

Синдром Данона: совокупный анализ данных таргетного NGS и клиники (первый опыт диагностики в Беларуси)

Сивицкая Л.Н.^{1*}, Вайханская Т.Г.², Даниленко Н.Г.¹,
Левданский О.Д.¹, Курушко Т.В.², Давыденко О.Г.¹

¹ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь, cytoplasmic@mail.ru
(директор к.б.н. Лемеш Валентина Александровна)

² Республиканский научно-практический центр «Кардиология», ул. Р. Люксембург, 110, 220036, г. Минск, Беларусь

Метод таргетного NGS был применен для поиска мутаций, повлекших развитие гипертрофической кардиомиопатии у пациента 28 лет. С использованием коммерческой панели TruSight Cardiomyopathy Sequencing panel была выявлена делеция c.864+3_864+6delGAGT (rs397516751) в гене *LAMP2*, затрагивающая донорный сайт сплайсинга в интроне 6. Ген *LAMP2* (lysosomal associated membrane protein 2, Xq24) кодирует мембранный гликопротеид, необходимый для адгезии лизосом и процесса аутофагии. Мутации в этом гене ассоциированы с развитием болезни Данона, которая может проявляться как фенокопия гипертрофической кардиомиопатии. Метод NGS позволил скорректировать диагноз. В статье приведены данные других клинических случаев, подтверждающих патогенность мутаций, нарушающих донорный сайт сплайсинга в интроне 6 гена *LAMP2*.

Ключевые слова: NGS, болезнь Данона, гипертрофическая кардиомиопатия, лизосома-ассоциированный мембранный протеин 2, ген *LAMP2*.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The first case of Danon disease in Belarus, diagnosed by targeted NGS

Sivitskaya L.N.¹, Vaikhanskaya T.G.², Danilenko N.G.¹,
Liaudanski O.D.¹, Kurushka T.V.², Davydenko O.G.¹

The targeted NGS was used to search for mutations, associated with hypertrophic cardiomyopathy in a 28-year-old patient. TruSight Cardiomyopathy Sequencing panel allowed to detect c.864 + 3_864 + 6delGAGT deletion (rs397516751) that affects a natural splice site in intron 6 in the *LAMP2* gene. The *LAMP2* (lysosomal-associated membrane protein 2, Xq24) codes for a membrane glycoprotein necessary for lysosome adhesion and autophagy. Mutations in this gene are associated with Danon disease, which can manifest as a phenocopy of hypertrophic cardiomyopathy. The NGS made it possible to correct the diagnosis. Data of other clinical cases are presented in the article, confirming the pathogenicity of mutations that affect the donor splice site in intron 6 in the *LAMP2*.

Key words: NGS, Danon disease, hypertrophic cardiomyopathy, lysosome-associated membrane protein 2, *LAMP2* gene.

Введение

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) относится к гетерогенным заболеваниям. В большинстве случаев поиск мутаций при этой патологии осуществляется в генах, кодирующих белки саркомеров. Однако в 50% случаев причина ГКМП не связана с изменениями в саркомерных белках [1]. Некоторые метаболические заболевания (амилоидоз, болезнь Фабри, Данона, Кори и др.) проявляются как фенокопия ГКМП из-за отложения метаболитов в кардиомиоцитах. Метаболическую причину такой ГКМП не всегда легко распознать, хотя их ранняя диагностика имеет решающее значение для определения стратегии лечения.

Мы представляем случай болезни Данона, которая манифестировала как фенокопия ГКМП с гипертрофией левого и правого желудочков сердца и дополнительными признаками. Метод NGS был применен для установления генетической причины развития ГКМП.

Материалы и методы

Клинический случай

Пациент, молодой мужчина, кровных родственников не имеет, своей родословной не знает. С 12 лет отмечал приступы сердцебиения и слабости в мышцах ног, шеи и плеч. В возрасте 28 лет мужчина был госпитализирован в РНПЦ «Кардиология» с жалобами на сердцебиения и эпизоды потери сознания. При эхокардиографии выявлена гипертрофия левого желудочка сердца (ЛЖ) в сочетании с выраженной систолической дисфункцией. Толщина стенок ЛЖ в диастолу составила 17—27 мм (норма 9—11 мм). Наблюдалось расширение полости левого желудочка на фоне систолической дисфункции, при этом величина фракции выброса составляла 38%. Отмечалось гипертрофическое строение верхушки левого желудочка. По данным ЭКГ выявлена экстремально высокая амплитуда комплексов, полная блокада левой ножки пучка Гиса, трепетание предсердий. При су-

точном мониторинговании ЭКГ зарегистрированы пароксизмы неустойчивой желудочковой тахикардии и интермиттирующая атриовентрикулярная блокада 3 степени. Скелетная миопатия проявилась в виде гипотрофии/атрофии дистальных мышц нижних конечностей и проксимальных мышц верхних конечностей, субтильного телосложения с выраженным поясничным гиперлордозом, а также симптомов «крыловидных лопаток» и перонеальной походки.

У пациента выявлены отклонения в лабораторных показателях: повышение уровня тропонина I (0,46 нг/мл), лактатдегидрогеназы (1343 Е/л), креатинфосфокиназы (1553 U/L), мозгового натрийуретического пептида (1795 пг/ммоль). Отмечались также проявления цитолиза гепатоцитов в виде повышения уровня аспарагинтрансферазы до 359Е/л и аланинаминотрансферазы до 294 Е/л.

Семейный анамнез отягощен: внезапная смерть матери в молодом возрасте (до 30 лет). На фоне проведенной оптимальной медикаментозной терапии сердечной недостаточности пациенту имплантировали кардиоресинхронизирующее устройство с функцией кардиовертер-дефибриллятора.

Генетические исследования

Письменное информированное согласие на проведение молекулярно-генетических исследований и разрешение на анонимную публикацию результатов было получено от пациента. Геномная ДНК была получена из буккальных эпителиоцитов ротовой полости методом фенол-хлормной экстракции по стандартному протоколу.

Таргетное секвенирование нового поколения (NGS) было выполнено на приборе MiSeq System (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). Коммерческая панель TruSight Cardiomyopathy Sequencing panel (Illumina Inc., San Diego, CA, USA), охватывающая 46 генов, изменения в которых приводят к развитию кардиомиопатий различного генеза, была использована для поиска вариантов, повлекших развитие тяжелого фенотипа.

Метод прямого секвенирования по Сэнгеру был использован для проверки вариантов, идентифицированных при NGS, с помощью BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit согласно протоколу производителя на приборе 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Последовательности праймеров (производство ОДО «Праймтех», Минск, Беларусь) доступны по запросу.

Биоинформатические ресурсы

Обработка данных NGS была выполнена с помощью доступных web-ресурсов. Качество «сырых» данных FASTQ-формата оценивалось с помощью FASTQC. Картирование было выполнено с помощью BWA (Barrons-Wheeler Aligner) на референсный геном NCBI build37 (UCSC hg19). Первичное аннотирование осуществ-

лялось ресурсами SAMtools v.1.18 и GATK v3.2/2. Дальнейшее аннотирование вариантов было выполнено в программе ANNOVAR с использованием частотных данных 1000 Genomes Project, Exome Aggregation Consortium (ExAC), Exome sequencing project (ESP). Клиническое проявление вариантов оценивалось с помощью ClinVar database, OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) и данных литературы.

Результаты и обсуждение

На момент проведения молекулярно-генетического исследования пациенту М. был установлен предварительный диагноз необструктивной формы ГКМП с трансформацией в дилатационную стадию и скелетной миопатии неуточненного генеза. Методом NGS у него была выявлена делеция с.864+3_864+6delGAGT (NM_002294.2, rs397516751) в гене *LAMP2*, кодирующем лизосома-ассоциированный мембранный протеин 2. Согласно альтернативной номенклатуре — IVS6+3_6delGAGT. Делеция находится в 5'-районе интрона 6, в области стыка с экзоном 6, где локализуется естественный сайт сплайсинга. Такая делеция с большой вероятностью приведет к его ликвидации и изменению сплайсинга пре-мРНК.

На основании результатов NGS диагноз пациента был скорректирован — болезнь Данона (БД), ассоциированная с мутациями в гене *LAMP2*. Ген *LAMP2* (lysosomal associated membrane protein 2, Xq24) кодирует мембранный гликопротеид, необходимый для адгезии лизосом. Мутации в нем приводят к накоплению гликогена в клетках вследствие нарушения процесса аутофагии [2, 3]. В классическом варианте БД проявляется триадой признаков: гипертрофической или дилатационной кардиомиопатией, скелетной миопатией и умственной отсталостью. Описаны случаи с разной степенью выраженности мышечных и когнитивных нарушений, от минимальных проявлений до тяжелой симптоматики [4, 5]. Особенности проявления болезни Данона у мужчин и женщин связаны с X-сцепленным типом наследования. Показано, что более тяжелое проявление, мультисистемность и более ранняя манифестация (13 ± 8 года) чаще встречаются у мужчин. У женщин, вследствие гетерозиготности, болезнь проявляется в 3-4 декаде жизни и характеризуется более мягкими формами скелетной миопатии и когнитивного дефицита или их полным отсутствием [4, 5].

Для выявления нейрокогнитивных расстройств у пациента был проведен тест Mini Mental State Examination (MMSE). Обнаружены затруднения в математическом счете, снижение зрительной и слухоречевой памяти, некоторые элементы пространственной агнозии и умеренные расстройства конструктивного праксиса. Согласно результатам MMSE теста, пациент страдал деменцией умеренной степени — 15 баллов (11-19 баллов — деменция умеренной степени; 20-23 — легкая деменция).

Несмотря на проведение адекватной лечебной стратегии (медикаментозная и электрофизиологическая терапия) пациент скончался в возрасте 30 лет из-за неэффективности шоковой терапии возникших жизнеопасных желудочковых тахикардий. По данным аутопсии масса его сердца составила 879 г, отмечался распространенный фиброз субэндокардиальной локализации, не соответствующий бассейнам коронарного кровоснабжения.

Делеция с.864+3_864+6delGAGT ранее была описана Вуй с соавторами (2008) у 16-летнего молодого человека из Мексики с ГКМП и тяжелой скелетной миопатией. Клинические проявления патологии и время манифестации сопоставимы с нашим пациентом. Однако ментальный статус пациента из Мексики был в норме. Биопсия бедренной мышцы продемонстрировала увеличение активности щелочных и кислых фосфатаз в ткани, обилие гипертрофических мышечных волокон, наполненных кислыми фосфатазами и гликогеном, что указывало на нарушения процесса аутофагии [6].

Область границы экзона 6 и интрона 6 можно по праву считать «горячей точкой» гена *LAMP2*. В этом районе обнаружены точковые замены, также нарушающие донорный сайт сплайсинга — rs730880485 (с.864+2T>C) и rs727503119 (с.864+1G>A и с.864+1G>T). Все они интерпретируются как «патогенные» и выявлены у мужчин с БД или у женщин с *LAMP2*-ассоциированной кардиомиопатией [5, 7, 8].

Описан еще один клинический случай 4bp-делеции в этой же области, но затрагивающий 1-4-ый нуклеотиды интрона 6 — с.864+1_864+4delGTGA [8]. Эта мутация выявлена у двух братьев с СД. У одного из них заболевание прогрессировало стремительно с 16-летнего возраста. Пациент скончался в возрасте 22 лет. Гистопатологическое исследование его сердца подтвердило гипертрофию миоцитов и интерстициальный фиброз. У него, как и его брата, интеллект был сохранен. Повышенный уровень креатинфосфокиназы указывал на изменения в скелетных мышцах, однако, явных неврологических дефектов и клинических проявлений мышечной дистрофии не было выявлено [8].

Для предсказания того, какой эффект может оказать обнаруженная нами мутация с.864+3_864+6delGAGT на процесс сплайсинга пре-мРНК^{*LAMP2*}, были использованы он-лайн предикторы Human Splice Finder (HSF) и MaxEntScan. Обе программы указали на «поломку» естественного донорного сайта сплайсинга вблизи экзона 6 при делеции. Альтернативные донорные сайты, которые могут быть использованы взамен утраченного, приводят к сдвигу рамки считывания мРНК и преждевременной термации транскрипции. Результаты HSF и MaxEntScan являются теоретическими. Для выяснения

точных изменений в мРНК при сплайсинг-мутациях необходимы исследования РНК пораженных тканей.

Мы интерпретируем делецию с.864+3_864+6delGAGT как «патогенная», повлекшая развитие БД у нашего пациента. В популяционных базах данных 1000Genomes, ExAC и ESP отсутствует информация о частоте этой мутации. Она расположена в «hot spot» гена *LAMP2*, где были выявлены другие патогенные мутации. Описан клинический случай носительства этой же делеции с подобным проявлением БД. Изменения сплайсинга и нарушения синтеза белка при с.864+3_864+6delGAGT предсказаны *in silico*.

Заключение

В представленном клиническом случае метаболическая причина гипертрофии миокарда была нераспознана. Метод таргетного NGS позволил идентифицировать гомизиготную делецию с.864+3_864+6delGAGT, затрагивающую сайт сплайсинга в гене *LAMP2*, и уточнить диагноз — *болезнь Данона*. Изменения донорного сайта сплайсинга в интроне 6 описаны в нескольких клинических случаях с БД, что подтверждает патогенность мутаций, затрагивающих его. Учитывая неблагоприятный прогноз для пациентов с БД, ранняя диагностика имеет решающее значение для определения стратегии лечения и своевременной трансплантации сердца, как наиболее эффективного метода лечения.

Список литературы

1. Леонтьева И.В., Царегородцев Д.А. Болезнь Данона как причина гипертрофической кардиомиопатии // Российский вестник перинатологии и педиатрии. — 2015. — № 3. — С. 26-30
2. Tanaka Y., Guhde G., Suter A., et al. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in *LAMP-2*-deficient mice // Nature. — 2000. — Vol. 406. № 6798. — P. 902-906
3. Danon M.J., Oh S.J., DiMauro S., et al. Lysosomal glycogen storage disease with normal acid maltase // Neurology — 1981. — Vol. 31. №1. — P. 51-57
4. Charron P. Danon's disease as a cause of hypertrophic cardiomyopathy: a systematic survey // Heart. — 2004. — Vol. 90. № 8. — P. 842-846
5. Boucek D., Jirikowic J., Taylor M. Natural history of Danon disease // Genet. Med. — 2011. — Vol. 13. № 6. — P. 563-568
6. Bui Y.K., Renella P., Martinez-Agosto J.A., et al. Danon disease with typical early-onset cardiomyopathy in a male: focus on a novel *LAMP-2* mutation // Pediatr Transplant. — 2008. — Vol. 12. № 2. — P. 246-250
7. Horvath J., Ketelsen U-P., Geibel-Zehender A., et al. Identification of a novel *LAMP2* mutation responsible for X-chromosomal dominant Danon disease // Neuropediatrics — 2003. — Vol. 34. № 5. — P. 270-273
8. Arad M., Maron B.J., Gorham J.M., et al. Glycogen storage diseases presenting as hypertrophic cardiomyopathy // N Engl J Med. — 2005. — Vol. 352. № 4. — P. 362-372