

## Технология комплексной ДНК-диагностики синдрома ломкой X-хромосомы

Кузнецова Е.Б.<sup>1,2</sup>, Стрельников В.В.<sup>1,3</sup>, Танас А.С.<sup>1,3</sup>, Немцова М.В.<sup>1,2</sup>, Залетаев Д.В.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»,

Москва, 115522, ул. Москворечье, д. 1; e-mail: kuznetsova.k@bk.ru

<sup>2</sup> ФГАУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова

Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет);

119991, Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр. 2; e-mail: zalnem@mail.ru

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Пирогова»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,

Москва, 117997, ул. Островитянова, д. 1; e-mail: vstrel@list.ru

Разработана технология комплексной ДНК-диагностики синдрома ломкой X-хромосомы (синдрома Мартина—Белл), соответствующая современному уровню развития методов секвенирования ДНК, определения копийности участков генома и детекции аномального метилирования ДНК. Технология включает методы таргетного высокопроизводительного параллельного секвенирования ДНК, мультиплексной амплификации лигированных зондов (MLPA) и мультиплексной метилчувствительной ПЦР. Поиск точковых мутаций и коротких инсерций/делеций в генах *FMR1* и *FMR1-AS1* осуществляется с применением секвенирования нового поколения на приборе Ion Torrent PGM. В случае синдрома Мартина—Белл методы секвенирования позволяют выявлять не только однонуклеотидные замены, небольшие инсерции и делеции, но и протяженные делеции, наблюдающиеся у пробандов в гемизиготном состоянии. Таким образом, MLPA экзонов гена *FMR1* используется в рамках настоящей технологии ДНК-диагностики скорее как подтверждающий, чем основной, метод. Метилчувствительная ПЦР используется для выявления аномального метилирования промотора гена *FMR1*. Новая технология комплексной ДНК-диагностики синдрома Мартина—Белл направлена на выявление всех известных на сегодняшний день молекулярно-генетических нарушений, приводящих к развитию заболевания.

**Ключевые слова:** синдром ломкой X-хромосомы, синдром Мартина—Белл, ген *FMR1*, ген *FMR1-AS1*, медицинская технология, высокопроизводительное параллельное секвенирование ДНК, MLPA, метилчувствительная ПЦР.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Technology for comprehensive DNA analysis in fragile X syndrome

Kuznetsova E.B.<sup>1,2</sup>, Strelnikov V.V.<sup>1,3</sup>, Tanas A.S.<sup>1,3</sup>, Nemtsova M.V.<sup>1,2</sup>, Zaletaev D.V.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation, 115522, Moskvorechie st.1, e-mail: kuznetsova.k@bk.ru

<sup>2</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation, 119991, Trubetskaya st. 8, e-mail: zalnem@mail.ru

<sup>3</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation, 117997, Ostrovityanova st. 1, e-mail: vstrel@list.ru

We have developed the technology for complex DNA diagnostics of fragile X syndrome, contemporaneous to the current level of the in DNA sequencing methods, assessment of the DNA regional copy number, and detection of abnormal DNA methylation. The technology includes targeted high-throughput parallel DNA sequencing, multiplex amplification of ligated probes (MLPA), and multiplex methylation sensitive PCR. The search for point mutations and short insertions / deletions in the *FMR1* and *FMR1-AS1* genes was performed using an NGS on the Ion Torrent PGM instrument. In the case of fragile X syndrome, the sequencing methods allow detecting not only single nucleotide substitutions, small insertions and deletions, but also extended deletions observed in probands in the hemizygous state. Thus, the MLPA of the exons of the *FMR1* gene is used within the framework of the present DNA diagnostic technology rather as a confirmatory than the main method. Methylation sensitive PCR is used to detect abnormal methylation of the promoter of the *FMR1* gene. Thus, the new technology of complex DNA diagnosis of the fragile X syndrome is aimed at identifying all known molecular genetic abnormalities leading to the development of the disease.

**Key words:** fragile X syndrome, *FMR1* gene, *FMR1-AS1* gene, medical technology, NGS, MLPA, methylation sensitive PCR.

#### Введение

Синдром ломкой X-хромосомы (синдром Мартина—Белл, СМБ) — наиболее распространённая моногенная форма X-сцепленной умственной отсталости. Основными клиническими диагностическими признаками СМБ являются умственная отсталость различной степени выраженности, крупные оттопыренные ушные

раковины, выступающий лоб и массивный подбородок, макроорхизм [1]. Однако в связи с тем, что характерные признаки синдрома формируется не сразу, и в связи с выраженной вариабельностью фенотипических проявлений, раннее выявление и дифференциальная диагностика этого синдрома на клиническом уровне затруднены.

Разработка надёжных методов диагностики СМБ и идентификации здоровых носителей стала возможной только в результате клонирования гена заболевания и выявления механизмов возникновения мутаций в этом гене [2]. У подавляющего большинства больных с СМБ причиной заболевания является экспансия полиморфного повтора CGG, расположенного в 5'-нетранслируемой области гена *FMRI* (fragile X mental retardation 1). У нормальных индивидов длина повтора варьирует от 2 до 54 триплетов. Увеличение длины повтора от 52 до 200 триплетов (премутация) не сопровождается экспрессией патологического фенотипа. Дальнейшая экспансия (свыше 200 копий) представляет собой полную мутацию и приводит к развитию клинических проявлений СМБ. Полные мутации ассоциированы с аномальным метилированием промоторной области гена *FMRI*. Наличие в этой области сайтов узнавания метилчувствительных рестриктаз дает возможность проводить молекулярно-генетическую диагностику СМБ, основанную на метилчувствительной ПЦР. Разработанная нами ранее система ДНК-диагностики СМБ на основе анализа метилирования ДНК [3—5], успешно проработавшая почти 20 лет, в настоящее время требует совершенствования с использованием уточненных данных о последовательности генома человека и современных требований к дизайну многолокусных метилчувствительных ПЦР [6].

Количество описанных точковых мутаций в гене *FMRI* невелико. Впервые такая мутация была выявлена в 1993 г. у больного с типичными признаками СМБ [7]. У больного с выраженной умственной отсталостью были высокий лоб, асимметричное продолговатое лицо, крупные уши, толстые губы, мандибулярный прогнатизм, макроорхизм. Цитогенетический анализ показал отсутствие патогномичного фолатчувствительного ломкого участка X-хромосомы. Поиск мутаций в кодирующей части гена привёл к обнаружению трансверсии Т на А, заменяющей кодон 367 с АТТ (изолейцин) на ААТ (аспарагин). У здоровых родственников описанной мутации выявлено не было [7].

Lugenbeel с соавт. описали делецию А в позиции 373 мРНК, приводящую к сдвигу рамки считывания и преждевременной терминации трансляции у мальчика с умственной отсталостью и всеми основными признаками СМБ, кроме макроорхизма, и замену двух нуклеотидов (GG на TA) в участке сплайсинга, приводящую к вырезанию второго экзона и синтезу укороченного белкового продукта, у взрослого больного со всеми признаками СМБ, включая макроорхизм [8]. Другие опубликованные точковые мутации в гене *FMRI* после тестирования дополнительных контрольных образцов были признаны нормальными полиморфными вариантами [9—14].

На сегодняшний день применение высокопроизводительного параллельного секвенирования позволяет сделать поиск структурных изменений в гене *FMRI* более эффективным и относительно экономичным. В случае СМБ методы секвенирования позволяют выявлять

не только однонуклеотидные замены, небольшие инсерции и делеции, но и протяженные делеции, наблюдающиеся у пробандов в гемизиготном состоянии.

Совокупность методов анализа метилирования ДНК и секвенирования нуклеотидных последовательностей позволяет охватить полный спектр генетических нарушений у больных с СМБ, что способствует проведению грамотного и объективного медико-генетического консультирования.

## Материалы и методы

### Клинический материал

В работе использовали биологический материал 472 пациентов мужского пола с клиническими признаками СМБ разной степени выраженности, а также с несиндромальной умственной отсталостью, проходивших обследование в ФГБНУ «МГНЦ» в 2017 г. В качестве материала для получения ДНК использовали лимфоциты периферической венозной крови пациентов.

Выделение ДНК из тканей и лимфоцитов периферической крови проводили стандартным методом фенол-хлороформной экстракции.

### Секвенирование ДНК

Высокопроизводительное параллельное секвенирование генов *FMRI* и *FMRI-AS1* проводили на приборе Ion Torrent PGM (Life Technologies, США) в ФГБНУ «МГНЦ». Панель праймеров для секвенирования (табл. 1) разработана с использованием программного обеспечения AmpliSeq Designer (Life Technologies). Таргетные регионы включают все кодирующие последовательности гена *FMRI*, прилегающие области интронов и 5', 3'-нетранслируемые области (UTR), а также полную последовательность гена длинной некодирующей РНК *FMRI-AS1*. Для создания библиотеки использовали реагенты Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (Life Technologies).

Клональную эмульсионную ПЦР проводили с использованием PGM Template OT2 200 Kit (Life Technologies) на приборе Ion One Touch 2 в соответствии с протоколом производителя. Секвенирование мультиплексированных образцов выполняли на секвенаторе Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) на чипах Ion 318 с использованием Ion PGM Sequencing 200 Kit (Life Technologies) по протоколу производителя.

Результаты секвенирования анализировали с использованием программного обеспечения Torrent Suite, в составе: Base Caller (первичный анализ результатов секвенирования); Torrent Mapping Alignment Program — TMAP (выравнивание последовательностей относительно референсного генома NCBI build 37 — hg19); Variant Caller (анализ вариаций нуклеотидных последовательностей). Аннотацию функционального значения генетических вариантов и фильтрацию известных полиморфизмов с использованием базы данных dbSNP проводили с использованием компьютерной программы

ANNOVAR. Визуальный анализ данных, ручную фильтрацию артефактов секвенирования и выравнивания последовательностей осуществляли с использованием программы Integrative Genomics Viewer — IGV.

*Анализ количества копий гена FMR1*

Исключение протяженных делеций гена *FMR1* в ДНК пациентов осуществляли с использованием мультиплексной амплификации лигированных зондов (MLPA, multiplex ligation-dependent amplification). Реакцию MLPA проводили по стандартному протоколу, рекомендованному

производителем (MRC-Holland, <http://www.mlpa.com>). В работе использовали набор MRC-Holland SALSA MLPA ME029 *FMR1*/AFF2 probemix.

Капиллярный электрофорез продуктов MLPA проводили на генетическом анализаторе ABI3500 в соответствии с протоколом Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer User Guide (Life Technologies). Полученные данные обрабатывали с использованием программного обеспечения Coffalyser.NET, предоставленного компанией MRC-Holland.

Таблица 1

**Праймеры для проведения высокопроизводительного параллельного секвенирования генов *FMR1* и *FMR1-AS1***

Название пары праймеров	Последовательность прямого праймера	Последовательность обратного праймера	Ген	Пул
AMPL7160113753	AGAGAGAGAGAGAGGACTTTGGAAG	CAGACAGGGCAAATGTCTTTTCTATCT	<i>FMR1-AS1</i>	1
AMPL7160113754	ATACCTTGAATCAACCACCTTTAATGTGC	GTCTTTACAACCTTTGCCAGAACTTATTT	<i>FMR1-AS1</i>	2
AMPL7160113755	GCAGAGGGTATGCACAAGTTCT	GCATTTACAGAGATGGTATTGGACTGTAAA	<i>FMR1-AS1</i>	1
AMPL7160113756	TCAAAAACAGACTGTTGAGTAAAACAGTG	AGAGAGTTAACTTTGCTCCTCAATTTTCA	<i>FMR1-AS1</i>	2
AMPL7160113757	CAAGGACCCCTGTAGGGACTGATA	CCTGAACCTGTGATGCACCTTC	<i>FMR1-AS1</i>	1
AMPL7160113758	GCCCAGGAAGGATGTGTAGAGA	CCAAGAACCAATAGGGCTGAAA	<i>FMR1-AS1</i>	2
AMPL7160113759	CTCTGCTCCCATTGAGCCTATG	GATGATTCCAGCTGGAATATGGCA	<i>FMR1-AS1</i>	1
AMPL7160113760	CTCTGCCAAGTCAAGTCTATTAGT	CGACTGCCAGCATTGAACTTAGT	<i>FMR1-AS1</i>	2
AMPL7160113765	TTGTCTGACAATTTGATTTATGTCCACCTA	ACCCCTTACATTCCACTGTGAAACAAA	<i>FMR1-AS1</i>	1
AMPL7160113766	TAAGCACGGTGTAAAAACAGGAATAAGA	TTTCTCAGACCCAGCTTTGAC	<i>FMR1-AS1</i>	2
AMPL7160113767	TCAAGTAAAAGTATGAAAATGAGTTGAGGA	GGGTGAAGGATTAGACAGAAGAAGAC	<i>FMR1-AS1</i>	1
AMPL7160113768	ACCCTGGTTGCCACTGTTC	AGAACGCCCTTTCTGCAGA	<i>FMR1-AS1</i>	2
AMPL7160113764	TAACCGGATGCATTTGATTTCCCA	GTCACGTGATCAACGCTGTT	<i>FMR1-AS1</i>	1
AMPL7162611972	CTCCCAGGCCACTTGAAGAGAGAG	CCCTCCACCGGAAGTGAA	<i>FMR1-AS1</i>	2
AMPL7153722798	GCTCAGCTCCGTTTCGGT	ACCACCAGCTCCTCCATCTT	<i>FMR1</i>	1
AMPL7159105493	CGCTAGCAGGGCTGAAGAG	CCCTCCCAACAACATCCCG	<i>FMR1</i>	2
AMPL7153262946	TTTATCTCTAGGGTATAGCACATACAAGGT	CACTTACTTGTTTTCAAATGCAACTGTT	<i>FMR1-AS1</i>	1
AMPL7164843731	TACACAGGCATTTGTAAAGGATGTTTAT	GACCTCCAGGACATTAGCAGAAA	<i>FMR1-AS1</i>	2
AMPL7153722800	GGGTCAGCCTTAACCAAAAGTTG	CCCACTCTTTTCAAGTCTAAATGAC	<i>FMR1</i>	1
AMPL7153262941	GGGCATTTTAAAGAAATTTCTCGATATCT	TACTTCAAATAGAAATCCACACGGGAAT	<i>FMR1</i>	2
AMPL7154716132	TCCCGTGTGGATTTCTATTTTGAAGT	TAACAGATCTTAGACGTTCAATTGTGACAA	<i>FMR1</i>	1
AMPL7160073575	GATAGAATATGCAGCATGTGATGCAAC	GTTCTCAGCATTTCTTGTGTATCAACTTAC	<i>FMR1</i>	2
AMPL7153262936	GTGTAATCTGCCTGCATTTATTTATGTCA	AGGTGACTTCATTGATGGACTAAATGATTT	<i>FMR1</i>	1
AMPL7153262934	GTCATTTTGGTGAGCATTTTGTAGTTG	TGGAATGATACAGTTAATCGTTCCTAGGT	<i>FMR1</i>	2
AMPL7153722799	TTGATAAAGTGTATTCATCAGACGTCAT	GATTAGCCAGCTGAAATACTTGTGTTGG	<i>FMR1</i>	1
AMPL7153262930	CCAAACAAGTATTTTCAAGCTGGCT	TTCAATTAATGATACCCTCCAGTAAGAAAAA	<i>FMR1</i>	2
AMPL7153262927	GTAATAGTTTACAGTAGGGCTGTGCTT	CACATATTAGAGGTCCTCAACATATCACAT	<i>FMR1</i>	1
AMPL7154716131	TTTTTCTGCGTACAATTTGTATTCGGT	CATTAGGTTCAACCCCTGAATTATTGGA	<i>FMR1</i>	2
AMPL7153262924	TTTTTACCAAGGAAATATGCCACCAA	CAATTGTGACATCTGAGACAAATTAAGTGT	<i>FMR1</i>	1
AMPL7153262922	TGGGTTTAAAGTCTGCAGTGAA	CAGTCCCTAATCCTGAGGATCATTTG	<i>FMR1</i>	2
AMPL7153262921	ACCAGATCCTGTGCTAGGGAAAT	GCTAGAATGAGTCTCAACTGCTGA	<i>FMR1</i>	1
AMPL7154716146	TTAAGGAGATCATTCAATTTCTGATAATTCT	TCTGTGCAACTGCTCATCAATT	<i>FMR1</i>	2

Таблица 1 (окончание)

Название пары праймеров	Последовательность прямого праймера	Последовательность обратного праймера	Ген	Пул
AMPL7154716147	TAGGAAGTAGACCAGTTGCGTTTG	AGATTAGCAGCTATAAGTCTAGGAACAGAT	<i>FMR1</i>	1
AMPL7154716130	AAAATTAACCTCAAATATTGCAAAGCCCTT	GTCTCTGTGGTCAGATTCTGTTTCA	<i>FMR1</i>	2
AMPL7153722797	TAACTCTCGATAGGAACATAATTCTGAAGCA	GACAGCTGTTACAATTCACATTTGATTTCTT	<i>FMR1</i>	1
AMPL7159785870	AGCAGGCTAGATTATTAGCCATTGTG	AATTAAGATGAAAAGAGGCAGACAGGTT	<i>FMR1</i>	2
AMPL7155126157	AACATGTGGAATTTACACTTCAGGTTTAAA	GGTACTCCATTCACGAGTGGTT	<i>FMR1</i>	1
AMPL7155126158	ATCGTAACCAGAAGAAAGAGAAGCCA	AATTGTTGCTTATGGCCAATACCAAAAA	<i>FMR1</i>	2
AMPL7155126159	GGGCATGAAATGAACACAAATTATGCTAA	GAATGTACTGGTGAATGATCACCCAA	<i>FMR1</i>	1
AMPL7155126160	GAGCAGTGATATTCTTTGTTAATTTGGACC	AAATGTCACATCACACACATTTTCAGG	<i>FMR1</i>	2
AMPL7155126161	AGTTTATGTTTTGGTCCACTTTTCCAGTA	TGCCTAACCTGATGTTTATGTAAGGAAAA	<i>FMR1</i>	1
AMPL7155126162	AGCAAACCTGTCAAACATTAGTACTTTA	CCAGGAAGATTTGTTCCCTAGCTGAAAA	<i>FMR1</i>	2
AMPL7155126163	GGAGAAGAAAGAAGTATCTTCATCTGAGAG	ACCTGTACTTTGCAGGATTATTATGCAT	<i>FMR1</i>	1
AMPL7155126164	CAAGCTTATTTGGAGAGATAGGAAGGT	CTTTTCCAATTCTGCTTAAACATTAGACCA	<i>FMR1</i>	2
AMPL7155126165	ATTGGAAGCAGGTTAAATGTTTTGTAACCT	GGCTCTGTACAGATTTCAGTGGTAC	<i>FMR1</i>	1
AMPL7155126166	TATGTGAAGGACCTTCACTCTAAGATGTTA	GTGAAATCATGTGCAGTTTGTGTC	<i>FMR1</i>	2
AMPL7155126167	AGTTACTTTTCCTTGCATACAAACAAGC	GTTACATTACAAGGTCATTCTACCTTGGTT	<i>FMR1</i>	1
AMPL7155126168	CACATCATCTGTAAGCTGTTTGGTTTTAAA	CATCAACATCAATTTAGCAGAGGAAGATC	<i>FMR1</i>	2
AMPL7155126169	AGTGCAATATATTTGTATGCAAGCAGTTT	TGGTTGAGTTTTTCGCTTTATTAACAAGT	<i>FMR1</i>	1
AMPL7155126170	CGTCATAGGAAGTTAGCCTTTATCTACC	TGAAAAACATACACGTTTAGCACACAAAT	<i>FMR1</i>	2
AMPL7164843699	CATGTTTTCAAATGGAGTTGGAGTTCATT	CAGGAGCAAACATCTGTCCAGACT	<i>FMR1</i>	1

Таблица 2

**Список праймеров для метилчувствительной ПЦР промоторной области гена *FMR1* и контрольных фрагментов**

Ген	Последовательности праймеров	Длина фрагмента, п.н.
<i>FMR1</i>	FRAXA2f: CCGCCCTTCAGCCTTCCC GCCCT FRAXA2r: CCCCTCGGCCCGCCCTCTCTCT	146
<i>CUX1</i>	CUX1-4f: GACGCCGCTACCTCAGCCGCCG CUX1-4r: TCGGTGCAGGCCCGGCCCAA	378
<i>mir34</i>	mir34f: ACCGACGGGACAGCGGCATCTCCTCC mir34r: ACTGGCCCCGCACCCACGC	197

*Анализ метилирования промотора гена *FMR1**

Гидролиз ДНК метилчувствительной рестриктазой BstHNI проводили в смеси 1,5 мкг геномной ДНК, 20 ед. акт. фермента, 2 мкл буфера SEBufferY (x10) («СибЭнзим», Новосибирск). Объем смеси доводили до 20 мкл деионизированной водой и инкубировали в течение 16 ч при температуре 37°C.

Диагностическая тест-система включает три пары праймеров, фланкирующих промотор гена *FMR1*, фрагмент гена *CUX1* (положительный контроль ПЦР) и фрагмент гена *mir34* (контроль полноты гидролиза), табл. 2.

ПЦР проводили в смеси следующего состава: 0,1 мкг ДНК, 0,05 мкМ каждого олигопраймера, 200 мкМ dATP, 200 мкМ dTTP, 600 мкМ dCTP, 600 мкМ dGTP, 68 мМ Tris-HCl pH 8.3 при 25°C, 16,8 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01% Tween-20, 8% глицерин, 0,1 мг/мл BSA, 7 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10%

диметилсульфоксида, деионизированной воды до 25 мкл. Реакционную смесь прогревали при 95°C в течение 10 мин и проводили 33 цикла ПЦР в следующем режиме: 95°C — 30 с, 66°C — 45 с, 69°C — 105 с. Последнюю элонгацию проводили при 72°C в течение 10 мин. ПЦР проводили для двух образцов ДНК каждого пациента — гидролизованного BstHNI и интактного — параллельно. Продукты ПЦР разделяли в 8%-ном полиакриламидном геле и окрашивали нитратом серебра.

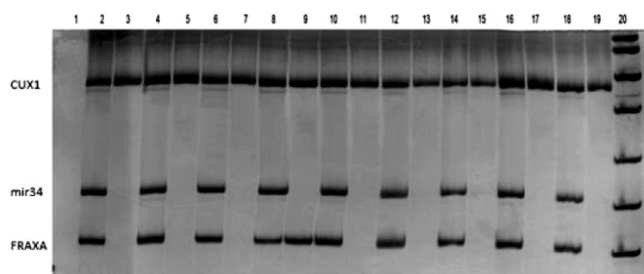
**Результаты и обсуждение**

Будучи наиболее распространенной моногенной формой умственной отсталости и представляя собой социально значимое заболевание, требующее эффективной ДНК-диагностики, СМБ, в то же время, является одним

из наследственных заболеваний, для которых стандартных подходов к молекулярно-генетической диагностике недостаточно. Патогномичная для СМБ мутация, экспансия тринуклеотидного повтора CGG в промоторной области гена *FMRI*, эффективно выявляется только одним из известных методов ДНК-диагностики — блот-гибридизацией по Саузерну, причём достоверные результаты обеспечивает лишь классический дизайн метода, требующий использования радиоактивных изотопов. Несмотря на многочисленные публикации, сообщающие о разработке всё более эффективных способов определения длины CGG-повтора гена *FMRI* методами на основе ПЦР, авторы указывают на инвариантность использования Саузерн-блоттинга для детекции аллелей в состоянии полной мутации (свыше 200 триплетов) [15].

Полные мутации при СМБ сопровождаются аномальным метилированием промоторной области гена *FMRI*. Наличие в этой области сайтов узнавания метилчувствительных рестриктаз дает возможность проводить молекулярно-генетическую диагностику СМБ, основанную на выявлении аномального метилирования промотора *FMRI*. Такая возможность учтена в некоторых протоколах ДНК-диагностики СМБ методом Саузерн-блоттинга, когда для подготовки фрагментов ДНК к гибридизации используются метилчувствительные рестриктазы, сайты узнавания которых обнаружены в области аномального метилирования ДНК, характерного для СМБ [4].

Ранее нами было предложено несколько вариантов дизайна теста на основе метилчувствительной ПЦР (МЧ-ПЦР), позволяющего осуществлять диагностику аномального метилирования промотора гена *FMRI* в сжатые сроки и без использования радиоактивных изотопов [3, 4]. С использованием МЧ-ПЦР были обследованы тысячи пациентов и выявлены десятки случаев синдрома Мартина—Белл, что обеспечило основу для эффективного медико-генетического консультирования, проведения пренатальной диагностики и осуществления каскадного скрининга в семьях.



Результаты анализа метилирования промоторной области гена *FMRI* методом многолокусной МЧ-ПЦР. 1 — отрицательный контроль. 2–3 — контрольная ДНК (здорового донора), 4–5, 6–7, 10–11, 12–13, 14–15, 16–17, 18–19 — ДНК пациентов мужского пола с УО, метилирования промотора *FMRI* не выявлено. 8–9 — ДНК больного с СМБ мужского пола, выявлено аномальное метилирование промотора *FMRI*. 20 — маркер молекулярного веса. В нечетных дорожках матрицы для ПЦР служили образцы геномной ДНК, предварительно обработанной *Bst*НН1, в четных в качестве матрицы использована интактная геномная ДНК.

Совершенствование аннотации генома человека и развитие технологии МЧ-ПЦР создали необходимость современного дизайна метода анализа аномального метилирования промотора *FMRI*, который представлен в настоящей работе. Относительно дизайна [4] изменены последовательности праймеров для амплификации участка промотора *FMRI*, что продиктовано не только уточнением последовательности референсного генома человека, но и требованием к совместимости пар праймеров в одной многолокусной системе МЧ-ПЦР. В современном виде тест-система включает в себя все необходимые атрибуты МЧ-ПЦР: внутренний контроль эффективности амплификации, внутренний контроль полноты гидролиза геномной ДНК и собственно анализируемый целевой locus генома. Требованием к фрагменту генома, выбираемому для обеспечения контроля эффективности амплификации, является его постоянно метилированное состояние в исследуемой ткани. Нами выбран участок гена *CUX1*, константно метилированный в ДНК лимфоцитов периферической крови. Напротив, контроль полноты гидролиза ДНК осуществляется амплификацией константно неметилированного участка генома, в нашем случае — фрагмента гена *mir34* (рисунок).

В результате мультилокусной МЧ-ПЦР на матрице ДНК, не подвергавшейся гидролизу, образуются все три продукта амплификации. Таким образом, в соответствующих дорожках геля будут наблюдаться три фрагмента ожидаемых длин.

В случае, если в ДНК пациента имеет место аномальное метилирование CpG-динуклеотидов исследуемой области, остатки цитозина заменены на 5-метилцитозин, в том числе в сайтах узнавания рестриктазы *Bst*НН1. В этом случае рестриктаза не в состоянии гидролизовать геномную ДНК в сайтах узнавания, и матрица для МЧ-ПЦР остается интактной. В результате, в окрашенном геле видны фрагменты, соответствующие участку промоторной области гена *FMRI*, а также фрагмент гена *CUX1* (положительный контроль ПЦР). Фрагмент, соответствующий гену *mir34*, должен отсутствовать, отражая полный гидролиз ДНК.

В тех образцах, где метилирование CpG-островков отсутствует, происходит гидролиз геномной ДНК в сайтах узнавания *Bst*НН1, матрица для ПЦР разрушается, и соответствующие ПЦР-продукты отсутствуют в ПААГ. Пример анализа геля представлен на рисунке.

Следует учитывать, что метилированное состояние промотора гена *FMRI* может наблюдаться при некоторых численных аномалиях половых хромосом, часть из которых может приводить к умственной отсталости различной степени тяжести. В частности, речь идет о дополнительных X-хромосомах у лиц мужского пола (варианты кариотипа 47,XXY; 49,XXXXY; 48,XXXY; 46,XX и различные мозаичные варианты). Кариотип 49,XXXXY ассоциирован с тяжёлой умственной отсталостью. Среди больных с синдромом Клайнфельтера, 47,XXY, и вариантом синдрома Клайнфельтера, 48,XXXY, частота умственной отсталости также превышает среднепопуляционные показатели. Та-

ким образом, при получении положительного результата теста на метилирование, необходимо сопоставление результатов с результатами кариотипирования.

В 2017 году с использованием обновленного метилчувствительного теста было обследовано 472 пациента мужского пола с клиническими признаками СМБ разной степени выраженности, а также с несиндромальной умственной отсталостью. Аномальное метилирование промотора гена *FMR1* выявлено в 23 случаях (5%), что соответствует значениям выявляемости СМБ в когортах подобного состава по данным зарубежных авторов и по нашим собственным наблюдениям [14].

Для 27 пациентов с признаками СМБ и отсутствием аномального метилирования промотора гена *FMR1* проведено высокопроизводительное параллельное секвенирование генов *FMR1* и *FMR1-AS1*. Патогенных генетических вариантов в исследованных генах не было выявлено ни у одного из пациентов. Ранее было показано, что мутации в гене *FMR1*, отличные от экспансии тринуклеотидного повтора CGG в первом экзоне гена, могут являться причиной развития СМБ, однако частота таких мутаций оценивалась как крайне низкая — до последнего времени описаны единичные случаи [9—14]. Внедрение методов высокопроизводительного параллельного секвенирования ДНК стимулировало новые попытки оценить частоту мутаций в гене *FMR1* на основе определения нуклеотидной последовательности гена в больших когортах пациентов с умственной отсталостью. В публикации 2017 года [14] сообщается о результатах такого исследования, проведенного на выборке 940 пациентов, в результате которого выявлены три различные патогенные мутации в трех семьях — внутригенная делеция и две мутации сайтов сплайсинга. Кроме того, авторы составили исчерпывающий обзор литературы, на основании которого сделали вывод о том, что среди генетических вариантов *FMR1*, опубликованных на сегодняшний день, лишь о шести можно говорить как о вариантах с доказанной патогенностью. Тем не менее, авторы делают вывод о целесообразности включения секвенирования гена *FMR1* в алгоритм ДНК-диагностики СМБ для пациентов, у которых не выявлено мажорной мутации — экспансии повтора CGG [14].

### Заключение

В настоящем исследовании применен комплексный подход, включающий многолокусную МЧ-ПЦР и высокопроизводительное параллельное секвенирование, для выявления молекулярно-генетических изменений в генах *FMR1* и *FMR1-AS1* у больных с направляющим клиническим диагнозом синдром Мартина—Белл и неспецифической умственной отсталостью. Обследованы 472 пациента, биологический материал которых был направлен научно-консультативным отделом ФГБНУ «МГНЦ» в лабораторию в 2017 г. Аномальное метилирование промотора гена *FMR1* выявлено в 5% случаев. Патогенных мутаций, отличных от экспансии

тринуклеотидного повтора CGG в первом экзоне гена *FMR1*, по результатам секвенирования ДНК 27 больных выявлено не было. Показатели выявляемости молекулярной патологии гена *FMR1* соответствуют данным зарубежных авторов и собственным наблюдениям.

### Список литературы

1. Козлова С.И., Демикова Н.С., Семанова Е., Блиникова О.Е. Наследственные синдромы и медико-генетическое консультирование. Москва, изд. Практика: 1996; стр. 304-305.
2. Oberle I., Rousseau F., Heitz F., et al. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science*. 1991; 252:1097-1102.
3. Strel'nikov, V., Nemtsova, M., Chesnokova, G., Kuleshov, N., Zaletayev, D. A simple multiplex FRAXA, FRAXE, and FRAXF PCR assay convenient for wide screening programs. *Human mutation*. 1999;13(2):166-169.
4. Strel'nikov, V.V., Nemtsova, M.V., Chesnokova, et al. Diagnosis of Martin-Bell syndrome based on an analysis of the structural-functional changes in the 5'-untranslated region of the FMR1 gene. *Molekuliarnaia biologii*. 1998; 33(2):330-336.
5. Залетаев, Д.В., Немцова, М.В., Стрельников, В.В. и соавт. Диагностика эпигенетической патологии при наследственных и онкологических заболеваниях. *Молекулярная биология*. 2004; 38(2):213-223.
6. Стрельников В.В., Танас А.С, Кузнецова Е.А. Методология локус-специфического анализа метилирования ДНК. Издательство: LAP Lambert Academic Publishing. ISBN 9783659670411; 2014, 104 стр.
7. De Boule K., Verkerk A.J.M.H., Reyniers E., et al. A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nature Genet*. 1993;3:31-35.
8. Lugenbeel K.A., Peier A.M., Carson N.L., Chudley A.E., Nelson D.L. Intragenic loss of function mutations demonstrate the primary role of FMR1 in fragile X syndrome. *Nature Genet*. 1995;10:483-485.
9. Myrick, L.K., Nakamoto-Kinoshita, M., Lindor, N.M., Kirmani, S., Cheng, X., Warren, S.T. Fragile X syndrome due to a missense mutation. *European Journal of Human Genetics*. 2014;22(10):1185-1189.
10. Handt, M., Epplen, A., Hoffjan, S., Mese, K., Epplen, J.T., Dekomien, G. Point mutation frequency in the FMR1 gene as revealed by fragile X syndrome screening. *Molecular and cellular probes*. 2014;28(5):279-283.
11. Redin, C., Gerard, B., Lauer, J., et al. Efficient strategy for the molecular diagnosis of intellectual disability using targeted high-throughput sequencing. *Journal of medical genetics*. 2014;51(11):724-736.
12. Grozeva, D., Carss, K., Spasic Boskovic, O., et al. Targeted next generation sequencing analysis of 1,000 individuals with intellectual disability. *Human mutation*. 2015;36(12): 1197-1204.
13. Wright, C.F., Fitzgerald, T.W., Jones, W.D., et al. Genetic diagnosis of developmental disorders in the DDD study: a scalable analysis of genome-wide research data. *The Lancet*. 2015;385(9975):1305-1314.
14. Quartier, A., Poquet, H., Gilbert-Dussardier, B., et al. Intragenic FMR1 disease-causing variants: a significant mutational mechanism leading to Fragile-X syndrome. *European Journal of Human Genetics*. 2017;25(4):423-431.
15. Hantash, F.M., Goos, D.G., Tsao, D., et al. Qualitative assessment of FMR1 (CGG) n triplet repeat status in normal, intermediate, premutation, full mutation, and mosaic carriers in both sexes: implications for fragile X syndrome carrier and newborn screening. *Genetics in Medicine*. 2010;12(3):162-173.