

К вопросу о преконцепционной профилактике наследственных болезней: случай выявления носительства редкой мутации у донора яйцеклеток и реципиентов

Щагина О.А., Поляков А.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр»

В статье представлен уникальный случай выявления носительства редкой мутации у донора половых клеток и реципиента. Изложена информация о существующих на сегодняшний день молекулярно-генетических подходах к преконцепционной профилактике наследственных болезней с аутосомно-рецессивным типом наследования, приведены их достоинства и недостатки. Представлены результаты определения популяционной частоты носительства мутации c.301_302delAG (p.S101fsX) гена *PROP1* с использованием медицинской технологии «Система детекции частой мутации гена *PROP1*, ответственной за комбинированный дефицит гормонов гипофиза», внедренной в практику ФГБНУ МГНЦ. Установлено, что аллельная частота данной делеции составляет 0,4%, расчетная частота носительства аутосомно-рецессивного дефицита гормонов гипофиза составляет $1,6\% \pm 0,13$, а расчетная частота заболевания — 1 на 16 000 населения, что совпадает с известными частотами встречаемости гипопитуитаризма.

Ключевые слова: пангипопитуитаризм, преконцепционная профилактика, *PROP1*, медицинская технология диагностики.

Информация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

To the question of the preconception expanded carrier screening of hereditary diseases: the case of the rare mutation detection in donor of ovum and recipients

Shchagina O.A., Polyakov A.V.

Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics»

The article presents a unique case of detection of a rare mutation both in the donor and recipient of sex cells. The article contains information on molecular genetic approaches to the preconception expanded carrier screening. The medical technology «Detection system for frequent mutation of the *PROP1* gene responsible for the combined deficiency of pituitary hormones» was using for population frequency of the mutation c.301_302delAG (p.S101fsX) of the *PROP1* gene detection. It was found that the allelic frequency of this deletion is 0.4, the estimated carrier frequency of autosomal recessive hormone deficiency is $1.6\% \pm 0.13$, and the estimated frequency of the disease is 1 per 16 000.

Keywords: Panhypopituitarism, carrier screening, *PROP1*, medical technology.

Введение

На сегодняшний день известно более 1300 заболеваний с рецессивным типом наследования. В среднем в мире ежегодно рождается 30 детей с рецессивной наследственной болезнью на 10 000 населения. Из 100 супружеских пар в 1—2 случаях оба супруга являются носителями мутаций одного и того же рецессивного гена [1]. В настоящее время преконцепционная профилактика большинства заболеваний, а именно скрининг носительства, предлагается лишь здоровым родственникам больных и их супругам, реже — представителям определенных этносов или планирующим беременность кровным родственникам, однако большинство случаев рецессивной патологии регистрируется в семьях, не имеющих в родословной ни одного больного [2].

В некоторых странах существуют государственные программы обследования лиц детородного возраста или беременных женщин на наиболее частые мутации

генов распространенных рецессивных болезней. В Израиле работает программа по обследованию школьников старших классов на носительство болезни Тея—Сакса, широко распространенной среди евреев-ашкенази. Эта программа позволила на 90% сократить число новорожденных с данной болезнью [3]. В последние годы в программу исследования носительства включены еще 6 болезней [4]. В США, Австралии, Италии беременным женщинам проводится скрининг частых мутаций гена *CFTR*, ответственного за муковисцидоз [5—7]. В регионах средиземноморского бассейна: Кипре, Сардинии, Израиле, Турции, где широко распространены наследственные гемоглобинопатии, введены программы по скринингу на носительство β -талассемии [8]. Подобная программа предложена и в Нидерландах, в связи с высоким числом эмигрантов из эндемичных стран и повышением уровня заболеваемости талассемией.

Целью скрининга здоровых людей на носительство, в отличие от пренатального и неонатального скринингов, является не профилактика болезни, её симптомов, а принятие семьей репродуктивных решений. То есть в соответствии с результатами скрининга и генетическими рисками семья должна принять для себя решение о деторождении, основываясь на возможности проведения пренатальной диагностики, использования преимплантационной генетической диагностики в процедуре ЭКО, применения вспомогательных репродуктивных технологий с донорскими половыми клетками, или отказе от деторождения. Основными параметрами оценки систем для диагностики носительства являются «клиническая чувствительность» — доля идентифицированных носителей наследственной болезни из общего числа носителей и «отрицательное прогностическое значение» — вероятность того, что обследуемый не является носителем рецессивной болезни при отрицательном результате теста [2, 9].

Существует несколько подходов к преконцепционной профилактике рецессивных болезней и обследованию здоровых людей с целью выявления носительства рецессивных мутаций.

Наиболее распространенный подход заключается в создании целевых систем для исследования частых патогенных вариантов нуклеотидной последовательности генов распространенных рецессивных заболеваний. К преимуществам данного подхода относится его относительная дешевизна, быстрота исполнения, высокая точность типирования, возможность разработки регионспецифичных систем. Существенным недостатком данного подхода является то, что причины заболевания не ограничиваются выбранными патогенными вариантами, являющаяся высокоинформативной для определенной группы обследуемых система может иметь крайне низкую информативность в другой группе людей [10, 11]. Даже системы, созданные специально для диагностики носительства в узкой этнической группе, на сегодняшний день становятся менее эффективными за счет возрастания уровня метисации населения. Таким образом, для каждой исследуемой пары диагностическая система должна подбираться индивидуально с учетом их этнической принадлежности, региона проживания и т.д. Кроме того, возникает проблема полноты обследования партнера выявленного с использованием такой системы носителя, ведь патогенный вариант у него может локализоваться в любой другой области гена.

С появлением чиповых технологий, стало возможным исследование конкретных вариантов генов сотен болезней одновременно без увеличения себестоимости по сравнению с целевыми системами. В такие панели можно включать большое число частых мутаций вне зависимости от этнических спектров, что позволяет унифицировать диагностический протокол для всех обратившихся. Основными проблемами данного метода по-прежнему являются отбор включаемых мутаций и основания такого отбора. Такие системы, с одной стороны, не могут исключить носительства редких генетических вариантов, а с дру-

гой — могут дать избыточную информацию о генетическом статусе обследуемого, относительно, например, болезней с поздней манифестацией. Интерпретировать результаты такого исследования может только специалист, обладающий специальными знаниями. Таким образом, преждевременно говорить о том, что затраты на такое типирование сопоставимы с затратами на целевое исследование, так как проведение такой диагностики должно сопровождаться консультированием пары специалистом соответствующего профиля до сдачи анализа и после получения результатов обследования [12].

Многие учреждения предлагают проводить исследование на носительство в рамках преконцепционной профилактики наследственных болезней методами массового параллельного секвенирования. В большинстве случаев предлагается проведение исследования с использованием обогащенных экзомных панелей (NGS-исследования). Однако данные панели не способны выявить интронные варианты, имеют существенные ограничения по выявлению крупных делеций/дупликаций и исследованию генов, имеющих псевдогены. Таким образом, NGS-исследования не могут выявить носительства некоторых распространенных рецессивных болезней: спинальной мышечной атрофии (частота носительства в среднем, в мире 1/40), адреногенитального синдрома (частота носительства 1/30), атаксии Фридрейха (частота носительства 1/120) и других патологий [13—15]. Интерпретация результатов в случае поиска носительства представляет существенные трудности, связанные с трактовкой не описанных ранее вариантов нуклеотидной последовательности, возможностью случайных находок мутаций в генах с поздней манифестацией, неполной пенетрантностью и различной экспрессивностью гена [16].

Таким образом, в мире на сегодняшний день отсутствует единая концепция молекулярно-генетической диагностики пар, планирующих беременность. Все существующие подходы к преконцепционной профилактике имеют свои преимущества и недостатки.

В России государственных программ выявления носителей рецессивных болезней не существует. Многие организации представляют возможность тестирования тем или иным методом. Актуальна проблема выявления носителей частых рецессивных заболеваний среди доноров половых клеток, особенно доноров спермы. В приказе Министерства Здравоохранения РФ «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению от 30 августа 2012 года N 107н с изменениями», указано, что обследование донора половых клеток должно включать медико-генетическое обследование. Однако обязательна только консультация врача-генетика, проведение молекулярно-генетического обследования остается на усмотрение ЭКО-клиники. В некоторых организациях проводится обследование доноров на носительство одной или нескольких наиболее частых мутаций, в других предлагают использование панелей, включающих порядка 50 мутаций [17].

Материалы и методы

В лабораторию ДНК-диагностики ФГБНУ МГНЦ обратилась семья, планирующая деторождение с использованием вспомогательных репродуктивных технологий: суррогатное материнство и использования донорских яйцеклеток. На этапе подготовки к ЭКО супругу был проведен анализ носительства рецессивных заболеваний в компании Sequenom laboratories (США). Для исследования была использована микрочиповая панель Heredit Universal Complete Panel, включающая 2094 мутации в 221 гене, ответственным за 229 наследственных болезней. По результатам исследования у супруга было выявлено гетерозиготное носительство мутации с.301_302delAG (p.S101fsX) гена *PROPI*, ответственного за аутосомно-рецессивную комбинированную недостаточность гормонов гипофиза. Семья просила установить отсутствие мутаций гена *PROPI* у трех возможных доноров яйцеклеток.

Для определения частоты носительства мутации с.301_302delAG (p.S101fsX) гена *PROPI* использовались образцы ДНК, выделенные из крови 499 неродственных необследованных жителей РФ.

ДНК выделена из цельной крови, забранной в пробирку с антикоагулянтом ЭДТА с использованием набора реактивов для выделения Wizard® GenomicDNA Purification Kit (Promega, USA) по протоколу производителя.

Определение нуклеотидной последовательности гена *PROPI* у доноров яйцеклеток проводили методом прямого секвенирования продукта ПЦР как с прямого, так и с обратного праймера, на основе ферментативного сиквенса по Сенгеру. В качестве матрицы для проведения сиквенса использовали фрагменты, полученные после проведения ПЦР. Автоматическое секвенирование проводили согласно протоколу фирмы-производителя на приборе ABI Prism 3100 (Applied Biosystems).

Определение частоты мутации с.301_302delAG (p.S101fsX) проводили с использованием медицинской технологии «Система детекции частой мутации гена *PROPI*, ответственной за комбинированный дефицит гормонов гипофиза», внедренной в практику ФГБНУ МГНЦ.

Дизайн олигонуклеотидных праймеров осуществлен в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ МГНЦ, синтез — в ЗАО «Евроген», Москва.

Последовательности праймеров выбирали согласно базе данных GeneBank. В качестве референсной использовали последовательность NM_006261. Использованы последовательности гена *PROPI*, фланкирующие последовательности экзонов гена *PROPI* и мутацию с.301_302delAG (табл. 1).

Длина амплифицированного фрагмента составляет 148 п.н. в случае нормальной последовательности и 146 п.н. при наличии делеции.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили под минеральным маслом по следующей схеме: в 23 мкл реакционной смеси, содержащей 1х реакционный буфер (67 мМ Tris-HCl, 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Twin-20), 0,25 мкМ каждого олигопраймера, 250 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 4 мМ MgCl₂, 1,5 единицы термофильной ДНК-полимеразы, добавляли 2 мкл ДНК.

ПЦР проводили в следующем режиме: первоначальная денатурация при 95°C — 5 минут, затем 30 циклов смены температур: 94°C — 45 с, температура отжига праймеров 60°C — 45 с, элонгация цепи 72°C — 45 с; заключительная элонгация 72°C — 7 минут. Для проведения ПЦР использовали режим точной регуляции. Последовательности праймеров и условия амплификации представлены в табл. 1.

Продукт реакции детектировался методом вертикального электрофореза в 8% ПААГ (соотношение акриламида/бисакриламида 19/1). Результаты электрофореза визуализировали после окрашивания геля раствором бромистого этидия на документирующей системе GelDoc фирмы BIO-RAD (США) в УФ-излучении с длиной волны 312 нм.

Интерпретацию результатов поиска с.301_302delAG проводили на основании длин фрагментов, идентифицируемых на электрофорезе. Электрофореграмма представляет из себя паттерн полос, соответствующих последовательности экзона 2 гена *PROPI*. По наличию/отсутствию полос с длинами, соответствующими нормальной и мутантной последовательностям судили о наличии/отсутствии аллеля с мутацией с.301_302delAG в гентипе пробанда (табл. 2)

Таблица 1

Последовательности праймеров для анализа гена *PROPI*

Фрагмент	Последовательность праймеров, 5'→3'	t отжига
Экзон 1	F: CAGAGAAATCTCAAGTCAGAGAT R: AGCCTATGCTTTCAGCCTCACAC	62°C
Экзон 2	F: GGAGCGTCCTCCTCAGAAGC R: GCCCAACATTCTATGATAGCACC	62°C
Экзон 3	F: CATTGGAGTAGGGTGTCAACCACC R: CCATAGATGGAAGGAAGCCAC	62°C
Мутация с.301_302delAG	F: GAGGAACCAGTACCCCGACATC R: GCCCAACATTCTATGATAGCACC	62°C

Интерпретация результатов поиска мутации с.301_302delAG

Детектируемая мутация	Генотип	Длина фрагментов
с.301_302delAG	с.301_302delAG/ с.301_302delAG	146
	с.301_302delAG/N	148/146
	N/N	148

Результаты и обсуждение

Всем трем предполагаемым донорам яйцеклетки было проведено исследование кодирующей последовательности гена *PROPI*. В результате исследования у Донора 1 не было выявлено изменений нуклеотидной последовательности, у Донора 2 был обнаружен полиморфный вариант с.424G>A, приводящий к аминокислотной замене р.Ala142Trp. Данный вариант описан в базе SNP (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP) под номером rs1800197. На основании высокой популяционной частоты данного варианта — 0,24 (по данным ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/>)), биоинформатического анализа с использованием программ предсказания патогенности данный вариант признан вероятно доброкачественным в соответствии с критериями ACMG [16]. Таким образом, ооциты этих женщин оказались пригодными для использования консультирующейся семьей.

У Донора 3 была выявлена мутация с.301_302delAG в гетерозиготном состоянии, совпадающая с мутацией

в генотипе супруга. Таким образом, ооциты этого донора оказались непригодными для оплодотворения из-за высокого риска рождения ребенка с комбинированной недостаточностью гормонов гипофиза.

Комбинированная недостаточность гормонов гипофиза, связанная с мутациями гена *PROPI* — одна из форм пангипопитуитаризма, при которой не синтезируются гормоны передней доли гипофиза: соматотропный, тиреотропный, аденокортикотропный, фолликулостимулирующий, лютеинизирующий, пролактин. Результатом дефицита гормонов являются карликовость, гипотиреоз, гипогонадизм, атрофия надпочечников. При исследовании методом магнитно-резонансной томографии у больных визуализируют атрофию гипофиза. Точных оценок частоты комбинированного дефицита гормонов гипофиза, связанного с мутациями в гене *PROPI* не проводилось, частоту всех форм пангипопитуитаризма в США оценивают как 1 на 7000—10 000 населения, по другим странам подобная информация отсутствует [18].

Ген *PROPI* кодирует транскрипционный фактор, экспрессирующийся в эмбриогенезе в клетках гипофиза. В настоящее время описано более 30 мутаций этого гена, однако многими авторами показано, что наиболее частой мутацией, выявляемой более чем на 50% поврежденных хромосом, является делеция с.301_302delAG [21, 22], зарегистрированная у супруга из обратившейся пары и одного из возможных доноров ооцитов. Популяционные частоты носительства данной делеции точно не установлены, по данным ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/>), этот вариант нуклеотидной последовательности не зарегистрирован, несмотря на хорошее покрытие данной области и исследованных 119 808 аллелей.

Мы предположили, что у жителей РФ частота мутации с.301_302delAG может быть существенно выше. Для проверки данной гипотезы, мы, используя медицинскую технологию диагностики «Система детекции частот мутации гена *PROPI*, ответственной за комбинированный дефицит гормонов гипофиза», внедренную в практическую деятельность ФГБНУ МГНЦ в 2017 г., исследовали образцы ДНК, выделенной из крови 499 необследованных жителей РФ. Электрофореграмма результатов анализа представлена на рис. 1. Все образцы с измененной электрофоретической подвижностью были отсекуены (результаты секвенирования представлены на рис. 2).

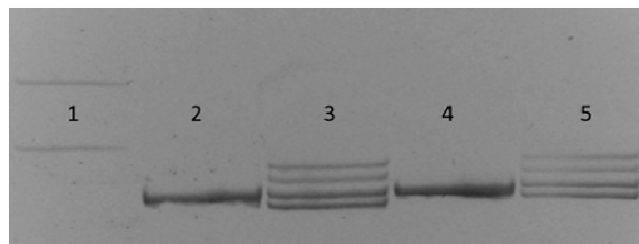


Рис. 1. Визуализация мутации с.301_302delAG. Паттерн полос, визуализируемый на форе. Дорожка 1 — маркер молекулярного веса; дорожки 2 и 4 — норма; дорожки 3 и 5 — гетерозиготы по мутации с.301_302delAG.

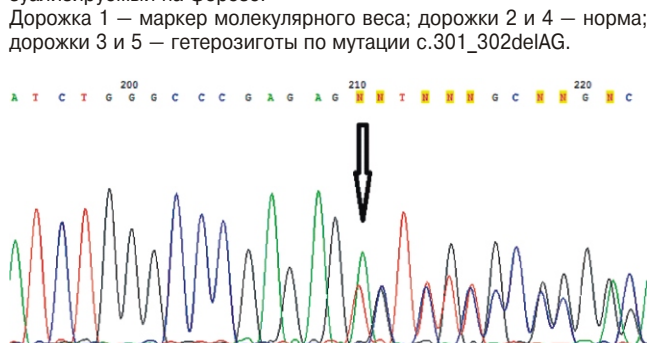


Рис. 2. Мутация с.301_302delAG. Результаты секвенирования. Стрелкой указан сдвиг нуклеотидной последовательности, обусловленный носительством мутации с.301_302delAG в гетерозиготном состоянии.

В результате мутация с.301_302delAG в гетерозиготном состоянии была выявлена у 4 из 499 жителей РФ. Аллельная частота данной делеции составляет 0,4%. Исходя из предположения, что на долю исследуемой делеции приходится около 50% всех мутаций гена *PROPI*, расчетная частота носительства аутосомно-рецессивного дефицита гормонов гипофиза составляет $1,6 \pm 0,13\%$, а расчетная частота заболевания — 1 на 16 000 населения, что совпадает с известными частотами встречаемости гипопитуитаризма. Вероятность того, что среди возможных доноров яйцеклеток для пары, где супруг является носителем мутации с.301_302delAG, окажется носительница той же мутации составляет 0,8%.

Таким образом, несмотря на то, что вопрос необходимости и полноты обследования здоровых людей репродуктивного возраста на носительство рецессивных болезней на сегодняшний день остается нерешенным, необходимость обследования доноров половых клеток и пар, вступающих в программу ЭКО несомненна. Широкий спектр исследованных мутаций у консультирующейся пары позволил выбрать подходящего донора яйцеклеток и предотвратить рождение больного ребенка.

В результате работы было установлено, что новая медицинская технология для диагностики комбинированного дефицита гормонов гипофиза обладает достаточно высокой информативностью. Разработанная система детекции частой мутаций гена *PROPI* повышает эффективность диагностики комбинированного дефицита гормонов гипофиза, позволяет детектировать наиболее частую мутацию с.301_302DelAG с наименьшими временными и финансовыми затратами.

Заключение

Впервые в России разработана система на основе метода ПЦР, позволяющая детектировать наиболее частую мутацию гена *PROPI* с.301_302DelAG, позволяющая выявлять не менее 50% аллелей с мутацией, вызывающей комбинированный дефицит гормонов гипофиза, ассоциированном с геном *PROPI*.

Новая методика может быть использована для подтверждающей диагностики врожденного дефицита гормонов гипофиза, в том числе у новорожденных детей, использоваться при дифференциальной диагностике различных форм гипопитуитаризма, для подбора оптимальной тактики наблюдения и лечения пациентов с первых дней жизни, проведения пренатальной диагностики в отягощенных семьях.

Детекция мутаций позволяет подтвердить диагноз на молекулярно-генетическом уровне, провести, в случае необходимости, пренатальную диагностику. Различия в терапии наследственных и ненаследственных форм гипопитуитаризма, возможность предотвратить осложнения в случае своевременно начатой заместительной терапии делают особенно актуальной своевременную диагностику данных болезней.

Список литературы

1. Henneman L, Borry P, Chokoshvili D et al. Responsible implementation of expanded carrier screening. *Eur J Hum Genet.* 2016 Jun; 24(6):e1-e12. doi: 10.1038/ejhg.2015.271.
2. Morris JK, Law MR, Wald NJ. Is cascade testing a sensible method of screening a population for autosomal recessive disorders? *Am J Med Genet A.* 2004 Jul 30;128A(3):271-5.
3. Kaback MM. Population-based genetic screening for reproductive counseling: the Tay-Sachs disease model. *Eur J Pediatr.* 2000 Dec;159 Suppl 3:S192-5.
4. Ioannou L, Massie J, Lewis S et al. Evaluation of a multi-disease carrier screening programme in Ashkenazi Jewish high schools. *Clin Genet.* 2010 Jul;78(1):21-31. doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01459.x.
5. Edwards JG, Feldman G, Goldberg J et al. Expanded carrier screening in reproductive medicine—points to consider: a joint statement of the American College of Medical Genetics and Genomics, American College of Obstetricians and Gynecologists, National Society of Genetic Counselors, Perinatal Quality Foundation, and Society for Maternal-Fetal Medicine. *Obstet Gynecol.* 2015 Mar;125(3):653-62. doi:10.1097/AOG.0000000000000666.
6. Castellani C, Macek M Jr, Cassiman JJ et al. Benchmarks for cystic fibrosis carrier screening: a European consensus document. *J Cyst Fibros.* 2010 May;9(3):165-78. doi:10.1016/j.jcf.2010.02.005.
7. Godard B, ten Kate L, Evers-Kiebooms G et al. Population genetic screening programmes: principles, techniques, practices, and policies. *Eur J Hum Genet.* 2003 Dec;11 Suppl 2:S49-87.
8. Cousens NE, Gaff CL, Metcalfe SA et al. Carrier screening for beta-thalassaemia: a review of international practice. *Eur J Hum Genet.* 2010. Oct;18(10):1077-83. doi: 10.1038/ejhg.2010.90.
9. Grody WW, Thompson BH, Gregg AR et al. ACMG position statement on prenatal/preconception expanded carrier screening. *Genet Med.* 2013 Jun;15(6):482-3. doi:10.1038/gim.2013.47. Epub 2013 Apr 25.
10. Bliznetz EA, Tverskaya SM, Zinchenko RA et al. Genetic analysis of autosomal recessive osteopetrosis in Chuvashiya: the unique splice site mutation in TCIRG1 gene spread by the founder effect. *Eur J Hum Genet.* 2009 May;17(5):664-72. doi:10.1038/ejhg.2008.234.
11. Fares F, Badarneh K, Abosaleh M et al. Carrier frequency of autosomal-recessive disorders in the Ashkenazi Jewish population: should the rationale for mutation choice for screening be reevaluated? *Prenat Diagn.* 2008 Mar;28(3):236-41. doi: 10.1002/pd.1943.
12. Kihlbom U. Ethical issues in preconception genetic carrier screening. *Ups J Med Sci.* 2016 Jul 8:1-4.
13. Stoll K, Resta R. Considering the cost of expanded carrier screening panels. *Genet Med.* 2013 Apr;15(4):318-9. doi: 10.1038/gim.2013.18.
14. Zabnenkova VV, Dadali EL, Spiridonova MG et al. [Heterozygous carrier rate for type I-IV proximal spinal muscular atrophy in Chuvashes, Udmurts, and residents of the Moscow region]. *Genetika.* 2012 Aug;48(8):983-92.
15. Wilson RC, Nimkarn S, Domic M et al. Ethnic-specific distribution of mutations in 716 patients with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab.* 2007 Apr;90(4):414-21.
16. Delatycki MB, Williamson R, Forrest SM. Friedreich ataxia: an overview. *J Med Genet.* 2000 Jan;37(1):1-8. Review.
17. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing, *Genetics in medicine*, V. 15, Number 9, September 2013, p. 733-747
18. Кречмар МВ. Медико-генетическое консультирование на основе комплексного прекоцепционного ДНК-тестирования будущих родителей с целью снижения рисков моногенной патологии детей. *Медицинская генетика*, 2016; (7): 41-44.
19. Steiner MM, Boggs JD. Absence of pituitary gland, hypothyroidism, hypoadrenalism and hypogonadism in a 17-year-old dwarf. *J. Clin. Endocr.* 25: 1591-1598, 1965.
20. Cogan JD, Wu W, Phillips JA et al. The *PROPI* 2-base pair deletion is a common cause of combined pituitary hormone deficiency. *J. Clin. Endocr. Metab.* 83: 3346-3349, 1998.
21. Fofanova O, Takamura N, Kinoshita E et al. Compound heterozygous deletion of the *PROP-1* gene in children with combined pituitary hormone deficiency. *J. Clin. Endocr. Metab.* 83: 2601-2604, 1998.