

Результаты использования медицинской технологии определения микроделеции 22q11.2 методом микросателлитного анализа у больных с диагнозом вело-кардио-фациальный синдром / ДиДжорджи синдром*

Немцова М.В.¹, Стрельников В.В.¹, Кузнецова Е.Б.^{1,2},
Руденко В.В.¹, Казакова С.А.^{1,2}, Залетаев Д.В.^{1,2}

¹ — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр»,
e-mail: vstrel@list.ru

² — Государственное бюджетное учреждение высшего профессионального образования
Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения
Российской Федерации; e-mail: zalnem@mail.ru

Синдромы ДиДжорджи (OMIM 188400) и вело-кардио-фациальный (ВКФС) составляют группу «CATCH 22», которая характеризуется микроделецией различной длины в хромосомном районе 22q11.2. Частота микроделеции достаточно высока и составляет 1 на 4000 живых новорожденных в популяции, что делает это заболевание одним из самых частых микроделеционных синдромов. В настоящее время для выявления микроделений наряду со стандартным высокоразрешающим хромосомным анализом используются методы сравнительной геномной гибридизации, FISH-анализа, фрагментного анализа и мультиплексной лигазной реакции. Преимуществом скринингового метода микросателлитного анализа является быстрота, эффективность и экономичность. В работе представлены результаты ДНК-диагностики 389 пациентов, направленных в лабораторию с диагнозом CATCH 22, с использованием медицинской технологии, представляющей собой эффективный экспресс-метод выявления делеций хромосомы 22 посредством амплификации последовательностей высокополиморфных микросателлитных локусов ДНК. В диагностическую панель включены микросателлитные маркеры, расположенные в критическом районе хромосомы 22. Локусы *D22S264*, *D22S1638*, *D22S941*, *D22S873*, *D22S4*, *D22S1709* располагаются в наименьшем районе, в котором перекрываются все определенные до настоящего времени делеции. Диагностика проводится на ДНК, полученной из лимфоцитов периферической крови больных, а также их родителей. Проведение ДНК-диагностики возможно для подтверждения диагноза в случае гибели плода или ранней смерти ребенка на секционном материале парафиновых блоков.

Ключевые слова: вело-кардио-фациальный и ДиДжорджи синдромы, делеция хромосомы 22q11.2, микросателлитные маркеры, микросателлитный анализ

Введение

Синдромы ДиДжорджи (ДДС) (OMIM 188400) и вело-кардио-фациальный (ВКФС) (OMIM 192430) составляют группу «CATCH 22», которая характеризуется микроделецией различной длины в хромосомном районе 22q11.2. Частота микроделеции достаточно высока, и составляет 1 на 4000 живых новорожденных в популяции, что делает это заболевание одним из самых частых микроделеционных синдромов. Основные клинические проявления связаны с врожденными пороками сердца, среди которых — дефект межжелудочковой перегородки, тетрада Фалло, стеноз легочной артерии и т.п. Кроме сердечно-сосудистой патологии у пациентов отмечаются задержка умственного развития различной степени выраженности, расщелина или аномалии неба и лицевые аномалии, гипокальциемия, а также отсутствие или гипоплазия тимуса. У пациентов с делециями 22q11.2 определен высокий риск развития шизофрении

— 25%. Клиническая картина заболевания может значительно варьировать даже в одной семье [1].

Почти у 90% пациентов с ВКФС/ДДС делеция в хромосоме 22 образуется *de novo*, и только 10% наследуют ее от своих родителей. Размер делеции у большинства пациентов (80—90%) является стандартным — 3 млн п.н. Однако в 10% случаев наблюдаются делеции меньшего размера, 1,5 млн п.н. Такое различие в размере делеции объясняется тем, что в критическом районе имеется несколько кластеров низкокопийных повторов и между ними происходят рекомбинационные события, которые приводят к образованию как делеций, так и дупликаций [2, 3, 4] (рис. 1).

На сегодняшний день существует целый ряд молекулярных методов, позволяющих выявлять нарушения кариотипа. Наряду со стандартным метафазным анализом используются методы, основанные на применении сравнительной геномной гибридизации, интерфазного

* Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

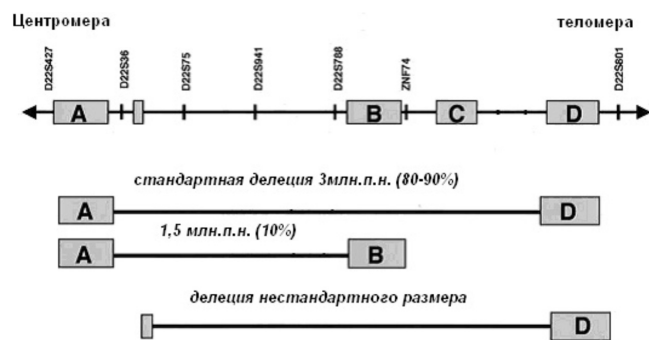


Рис. 1. Расположение кластеров низкокопийных повторов в критическом районе 22q11.2 и размеры делеций, которые возникают в результате неаллельной гомологичной рекомбинации. Серые блоки А, В, С, D — кластеры низкокопийных повторов [5].

FISH-анализа, фрагментного анализа и мультиплексной лигазной реакции [6, 7].

Несомненным преимуществом метода микросателлитного анализа является быстрота, экономичность, простота выполнения, однозначность интерпретации и отсутствие жестких требований к исследуемому материалу, что позволяет рассматривать метод как оптимальный способ экспресс-диагностики микроделеций.

Материалы и методы

Разработанная медицинская технология может быть применена для исследования ДНК, выделенной из периферической крови. Материалом для исследования может также служить ДНК, выделенная из секционных образцов, полученных после гибели больного (гистологические срезы). В качестве референсного материала для подтверждения или исключения делеции используется периферическая кровь обоих родителей.

Технология была апробирована на выборке из образцов ДНК, полученных из периферической крови 389 пациентов, а также их родителей, и на 15 образцах секци-

онного материала, полученного от детей, умерших от пороков сердца и иммунодефицита.

Выделение ДНК из тканей и лимфоцитов периферической крови проводили стандартным методом фенол-хлороформной экстракции, после предварительной инкубации образцов при 56°C в буфере с протеиназой К.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

ПЦР полиморфных маркеров района хромосомы 22q11.2 проводили с использованием термоциклера «Терцик» (ДНК-технология, Россия). Состав реакционной смеси ПЦР: 1 мкл образца ДНК, 1,5 мМ MgCl₂, 200 мкМ каждого dNTP, по 0,05 мкМ прямого (F) и обратного (R) праймеров (таблица), 1 ед. термостабильной Taq-полимеразы, 5 мкл 5-кратного буфера для ПЦР («Интерлабсервис», Москва), деионизированной воды до 25 мкл. На смесь наслаивали 40–60 мкл минерального масла, прогревали при 95°C в течение 10 мин и проводили 35 циклов с параметрами: денатурация: 94°C — 1 мин; отжиг: 60°C — 1 мин; элонгация: 72°C — 30 с. Финальную инкубацию проводили при 72°C в течение 10 мин.

Продукты ПЦР разделяли в 8%-ном полиакриламидном геле методом вертикального электрофореза и визуализировали окрашиванием нитратом серебра.

Результаты и обсуждение использования медицинской технологии

Оптимальные критерии интерпретации результатов

Суть метода заключается в анализе размеров ПЦР-продуктов, полученных с ДНК пробанда и его родителей. Длина ПЦР-продукта зависит от полиморфизма микросателлитных повторов. Основными требованиями к микросателлитным повторам являются их полиморфность и высокая гетерозиготность (>80%). Исследуя повторы методом ПЦР, определяют гетеро-

Таблица

Нуклеотидные последовательности праймеров для диагностики микроделеций 22q11.2 микросателлитным анализом

Локус	Размер продукта ПЦР, п.н.	Праймеры
D22S264	190–210	F: att aac tca taa agg agc cc R: cac ccc acc aga ggt att cc
D22S1638	100–120	F: gac aac agc aaa ttg cac att R: tca cgc cac tac cct cca g
D22S4	210–220	F: gag tag gca ggg gcc ata ag R: tgc ttg agc caa gga gtt cg
D22S873	110–130	F: agt ctg tgt gac aga gtg aca gc R: gct cct ctg agc acg ttt ct
D22S941	224–258	F: cag gtt aca aag tac att aac tt R: caa gaa atg gtt gga gct ggt
D22S1709	110–130	F: ctc ttc caa gtt cag tgc tct R: cac ttc agc aag aac agc aga

зиготное или гомозиготное состояние маркера у пациента. Если маркер обладает высоким полиморфизмом, то аллели родителей будут отличаться друг от друга количеством повторенных единиц, и ребенок наследует от отца и матери аллели разной молекулярной массы, что легко оценить в полиакриламидном геле методом электрофореза. Такое состояние повтора называется гетерозиготным, что свидетельствует о сохранении обеих аллелей и об отсутствии делеции. В том случае, если аллели родителей не отличаются по длине, ребенок унаследует два фрагмента одинаковой молекулярной массы, что свидетельствует о гомозиготном неинформативном состоянии маркера. Подобное состояние маркера затрудняет молекулярную диагностику. Для повышения информативности диагностики используют несколько полиморфных повторов, расположенных в пределах минимальной области перекрытия делеций, охарактеризованной для конкретного микроделеционного синдрома.

Если у пациента имеется делеция исследуемого локуса, то при сравнительном анализе аллелей в семье у него не будет наблюдаться фрагмент ДНК, равный по длине фрагменту одного из родителей. Анализ позволяет выявить наличие делеции и определить родительское происхождение патологии (рис. 2, 3). В случае недоступности родителей для исследования их аллелей в качестве маркеров сравнения, ориентируются на состояние гетерозиготности полиморфных маркеров у пробанда. Если в группе маркеров отсутствуют гетерозиготные аллели, можно косвенно предположить наличие делеции, если же какие-то маркеры из группы имеют гетерозиготное состояние, то делецию исключают.

Результаты использования медицинской технологии

Представленная технология была использована авторами для подтверждения или исключения микроделеции хромосомы 22q11.2. Эффективность медицинской технологии подтверждается выявлением патологии в различных группах пациентов с признаками иммунодефицита вследствие аплазии или гипоплазии тимуса, пороками сердечно-сосудистой системы и недифференцированной умственной отсталостью.

Определение микроделеции 22q11.2 проведено у 389 пациентов, имеющих сочетание некоторых клинических признаков ВКФС/ДДС, а также на 15 образцах секционного материала, полученного от детей, умерших от пороков сердца и иммунодефицита. Среди обследованных больных у 58 (15%) определена интерстициальная делеция хромосомы 22, что подтверждает наличие ВКФС/ДДС. При исследовании секционного материала больных диагноз удалось подтвердить в двух случаях, у остальных 13 больных делеция не определена, что указывает на другую причину смерти.

Обсуждение результатов

Внутрихромосомная рекомбинация критического района 22q11.2 происходит спорадически и приводит к образованию не только делеций, но и дупликаций [9]. Однако наличие дупликаций не приводит к развитию клинических проявлений ВКФС/ДДС. Предполагается, что в популяции существует много индивидуумов — носителей дупликации 22q11.2, но они остаются не выявленными, поскольку дупликация «критического района» не приводит к развитию клинической картины, характерной для синдрома [1].

Ткани и органы, повреждаемые у пациентов с ВКФС/ДДС, развиваются в эмбриогенезе из структур глоточной дуги, которая присутствует у всех позвоночных. Клетки нервного гребня мигрируют из района нервной трубки и принимают участие в формировании как самой глоточной дуги, так и ее производных.

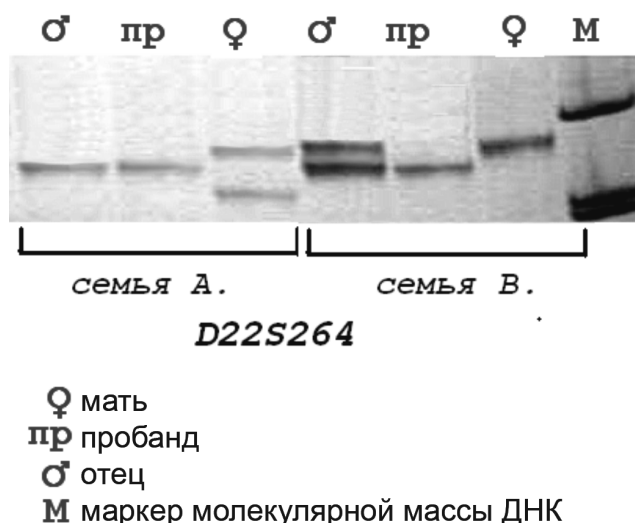


Рис. 2. Микроделеции 22q11.2 при ВКФС/ДДС, выявленные анализом микросателлитного повтора *D22S264*. На рисунке видно отсутствие у пробандов фрагментов, утраченных в результате делеции, соответствующих материнским аллелям в семьях А и В.

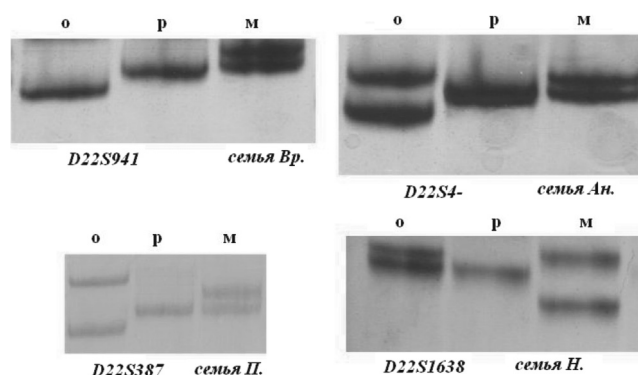


Рис. 3. Примеры выявления микроделеций при ВКФС/ДДС: о — отец; м — мать; р — ребенок. Семьи Вр., Ан., П.: пример делеции отцовского аллеля, семья Н.: пример делеции материнского аллеля.

Эмбрион позвоночных имеет пять пар глоточных дуг. Из первых двух пар происходят кости, мышцы и нервы лица, уха, челюсти и верхнего отдела шеи. Последние три пары отвечают за происхождение костей и мышц шеи, эндокринных желез (тимуса и щитовидной железы), а также выносящих магистральных сосудов сердца: аорты и легочной артерии. Предполагается, что за развитие характерной клиники ВКФС/ДДС отвечает дефект клеток нервного гребня. Минимальный район делеции у мышей включал несколько генов, среди которых наибольшее значение имел ген *tbx1*. Этот ген принадлежит к семейству генов T-box, кодирующих транскрипционные факторы, и в процессе эмбрионального развития имеет высокий уровень экспрессии в глоточной дуге [10]. Одной из функций этого гена является регуляция миграции клеток нервного гребня для формирования структуры глоточной дуги. Эксперименты на мышинных моделях подтвердили значение нарушений *tbx1* для развития клиники ВКФС/ДДС. Ген имеет 9 экзонов, подвергается альтернативному сплайсингу с образованием трех сплайсоформ (*TBX1A*, *TBX1B* и *TBX1C*). Все три формы с 1 по 8 экзон высоко консервативны, и различаются только терминальными экзонами. Значение этого гена для развития клинической картины заболевания подтверждено наличием точковых мутаций у пациентов с клиническими проявлениями ВКФС/ДДС, при отсутствии хромосомной патологии. При этом клинические проявления заболевания у таких больных имеют нетяжелую, частичную форму, при которой обязательно сохраняются дефекты развития сердца и сосудов [11].

В качестве скринингового метода для диагностики микроделений, приводящих к развитию синдромов ВКФС/ДДС, предлагается анализ полиморфных микросателлитных локусов критического района: *D22S264*, *D22S941*, *D22S873*, *D22S4*, *D22S1638*, все они располагаются в наименьшем районе перекрывания всех делеций [8]. Соответствующие высокополиморфные микросателлитные повторы имеют высокую гетерозиготность (более 80%). Исследуемые локусы расположены в непосредственной близости к гену-кандидату *TBX1*; их анализ в семьях пациентов позволяет определить не только наличие делеции, но и ее размеры. Расчетная информативность выбранной нами панели микросателлитных маркеров составляет 99%.

Предлагаемая скрининговая методика имеет ряд преимуществ по сравнению с альтернативными технологиями. Стандартный высокоразрешающий цитогенетический анализ, являясь высокоинформативным методом выявления большинства структурных аномалий, имеет при этом существенное ограничение — не менее 3—5 млн п.н., видимых в световой микроскоп. Диагностическая ценность хромосомного анализа напрямую зависит от квалификации цитогенетика и качества полученных препаратов.

Методы, основанные на применении современных молекулярных технологий, позволяют исключить указанные недостатки. На сегодняшний день в клинической практике чаще всего используются методики, основанные на использовании FISH-анализа, метафазной сравнительной геномной гибридизации и фрагментного анализа. Основными преимуществами микросателлитного анализа являются существенная дешевизна, скорость и простота выполнения диагностических процедур по сравнению с альтернативными методами.

Представленная медицинская ДНК-технология направлена на поиск и характеристику делеций хромосомы 22q11.2 у пациентов с фенотипом ВКФС/ДДС и несиндромальными формами пороков развития сердца, крупных кровеносных сосудов и аномалий развития неба. Внедрение системы молекулярного тестирования делеции в клиническую практику позволяет подтвердить или исключить диагноз серьезной генетической патологии, что способствует адекватному симптоматическому лечению, позволяет эффективно проводить медико-генетическое консультирование в семьях с ВКФС/ДДС.

Список литературы

1. Немцова М.В., Залетаев Д.В. Молекулярно-генетическая диагностика микроделеционных синдромов. В кн. «Введение в молекулярную диагностику, том 2» под ред. М.А.Пальцева и Д.В.Залетаева. М.: ОАО «Медицина», 2011, с. 165-192.
2. Gu W., Zhang F., Lupski J.R. Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics*. 2008; 1:4.
3. Shaw C.J., Lupski J.R. Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Hum Mol Genet*. 2004; Suppl 1: 57-64.
4. Guo X., Delio M., Haque N., Castellanos R., Hestand M.S., Vermeesch J.R., Morrow B.E., Zheng D. Variant discovery and breakpoint region prediction for studying the human 22q11.2 deletion using BAC clone and whole genome sequencing analysis. *Hum Mol Genet*. 2016; ddd221.
5. Saitta S.C., Harris S.E., Gaeth A.P., Driscoll D.A., McDonald-McGinn D.M. Aberrant interchromosomal exchanges are the predominant cause of the 22q11.2 deletion. *Hum Mol Genet*. 2004;13(4):417-428.
6. Jalali G.R., Vorstman J.A., Errami A., Vijzelaar R., Biegel J., Shaikh T., Emanuel B.S. Detailed analysis of 22q11.2 with a high density MLPA probe set. *Hum Mutat*. 2008; 29(3):433-440.
7. Bretelle F., Beyer L., Pellissier M.C., Missirian C. et al. Prenatal and postnatal diagnosis of 22q11.2 deletion syndrome. *Eur J Med Genet*. 2010; 53(6), 367-370.
8. <http://genome.ucsc.edu/>
9. Yobb T.M., Somerville M.J., Willatt L., Firth H.V., Harrison K., MacKenzie J., et al. Microduplication and triplication of 22q11.2: a highly variable syndrome. *Am J Hum Genet*. 2005; 76, 865-876.
10. Yagi H., Furutani Y., Hamada H., Sasaki T., Asakawa S., et al. Role of *TBX1* in human del22q11.2 syndrome. *Lancet*. 2003;362(9393):1366-1373.
11. Vitelli F., Morishima M., Taddei I., Lindsay E.A., Baldini A. *Tbx1* mutation causes multiple cardiovascular defects and disrupts neural crest and cranial nerve migratory pathways. *Hum Mol Genet*. 2002; 11(8):915-922.

Results of the use of the new medical technology to determine microdeletions 22q11.2 by microsatellite analysis on patients with velo-cardio-facial syndrome / DiGeorge syndrome

Nemtsova M.V.¹, Strelnikov V.V.¹, Kuznetsova E.B.^{1,2},
Rudenko V.V.¹, Kazakova S.A.^{1,2}, Zaletaev D.V.^{1,2}

¹ — Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation, e-mail: vstrel@list.ru

² — I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, e-mail: zalnem@mail.ru

DiGeorge syndrome (OMIM 188400) and velo-cardio-facial syndrome (VCFS) (OMIM 192430) constitute a group of «CATCH 22», which is characterized by microdeletions of different lengths in the chromosome 22q11.2 region. Microdeletion rate is quite high, and is 1 in 4000 live births in the population, making this disease one of the most common microdeletion syndromes. At the present time to identify microdeletions along with standard high-resolution chromosome analysis methods, comparative genomic hybridization, FISH analysis, fragment analysis and multiplex ligation reaction are used. The advantages of microsatellite analysis are speed, efficiency and cheapness. We present the results of DNA diagnostics on 389 patients, referred to the laboratory with a diagnosis of CATCH 22, using the medical technology which is an effective method of rapid detection of deletions of chromosome 22 sequences by amplification of highly polymorphic microsatellite DNA loci. The diagnostic panel includes STR-markers mapped in a critical region of chromosome 22. Markers *D22S264*, *D22S1638*, *D22S941*, *D22S873*, *D22S4*, *D22S1709* are located in the smallest region of overlap of all deletions identified to date. Diagnosis is carried out on DNA obtained from peripheral blood lymphocytes of patients and their parents. DNA diagnostics is possible to confirm the diagnosis in the case of fetal death or premature death of the child on the formalin-fixed paraffin embedded autopsy material.

Key words: velo-cardio-facial syndrome / DiGeorge syndrome, microdeletions 22q11.2, STR-markers, microsatellite analysis