

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2024.09.49-58>

Молекулярно-генетическая диагностика мозаичных форм заболеваний с использованием дуплекс-специфической нуклеазы на примере PIK3CA-ассоциированного спектра заболеваний избыточного роста

Пустовалова А.В.¹, Николаева А.Ф.¹, Петрова К.О.², Бычкова Е.В.¹, Сигин В.О.¹, Стрельников В.В.¹

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

2 – ФГБУ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»
123182 г. Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1

Введение. Обнаружение интересующих генетических вариантов при мозаичных формах заболеваний может быть существенно осложнено малой представленностью таковых в биологическом материале, взятом для анализа. Существует широкий спектр методологических подходов для выявления редких генетических вариантов в клинико-лабораторной диагностике, однако не все они могут быть доступны для многих лабораторий из-за различных ограничений. Метод с применением дуплекс-специфической нуклеазы (ДСН) с последующим секвенированием по Сэнгеру нацелен на обнаружение низкопредставленных однонуклеотидных генетических вариантов практически в любой точке генома.

Цель: усовершенствование метода молекулярно-генетической диагностики мозаичных форм генетических заболеваний с применением ДСН на примере PIK3CA-ассоциированного спектра избыточного роста (PROS).

Методы. Материалом для исследования послужила ДНК из лейкоцитов периферической крови и биоптатов тканей. Для определения аналитических свойств метода моделировали уровень представленности альтернативного аллеля путём добавления в реакционную смесь образцов ДНК, гомозиготных по полиморфному и референсному вариантам, в разном соотношении.

Результаты. Минимально достоверно детектируемый уровень представленности альтернативного аллеля составил 1,5%. С использованием метода, основанного на применении ДСН, были подтверждены ранее выявленные на NGS-панели с глубоким покрытием генетические варианты PIK3CA у 9 пациентов с клиническими проявлениями PROS.

Ключевые слова: дуплекс-специфическая нуклеаза, секвенирование по Сэнгеру, мозаицизм, PROS.

Для цитирования: Пустовалова А.В., Николаева А.Ф., Петрова К.О., Бычкова Е.В., Сигин В.О., Стрельников В.В. Молекулярно-генетическая диагностика мозаичных форм заболеваний с использованием дуплекс-специфической нуклеазы на примере PIK3CA-ассоциированного спектра заболеваний избыточного роста. *Медицинская генетика*. 2024; 23(9): 49-58.

Автор для корреспонденции: Пустовалова Анна Васильевна; e-mail: a_pustovalova02@inbox.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ МГНЦ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 09.09.2024

Molecular genetic diagnosis of mosaic forms using duplex-specific nuclease in patients with PIK3CA-related overgrowth spectrum

Pustovalova A.V.¹, Nikolaeva A.F.¹, Petrova K.O.², Bychkova E.V.¹, Sigin V.O.¹, Strelnikov V.V.¹

1 – Research Centre for Medical Genetics
1, Moskvorechye st., Moscow, 115522, Russian Federation

2 – Kurchatov Institute
1, Akademika Kurchatova square, Moscow, 123182, Russian Federation

Background. The detection of genetic variants of interest in mosaic disease can be significantly complicated by the low representation of such variants in the biological material taken for analysis. There is a wide range of methodological approaches for the detection of rare genetic variants in clinical and laboratory diagnostics, but not all of them may be available to many laboratories due to various limitations. A method using duplex-specific nuclease followed by Sanger sequencing aims to detect low-representation single-nucleotide genetic variants virtually anywhere in the genome.

Aim: to improve the method of molecular genetic diagnostics of mosaic forms of genetic diseases using duplex-specific nuclease (DSN) on the example of PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS).

Methods. DNA from peripheral blood leukocytes and tissue biopsies was used as a material for the study. To determine the analytical properties of the method, the level of alternative allele representation was modeled by adding DNA samples homozygous for polymorphic and reference variants to the reaction in different ratios.

Results. The minimum reliably detectable level of alternative allele representation was 1.5%. Using the DSN-based method, the PIK3CA genetic variants previously detected on the NGS panel with high coverage in 9 patients with clinical manifestations of PROS were confirmed.

Keywords: duplex-specific nuclease; Sanger sequencing; mosaicism; PROS.

For citation: Pustovalova A.V., Nikolaeva A.F., Petrova K.O., Bychkova E.V., Sign V.O., Strelnikov V.V. Molecular genetic diagnosis of mosaic forms using duplex-specific nuclease in patients with PIK3CA-related overgrowth spectrum. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]*. 2024; 23(9): 49-58. (In Russ.)

Corresponding author: Anna V. Pustovalova; **e-mail:** a_pustovalova02@inbox.ru

Funding. The study has been funded by the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for RCMG.

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

Accepted: 09.09.2024

Введение

Обнаружение интересующих генетических вариантов при мозаичных формах заболеваний может быть существенно осложнено малой представленностью таковых в биологическом материале, взятом для анализа. К ошибкам диагностики могут приводить недостаточная чувствительность используемых методов и отсутствие возможности валидации полученных результатов. PIK3CA-ассоциированный спектр заболеваний избыточного роста (PIK3CA-related overgrowth spectrum, PROS) – группа редких синдромов, причиной которых являются соматические постзиготические изменения в гене PIK3CA, приводящие к мозаичным формам патологий [1]. PIK3CA кодирует p110 α каталитическую субъединицу фосфоинозитид-3-киназы класса IA (PI3K α), участвующую в сигнальном пути PI3K/PDEN/АКТ/TSC/mTORC. Патогенные соматические варианты генов этого сигнального пути и, как следствие, усиление или ослабление экспрессии соответствующих генов, могут способствовать развитию спектра аномалий роста, затрагивая изолированный участок тканей или стимулируя формирование крупных новообразований. Такие варианты классифицированы как приводящие к усилению функции белка («gain-of-function») и вызывают физиологически неадекватный рост жировой, мышечной, костной, нервной тканей, кровеносных и лимфатических сосудов, кожи [2,3]. Влияние генетических вариантов на жировые и сосудистые компоненты особенно выражено и объясняется присущими этим тканям пластичностью и высоким потенциалом постнатального роста [4].

На данный момент существует ряд методик детекции малопредставленных генетических вариантов, например, аллель-специфическая полимеразная цепная реакция (ПЦР), цифровая капельная ПЦР, NGS (Next Generation Sequencing, секвенирование нового поколения) с глубоким покрытием. Каждая имеет

как преимущества, так и ограничения. В основном, ограничения заключаются в недостаточной чувствительности, дороговизне и необходимости валидации результата. Метод, основанный на элиминации аллеля дикого типа путём ферментативного гидролиза дуплекс-специфической нуклеазой (ДСН) и последующего секвенирования по Сэнгеру, позволяет генотипировать вариант с низким VAF (variant allele frequency, представленностью альтернативного аллеля) практически в любой точке генома и подходит для использования как в первой линии диагностики, так и в качестве валидирующего метода.

ДСН – термостабильная нуклеаза, которая гидролизует преимущественно двухцепочечную ДНК. Фермент был выделен и очищен из гепатопанкреаса камчатского краба (*Paralithodes camtschaticus*) в 2002 г. ДСН – высокостабильный фермент, эффективно работающий при широком диапазоне условий [5]. Благодаря высокой термостабильности и своему уникальному свойству гидролизовать полностью комплементарные дуплексы ДНК нуклеаза успешно применяется в разнообразных уникальных молекулярных протоколах, в частности, для генотипирования однонуклеотидных вариантов [5–8].

В данной работе описываются основные этапы разработки тест-системы с использованием ДСН и последующим секвенированием по Сэнгеру для детекции генетических вариантов с низкой представленностью и качественная оценка минимальной чувствительности применяемого подхода.

Материалы и методы

В качестве материала для создания модельных систем использовали ДНК из лейкоцитов периферической крови. Для генотипирования пациентов

с клиническими признаками PROS и выявленными генетическими вариантами *PIK3CA* отбирали свежемороженый биопат из очага патологического разрастания тканей. Пациенты, вошедшие в исследование, были направлены на молекулярно-генетическую диагностику в лабораторию эпигенетики Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова. Письменное информированное добровольное согласие на участие в научном исследовании было получено от всех пациентов.

Выделение и оценка качества ДНК

ДНК выделяли согласно стандартному протоколу фенол-хлороформной экстракции [9]. Качество выделенной ДНК оценивали на спектрофотометре Nano-500 (Allsheng, Китай), концентрацию определяли на приборе Qubit 2.0 с использованием набора QuDye dsDNA BR (Lumiprobe, Россия) по стандартному протоколу производителя.

Критерии подбора праймеров

Главными критериями для подбора праймеров были специфичность, отсутствие димеров, шпилек и известных SNV (single nucleotide variant, однонуклеотидный вариант) в локусе гибридизации. Праймеры для проведения ПЦР подбирали так, чтобы интересующий вариант находился в середине ПЦР-продукта, длина ПЦР-продукта составляла 140–200 п.н., как наибо-

лее подходящая для ферментативного гидролиза ДСН и последующего секвенирования по Сэнгеру с обоих концов продукта (табл. 1). Анализ геномных последовательностей (выбор целевых районов и наличие SNV) проводили в геномном браузере UCSC Genome Browser (GRCh37/hg19). Дизайн праймеров проводили с помощью программы PrimerBlast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), специфичность оценивали с помощью инструмента MFEprimer v.3.1 (<https://mfeprimer3.igenetech.com/spec>).

Подбор специфичных праймеров был осложнен наличием псевдогена на хромосоме 22 в позиции 22q11.1 длиной 2613 п.н. [10]. В том случае, когда исследуемый регион давал неспецифические продукты реакции, подбирали пару праймеров для гнездовой ПЦР (табл. 2) и пару праймеров на исследуемый вариант.

Аmplификация целевых областей

Целевые локусы, включающие исследуемый SNV, предварительно амплифицировали. На первом этапе проводили амплификацию продуктов длиной 3404 п.н. с праймерами, сайт посадки которых находится вне гомологичной псевдогену последовательности, затем продукты амплификации подвергались очистке посредством экстракции из агарозного геля, чтобы не допустить попадания геномной ДНК в реакции следующих этапов протокола. Далее следовал этап амплификации целевого продукта.

Таблица 1. Последовательности праймеров и характеристика условий ПЦР

Table 1. Primer sequences and characteristics of PCR conditions

<i>rs (dbSNP)</i>	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Температура отжига, °C	Длина продукта ПЦР, п.н.
<i>PIK3CA</i> /rs1576935161	F: GTCTATCGAGTGTGTGCATATGTG R: CTTACCTGGGATTGGAACAAGG	66	160
<i>PIK3CA</i> /rs1057519925	F: TGGCATGGGGAAATATAAACT R: CCTTACTTTATTTGGATTTGATCC	60	146
<i>PIK3CA</i> /rs121913273	F: TTACAGAGTAACAGACTAGCT R: AAAAAGAAACAGAGAATCTCCA	62	167
<i>PIK3CA</i> /rs121913274			
<i>PIK3CA</i> /rs121913286			
<i>PIK3CA</i> /rs397517201			
<i>PIK3CA</i> /rs104886003	F: GATGCAGCCATTGACCT R: GAACACCAAAACATTTTAAACAGA	58	150
<i>PIK3CA</i> /rs587776932			

Примечание. dbSNP – база данных полиморфизма отдельных нуклеотидов центрального института обработки и хранения данных молекулярной биологии (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>).

Алгоритм формирования системы ДНК-зондов для ферментативного гидролиза ДСН

Для формирования условий, в которых элиминируются последовательности дикого типа, разработали системы из ДНК-зондов с перекрывающейся областью гибридизации (рис. 1, табл. 3). Необходимо, чтобы пара зондов, каждый из которых длиной 18-23 нуклеотида, была комплементарна смысловой и антисмысловой цепям ДНК референсной последовательности и была подобрана так, чтобы ее температура плавления лежала в оптимуме работы ДСН, при этом температура гибридизации зондов между собой была ниже диапазона температуры реакции с ДСН, чтобы предотвратить образование димеров и снижение эффективности реакции. Разница температуры плавления зондов с матрицей и между собой достигалась за счет взаимной комплементарности только 10 нуклеотидов с 3'-концов каждого зонда. Точка исследуемого варианта находилась в 5-6 позиции с 3'-конца каждого зонда.

Моделирования уровня VAF

Для определения аналитических свойств метода молекулярно-генетической диагностики мозаичных форм с использованием ДСН моделировали уровень представленности альтернативного аллеля путём добавления в реакционную смесь образцов ДНК, гомозиготных по полиморфному и референсному вариантам в гене *TSC2*, в разном соотношении. Образцы ДНК с вариантами NM_000548.5(*TSC2*):c.5260-49C>T и NM_000548.5(*TSC2*):c.976-100C>G в гомозиготном состоянии были предоставлены лабораторией эпигенетики ФГБНУ МГНЦ. Образцы, гомозиготные по референсному и альтернативному аллелям, проверили на 100% VAF секвенированием по Сэнгеру. Таким образом, создали 6 модельных систем, имитирующих уровень VAF 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1,5% и 0,6% (табл. 4).

Геномную ДНК предварительно амплифицировали в локусах интереса, продукты реакции очищали на магнитных частицах Ampure XP Beads (Beckman

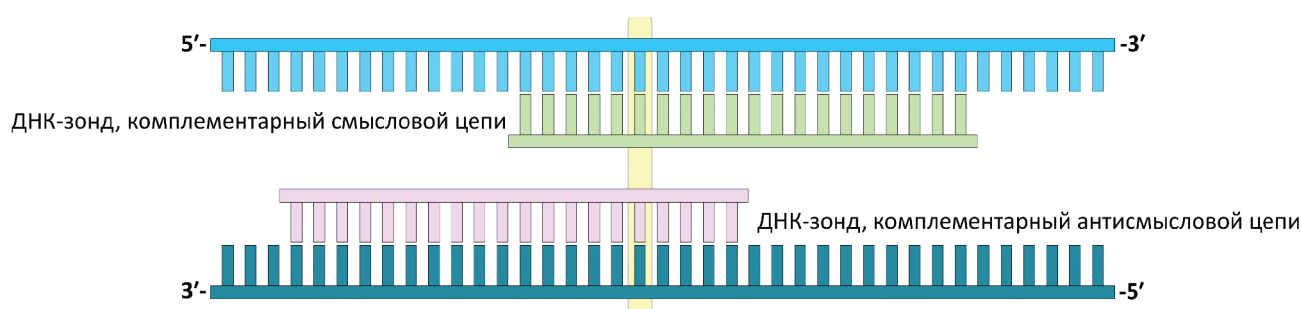


Рис. 1. Схема гибридизации перекрывающихся ДНК-зондов: голубым и тёмно-синим цветом обозначена двухцепочечная ДНК-матрица, желтым – точка исследуемого однонуклеотидного варианта, зелёным – зонд, комплементарный смысловой цепи ДНК, лиловым – зонд, комплементарный антисмысловой цепи ДНК.

Fig. 1. Scheme of hybridization of overlapping DNA probes: the double-stranded DNA matrix is shown in light blue and dark blue, the point of the studied single-nucleotide variant is shown in yellow, the probe complementary to the sense DNA strand is shown in green, and the probe complementary to the antisense DNA strand is shown in purple.

Таблица 2. Последовательности праймеров и характеристика условий гнездовой ПЦР

Table 2. Primer sequences and characteristics of nest PCR conditions

<i>rs (dbSNP)</i>	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Температура отжига, °C	Длина продукта ПЦР, п.н.
<i>PIK3CA/rs121913273</i>	F: GCTTCTTTTCTGATAAATCG R: TTTAGTTTTGAATTTACTGCTTTT	56	3404
<i>PIK3CA/rs121913274</i>			
<i>PIK3CA/rs121913286</i>			
<i>PIK3CA/rs397517201</i>			
<i>PIK3CA/rs104886003</i>			

Coulter, США) и измеряли концентрацию набором QuDye dsDNA HS (Lumiprobe, Россия). ПЦР-продукты разводили до концентрации 1 нг/мкл и смешивали в различном соотношении для получения градации образцов по уровню представленности альтернативного аллеля.

Ферментативная реакция ДСН

Для ферментативной реакции использовали коммерческий набор «Дуплекс-специфическая нуклеаза» (Евроген, Россия) согласно протоколу, представленному в табл. 5. Условия реакции подбирали опытным путем.

ДСН (1 ед./мкл) предварительно разводили до 0,2 ед./мкл смесью 100% глицерина и буфера для хранения ДСН (1:1). Для использования в ферментативной реакции ДСН образцы предварительно разводили деионизированной водой до концентрации 0,001 нг/мкл.

Реакцию проводили в амплификаторе Genesy 96T (Tianlong, Китай) по протоколу: 98°C – 2 минуты, денатурация; 55-65°C – добавление ДСН, инкубация в течение 20 мин; 96°C – 3 минуты, инактивация (рис. 2).

Секвенирование по Сэнгеру

Секвенирующую реакцию проводили в амплификаторе GeneAmp 9700 (ThermoFisher Scientific, США) с использованием набора BrilliantDye Terminator, v 3.1 (NimaGen, Нидерланды) по стандартному протоколу в 10 мкл итоговой смеси. Протокол секвенирую-

щей реакции включал в себя следующие этапы: 96°C – 1 минута, 25-40 циклов (в зависимости от концентрации ДНК в реакции): 96°C – 10 сек, 55°C – 5 сек, 60°C – 75 сек. Полученный продукт реакции очищали на колонках с использованием сефадекса G50 (Вектон, Россия). Очищенный образец денатурировали в 20 мкл формамида Hi-Di (ThermoFisher Scientific, США) в течение 5 минут при 95°C и анализировали с использованием капиллярного ДНК-секвенатора 3500 Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific, США). Анализ полученных хроматограмм проводили с использованием программного обеспечения Chromas 1.45 (Technelysium).

Результаты

Мы оптимизировали метод избирательной элиминации аллеля дикого типа, основанный на использовании ДНК-зондов и ферментативном гидролизе ДСН. Для оценки чувствительности метода провели моделирование уровня представленности альтернативного аллеля 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1,5%, 0,6% с использованием образцов с гомозиготными вариантами по альтернативному и референсному аллелям в гене *TSC2*. По результатам приведенного исследования минимальный уровень VAF, надежно детектируемый на хроматограммах и отличный от «фонового шума», составил 1,5%. Флуоресцентный пик минорного нуклеотидного варианта с уровнем представленности 0,6% достоверно не определяется (рис. 3).

Таблица 3. Характеристика ДНК-зондов для детектирования уровня VAF в гене *PIK3CA* (NM_006218.4).

Table 3. Characteristics of DNA probes for detecting VAF levels in the *PIK3CA* gene (NM_006218.4).

Исследуемый вариант в гене <i>PIK3CA</i>	Последовательность зондов смысловой цепи (5'→3')	Последовательность зондов антисмысловой цепи (5'→3')	Tm зонды-матрица, °C	Tm зонд-зонд, °C
c.1090G>A, p.(Gly364Arg)	TCACATAAGGGTTCCTCCAT	CAGGTATCTACCATGGAGGAGA	62,5	33
c.1357G>A, p.(Glu453Lys)	GGGTTTCAGCAAATCTTCTAATC	CAGTACCTCATGGATTAGAAGA	59	26,5
c.1624G>A, p.(Glu542Lys)	CTGCTCAGTGATTCAGAGA	ACGAGATCCTCTCTGAAAT	59,5	27
c.1633G>A, p.(Glu545Lys)	AATCTTTCTCCTGCTCAGTG	TCTCTGAAATCACTGAGCAG	59,5	40
c.1634A>G, p.(Glu545Gly)				
c.1636C>A, p.(Gln546Lys)	GAAAATCTTTCTCCTGCTCA	CTGAAATCACTGAGCAGGAG	59	40
c.1637A>G, p.(Gln546Arg)				
c.2740G>A, p.(Gly914Arg)	ATTGTGACGATCTCCAATTC	TTCATTTGGGAATTGGAGA	57,5	32
c.3145G>A, p.(Gly1049Ser)	TTGTCCAGCCACCATGAT	AATGATGCACATCATGGTGG	60,8	37,5

Примечание: Tm – расчётная температура плавления; полужирным начертанием выделена область перекрывания зондов.

Таблица 4. Соотношение объемов гомозиготных образцов по референсному (REF) и альтернативному (ALT) вариантам.

Table 4. Ratio of volumes of homozygous samples by reference (REF) and alternative (ALT) variants.

Объем ALT, мкл	Объем REF, мкл	Моделируемый уровень VAF, %
2	8	20
1	9	10
1	19	5
1	39	2,5
1	79	1,5
1	159	0,6

Таблица 5. Реакционная смесь для ферментативной реакции с использованием ДСН, из расчёта на один образец.

Table 5. Reaction mixture for the enzymatic reaction using DSN, per sample.

Компонент	Объем, мкл
10x Реакционный буфер ДСН	1
ДНК-зонд, комплементарный смысловой цепи, 2 мкМ	1
ДНК-зонд, комплементарный антисмысловой цепи, 2 мкМ	1
Образец (0,001 нг/мкл)	1
Деионизированная вода	5
ДСН (0,2 ед./мкл)	1
Итоговый объем	10

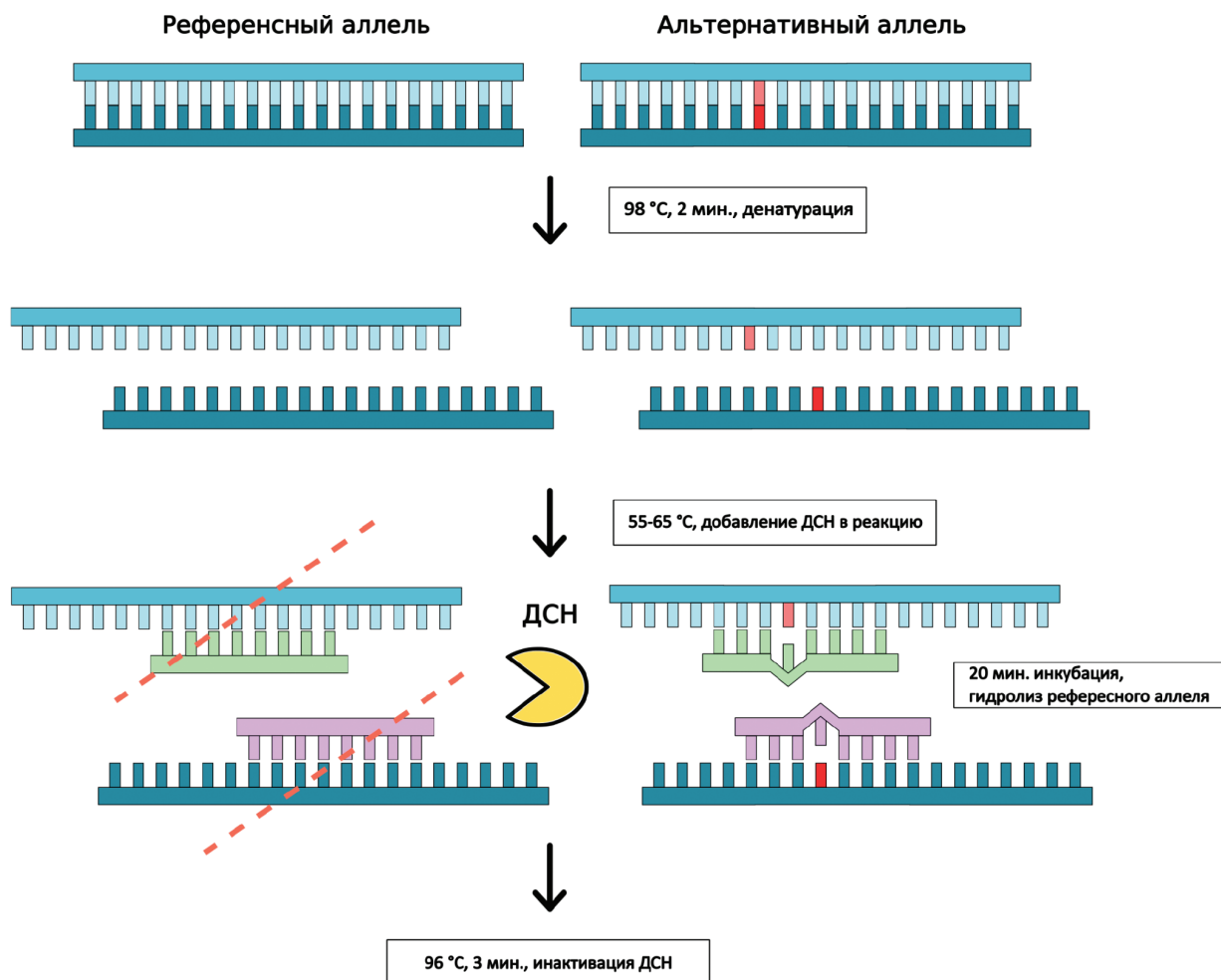


Рис. 2. Схема принципа ферментативного гидролиза с использованием ДСН.

Fig. 2. Diagram of the principle of enzymatic hydrolysis using DSN.

С использованием метода, основанного на применении ДСН, мы генотипировали 9 пациентов с клиническими признаками PROS, уровнем представленности альтернативного аллеля от 17% до 4% и с обнаруженными ранее на NGS-панели с глубоким покрытием полиморфными вариантами в гене *PIK3CA* (табл. 6, рис. 4).

Обсуждение

Все обнаруженные на NGS варианты нуклеотидной последовательности должны подтверждаться секвенированием по Сэнгеру [11]. С использованием секвенирования по Сэнгеру можно обнаружить генетический вариант, находящийся не менее чем в 10–20% процентах от общего числа клеток собранного биоматериала [12]. Такие ограничения могут помешать постановке или подтверждению верного диагноза и назначению соответствующего лечения в случае малой представленности альтернативного аллеля. Ненахождение варианта нуклеотидной последовательности в гене *PIK3CA* не противоречит диагнозу PROS, так как может быть объяснено недостаточным количеством биологического материала и ограничениями чувствительности методов диагностики [13]. Помимо диагностических целей существует необходимость молекулярно-генетической валидации вариантов в *PIK3CA* пациентам с клинической картиной PROS для назначения специфического ингибитора PI3Kα алпелисиба [14].

Для точной верификации диагноза необходимы молекулярно-генетические методы, которые могли бы использовать лаборатории даже с минимальным техническим обеспечением. Между тем, генетические варианты

в гене *PIK3CA*, как упоминалось выше, являются соматическими, а, следовательно, мозаичными, что вносит существенный вклад в проблему диагностики заболевания. Отодвигая в сторону преаналитический этап лабораторных исследований с проблемой подготовки пациента к инвазивным хирургическим манипуляциям и правильной процедуре взятия биоматериала, мы обращаем внимание на вопрос разработки новых методов анализа мозаичных форм заболеваний на примере PROS.

Метод избирательной элиминации аллеля дикого типа, основанный на уникальных свойствах ДСН, обладает некоторыми ограничениями. Сложности могут возникать на этапе подбора специфичных праймеров и зондов, которые будут соответствовать всем требованиям ДСН-реакции. Локусу гена *PIK3CA*, содержащему наиболее подверженные мутагенезу «горячие точки», соответствует псевдоген, находящийся на хромосоме 22. Амплифицировать фрагмент интереса и избежать параллельной амплификации участка на псевдогене можно, используя гнездовую ПЦР. Такой подход накладывает ограничения, связанные со спецификой гнездовой ПЦР: для первичной амплификации ПЦР-продукта более 1000 п.н. необходима нефрагментированная матрица. В связи с этим исследователь, работая с образцами, полученными из FFPE блоков, может столкнуться с некоторыми трудностями молекулярно-генетической диагностики.

Патогенные генетические варианты *PIK3CA* также обнаруживаются при некоторых видах онкологических заболеваний [15]. Существуют разработанные тест-системы, которые применяют в диагностике онкологических заболеваний для валидации патоген-

Таблица 6. Варианты нуклеотидной последовательности гена *PIK3CA* (RefSeq; NM_006218.4).

Table 6. *PIK3CA* gene variants of the nucleotide sequence (RefSeq; NM_006218.4).

№	Положение в кДНК	Эффект	VAF, %
1	c.1624G>A	p.Glu542Lys	17
2	c.1634A>G	p.Glu545Gly	12
3	c.1357G>A	p.Glu453Lys	9
4	c.3145G>A	p.Gly1049Ser	9
5	c.1636C>A	p.Gln546Lys	7
6	c.1090G>A	p.Gly364Arg	5
7	c.1633G>A	p.Glu545Lys	5
8	c.2740G>A	p.Gly914Arg	4
9	c.1637A>G	p.Gln546Arg	4

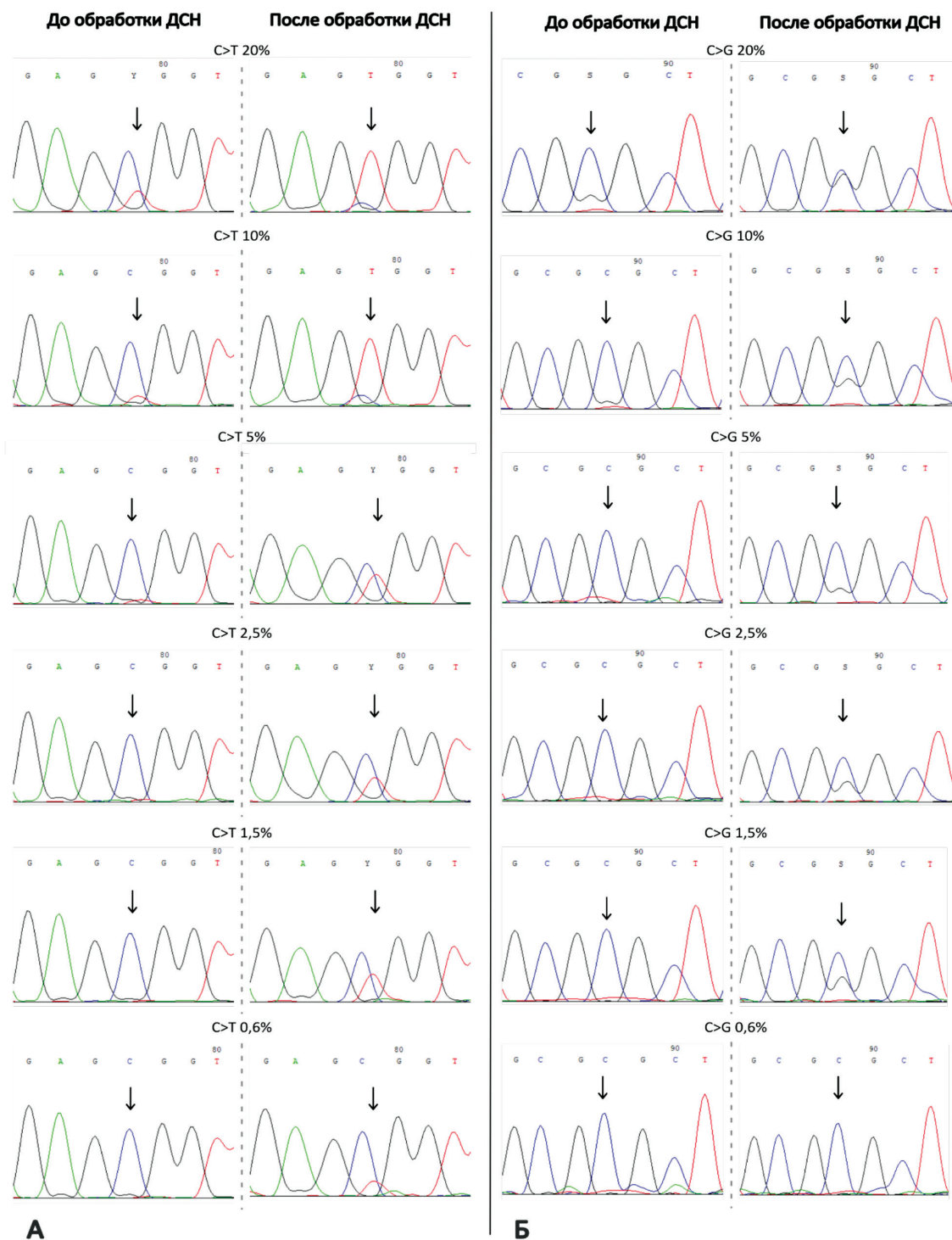


Рис. 3. Фрагменты хроматограмм модельных систем для вариантов NM_000548.5(TSC2):c.5260-49C>T (А) и NM_000548.5(TSC2):c.976-100C>G (Б) до и после обработки ДСН.

Fig. 3. Fragments of chromatograms of model systems for variants NM_000548.5(TSC2):c.5260-49C>T (A) and NM_000548.5(TSC2):c.976-100C>G (B) before and after DSN treatment

ных генетических вариантов в гене *PIK3CA*. В большинстве своем такие тест-системы основываются на аллель-специфической ПЦР, при использовании которой существует риск получения результатов в «серой зоне», что влечет за собой необходимость дальнейшей валидации секвенированием по Сэнгеру, который, в свою очередь, имеет малую аналитическую чувствительность. Применение ДСН позволяет успешно избежать данные ограничения.

Полученные нами результаты соотносятся с литературными данными и являются продолжением многолетней работы других исследовательских групп [5-8]. В то же время нами впервые были разработаны системы ДНК-зондов для ферментативного гидролиза ДСН для однонуклеотидных вариантов *PIK3CA*. Разработанный нами подход прост в исполнении, точен и может быть рассмотрен для использования в клинико-лабораторной диагностике.

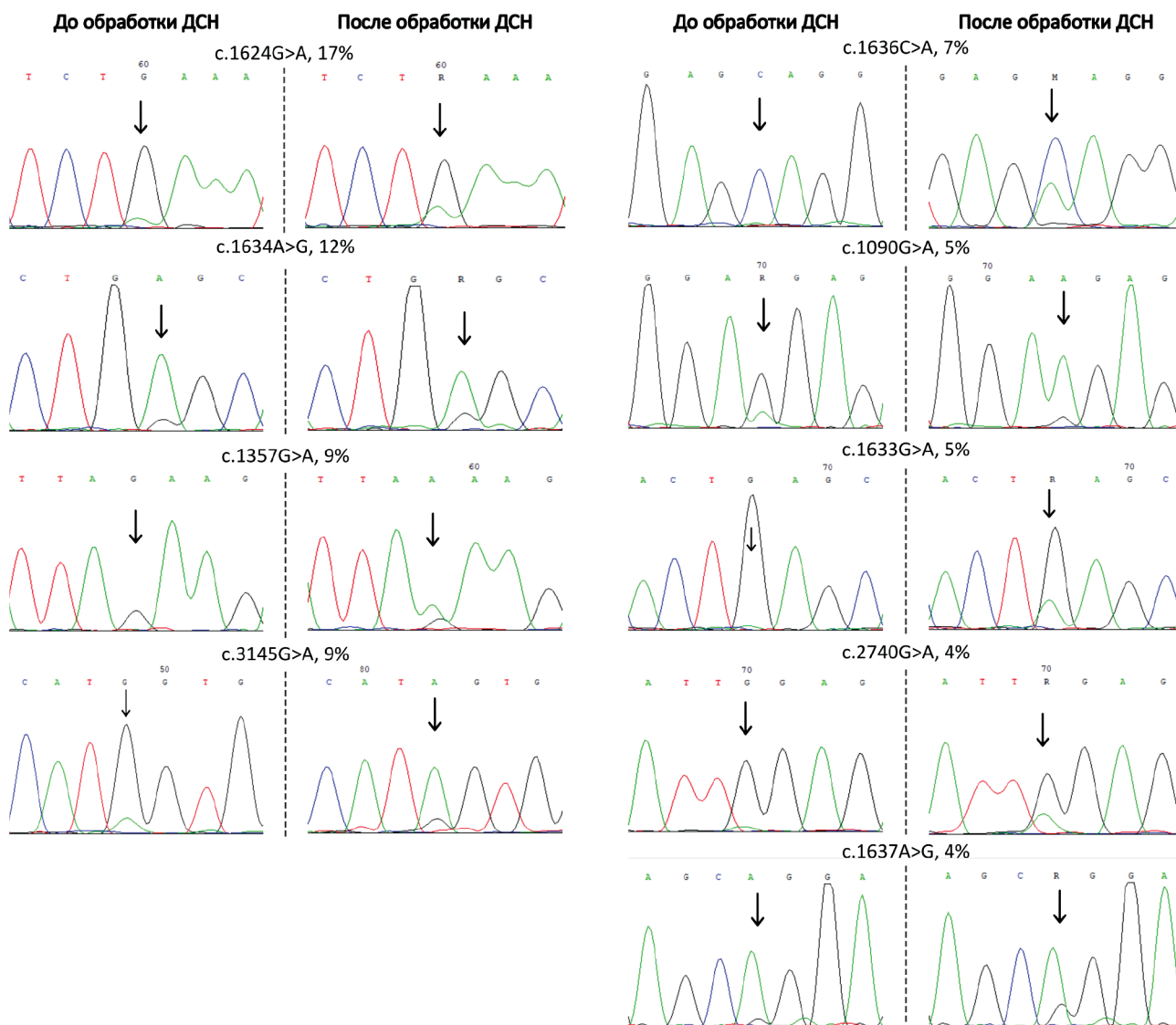


Рис. 4. Фрагменты хроматограмм ДНК пациентов с PROS до и после обработки ДСН.

Fig. 4. Fragments of DNA chromatograms of patients with PROS before and after DSN treatment.

Литература

1. Keppler-Noreuil K.M., Sapp J.C., Lindhurst M.J., et al. Clinical delineation and natural history of the *PIK3CA* -related overgrowth spectrum. *Am J Med Genet A*. 2014;164(7):1713–1733. doi: 10.1002/ajmg.a.36552.
2. Keppler-Noreuil K.M., Rios J.J., Parker V.E.R., et al. *PIK3CA* -related overgrowth spectrum (PROS): Diagnostic and testing eligibility criteria, differential diagnosis, and evaluation. *Am J Med Genet A*. 2016;167(2):287–295. doi: 10.1002/ajmg.a.36836.
3. Nathan N., Keppler-Noreuil K.M., Biesecker L.G., et al. Mosaic Disorders of the PI3K/PTEN/AKT/TSC/mTORC1 Signaling Pathway. *Dermatol Clin*. 2017;35(1):51–60. doi: 10.1016/j.det.2016.07.001.
4. Parker V.E.R., Keppler-Noreuil K.M., Faivre L., et al. Safety and efficacy of low-dose sirolimus in the *PIK3CA*-related overgrowth spectrum. *Genet Med*. 2019;21(5):1189–1198. doi: 10.1038/s41436-018-0297-9.
5. Shagin D.A., Rebrikov D.V., Kozhemyako V.B., et al. A novel method for SNP detection using a new duplex-specific nuclease from crab hepatopancreas. *Genome Res*. 2002;12(12):1935–42. doi: 10.1101/gr.547002.
6. Shagin D.A., Rebrikov D.V. Molecular biology applications of the red king crab duplex-specific nuclease. *Bulletin of RSMU*. 2022;(1):5–10. doi: 10.24075/brsmu.2022.010.
7. Song C., Liu Y., Fontana R., et al. Elimination of unaltered DNA in mixed clinical samples via nuclease-assisted minor-allele enrichment. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(19):e146. doi: 10.1093/nar/gkw650.
8. Ladas I., Fitarelli-Kiehl M., Song C., et al. Multiplexed Elimination of Wild-Type DNA and High-Resolution Melting Prior to Targeted Resequencing of Liquid Biopsies. *Clinical Chemistry*. 2017;63(10):1605–1613. doi:10.1373/clinchem.2017.272849.
9. Green M.R., Sambrook J. Isolation of High-Molecular-Weight DNA Using Organic Solvents. *Cold Spring Harb Protoc*. 2017;2017(4):pdb.prot093450. doi: 10.1101/pdb.prot093450.
10. Tanaka Y., Kanai F., Tada M., et al. Absence of *PIK3CA* hotspot mutations in hepatocellular carcinoma in Japanese patients. *Oncogene*. 2006;25(20):2950–2. doi: 10.1038/sj.onc.1209311.
11. 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. doi:10.25557/2073-7998.2019.02.3-23.
12. Davidson C.J., Zeringer E., Champion K.J., et al. Improving the limit of detection for Sanger sequencing: a comparison of methodologies for *KRAS* variant detection. *Biotechniques*. 2012;53(3):182–8. doi: 10.2144/000113913.
13. Сагоян Г.Б., Клещкая И.С., Имянитов Е.Н., и др. Спектр синдромов избыточного роста, связанных с мутацией *PIK3CA*. Обзор литературы. *Российский журнал детской гематологии и онкологии (РЖДГ/О)*. 2022;9(1):29–44. doi:10.21682/2311-1267-2022-9-1-29-44.
14. Singh S., Bradford D., Li X., et al. FDA Approval Summary: Alpelisib for *PIK3CA*-Related Overgrowth Spectrum. *Clin Cancer Res*. 2024;30(1):23–28. doi:10.1158/1078-0432.CCR-23-1270.
15. Angulo-Urarte A., Graupera M. When, where and which *PIK3CA* mutations are pathogenic in congenital disorders. *Nat Cardiovasc Res*. 2022;1(8):700–714. doi:10.1038/s44161-022-00107-8.

References

1. Keppler-Noreuil K.M., Sapp J.C., Lindhurst M.J., et al. Clinical delineation and natural history of the *PIK3CA* -related overgrowth spectrum. *Am J Med Genet A*. 2014;164(7):1713–1733. doi: 10.1002/ajmg.a.36552.
2. Keppler-Noreuil K.M., Rios J.J., Parker V.E.R., et al. *PIK3CA* -related overgrowth spectrum (PROS): Diagnostic and testing eligibility criteria, differential diagnosis, and evaluation. *Am J Med Genet A*. 2016;167(2):287–295. doi: 10.1002/ajmg.a.36836.
3. Nathan N., Keppler-Noreuil K.M., Biesecker L.G., et al. Mosaic Disorders of the PI3K/PTEN/AKT/TSC/mTORC1 Signaling Pathway. *Dermatol Clin*. 2017;35(1):51–60. doi: 10.1016/j.det.2016.07.001.
4. Parker V.E.R., Keppler-Noreuil K.M., Faivre L., et al. Safety and efficacy of low-dose sirolimus in the *PIK3CA*-related overgrowth spectrum. *Genet Med*. 2019;21(5):1189–1198. doi: 10.1038/s41436-018-0297-9.
5. Shagin D.A., Rebrikov D.V., Kozhemyako V.B., et al. A novel method for SNP detection using a new duplex-specific nuclease from crab hepatopancreas. *Genome Res*. 2002;12(12):1935–42. doi: 10.1101/gr.547002.
6. Shagin D.A., Rebrikov D.V. Molecular biology applications of the red king crab duplex-specific nuclease. *Bulletin of RSMU*. 2022;(1):5–10. doi: 10.24075/brsmu.2022.010.
7. Song C., Liu Y., Fontana R., et al. Elimination of unaltered DNA in mixed clinical samples via nuclease-assisted minor-allele enrichment. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(19):e146. doi: 10.1093/nar/gkw650.
8. Ladas I., Fitarelli-Kiehl M., Song C., et al. Multiplexed Elimination of Wild-Type DNA and High-Resolution Melting Prior to Targeted Resequencing of Liquid Biopsies. *Clinical Chemistry*. 2017;63(10):1605–1613. doi:10.1373/clinchem.2017.272849.
9. Green M.R., Sambrook J. Isolation of High-Molecular-Weight DNA Using Organic Solvents. *Cold Spring Harb Protoc*. 2017;2017(4):pdb.prot093450. doi: 10.1101/pdb.prot093450.
10. Tanaka Y., Kanai F., Tada M., et al. Absence of *PIK3CA* hotspot mutations in hepatocellular carcinoma in Japanese patients. *Oncogene*. 2006;25(20):2950–2. doi: 10.1038/sj.onc.1209311.
11. Ryzhkova O.P., Kardymon O.L., Prohorchuk 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):3–23. (In Russ.) <https://doi.org/10.21682/2311-1267-2022-9-1-29-44>
12. Davidson C.J., Zeringer E., Champion K.J., et al. Improving the limit of detection for Sanger sequencing: a comparison of methodologies for *KRAS* variant detection. *Biotechniques*. 2012;53(3):182–8. doi: 10.2144/000113913.
13. Sagoyan G.B., Kletskaya I.S., Imyanitov Ye.N., et al. Spektr sindromov izbytochnogo rosta, svyazannykh s mutatsiyey *PIK3CA*. Obzor literatury [A spectrum of overgrowth syndromes associated with the *PIK3CA* mutation. Literature review]. *Rossiyskiy zhurnal detskoj gematologii i onkologii [Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology]*. 2022;9(1):29–44. (In Russ.) <https://doi.org/10.21682/2311-1267-2022-9-1-29-44>
14. Singh S., Bradford D., Li X., et al. FDA Approval Summary: Alpelisib for *PIK3CA*-Related Overgrowth Spectrum. *Clin Cancer Res*. 2024;30(1):23–28. doi:10.1158/1078-0432.CCR-23-1270.
15. Angulo-Urarte A., Graupera M. When, where and which *PIK3CA* mutations are pathogenic in congenital disorders. *Nat Cardiovasc Res*. 2022;1(8):700–714. doi:10.1038/s44161-022-00107-8.