

Высокопроизводительные технологии мутационного скрининга при нейродегенеративных заболеваниях: опыт таргетного секвенирования

Н.Ю. Абрамычева, А.С. Ветчинова, Е.Ю. Федотова, С.А. Ключников, Я.И. Алексеев, С.Н. Иллариошкин

Научный центр неврологии, ЗАО «Синтол» (Москва)

Неврология является тем разделом клинической медицины, который наиболее ярко демонстрирует как существующие проблемы в оценке взаимоотношений между генотипом и фенотипом, так и современные возможности молекулярной генетики, и ее место в диагностическом поиске.

Сложности в генетической систематизации неврологической патологии обусловлены рядом факторов. Так, для наследственных заболеваний нервной системы характерен исключительно выраженный меж- и внутрисемейный фенотипический полиморфизм. Он проявляется развитием самых разнообразных, нередко весьма отличающихся друг от друга неврологических синдромов в рамках одной нозологической формы, в том числе даже у разных членов одной семьи. Варибельная экспрессивность мутантных генов может приводить как к манифестации развернутых клинических форм болезни, так и к развитию атипичных ее вариантов, а также «стертых» или «фрустрированных» форм (*forme fruste*). Для многих моногенных неврологических заболеваний (таких, например, как миотоническая дистрофия, ряд форм наследственных атаксий, торсионная дистония и др.) полиморфизм клинических проявлений и развитие разнообразных атипичных и «стертых» форм скорее правило, чем исключение, что значительно осложняет систематизацию изучаемых клинических синдромов. Кроме того, полиморфизму клинических проявлений нередко сопутствует значительный полиморфизм морфологической картины наследственных болезней нервной системы, отражающий в первую очередь варибельный характер и тяжесть мутаций у конкретных больных. При ряде заболеваний строгая корреляция между клиническими и морфологическими признаками может отсутствовать [1–5]. Можно добавить, что до настоящего времени патогенез большого числа форм наследственных неврологических заболеваний изучен в недостаточной степени, в связи с чем отсутствуют какие-либо биохимические и другие специфические лабораторно-инструментальные маркеры, позволяющие провести четкие нозологические границы среди многообразия сходных клинических синдромов.

Диагностика предрасположенности к развитию того или иного дегенеративного заболевания мозга является первостепенной задачей нейрогенетики на ближайшее время, так как на доклинической стадии при ряде заболеваний уже сегодня возможно проведение профилактических мероприятий, предотвращающих или замедляющих развитие патологического процесса [6, 7].

При наличии внушительного генетического разнообразия заболеваний нервной системы (наиболее яркие примеры такой гетерогенности представлены в таблице 1) молекулярно-генетическая диагностика уже не может, как это было ранее, базироваться на простом последовательном скрининге доступных для анализа генов – в этом случае поиск мутаций может оказаться слишком длительным и необоснованно дорогостоящим процессом. В настоящее время принципиальным является создание специальных диагностических алгоритмов, базирующихся на современных молекулярно-генетических технологиях, позволяющих значительно сузить рамки поиска молекулярного дефекта, и сделать такой поиск разумным с точки зрения трудозатрат и экономической целесообразности [8, 9].

Таблица 1. Генетическая гетерогенность нейродегенеративных заболеваний.

Заболевания	Число генов
Наследственные спастические параличи	78
Наследственные невропатии	>50
Аутосомно-доминантные атаксии	43
Аутосомно-рецессивные атаксии	>60
Первичные дистонии	23
Болезнь Паркинсона	20
Нейродегенерации с накоплением железа в головном мозге	6
Формы первичной хорей	6

Квалифицированный клинико-генеалогический и лабораторно-инструментальный анализ конкретного синдрома, учет генных частот и особенностей мутационного спектра в популяции – основные принципы для внедрения практических алгоритмов ДНК-диагностики.

ДНК-диагностика, являясь одним из важнейших инструментов молекулярной медицины и наиболее объективным методом верификации наследственных заболеваний базируется на новейших современных точных и высокопроизводительных технологиях. За последние годы сделан серьезный прорыв в развитии методов детекции мутаций, связанный с появлением так называемых мультиплексных молекулярно-генетических методов, таких как ПЦР в режиме «реальном

времени» (ПЦР-РВ), ПЦР-РВ с плавлением аплифицированных продуктов, мультиплексная лигазная реакция с амплификацией (MLPA), анализ длин флуоресцентно-меченных фрагментов ДНК и т.д. Качественно новый этап в молекулярной идентификации нейродегенеративных заболеваний связан с внедрением технологий *секвенирования следующего поколения* (*Next Generation Sequencing, NGS*) [10–13].

Существует три основных стратегии применения технологии NGS на практике:

- панельное секвенирование;
- полноэкзомное секвенирование;
- полногеномное секвенирование.

Панельное секвенирование – это NGS-анализ генов, собранных в мультигенные панели. При чрезвычайно высокой гетерогенности основных групп неврологических синдромов и значительном перекрытии клинических проявлений десятков генетических форм в рамках одной группы удачным решением проблемы является параллельное секвенирование всех известных генов, имеющих отношение именно к исследуемому фенотипу – паркинсонизму, атаксии, деменции и т.п. Таким образом, панельное секвенирование является целенаправленной, адресной разновидностью NGS и представляет собой пример таргетного генетического анализа.

Полноэкзомное секвенирование – определение нуклеотидного состава экзома, т.е. совокупности экзонов (кодирующих областей ДНК) конкретного индивидуума. Полноэкзомное исследование весьма привлекательно с клинических позиций: метод не ограничен каким-либо мультигенным набором и способен обеспечить информативное секвенирование кодирующей части большинства из 22 000 известных генов человека, однако на сегодняшний день он все еще дорогостоящий.

Полногеномное секвенирование является наиболее затратным и предполагает определение всех нуклеотидных последовательностей в кодирующих и некодирующих областях. Его очевидное преимущество заключается в возможности обнаружения мутаций в промоторах, энхансерах, интронах, т.е. в тех регуляторных и вспомогательных участках гена, которые обычно выпадают из поля зрения специалистов, занимающихся практической ДНК-диагностикой.

Использование той или иной методики зависит от эффективности и оптимальности их применения в каждом конкретном случае.

Обобщение опыта многих ведущих центров мира, а также нашего собственного опыта, позволяет предложить для использования в неврологии определенный исследовательский алгоритм. На первом этапе в результате детального клинического и лабораторно-инструментального обследования, дополняемого семейными данными, должно быть четко сформулировано предположение о генетической природе болезни у пациента. В ряде случаев такое предположение высказывается после исключения всех возможных приобретенных причин синдрома. Далее при диагностически ясном фенотипе, позволяющем заподозрить конкретное заболевание или группу близких заболеваний, а также при указании на наличие известного заболевания в семейном анамнезе, целесообразно применить один из доступных методов мультиплексного мутационного анализа: ПЦР-РВ, ПЦР-РВ с плавлением аплифицированных продуктов, MLPA и др., либо непосредственно секвенировать один или несколько наиболее значимых генов-кандидатов.

Так, например, при клинической картине болезни Паркинсона на первом этапе целесообразно провести мутационный скрининг методом MLPA генов *SNCA*, *PARK2*, *PINK1*, *DJ-1*, *ATP13A2* на наличие крупных делеций и инсерций, а также гена *LRRK2* на наличие мажорной миссенс-мутации *G2019S*. Геном «выбора» для дальнейшего исследования является ген *GBA*, который, имеет наибольшую частоту встречаемости при БП – 17,7% случаев [14]. Если фенотип может быть обусловлен экспансией микросателлитных повторов (спиноцеребеллярные атаксии, хорей и др.), приоритетным становится анализ наиболее частых «динамических» мутаций, не диагностируемых с помощью NGS. Практика показывает, что уже на этой стадии выявляется значительная часть искомых генных повреждений. Например, при атактических синдромах первоначально имеет смысл исследовать полиглутамин-кодирующие гены *ATXN1*, *ATXN2*, *ATXN3*, *CACNL1A4* и *ATXN7*, а также ген болезни Фридрейха *FXN* и ген *FMRI*, наличие динамических мутаций в которых в совокупности обуславливают 40–50% всех случаев генетических атаксий. У пациентов с атипичным паркинсонизмом и лобно-височными деменциями ценным является исследование числа копий гексануклеотидных повторов в гене *C9orf72*.

При отрицательном результате стандартного генетического тестирования или при обследовании пациентов из сложных гетерогенных групп целесообразно провести NGS-анализ с использованием подходящей таргетной мультигенной панели, что особенно продуктивно в тех случаях, когда генетическая гетерогенность синдрома чрезвычайно велика и в изучаемой группе заболеваний нет каких-либо четких корреляций между генотипом и фенотипом (отсутствие ориентиров для выбора предпочтительных генов-кандидатов).

При обследовании пациентов с неясными, неспецифическими фенотипами, предположительно обусловленными генетикой, целесообразно прямое обращение к полноэкзомному и полногеномному анализу. Так, наличие умственной отсталости может быть ассоциировано примерно с 1000 генами, что однозначно требует применения полноформатных NGS-технологий. Полноэкзомный и полногеномный анализ может быть рекомендован и при отрицательных результатах проведенного панельного секвенирования.

С 2015 года в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» Научным центром неврологии совместно с компанией «Синтол» проводилась разработка оригинальной диагностической таргетной NGS-панели (платформа Illumina MiSeq) для ранней диагностики и профилактики нейродегенеративных заболеваний. Панель направлена на секвенирование кодирующей области 300 генов социально значимых возраст-зависимых патологий ЦНС, проявляющихся двигательными и когнитивными расстройствами, в том числе: спиноцеребеллярные атаксии – 136 генов; спастические параличи – 43 гена; деменции – 23 гена; лейкодистрофии и лейкоэнцефалопатии – 22 гена; паркинсонизм – 20 генов; боковой амио-

трофический склероз – 20 генов; дистонии – 16 генов; нейродегенерации с накоплением железа в мозге – 6 генов; хорья – 6 генов; эссенциальный тремор – 4 гена; болезнь Фара – 3 гена; гепатоленгикулярная дегенерация – 1 ген.

В настоящее время проведен мутационный скрининг для 59 пациентов, наблюдавшихся в Научном центре неврологии. В группу исследования вошли пациенты с различной нейродегенеративной патологией, у которых не были определены мутации с помощью других (традиционных) молекулярно-генетических методов. При включении пациентов в первую выборку учитывались следующие аспекты: 1) фенотип с крайне выраженной генетической гетерогенностью (например, атаксия дегенеративного генеза); 2) фенотип, который не укладывался в типичные клинические формы нейродегенеративной патологии (т.е. имевший определенные особенности или сочетавший в себе несколько синдромов); 3) фенотип, подразумевающий конкретные гены, которые при этом являются либо достаточно протяженными для рутинной диагностики, либо редкими (т.е. с неразработанными молекулярно-генетическими протоколами исследования); 4) предпочтение отдавалось семейным случаям – для последующего сравнительного анализа пробанда и его здоровых/больных родственников.

Образцы геномной ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с помощью набора для выделения Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega USA).

Предварительно для всех пациентов с помощью стандартных генетических тестов, существующих в нашем центре, были исключены возможные генетические нарушения, приводящие к конкретному неврологическому синдрому. Так при атактических и хорейческих синдромах с помощью фрагментного анализа исключались «динамические» мутации – наличие экспансии микросателлитных повторов в генах *ATXN1*, *ATXN2*, *ATXN3*, *CACNL1A4*, *ATXN7*, *FXN*, *HTT*, *DRPLA*, *JPH3* и *TBP*. У пациентов с деменциями исключалось наличие экспансии гексануклеотидных повторов в гене *C9orf72*. С помощью молекулярно-генетических тестов на основе метода ПЦР-РВ исключалось наличие следующих мутаций: GAG-делеции в гене *TOR1A* при дистонии (тип DYT1); мажорной мутации *H1069Q* в гене *ATP7B* при возможности диагностики гепатоленгикулярной дегенерации; мажорных мутаций *N370S* и *L444P* в гене *GBA* и *G2019S* в гене *LRRK2* при клинических проявлениях паркинсонизма. С помощью технологии MLPA проводился мутационный скрининг генов *PINK1*, *SNCA*, *ATP13A2*, *LRRK2*, *PARK2* и *PARK7* на наличие крупных делеций и дупликаций при паркинсонизме.

Таргетное секвенирование на основе NGS проводили на базе ЦКП «Биотехнология» ВНИИ Сельхозбиотехнологий. Фрагментацию образцов ДНК проводили методом ультразвукового воздействия с использованием системы фрагментации Covaris S220 System, в объеме 52,5 мкл ТЕ-буфера (10 мМ Трис-НСl рН 8,0, 1 мМ ЭДТА) на фрагменты со средним размером 180–220 п.о. Библиотеки готовили с использованием набора KAPA Library Preparation Kit (Roche, Швейцария). Обогащение библиотеки ДНК проводили по технологии SeqCap EZ Library SR с помощью специфических биотинилированных олигонуклеотидных зондов, комплементарных последовательностям кодирующих областей генов, входящих в нашу панель. Секвенирование полученных библиотек ДНК проводили на секвенаторе MiSeq (Illumina), с использованием набора реагентов для секвенирования MiSeq® Reagent Kit v3, 150 циклов. Последовательности адаптеров, нуклеотиды с качеством ниже q20, N-нуклеотиды были удалены из полученных прочтений с помощью программного обеспечения Trimmomatic 0.33. Последовательности картировали на геном человека (GRCh38) с использованием программного обеспечения bowtie2 [15], в среднем 98% прочтений были картированы успешно. Поиск вариантов осуществляли с помощью программы GATK 3.1., а их аннотацию – с помощью онлайн-ресурса wANNOVAR [16]. При оценке патогенности выявленных вариантов использовали следующие базы данных: Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>), dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), OMIM (<http://www.omim.org/>), ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).

Все положительные находки подтверждались методом капиллярного секвенирования на генетическом анализаторе НАНОФОР 05 (ИАП РАН, Санкт-Петербург). Ближайшие родственники пробандов, в случае доступности, также обследовались на наличие найденных, подтвержденных мутаций.

В результате применения разработанной генетической панели для мутационного скрининга нейродегенеративных заболеваний нами были выявлены патогенные мутации в 19 случаях (5 аутосомно-рецессивных и 14 аутосомно-доминантных форм патологии), что составило 32% выявляемости (таблица 2).

№	Клинический синдром	Ген	Мутация	Кол-во копий	Диагноз
1	спастический парез нижних конечностей	SPAST	T541N	гет.	Наследственная спастическая параплегии типа 4 (SPG4)
2	синдромом нижней спастической параплегии	DDHD1	G112_ S113insGG	гом.	Наследственная спастическая параплегия типа 28 (SPG28)
3	атаксия, дистония, когнитивные нарушения	NPC1	Q119X G992R	гет.	Болезнь Ниманна–Пика типа С
4	атаксия	SPTBN2	R1880H	гет.	Спиноцеребеллярная атаксия типа 5 (SCA5)
5	деменция	GRN	N33Q	гет.	Лобно-височная деменция
6	деменция	GRN	C315fs	гет.	Лобно-височная деменция
7	дистония	GCH1	S139fs	гет.	Дофа-чувствительная дистония (DYT5)
8	паркинсонизм	LRRK2	R1398H	гет.	Болезнь Паркинсона (PARK8)

9	паркинсонизм	LRRK2	R1398H	гет.	Болезнь Паркинсона (PARK8)
10	ранний паркинсонизм	PINK1	A103f L519fs	гет. гет.	Болезнь Паркинсона (PARK8)
11	лейкоэнцефало-патия	NOTCH3	H1133Q	гет.	ЦАДАСИЛ
12	афазия –деменция	AGER	C38W	гет.	Болезнь Альцгеймера
13	легкий тетрапарез конечностей	RARS	F397Y	гом.	Лейкодистрофия-гипомиелинизация типа 9 (HLD9)
14	смешанный тетрапарез	DCTN1	R361Q	гет.	Боковой амиотрофический склероз
15	смешанный тетрапарез, деменция	SQSTM1	K238E	гет.	Боковой амиотрофический склероз с лобно-височной деменцией (FTDALS1)
16	прогрессирующий парез наружных мышц глаз	POLG	R579W L311P	гет. гет.	Прогрессирующая наружная оптоальмоплегия (PEOA1)
17	паркинсонизм	GIGYF2	H1165R	гет.	Болезнь Паркинсона (PARK11)
18	атаксия	ITPR1	V479I	гом.	Спиноцереbellарная атаксия типа 15 (SCA15)
19	паркинсонизм	SYNJ1	G1367E	гет.	Болезнь Паркинсона (PARK20)

Заключение. Таргетные генетические панели на основе NGS являются незаменимыми и экономически оправданными при диагностике наследственных заболеваний нервной системы, которые характеризуются генетической гетерогенностью и фенотипическим полиморфизмом. Применение панельного скрининга у диагностически неясных пациентов с нейродегенеративными заболеваниями, проявляющихся двигательными и психическими расстройствами, показало, что выявление и последующее подтверждение мутаций в различных генах возможно более чем в 25–30% обследуемых случаев.

Литература

- Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование в неврологии. М.: МИА, 2003.
- Загоровская Т.Б., Иллариошкин С.Н., Сломинский П.А. и др. Клинико-генетический анализ ювенильного паркинсонизма в России. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2004; 8: 66–72.
- Иллариошкин С.Н., Руденская Г.Е., Иванова-Смоленская И.А. и др. Наследственные атаксии и параличи. М.: МЕДпресс-информ, 2006.
- Pastor P. Genetic heterogeneity in Parkinson disease: the meaning of GWAS and replication studies. *Neurology*. 2012; 79: 619–620.
- Klebe S., Stevanin G., Depienne C. Clinical and genetic heterogeneity in hereditary spastic paraplegias: from SPG1 to SPG72 and still counting. *Rev. Neurol.* 2015; 171: 505–530.
- Иванова-Смоленская И.А., Верещагин Н.В., Маркова Е.Д. и др. Молекулярно-генетический анализ – новый этап в изучении наследственных заболеваний центральной нервной системы. Вестник РАМН. 1996; 4: 6–10.
- Гинтер Е.К., Иллариошкин С.Н. Достижения генетики и геномики в неврологии. Вестник РАМН. 2012; 8: 14–20.
- Иллариошкин С.Н., Абрамычева Н.Ю., Иванова-Смоленская И.А. Молекулярно-генетическая диагностика заболеваний нервной системы. В кн.: Неврология XXI века: диагностические, лечебные и исследовательские технологии: Руководство для врачей. В 3-х т. (под ред. М.А. Пирадова, С.Н. Иллариошкина, М.М. Танашян). Т. I. Современные технологии диагностики заболеваний нервной системы. М.: ООО «АТМО», 2015: 329–362.
- Дадали Е.Л., Тибуркова Т.Б., Шагина О.А., Поляков А.В. Алгоритм диагностики наследственных моторно-сенсорных невропатий. *Атмосфера. Нервные болезни*. 2010; 2: 17–21.
- Metzker M.L. Sequencing technologies – the next generation. *Nat. Rev. Genet.* 2010; 11: 31–46.
- Jiang T., Tan M.S., Tan L., Yu J.T. Application of next-generation sequencing technologies in neurology. *Ann. Transl. Med.* 2014; 2: 125.
- Lee H., Deignan J.L., Dorrani N. et al. Clinical exome sequencing for genetic identification of rare Mendelian disorders. *JAMA*. 2014; 312: 1880–1887.
- Saudi Mendeliome Group. Comprehensive gene panels provide advantages over clinical exome sequencing for Mendelian diseases. *Genome Biol.* 2015; 16: 134.
- Абрамычева Н.Ю., Федотова Е.Ю., Степанова М.С. и др. Новый подход к молекулярно-генетическому скринингу у пациентов с болезнью Паркинсона. *Неврологический журнал*. 2016; 1: 13–16.
- Langmead B., Salzberg S.L., Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods*. 2012; 9: 357–359.
- Yang H., Wang K. Genomic variant annotation and prioritization with ANNOVAR and WANNOVAR. *Nat. Protoc.* 2015; 10: 1556–1566.