

Функциональное подтверждение патогенности варианта интронной последовательности гена *PAX6*

Филатова А.Ю.^{1*}, Васильева Т.А.¹, Скоблов М.Ю.^{1,2}, Кадышев В.В.¹,
Воскресенская А.А.³, Марахонов А.В.^{1,2}, Зинченко Р.А.^{1,4,*}

¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»

² ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)»

³ Чебоксарский филиал ФГАУ «Межотраслевой научно-технический комплекс

«Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

⁴ ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

*e-mail: maacc@yandex.ru; renazinchenko@mail.ru

Врожденная аниридия (ОМIM #106210) (БА) — моногенный врожденный порок развития с аутосомно-доминантным типом наследования, встречающийся в популяции с частотой 1:45 000—1:100 000 населения. Ведущими диагностическими признаками являются врожденное отсутствие ткани радужки, гипоплазия центральной ямки и нистагм. Подавляющее большинство случаев БА обусловлено гетерозиготными мутациями в гене *PAX6*, расположенном в регионе 11p13, а также хромосомными перестройками, затрагивающими этот регион. Ранее в лаборатории генетической эпидемиологии проведен молекулярно-генетический анализ в группе из 110 больных из 84 неродственных семей с клиническим диагнозом врожденной аниридии из России, включавший секвенирование и анализ вариации числа копий генов в регионе 11p13. В общей сложности найден 81 вариант нуклеотидной последовательности, значительную часть которых (13,6%) составляют интронные мутации, локализующиеся как в канонических сайтах сплайсинга, так и глубоко в интронных областях (11 различных мутаций у 18 больных). Данные варианты нуклеотидной последовательности были проанализированы с использованием программ HSF v. 3.0 (Human Splicing Finder) и IntSplice. Их патогенный статус, как и других обнаруженных мутаций, устанавливался в соответствии с рекомендациями ACMG для интерпретации вариантов последовательностей ДНК. Настоящая работа посвящена доказательству влияния выявленного в спорадическом случае врожденной аниридии интронного варианта нуклеотидной последовательности с неизвестным клиническим значением NG_008679.1(*PAX6_v001*):c.142-14C>G на паттерн сплайсинга. Функциональный анализ с использованием системы экспрессии минигенов *in vitro* показал, что данная замена ведет к возникновению нового акцепторного сайта сплайсинга интрона 5, в результате чего происходит удлинение экзона 6 на 13 нуклеотидов и сдвиг открытой рамки считывания (NM_000280.4(*PAX6_v001*):c.141_142insTTCCCCTATGCAG, p.Val48PhefsTer12) с разрушением aberrантной мРНК по нонсенс-опосредованному механизму деградации (NMD). Таким образом, исследуемая интронная замена продуцирует нулевой аллель и ведет к гаплонедостаточности функции гена *PAX6*, что приводит к развитию заболевания.

Ключевые слова: врожденная аниридия; гаплонедостаточность; *PAX6*; мутации; приводящие к нарушению сплайсинга; функциональный анализ; клонирование; система экспрессии минигенов *in vitro*; ОТ-ПЦР; HEK293.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Информация о спонсорстве. Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ — грант 17-04-00475.

Evidence of pathogenic role an intronic variant in *PAX6* gene using functional analysis

Filatova A.Yu.^{1*}, Vasilyeva T.A.¹, Skoblov M.Yu.^{1,2}, Kadyshev V.V.¹,
Voskresenskaya A.A.³, Marakhonov A.V.^{1,2}, Zinchenko R.A.^{1,4,*}

¹ Research Center for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

² Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny, Russian Federation

³ Cheboksary branch of S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Cheboksary, Russian Federation

⁴ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

*e-mail: maacc@yandex.ru; renazinchenko@mail.ru

Congenital aniridia (OMIM #106210) (BA) is a Mendelian autosomal dominant panocular disorder with complete penetrance and variable expressivity. The incidence of aniridia is 1 in 45,000–100,000 births. Aniridia is characterized by congenital absence of the iris with foveal hypoplasia and other eye abnormalities. The most cases of aniridia is caused by heterozygous mutations in the *PAX6* gene or chromosome 11p13 rearrangements. Molecular analysis (including Sanger sequencing as well as MLPA analysis and the loss of heterozygosity analysis) of 110 patients referred with congenital aniridia from 84 unrelated families identifies causative *PAX6* mutations in all except 3 patients (81/84). A significant proportion of point *PAX6* mutations affecting canonical splicing sites and deeper intronic sequences (13,6%) (11 different mutations in 18 patients) have been revealed. Intron sequence variants pathogenic status is established in accordance with ACMG recommendations for interpretation of sequence variants. The manuscript gives consideration to the functional

evidence of a revealed in patient with congenital aniridia VUS (variant of unknown clinical significance) NG_008679.1(PAX6_v001):c.142-14C>G effect on the splicing pattern. We used a minigene system to determine the effect of investigated mutation *in vitro* in human cell line HEK293. Our analysis has shown that this single nucleotide substitution leads to a splicing disruption due to the use of the new acceptor-site of intron 5. That leads to exon 6 elongation by 13 nucleotides, open reading frame shifting (NM_000280.4(PAX6_v001):c.141_142insTTCCCTATGCAG, p.Val48PhefsTer12) and aberrant mRNA degradation by NMD (non-sense-mediated mRNA decay) mechanism. Thus, the intron sequence variant produces a null allele, leading to a haploinsufficiency of the PAX6-function and the development of disease.

Key words: congenital aniridia, PAX6, haploinsufficiency, splicing mutations, variant of unknown clinical significance, functional evidence, cloning, *in vitro* mini-gene expression system, RT-PCR, HEK293.

Введение

Врожденная аниридия (OMIM #106210) (ВА) — моносомный врожденный порок развития с аутосомно-доминантным типом наследования, встречающийся в популяции с частотой 1:45 000—1:100 000 населения. Ведущими диагностическими симптомами являются врожденное отсутствие ткани радужки, гипоплазия центральной ямки, сопровождающиеся нистагмом. Кроме основных признаков, при ВА могут развиваться кератопатия и первичная и/или осложненная катаракта, которые наблюдаются у 80% пациентов, реже встречаются глаукома и гипоплазия зрительного нерва. ВА сопровождается значительным снижением остроты зрения и инвалидизацией пациентов и является социально значимой проблемой. Подавляющее большинство случаев ВА обусловлено мутациями в гене PAX6 в гетерозиготном состоянии (OMIM *607108), расположенном в регионе 11p13, а также хромосомными перестройками, затрагивающими этот регион [1, 2].

Ранее в лаборатории генетической эпидемиологии проведена молекулярно-генетическая диагностика в обширной выборке пациентов с ВА из России. Анализ мутаций в гене PAX6 и детальное клиническое обследование проведены в группе из 110 больных из 84 неродственных семей с клиническим диагнозом ВА. Более половины случаев (62 пациента — 73,81%) представлены единичными больными без отягощенного семейного анамнеза. Поиск мутаций в гене PAX6 проводили методом секвенирования по Сэнгеру, последующей мультиплексной лигазозависимой амплификации проб (MLPA) и анализа потери гетерозиготности у пробанда (LOH) с использованием 12 коротких tandemных повторов (STR маркеров) [3]. В общей сложности найдена 81 различная мутация (58 внутригенных мутаций в гене PAX6 и 23 хромосомные делеции с вовлечением региона 11p13). Среди 48 уникальных внутригенных мутаций в гене PAX6 27 новых и 21 ранее описанная мутация [4]. Значительную долю среди выявленных вариантов нуклеотидной последовательности (13,6%) составляют интронные мутации, локализующиеся как в канонических сайтах сплайсинга, так и глубоко в интронных областях (11 различных мутаций у 18 больных). Все обнаруженные варианты последовательности (SNV) согласно критериям Американского колледжа медицинской генетики (ACMG) классифицированы

как патогенные и вероятно патогенные [5]. Исключения составили две выявленные впервые интронные мутации: однонуклеотидная замена в интроне 5 гена PAX6 NG_008679.1(PAX6_v001):c.142-14C>G и однонуклеотидная дупликация, вблизи сайта сплайсинга некодирующего экзона 3 в 5'-UTR последовательности гена PAX6 NG_008679.1(PAX6_v001):c.-125dupG, получившие статус вариантов с неизвестным клиническим значением.

Материалы и методы

Поиск мутаций у больных врожденной аниридией проведен согласно разработанному ранее протоколу в лаборатории генетической эпидемиологии [3, 6]. Интронные варианты проанализированы с использованием программ HSF v. 3.0 (Human Splicing Finder) [7] и IntSplice [8]. Их патогенный статус, как и для других обнаруженных мутаций, устанавливался в соответствии с рекомендациями ACMG для интерпретации вариантов последовательностей ДНК [5].

Для функционального анализа влияния выявленной однонуклеотидной замены в интроне 5 гена PAX6 NG_008679.1(PAX6_v001):c.142-14C>G на паттерн сплайсинга использована система экспрессии минигенов *in vitro*.

Создание конструкций, содержащих минигены

Фрагмент геномной ДНК пациента от 5 до 7 экзона гена PAX6 был амплифицирован с использованием праймеров: PAX6-ex5F (5'-ТТААГАТСТТТГТАГАГСТАГСТСАСАС-3') и PAX6-ex7R (5'-ТТАГТСТГАССТАТГСССТГТСТГССССТАТСТ-3'). Полученный ПЦР-продукт был клонирован по сайтам рестрикции BglII и SalI в вектор pSplPIG [9]. Клоны, содержащие миниген дикого типа или вариант с мутацией c.142-14C>G, отбирали с использованием секвенирования по Сэнгеру.

Исследование сплайсинга минигенов в клеточной линии HEK293

Трансфекция конструкций, содержащих минигены (дикого типа (WT) и мутантный (MUT)), в клеточную линию HEK293 проводили с использованием реагента

Metafectene (Biontес, Германия) согласно протоколу производителя. Через 48 часов из клеток выделяли тотальную РНК методом фенол-хлороформной экстракции с гуанидин-тиоцианатным буфером. Полученную РНК обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific, США). Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, США). Для исследования полученных изоформ минигенов проводили амплификацию кДНК с плазмидо-специфичными праймерами:

pIF (5'-ACAAAGAGACCTACGTCGAGCA-3'),
pIR (5'-AGCTCGATCAGCACGGGCACGAT-3').

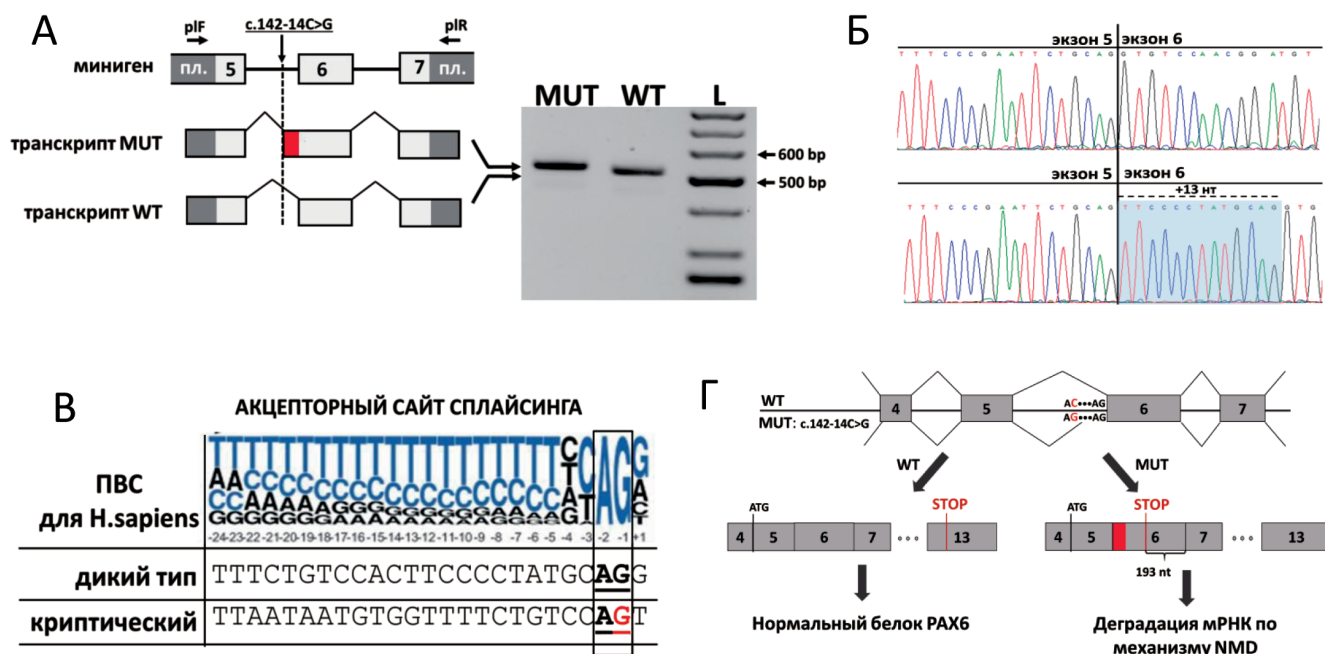
Полученные ПЦР-продукты анализировали методом агарозного гель-электрофореза. Каждый полученный продукт амплификации был очищен из геля при помощи Cleanup Standard kit (Евроген, Россия) и секвенирован по Сенгеру с использованием праймеров pIF и pIR.

Результаты

У пациентки #А-45.03 с ВА и нормальным кариотипом проведена подтверждающая ДНК диагностика согласно разработанному протоколу [3, 6]. Проведенный методом MLPA поиск хромосомных аномалий не выя-

вил вариаций числа копий в регионе 11p13. При секвенировании по Сэнгеру экзонов и фланкирующих их участков интронов гена *PAX6* обнаружена однонуклеотидная замена в интроне 5 гена *PAX6* NG_008679.1(*PAX6_v001*):c.142-14C>G. Других кандидатных вариантов не найдено. Интронный вариант не описан ранее, не зарегистрирован в базе данных gnomAD и не обнаружен у здоровых родителей. Согласно критериям ACMG, данная замена имеет статус варианта с неизвестным клиническим значением. Тем не менее, биоинформатический анализ с использованием программного обеспечения Human Splicing Finder предсказывает изменение сплайсинга вследствие активации нового криптического акцепторного сайта сплайсинга.

Для определения влияния исследуемой мутации на сплайсинг пре-мРНК использована система экспрессии минигена в модельной клеточной линии. Для создания векторов, содержащих минигены дикого типа (WT) и с мутацией с.142-14С>G (MUT), мы амплифицировали участок геномной ДНК пробанда от 5 до 7 экзона гена *PAX6* и клонировали его в вектор pSpl. Каждая из двух полученных конструкций была трансфицирована в клеточную линию эмбриональной почки человека (HEK293). Через 48 часов из обработанных клеток выделяли тотальную РНК, далее проводили реакцию обрат-



Функциональный анализ однонуклеотидной замены NG_008679.1(PAX6_v001):с. 142-14С>G. (А) (слева) Схема конструкции содержащей миниген с обозначением исследуемой замены и плазмидоспецифичных праймеров для амплификации кДНК. Цифрами обозначены номера экзон-интронных мРНК PAX6 по NM_000280.4. Ниже приведены схемы полученных ПЦР-продуктов; (справа) электрофореграмма продуктов амплификации с праймерами pIF и pIR для кДНК из клеток, экспрессирующих миниген дикого типа (WT) и миниген с заменой (MUT). (Б) результаты секвенирования по Сэнгеру полученных ПЦР-продуктов. (В) (сверху) позиционно-весовая матрица (ПВС) по всем каноническим акцепторным сайтам сплайсинга человека. Высота каждой буквы пропорциональна частоте нахождения соответствующего нуклеотида в данном положении [14]; (снизу) выравнивание сайта сплайсинга интрона 5 дикого типа и криптического (возникшего в результате исследуемой замены). Красным выделено место замены. (Г) Схема возможного патогенного влияния исследуемой замены в гене PAX6 с привлечением механизма нонсенс опосредованной деградации мРНК (NMD). Пояснения в тексте.

ной транскрипции. Полученную кДНК амплифицировали, используя плазмидо-специфические праймеры. В результате было выявлено изменение электрофоретической подвижности ПЦР-продукта, полученного для минигена с мутацией, относительно дикого типа (рис. А). Анализ полученных фрагментов прямым секвенированием по Сэнгеру показал, что наличие мутации с.142-14С>G приводит к переключению акцепторного сайта сплайсинга интрона 5, что приводит к удлинению экзона 6 на 13 нуклеотидов (рис. А, Б).

Обсуждение

Процесс вырезания интронов из последовательности пре-мРНК направляется последовательностью геномной ДНК на границах экзонов и интронов, содержащих высококонсервативные канонические последовательности донорного и акцепторного сайтов сплайсинга и точки ветвления. Эти мотивы служат для связывания с рибонуклеопротеиновыми факторами сплайсинга, которые вместе формируют макромолекулу сплайсосомы. Кроме самих канонических последовательностей для правильного их узнавания и выбора в ходе конститутивного и альтернативного сплайсинга крайне важны многочисленные и менее сильные сигналы — мотивы энхансеров и сайленсеров сплайсинга [10]. Для нормального процесса сплайсинга также необходима определенная, не нарушенная вследствие интронных нуклеотидных замен, вторичная структура РНК транскрипта и доступность критически важных для связывания с компонентами сплайсосомы мотивов [11]. Мутации вблизи экзон-интронной границы и в более глубоких интронных или экзонных областях могут значительно изменять регуляцию сплайсинга и процессинг пре-мРНК: могут оставаться удержанными интроны, не узнаваться и не включаться экзоны или изменяться их длина за счет использования криптопических сайтов сплайсинга, нарушая паттерн сплайсинга и нормальную экспрессию гена [12].

В данной работе проведено функциональное исследование *in vitro* ранее не описанной однонуклеотидной замены NG_008679.1(PAX6_v001): с.142-14С>G у пациентки с ВА. В результате исследования определено, что данная замена приводит к возникновению канонического динуклеотида и нового криптопического акцепторного сайта сплайсинга интрона 5. При этом данный сайт сплайсинга оказывается более сильным, чем сайт дикого типа, что приводит к включению дополнительных 13 нуклеотидов в экзон 6 гена *PAX6* (рис. В).

Удлинение экзона 6 на 13 нуклеотидов приводит к сдвигу открытой рамки считывания (NM_000280.4(PAX6_v001):с.141_142insTTCCCTATG-CAG, p.Val48PhefsTer12) и возникновению преждевременного стоп-кодона. Данный стоп-кодон локализуется за 293 нуклеотида от границы экзонов 6/7. Ранее показано, что стоп-кодон, расположенный более чем за 50 нуклеотидов от последней экзон-экзонной границы, распо-

знается как преждевременный и инициирует нон-сенс-опосредованный механизм деградации мРНК (NMD) [13]. Таким образом, вариант интронной последовательности NG_008679.1(PAX6_v001):с.142-14С>G продуцирует нулевой аллель и ведет к гаплонедостаточности гена *PAX6* (рис. Г).

Подтверждение патогенного характера и причинной роли одного из глубоких интронных вариантов последовательности гена *PAX6* в возникновении ВА подчеркивает важность расширенного поиска мутаций в гене *PAX6* у пациентов. Результаты исследования мутаций в гене *PAX6* в обширной выборке пациентов с ВА из России указывают на недооценку доли мутаций сплайсинга в мировых базах данных. Выявление у пациентов вариантов интронной последовательности, влияющих на сплайсинг, всегда требует функционального подтверждения патогенного статуса обнаруженного варианта, которое все еще остается проблемой из-за трудоемкости и нетривиальности процедуры функционального анализа *in vitro*. Именно поэтому пополнение баз данных о патогенных мутациях за счет вариантов, локализованных вне кодирующей последовательности и консенсусных динуклеотидов сайтов сплайсинга, происходит довольно медленно и не отражает истинной частоты мутаций, нарушающих сплайсинг.

Список литературы

1. Васильева Т.А., Воскресенская А.А., Хлебникова О.В. и др. Дифференциальная диагностика наследственных форм врожденной аниридии с позиций современной генетики // Вестник РАМН. 2017. Т. 72. № 4. С. 233-241. doi: 10.15690/vramn834
2. Hingorani M., Hanson I., van Heyningen V. Aniridia // Eur J Hum Genet. 2012. V. 20. № 10. P. 1011-7. doi: 10.1038/ejhg.2012.100
3. Васильева Т.А., Хлебникова О.В., Марахонов А.В. и др. Изучение генетических основ и разработка протоколов для диагностики наследственных заболеваний органа зрения на примере врожденной аниридии // Медицинская генетика. 2016. Т. 15. № 6. С. 37-43.
4. Vasilyeva T.A., Voskresenskaya A.A., Kasmann-Kellner B. et al. Molecular analysis of patients with aniridia in Russian Federation broadens the spectrum of PAX6 mutations // Clin Genet. 2017. V. 92. № 6. P. 639-644. doi: 10.1111/cge.13019
5. Richards S., Aziz N., Bale S. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology // Genet Med. 2015. V. 17. № 5. P. 405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30
6. Марахонов А.В., Васильева Т.А., Воскресенская А.А. и др. Опыт применения медицинской технологии диагностики врожденной аниридии в ФГБНУ «МГНЦ» // Медицинская генетика. 2017. Т. 16. № 11. С. 23-26.
7. Desmet F.O., Hamroun D., Lalande M. et al. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals // Nucleic Acids Res. 2009. V. 37. № 9. P. e67. doi: 10.1093/nar/gkp215
8. Shibata A., Okuno T., Rahman M.A. et al. IntSplice: prediction of the splicing consequences of intronic single-nucleotide variations in the human genome // J Hum Genet. 2016. V. 61. № 7. P. 633-40. doi: 10.1038/jhg.2016.23

9. Gurskaya N.G., Staroverov D.B., Zhang L. et al. Analysis of alternative splicing of cassette exons at single-cell level using two fluorescent proteins // *Nucleic Acids Res.* 2012. V. 40. № 8. P. e57. doi: 10.1093/nar/gkr1314
10. Sperling R. The nuts and bolts of the endogenous spliceosome // *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2017. V. 8. № 1 doi: 10.1002/wrna.1377
11. Liu S.R., Hu C.G., Zhang J.Z. Regulatory effects of cotranscriptional RNA structure formation and transitions // *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2016. V. 7. № 5. P. 562-74. doi: 10.1002/wrna.1350
12. Weisschuh N., Wissinger B., Gramer E. A splice site mutation in the PAX6 gene which induces exon skipping causes autosomal dominant inherited aniridia // *Mol Vis.* 2012. V. 18. P. 751-7.
13. Shoemaker C.J., Green R. Translation drives mRNA quality control // *Nat Struct Mol Biol.* 2012. V. 19. № 6. P. 594-601. doi: 10.1038/nsmb.2301
14. Denisov S.V., Bazykin G.A., Sutormin R. et al. Weak negative and positive selection and the drift load at splice sites // *Genome Biol Evol.* 2014. V. 6. № 6. P. 1437-47. doi: 10.1093/gbe/evu100