

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2024.12.22-29>

## Использование эписигнатуры для диагностики синдрома Сотоса

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

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

Мутационные события в генах эпигенетического аппарата влекут за собой изменения в метилировании ДНК. Уникальные паттерны метилирования ДНК (эписигнатуры) являются высокоспецифичными биомаркерами заболеваний и могут использоваться для косвенной диагностики хроматинопатий и для интерпретации вариантов в эпигенах. В этой работе мы провели поиск наиболее значимых CpG-динуклеотидов из широкогеномной эписигнатуры синдрома Сотоса и разработали классифицирующую модель для косвенной диагностики синдрома Сотоса на основании выявленной эписигнатуры. Данная модель применима в качестве теста второй линии при клинической картине синдрома Сотоса и отсутствии молекулярно-генетического диагноза. Наличие эписигнатуры синдрома Сотоса устанавливает диагноз, но заставляет искать другие варианты ДНК в гене *NSD1*, которые могут приводить к патологии.

**Ключевые слова:** синдром Сотоса, эписигнатура, метилирование ДНК.

**Для цитирования:** Ефремова А.В., Земляная О.А., Калинин А.И., Залетаев Д.В., Танас А.С., Стрельников В.В., Володин И.В. Использование эписигнатуры для диагностики синдрома Сотоса. *Медицинская генетика* 2024; 23(12): 22-29.

**Автор для корреспонденции:** Ефремова А.В.; **e-mail:** anv.efremova@gmail.com

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

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 3.12.2024

## Using episignature to diagnose Sotos syndrome

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

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

Mutational events in the genes of the epigenetic apparatus lead to changes in DNA methylation. Unique DNA methylation patterns (episignatures) are highly specific biomarkers of diseases and can be used for indirect diagnosis of chromatinopathies and for interpretation of variants in epigenes. In this work, we searched for the most significant CpG dinucleotides from the genome-wide episignature of Sotos syndrome and developed a classification model for indirect diagnosis of Sotos syndrome based on the identified episignature. This model is applicable as a second-line test (in the clinical picture of Sotos syndrome and the absence of a molecular genetic diagnosis). The presence of the episignature of Sotos syndrome establishes the diagnosis and prompts the search for the causative variant in the *NSD1* gene.

**Keywords:** Sotos syndrome, episignature, DNA methylation.

**For citation:** Efremova A.V., Zemlianaia O.A., Kalinkin A.I., Zaletaev D.V., Tanas A.S., Strelnikov V.V., Volodin I.V. Using episignature to diagnose Sotos syndrome. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]*. 2024; 23(12): 22-29. (In Russian).

**Corresponding author:** Efremova A.V.; **e-mail:** anv.efremova@gmail.com

**Funding.** The study was carried out according to the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for the Research Centre for Medical Genetics.

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

**Accepted:** 3.12.2024

### Введение

Нарушения нервно-психического развития представляют собой генетически гетерогенную группу расстройств с широкой фенотипической картиной, поведенческими и когнитивными нарушениями и задержкой развития. Одной из причин нарушений нервно-психи-

ческого развития, в частности, хроматинопатий являются генетические изменения в различных компонентах эпигенетического аппарата. Молекулярно-генетическая диагностика этой группы заболеваний затруднена. В настоящее время диагностика основана на использо-

вании таргетных панелей генов-кандидатов, экзомном и реге геномном секвенировании. Эти методы успешно выявляют генетическую причину заболевания в большинстве случаев, но в части случаев она остается нераскрытой. Часто диагностической неопределенности добавляют фенотипически перекрывающиеся состояния и обнаруженные варианты неясного клинического значения, что указывает на необходимость использования дополнительных диагностических инструментов, одним из которых может стать анализ метилирования генома. В настоящее время установлено наличие уникальных паттернов метилирования генома (эписигнатур) для более 65 различных хроматинопатий [1]. На основе уникальных паттернов метилирования генома можно разработать модель для дифференциации пациентов на основании выявленной эписигнатуры, что предполагает диагноз и в случаях, когда молекулярно-генетический диагноз отсутствует, и заставляет искать другие варианты ДНК, приводящие к патологии (в некодирующих или регуляторных областях) [2, 3].

Husson T. с соавт. в 2023 г. провели независимую оценку чувствительности и специфичности большинства опубликованных эписигнатур нарушений нервно-психического развития. Одну из наиболее надежных эписигнатур показал синдром Сотоса (OMIM:117550), продемонстрировавший 100% чувствительность [4]. Синдром Сотоса – аутосомно-доминантное заболевание, характеризующееся чрезмерным ростом в детстве, задержкой психического развития и характерным лицевым фенотипом (широкий, выступающий лоб, макроцефалия, долихоцефалия, длинное узкое лицо, острый подбородок, гипертелоризм). Причиной синдрома Сотоса является патогенный вариант в гене *NSDI*, выявляемый в >90% случаев. Ген *NSDI* кодирует один из компонентов эпигенетического аппарата гистон-лизин-метилтрансферазу NSD1, диметилирующую лизин 36 гистона H3 (H3K36me2) [3]. Данная посттрансляционная модификация гистона играет важную роль в рекрутировании ДНК-метилтрансфераз и необходима для межгенной локализации DNMT3A и поддержания метилирования ДНК [4]. Choufani S. с соавт. определили изменение профиля метилирования у пациентов с синдромом Сотоса по сравнению с контрольными образцами и идентифицировали 7085 CpG-сайтов из которых 99,3% (7038) продемонстрировали гипометилированное состояние и 0,7% (47) – гиперметилированное [2].

Наиболее популярным методом широкогеномного анализа метилирования ДНК является технология сайт-специфической гибридизации на микрочипах

Illumina Infinium Methylation, покрывающих 450 тысяч (Infinium HumanMethylation450 BeadChip) или 850 тысяч (Infinium MethylationEPIC BeadChip) CpG-динуклеотидов генома человека. В геноме человека насчитывается более 28 миллионов CpG-динуклеотидов, охват CpG-динуклеотидов в технологии Illumina Infinium Methylation ограничен и покрывает около 3%. Для исследования метилирования всего генома используется полногеномное бисульфитное секвенирование (WGBS), а для анализа интересующих областей генома или определенных CpG-динуклеотидов можно использовать метод бисульфитного секвенирования по Сэнгеру. Помимо этого, стремительно развивающиеся технологии высокопроизводительного секвенирования, в том числе нанопоровое секвенирование, являются перспективными методами для анализа метилирования ДНК.

В этом исследовании мы показали возможность сужения широкогеномной эписигнатуры до набора отдельных CpG-динуклеотидов без существенной потери чувствительности, что позволяет определять наличие эписигнатуры не только широкогеномными методами. Кроме того, нами разработана классифицирующая модель для косвенной диагностики синдрома Сотоса, позволяющая относить образцы к тому или иному классу на основании выявленной эписигнатуры. Задача модели состоит в том, чтобы относить неизвестные образцы к образцам с синдромом Сотоса, либо к нормальным образцам (без синдрома Сотоса).

## Материалы и методы

В исследование включен 31 пациент с направительным диагнозом синдром Сотоса, из которых 26 имеют патогенный или вероятно патогенный вариант в гене *NSDI*, 2 имеют вариант неопределенного значения в гене *NSDI* и 3 пациента имеют вариант в гене *NFIX*, ассоциированном с синдромом Малана (OMIM:614753), имеющим схожие клинические проявления с синдромом Сотоса. Характеристика обнаруженных вариантов представлена в **табл. 1**. Образец 46 с вариантом *NSDI*(NM\_022455.5):c.8005del,p.(Gln2669LysfsTer92) получил неоднозначную интерпретацию (вариант неопределенного значения/вероятно патогенный вариант) из-за близкого расположения варианта к 3'-концу гена *NSDI* и попал в группу образцов с вариантами неопределенного значения. В контрольную группу включено 11 образцов условно здоровых лиц.

Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови стандартными методами высаливания и фенол-хлороформной экстракции.

**Таблица 1.** Спектр генетических вариантов в исследуемой выборке.**Table 1.** Spectrum of genetic variants in the studied sample.

Номер образца	Вариант нуклеотидной последовательности
Патогенные и вероятно патогенные варианты в гене <i>NSDI</i>	
0	<i>NSDI</i> (NM_022455.5):c.3480G>A p.(Trp1160Ter)
4	<i>NSDI</i> (NM_022455.5):c.3904C>T p.(Gln1302Ter)
6	<i>NSDI</i> (NM_022455.5):c.3549dup p.(Glu1184Ter)
7	<i>NSDI</i> (NM_022455.5):c.1813G>T p.(Glu605Ter)
9	<i>NSDI</i> (NM_022455.5):c.5380T>C p.(Phe1794Leu)
11	<i>NSDI</i> (NM_022455.5):c.4831T>C p.(Cys1611Arg)
14	<i>NSDI</i> (NM_022455.5):c.5990A>G p.(Tyr1997Cys)
16	<i>NSDI</i> (NM_022455.5):c.5075A>G p.(His1692Arg)
17	del 8 экзона гена <i>NSDI</i>
18	<i>NSDI</i> (NM_022455.5):c.5161T>C p.(Cys1721Arg) de novo
19	<i>NSDI</i> (NM_022455.5):c.1318_1319del p.(Arg440LysfsTer12)
20	<i>NSDI</i> (NM_022455.5):c.6049C>T p.(Arg2017Trp)
21	<i>NSDI</i> (NM_022455.5):c.2894C>G p.(Ser965Ter)
22	<i>NSDI</i> (NM_022455.5):c.5411_5412del p.(Tyr1804PhefsTer15)
23	del 13 экзона гена <i>NSDI</i>
25	<i>NSDI</i> (NM_022455.5):c.6525T>A p.(Cys2175Ter)
31	del 6 экзона гена <i>NSDI</i>
33	del 1-23 экзонов гена <i>NSDI</i>
34	<i>NSDI</i> (NM_022455.5):c.5496del p.(Thr1833HisfsTer16)
35	<i>NSDI</i> (NM_022455.5):c.2968G>T p.(Glu990Ter)
36	<i>NSDI</i> (NM_022455.5):c.5951G>A p.(Arg1984Gln)
37	<i>NSDI</i> (NM_022455.5):c.6157G>T p.(Glu2053Ter)
38	<i>NSDI</i> (NM_022455.5):c.5431C>T p.(Arg1811Ter)
39	del 2-23 экзонов гена <i>NSDI</i>
40	del 6 экзона гена <i>NSDI</i>
27	<i>NSDI</i> (NM_022455.5):c.6385C>T p.(Gln2129Ter)
Варианты неопределенного значения в гене <i>NSDI</i>	
24	<i>NSDI</i> (NM_022455.5):c.6523T>C p.(Cys2175Arg)
46	<i>NSDI</i> (NM_022455.5):c.8005del p.(Gln2669LysfsTer92)
Патогенные и вероятно патогенные варианты в гене <i>NFIX</i>	
12	<i>NFIX</i> (NM_001365902.3):c.213G>A p.(Trp71Ter)
13	<i>NFIX</i> (NM_001365902.3):c.502_503insGCCT p.(Ile168SerfsTer27)
15	<i>NFIX</i> (NM_001365902.3):c.922C>T p.(Gln308Ter)

Бисульфитную модификацию ДНК проводили с помощью набора EpiTect Fast Bisulfite Kit (QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя.

СрG-динуклеотиды с максимальной разницей метилирования между контрольными и опытными образцами, минимальным уровнем значимости и близким расположением друг к другу были отобраны из работы S. Choufani с соавт., в которой для анализа метилирования использовалась технология Illumina Infinium HumanMethylation450 (450K) [2]. Для бисульфитного секвенирования по Сэнгеру отобранных СрG-динуклеотидов были сформированы ампликоны размером в среднем 250 п.н. Полученные ампликоны содержали дополнительные СрG-динуклеотиды, не исследованные ранее и не входящие в гибридационные микрочипы Illumina Infinium Methylation. Для бисульфитной ПЦР были разработаны праймеры с помощью программы MethPrimer [8]. Бисульфитное секвенирование по Сэнгеру проводили на капиллярном генетическом анализаторе 3500 Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific, США). Полученные электрофореграммы использовали для измерения уровня метилирования отобранных ранее СрG-динуклеотидов. Для получения количественных значений метилирования ДНК использовали модифицированный алгоритм [8]. Алгоритм подразумевает создание шкалы измерения уровня метилирования в исследуемых локусах за счет секвенирования модельных ампликонов с «нулевым» метилированием (без метильных меток). Уровень метилирования в СрG-динуклеотидах рассчитывали путем вычитания из уровня неметилированного сигнала, полученного на электрофореграммах с «нулевым метилированием», уровня неметилированного сигнала образца и переводили в процентную шкалу (0-100%).

После получения данных об уровне метилирования исследуемых СрG-динуклеотидов каждый анализируемый СрG-сайт оценивался как потенциальный предиктор. Поиск наиболее значимых с точки зрения классифицирующей способности предикторов осуществляли методом Random Forest с применением алгоритма Boruta. На основе использования каждого из значимых предикторов по отдельности, а также их возможных комбинаций были построены классифицирующие модели и оценены их чувствительность, специфичность и точность. Для создания классифицирующей модели использовали метод опорных векторов с применением кросс-валидации. В обучающую и тестовую выборки были включены образцы с синдромом Сотоса и образцы контрольной группы, разделение выборок проводили случайным обра-

зом в соотношении 70:30. Результат машинного обучения визуализировали с помощью линейного правила. Оценку работы модели проводили на итоговой выборке, включающей контрольные образцы и образцы из табл. 1. Оценку качества модели проводили с помощью ROC-анализа.

## Результаты

В результате отбора СрG-динуклеотидов были сформированы четыре локуса, содержащие 4, 10, 6 и 4 СрG-динуклеотидов (bis-3, bis-649, bis-643, bis-11). В ходе работы локус bis-649 был исключён (из-за невозможности получения валидных электрофореграмм) по техническим причинам. Электрофореграммы таргетных локусов были обработаны оригинальным лабораторным алгоритмом для получения количественных значений метилирования для каждого анализируемого СрG-динуклеотида. На **рис. 1** представлен уровень метилирования ДНК в исследуемых группах по каждому локусу (усредненное значение по СрG-динуклеотиду и по локусу). Образцы с подтвержденным молекулярно-генетическим диагнозом *синдром Сотоса* показали гипометилированное состояние СрG-динуклеотидов относительно контрольных образцов во всех трех локусах. Образцы с вариантом неопределенного значения показали гиперметилированное состояние в локусе bis-3 и гипометилированное в локусах bis-643 и bis-11. Образцы с синдромом Малана показали уровень метилирования, схожий с контрольными образцами.

Результат отбора предикторов представлен на **рис. 2**. Наиболее высокую значимость с точки зрения классифицирующей способности из анализируемых предикторов показали СрG-динуклеотиды 11-845 (зонд HumanMethylation450 cg26004810), 11-847 (новый, не анализируемый ранее СрG-динуклеотид), 6-375 (cg22497095), 6-440 (cg20851828).

На обучающей выборке было построено множество классифицирующих моделей с использованием значимых предикторов по отдельности и их возможных комбинаций. Оценка качества полученных моделей представлена в **табл. 2**, ранжирование проводили по значению площади под ROC-кривой (AUC). Классифицирующая модель, основанная на комбинации предикторов 6-375 (cg22497095) и 6-440 (cg20851828) продемонстрировала наилучшие показатели чувствительности (99%), специфичности (93%) и точности (94%) и была выбрана для работы (**рис. 3**). Модели на основе предиктора 6-375 или 6-440 в отдельности показали более низкие показатели качества. Качество

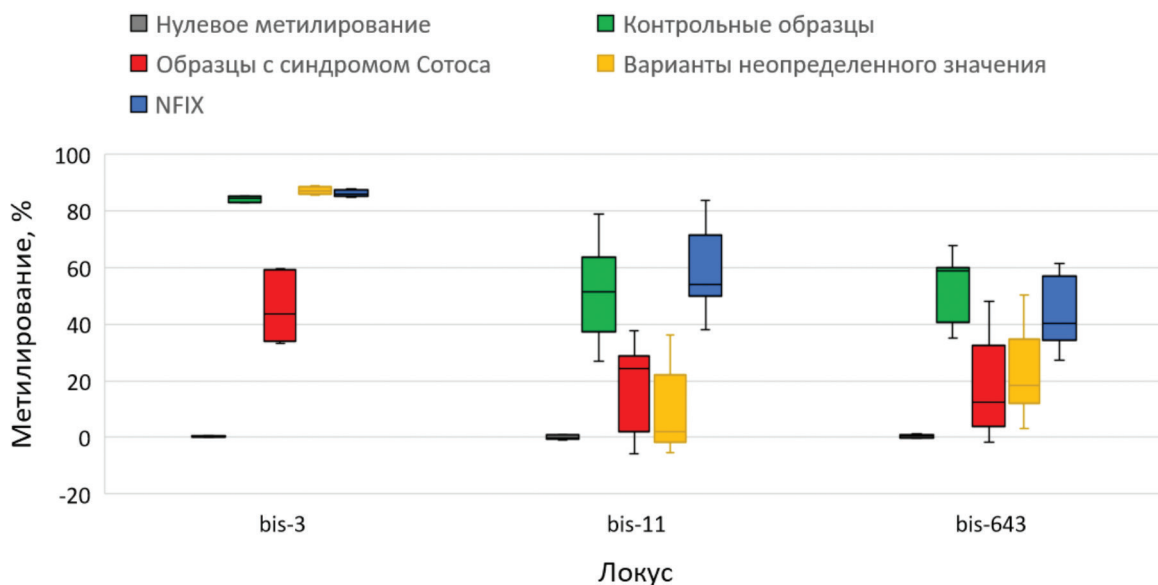


Рис. 1. Уровень метилирования ДНК в исследуемых локусах.

Fig. 1. DNA methylation level in the studied loci.

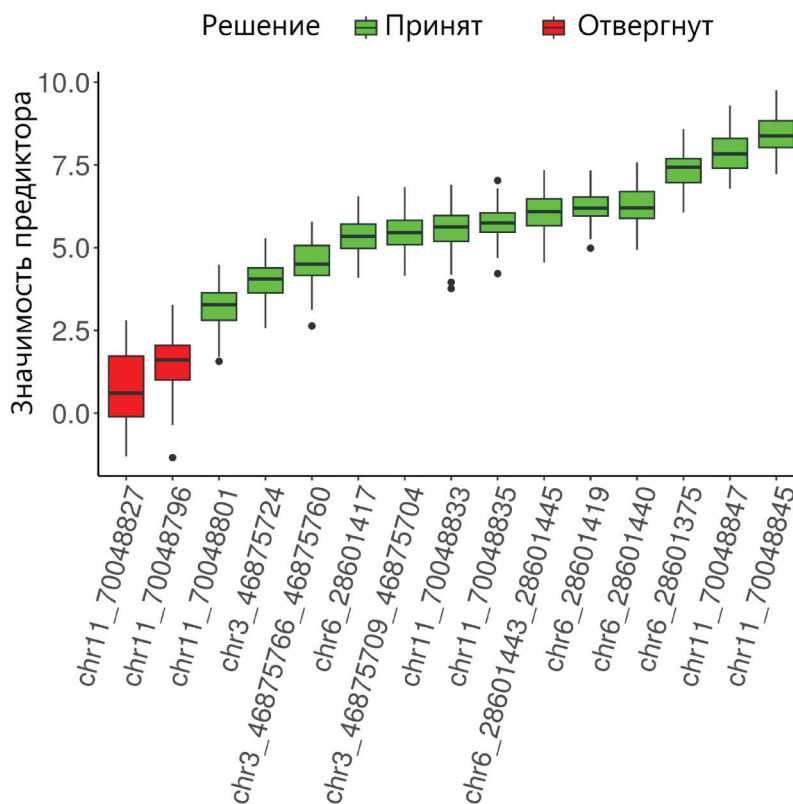


Рис. 2. Значимость предикторов в модели эписигнатуры синдрома Сотоса.

Fig. 2. Significance of predictors in the epigenature model of Sotos syndrome.

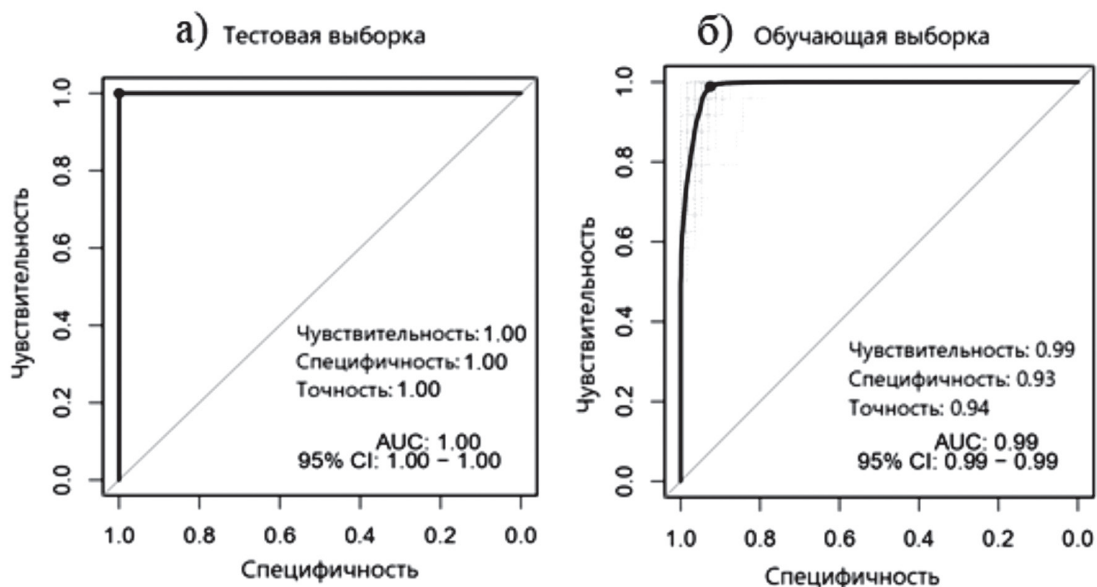


Рис. 3. Показатели качества классифицирующей модели на тестовой (а) и обучающей (б) выборках.

Fig. 3. Indicators of the classification model quality on test (a) and training (b) samples.

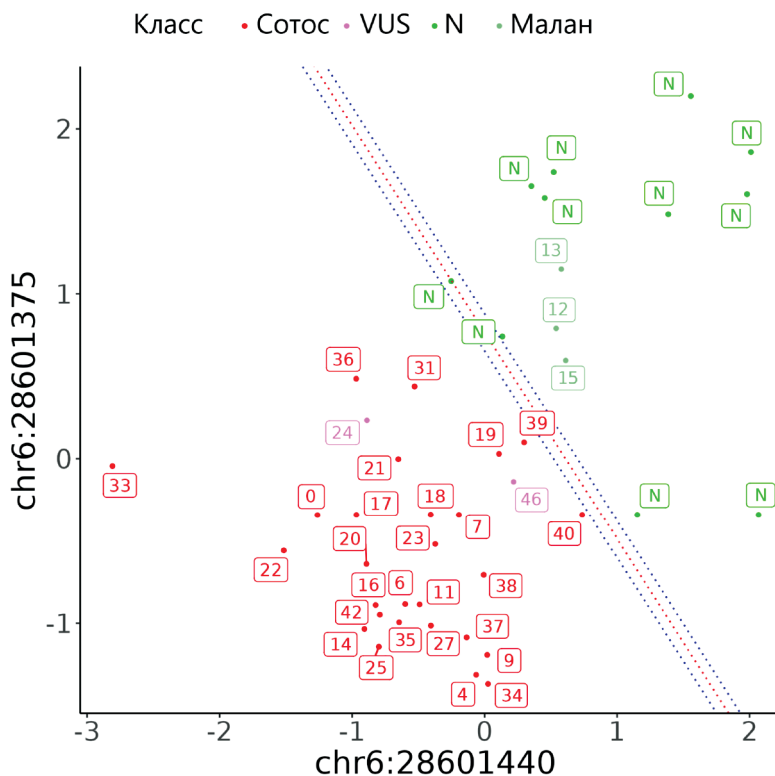


Рис. 4. Распределение образцов исследуемой выборки согласно разработанной модели.

Fig. 4. Distribution of the samples of the studied groups according to the model.

модели оценивали на тестовой и обучающей выборках (рис. 3).

Распределение исследуемых образцов на группы с синдромом Сотоса (слева от опорных векторов) и без синдрома Сотоса (справа от опорных векторов) с помощью выбранной модели представлено на **рис. 4**. Все исследуемые образцы с синдромом Сотоса были классифицированы как образцы с синдромом Сотоса, образцы с вариантами неопределенного значения (VUS) также попали в группу образцов с синдромом Сотоса. Контрольные образцы были классифицированы как нормальные (N, без синдрома Сотоса), образцы с синдромом Малана попали в группу нормальных образцов.

### Обсуждение

Использование бисульфитного секвенирования по Сэнгеру и последующая обработка электрофореграмм позволяют получить количественные значения метилирования исследуемых CpG-динуклеотидов, наряду с другими методами бисульфитного секвенирования. Образцы с синдромом Сотоса демонстрируют гипометилирование по сравнению с контрольными образцами в исследуемых локусах, что соответствует литературным данным и подтверждает наличие характерной для синдрома Сотоса эпигенетической метки в исследуемых образцах [2]. Образцы с синдромом Малана показали схожий с контрольными образцами уровень метилирования. Синдром Малана (OMIM:614753, также называется синдром Сотоса 2) возникает из-за патогенного варианта в гене ядерного фактора IX, который не задействован в эпигенетической регуляции и, соот-

ветственно, не имеет характерной для хроматинопатий эпигенетической метки. Отсюда следует, что эпигенетическую метку можно использовать для дифференциальной диагностики между синдромами Сотоса и Малана. При наличии характерной для синдрома Сотоса эпигенетической метки может быть установлен диагноз синдрома Сотоса, но при отсутствии указанной эпигенетической метки наличие синдрома Малана установлено не будет. Создание диагностической системы, включающей в себя данные эпигенетических меток нескольких хроматинопатий, позволяет внедрить их анализ в тестирование первой линии и определять предварительный диагноз и тактику ведения пациента, что улучшит качество медико-генетического консультирования. Важно отметить, что при наличии клинического диагноза синдрома Сотоса и отрицательного молекулярно-генетического тестирования определение эпигенетической метки можно использовать в качестве теста второй линии и, при положительном результате, проводить дальнейший поиск генетического варианта в глубоко интронных или регуляторных участках гена.

В настоящее время алгоритмы классификации образцов построены на использовании полных эпигенетических меток, характерных для ряда синдромов [3, 9]. Преимуществом нашей работы является сокращение широкогеномной эпигенетической метки синдрома Сотоса до двух наиболее репрезентативных CpG-динуклеотидов 6-375 и 6-440 (cg22497095 и cg20851828, соответственно) с сохранением высоких диагностических параметров. Созданная нами классифицирующая модель с использованием контролируемых биоинформатических методов (что минимизирует ошибки классификации) показала 100% чувствительность и 100% специфичность.

**Таблица 2.** Оценка качества классифицирующих моделей синдрома Сотоса.

**Table 2.** Quality assessment of classification models for Sotos syndrome.

Ранг	Комбинация предикторов	AUC	Чувствительность	Специфичность	Точность
1	chr6_28601375, chr6_28601440	0,989	0,988	0,926	0,945
2	chr11_70048845, chr6_28601375, chr6_28601440	0,987	0,989	0,902	0,928
3	chr11_70048845, chr6_28601375, chr6_28601419, chr6_28601440	0,984	0,997	0,886	0,919
4	chr11_70048847, chr6_28601375, chr6_28601419	0,982	0,989	0,902	0,928
5	chr11_70048845, chr11_70048847, chr6_28601375, chr6_28601419	0,982	0,983	0,921	0,939
6-29	.....				
30	chr6_28601440	0,904	0,754	0,914	0,867
31	chr6_28601375	0,891	0,732	0,967	0,897

В последнее время многие исследователи считают эписигнатуру весомым функциональным инструментом и используют для интерпретации вариантов [10–12]. Kerkhof J. с соавт. совместно с экспертной рабочей группой разработали рекомендации по интерпретации и представлению результатов анализа эписигнатур. При наличии достоверной эписигнатуры и варианта в гене, ассоциированном с заболеванием, для которого выявлена эписигнатура, могут быть использованы критерии PS3 или PP4 [13]. Поскольку эписигнатура является функциональным следствием патогенных вариантов в генах эпигенетического аппарата, то она может быть использована для интерпретации и переклассификации вариантов, но с большой осторожностью. К ошибочной классификации на основании одной эписигнатуры (для синдромов с умеренной эписигнатурой) может привести использование неконтролируемых биоинформатических методов (иерархическая кластеризация, многомерное шкалирование). Кроме того, не все патогенные варианты в гене могут давать одинаковую эписигнатуру, например, при синдроме Хельсмуртел–Ван дер Аа (OMIM:615873) различное расположение патогенных вариантов в гене *ADNP* приводит к противоположным эписигнатурам [12]. Однако наличие эписигнатуры, специфичной для заболевания, не вызывает сомнений в его наличии у пациента. Метилирование ДНК является патогномичным признаком ряда заболеваний и дает возможность применять критерий PP4 при интерпретации вариантов [14]. Эписигнатура – это высокоспецифичный биомаркер, более надежный по сравнению с алгоритмами прогнозирования патогенности *in silico* и может использоваться для интерпретации вариантов (для заболеваний, которые имеют известную отчетливую общегеномную эписигнатуру).

Анализ частичной эписигнатуры (cg22497095 и cg20851828) и использование классифицирующей модели позволили нам определить образцы 24 и 46, как образцы с синдромом Сотоса. Исходя из этого, можно с уверенностью сказать о наличии синдрома у этих пациентов и применять критерий PP4 для интерпретации. Также были проведены оценка *de novo* статуса варианта в образцах 24 и 46 и переклассификация вариантов в вероятно патогенные (PS2, PM2, PP4, PP3). Несмотря на небольшой вес критерия PP4, наличие характерной эписигнатуры является высоко специфическим биомаркером и помогает в решении сложных диагностических случаев.

Эписигнатура метилирования ДНК является высокочувствительным, высокоспецифичным биомаркером и многообещающим диагностическим инструментом для нарушений нервно-психического развития без явного молекулярно-генетического дефекта. Сокращение эписигнатуры до нескольких наиболее значимых CpG-динуклеотидов позволяет использовать более доступные таргетные методы исследования метилирования ДНК.

## Литература/References

1. Levy M.A., McConkey H., Kerkhof J., et al. Novel diagnostic DNA methylation epigenatures expand and refine the epigenetic landscapes of Mendelian disorders. *HGG Adv.* 2021;3(1):100075.
2. Choufani S., Cytrynbaum C., Chung B.H., et al. NSD1 mutations generate a genome-wide DNA methylation signature. *Nat Commun.* 2015;6:10207.
3. Aref-Eshghi E., Kerkhof J., Pedro V.P., et al. Evaluation of DNA Methylation Epigenatures for Diagnosis and Phenotype Correlations in 42 Mendelian Neurodevelopmental Disorders. *Am J Hum Genet.* 2020;106(3):356–370.
4. Husson T., Lecoquierre F., Nicolas G. et al. Episignatures in practice: independent evaluation of published episignatures for the molecular diagnostics of ten neurodevelopmental disorders. *Eur J Hum Genet.* 2024;32:190–199.
5. Tatton-Brown K., Rahman N. Sotos syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2007;15:264–271.
6. Weinberg D.N., Papillon-Cavanagh S., Chen H. et al. The histone mark H3K36me2 recruits DNMT3A and shapes the intergenic DNA methylation landscape. *Nature.* 2019;573:281–286.
7. Li L.C., Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics.* 2002;18(11):1427–31.
8. 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.
9. Levy M.A., McConkey H., Kerkhof J., et al. Novel diagnostic DNA methylation epigenatures expand and refine the epigenetic landscapes of Mendelian disorders. *HGG Adv.* 2021;3(1):100075.
10. Trajkova S., Kerkhof J., Rossi Sebastiano M., et al. DNA methylation analysis in patients with neurodevelopmental disorders improves variant interpretation and reveals complexity. *HGG Adv.* 2024;5(3):100309.
11. Coursimault J., Goldenberg A., Nicolas G., et al. Contribution of DNA methylation profiling to the reclassification of a variant of uncertain significance in the KDM5C gene. *Eur J Med Genet.* 2022;65(9):104556.
12. Sadikovic B., Levy M.A., Aref-Eshghi E. Functional annotation of genomic variation: DNA methylation epigenatures in neurodevelopmental Mendelian disorders. *Hum Mol Genet.* 2020;29(R1):R27–R32.
13. Kerkhof J., Rastin C., Levy M.A., et al. Diagnostic utility and reporting recommendations for clinical DNA methylation epigenature testing in genetically undiagnosed rare diseases. *Genet Med.* 2024;26(5):101075.
14. Durkie M., Cassidy E.-J., Berry I., et al. The Association for Clinical Genomic Science. Best Practice Guidelines for Variant Classification in Rare Disease 2024 <https://www.acgs.uk.com/media/12533/uk-practice-guidelines-for-variant-classification-v12-2024.pdf>