopmental Disorders. *Am J Hum Genet.* 2020;106(3):356–370.
11. Tang Y., Ye X., Zhan Y. et al. Preprint from Research Square, 15 Mar 2023 Correlations between phenotype and gene region-specific epigenotypes in Rubinstein-Taybi syndrome and Menke-Hennekam syndrome. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2671798/v1>
12. Husson T., Lecoquierre F., Nicolas G. et al. Epigenotypes in practice: independent evaluation of published epigenotypes for the molecular

diagnostics of ten neurodevelopmental disorders. *Eur J Hum Genet.* 2024;32(2):190–199.

13. Karpenko D.V. A Method Using One Fluorophore Signal in Sanger Read to Determine CpG Methylation in Bisulfite Converted DNA. *Russ J Genet.* 2023;59(11):1255–1262.
14. Kursa M.B., Jankowski A., Rudnicki, W.R. (2010). Boruta - A System for Feature Selection. *Fundam. Informaticae.* 2010; 101: 271–285.

References

1. Nava A.A., Arboleda V.A. The omics era: a nexus of untapped potential for Mendelian chromatinopathies. *Hum Genet.* 2024;143:475–495.
2. Larizza L., Finelli P. Developmental disorders with intellectual disability driven by chromatin dysregulation: Clinical overlaps and molecular mechanisms. *Clin Genet.* 2019;95(2):231–240.
3. Levy M.A., McConkey H., Kerkhof J. et al. Novel diagnostic DNA methylation epigenotypes expand and refine the epigenetic landscapes of Mendelian disorders. *HGG Adv.* 2021;3(1):100075.
4. Stevens C.A. Rubinstein-Taybi Syndrome. 2002 Aug 30 [Updated 2023 Nov 9]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2024. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1526/>
5. Van Gils J., Magdinier F., Fergelot P., Lacombe D. Rubinstein-Taybi Syndrome: A Model of Epigenetic Disorder. *Genes (Basel).* 2021;12(7):968.
6. Ismagilova O.R., Beskorovaynaya T.S., Adyan T.A., Polyakov A.V. Молекулярно-генетические основы синдрома Рубинштейна–Тейби [Молекулярно-генетические основы синдрома Рубинштейна–Тейби]. *Нервно-мышечные болезни [Neuromuscular Diseases]*. 2023;13(2):31–41. (In Russ.) <https://doi.org/10.17650/2222-8721-2023-13-2-31-41>
7. Awamleh Z., Goodman S., Choufani S. et al. DNA methylation signatures for chromatinopathies: current challenges and future applications. *Hum Genet.* 2024;143:551–557.
8. Chater-Diehl E., Goodman S.J., Cytrynbaum C., Turinsky A.L., Choufani S., Weksberg R. Anatomy of DNA methylation signatures: Emerging insights and applications. *Am J Hum Genet.* 2021;108(8):1359–1366.
9. Sadikovic B., Levy M.A., Kerkhof J. et al. Clinical epigenomics: genome-wide DNA methylation analysis for the diagnosis of Mendelian disorders. *Genet Med.* 2021;23:1065–1074.
10. Aref-Eshghi E., Kerkhof J., Pedro V.P. et al. Evaluation of DNA Methylation Epigenotypes for Diagnosis and Phenotype Correlations in 42 Mendelian Neurodevelopmental Disorders. *Am J Hum Genet.* 2020;106(3):356–370.
11. Tang Y., Ye X., Zhan Y. et al. Preprint from Research Square, 15 Mar 2023 Correlations between phenotype and gene region-specific epigenotypes in Rubinstein-Taybi syndrome and Menke-Hennekam syndrome. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2671798/v1>
12. Husson T., Lecoquierre F., Nicolas G. et al. Epigenotypes in practice: independent evaluation of published epigenotypes for the molecular diagnostics of ten neurodevelopmental disorders. *Eur J Hum Genet.* 2024;32(2):190–199.
13. Karpenko D.V. A Method Using One Fluorophore Signal in Sanger Read to Determine CpG Methylation in Bisulfite Converted DNA. *Russ J Genet.* 2023;59(11):1255–1262.
14. Kursa M.B., Jankowski A., Rudnicki, W.R. (2010). Boruta - A System for Feature Selection. *Fundam. Informaticae.* 2010; 101: 271–285.