

ДНК-ДИАГНОСТИКА И СПЕКТР МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *FBN1* ПРИ СИНДРОМЕ МАРФАНА

Рогожина Ю. А., Румянцева В. А., Букаева А. А., Заклязьминская Е. В.

Цель. Разработка оптимального протокола диагностического поиска мутаций с использованием секвенирования нового поколения (NGS) и оценка спектра мутаций в российской выборке больных с синдромом Марфана.

Материал и методы. В исследование включены 32 пациента с синдромом Марфана. Для 24 человек было проведено прямое секвенирование по Сенгеру 24–32 экзонов гена *FBN1*. Для 10 человек был проведен анализ кодирующих экзонов и прилегающих интронных областей гена *FBN1* путем приготовления фрагментных библиотек и проведения NGS на платформе IonTorrent. Для 12 человек поиск мутаций осуществлялся с использованием автоматически разработанной панели праймеров Ampliseq для мультиплексной амплификации кодирующих областей генов, ответственных за развитие соединительно-тканной дисплазии.

Результаты. При исследовании 24–32 экзона гена *FBN1* были обнаружены 3 замены (р.С921R, р.С950S и р.11048T). При полном анализе последовательности гена *FBN1* фрагментным анализом замены найдено 4 преждевременных стоп-кодона (р.У181*, р.Р516*, р.Q1811*, р.Р2776*) и 3 новые миссенс-варианта (р. С739W, р.С1095S, р.С2468R). Так же была выявлена делеция со сдвигом рамки считывания и появлением стоп-кодона в 9 экзоне (с.661delT). У одной пациентки была обнаружена замена с.4942+4A>G, клиническое значение которой не определено. При полном анализе гена *FBN1* с использованием панели Ampliseq было обнаружено 2 преждевременных стоп-кодона (р. Q520*, р.К2838*) и 2 делеции со сдвигом рамки считывания (с.40_49del, с.6751del). У 6 из 12 обнаружены миссенс-замены (р.Н2144S, р.А986T, р.С2390S, р.С2276W, р.С1777R и р.С2363G).

Заключение. В отсутствии “горячих” экзонов, внедрение NGS позволяет оптимизировать поиск мутаций даже в таких протяженных генах как ген *FBN1*. Медико-генетическая консультация и ДНК-диагностика являются интегральными методами для оказания мультидисциплинарной помощи.

Российский кардиологический журнал 2015, 10 (126): 61–64

<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2015-10-61-64>

Ключевые слова: синдром Марфана, фибриллин, *FBN1*.

ФГБНУ Российский научный центр хирургии имени академика Б. В. Петровского, Москва, Россия.

Рогожина Ю. А.* — научный сотрудник лаборатории медицинской генетики, Румянцева В. А. — врач-генетик лаборатории медицинской генетики, Букаева А. А. — младший научный сотрудник лаборатории медицинской генетики, Заклязьминская Е. В. — заведующая лабораторией медицинской генетики.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

uar8o@yandex.ru

FBN1 — ген, кодирующий белок фибриллин-1, NGS — new generation sequencing, секвенирование нового поколения, VUCS — variant of unknown clinical significance, вариант с неизвестным клиническим значением, ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, кДНК — комплементарная ДНК, мРНК — матричная РНК, РНК — рибонуклеиновая кислота, СМ — синдром Марфана.

Рукопись получена 26.05.2015

Рецензия получена 28.05.2015

Принята к публикации 04.06.2015

DNA DIAGNOSTICS AND MUTATION SPECTRUM OF THE GENE *FBN1* IN MARFAN'S SYNDROME

Rogozhina Yu. A., Rumyantseva V. A., Bukaeva A. A., Zaklyazminskaya E. V.

Aim. The development of an optimal protocol for diagnostic search for mutations with the use of the new generation sequencing technique (NGS) and evaluation of the mutation spectrum in Russian selection of the patients with Marfan syndrome.

Material and methods. Totally 32 patients included with Marfan syndrome. For 24 the direct sequencing was done by Sanger, of 24–32 exons *FBN1*. For 10 persons the analysis performed of coding exons and close introns regions of the gene *FBN1* with the preparation of fragmented libraries and performing of NGS on the IonTorrent platform. For 12 persons the mutations search was done with the use of automatically developed panel of Ampliseq primers for multiplex amplification of coding regions of genes that are responsible for the connective tissue development.

Results. In investigation of 24–32 exons of *FBN1* we found 3 replacements (р.С921R, р.С950S and р.11048T). In complete analysis of *FBN1* gene by fragmentation check of replacements we found 4 premature stop-codons (р.У181*, р.Р516*, р.Q1811*, р.Р2776*) and 3 missense variants (С739W, р.С1095S, р.С2468R). In addition, there was deletion with the shift of translation frame and occurrence of stop-codon in the 9th exon (с.661delT). In one female patient there

was replacement variant с.4942+4A>G, with non-defined clinical significance. With the complete analysis of *FBN1* using Ampliseq there were 2 premature codons found (р. Q520*, р.К2838*) and 2 deletions with the translation frame shift (с.40_49del, с.6751del). In 6 from 12 there were missense replacements found (р.Н2144S, р.А986T, р.С2390S, р.С2276W, р.С1777R and р.С2363G).

Conclusion. In the case of absence of the “hot spot” exons, invention of NGS allows for optimization the search of mutations even in such long genes as the *FBN1*. Medical-genetic consultation and DNA-diagnostics are the integral methods for multidisciplinary care.

Russ J Cardiol 2015, 10 (126): 61–64

<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2015-10-61-64>

Key words: Marfan's syndrome, fibrillin, *FBN1*.

FSBSI Russian Scientific Center of Surgery n.a. B. V. Petrovsky, Moscow, Russia.

Синдром Марфана (СМ) — одно из самых частых заболеваний из группы дисплазий соединительной ткани. Для этого синдрома характерны поражение сердечно-сосудистой системы, аномалия глаз (подвывих хрусталика, миопия) и изменения скелета (длинные конечности, деформация позвоночника и грудной клетки). Основными факторами ограничения продолжительности жизни являются

осложнения со стороны сердечно-сосудистой системы. Сердечно-сосудистые проявления включают дилатацию аорты на уровне синусов Вальсальвы, высокий риск аневризм/разрывов аорты и других крупных сосудов, пролапс митрального клапана с регургитацией или без нее, пролапс трехстворчатого клапана и расширение проксимальных отделов легочной артерии.

По данным, представленным европейскими и американскими авторами, СМ встречается в популяции с частотой 2-3 на 10 000 человек [1], однако в России масштабных эпидемиологических исследований не проводилось.

Диагноз СМ ставится на основании Гентских критериев (2010) [2], учитывающих комбинацию больших и малых диагностических признаков в нескольких системах органов. В отсутствие семейной истории, сочетание дилатации аорты на уровне синусов Вальсальвы ($Z > 2$) и подвывиха хрусталика считается достаточным для постановки диагноза. Кроме того, впервые в 2010г в Гентские критерии [2] было введено выявление патогенной мутации в гене *FBNI* в качестве большого диагностического критерия заболевания.

Классическая форма синдрома Марфана вызвана мутациями в гене *FBNI*, расположенным на 15-й хромосоме (15q21.1). Ген *FBNI* — очень протяженный, содержит 66 экзонов (из них 65 кодирующих). При этом в *FBNI* нет “горячих” замен и экзонов, которые бы позволили эффективно и с малыми затратами проводить молекулярно-генетическое подтверждение диагноза. Условно “горячими” считают экзоны 24-32, по данным литературы на них может приходиться 20% найденных мутаций [3]. Только у 75% больных прослеживается отягощенный семейный анамнез и передача мутации от одного из родителей, у 25% мутация возникает *de novo*.

Ген *FBNI* кодирует белок фибриллин-1. Это внеклеточный гликопротеин, который образует микрофибриллы. Микрофибриллы участвуют в формировании эластичных тканей, поддержании их гомеостаза и создании клеточного каркаса. Эластические волокна распространены по всему организму, но наибольшее их число сосредоточено в аорте и связках. При СМ эти волокна становятся менее прочными из-за нарушения структуры фибриллина. Фибриллин-1 содержит связывающие сайты для рецепторов интегрин [4]. Кроме того, фибриллин-1 способен регулировать биодоступность трансформирующего фактора роста (TGF β) [5], который опосредует сигнальный каскад, важный для дифференцировки и созревания соединительнотканых структур.

Клинический полиморфизм проявлений СМ, которые встречаются при разных мутациях, чрезвычайно широк — от изолированной эктопии хрусталика или ПМК с минимальными скелетными проявлениями марфаноидного фенотипа до тяжелых неонатальных форм СМ с продолжительностью жизни около двух лет.

Цель исследования — разработка оптимального протокола диагностического поиска мутаций с использованием секвенирования нового поколения (NGS) и оценка спектра мутаций в российской выборке больных с синдромом Марфана.

Материал и методы

Согласно рекомендациям Consensus Statement [6], всем пациентам с подозрением на наследственное сердечно-сосудистое заболевание рекомендовано медико-генетическое консультирование (класс рекомендаций I). В ФГБНУ РНЦХ им. акад. Б. В. Петровского были проконсультированы 279 пациентов с дисплазией соединительной ткани. Из них для 32 пациентов выполнялись Гентские критерии синдрома Марфана (2010), и им была проведена ДНК-диагностика. Два пациента с неонатальной формой СМ наблюдались в перинатальном кардиологическом центре. Для 30 пациентов был поставлен диагноз “классическая форма СМ”: 29 человек госпитализированы в отделение хирургии аорты и ее ветвей, один — в отделение хирургического лечения дисфункций миокарда и сердечной недостаточности. Все пациенты дали информированное согласие на проведение клинического и генетического обследования и хирургического лечения.

Анализ последовательности гена *FBNI* в силу большой протяженности проводился в несколько этапов и с использованием различных методов. Случайным образом пациенты с достаточной для диагноза комбинацией Гентских критериев были разбиты на 3 группы. Первую группу составили 24 пациента, у которых методом прямого секвенирования по Сенгеру были исследованы только 24-32 экзоны гена *FBNI*. Во второй группе было 10 человек (из них 7 человек без обнаруженных мутаций перешли из 1 группы). Им был проведен анализ кодирующих экзонов и прилегающих интронных областей гена *FBNI* путем приготовления фрагментных библиотек и проведения NGS на платформе IonTorrent. Третья группа включала в себя 12 человек (из них 7 человек без мутаций в 24-32 экзонах из 1 группы), для которых поиск мутаций осуществлялся с использованием автоматически разработанной панели праймеров Ampliseq для мультиплексной амплификации кодирующих областей генов, ответственных за развитие соединительно-тканной дисплазии. Все непокрытые участки и найденные замены у всех обследованных больных были проанализированы капиллярным секвенированием по Сенгеру.

Все выявленные новые генетические варианты были проанализированы с помощью биоинформатических ресурсов NetGene2, SpliceSitePredictor, PolyPhen2, Provean и Sift для оценки *in silico* их функционального значения. Окончательное заключение о клинической значимости замен делалось в соответствии с Гентскими критериями патогенности мутаций [2] и в сочетании с результатами анализа *in silico*.

По запросу 5 семей был выполнен каскадный семейный скрининг (проведён поиск найденных мутаций у родственников пробанда).

Результаты

В первой группе из 24 пробандов исследовали только 24–32 экзоны гена *FBN1*. У 3 больных были обнаружены 3 замены (р.С921R, р.С950S и р.І1048Т). Миссенс-замены р.С921R и р.С950S являются новыми, мутация р.І1048Т описана в литературе как патогенная при синдроме Марфана [7].

Во второй группе при полном анализе последовательности гена фрагментным анализом замены были обнаружены у 9 из 10 пробандов (90%). Найдено 4 преждевременных стоп-кодона (р.У181*, р.R516*, р.Q1811*, р.R2776*) и 3 новые миссенс-варианта (р.С739W, р.С2468R). Замена р.С1095S обнаружена у пациентки с неонатальной формой СМ [8]. Также была выявлена делеция со сдвигом рамки считывания и появлением стоп-кодона в 9 экзоне (с.661delТ). У одной пациентки была обнаружена замена с.4942+4А>G, клиническое значение которой не определено. Процент обнаруженных замен в этой группе составил 90%.

В третьей группе из 12 пробандов проводился полный анализ гена *FBN1* с использованием панели Ampliseq. Было обнаружено 2 преждевременных стоп-кодона (р. Q520*, р.К2838*) и 2 малые делеции со сдвигом рамки считывания (с.40_49del, с.6751del). У 6 из 12 обнаружены миссенс-замены (р.Н2144S, р.А986Т, р.С2390S, р.С2276W, р.С1777R и р.С2363G). Процент обнаруженных замен в этой группе составил 84%.

Все найденные замены представлены в таблице 1.

Обсуждение

Мутации в гене *FBN1* как причина СМ были описаны в 1991г. Однако, в связи с большим размером, поиск мутаций в этом гене проводился в небольшом числе специализированных лабораторий в мире. Подавляющее число мутаций в *FBN1* обусловлены точковыми заменами или небольшими делециями/инсерциями, обнаружение которых требует полного анализа гена. Большая протяженность гена *FBN1* делает диагностику синдрома Марфана дорогостоящей и трудоемкой. Поэтому данные о спектре мутаций ограничены.

Широкое применение методов высокоэффективного секвенирования приводит к выявлению большого числа неописанных замен, и квалификация этих замен, заключение о связи выявленной замены с заболеванием требует большой осторожности. Необходим аккуратный анализ вновь выявленных вариантов, так как не все аминокислотные замены являются мутациями. В 2010 году предложены Гентские критерии патогенности мутаций [2], которые облегчают квалификацию генетических находок. По этим критериям клинически значимыми следует считать следующие генетические варианты:

- Замены, ранее описанные для синдрома Марфана.

Таблица 1

Результаты поиска мутаций в гене *FBN1* у обследованных пробандов VUCS

	Генетические изменения	Изменения белка	Экзон	Клиническое значение
1	с.40_49 del	р.Т14fs	2	мутация
2	с.543С>G/N	р.У181*	7	мутация
3	с.661delТ/N	р.221fs	7	мутация
4	с.1558С>Т/N	Q520*	13	мутация
5	с.1546С>Т/N	р.R516*	13	мутация
6	с.2217Т>G/N	р.С739W/N	19	мутация
7	с.2761Т>C/N	р.С921R	24	мутация
8	с.2849G>C/N	р.С950S	24	мутация
9	с.2956G>A/N	р.А986Т	25	VUCS*
10	с.3143Т>C/N	р.І1048Т	26	мутация
11	с.3284G>C/N	р.С1095S	27	мутация
12	с.5329Т>C/N	р.С1777R	44	мутация
13	с.5431G>Т/N	р.Е1811*	45	мутация
14	с.6431А>G/N	р.Н2144S	53	VUCS*
15	с.6828Т>G/N	С2276W	56	мутация
16	с.6751delТ/N	р.С2251fs	56	мутация
17	с.7168Т>A/N	р.С2390S	58	мутация
18	с.7087Т>G/N	р.С2363G	58	мутация
19	с.7402Т>C/N	р.С2468R	60	мутация
20	с.8512А>Т/N	р.К2838*	66	мутация
21	с.8326С>Т/N	р.R2776*	66	мутация
22	с.4942+4А>G/N	нет данных		VUCS*

Сокращение: VUCS — variants of uncertain clinical significance (вариант с неизвестным клиническим значением).

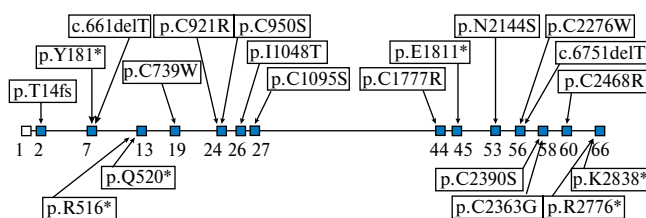


Рис. 1. Схема расположения найденных замен относительно экзонов гена *FBN1*.

- Мутации *de novo* (с доказанным отцовством и отсутствием заболевания у родителей).
- Нонсенс-мутации.
- Мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания.
- Мутации сайта сплайсинга, влияющие на каноническую последовательность гена или для которых экспериментально установлены изменения на уровне мРНК/кДНК.
- Миссенс — замены, затрагивающие или создающие цистеин в белковой последовательности.
- Миссенс — замены, влияющие на консервативные участки в последовательности EGF-домена ((D/N)X(D/N)(E/Q)Xm(D/N)Xn(Y/F) где m и n — переменное число остатков; D — аспарагиновая кислота, N —

аспарагин, E — глутаминовая кислота, Q — глутамин, Y — тирозин, F — фенилаланин).

- Другие миссенс-мутации: при сегрегации в семье (если это возможно) + отсутствие замены в 200 образцах здоровых доноров (400 контрольных хромосом). Если нет семейной истории, то отсутствие данной замены в 400 контрольных хромосомах.

- Сегрегация совместно с заболеванием выявленного гаплотипа в гене *FBN1* в ≥ 6 мейозов в семье.

При таком анализе найденных вариантов, у 32 пациентов нашей выборки в 24-32 экзонах обнаружено всего 4 патогенных мутации и 1 VUCS. Таким образом, диагностическая эффективность поиска в девяти экзонах составила 15,6% в общей группе, 100% — у больных с неонатальной формой СМ.

Из 32 пациентов мутации или VUCS обнаружены у 22 человек (69%). Полный анализ гена *FBN1* был проведен для 22 пациентов, патогенные замены или VUCS обнаружены у 19 человек (86%).

В нашей выборке замены распределены неравномерно (рис. 1). Не обнаружено мутаций на участке с 28 по 43 экзон. Между 40 и 41 экзонами находится замена с.4942+4A>G, но ее клиническое значение неопределенно и требуется дополнительный анализ. Неравномерность может быть связана с небольшой выборкой и специфичностью группы пациентов (большинство госпитализировано в отделение хирургии аорты и ее ветвей).

Частичный анализ последовательности *FBN1* описано не дал значительных результатов. При анализе 14% кодирующей последовательности (экзоны 24-32) мутации были выявлены у 15,6% пациентов. При необходимости полного анализа всей последовательности, секвенирование по Сенгеру становится крайне дорогостоящим методом. Применение технологий

секвенирования нового поколения упрощает анализ таких протяженных генов, как *FBN1*. При этом надо учитывать ограничения данного метода, такие как невозможность полного покрытия всего гена и неравномерность прочтения участков. При использовании панели AmpliSeq есть стабильно непокрываемые участки. Для оптимизации диагностики такие участки сразу отправлялись на секвенирование по Сенгеру. В нашей выборке финальное покрытие экзонов было неравномерно для каждого пациента, что определяется в том числе качеством анализируемой ДНК. При больших пробелах в индивидуальном прочтении после AmpliSeq, можно готовить эти образцы на фрагментный анализ, который позволит достоверно проанализировать оставшиеся экзоны и удешевить диагностику. Подтверждение найденных замен производится с помощью секвенирования по Сенгеру как единственного сертифицированного метода для клинической диагностики.

Заключение

Согласно европейским рекомендациям по диагностике и лечению заболеваний аорты (2014) [9], пациентов с СМ и другими дисплазиями соединительной ткани выделяют в отдельную категорию больных, имеющих особенности при выборе тактики хирургического вмешательства. Нахождение патогенной мутации в гене *FBN1* является одним из больших критериев для постановки диагноза. В отсутствие “горячих” экзонов, внедрение NGS позволяет оптимизировать поиск мутаций даже в таких протяженных генах как ген *FBN1*. Медико-генетическая консультация и ДНК-диагностика являются интегральными методами для оказания мультидисциплинарной помощи.

Литература

1. Collod-Beroud G, et al. Marfan syndrome in the third Millennium. *Eur J Hum Genet*, 2002; 10: 673-81.
2. Loeys BL, et al. The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome. *J Med Genet*, 2010; 47: 476-85.
3. Faivre L, et al. Clinical and mutation-type analysis from an international series of 198 probands with a pathogenic *FBN1* exons 24-32 mutation. *Eur J Hum Genet*, 2009; 17: 491-501.
4. Olivieri J, et al. Fibrillin assemblies: extracellular determinants of tissue formation and fibrosis. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 2010; 3:24.
5. Chaudhry SS, et al. Fibrillin-1 regulates the bioavailability of TGF β 1. *JCB*, 2007; 176 (3): 355.
6. Ackerman MJ, et al. HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies this document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Heart Rhythm*, 2011; Aug 8(8): 1308-39.
7. Kirschner R, Hubmacher D, et al. Classical and Neonatal Marfan Syndrome Mutations in Fibrillin-1 Cause Differential Protease Susceptibilities and Protein Function. *The Journal of biological chemistry*, 2011; 286, 37: 32810-23.
8. Romyantseva VA, et al. Neonatal Marfan Syndrome: clinical description and complex approach to diagnostics and treatment. *Russ J Cardiol*, 2014; 5(109): 55-60. Russian (Румынцева В.А. и др. Неонатальная форма синдрома Марфана — клиническое описание и комплексный подход к диагностике и лечению. *Российский кардиологический журнал*, 2014; 5(109): 55-60).
9. Erbel R, Aboyans V, Boileau C, et al.; ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of aortic diseases. *Eur Heart Jour*, 2014; Nov1,35(41):2873-926.