

Медицинская технология комплексной ДНК-диагностики tuberозного склероза

Аношкин К.И.^{1,2}, Карандашева К.О.¹, Танас А.С.^{1,2}, Бессонова Л.А.¹, Демина Н.А.¹, Петухова М.С.¹, Анисимова И.В.¹, Залетаев Д.В.^{2,3}, Стрельников В.В.^{1,2}

¹ — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»,

Москва, 115522, ул. Москворечье, д. 1; e-mail: anoshkiri@gmail.com

² — ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Пирогова»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,

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

³ — ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,

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

Проведено комплексное молекулярно-генетическое обследование 76 больных с tuberозным склерозом. Для диагностики заболевания использовалась внедренная в практическую деятельность ФГБНУ «МГНЦ» новая медицинская технология, которая включает в себя методы таргетного высокопроизводительного параллельного секвенирования (ВПС), мультиплексной амплификации лигированных зондов (MLPA), а также секвенирование ДНК по Сенгеру. Поиск точковых мутаций, а также малых делеций/инсерций в генах *TSC1* и *TSC2* осуществляли методом ВПС на приборе Ion S5. Для исключения артефактов секвенирования, подтверждения патогенности обнаруженных однонуклеотидных замен и выявления семейных случаев проводили секвенирование по Сенгеру. Для выявления протяженных делеций в генах *TSC1* и *TSC2* использовали метод MLPA. Патогенные генетические варианты выявлены в 46% случаев, из них 70% — в гене *TSC2*, и 30% — в гене *TSC1*. Подавляющее большинство мутаций было выявлено методом ВПС — 91,9%; методом MLPA протяженные делеции выявлены в 8,1% информативных образцов.

Ключевые слова: tuberозный склероз, ген *TSC1*, ген *TSC2*, медицинская технология, высокопроизводительное параллельное секвенирование ДНК, MLPA.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Работа выполнена в рамках государственного задания на выполнение НИР в 2018 году.

Medical technology for comprehensive DNA analysis in tuberous sclerosis

Anoshkin K.I.^{1,2}, Karandasheva K.O.¹, Tanas A.S.^{1,2}, Bessonova L.A.¹, Demina N.A.¹, Petukhova M.S.¹, Anisimova I.V.¹, Zaletaev D.V.^{2,3}, Strelnikov V.V.^{1,2}

¹ — Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation, 115522, Moskvorechie st.1, e-mail: anoshkiri@gmail.com

² — Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation, 117997, Ostrovityanova st. 1,

e-mail: vstrel@list.ru

³ — 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 76 patients with tuberous sclerosis. For establish molecular diagnosis of the disease, we applied a new medical technology that includes targeted high-throughput parallel DNA sequencing (NGS), multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), and Sanger sequencing. Search for point mutations and small indels in the *TSC1* and *TSC2* genes was carried out with next generation sequencing on the Ion S5 instrument. In order to filter out sequencing artifacts, to establish pathogenicity of the detected single nucleotide substitutions, and to identify familial cases, Sanger sequencing was performed. To search for extended deletions, the MLPA method was used. In 46% cases mutations have been detected, 70% in the *TSC2* gene, and 30% in the *TSC1* gene. Overwhelming majority of mutations were detected by NGS (91.9%), and 8.1% were detected by MLPA.

Keywords: tuberous sclerosis, *TSC1* gene, *TSC2* gene, medical technology, NGS, MLPA.

Введение

Туберозный склероз (ТС) — орфанное полисистемное заболевание с аутосомно-доминантным типом наследования, имеющее вариабельную экспрессивность и 100% пенетрантность. Частота встречаемости ТС составляет 1:20000, среди новорожденных — 1:6000 — 1:10000 [1]. Не

менее чем в 2/3 случаев заболевание является следствием мутаций *de novo*. При ТС в основном поражаются головной мозг, сетчатка глаза, кожа, сердце, почки и печень. Также поражаются легкие, эндокринная система и желудочно-кишечный тракт. Клиническими признаками ТС в 95% случаев являются гипопигментные пятна, в среднем у 65% пациентов встречаются ангиофибромы. Субэпенди-

мальные узлы встречаются в 95% случаев, в 48% случаев отмечается умственная отсталость. Также у 80% пациентов с ТС развиваются множественные ангиомиолипомы почек, и в 50% случаев — рабдомиома сердца [1].

Основной причиной развития ТС являются структурные нарушения в генах комплекса tuberозного склероза, а именно в генах *TSC1* и *TSC2*. Гены *TSC1* и *TSC2* кодируют белки гамартин и туберин — супрессоры опухолевого роста. Данные белки играют важнейшую роль в универсальном сигнальном пути mTOR, который отвечает за рост, пролиферацию, метаболизм клеток и уход от апоптоза [2]. Ген *TSC1* (MIM#191100) картирован на длинном плече девятой хромосомы в районе 9q34 и состоит из 23 экзонов. Ген *TSC2* (MIM#191092) расположен на коротком плече шестнадцатой хромосомы в районе 16p13.3 и состоит из 42 экзонов. Туберин в комплексе с гамартином выполняет роль ингибитора ГТФ-связывающего белка Rheb, причем гамартин стабилизирует туберин и предотвращает его убиквитин-опосредованную деградацию. Ингибируя белок Rheb, комплекс инактивирует серин/треониновую протеинкиназу mTOR [3].

Молекулярные нарушения в данном комплексе генов представлены широким спектром генетических изменений: нонсенс-мутации, миссенс-мутации, мутации сайта сплайсинга, короткие инсерции/делеции, а также протяженные делеции. Мутации распределены по всей кодирующей последовательности генов равномерно. Таким образом, большой размер генов и отсутствие «горячих» точек делает молекулярно-генетическую диагностику заболевания трудоемкой и ресурсозатратной.

Применяемый в настоящей работе метод высокопроизводительного параллельного секвенирования (ВПС) предоставляет возможность более эффективного и экономичного поиска структурных изменений в генах *TSC1* и *TSC2*. Однако ВПС позволяет выявить только короткие генетические варианты (от 1 до 30 п.н.), что приводит к необходимости применения в комплексной диагностике ТС метода MLPA, который позволяет обнаружить протяженные делеции или дупликации. Несмотря на высокую достоверность результатов ВПС, которая достигается путем многократного прочтения целевой последовательности, для исключения артефактов секвенирования необходимо использование метода прямого секвенирования по Сэнгеру с альтернативной пары праймеров. Секвенирование по Сэнгеру целесообразно использовать также для подтверждения статуса мутаций *de novo* в спорадических случаях заболевания, и для выявления семейных случаев ТС, которые, вследствие вариабельной экспрессивности заболевания могут быть упущены при проведении клинической диагностики.

Совокупность перечисленных трех методов позволяет охватить полный спектр молекулярно-генетических нарушений у больных с ТС, что способствует объективному и грамотному проведению медико-генетического консультирования.

Материалы и методы

Клинический материал

Обследовано 76 пациентов с подозрением на ТС.

Скрининг точковых мутаций, а также малых делеций/инсерций в генах *TSC1* и *TSC2* в образцах ДНК из лимфоцитов периферической крови, выделенной стандартным методом фенол-хлороформной экстракции, методом ВПС проведен 76 пациентам.

Скрининг протяженных делеций в генах *TSC1* и *TSC2* проведен методом MLPA в образцах ДНК из лимфоцитов периферической крови 42 пациентов, у которых методом ВПС повреждений этих генов выявлено не было.

Высокопроизводительное параллельное секвенирование генов TSC1 и TSC2 проводили на приборе Ion S5 (ThermoFisher, США). Панель праймеров для секвенирования разработана с использованием программного обеспечения AmpliSeq Designer (ThermoFisher). Таргетные регионы включают все кодирующие последовательности генов *TSC1* и *TSC2*, прилегающие области интронов и 5', 3'- нетранслируемые области (UTR). Для создания библиотек фрагментов ДНК использовали реагенты Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (ThermoFisher). Реакции проводили по стандартному протоколу, рекомендованному производителем.

Клональную эмульсионную ПЦР, а также загрузку чипов проводили с использованием аппарата Ion Chef Instrument (ThermoFisher) согласно протоколу производителя. Секвенирование мультиплексированных образцов выполняли на секвенаторе Ion S5 (ThermoFisher) на чипах Ion 540.

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 (идентификация вариантов нуклеотидных последовательностей).

Для оценки клинической значимости генетических вариантов использовали базы данных LOVD [4], HGMD [5] и ClinVar [6]. Фильтрацию известных полиморфизмов проводили по базам данных gnomAD и ExAC [7] с использованием программного обеспечения ANNOVAR [8].

Визуальный анализ данных, ручную фильтрацию артефактов секвенирования и выравнивания последовательностей осуществляли с использованием программы Integrative Genomics Viewer — IGV [9].

Анализ протяженных делеций генов TSC1 и TSC2 в ДНК крови пациентов осуществляли с использованием мультиплексной пробозависимой лигазной реакции (MLPA, multiplex ligation-dependent amplification). Реакцию MLPA проводили по стандартному протоколу, ре-

комендованному производителем (MRC-Holland, <http://www.mlpa.com>).

В работе использовали два набора:

- MRC-Holland SALSA® MLPA® Probemix P124 *TSC1*;

- MRC-Holland SALSA® MLPA® Probemix P046 *TSC2*.

Капиллярный электрофорез продуктов MLPA осуществляли на генетическом анализаторе ABI3500 по протоколу ABI Prism 3500 Genetic Analyzer Kits (Thermo Fisher). Данные обрабатывали с использованием программного обеспечения Coffalyser.NET, предоставленного компанией MRC-Holland.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

В состав реакционной смеси для ПЦР входили следующие реагенты: 8% глицерин, 68 мМ Tris-HCl с pH 8,3, 17 мМ (NH₄)SO₄, 0,01% Tween-20, 0,1 мг/мл BSA, по 0,2 мМ каждого dNTP, 1,5 ед. акт. Taq-полимеразы, 0,12 мМ каждого праймера, 2,5 мМ MgCl₂. В реакционную смесь добавляли 100 нг геномной ДНК. Объем реакционной смеси составлял 25 мкл. Сверху наслаивали 40–60 мкл вазелинового масла. Прогревали смесь при 95°C в течение 5 минут и проводили 33 цикла по следующей программе: 95°C — 40 с, T_{отжига} праймеров (60–64°C, подбирались экспериментальным путем — табл. 1) — 40 с, 72°C — 40 секунд, финальную элонгацию проводили при 72°C в течение 5 минут.

ПЦР проводили на программируемом термоциклере «Термик» фирмы «ДНК-технология», Москва.

Продукты реакции детектировали методом вертикального электрофореза в 8% ПААГ. Визуальный контроль пробега фрагментов ДНК осуществляли по красителям ксиленианолу и бромфеноловому синему. По окончании электрофореза гель окрашивали нитратом серебра. Маркером молекулярного веса служили фрагменты плазмиды pUC19, полученные в результате ее обработки рестриктазой HpaII («СибЭнзим», Новосибирск).

Секвенирование ДНК по Сенгеру

Определение нуклеотидных последовательностей продуктов ПЦР проводили секвенированием по Сенгеру на генетическом анализаторе ABI3500 в соответствии с протоколом фирмы-производителя (Thermo Fisher). Результаты секвенирования анализировали с использованием программы Chromas и сопоставляли с базой данных GenBank с помощью алгоритма BLAST.

Результаты и обсуждение

В настоящей работе применен комплексный подход к выявлению молекулярно-генетических изменений у больных с предполагаемым клиническим диагнозом *туберозный склероз*. В результате скрининга точковых мутаций в генах *TSC1* и *TSC2* методом секвенирования нового поколения в выборке из 76 больных изменения выявлены в 43,4% (32/76) случаев.

По данным литературы, мутации в гене *TSC1* встречаются намного реже, чем в гене *TSC2* (~30% против

Список праймеров для валидации выявленных в работе мутаций методом прямого секвенирования по Сенгеру

Таблица 1

Ген	Последовательность прямого праймера	Последовательность обратного праймера	Температура отжига, °C	Номер экзона
<i>TSC2</i>	CAGGGTTCTTGAGAGCACAT	CTGACGTCACCCATCCCA	60	4
<i>TSC2</i>	CTCTGGTGCCAAGTCCATGT	CTCTGGTCCGCACATCTCT	64	12
<i>TSC1</i>	GATTCTTGTTCTCTCTTACACTTTCTGT	CCCGTATGATCATCTTTTTGAGGTG	62	15
<i>TSC1</i>	GTAAGGCTTGCTTTGGTGTGT	CTCTCTTCTCTCAGCTGCAATA	64	15
<i>TSC2</i>	GATGTGGCCCTCGTTGGG	GCCATCCGGTCACTCGAAG	62	15
<i>TSC1</i>	AGCTATCATGCTGACCCAAAACA	CCAGTTACTCTATGAGCGTTTAAAGAGG	62	17
<i>TSC2</i>	TGTGTTTTGAAGCACGCACT	GCCGAGACGGGGATACCT	60	17
<i>TSC2</i>	GGTCCTTTCTAGTCGTCTCAGT	AGGGTCCCTGACTGTGACC	62	34
<i>TSC2</i>	AGGTTAAGGCCCGGTACAG	GGCTCTGCTCTTTAAGGCGT	60	34
<i>TSC2</i>	GCTCGCCATCCTGTCCAATG	CGTACCTTGCATGATGTCATCGT	62	37
<i>TSC2</i>	GCTCGCCATCCTGTCCAATG	CGTACCTTGCATGATGTCATCGT	62	37
<i>TSC2</i>	CCCAGAGCCCCTGGAGTAAT	ACAGAGGACACAACGCAGG	64	38
<i>TSC2</i>	GACCCCTTCTCTTGTCCGGG	ATGTCTGGGGAGACTTGGTG	62	39
<i>TSC2</i>	GACCCCTTCTCTTGTCCGGG	ATGTCTGGGGAGACTTGGTG	64	39
<i>TSC2</i>	CAAGTCTCCCCAGACATGGAG	GGGTTGGAGCGGCTATGATG	63	40
<i>TSC2</i>	CAAGTCTCCCCAGACATGGAG	GCTGAGGGAGCCCCATATTC	63	41

~70%) [10], а течение заболевания у пациентов с мутациями в гене *TSC2* имеет более тяжелый характер [11]. В результате скрининга гена *TSC1* нами выявлено 10 точковых мутаций (табл. 2, рис. 1). В половине случаев (50%) это — нонсенс-мутации.

Секвенирование на всем протяжении кодирующих и прилежащих областей гена *TSC2* позволило выявить в общей сложности 22 мутации, причем мутация c.5227_5244del:p.1743_1748del обнаружена у двух неродственных пробандов. Выявлен полный спектр аномалий (табл. 2 и рис. 2), который представлен нонсенс-мутациями, миссенс-мутациями, мутациями сайтов сплайсин-

га, малыми делециями/инсерциями, приводящими и не приводящими к сдвигу рамки считывания. Патогенная делеция без сдвига рамки считывания c.5227_5244del:p.1743_1748del, которая была нами зафиксирована в двух случаях (2/22) является частой мутацией у больных с ТС [12, 13].

Заметно меньшая представленность патогенных мутаций в экзонах с 18 по 23 в гене *TSC1* и экзонах 1 по 14 в гене *TSC2* предположительно связана с размером изученной нами выборки, так как, по данным зарубежных исследований, мутации в генах *TSC1* и *TSC2* располагаются по генам равномерно [14].

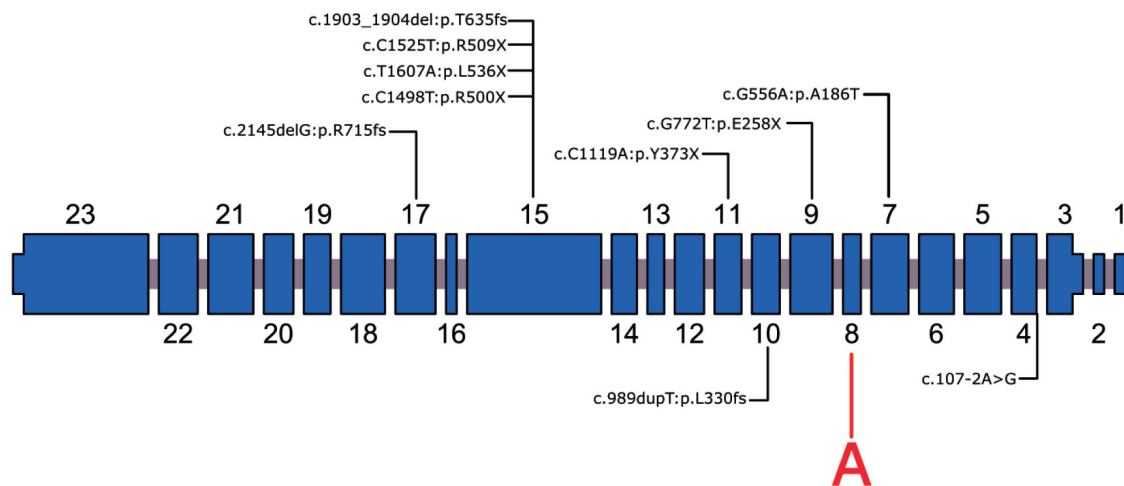


Рис. 1. Спектр мутаций, обнаруженных в гене *TSC1* методами высокопроизводительного параллельного секвенирования ДНК и MLPA (собственные данные). А — делеция экзона 8: NM 000368:c.(913_1030)del.

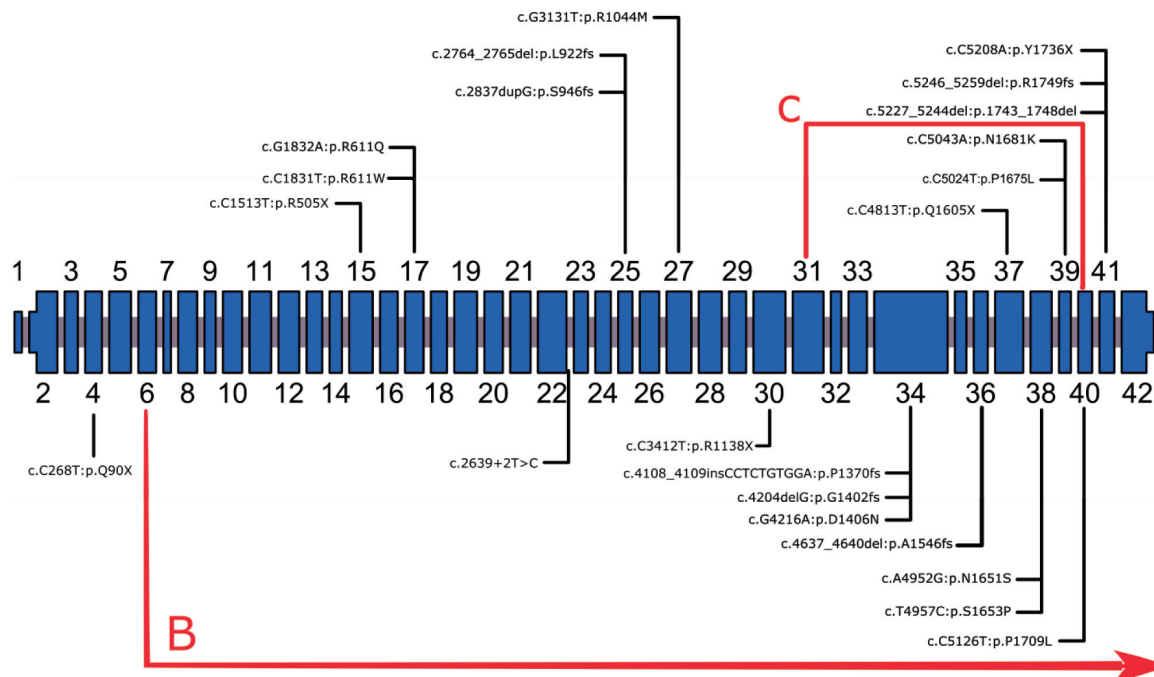


Рис. 2. Спектр мутаций, обнаруженных в гене *TSC2* методами высокопроизводительного параллельного секвенирования и MLPA (собственные данные). В — делеция NM_000548:c.(482_598)(525_?)del. С — делеция NM_000548:c.(3611_3813)(5069_5259)del.

В случаях, где не было обнаружено точковых мутаций, был проведен анализ копийности экзонов генов *TSC1* и *TSC2*. Выявлена делеция с.(913_1030)del, затрагивающая восьмой экзон в гене *TSC1* (рис. 1), и две протяженные делеции (с.(482_598)_(525_?)del и с.(3611_3813)_(5069_5259)del) в гене *TSC2* (рис. 2).

Интерпретация патогенности выявленных генетических вариантов включала анализ их наследования в родословных. Наличие редкого генетического варианта у пробанда с клиническими признаками ТС при отсутствии его в ДНК из периферической крови родителей свидетельствует в пользу его патогенности. Анализ наследования мутаций в семьях проводили секвенированием соответствующих участков генов по Сенгеру — более экономичным, по сравнению с ВПС, методом однолукусного анализа ДНК. Дополнительно, ресеквенирование по Сэнгеру обеспечивает валидацию находок ВПС независимым методом.

Секвенирование по Сенгеру образцов ДНК пробандов и их родителей проведено нами в 33 семьях. Были подтверждены все мутации, выявленные ранее методом NGS, и в 100% случаев была показана их спорадическая природа (мутации *de novo*).

Таким образом, в настоящей работе методами ВПС и MLPA из 76 пациентов, направленных в лабораторию

для поиска мутаций в генах *TSC1/TSC2*, в 35 (46%) случаях было подтверждено наличие мутаций, включая протяженные делеции. В 24 (68,6%) случаях мутации были обнаружены в гене *TSC2*, в 11 (31,4%) случаях — в гене *TSC1*. В 100% случаев определен спорадический характер мутаций (*de novo*).

Проведено сравнение спектра выявленных мутаций с данными международной базы LOVD [4], которая содержит 2540 и 7239 вариантов точковых замен в генах *TSC1* и *TSC2* соответственно, и является на данный момент наиболее полной общедоступной курируемой агрегирующей базой данных по мутационному профилю ТС. Сравнение с исследуемой выборкой показало различия в представленности нонсенс-мутаций (23% в LOVD против 46% в нашем исследовании) и малых делеций/инсерций (53% против 27%) в гене *TSC1* (табл. 3). Однако с учетом того, что мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания, приводят образованию стоп-кодона, процентное соотношение мутаций, приводящих к нонсенс-опосредованному распаду РНК, в группах не различается (73% против 76%).

В 56,6% случаев мутаций в комплексе генов ТС найдено не было. Мы предполагаем, что причиной этому может быть неоднозначность клинической картины у пациентов, направленных на молекулярно-генетиче-

Таблица 2

Спектр мутаций, выявленных в генах *TSC1* и *TSC2* методом ВПС (собственные данные)

Тип мутации	Ген	
	<i>TSC2</i>	<i>TSC1</i>
Нонсенс-мутации	5 (22,7%)	5 (45,5%)
Миссенс-мутации	8 (36,4%)	2 (18,2%)
Мутации сайта сплайсинга	1 (4,5%)	1 (9,1%)
Мутации сдвига рамки считывания, в том числе:		
— делеции	4 (18,2%)	2 (18,2%)
— инсерции	1 (4,5%)	—
— дупликации	1 (4,5%)	1 (9,1%)
Делеции без сдвига рамки считывания	2 (9,1%)	—
Суммарно по гену:	22 (70,6%)	10 (29,4%)

Таблица 3

Сравнение представленности типов мутаций в генах *TSC1* и *TSC2* в базе данных LOVD и по результатам настоящего исследования

Тип мутаций	Данные LOVD <i>TSC1</i> (n = 541)	Настоящее исследование <i>TSC1</i> (n = 11)	Данные LOVD <i>TSC2</i> (n = 1442)	Настоящее исследование <i>TSC2</i> (n = 24)
Миссенс-мутации	4%	9%	29,2%	33,3%
Нонсенс-мутации	23%	46%	15%	20,8%
Малые делеции/инсерции/дупликации	53%	27%	35%	33,3%
Мутации в сайте сплайсинга	15%	9%	15%	4,2%
Протяженные делеции	5%	9%	5,9%	8,3%

скую диагностику. Нельзя также исключать наличие в исследованной выборке пациентов с другими генетическими заболеваниями, симптомы которых аналогичны таковым при ТС.

Проведение комплексной молекулярно-генетической диагностики у пациентов с клиническим диагнозом *туберозный склероз* позволит повысить эффективность диагностики заболевания и установить характер генетического нарушения. Результаты работы найдут применение в практике врачей-генетиков при определении тактики ведения пациентов с признаками ТС, а также при проведении медико-генетического консультирования членов их семей.

Список литературы

1. Islam, M.P. and E.S. Roach, Tuberous sclerosis complex. *Handb Clin Neurol*, 2015. 132: 97-109.
2. Populo, H., J.M. Lopes, and P. Soares, The mTOR signalling pathway in human cancer. *Int J Mol Sci*, 2012. 13(2):1886-918.
3. Huang, J. and B.D. Manning, The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem J*, 2008. 412(2):179-90.
4. Fokkema, I.F., et al., LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. *Hum Mutat*, 2011. 32(5):557-63.
5. Stenson, P.D., et al., Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat*, 2003. 21(6):577-81.
6. Landrum, M.J., et al., ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res*, 2018. 46(D1):D1062-D1067.
7. Lek, M., et al., Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*, 2016. 536(7616):285-91.
8. Wang, K., M. Li, and H. Hakonarson, ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*, 2010. 38(16):e164.
9. Robinson, J.T., et al., Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol*, 2011. 29(1):24-6.
10. Northrup H, K.M., Pearson DA, et al., Tuberous Sclerosis Complex. 2015.
11. Curatolo, P., et al., Genotype/Phenotype Correlations in Tuberous Sclerosis Complex. *Semin Pediatr Neurol*, 2015. 22(4):259-73.
12. Sancak, O., et al., Mutational analysis of the TSC1 and TSC2 genes in a diagnostic setting: genotype—phenotype correlations and comparison of diagnostic DNA techniques in Tuberous Sclerosis Complex. *Eur J Hum Genet*, 2005. 13(6):731-41.
13. Tyburezy, M.E., et al., Mosaic and Intronic Mutations in TSC1/TSC2 Explain the Majority of TSC Patients with No Mutation Identified by Conventional Testing. *PLoS Genet*, 2015. 11(11):e1005637.
14. Rosset, C., C.B.O. Netto, and P. Ashton-Prolla, TSC1 and TSC2 gene mutations and their implications for treatment in Tuberous Sclerosis Complex: a review. *Genet Mol Biol*, 2017. 40(1):69-79.