

Главный редактор
ГИНТЕР Е.К.
академик РАН, д.б.н., профессор
Заместители главного редактора
ПУЗЫРЕВ В.П.
академик РАН, д.м.н., профессор
БАРАНОВ В.С.
чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор
Ответственный секретарь
ИЖЕВСКАЯ В.Л.
д.м.н.

Редакционная коллегия
АРЧАКОВ А.И.
академик РАН, д.б.н., профессор
ВОЕВОДА М.И.
чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор
ДУРНЕВ А.Д.
чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор
ИВАНОВ В.П.
д.б.н., профессор
ИЛЛАРИОШКИН С.Н.
д.м.н., профессор
КОЗЛОВА С.И.
д.м.н., профессор
КОПНИН Б.П.
д.б.н., профессор
КУЦЕВ С.И.
д.м.н.

КУЧИНСКАС В. (Kucinskas V.)
академик Литовской АН, д.б.н., профессор
ЛИМБОРСКАЯ С.А.
д.б.н., профессор
МАЦЕК М. (Macek M. Jr.)
доктор медицины и педиатрии (MD),
доктор философии по медицине
и молекулярной генетике (PhD), профессор
МИХАЙЛОВА Л.К.
д.м.н., профессор
НАЗАРЕНКО Л.П.
д.м.н., профессор
НОВИКОВ П.В.
д.м.н., профессор
НОСИКОВ В.В.
д.б.н., профессор
РОГАЕВ Е.И.
д.б.н., профессор
РУБЦОВ Н.Б.
д.б.н., профессор
СВЕРДЛОВ Е.Д.
академик РАН, д.б.н., профессор
СЕРЕДЕННИК С.Б.
академик РАН, д.м.н., профессор
СМИРНОВ В.Н.
академик РАН, д.м.н., профессор
СТЕПАНОВ В.А.
д.б.н., профессор
ХУСНУТДИНОВА Э.К.
д.б.н., профессор
ЧЕХОНИН В.П.
академик РАН, д.б.н., профессор
ЧУЧАЛИН А.Г.
академик РАН, д.м.н., профессор

Издатель: Иришкин Дмитрий
E-mail: genius-media@mail.ru

Адреса редакции:
115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1,
Федеральное государственное
бюджетное учреждение
Медико-генетический научный центр РАМН
Тел. (499) 612-81-07, факс: 324-07-02
E-mail: L_Tarlycheva@med-gen.ru

Вниманию авторов и читателей:
Рукописи и иллюстрации не возвращаются.
При перепечатке материалов согласование с ре-
дакцией журнала «Медицинская генетика» обя-
зательно. За содержание рекламных публикаций от-
ветственность несет рекламодатель.

© Российское общество медицинских генетиков
© Российская академия медицинских наук
© ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»
© ИП Иришкин Дмитрий Андреевич

Тираж 200 экз.

Медицинская ГЕНЕТИКА

Ежемесячный рецензируемый научно-практический журнал

2017 г. Том 16. №11 (185)

СОДЕРЖАНИЕ

НАУЧНЫЕ ОБЗОРЫ

Твленёва А.А., Мусатова Е.В., Шилова Н.В.

Методы полногеномной амплификации генетического материала единочных клеток.....3

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Филиппов О.С., Андреева Е.Н., Голошубов П.А.,
Калашникова Е.А., Одегова Н.О., Жученко Л.А.

Современный пренатальный скрининг на врожденные пороки развития
и хромосомные аномалии в Российской Федерации. Результаты Аудита-20177

Жикривецкая С.О., Орлова А.А., Мусатова Е.В.,
Софронова Я.В., Померанцева Е.А.

Преимплантационная генетическая диагностика дупликации в районе 17p11.2
при синдроме Шарко-Мари-Тута типа 111

Щагина О.А., Полякова Д.А., Рыжкова О.П., Булах М.В.,
Забненкова В.В., Логинова А.Н., Поляков А.В.

Причины мышечной дистрофии у женщин
с направляющим диагнозом «мышечная дистрофия Дюшена/Беккера»17

Марахонов А.В., Васильева Т.А., Воскресенская А.А., Кадышев В.В., Поздеева Н.А.,
Шилова Н.В., Браславская С.И., Хлебникова О.В., Зинченко Р.А., Куцев С.И.

Опыт применения медицинской технологии
диагностики врожденной аниридии в ФГБНУ «МГНЦ»23

Бабушкина Н.П., Гончарова И.А., Голубенко М.В.

Разработка технологии диагностики наследственных генетических вариантов, определяющих
чувствительность к варфарину, методом одноклеточного удлинения праймеров27

Смирнихица С.А., Банников А.В., Анучина А.А.,
Кочергин-Никитский К.С., Адильгереева Э.П., Лавров А.В.

Факторы, влияющие на эффективность CRISPR/Cas9
для коррекции мутации F508del при муковисцидозе32

КЛИНИЧЕСКИЕ СЛУЧАИ

Руденская Г.Е., Шумарина А.О., Антонец А.В.,
Сермягина И.Г., Крылова Т.Д., Щагина О.А.

Случай сочетания двух редких неврологических болезней,
выявленных панельным экзомным секвенированием.....38

Кожанова Т.В., Жилина С.С., Мещерякова Т.И.,
Прокопьев Н.П., Осипова К.В., Айвазян С.О., Канивец И.В.,
Коновалов Ф.А., Толмачева Е.Р., Кошкин Ф.А., Притыко А.Г.

Х-сцепленная умственная отсталость (тип Кантагреля) у девочки:
клинический случай из практики42

Кашеварова А.А., Беляева Е.О., Никонов А.М., Плотникова О.В.,
Гергерт И.Г., Никитина Т.В., Скрябин Н.А., Васильев С.А., Лопаткина М.Е.,
Чурилова А.В., Толмачева Е.Н., Назаренко Л.П., Лебедев И.Н.

Интерпретация фенотипа пациента с учетом результатов
комплексных молекулярно-цитогенетических исследований46

Опыт применения медицинской технологии диагностики врожденной аниридии в ФГБНУ «МГНЦ»

Марахонов А.В.^{1,2}, Васильева Т.А.¹, Воскресенская А.А.³, Кадышев В.В.¹, Поздеева Н.А.³,
Шилова Н.В.¹, Браславская С.И.¹, Хлебникова О.В.¹, Зинченко Р.А.^{1,4}, Куцев С.И.^{1,4}

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

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования

«Московский физико-технический институт (государственный университет)»

³ Чебоксарский филиал Федерального государственного автономного учреждения «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» им. академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

⁴ Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования

«Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: renazinchenko@mail.ru

Врожденная наследственная несиндромальная аниридия (ВА) — моногенный врожденный порок развития органа зрения с аутосомно-домinantным типом наследования, встречающийся в популяции с частотой 1:45 000—100 000 населения. ВА характеризуется врожденным отсутствием радужной оболочки глаза или врожденной гипоплазией большей ее части. ВА может быть: несиндромальной, которая, однако, часто затрагивает все структуры глаза (75 % случаев) и синдромальной (20%, включая WAGR синдром). Часть форм ВА, как изолированной, так и синдромальной, обусловлена гетерозиготными мутациями в гене *PAX6* и хромосомными перестройками, вовлекающими регион 11p13. Делекции в том же регионе, но с вовлечением, помимо гена *PAX6*, еще и гена *WT1* приводят к синдрому WAGR. В исследование включены 110 пациентов с предположительным диагнозом изолированная врожденная аниридия из 84 неродственных семей и 7 пациентов из 7 неродственных семей — с диагнозом синдром WAGR. Применяемая комплексная подтверждающая и дифференциальная ДНК-диагностика ВА и синдрома WAGR состоит из двух основных последовательных этапов: MLPA анализа (с подтверждением обнаруженных делеций с помощью анализа потери гетерозиготности или FISH) и секвенирования по Сэнгеру. Эффективность применения MLPA-анализа в качестве первоначального метода диагностики составляет 33% (30/91). Эффективность применения секвенирования в качестве единственного метода диагностики ВА вне предлагаемой комплексной технологии в выборке российских больных составила бы 63,7% (58/91). В результате использования предлагаемой технологии диагноз подтвержден у 107 пациентов (81 пробанда) с несиндромальной ВА и 7 пациентов с синдромом WAGR, определены частые в выборке пациентов из России *PAX6* мутации. Эффективность применения двух последовательных этапов комплексной технологии подтверждающей и дифференциальной диагностики ВА в выборке пациентов из России составила 96,7% (88/91).

Ключевые слова: врожденная аниридия, синдром WAGR, *PAX6*, MLPA, 11p13, внутригенные мутации, крупные хромосомные делеции.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ (гранты 17-04-00475, 17-04-00288) и Российского научного фонда (грант 17-15-01051). Часть исследований оплачена Благотворительным фондом «Созидание».

Application of medical technology for the diagnosis of congenital aniridia at the research centre for medical genetics

Marakhonov A.V.^{1,2}, Vasilyeva T.A.¹, Voskresenskaya A.A.³, Kadyshev V.V.¹, Pozdeyeva N.A.³,
Shilova N.V.¹, Braslavskaya S.I.¹, Khlebnikova O.V.¹, Zinchenko R.A.^{1,4,*}, Kutsev S.I.^{1,4}

¹ Research Center for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

² Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny, Russian Federation

³ Cheboksary branch of S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Cheboksary, Russian Federation

⁴ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

* e-mail: renazinchenko@mail.ru

Congenital aniridia is a Mendelian autosomal dominant panocular disorder with complete penetrance and variable expressivity. The incidence of aniridia is 1 in 40,000-100,000 births. Aniridia is characterized by congenital absence of the iris with foveal hypoplasia and other eye abnormalities. Aniridia occurs as non-syndromic which, however, often affects all eye structures (75% of cases) and syndromic (20%, including WAGR syndrome). The most cases of aniridia, both isolated and syndromic, is caused by heterozygous mutations in the *PAX6* gene or chromosome 11p13 rearrangements. Large deletions of the same region affecting *PAX6* and *WT1* genes loci lead to the WAGR syndrome. 110 patients with a preliminary diagnosis of congenital aniridia from 84 unrelated families and 7 patients from 7 unrelated families diagnosed with WAGR syndrome were included into the study. The applied complex confirmatory and differential DNA diagnosis of aniridia and WAGR syndrome consists of two main sequential steps: MLPA analysis (with confirmation of the detected deletions using the loss of heterozygosity analysis and/or FISH) and Sanger sequencing. The effi-

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ciency of MLPA analysis as an initial diagnostic method is 33% (30/91). The effectiveness of sequencing as the only method for diagnosis of aniridia is 63.7% (58/91). As a result of the application of complex medical technology at the Research Centre for Medical Genetics, the diagnosis was confirmed in 107 patients (81 probands) with aniridia and 7 patients with WAGR syndrome. Frequent *PAX6* mutations and 11p13 deletions were identified. The effectiveness of two-staged technology for congenital aniridia diagnosis is 96.7% (88/91).

Key words: congenital aniridia, WAGR syndrome, *PAX6*, MLPA, 11p13, intragenic mutations, large chromosome deletions.

Введение

Врожденная наследственная несиндромальная аниридия (ВА, OMIM #106210) — наследственный врожденный порок развития (ВПР) органа зрения с аутосомно-доминантным типом наследования, встречающийся в популяции с частотой 1:45 000—100 000 населения [1]. ВА характеризуется врожденным отсутствием радужной оболочки глаза или врожденной гипоплазией большей ее части. ВА может быть несиндромальной, которая, однако, часто затрагивает все структуры глаза (75% случаев) и синдромальной (20%, включая синдром WAGR) [2]. Синдромальные формы аниридии включают:

- а) ВА, отягощенную поражением ЦНС, эндокринной, мочеполовой и других систем и органов (<10%);
б) синдром WAGR (<10%);
в) нетипичные редкие формы ВА, возникающие на фоне других сложных моногенных или хромосомных заболеваний [3, 4].

Часть форм ВА, как изолированной, так и синдромальной обусловлена гетерозиготными мутациями в гене *PAX6* (OMIM *607108), а также хромосомными перестройками, вовлекающими регион 11p13 [4—6]. Делеции в этом регионе, но с вовлечением, помимо гена *PAX6*, еще и гена *WT1* приводят к синдрому WAGR. Синдром WAGR встречается, в основном, в виде спорадических случаев. Во всех спорадических случаях ВА до установления генетической причины больной имеет 50%-ный риск развития нефробластомы до 8 лет жизни [7].

Около 2% случаев аниридии ассоциированы с другими моногенными и хромосомными синдромами, более редкими по частоте [8].

Кроме того, сходные с вызванной мутациями в гене *PAX6* ВА фенотипы могут быть также ассоциированы

с мутациями в генах *FOXC1* (OMIM *601090), *PITX2* (OMIM *601542), *PITX3* (OMIM *602669) и других (~3% пациентов) [9—11].

Мутации в генах *FOXC1* и *PITX2* обычно ассоциированы с синдромом Аксенфельд-Ригера и аномалией Петерса. Учитывая схожесть фенотипов, приходится проводить дифференциальную диагностику несиндромальной аниридии с этими пороками развития переднего отрезка глаза. Значительную сложность в молекулярном подтверждении диагноза ВА представляет и гетерогенность молекулярных механизмов повреждения гена *PAX6*. Они включают в себя не только точковые мутации, но и крупные хромосомные перестройки с вовлечением области p13 хромосомы 11 [12]. Хромосомные перестройки в ряде случаев могут затрагивать не кодирующую часть гена *PAX6*, а дистальный 3' *цис*-регуляторный район, находящийся на расстоянии 150 т.п.н. от гена [13].

В лаборатории генетической эпидемиологии ФГБНУ «МГНЦ» разработана комплексная медицинская технология подтверждающей и дифференциальной диагностики ВА [14, 15]. В настоящей работе представлены результаты применения медицинской технологии для диагностики ВА у 117 пациентов из 91 неродственной семьи.

Основные этапы технологии

От всех обследованных больных или их законных представителей (родителей) получено информированное согласие на участие в обследовании, обработку персональных данных и проведение лабораторной диагностики. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ».

Таблица

Результаты применения комплексной диагностики ВА в выборке из 117 пациентов из 91 неродственной семьи из России

Диагноз	<i>PAX6</i> анализ			Всего изучено пациентов	
	Точкаевые внутригенные мутации	Делеции (MLPA)	Количество пробандов без <i>PAX6</i> мутаций		
WAGR	0	7	0	7	62 спорадических случаев
Спорадическая ВА	35	17	3	55	
Семейная ВА	23	6	0	29	
Все	58	30	3	91	

В исследование включены 110 пациентов с предположительным диагнозом *изолированная врожденная аниридия* из 84 неродственных семей и 7 пациентов из 7 неродственных семей — с диагнозом *синдром WAGR*. Изучено 29 семейных случаев ВА и 59 единичных (в том числе семеро пациентов с синдромом WAGR). Возраст пациентов варьировал от 6 месяцев до 65 лет (средний возраст 16 лет), большинство больных в выборке (67 чел.) обследованы в возрасте до 12 лет. Диагноз поставлен на основании клинической картины в ФГБНУ «МГНЦ» (63 пациента) и в Чебоксарском филиале ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» (54 пациента).

Применяемая комплексная подтверждающая и дифференциальная ДНК-диагностика ВА и синдрома WAGR состоит из двух последовательных этапов.

Первый этап. Высокий риск и злокачественность опухоли почки при синдроме WAGR определяют важность проведения ранней дифференциальной диагностики и первоочередность анализа вариаций числа копий генов в регионе 11p13 у пациентов с ВА. Данный этап проводится методом MLPA анализа и валидации обнаруженных делеций:

а) в случае обнаружения крупных делеций, затрагивающих ген *WT1*, — флуоресцентной *in situ* гибридизацией (FISH) с зондом, специфичным к гену *WT1*;

б) в остальных случаях — генотипированием отягощенных семей по 12 микросателлитным маркерам хромосомы 11.

Второй этап. При отсутствии в образце ДНК пробанда крупных структурных изменений региона 11p13 методом прямого секвенирования по Сэнгеру определяются точковые изменения гена *PAX6* и подтверждается патогенный характер вновь найденных мутаций.

Результаты и выводы

В результате MLPA-анализа протяженные хромосомные делеции выявлены у 23 пробандов с несиндромальной ВА и у 7 с синдромом WAGR.

У пациентов с ВА обнаружены делеции, захватывающие локус гена *PAX6* и/или локусы соседних генов, длиной от 3 т.п.н. до 7,5 млн п.н.

В 8 неродственных семьях (12 пациентов) определена делеция региона 11p13, которая затрагивает удаленную 3' *цис*-регуляторную область, но оставляет интактной кодирующую последовательность гена *PAX6*. Длина делетированного участка может варьировать от 500 до 1500 т.п.н.

У 12 пробандов определены делеции, захватывающие оба гена: *PAX6* и *WT1*. Делеции WAGR-области были верифицированы методом FISH по характерному паттерну гибридизации — единичному сигналу, соответствующему локусу *WT1*. В результате семерым пациентам с синдромом WAGR диагноз подтвержден молекуллярно-генетическими методами. У 3 из 5 пробандов

с ВА и выявленными делециями WAGR-области диагноз *синдром WAGR с развитием опухоли Вильмса* может подтвердиться позднее (из-за раннего возраста больного опухоль могла еще не развиться). Этим пациентам рекомендован мониторинг состояния почек (УЗИ каждые 3 месяца) и наблюдение у онколога.

Эффективность применения MLPA анализа в качестве первоначального метода диагностики составляет 33% (30/91).

У оставшихся 67% (61/91) пробандов с ВА несбалансированных хромосомных перестроек, затрагивающих сегмент 11p13, не обнаружено.

Внутригенные мутации в гене *PAX6* выявлены у 58 пробандов с предположительным диагнозом *несиндромальная ВА*. Из 58 идентифицированных мутаций 28 — ранее не описанные, а 30 описаны другими авторами и зарегистрированы в базе данных о мутациях в гене *PAX6* [3]. Определены 24 нонсенс-мутации, 15 мутаций сдвига рамки, 5 миссенс-мутаций, 1 СТЕ (приводящая к С-концевому удлинению белка), 2 изменения сайта инициации трансляции, 11 мутаций, нарушающих сплайсинг. Все обнаруженные в данном исследовании мутации зарегистрированы в открытой базе данных о мутациях человека LOVD 3.0 (<http://databases.lovd.nl/shared/genes/PAX6>) и Clinvar.

У 13 неродственных пробандов обнаружены 4 частые рекуррентные мутации (p.Arg203* — у 4, p.Arg103* — у 2, p.Arg240* — у 5, 1183+2T>C — у 2). Еще у двоих неродственных пробандов определена ранее не зарегистрированная нонсенс-мутация c.265C>T, p.(Gln89*) (N = 15/91, т. е. у 16,5% пациентов обнаружены рекуррентные мутации).

Ни одна из впервые обнаруженных мутаций не встретилась в базе данных полноэкзонного секвенирования 60 706 неродственных здоровых индивидов из разных популяций ExAc [16]. Обнаруженные небольшие внутригенные мутации в гене *PAX6* распределены по всему гену, однако большинство из них (76%, 44/58) сосредоточено в пяти экзонах: 5, 6, 7, 8 и 9.

Прямое двунаправленное секвенирование гена *PAX6* позволило выявить генетический дефект у 63,7% (58/91) пробандов с ВА. При применении секвенирования в качестве единственного метода диагностики ВА вне предлагаемой комплексной технологии его эффективность в выборке российских больных составила бы 63,7%. В 3 случаях спорадической ВА ни точковых мутаций в гене *PAX6*, ни хромосомных перестроек с вовлечением региона 11p13 не выявлено.

В итоге после применения MLPA анализа и секвенирования по Сэнгеру диагноз подтвержден у 107 пациентов с несиндромальной ВА и 7 пациентов с синдромом WAGR, определены частые в выборке пациентов из России мутации. Эффективность применения двух последовательных этапов комплексной технологии подтверждающей и дифференциальной диагностики ВА составила 96,7% (88/91).

Список литературы

1. Hingorani, M., I. Hanson, and V. van Heyningen, Aniridia. Eur J Hum Genet, 2012. 20(10): p. 1011-7.
2. Васильева, Т.А., и др., Дифференциальная диагностика наследственных форм врожденной аниридии с позиций современной генетики. Вестник РАМН, 2017. 72. — в печати.
3. Kasmann-Kellner, B., B. Seitz, Aniridia syndrome: clinical findings, problematic courses and suggestions for optimization of care («aniridia guide»). Ophthalmologe, 2014. 111(12): p. 1145-56.
4. Robinson, D.O., et al., Genetic analysis of chromosome 11p13 and the PAX6 gene in a series of 125 cases referred with aniridia. Am J Med Genet A, 2008. 146A(5): p. 558-69.
5. Crolla, J.A. and V. van Heyningen, Frequent chromosome aberrations revealed by molecular cytogenetic studies in patients with aniridia. Am J Hum Genet, 2002. 71(5): p. 1138-49.
6. Chen, P., et al., Mutation analysis of paired box 6 gene in inherited aniridia in northern China. Mol Vis, 2013. 19: p. 1169-77.
7. Gronskov, K., et al., Population-based risk estimates of Wilms tumor in sporadic aniridia. A comprehensive mutation screening procedure of PAX6 identifies 80% of mutations in aniridia. Hum Genet, 2001. 109(1): p. 11-8.
8. Kokotas, H. and M.B. Petersen, Clinical and molecular aspects of aniridia. Clin Genet, 2010. 77(5): p. 409-20.
9. Ito, Y.A., et al., Severe molecular defects of a novel FOXC1 W152G mutation result in aniridia. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. 50(8): p. 3573-9.
10. Sadagopan, K.A., et al., Aniridia-like phenotype caused by 6p25 dosage aberrations. Am J Med Genet A, 2015. 167A(3): p. 524-8.
11. Reis, L.M. and E.V. Semina, Genetics of anterior segment dysgenesis disorders. Curr Opin Ophthalmol, 2011. 22(5): p. 314-24.
12. Redeker, E.J., et al., Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) enhances the molecular diagnosis of aniridia and related disorders. Mol Vis, 2008. 14: p. 836-40.
13. Wawrocka, A., et al., 11p13 deletions can be more frequent than the PAX6 gene point mutations in Polish patients with aniridia. J Appl Genet, 2013. 54(3): p. 345-51.
14. Vasilyeva, T.A., et al., Molecular Analysis of Patients with Aniridia in Russian Federation Broadens the Spectrum of PAX6 Mutations. Clin Genet, 2017. 10.1111/cge.13019.
15. Васильева, Т.А., и др., Изучение генетических основ и разработка протоколов для диагностики наследственных заболеваний органа зрения на примере врожденной аниридии. Медицинская генетика, 2016. 15(6): с. 37-43.
16. Lek, M., et al., Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. Nature, 2016. 536(7616): p. 285-91.