

Результаты использования новой медицинской технологии комплексной ДНК-диагностики синдрома Сотоса

Володин И.В.^{1,2}, Танас А.С.^{1,3}, Кузнецова Е.Б.^{1,4}, Симонова О.А.¹,
Матющенко Г.Н.¹, Дёмина Н.А.¹, Петухова М.С.¹, Бессонова Л.А.¹,
Анисимова И.В.¹, Пашченко М.С.¹, Залетаев Д.В.^{1,3,4}, Стрельников В.В.^{1,3}

¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»,

Москва, 115478, ул. Москворечье, д. 1; e-mail: ilya.fevral@mail.ru

² ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

125993, г. Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1, стр. 1; e-mail: ilya.fevral@mail.ru

³ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Пирогова»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,

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

⁴ 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

Проведено комплексное молекулярно-генетическое обследование больных с синдромом Сотоса. Для диагностики заболевания использовалась внедренная в практическую деятельность ФГБНУ «МГНЦ» новая медицинская технология, включающая методы таргетного высокопроизводительного параллельного секвенирования ДНК и мультиплексной амплификации лигированных зондов (MLPA). Поиск точковых мутаций и коротких инсерций/делеций в генах *NSD1* и *NFIX* осуществляли с применением секвенирования нового поколения на приборе Ion Torrent PGM. Для выявления протяженных делеций в генах *NSD1* и *NFIX* использовали метод MLPA. В группе пациентов с клиническими признаками синдрома Сотоса мутации в одном из исследуемых генов выявлены в 44% случаев. Все мутации выявлены высокопроизводительным параллельным секвенированием, расположены в кодирующих областях генов *NSD1* и *NFIX*, и представлены однонуклеотидными заменами и делециями/инсерциями протяженностью от 1 до 31 нуклеотидов. Протяженных делеций/инсерций, охватывающих отдельные экзоны или целые гены, методом MLPA выявлено не было.

Ключевые слова: синдром Сотоса, ген *NSD1*, ген *NFIX*, медицинская технология, высокопроизводительное параллельное секвенирование ДНК, MLPA.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The results of the use of new medical technology for comprehensive DNA analysis of Sotos syndrome

Volodin I.V.^{1,2}, Tanas A.S.^{1,3}, Kuznetsova E.B.^{1,4}, Simonova O.A.¹,
Matyushchenko G.N.¹, Demina N.A.¹, Petuchova M.S.¹, Bessonova L.A.¹,
Anisimova I.V.¹, Pashchenko M.S.¹, Zaletaev D.V.^{1,3,4}, Strelnikov V.V.^{1,3}

¹ Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation,

115478, Moskvorechie st. 1, e-mail: ilya.fevral@mail.ru

² Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Russian Federation,

125993, Moscow, Barrikadnaya st. 2/1, e-mail: ilya.fevral@mail.ru

³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation,

117997, Ostrovityanova st. 1, e-mail: vstrel@list.ru

⁴ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation,

119991, Trubetskaya st. 8, e-mail: zalnem@mail.ru

We performed a comprehensive molecular genetic examination of patients with Sotos syndrome. To establish molecular diagnosis of the disease, we applied a set of new medical technologies, including targeted high-throughput parallel DNA sequencing (NGS) and multiplex ligation probe amplification (MLPA). Search for point mutations and small indels in the *NSD1* and *NFIX* genes was carried out with next generation sequencing on the Ion Torrent PGM. To detect extended deletions in these genes MLPA method was used. In a group of patients with clinical features of Sotos syndrome, mutations in either one of the genes under study were detected in 44% of cases. All mutations were detected by NGS and presented either SNVs or deletions 1 to 31 bp long within the coding regions of the *NSD1* and *NFIX* genes. No indels encompassing whole genes or their exons have been detected by MLPA.

Key words: Sotos syndrome, *NSD1* gene, *NFIX* gene, medical technology, NGS, MLPA.

Введение

Синдром Сотоса — редкое наследственное заболевание преимущественно с аутосомно-доминантным типом наследования и частотой встречаемости 1—9:100000 [1]. Клинические признаки, характерные для данного синдрома, подразделяются на кардинальные (встречаются не менее чем у 90% больных), основные (встречаются у 15—89% больных) и ассоциированные (от 2 до 15%) [1]. К первой группе относят характерный лицевой фенотип, умственную отсталость и ускоренный рост. Группа основных клинических признаков включает в себя сердечные и почечные аномалии, сколиоз, гиперподвижность суставов, плоскостопие, материнскую преэклампсию, неонатальные осложнения, превышение реального костного возраста, поведенческие проблемы и судороги. К группе ассоциированных признаков относят злокачественные опухоли (такие, как тератома, нейробластома, лимфобластный лейкоз, мелкоклеточный рак легких), проводящую тугоухость, катаракту, позвоночные аномалии, косоглазие и др. [1, 2].

Наиболее специфическим клиническим критерием для синдрома Сотоса является характерный лицевой фенотип, наиболее выраженный в возрасте от 1 до 6 лет. Он включает в себя долихоцефалию, высокий лоб и антимонголоидный разрез глаз, часто присутствуют узкий подбородок и редкий рост волос на лобно-височной части головы.

Клинические проявления синдрома Сотоса пересекаются с таковыми синдромов Вивера—Смитта, Беквита—Видеманна и ломкой X-хромосомы, поэтому точная диагностика синдрома Сотоса может быть проведена только с использованием молекулярно-генетического тестирования [3, 4].

Выделяют два типа синдрома Сотоса с аутосомно-доминантным наследованием: синдром Сотоса 1 (OMIM # 117550) и синдром Сотоса 2 (OMIM # 614753). Синдром Сотоса 1 является более распространенным и обуславливается наличием патогенных изменений в гене *NSD1*. Этот ген расположен в длинном плече хромосомы 5 (5q35.3), включает в себя 23 экзона и кодирует белок ARA267 — гистоновую метилтрансферазу, способную осуществлять двунаправленную регуляцию транскрипции генов [5]. В 95% случаев патогенные изменения в гене *NSD1* возникают *de novo* [1]. На данный момент идентифицировано более 100 патогенных изменений в гене, не сгруппированных в какие-либо горячие точки мутаций. У больных из разных популяций, кроме японской, однонуклеотидные замены преобладают над инсерциями и делециями, обнаруживаемыми примерно у 15% пациентов с *NSD1*-ассоциированным синдромом Сотоса [6, 7].

Синдром Сотоса 2 встречается значительно реже и обусловлен наличием патогенных изменений в гене *NFIX*. Этот ген расположен в коротком плече хромосомы 19 (19p13.13) и кодирует транскрипционный фактор, связывающийся с последовательностью TTGGCNNNNNGCCAA промоторов генов. Мутации в гене *NFIX* также не сосредото-

чены в «горячих точках» и представлены как однонуклеотидными заменами, так и делециями/инсерциями различной протяженности. Помимо синдрома Сотоса 2 с патогенными мутациями в гене *NFIX* ассоциирован синдром Маршалла—Смита [8].

Фенотипическое сходство клинических признаков синдрома Сотоса с рядом других заболеваний указывает на необходимость его дифференциальной диагностики, а отсутствие горячих точек в ассоциированных генах делает высокопроизводительное параллельное секвенирование (NGS) одним из наиболее подходящих для этой цели методов, так как позволяет точно и относительно недорого проводить поиск мутаций на всей протяженности кодирующих областей генов, включенных в таргетную панель. Однако, поскольку методы секвенирования позволяют выявить только однонуклеотидные замены и небольшие инсерции/делеции, необходимо включить в протокол комплексной диагностики синдрома Сотоса метод MLPA для обнаружения протяженных делеций, которые также характерны для этого заболевания.

Материалы и методы

Клинический материал

В работе использовали биологический материал 9 пациентов (5 мужского пола и 4 женского пола) с клиническими признаками синдрома Сотоса, 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 *NSD1* и *NFIX* проводили на приборе Ion Torrent PGM (Life Technologies, США) в ФГБНУ «МГНЦ». Панель праймеров для секвенирования разработана с использованием программного обеспечения AmpliSeq Designer (Life Technologies). Таргетные регионы включают все кодирующие последовательности генов *NSD1* и *NFIX* и прилегающие к ним области интронов. Для создания библиотек использовали реагенты Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (Life Technologies). Реакцию проводили по протоколу, рекомендованному производителем.

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 мультитиплексированных 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.

С целью верификации выявленных точковых мутаций применяли секвенирование по Сэнгеру, с предварительной амплификацией целевых фрагментов генов методом ПЦР по методике, описанной ранее [9]. ПЦР и секвенирование по Сэнгеру проводили с праймеров, отличных от входящих в панель NGS (подбор праймеров осуществляли с помощью программного обеспечения Primer-BLAST). Последовательности всех праймеров, использованных в настоящем исследовании, предоставляются авторами по запросу.

Анализ количества копий генов *NSD1* и *NFIX*

Исключение протяженных делеций генов *NSD1* и *NFIX* 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® P026 Sotos.

Капиллярный электрофорез продуктов MLPA проводили на генетическом анализаторе ABI3500 в соответствии с протоколом Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer User Guide (Life Technologies). Получен-

ные данные обрабатывали с использованием программного обеспечения Coffalyser.NET, предоставленного компанией MRC-Holland.

Результаты и обсуждение

В настоящем исследовании применен комплексный подход, включающий высокопроизводительное параллельное секвенирование и MLPA, для выявления молекулярно-генетических изменений в генах *NSD1* и *NFIX* у больных с направительным клиническим диагнозом синдром Сотоса. Создана панель праймеров, покрывающая всю кодирующую часть генов. Использование этой панели на первом этапе тестирования позволяет эффективно обнаруживать однонуклеотидные замены, а также инсерции или делеции умеренной протяженности (по крайней мере, до 30 п.н.) в исследуемых генах. Исследование методом MLPA в качестве второго этапа тестирования для пациентов с отсутствием выявленных мутаций методом NGS позволяет говорить о проверке всех типов мутаций, характерных для синдромов Сотоса 1 и 2 у каждого обследуемого. Последовательность применения перечисленных исследований в рамках медицинской технологии обусловлена значительно большей частотой встречаемости коротких вариантов нуклеотидной последовательности при синдроме Сотоса по сравнению с крупными делециями по данным зарубежных авторов [6, 7], что подтверждается собственными данными, полученными в настоящем исследовании.

Нами обследованы 9 пациентов с признаками синдрома Сотоса, биологический материал которых был направлен научно-консультативным отделом ФГБНУ «МГНЦ» в лабораторию в 2017 г. У троих пациентов выявлены патогенные мутации в гене *NSD1*, у одного — возможно патогенная мутация в гене *NFIX* (таблица). Таким образом, генетические варианты в одном из двух основных генов синдрома Сотоса выявлены у 44% пациентов.

Таблица

Мутации, выявленные у пациентов с клиническими признаками синдрома Сотоса (собственные данные)

Пациент	Мутации в генах <i>NSD1</i> и <i>NFIX</i> , выявленные методом NGS	Мутации в генах <i>NSD1</i> и <i>NFIX</i> , выявленные методом MLPA
1	NSD1:NM_022455:exon5:c.2859dupT:p.S953fs,	—
2	—	—
3	NSD1:NM_172349:exon6: [c.2895_2926del31:p.L965fs; c.2936delA p.E976fs]	—
4	—	—
5	—	—
6	NFIX:NM_001271043:exon8:c.C1145G:p.T382R	—
7	NSD1:NM_022455:exon22:c.A6304T:p.K2102*	—
8	—	—
9	—	—

У двух пациентов выявлены мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания (NSD1:NM_022455:exon5: c.2859dupT:p.S953fs и NSD1:NM_172349:exon6: [c.2895_2926del31:p.L965fs; c.2936delA:p.E976fs]). Во втором случае обнаружены две близлежащие делеции разной протяженности (31 и 1 нуклеотиды), *in cis*, в сумме не кратные 3 и, следовательно, приводящие в комплексе к сдвигу рамки считывания (рис. 1, 2).

Выявлены одна нонсенс-мутация (NSD1:NM_022455:exon22:c.A6304T:p.K2102*) и одна миссенс-замена (NFIХ:NM_001271043:exon8:c.C1145G:p.T382R), патогенность которой, однако, нуждается в подтверждении дальнейшими исследованиями. Исследование методом MLPA не обнаружило протяженных делеций ни у одного из обследуемых.

Поскольку по данным литературы клинические проявления синдрома Сотоса могут выявляться у больных с синдромами Беквита—Видеманна и Мартина—Белл, была проведена дифференциальная молекулярно-генетическая диагностика с использованием метилчувствительной ПЦР CpG-островков генов *IGF2* и *FMR1* методами, описанными нами ранее [10—12]. Ни у одного из обследованных пациентов аномалий метилирования генов *IGF2* и *FMR1* не выявлено, что позволяет исключить для них диагнозы синдромов Беквита—Видеманна и Мартина—Белл с точностью свыше 95%.

Таким образом, использование новых высокотехнологичных подходов в молекулярно-генетической диагностике у пациентов с синдромом Сотоса обеспечивает эффективную диагностику заболевания и позволяет установить характер генетического нарушения за относительно короткое время.

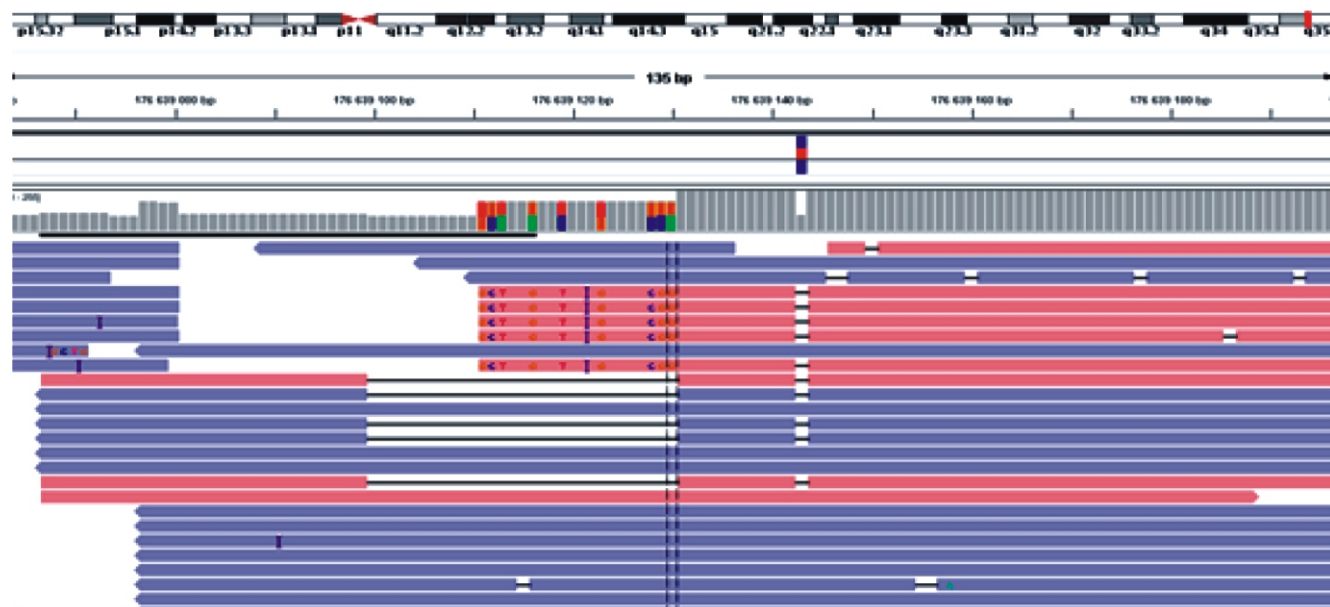


Рис. 1. Результат высокопроизводительного параллельного секвенирования фрагмента 6-го экзона гена *NSD1* у пациента 3: комплексная мутация (две делеции *in cis* со сдвигом рамки считывания — NM_172349:exon6:[c.2895_2926del31:p.L965fs; c.2936delA:p.E976fs]).

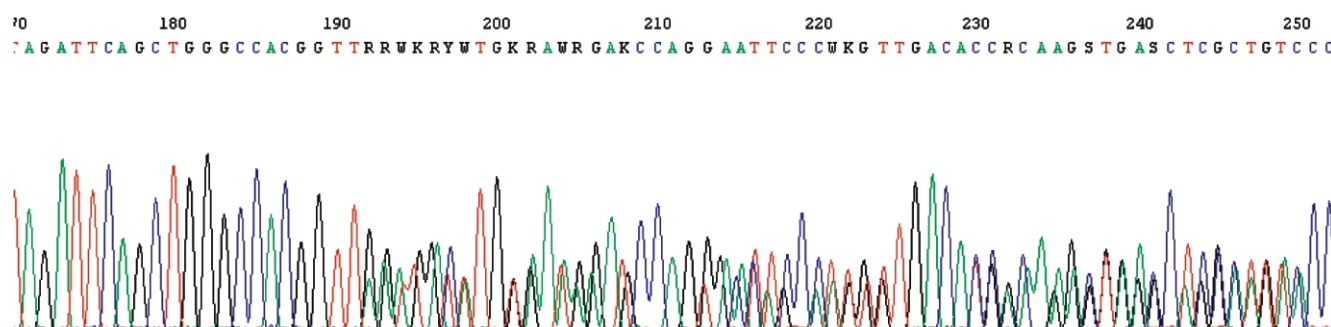


Рис. 2. Результат верификации комплексной мутации в 6-м экзоне гена *NSD1* у пациента 3 секвенированием ДНК по Сэнгеру.

Список литературы

1. Tatton-Brown K, Douglas J, Coleman K, et al. Genotype-phenotype associations in Sotos syndrome: an analysis of 266 individuals with NSD1 aberrations. *Am J Hum Genet.* 2005 Aug; 77(2):193-204.
2. Tatton-Brown K, Rahman N. Clinical features of NSD1-positive Sotos syndrome. *Clin Dysmorphol.* 2004 Oct; 13(4):199-204.
3. Cole TR, Hughes HE. Sotos syndrome: a study of the diagnostic criteria and natural history. *J Med Genet.* 1994 Jan; 31(1):20-32.
4. Baujat G, Rio M, Rossignol S, et al. Paradoxical NSD1 mutations in Beckwith-Wiedemann syndrome and 11p15 anomalies in Sotos syndrome. *Am J Hum Genet.* 2004 Apr; 74(4):715-720.
5. Wang, X., Yeh, S., Wu, G., et al. Identification and characterization of a novel androgen receptor coregulator ARA267-alpha in prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* 2001 Nov 2; 276(44):40417-40423.
6. Faravelli F. NSD1 mutations in Sotos syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2005 Aug 15; 137C(1):24-31.
7. Visser R., Shimokawa O., Harada N., et al. Non-hotspot-related breakpoints of common deletions in Sotos syndrome are located within destabilised DNA regions. *J Med Genet.* 2005 Nov; 42(11):e66.
8. Malan, V., Rajan, D., Thomas, S., et al. Distinct effects of allelic NFIX mutations on nonsense-mediated mRNA decay engender either a Sotos-like or a Marshall-Smith syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 2010 Aug 13; 87(2):189-198.
9. Алексеева Е.А., Бабенко О.В., Козлова В.М., и соавт. Результаты использования новой медицинской технологии комплексной ДНК-диагностики ретинобластомы. *Медицинская генетика.* 2017; 16(10):41-46.
10. 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.
11. Немцова, М.В., Стрельников, В.В., Бабенко, О.В. и соавт. Молекулярная диагностика эпигенетических нарушений при синдроме Видеманна-Беквита. *Медицинская генетика.* 2005; 4(1):33-38.
12. 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 biologiya.* 1998; 33(2):330-336.