

БИОЛОГИЯ
BIOLOGY

УДК 575.113.1/616.12-007.61

Поступило в редакцию 20.02.2017
Received 20.02.2017**Л. Н. Сивицкая¹, Н. Г. Даниленко¹, Т. Г. Вайханская², О. Д. Левданский¹,
член-корреспондент О. Г. Давыденко¹**¹*Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь*
²*Республиканский научно-практический центр «Кардиология», Минск, Республика Беларусь***ДИАГНОСТИКА БОЛЕЗНИ ДАНОНА МЕТОДОМ TARGETED NEXT-GENERATION SEQUENCING: ИДЕНТИФИКАЦИЯ МУТАЦИИ В ГЕНЕ LAMP2**

В сообщении представлен клинический случай болезни Данона, впервые диагностированной в Беларуси. Метод targeted Next-Generation Sequencing (tNGS) был применен для поиска изменений в 46 генах, ассоциированных с развитием кардиомиопатий различного генеза, у пациента с дилатационной кардиомиопатией. Сопутствующими клиническими проявлениями были периферические мышечные нарушения и умеренная деменция. Выявлена гемизиготная делеция c.864+3_864+6delGAGT (rs397516751, NM_002294.2) в гене LAMP2, затрагивающая естественный сайт сплайсинга. Ген LAMP2 (Lysosomal Associated Membrane Protein 2, Xq24) кодирует мембранный гликопротеид, необходимый для адгезии лизосом. Мутации в нем приводят к накоплению гликогена в клетках вследствие нарушения процесса аутофагии лизосомами. Клинически они проявляются болезнью Данона: гипертрофическая или дилатационная кардиомиопатия, скелетная миопатия и умственная отсталость. В представленном клиническом случае метаболическая причина кардиомиопатии была не распознана. Метод tNGS позволил скорректировать диагноз. Очевидна необходимость наиболее ранней постановки правильного диагноза у таких пациентов для своевременного принятия мер, направленных на замедление прогрессирования заболевания. Болезнь Данона может протекать бессимптомно до пубертатного возраста, далее происходит стремительное развитие и прогрессирование признаков с высокой смертностью, возникающей внезапно.

Ключевые слова: болезнь Данона, кардиомиопатия, ген LAMP2, Next-Generation Sequencing, сплайсинг-мутация, ДНК-диагностика

**Larysa N. Sivitskaya¹, Nina G. Danilenko¹, Tatiana G. Vaikhanskaya², Aleh D. Liaudanski¹,
Corresponding Member Oleg G. Davydenko¹**¹*Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*
²*Republican Scientific and Practical Center of Cardiology, Minsk, Republic of Belarus***DANON DISEASE DIAGNOSIS BY TARGETED NEXT-GENERATION SEQUENCING: IDENTIFICATION OF LAMP2 MUTATIONS**

The case report of the Danon disease firstly diagnosed in Belarus is presented. The targeted Next-Generation Sequencing (tNGS) was used to search for mutations in 46 genes associated with cardiomyopathy of different genesis in a patient suffered from dilated cardiomyopathy, peripheral muscle disorders and mild dementia. Hemizygous deletion c.864+3_864+6delGAGT (rs397516751, NM_002294.2) in the LAMP2 gene affecting the natural splice site was detected. The LAMP2 gene (Lysosomal Associated Membrane Protein 2, Xq24) encodes a membrane glycoprotein essential for the adhesion of lysosomes. Mutations in LAMP2 lead to the distortion of the autophagy by lysosomes and glycogen accumulation in the cells. Clinically, they manifest in the Danon disease: hypertrophic or dilated cardiomyopathy, skeletal myopathy, and mental retardation. The metabolic reason of cardiomyopathy has not been recognized in the present case. The tNGS has allowed one to correct the diagnosis. The early exact diagnosis for such patients is essential to slow down the disease progression. The Danon disease can proceed asymptotically before puberty and then develops rapidly with sudden mortality.

Keywords: Danon disease, cardiomyopathy, LAMP2 gene, Next-Generation Sequencing, splicing mutation, DNA diagnostics

Введение. Болезнь Данона – это X-сцепленное заболевание, характеризующееся триадой клинических признаков: гипертрофической кардиомиопатией, скелетной миопатией и умственной отсталостью. Жизнеугрожающим признаком у таких пациентов является гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП), которая развивается в раннем возрасте и характеризуется тяжелым течением.

нием. Признаки миопатии, поражения сердца и умственной отсталости сильно варьируют. Описаны случаи с разной степенью выраженности мышечных и когнитивных нарушений: от минимальных проявлений до тяжелой симптоматики [1]. Так как болезнь Данона наследуется по X-сцепленному доминантному типу, в клиническом течении этой патологии прослеживаются гендерные различия. Более тяжелое течение, как правило, встречается чаще у мужчин, как и более раннее проявление симптомов заболевания ($13,3 \pm 8,0$ года для мужчин и $28,9 \pm 14,2$ лет для женщин) [2]. Болезнь Данона у женщин, вследствие гетерозиготности, характеризуется проявлением в более позднем возрасте и с более мягкой клинической симптоматикой. Скелетная миопатия и умственная отсталость менее распространены у женщин, нежели у мужчин [1].

Впервые болезнь была описана Морисом Даноном в 1981 г. у двух неродственных мальчиков [3]. Гистологическое исследование их мышечной ткани показало наличие лизосом, «нагруженных» гликогеном. А при ультраструктурном исследовании было выявлено обилие гликогеновых частиц, большинство из которых находились внутри лизосомальных мешочков, некоторое количество отдельно или вместе с дебрисом (отходами) клетки. В связи с этим болезнь была классифицирована как дефект накопления гликогена. Однако позже генетические, гистологические и ультраструктурные исследования показали, что у таких больных нарушен процесс аутофагии. Это сложный механизм «разборки», утилизации и повторного использования компонентов клетки [3].

По современным представлениям болезнь Данона является следствием мутации в гене LAMP2, кодирующем лизосома-ассоциированный мембранный протеин 2. У больных наблюдается дефицит этого белка – важного компонента мембраны лизосом. Как следствие, в клетках скелетной и сердечной мускулатуры накапливаются вакуоли, в которых содержится большое количество гликогена [4; 5]. В свою очередь это приводит к увеличению размеров клеток и их гибели, что проявляется гипертрофией и фиброзными изменениями в миокарде [2; 4–7].

В базе данных Human Gene Mutation Database (HGMD, www.hgmd.org) в гене LAMP2 зарегистрирована 81 мутация, ассоциированная с болезнью Данона. Более четверти из них представлены миссенс-заменами, большинство из которых (около 85 %) приводят к образованию преждевременного стоп-кодона. Еще четверть мутаций затрагивает сайты сплайсинга LAMP2 гена. И треть мутаций приходится на малые инсерции/делеции, приводящие к сдвигу рамки считывания белка и образованию преждевременного стоп-кодона. Описаны также крупные делеции и дубликации в этом гене. Таким образом, подавляющее большинство изменений в LAMP2, приводящих к развитию болезни Данона, связано с синтезом укороченного или делетированного протеина.

Между типом мутаций и клиническими проявлениями заболевания выявлены корреляции. Показано, что миссенс-мутации, не приводящие к укорочению LAMP2-белка, ассоциированы с низкой вероятностью развития кардиомиопатии или в целом более поздним проявлением болезни Данона (32 ± 23 лет). Мутации, вызывающие синтез усеченного лизосомального протеина, коррелируют с наиболее ранним проявлением заболевания (18 ± 11 лет). Сплайсинг-мутации занимают промежуточное значение (20 ± 13 лет) [8].

Распространенность болезни Данона до настоящего времени точно не определена. Это связано с тем, что причина гипертрофии миокарда из-за отложений гликогена в кардиомиоцитах вследствие мутации в гене LAMP2 часто остается нераспознанной. По некоторым литературным данным, изменения в LAMP2 гене встречаются у 1–5 % больных с ГКМП. А частота таких кардиомиопатий составляет 2 случая на 1000 молодого взрослого населения [1]. Распространенность болезни Данона в белорусской популяции также неизвестна. В нашей стране до настоящего времени нет данных о прижизненной диагностике этого заболевания.

В сообщении представлен клинический случай кардиомиопатии с сопутствующими признаками скелетной миопатии и умеренной деменции. Диагноз болезни Данона был установлен современными методами ДНК-диагностики.

Материалы и методы исследования. *Клиническая характеристика пациента.* Пациент М., молодой мужчина, кровных родственников не имеет, своей родословной не знает. После смерти родителей (причина неизвестна) в 16-летнем возрасте оказался на государственном попечении. В 30-летнем возрасте с жалобами на чувство сердцебиения и эпизоды потери сознания мужчина

был госпитализирован в РНПЦ «Кардиология» с подозрением на кардиальное происхождение синкопальных состояний. При осмотре выявлены признаки скелетной миопатии: изменение походки, гипотрофия/атрофия мышц нижних конечностей. Пациент отличался субтильным телосложением с выраженным поясничным гиперлордозом, симптомом «крыловидных лопаток» и перонеальной походкой. Пробанд отмечал чувство слабости в мышцах ног, шеи и плеч с пубертатного возраста. Умеренные нейрокогнитивные нарушения были выявлены при обследовании: когнитивный тест MMSE (Mini-Mental State Examination) составил 15 баллов (11–19 – деменция умеренной степени; 20–23 – легкая деменция).

При эхокардиографии выявлена гипертрофия левого желудочка (ЛЖ) в сочетании с выраженной систолической дисфункцией. Толщина стенок ЛЖ составила 17–27 мм (норма 11–14 мм). Наблюдалось расширение полости левого желудочка, величина фракции выброса составляла 38 %. Отмечалось трабекулярное строение верхушки левого желудочка. По данным ЭКГ выявлена полная блокада левой ножки пучка Гиса, трепетание предсердий.

У пациента обнаружены неспецифические выраженные отклонения в лабораторных показателях: повышение уровня тропонина I (0,46 нг/мл) и лактатдегидрогеназы (1343 Е/л), отражающие повреждение кардиомиоцитов вследствие массивной гипертрофии. Уровень креатинфосфокиназы (1553 U/L) **был на порядок выше нормы, что также свидетельствует о поражении мышечных волокон.** Отмечались также проявления цитолиза гепатоцитов: повышение уровня аспарагинтрансферазы до 359 Е/л и аланинаминотрансферазы до 294 Е/л. Концентрация мозгового натрийуретического пептида составила 1795 пг/ммоль (норма 0–50 пг/ммоль), что свидетельствует о чрезмерном растяжении кардиомиоцитов.

Пациенту имплантировали кардиоресинхронизирующее устройство и провели медикаментозную базовую терапию сердечной недостаточности. На амбулаторном этапе на фоне продолжающейся стандартной фармакотерапии отмечалось улучшение клинических, гемодинамических и лабораторных показателей.

Генетические исследования. У пациента было получено письменное информированное согласие на проведение молекулярно-генетического исследования образцов биологического материала и разрешение на анонимную публикацию результатов. Биологическим материалом послужили буккальные эпителиоциты ротовой полости, предоставленные РНПЦ «Кардиология». Выделение ДНК осуществлялось феном-хлоромным методом с использованием протеинкиназы K по стандартному протоколу.

Геномная ДНК была использована для targeted Next-Generation Sequencing (tNGS) на приборе MiSeq System (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). Секвенирование было выполнено с помощью коммерческой панели TruSight Cardiomyopathy Sequencing panel (Illumina Inc., San Diego, CA, USA), охватывающей 46 генов, изменения в которых приводят к развитию кардиомиопатий различного генеза. Для анализа доступны 1020 экзонов и прилегающие к ним интронные области длиной около 50 п. н., 3'- и 5'-UTR регионы. Суммарно панель покрывает 246000 п. н. генома человека.

Метод прямого секвенирования по Сэнгеру был использован для проверки вариантов, идентифицированных при tNGS и отвечающих требованиям патогенных мутаций – MAF < 1 % (Minor Allele Frequency). Праймеры были разработаны с помощью NCBI/Primer-BLAST [9]. Секвенирование выполнено с использованием Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing kit согласно протоколу производителя на приборе 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

Биоинформатические ресурсы. Обработка данных tNGS была выполнена с помощью доступных web-ресурсов. Оценка качества «сырых» данных FASTQ-формата проводилась с помощью программы FASTQC [10] и IGV-браузера (Integrative Genomic Viewer) [11]. Данные прочтения были картированы с помощью BWA (Burrows-Wheeler Aligner) с генерацией BAM-файла [12]. В качестве референсного генома был использован NCBI build37 (UCSC hg19). Первичное аннотирование осуществлялось ресурсами SAMtools v.1.18 (Sequence Alignment/Map) и GATK v3.2/2 (Genome Analysis Toolkit) с образованием «сырого» VCF-файла [13; 14]. Дальнейшее аннотирование вариантов было выполнено в программе ANNOVAR [15] с использованием частотных

данных 1000 Genomes Project, Exome Aggregation Consortium (ExAC), Exome sequencing project, а также информации по клиническим проявлениям вариантов в ClinVar database [16].

Для предсказания изменения процессинга пре-мРНК *in silico* были использованы предикторы MaxEntScan, Human Splice Finder, SplicePort, Splice Site Prediction by Neural Network (NNSplice version 0.9), NetGene2 [17–21].

Результаты и их обсуждение. По результатам tNGS у пациента было идентифицировано 173 отличия от референсной последовательности. Среди них синонимичные и несинонимичные замены, сплайсинг-мутации и малые инсерции/делеции (рис. 1). Подробный анализ вариантов, приводящих к несинонимичным заменам в белке, не выявил какой-либо патогенной мутации. Единственный вариант с.G10966A в гене титина (TTN: экзон 47, p.A3656T, rs72648923, NM_133378), прошедший все фильтры, был интерпретирован как «benign» в базе данных ClinVar. В целом его частота встречаемости в мировой популяции человека низка (MAF < 1 %). Однако по данным браузера ExAC эта замена встречается у 1,5 % финнов. Дополнительным основанием для исключения этого варианта как мутации, вызвавшей развитие патологии у нашего пациента, стало описание в базе данных OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) заболеваний, ассоциированных с мутациями в гене титина [22]. Их фенотипическое проявление не совпадало с клиническими данными пациента.

С целью обнаружения сплайсинг-мутаций был проведен подробный анализ синонимичных вариантов в экзонах, малых инсерций/делеций и точковых замен в интронах. Это позволило идентифицировать делецию четырех нуклеотидов в интроне 6 гена LAMP2 – с.864+3_864+6delGAGT (rs397516751, NM_002294.2). На рис. 2 представлены результаты выравнивания прочтений в районе экзона 6 этого гена в IGV браузере. Обращает на себя внимание, что делеция детектируется в прочтениях прямого и обратного направлений и выглядит как гомозигота, вследствие наличия у мужчин одной X-хромосомы. По данным базы ClinVar этот вариант является патогенным и ассоциирован с развитием болезни Данона. Мутация была верифицирована методом прямого секвенирования по Сэнгеру (рис. 3).



Рис. 1. Последовательность шагов в анализе данных tNGS для определения потенциальных мутаций. Клиническое проявление оценивалось с помощью ClinVar и OMIM

Fig. 1. Order of steps in the analysis of the tNGS data for potential mutations. The clinical manifestation was evaluated by ClinVar and OMIM

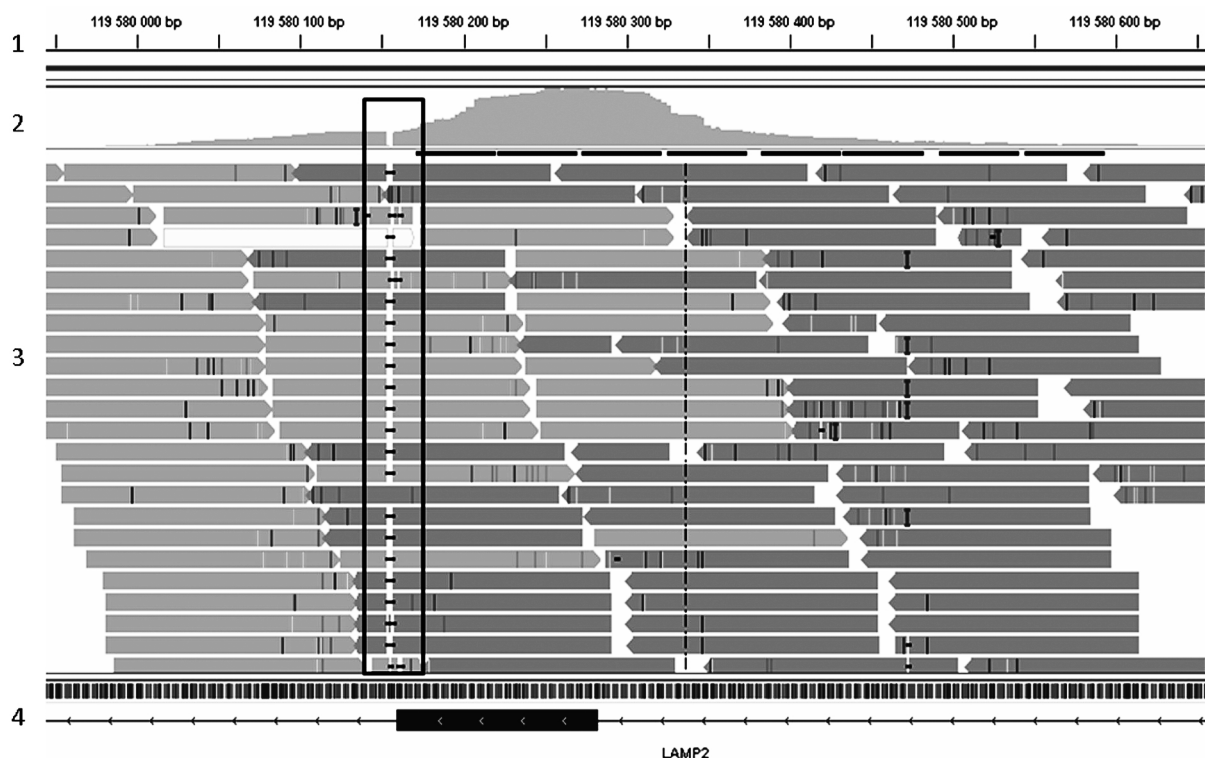


Рис. 2. Результаты tNGS в области экзона 6 и прилегающих интронов: 1 – порядковый номер нуклеотидов в геноме человека hg19; 2 – диаграмма покрытия; 3 – выравнивание прочтений на референсную последовательность гена LAMP2 человека. Направления прочтений обозначены стрелками; 4 – структура гена LAMP2, темным прямоугольником обозначен экзон 6. Рамкой обведена область делеции GAGT (rs397516751, NM_002294.2)

Fig. 2. The tNGS results in exon 6 and adjacent introns: 1 – nucleotide position in the human genome hg19; 2 – diagram; 3 – alignment of the reads to the LAMP2 reference sequence. The directions of reads are shown by the covering arrowed ends; 4 – LAMP2 gene structure, the dark rectangle shows exon 6. The GAGT deletion region (rs397516751, NM_002294.2) is enclosed in the frame

Делеция находится в районе стыка экзона 6 и интрона 6 и затрагивает 3-й, 4-й, 5-й и 6-й нуклеотиды в интронной последовательности. В этом регионе локализуется естественный донорный сайт сплайсинга. Такая делеция с большой вероятностью приведет к ликвидации донорного мотива. Чтобы понять, каким образом это отразится на сплайсинге пре-мРНК, и какой именно будет синтезирован белок, необходимо проводить исследования РНК, выделенной из пораженной ткани.

На сегодняшний день существует множество специализированных программ, которые позволяют с некоторой долей вероятности делать прогноз изменения сайтов сплайсинга и их использования в процессинге пре-мРНК. Среди них Splice Site Prediction by Neural Network (NNSplice), SplicePort, Human Splice Finder (HSF), NetGene2, MaxEntScan. С помощью перечисленных предикторов был проведен анализ того, какой эффект может оказать мутация с.864+3_864+6delGAGT на процесс сплайсинга пре-мРНК^{LAMP2}.

Все использованные предикторы идентифицировали один и тот же мотив в качестве естественного донорного сайта сплайсинга, присваивая ему высокую оценку (таблица). Изменение нуклеотидной последовательности в этой области в следствие делетирования 4 п. н. приводит к «поломке» сайта, что предсказано *in silico*. Ближайшие «сильные» донорные сайты, которые могут быть использованы в сплайсинге, были предложены HSF и MaxEntScan. Однако результаты этих предикторов отличались. Так HSF в качестве альтернативного приводит сайт, расположенный в позиции +19 от 5'-конца экзона 6. Это означает, что длина экзона увеличится на 19 нуклеотидов и приведет к сдвигу рамки считывания. Такой же эффект, но более длинный транскрипт, возникнет при использовании альтернативного сайта, находящегося на расстоянии +80, предсказанного MaxEntScan.

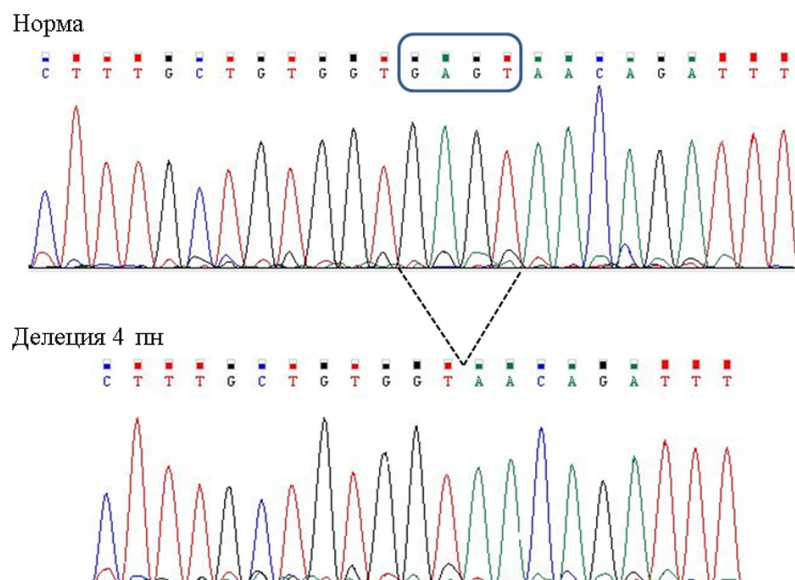


Рис. 3. Детекция делеции с.864+3_864+6delGAGT в гене LAMP2 методом прямого секвенирования
 Fig. 3. Detection of the deletion c.864+3_864+6delGAGT in the LAMP2 gene by the direct sequencing

Оценка естественного донорного сайта экзона 6 гена LAMP2 и его изменение при мутации с.864+3_864+6delGAGT

Estimation of natural donor site of exon 6 of the LAMP2 gene and its alteration as a result of c.864+3_864+6delGAGT

Предиктор (шкала оценки) Predictor (rating scale)	Референсный мотив Reference motive	Позиция в кДНК Position in cDNA	Оценка Estimate	Мутантный мотив Mutant motive	Оценка Estimate	Наличие альтернативного донорного сайта Presence of alternative donor site
HSF (0–100)	GTGgtgagt	121	92,17	GTGgtaaca	77,94	Ближайший сайт (оценка 81,51) в позиции +19
MaxEntScan (0–12)	GTGgtgagt	121	8,95	GTGgtaaca	3,31	Ближайший сайт (оценка 3,64) в позиции +80
SplicePort (–10–10)	ctgtggtgagta	120	1,05	ctgtggtaacag	0,038	Альтернативные сайты «слабее» мутантного
NetGene2 (0–1)	GCTGTG^GTGAGTA	120	0,83	broken	–	Альтернативного сайта не приводит
NNSplice (0–1)	tgctgtggtgagtaa	114–128	0,98	broken	–	Альтернативного сайта не приводит

Сервисы NNSplice и NetGene2 не приводят никаких альтернативных донорных мотивов и, в случае делеции, изменение длины транскрипта предсказать невозможно. Следует отметить, что результаты, полученные с помощью предикторов, являются теоретическими. Не исключено образование иных вариантов транскриптов, детекцию которых необходимо проводить экспериментальными методами. Так, в работе Cetin и соавт. (2016) методом RNA-секвенирования был проведен анализ транскриптов гена LAMP2, несущего сплайсинг-мутацию с.65-2A>G в интроне 1 [23]. Было показано существование четырех типов транскриптов, среди которых три разных делетированных варианта и полноразмерная мРНК^{LAMP2}. Делетированные варианты включали: транскрипты с делецией во 2-м экзоне, приводящей к сдвигу рамки считывания и образованию преждевременного стоп-кодона; транскрипты, в которых полностью отсутствовал 2-й экзон; транскрипты с делецией экзонов 1 и 2. Кроме того, некоторые варианты оказались тканеспецифичными. Полноразмерный транскрипт был обнаружен в скелетных мышцах, но не в лейкоцитах крови. Несмотря на крупные изменения в структуре мРНК^{LAMP2}, их клинические проявления

авторы относят к мягкой форме болезни Данона, предполагая, что это связано с синтезом полно-размерного транскрипта в мышечной ткани, хоть и в малом количестве. На его долю приходилось лишь 5,1 % от всех мРНК^{LAMP2} [23].

Сколько типов транскриптов будет детектировано в дальнейших молекулярно-генетических исследованиях в тканях пациента М., предсказать трудно. Также сложно предвидеть течение заболевания. Болезнь Данона может протекать бессимптомно до пубертатного возраста, далее происходит стремительное развитие и прогрессирование признаков с высокой смертностью, возникающей внезапно.

Заключение. Несмотря на типичную триаду признаков болезни Данона у пациента М. в виде кардиомиопатии, скелетной миопатии (периферические мышечные нарушения) и отставания в умственном развитии, метаболическая причина гипертрофии миокарда была не распознана. Диагноз ГКМП с исходом в дилатационную стадию оставался предварительным и заключительным клиническим диагнозом до проведения молекулярно-генетического исследования. Методом tNGS, охватывающим 46 генов, ассоциированных с развитием кардиомиопатий различного генеза, был обнаружен дефект в гене LAMP2 и скорректирован диагноз. Гемизиготная сплайсинг-мутация c.864+3_864+6delGAGT ассоциирована с накоплением гликогена – болезнью Данона. Очевидна необходимость наиболее ранней постановки правильного диагноза у таких пациентов для своевременного принятия мер, направленных на замедление прогрессирования заболевания. К сожалению, прогноз неблагоприятный, при развитии дилатации левого желудочка и систолической дисфункции необходима трансплантация сердца.

Список использованных источников

1. Danon's disease as a cause of hypertrophic cardiomyopathy: a systematic survey / P. Charron [et al.] // *Heart*. – 2004. – Vol. 90, N 8. – P. 842–846. doi.org/10.1136/hrt.2003.029504
2. Boucek, D. Natural history of Danon disease / D. Boucek, J. Jirikowic, M. Taylor // *Genet. Med.* – 2011. – Vol. 13, N 6. – P. 563–568. doi.org/10.1097/gim.0b013e31820ad795
3. Lysosomal glycogen storage disease with normal acid maltase / M. J. Danon [et al.] // *Neurology*. – 1981. – Vol. 31, N 1. – P. 51–57. doi.org/10.1212/wnl.31.1.51
4. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice / Y. Tanaka [et al.] // *Nature*. – 2000. – Vol. 406, N 6798. – P. 902–906. doi.org/10.1038/35022595
5. Clinicopathological features of genetically confirmed Danon disease / K. Sugie [et al.] // *Neurology*. – 2002. – Vol. 58, N 12. – P. 1773–1778. doi.org/10.1212/wnl.58.12.1773
6. Clinical Outcome and Phenotypic Expression in LAMP2 Cardiomyopathy / B. J. Maron [et al.] // *JAMA*. – 2009. – Vol. 301, N 12. – P. 1253–1259. doi.org/10.1001/jama.2009.371
7. Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease) / I. Nishino [et al.] // *Nature*. – 2000. – Vol. 406, N 6798. – P. 906–910. doi.org/10.1038/35022604
8. A novel LAMP2 mutation associated with severe cardiac hypertrophy and microvascular remodeling in a female with Danon disease: a case report and literature review / I. Bottillo [et al.] // *Cardiovasc. Pathol.* – 2016. – Vol. 25, N 5. – P. 423–431. doi.org/10.1016/j.carpath.2016.07.005
9. NCBI/Primer-BLAST [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>. – Date of access: 15.12.2016.
10. FASTQC [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. – Date of access: 20.01.2017.
11. IGV [Electronic resource]. – Mode of access: <http://software.broadinstitute.org/software/igv/home>. – Date of access: 20.01.2017.
12. BWA [Electronic resource]. – Mode of access: <https://sourceforge.net/projects/bio-bwa/>. – Date of access: 21.01.2017.
13. SAMtools v.1.18 [Electronic resource]. – Mode of access: <http://samtools.sourceforge.net/>. – Date of access: 22.01.2017.
14. GATK v3.2/2 [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.broadinstitute.org/gatk/index.php>. – Date of access: 22.01.2017.
15. ANNOVAR [Electronic resource]. – Mode of access: <http://annovar.openbioinformatics.org/en/latest/>. – Date of access: 25.01.2017.
16. ClinVar [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>. – Date of access: 01.02.2017.
17. HSF [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.umd.be/HSF3/HSF.html>. – Date of access: 01.02.2017.
18. MaxEntScan [Electronic resource]. – Mode of access: http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html. – Date of access: 01.02.2017.
19. NetGene2 [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>. – Date of access: 01.02.2017.

20. NNSplice [Electronic resource]. – Mode of access: http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html. – Date of access: 01.02.2017.
21. SplicePort [Electronic resource]. – Mode of access: <http://spliceport.cbc.umd.edu/>. – Date of access: 01.02.2017.
22. OMIM [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.omim.org/>. – Date of access: 01.02.2017.
23. The c.65-2A/G splice site mutation is associated with a mild phenotype in Danon disease due to the transcription of normal LAMP2 mRNA / H. Cetin [et al.] // *Clin. Genet.* – 2016. – Vol. 90, N 4. – P. 366–371. doi.org/10.1111/cge.12724

References

1. Charron P., Villard E., Sébillon P., Laforêt P., Maisonobe T., Duboscq-Bidot L., Romero N., Drouin-Garraud V., Frébourg T., Richard P., Eymard B., Komajda M. Danon's disease as a cause of hypertrophic cardiomyopathy: a systematic survey. *Heart*, 2004, vol. 90, no. 8, pp. 842–846. doi.org/10.1136/hrt.2003.029504
2. Boucek D., Jirikowic J., Taylor M. Natural history of Danon disease. *Genetics in Medicine*, 2011, vol. 13, no. 6, pp. 563–568. doi.org/10.1097/gim.0b013e31820ad795
3. Danon M. J., Oh S. J., DiMauro S., Manaligod J. R., Eastwood A., Naidu S., Schliselfeld L. H. Lysosomal glycogen storage disease with normal acid maltase. *Neurology*, 1981, vol. 31, no. 1, pp. 51–57. doi.org/10.1212/wnl.31.1.51
4. Tanaka Y., Guhde G., Suter A., Eskelinen E.-L., Hartmann D., Lüllmann-Rauch R., Janssen P. M. L., Blanz J., von Figura K., Saftig P. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature*, 2000, vol. 406, no. 6798, pp. 902–906. doi.org/10.1038/35022595
5. Sugie K., Yamamoto A., Murayama K., Oh S. J., Takahashi M., Mora M., Riggs J. E., Colomer J., Iturriaga C., Meloni A., Lamperti C., Saitoh S., Byrne E., DiMauro S., Nonaka I., Hirano M., Nishino I. Clinicopathological features of genetically confirmed Danon disease. *Neurology*, 2002, vol. 58, no. 12, pp. 1773–1778. doi.org/10.1212/wnl.58.12.1773
6. Maron B. J., Roberts W. C., Arad M., Haas T. S., Spirito P., Wright G. B., Almquist A. K., Baffa J. M., Saul J. P., Ho C. Y., Seidman J., Seidman C. E. Clinical Outcome and Phenotypic Expression in LAMP2 Cardiomyopathy. *JAMA*, 2009, vol. 301, no. 12, pp. 1253–1259. doi.org/10.1001/jama.2009.371
7. Nishino I., Fu J., Tanji K., Yamada T., Shimojo S., Koori T., Mora M., Riggs J. E., Oh S. J., Koga Y., Sue C. M., Yamamoto A., Murakami N., Shanske S., Byrne E., Bonilla E., Nonaka I., DiMauro S., Hirano M. Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature*, 2000, vol. 406, no. 6798, pp. 906–910. doi.org/10.1038/35022604
8. Bottillo I., Giordano C., Cerbelli B., D'Angelantonio D., Lipari M., Polidori T., Majore S., Bertini E., D'Amico A., Giannarelli D., de Bernardo C., Masuelli L., Musumeci F., Avella A., Re F., Zachara E., d'Amati G., Grammatico P. A novel LAMP2 mutation associated with severe cardiac hypertrophy and microvascular remodeling in a female with Danon disease: a case report and literature review. *Cardiovascular Pathology*, 2016, vol. 25, no. 5, pp. 423–431. doi.org/10.1016/j.carpath.2016.07.005
9. NCBI/Primer-BLAST. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast> (accessed 15 December 2016).
10. FASTQC. Available at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (accessed 20 January 2017).
11. IGV. Available at: <http://software.broadinstitute.org/software/igv/home> (accessed 20 January 2017).
12. BWA. Available at: <https://sourceforge.net/projects/bio-bwa/> (accessed 21 January 2017).
13. SAMtool v.1.18. Available at: <http://samtools.sourceforge.net/> (accessed 22 January 2017).
14. GATK v3.2/2. Available at: <https://www.broadinstitute.org/gatk/index.php> (accessed 22 January 2017).
15. ANNOVAR. Available at: <http://annovar.openbioinformatics.org/en/latest/> (accessed 25 January 2017).
16. ClinVar. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/> (accessed 1 February 2017).
17. HSF. Available at: <http://www.umd.be/HSF3/HSF.html> (accessed 1 February 2017).
18. MaxEntScan. Available at: http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html (accessed 1 February 2017).
19. NetGene2. Available at: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/> (accessed 1 February 2017).
20. NNSplice. Available at: http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html (accessed 1 February 2017).
21. SplicePort. Available at: <http://spliceport.cbc.umd.edu/> (accessed 1 February 2017).
22. OMIM. Available at: <https://www.omim.org/> (accessed 1 February 2017).
23. Cetin H., Wöhrer A., Rittelmeyer I., Gencik M., Zulehner G., Zimprich F., Ströbel T., Zimprich A. The c.65-2A/G splice site mutation is associated with a mild phenotype in Danon disease due to the transcription of normal LAMP2 mRNA. *Clinical Genetics*, 2016, vol. 90, no. 4, pp. 366–371. doi.org/10.1111/cge.12724

Информация об авторах

Сивицкая Лариса Николаевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: silarissa@yandex.ru.

Даниленко Нина Генусовна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: cytoplasmic@mail.ru.

Information about the authors

Sivitskaya Larisa Nikolaevna – Ph. D. (Biology), Senior researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: silarissa@yandex.ru.

Danilenko Nina Genusovna – Ph. D. (Biology), Leading researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: cytoplasmic@mail.ru.

Вайханская Татьяна Геннадьевна – канд. мед. наук, вед. науч. сотрудник. РНПЦ «Кардиология» (ул. Р. Люксембург, 110, 220036, Минск, Республика Беларусь). E-mail: tat_vaikh@mail.ru.

Левданский Олег Дмитриевич – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: cytoplasmic@mail.ru.

Давыденко Олег Георгиевич – член-корреспондент, д-р биол. наук, заведующий лабораторией. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: davydenko@tut.by.

Для цитирования

Диагностика болезни Данона методом targeted next-generation sequencing: идентификация мутации в гене LAMP2 / Л. Н. Сивицкая [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2017. – Т. 61, № 3. – С. 64–72.

Vaikhanskaya Tatiana Gennadievna – Ph. D. (Medicine), Leading researcher. Republican Scientific and Practical Center of Cardiology (110, R. Luxemburg Str., 220036, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tat_vaikh@mail.ru.

Liaundanski Aleh Dmitrievich – Ph. D. (Biology), Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: cytoplasmic@mail.ru.

Davydenko Oleg Georgievich – Corresponding Member, D. Sc. (Biology), Head of the Laboratory. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: davydenko@tut.by.

For citation

Sivitskaya L. N., Danilenko N. G., Vaikhanskaya T. G., Levdanskiy O. D., Davydenko O. G. Danon disease diagnosis by targeted next-generation sequencing: identification of LAMP2 mutations. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi* [Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus], 2017, vol. 61, no. 3, pp. 64–72 (in Russian).