

На правах рукописи

Аношкин Кирилл Игоревич

**Молекулярно-генетические аспекты туберозного склероза и
спорадической ангиомиолипомы почки, связанных с мутациями в
генах комплекса туберозного склероза**

03.02.07 – Генетика

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Москва – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Медико-генетический научный центр»

Научный руководитель:

Стрельников Владимир Викторович, доктор биологических наук, доцент

Официальные оппоненты:

Цуканов Алексей Сергеевич – доктор медицинских наук, федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кабинетом лабораторной генетики.

Белоусова Елена Дмитриевна, доктор медицинских наук, профессор, обособленное структурное подразделение – Научно-исследовательский клинический институт педиатрии имени академика Ю.Е. Вельтищева – Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, руководитель отдела психоневрологии и эпилептологии ОСП НИКИ педиатрии им. академика Ю.Е. Вельтищева.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

Защита диссертации состоится «___» _____ 2019 года в ___ часов на заседании Диссертационного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 001.016.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Медико-генетический научный центр» по адресу: 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр» по адресу: 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1 и на сайте www.med-gen.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2019 года

Ученый секретарь Диссертационного совета
Д 001.016.01 по защите диссертаций
на соискание ученой степени кандидата наук,
на соискание ученой степени доктора наук,
доктор медицинских наук, профессор

Зинченко
Рена Абульфазовна

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Туберозный склероз (ТС) является орфанным заболеванием с аутосомно-доминантным типом наследования и частотой встречаемости 1 на 10 000 человек (Henske et al. 2016). ТС характеризуется образованием доброкачественных опухолей, которые теоретически могут возникнуть в любом органе, однако наиболее часто встречаются в центральной нервной системе в виде туберов, субэпендимальных узлов и гигантоклеточных астроцитов, на коже в виде гамартром и гипопигментных пятен, рабдомиом в сердце и множественных ангиомиолипом (АМЛ) и кист в почках. Спорадическая ангиомиолипома (сАМЛ) почки, в отличие от АМЛ сочетанной с ТС, встречается у 1 на 250 человек и зачастую является случайной находкой. сАМЛ имеют солитарное строение и не беспокоят пациента до момента достижения определенного размера (более 3 см в диаметре) (Pleniceanu et al. 2018). Как и при АМЛ, сочетанной с ТС, при росте сАМЛ почки растет риск разрыва аневризмы, приводящего к внутрибрюшному кровотечению, что стоит на втором месте по причине смерти у пациентов с ТС (Northrup et al. 1993, Dixon et al. 2011).

Молекулярно-генетические нарушения в генах *TSC1* и *TSC2* являются причиной возникновения такого заболевания как ТС и часто наблюдаются в опухолевом материале спорадической ангиомиолипомы почки (>57%) (Au et al. 2007, Qin et al. 2011, Giannikou et al. 2016). Несмотря на хорошую изученность генов *TSC1* и *TSC2* при данных заболеваниях, на данный момент стоит острая необходимость в создании комплексного молекулярно-генетического подхода, позволяющего всецело анализировать гены комплекса туберозного склероза при разных заболеваниях, связанных с повреждениями этих генов. Это продиктовано встречаемостью таких генных мутаций в генах *TSC1* и *TSC2*, как нонсенс-мутации, миссенс-мутации, мутации в сайтах сплайсинга, коротких инделов, протяженных делеций и аллельного дисбаланса, а также встречаемостью мутаций с низкой аллельной представленностью у пациентов с ТС.

Выявление гено-фенотипических корреляций у пациентов с ТС является на сегодняшний момент вызовом для научного медицинского сообщества. На данный момент это наиболее явная гено-фенотипическая корреляция при ТС описана для известной делеции двух смежных генов *TSC2/PKD1*, ассоциированной с возникновением у пациентов с ТС еще одного аутосомно-доминантного заболевания - поликистоза почек. Выявление гено-фенотипических корреляций при солитарном поражении одного из генов туберозно-склерозного комплекса - *TSC1* или *TSC2* - позволит прогнозировать тяжесть течения болезни, а также оптимизировать мероприятия по лечению больных ТС.

Несмотря на хорошую изученность мутационного профиля сАМЛ почки, на данный момент наиболее широкий генетический анализ включал в себя лишь 9 образцов сАМЛ. Также, результаты разных исследовательских групп по мутационному профилированию сАМЛ, хоть и имеют однонаправленную тенденцию к утверждению, что причиной возникновения является биаллельная инактивация генов *TSC1* и *TSC2*, разрозненны и неоднозначны, что оставляет вопрос о причинах возникновения опухоли открытым (Qin et al. 2011, Giannikou et al. 2016).

Исходя из вышеописанного, представляется актуальной разработка комплексного молекулярно-генетического подхода к анализу генов *TSC1* и *TSC2* на примере таких заболеваний как туберозный склероз и спорадическая ангиомиолипома почки на выборке из российских пациентов. Также это позволит определить спектр типов мутаций при ТС в российской когорте пациентов. Выявление гено-фенотипических корреляций у пациентов

в российской популяции является актуальным в силу возможных специфических корреляций, характерных для исследуемой популяции. Широкогеномный анализ в опухолевом материале спорадической АМЛ почки позволит выявить новые гены и области поиска генов, которые вовлечены в этиопатогенез данного заболевания.

Цель и задачи исследования

Цель исследования: Изучение частоты и спектра структурных нарушений генов *TSC1* и *TSC2* при туберозном склерозе и спорадической ангиомиолипоме почки и разработка технологии молекулярно-генетического анализа генов *TSC1* и *TSC2* у больных российской популяции.

Задачи исследования:

1. Определить спектр типов генных мутаций в генах *TSC1* и *TSC2* у российских больных с туберозным склерозом.
2. Провести анализ клинических проявлений и гено-фенотипических корреляций в группе российских больных с туберозным склерозом.
3. Разработать медицинскую технологию клиничко-молекулярно-генетической диагностики туберозного склероза.
4. Провести широкогеномный анализ мутаций и аллельного дисбаланса в 409 генах, вовлеченных в опухолеобразование, в опухолевом материале спорадической ангиомиолипомы почки, для определения новых генов и новых областей поиска генов, вовлеченных в этиопатогенез спорадической ангиомиолипомы почки.
5. Провести скрининг мутаций и аллельного дисбаланса в генах *TSC1* и *TSC2* в опухолевом материале спорадической ангиомиолипомы почки для уточнения применимости двухударной модели канцерогенеза к доброкачественной опухоли – спорадической ангиомиолипоме почки.

Методология и методы диссертационного исследования

Выборка для генетического исследования сформирована из пациентов с клиническим диагнозом туберозный склероз и спорадическая ангиомиолипома почки. Пациенты или их законные представители (родители) подписали информированное согласие на обработку персональных данных. Проведение данного исследования одобрено этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ». В работе использованы общенаучные эмпирические (наблюдение и описание, эксперимент, сравнение), теоретические (аналогия, анализ, синтез, обобщение, моделирование, индукция, дедукция) и специальные методы (изучение литературных источников, молекулярно-генетические методы, молекулярно-цитогенетические методы, регистрация информации, методы функциональной геномики, биоинформатики и статистического анализа). Особенностью данного исследования является значительная величина выборки пациентов, соответствующей единому временному срезу.

Положения выносимые на защиту

1. Анализ нуклеотидной последовательности кодирующих участков генов *TSC1* и *TSC2* у 202 пациентов с туберозным склерозом в российской популяции показал присутствие таких генных мутаций, как малые инделы, миссенс-мутации, нонсенс-мутации, мутации в сайтах сплайсинга и протяженные делеции. Выявлена более высокая частота встречаемости миссенс-мутаций и более низкая - мутаций в сайтах сплайсинга в гене *TSC1* по сравнению с литературными данными ($p = 0.024$).

2. Анализ фенотипических проявлений у пациентов с туберозным склерозом в российской популяции показал превалирующую встречаемость поражения четырех систем органов - 41,1%.

3. Гено-фенотипический анализ корреляций показал более тяжелое течение заболевания при мутациях в гене *TSC2*. Такие проявления, как ангиофибромы Прингля ($p=0.022$), ангиомиолипомы почки ($p=0.025$), гамартомы сетчатки ($p=0.006$), и субэпидемальные узлы/субэпидемальные гигантоклеточные астроцитомы ($p=0.004$) встречаются чаще при мутациях в гене *TSC2*. Количество вовлеченных систем органов у пациентов дошкольного возраста при мутациях в гене *TSC1* ниже, чем при мутациях в гене *TSC2* ($p=0.009$).

4. Разработана медицинская технология молекулярно-генетической диагностики туберозного склероза, которая, при соответствии фенотипа заболевания, позволяет выявлять генетическую причину (в том числе мозаичные формы) в 96,5% случаев.

5. Впервые в образцах спорадической ангиомиолипомы почки с отсутствием драйверных мутаций генов *TSC1* или *TSC2* обнаружены мутации в генах *SETD2*, *PDGFRA* и *STK36*, а также ранее не описанные хромосомные регионы с аллельным дисбалансом (15q14-q15.1 и 6q22.31-q25.2), маркирующие новые области поиска генов, вовлеченных в этиопатогенез заболевания.

6. Для доброкачественной опухоли - спорадической ангиомиолипомы почки - соблюдается двухударная модель канцерогенеза: в 10 из 14 (71,42%) исследованных опухолей с мутациями гена *TSC2* выявлена биаллельная инактивация этого гена.

Научная новизна результатов исследования

Впервые на наиболее представительной выборке российских пациентов с диагнозом туберозный склероз (более 200 неродственных пробандов) проведено комплексное клиническое и молекулярно-генетическое исследование, позволившее определить полный спектр типов мутаций в генах *TSC1* и *TSC2*, выявить характерные для российской когорты пациентов особенности спектра мутаций и клинико-генетические корреляции. В российской популяции выявлена повышенная встречаемость миссенс-мутаций и пониженная встречаемость мутаций в сайтах сплайсинга в гене *TSC1* по сравнению с международными данными ($p = 0.024$).

Впервые проведен подробный гено-фенотипический анализ корреляций у российских пациентов с туберозным склерозом. Показано что, мутации в гене *TSC2* приводят к более тяжелому течению заболевания, чем мутации в гене *TSC1*.

Впервые в образцах спорадической ангиомиолипомы почки с отсутствием драйверных мутаций в генах *TSC1* и *TSC2* выявлены мутации в генах *SETD2*, *PDGFRA* и *STK36*, которые могут рассматриваться как гены-кандидаты для поиска драйверных мутаций сАМЛ почки.

Впервые в образцах спорадической ангиомиолипомы почки обнаружены ранее не описанные хромосомные регионы с аллельным дисбалансом - 15q14-q15.1 и 6q22.31-q25.2, которые могут указывать на расположение новых генов-кандидатов сАМЛ почки.

Впервые продемонстрирован генетический полиморфизм новообразований почки, морфологически классифицируемых как АМЛ, и показана необходимость уточняющей молекулярно-генетической диагностики АМЛ с другими новообразованиями почки разной степени злокачественности, в частности, папиллярного рака почки и *CDC73*-ассоциированного наследственного опухолевого синдрома, сопровождающегося кистами и гамартомами почек.

Научно-практическая значимость

Разработана технология комплексной молекулярно-генетической диагностики мутаций генов комплекса туберозного склероза, позволяющая анализировать максимально возможный спектр структурных повреждений генов *TSC1* и *TSC2* при врождённых и спорадических заболеваниях на примере туберозного склероза и спорадической АМЛ почки.

Определение генетической причины туберозного склероза позволит дифференцировать данное заболевание с другими заболеваниями, а также использовать при прогнозе течения и определении тактики лечения и профилактики на основе выявленных гено-фенотипических корреляций. Своевременно начатый мониторинг, направленный на ранее выявление туберозного склероза, позволит значительно повысить качество жизни носителей мутаций.

Выявление новых хромосомных участков аллельного дисбаланса, а также новых генных мутаций при спорадической АМЛ почки открывает возможности идентификации новых молекулярных мишеней для диагностики и лечения данной нозологии.

Показана необходимость дифференциальной молекулярно-генетической диагностики опухолей почки, морфологически мимикрирующих под АМЛ и не несущих драйверных мутаций в генах *TSC1* или *TSC2*, для уточнения клинического диагноза и корректировки лечения и медико-генетического консультирования.

Степень достоверности результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов и обоснованности сделанных выводов определяется представительным размером выборки пациентов с ТС и сАМЛ, включенных в исследование, применением статистических подходов обработки полученных результатов и использованием современных молекулярно-генетических методов исследования. Достоверность результатов подтверждена следующими непараметрическими методами сравнения: критерий Хи-квадрат Пирсона, критерий Хи-квадрат Пирсона с поправкой Йейтса, точный критерий Фишера. Сформулированные в работе выводы согласуются с поставленной целью и задачами исследования.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 03.02.07 – генетика (медицинские науки), охватывающей проблемы изменчивости и наследственности, закономерности процессов хранения, передачи и реализации генетической информации на молекулярном, клеточном, организменном и популяционном уровнях. Область исследований соответствует пунктам 7 (Реализация генетической информации (транскрипция, трансляция). Механизмы регуляции экспрессии генов. Роль геномных перестроек в реализации генного действия. Взаимодействие генов.), и 17 (Генетика человека. Медицинская генетика. Наследственные болезни) паспорта специальности.

Апробация результатов исследования

Материалы работы представлялись на ежегодной конференции Европейского общества генетики человека в 2018 году (г. Милан, Италия); на конференции молодых ученых ФГБНУ «МГНЦ» в 2016 г. и 2017 г. (Москва); на международной всероссийской Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых, 2016 г. и 2017 г. (Москва); на Российском конгрессе лабораторной медицины в 2017 г. (Москва); на 21-ой международной всероссийской научно-практической конференции «Качество

лабораторных исследований - условие безопасности пациентов” в 2016 г. (Москва); на общероссийской конференции с международным участием Flores Vitae, 2018 г. (Москва); на 3-м Петербургском международном онкологическом форуме “Белые ночи”, 2017 г. (Санкт-Петербург), на 21-ом международном симпозиуме имени Чарльза Хейдельберга, в 2016 году (г. Долгопрудный, Россия), на конгрессе по молекулярному анализу для персонализированной терапии (г. Париж, Франция) в 2018 году, на международном научном конгрессе «Генетика XXI века», 2019 г. (Москва).

Работа отмечена дипломом первой степени среди молодых ученых на XI Международной XX Всероссийской Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых, 2016 г. (Москва), выиграла конкурс на лучший постерный доклад на научной конференции “Молекулярная онкология: Итоги и перспективы” 2015 г. (Москва), отмечена стипендией Европейского общества генетики человека в 2018 году.

Работа одобрена этическим комитетом и прошла экспертную комиссию, рекомендована к защите на заседании диссертационного совета ФГБНУ «МГНЦ».

Личный вклад автора в проведение исследования

Автором проведен анализ отечественной и зарубежной литературы по теме диссертации. Автор принимал непосредственное участие в планировании и проведении молекулярно-генетических исследований, анализе клинических и лабораторных данных, обработке полученных результатов.

Автор самостоятельно подготовил материалы к публикации в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах.

Публикации

По теме работы подготовлено и опубликовано 14 научных работ, из них 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК МОН РФ для соискателей ученой степени кандидата медицинских наук (1 WoS и Scopus), 9 работ в материалах конгрессов и конференций в РФ и 1 - за рубежом.

Структура и объем диссертации

Диссертация имеет следующую структуру: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждения, заключение, выводы, практические рекомендации, список литературы. Диссертационная работа изложена на 127 страницах текста, содержит 48 рисунков и 16 таблиц. Библиографический указатель включает 205 наименований, из них 1 отечественный и 204 иностранных источника.

II СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал исследования

Для проведения генетического исследования выборка была сформирована на основе клинических диагностических критериев туберозного склероза от 2013 года H.Northrup и др. (Northrup et al. 2013). В исследование включено 202 неродственных больных с диагнозом туберозный склероз, а также 153 членов семей пробандов. Суммарно выборка составила 354 человека.

Образцы ткани спорадической ангиомиолипомы почки и периферической крови получены от 20 пациентов, прооперированных в Клинике урологии им. Р.М. Фронштейна Первого МГМУ им. И.М. Сеченова. Из них 19 женщин и 1 мужчина. Возраст пациентов варьировался от 31 до 72 лет.

Методы исследования

Экстракция геномной ДНК. Геномную ДНК из материала ткани и лейкоцитов периферической крови выделяли стандартным методом фенол-хлороформной экстракции.

Анализ мутаций в анализируемых генах проводился с помощью высокопроизводительного параллельного секвенирования (ВПС). Для анализа мутаций в генах *TSC1* и *TSC2* у пациентов с ТС использовалась панель праймеров которая покрывает кодирующие последовательности исследуемых генов, прилегающие области интронов, и 5', 3'- нетранслируемые области (UTR). Пациентам со сАМЛ проведен расширенный скрининг мутаций в 409 генах, участвующих в опухолеобразовании (панель праймеров для ВПС Ion AmpliSeq Comprehensive Cancer Panel, ThermoFisher, США) в опухолевом материале. Для исключения герминальных патогенных мутаций использовалась периферическая кровь этих же пациентов.

Проведение полимеразной цепной реакции проводили в реакционной смеси в состав которой входили 8% глицерин, 68 мМ Tris-HCl с pH 8,3, 17 мМ (NH₄)SO₄, 0.01% Tween-20, 0,1 мг/мл BSA, по 0,2 мМ каждого dNTP, 1,5 ед. акт. Taq-полимеразы, 0,12 пМ каждого праймера, 2,5 мМ MgCl₂. В реакционную смесь добавляли 100 нг геномной ДНК. Объем реакционной смеси составлял 25 мкл. Сверху наслаивали 40-60 мкл вазелинового масла. Прогревали смесь при 95°C в течение 5 минут и проводили 33 цикла по следующей программе: 95°C - 40 секунд, Тотжига праймеров (60-64°C, подбирались экспериментальным путем) - 40 секунд, 72°C - 40 секунд, финальную элонгацию проводили при 72°C в течении 5 минут. ПЦР проводили на программируемом термоциклере "Терцик" фирмы "ДНК-технология", Москва.

Анализ изменений копийности был проведен с использованием SALSA® MLPA® набора, наборов зондов P124-C3 *TSC1* и P046-C1 *TSC2*, и набора реактивов SALSA® MLPA® с мечеными FAM праймерами (SALSA MLPA buffer, SALSA Ligase-65, SALSA Ligase Buffer A, SALSA Ligase Buffer B, SALSA Polymerase, SALSA PCR Primer FAM) согласно протоколу производителя (MRC-Holland, Голландия).

Анализ аллельного дисбаланса с помощью метода высокопроизводительного параллельного секвенирования в образцах спорадической ангиомиолипомы почки определяли методом высокопроизводительного параллельного секвенирования с использованием панели праймеров Ion AmpliSeq Comprehensive Cancer Panel (ThermoFisher, США), покрывающей экзоны и фланкирующие их участки интронов 409 генов, участвующих в опухолеобразовании. Аллельное соотношение однонуклеотидных генетических вариантов (single nucleotide variant - SNV) со значениями между 35% и 65% считали соответствующим гетерозиготному состоянию SNV, а со значениями выше 65% и ниже 35% - аллельному дисбалансу. Значения соотношений аллелей SNV выше 95% или ниже 5% считали соответствующими гомозиготному состоянию. Рассматривали только генетические варианты в участках с глубиной прочтения не менее 50х.

Хромосомный микроматричный анализ был проведен в медико-генетическом центре «Геномед». ХМА проводили для подтверждения регионов с аллельным дисбалансом, которые были определены с помощью метода ВПС. ХМА представляет собой полногеномный метод исследования с использованием SNP-олигонуклеотидных

микроматриц высокой плотности, содержащих от 750 тыс. (CytoScan 750K Array) до 2,7 млн. (CytoScan HD Array) полиморфных и не полиморфных маркеров, позволяющих детектировать вариацию числа копий (Copy number variations, CNV) и потерю гетерозиготности (Loss of heterozygosity, LOH). В работе использовались микроматрицы высокой плотности CytoScan 750K Array Affymetrix (Thermo Fisher Scientific), USA и CytoScan HD Array Affymetrix (Thermo Fisher Scientific), USA. Исследование выполняли в соответствии с протоколом компании-производителя. Анализ полученных данных проводился с использованием программного обеспечения ChAS 3.0 Affymetrix (Thermo Fisher Scientific), USA.

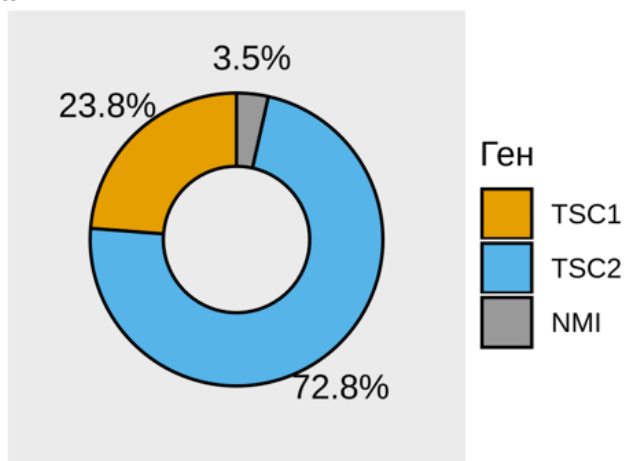
Статистический анализ полученных данных проводился с использованием программы Excel и R-studio. Для оценки достоверности при сравнении частотных показателей использовался точный критерий Фишера, Хи-квадрат Пирсона, и Хи-квадрат Пирсона с поправкой Йейтса.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Распределение мутаций в генах *TSC1* и *TSC2* в исследуемой выборке пациентов с туберозным склерозом

В результате анализа нуклеотидной последовательности кодирующих участков генов *TSC1* и *TSC2* у 202 пробандов с туберозным склерозом молекулярно-генетическая причина заболевания выявлена в 96,5% случаев (195/202). Подавляющее большинство мутаций зафиксировано в гене *TSC2* - 147 (72,8%). 48 мутаций (23,8%) локализованы в гене *TSC1*. В семи случаях (3,5%) мутации найдены не были (рис. 1А). Более высокая частота мутаций в гене *TSC2* по сравнению с *TSC1* наблюдается вне зависимости от пола пробанда (p -value = 0.193) (рис. 1Б). Данные о распределении долей мутаций по генам соответствуют международным данным

А.



Б.

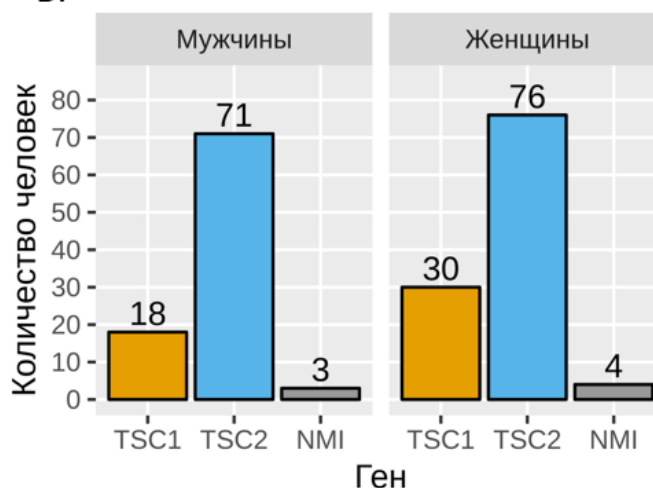


Рисунок 1. Распределение мутаций по генам (А). Встречаемость мутаций в генах по полу (Б). Примечание: NMI - мутация не определена.

В исследуемой выборке наиболее частым типом мутации в гене *TSC1* являются нонсенс-мутации - 41,7% случаев. Вторыми по частоте встречаемости являются инделы, приводящие к сдвигу рамки считывания - 35,4% случаев (рис. 2). Протяженная делеция в гене *TSC1* была зафиксирована лишь одна, в первом экзоне. Миссенс-мутации в гене *TSC1* встречаются в 7 случаях – 14,6%. Мутации, нарушающие сайт сплайсинга, встречается в двух случаях – 4,2%. Инделы, не приводящий к сдвигу рамки считывания, был зафиксирован лишь один раз – 2,1% случаев от общего числа мутаций.

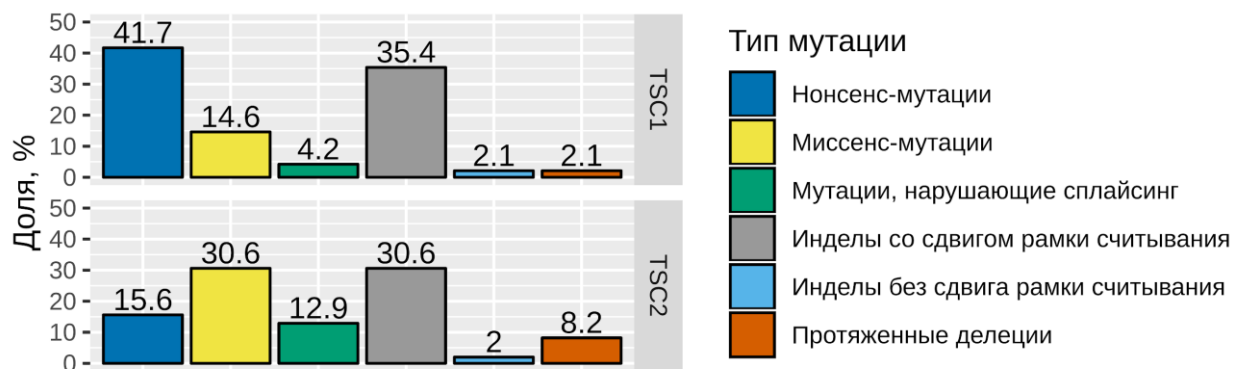


Рисунок 2. Распределение мутаций по типу в генах *TSC1* и *TSC2*.

В гене *TSC2* наиболее часто встречаются миссенс-мутации и инделлы, приводящие к сдвигу рамки считывания - по 30,6% для каждого типа мутаций (рис.2). Протяженные делеции в гене *TSC2* встречаются чаще, чем в *TSC1* - 8,2% (12 случаев, рис.2). Наименее встречаемым мутационным явлением являются инделлы, не приводящие к сдвигу рамки считывания, - 2,1% и 2% в генах *TSC1* и *TSC2* соответственно.

Из 195 мутационных явлений, 182 мутации (93,3%) были выявлены методом ВПС. Методом MLPA - 13 протяженных делеций (6,7%). В 7 случаях из 202 (3,5%) мутации в генах *TSC1* и *TSC2* найдены не были. 147 мутаций (75,4%) локализованы в гене *TSC2*, 24,6% (48) - в гене *TSC1*.

Сравнение исследуемой выборки с выборкой *Salussolia* по распределению типов мутаций обнаружило статистически значимые различия (p -value = 0.024; точный критерий Фишера) для гена *TSC1*. Статистически значимых различий для гена *TSC2* обнаружено не было (p -value = 0.129; критерий хи-квадрат Пирсона) (рис.3). Так, в исследуемой выборке, в гене *TSC1* встречаемость миссенс мутации встречается более часто чем в выборке *Salussolia* и др., 16,7% против 4,4%. Мутации в сайтах сплайсинга встречаются реже, 4,2% против 11,7% соответственно.

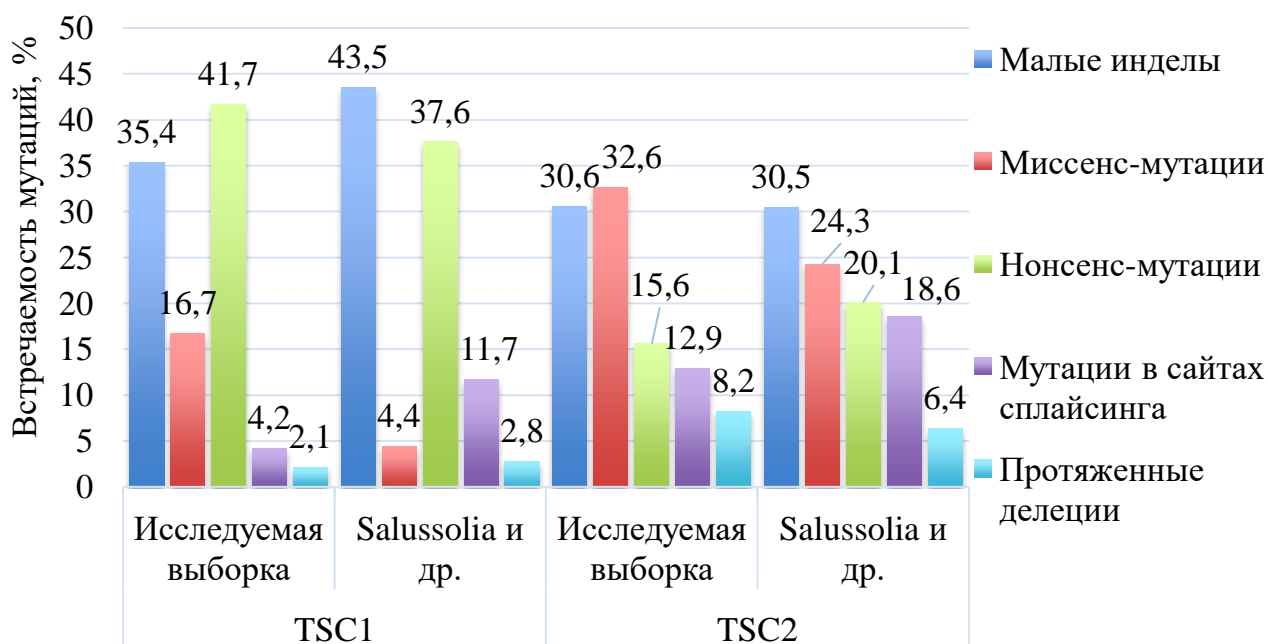


Рисунок 3. Сравнение распределения мутаций в генах *TSC1* и *TSC2* в выборках *C.Salussolia* и др. и в исследуемой выборке.

Примечание: инделлы без сдвига рамки считывания входят в миссенс-мутации.

Из общего числа точковых мутаций, мутации, приводящие к досрочной терминации синтеза белка, в гене *TSC1* присутствуют в 78,7% (37/47) случаев. Мутации, приводящие к замене аминокислотной последовательности, найдены в восьми случаях (17%). 32% точковых мутаций локализованы в 15 экзоне (15 мутаций). Наиболее высокая плотность мутаций в экзонах гена *TSC1* на т.п.н. приходится на 15 экзон, что отличается от данных *C.Salussolia*, где наиболее высокая плотность мутаций на нуклеотид фиксируется в восьмом экзоне.

Общее число точковых мутаций в гене *TSC2* составляет 135 (91,8% от общего числа определенных мутаций в данном гене). Мутации, приводящие к досрочной терминации белка, обнаружены в 68 случаях (50,3% от 135 точковых мутаций). К изменению аминокислотной последовательности приводило 48 мутаций - 35% случаев. Мутации в сайтах сплайсинга выявлены в 14% случаев (19/135).

Точковые мутации в гене *TSC2* встречаются наиболее часто в 34 экзоне - 12 мутаций (8,8%) и в экзоне 41 - также 12 мутаций (8,8%). Инделлы со сдвигом рамки считывания встречались наиболее часто в 34 экзоне - 8 случаев, а миссенс-мутации - в 17 экзоне - 8 случаев. Также заметны регионы, где чаще встречаются миссенс-мутации, с 34 по 41 экзон включительно - 22 миссенс-мутации (16,3% случаев) и с 20 по 25 экзон включительно - 10 мутаций (7,4% случаев). Наиболее часто в исследуемой выборке мутации фиксируются в GAP домене - 29,6% (40/135). Наиболее высокая плотность мутаций на т.п.н. в гене *TSC2* фиксируется в 41, 17 и 25 экзонах (121,2, 65 и 63,2 на т.п.н соответственно), что согласуется с литературными данными.

Протяженные делеции в генах *TSC1* и *TSC2*

Данные *C.Salussolia* (*Salussolia et al.* 2019) показывают, что протяженные делеции встречаются в генах *TSC1* и *TSC2* в 2,9% и 6,4% случаев соответственно (рис.3). В исследуемой когорте пациентов методом MLPA было обнаружено 13 протяженных делеций: одна в гене *TSC1* и 12 - в гене *TSC2*. Согласно *H.Northrup* и др., куратора страницы туберозного склероза на GeneReviews® (*Northrup et al.* 1993) (последняя дата обновления 12 июля 2018 г.), утверждается, что примерно 4,5% случаев от всех мутаций в гене *TSC2* представляют собой делеции, которые затрагивают лишь часть гена, а в 0,5% случаев делеции захватывают весь ген. Половина крупных делеций также затрагивают и смежный с *TSC2* ген *PKDI*. В исследуемой выборке делеции, затрагивающие лишь часть гена, встретились в 3,4% случаев, а затрагивающие весь ген - в 4,7% случаев. Делеции, включающие ген *PKDI*, были зафиксированы в 58% случаев протяженных делеций.

Исходя из полученных результатов можно сказать, что в исследуемой выборке более часто встречаются протяженные делеции гена *TSC2*, а также чаще наблюдаются делеции полного гена *TSC2*.

Мозаичные патогенные варианты у пациентов с туберозным склерозом

В исследуемой выборке было обнаружено 12 патогенных генетических вариантов с низкой представленностью мутантного аллеля (табл.1). Все мутации были локализованы исключительно в гене *TSC2*. Также все эти мутации имели аллельную представленность менее 30%, а 6 мутаций имели аллельную представленность менее 10%.

Таблица 1. Патогенные варианты с низкой аллельной представленностью.

№ пациента	Тип мутации	Нуклеотидная замена	A3	rsID	ГП	АЧ
265	Инсерция	c.5201_5202insC	p.D1734fs	-	800	0,006
87	Делеция*	c.1234_1235del	p.E412fs	-	6300	0,04
202	Сплайсинг	c.976-15G>A		rs45517150	5962	0,06
207	Миссенс	c.G5228A	p.R1743Q	rs45507199	5253	0,07
262	Нонсенс	c.C2713T	p.R905W	rs45517258	5330	0,07
311	Делеция*	c.1661_1667del	p.S554fs	-	3751	0,08
251	Делеция*	c.3193delA	p.K1065fs	-	1083	0,1
211	Нонсенс	c.C268T	p.Q90X	rs45517099	2187	0,12
222	Нонсенс	c.G2824T	p.E942X	rs45517270	1205	0,14
193	Нонсенс	c.C1659A	p.Y553X	-	7928	0,23
188	Сплайсинг	c.4850-1G>C		-	1965	0,29
81	Инсерция*	c.4108_4109insC CTCTGTGGA	p.P1370fs	-	1418	0,3

Примечание: A3 – аминокислотная замена, ГП – глубина прочтения, АЧ – аллельная частота патогенного аллеля, * - со сдвигом рамки считывания.

Согласно международным данным, патогенные мутации с низкой аллельной представленностью встречаются среди пациентов с ТС в 1-5% случаев (Northrup et al. 1993) (последняя дата обновления 12 июля 2018 г.). В исследуемой выборке методом ВПС было определено 12 случаев, что составляет 6% от общего числа исследуемых пациентов.

По последним данным, у пациентов с ТС представленность патогенных вариантов может достигать значений менее 1%. Так, в исследовании М.Тубурцы и др. (Тубурцы et al. 2015) в 3 образцах (из 23 случаев с аллельной представленностью менее 30% включительно) аллельная представленность была 0,71, 0,69 и 0,21%. В исследовании Qin и др. (Qin et al. 2010) аллели с частотой менее 1% включительно встретились в 3 случаях. В исследовании К.Гианнику (Giannikou et al. 2019) было определено, что медиана представленности патогенного аллеля в крови равнялась 1,7%, тогда как в образцах опухолей (кожные проявления) аллельная представленность была в 2 раза выше.

Интересно, что в исследованиях М.Тубурцы, и К.Гианнику, мутации с низкой аллельной представленностью встречались как в гене *TSC1*, так и в гене *TSC2*. В исследовании М.Тубурцы и др. мутации в гене *TSC1* встретились в 15,4% случаях, а в исследовании К.Гианнику и др. в 8%. В исследовании W.Qin и др. упоминание о мутациях в гене *TSC1* с низкой аллельной представленностью отсутствует (Qin et al. 2010).

В исследуемой выборке в семи случаях из двенадцати (58,3%), представленность патогенного аллеля была меньше или равна 10% (табл.1), а в одном случае - менее одного процента (табл.1, пациент 265). В остальных случаях аллельная представленность была выше 10%. Мутаций с низкой аллельной представленностью в гене *TSC1* зафиксировано не было.

В одном случае предположение о мозаичном характере мутации, определенной методом ВПС (мутация с малой аллельной представленностью - 29%; Пациент №188, табл.1), было опровергнуто по результатам прямого секвенирования по Сэнгеру, который показал 50%-ную представленность мутантного аллеля. Скорее всего, такая ситуация

является следствием меньшего количества прочтений, полученных с одного из праймеров панели ВПС, что существенно снизило оценку представленности аллеля.

Сегрегационный анализ был проведен 60-ти семьям, суммарно обследован 201 человек включая пробандов. В 44 семьях обследовано 3 человека, в 11 семьях - 4 человека и в 5 семьях - 5 человек. De novo мутации были определены в 51 семье (85%), а семейные случаи ТС - в девяти, что составляет 15%. Такое соотношение существенно ниже, чем в обобщенной мировой популяции, что может быть продиктовано малой выборкой, прошедшей сегрегационный анализ в настоящем исследовании.

Фено-генотипические корреляции у пациентов с туберозным склерозом

Наиболее частыми клиническими проявлениями у пациентов с ТС в российской популяции является эпилепсия 90,17%, гипопигментные пятна в 89,8%, субэпидемальные узлы в 79,4%, ангиомиолипомы почки в 74,3%, туберы в 72,3%, рабдомиомы в сердце в 69,5%, кисты почек в 68,7%, гигантоклеточные астроцитомы в 59,14%. Наиболее редкими проявлениями были пятна кофейного цвета – 4%, лимфангиолейомиоматоз в 1,5%, дефекты эмали зубов в 1,15% и пятна типа конфетти в 0,57% (рис.4).

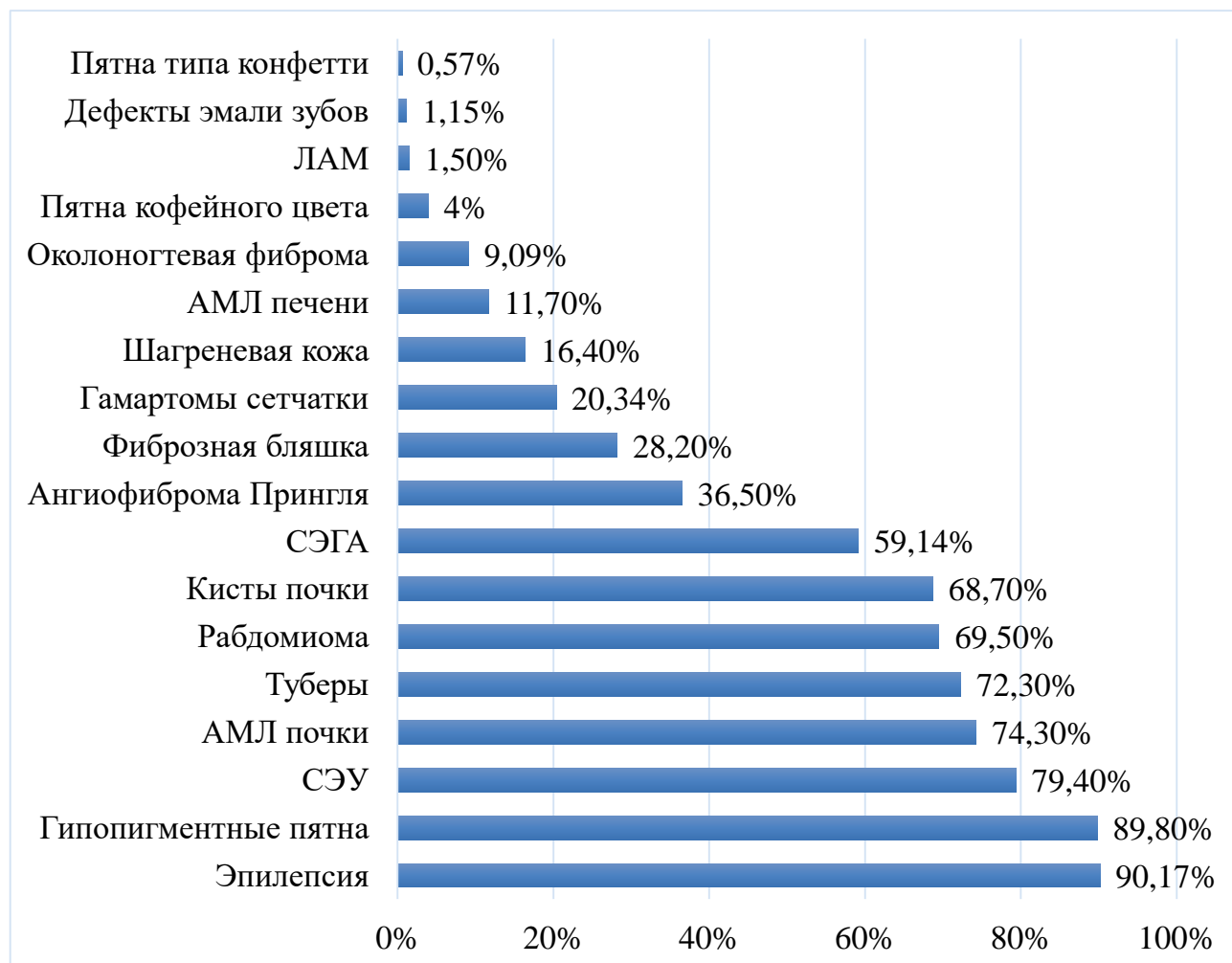


Рисунок 4. Частота встречаемости первичных проявлений ТС в исследуемой выборке.

Примечание: АМЛ - ангиомиолипома, ЛАМ - лимфоангиомиолеоматоз, СЭГА - субэпидемальная гигантоклеточная астроцитомы, СЭУ - субэпидемальные узлы.

По количеству вовлеченных систем органов наибольшая группа пациентов была с четырьмя вовлеченными системами органов - 41,1% (74/180). Наименьшее количество

пациентов имело одну и пять вовлеченных систем органов – 6,1% (11/180) и 6,7% (12/180) соответственно (рис.5).



Рисунок 5. Встречаемость количества вовлеченных систем органов в исследуемой выборке.

Мутации в гене *TSC1* наиболее часто встречаются при семейных случаях, 55,6% случаев, тогда как *de novo* случаи агрегируют в себе больше мутаций в гене *TSC2* - 86,8% (p -value = 0.0009). Результаты коррелируют с международными данными.

Сравнение проявлений ТС в выборках пациентов мужского и женского пола с учетом расположения выявленных мутаций в генах *TSC1* или *TSC2* показало, что в большинстве случаев статистически значимые различия отсутствуют (табл. 2). Однако для двух признаков выявлены статистически значимые различия: 1. в группе проявлений гипопигментных пятен при мутациях в гене *TSC2* (p -value = 0.03). У мужчин практически в 100% случаев наблюдаются гипопигментные пятна, тогда как у женщин лишь в 85% случаев; 2. в группе проявления тубероз при мутациях в гене *TSC1* (табл. 2), туберозы наблюдаются более часто у пациентов женского пола, чем мужского пола (p -value = 0.03) (табл. 2).

При сравнении первичных проявлений у пациентов с мутацией в гене *TSC1* и *TSC2*, статистически значимые отличия выявлены при сравнении частот таких первичных проявлений, как ангиофиброма Прингля (p -value = 0.022), ангиомиолипома почки (p -value = 0.025), гамартома сетчатки (p -value = 0.006), и СЭУ/СЭГА (p -value = 0.004) (табл. 3). Как можно наблюдать в таблице 3, данные проявления встречаются при мутациях в гене *TSC2* чаще, чем при мутациях в гене *TSC1*.

Таблица 2. Сравнение пациентов мужского и женского пола по первичным проявлениям, при мутациях в гене *TSC1* и *TSC2*.

Признак	Ген	У мужчин*	У женщин*	p-value	Тест
Ангиофиброма Прингла	<i>TSC1</i>	0.20 (15)	0.19 (26)	1.00	Точный тест Фишера
	<i>TSC2</i>	0.38 (64)	0.44 (66)	0.46	χ^2 критерий Пирсона
Лимфангиолейомиоматоз	<i>TSC1</i>	0 (13)	0 (18)	1	Точный тест Фишера
	<i>TSC2</i>	0 (47)	0.02(49)	1	Точный тест Фишера
Ногтевые фибромы	<i>TSC1</i>	0.07 (15)	0.15 (26)	0.64	Точный тест Фишера
	<i>TSC2</i>	0.05 (63)	0.09 (65)	0.49	Точный тест Фишера
Рабдомиома	<i>TSC1</i>	0.5 (14)	0.67 (21)	0.53	С поправкой Йейтса*
	<i>TSC2</i>	0.79 (57)	0.71 (63)	0.34	χ^2 критерий Пирсона
Ангиомиолипома почки	<i>TSC1</i>	0.64 (14)	0.59 (22)	1	С поправкой Йейтса
	<i>TSC2</i>	0.77 (56)	0.82 (57)	0.45	χ^2 критерий Пирсона
Гамартома Сетчатки	<i>TSC1</i>	0.07 (15)	0.04 (24)	1	Точный тест Фишера
	<i>TSC2</i>	0.24 (63)	0.25 (63)	0.84	χ^2 критерий Пирсона
СЭУ/СЭГА	<i>TSC1</i>	0.73 (15)	0.87 (23)	0.4	Точный тест Фишера
	<i>TSC2</i>	0.97 (59)	0.97 (62)	1	Точный тест Фишера
Шагреновая кожа	<i>TSC1</i>	0.2 (15)	0.23 (26)	1	Точный тест Фишера
	<i>TSC2</i>	0.14 (63)	0.15 (66)	1	С поправкой Йейтса
Гипопигментные пятна	<i>TSC1</i>	0.8 (15)	0.88 (26)	0.65	Точный тест Фишера
	<i>TSC2</i>	0.97 (63)	0.85 (67)	0.03	Точный тест Фишера
Туберы	<i>TSC1</i>	0.53 (15)	0.87 (23)	0.03	Точный тест Фишера
	<i>TSC2</i>	0.71 (59)	0.74 (62)	0.71	χ^2 критерий Пирсона

Примечание: у мужчин* - доля наблюдений (размер группы); у женщин* - доля наблюдений (размер группы); с поправкой Йейтса* - χ^2 критерий Пирсона с поправкой Йейтса.

Таблица 3. Сравнение первичных проявлений при мутациях в генах *TSC1* и *TSC2*.

Признак	TSC1*	TSC2*	p-value	Тест
Ангиофиброма Прингла	0.20 (41)	0.41 (130)	0.022	С поправкой Йейтса*
Лимфангиолейомиоматоз	0 (31)	0.01 (96)	1	Точный тест Фишера
Ногтевые фибромы	0.12 (41)	0.07 (128)	0.472	С поправкой Йейтса*
Рабдомиома	0.6 (35)	0.75 (120)	0.083	χ^2 критерий Пирсона
Ангиомиолипома почки	0.61 (36)	0.8 (113)	0.025	χ^2 критерий Пирсона
Гамартома Сетчатки	0.05 (39)	0.25 (126)	0.006	Точный тест Фишера
СЭУ/СЭГА	0.82 (38)	0.97 (121)	0.004	Точный тест Фишера
Шагреновая кожа	0.22 (41)	0.15 (129)	0.398	С поправкой Йейтса*
Гипопигментные пятна	0.85 (41)	0.91 (130)	0.489	С поправкой Йейтса*
Туберы	0.74 (38)	0.73 (121)	0.908	χ^2 критерий Пирсона

Примечание: * - доля наблюдений при мутациях в гене (размер группы); с поправкой Йейтса* - χ^2 критерий Пирсона с поправкой Йейтса.

Наблюдались статистически значимые различия в частоте проявлений ТС в покровной, нервной, сердечно-сосудистой и мочевыделительной систем между группой пациентов с мутациями в гене *TSC1* и группой пациентов с мутацией в гене *TSC2* (табл.4).

Соотношение количества пациентов с мутацией в *TSC2*, у которых выявлены и не выявлены симптомы ТС в сердечно-сосудистой системе, составляет $\approx 2:1$ (90/43), в то время как проявления в сердечно-сосудистой системе при мутациях в гене *TSC1* наблюдаются у половины пациентов (21 имеют проявления против 25 без проявлений).

Соотношение количества пациентов с мутацией в *TSC2* и проявлениями ТС в покровной системе к количеству пациентов с мутацией и без проявлений в покровной системе составляет $\approx 12:1$ (123/10). Проявления в покровной системе при мутациях в гене *TSC1* также показало повышенную встречаемость, но менее выраженную, $\approx 3:1$ (34/11).

Соотношение количества пациентов с мутацией в *TSC2* и проявлениями ТС в нервной системе к количеству пациентов с мутацией и без проявлений в нервной системе составило $\approx 10:1$ (121/12). В группе пациентов с мутацией в гене *TSC1* также прослеживается повышенная частота проявлений в нервной системе, $\approx 3:1$ (37/11).

Соотношение количества пациентов с мутацией в *TSC2* и проявлениями ТС в мочевыделительной системе к количеству пациентов с мутацией и без проявлений в мочевыделительной системе показало соотношение ≈ 10 к 1 (121/12). Проявление в данной системе у пациентов при мутациях в гене *TSC1* показало $\approx 50\%$ встречаемость (26/21).

Таблица 4. Уровни значимости при проявлении в системах органов между группами пациентов с мутациями в гене *TSC1* и *TSC2*.

Система органов	p-value
Покровная	0.002*
Нервная	0.013*
Сердечно-сосудистая	0.008*
Мочевыделительная	0.016*
Пищеварительная	0.78**

*Критерий Хи-квадрат, ** Точный критерий Фишера

Сравнение вовлеченности количества систем органов при мутациях в *TSC1* и *TSC2*

Некоторые исследования утверждают, что фенотип при мутациях в гене *TSC1* является более “мягким”, чем при мутациях в гене *TSC2* (Henske et al. 2016).

Статистически значимых различий между группами количества вовлеченных систем при мутациях в гене *TSC1* и *TSC2* найдено не было, однако полученный уровень значимости различия выборок (точный критерий Фишера $p\text{-value} = 0.053$) позволяет предполагать тенденцию к наблюдению вовлеченности меньшего количества систем органов у пациентов с мутациями в гене *TSC1*.

Был проведен более детальный анализ с разделением общей выборки пациентов на отдельные возрастные группы, исходя из того, что клиническая картина ТС развивается с возрастом.

Статистически значимые различия между генами по вовлеченности систем органов были обнаружены в дошкольном возрасте ($p\text{-value} = 0.009$, точный критерий Фишера). Статистически значимые различия между генами по вовлеченности систем органов у лиц старше 12 лет включительно выявлены не были ($p\text{-value} = 0.64$, точный критерий Фишера).

Исходя из вышеописанного, предположение о более тяжелом фенотипе при мутациях в гене *TSC2* является корректным, что подтвердило статистически значимое различие в выборке пациентов в периоде дошкольного возраста, где наличие мутации в гене *TSC1* ассоциировано с вовлеченностью менее трех систем органов.

Технология молекулярной диагностики tuberозного склероза

Разработана технология комплексной ДНК-диагностики tuberозного склероза, которая состоит из 4 этапов.

Первый этап включает в себя анализ кодирующих последовательностей и прилежащих участков генов *TSC1* и *TSC2*, что позволяет выявлять такие мутационные события как однонуклеотидные замены, малые инсерции и делеции.

Вторым этапом анализа является подтверждение патогенности выявленных мутационных явлений. Интерпретация патогенности выявленных генетических вариантов включает анализ их наследования в родословных. Наличие редкого генетического варианта у пробанда с клиническими признаками tuberозного склероза при отсутствии его в ДНК из периферической крови родителей свидетельствует в пользу его патогенности. Анализ наследования мутаций в семьях проводили секвенированием соответствующих участков генов по Сэнгеру – более экономичным, по сравнению с ВПС, методом однолокусного анализа ДНК. Дополнительно, ресеквенирование по Сэнгеру обеспечивает валидацию находок ВПС независимым методом.

При отсутствии точковых мутаций, третьим этапом является выявление протяженных делеций исследуемых генов с помощью реакции лигазозависимой амплификации зондов (MLPA анализа).

Четвертый этап заключается в реанализе результатов ВПС для выявления мозаичных случаев, если предыдущие этапы не привели к выявлению гетерозиготной мутации генов *TSC1* или *TSC2* у пациента с характерным фенотипом ТС.

Молекулярно-генетическая характеристика спорадической ангиомиолипомы почки

Анализ опухолевых образцов спорадической ангиомиолипомы почки методом ВПС позволил выявить в 13 образцах (65%) патогенные соматические мутации в гене *TSC2*. В 4 образцах мутации были локализованы в других генах - *SETD2* в образце №2, *PDGFRA* и *STK36* в образце №3, *CDC73* в образце №13 и *MET* в образце №18 (табл. 5).

Суммарно было определено 16 точковых мутаций в гене *TSC2*. 56,25% мутаций (9) являются инделами, приводящими к сдвигу рамки считывания. 62,5% мутаций расположены в одной трети гена, с 7 по 19 экзон, где подавляющее большинство мутаций – инделы (табл. 5).

Таблица 5. Генотипы исследуемых образцов сАМЛ почки.

№ образца	Ген	нуклеотидная замена	аминокислотная замена	АЧ	ГП
1	не найдено				
2	<i>SETD2</i>	c.861delG	p.G287fs	0.07	623
3	<i>PDGFRA</i>	c.512delC	p.A171fs	0.11	626
	<i>STK36</i>	c.G2762A	p.G921D	0.21	621
4	<i>SYNE1</i>	c.3648delA	p.K1216fs	0.27	268
	<i>PIK3CD</i>	c.1040delT	p.L347fs	0.12	300
	<i>TSC2</i>	c.629dupC	p.A210fs	0.5	239
	<i>NF1</i>	c.6525delT	p.T2175fs	0.36	161
5	<i>TSC2</i>	c.1283delC	p.S428fs	0.48	699
6	не найдено				
7	<i>TOP1</i>	c.A668C	p.K223T	0.1	448
	<i>TSC2</i>	c.G4289A	p.W1430*	0.37	222
	<i>ITGB3</i>	c.C1417A	p.R473S	0.1	568
8	<i>TSC2</i>	c.1509_1510insGTCC	p.Q503fs	0.22	903
9	<i>TSC2</i>	c.2053delC	p.P685fs	0.27	520
10	<i>TSC2</i>	c.G1832A	p.R611Q	0.47	333
11	<i>TSC2</i>	c.884_885insCGT	p.A295delinsAV	0.28	2880
	<i>TSC2</i>	c.204delA	p.A68fs	0.23	886
12	<i>TSC2</i>	c.C1372T	p.R458*	0.22	247
13	<i>CDC73</i>	c.G3A	p.M1I	0.94	670
14	<i>TSC2</i>	c.1454delT	p.I485fs	0.25	252
	<i>TSC2</i>	c.C5126G	p.P1709R	0.24	140
15	<i>TSC2</i>	c.A1793G	p.Y598C	0.37	634
	<i>TSC2</i>	c.5171dupA	p.Q1724fs	0.36	53
16	<i>TSC2</i>	c.C4713A	p.Y1571*	0.21	600
17	<i>TSC2</i>	c.G4829A	p.W1610*	0.73	600
18	<i>MET</i>	c.G406A	p.V136I	0.48	322
19	не найдено				
20	<i>TSC2</i>	c.976-3_41del		0.41	980

Примечание: АЧ - аллельная частота (патогенного аллеля). ГП – глубина прочтения.

Методом ВПС в образцах сАМЛ почки было суммарно определено 12 хромосомных регионов с аллельным дисбалансом (табл. 6). Определен новый регион с аллельным дисбалансом при спорадической АМЛ почки 15q14-q15.1, в который входят гены *THBS1* и *BUB1B*. Также были обнаружены участки аллельного дисбаланса, которые покрывали всю 3 и 11 хромосому, что позволило заподозрить делецию данных хромосом. Метод ХМА подтвердил данные наблюдения.

Таблица 6. Выявленные регионы с потерей гетерозиготности в исследуемой выборке сАМЛ почки.

№ образца	Координаты участков хромосом с потерей гетерозиготности в соответствии с номенклатурой ISCN 2016
2	seq[CRch37/hg19]15q14q15.1(39884882_40494960)hmz
4	arr[CRch37/hg19]16p13.3(1988555_2448679)hmz
5	arr[CRch37/hg19]16p13.3(1925000_2120000)x1
7	seq[CRch37/hg19]16p13.3.p13.11(2129637_15839034)hmz
9	seq[CRch37/hg19]16p13.3.p12.1(2110608_27460360)hmz
10	seq[CRch37/hg19]16p13.3(2138218_2138422)hmz
13	arr[CRch37/hg19]1q23.1.q44(156500001_249250621)hmz
18	arr[CRch37/hg19] 3p26.3q27.3(61891-187040043)x1-2 arr[CRch37/hg19] 7q35(146631506_147643306)x1 arr[CRch37/hg19]10p15.3.p11.23(1_31300000)x1 arr[GRCh37]11p15.2q25(13396951_134938470)x1-2 arr[GRCh37]16q12.2q24.3(53484187_90155062)x1-2
17	seq[CRch37/hg19]16p13.3(2136360_3779115)hmz
19	seq[CRch37/hg19]16p13.3(2105335_2105400)hmz arr[CRch37/hg19]6q22.31.q25.2(118500001_152500000)x1
20	seq[CRch37/hg19]16p13.3(2110630_2110668)hmz

В исследуемой выборке биаллельная инактивация гена *TSC2* была зафиксирована в 71,42% образцов, в которых была обнаружена мутация в этом гене (10/14). Интересно, что в исследовании K.Giannikou и др. аллельный дисбаланс в качестве “второго удара” встречается только в двух случаях из 9 (22%), а в исследовании W.Qin и др. - в 3 случаях из 6 (50%) (в одном случае была зафиксирована амплификация гена *TSC1*, поэтому один образец не учитывается) (Qin et al. 2011). На основании этого можно предположить, что хромосомные перестройки все же являются более частым событием в опухолевой ткани сАМЛ, чем предполагается в исследовании K.Giannikou и др. (Giannikou et al. 2016).

Используемый алгоритм анализа образцов опухолей почки, имевших первичный клинично-морфологический диагноз сАМЛ, позволил уточнить диагноз и диагностировать в одном случае злокачественную опухоль (образец № 18) с мутацией в гене *MET*, а в другом - доброкачественную, входящую в симптомокомплекс наследственного опухолевого синдрома, ассоциированного с герминальными мутациями *CDC73* (образец №13). Таким образом, впервые продемонстрирован генетический полиморфизм новообразований почки, морфологически классифицируемых как АМЛ, и показана необходимость уточняющей молекулярно-генетической диагностики АМЛ с другими новообразованиями почки, независимо от степени злокачественности.

ВЫВОДЫ

1. В результате анализа нуклеотидной последовательности кодирующих участков генов *TSC1* и *TSC2* у 202 пробандов с туберозным склерозом молекулярно-генетическая причина заболевания выявлена в 96,5% случаев. В 147 (75,4%) случаях мутации локализованы в гене *TSC2*, в 48 (24,6%) - в гене *TSC1*. В исследуемой выборке в обоих генах наблюдались все типы генных мутаций – малые инделы, миссенс-мутации, нонсенс-мутации, мутации в сайтах сплайсинга, протяженные делеции. Спектр по типам мутаций в гене *TSC1* отличается от литературных данных ($p=0.024$): в исследуемой выборке чаще встречаются миссенс-мутации, и реже - мутации в сайтах сплайсинга. Спектр по типам мутаций в гене *TSC2* соответствует литературным данным ($p=0.129$).

2. Изучены фенотипические особенности пациентов с туберозным склерозом. Наиболее часто встречаются пациенты с четырьмя вовлеченными системами органов - 41,1% случаев. Наименее часто встречаются пациенты с вовлеченностью одной (6,1%) и пяти (6,7%) системами органов.

3. Проведенный гено-фенотипический анализ корреляций определил ряд закономерностей. При мутациях в гене *TSC2* у пациентов мужского пола гипопигментные пятна наблюдаются чаще, чем у женского ($p=0.03$). При мутациях в гене *TSC1* туберы наблюдаются чаще у пациентов женского пола, чем мужского ($p=0.03$). Первичные проявления в виде ангиофибром Прингля ($p=0.022$), ангиомиолипом почки ($p=0.025$), гамартом сетчатки ($p=0.006$), и субэпидемальных узлов/субэпендимальных гигантоклеточных астроцитом ($p=0.004$) встречаются чаще при мутациях в гене *TSC2*, чем в гене *TSC1*. Анализ групп пациентов разных возрастных периодов выявил статистически значимые различия в группе дошкольного возраста ($p = 0.009$), в которой количество вовлеченных систем органов при мутациях в гене *TSC1* ниже, чем при мутациях в гене *TSC2*, что подтверждает более тяжелое клиническое течение при мутациях в гене *TSC2*.

4. Разработана медицинская технология молекулярно-генетической диагностики туберозного склероза, включающая последовательные этапы таргетного высокопроизводительного параллельного секвенирования (ВПС) генов *TSC1* и *TSC2*, реанализа результатов ВПС для выявления мозаичных случаев и секвенирования ДНК по Сэнгеру и мультиплексной амплификации лигированных зондов (MLPA).

5. Впервые в образцах спорадической ангиомиолипомы почки с отсутствием драйверных мутаций генов *TSC1* или *TSC2* обнаружены мутации в генах *SETD2*, *PDGFRA* и *STK36*, а также ранее не описанные хромосомные регионы с аллельным дисбалансом (15q14-q15.1 и 6q22.31-q25.2) маркирующие новые области поиска генов, вовлеченных в этиопатогенез заболевания.

6. Для доброкачественной опухоли - спорадической ангиомиолипомы почки - соблюдается двухударная модель канцерогенеза: в 10 из 14 (71,42%) исследованных опухолей с мутациями гена *TSC2* выявлена биаллельная инактивация этого гена.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

11. Проведенное исследование по анализу мутационного профиля генов *TSC1* и *TSC2* позволило разработать молекулярно-генетическую технологию анализа пациентов с ТС или же с подозрением на него, которая включает последовательные этапы: глубокое таргетное секвенирование генов *TSC1* и *TSC2* методом высокопроизводительного параллельного секвенирования, сегрегационный анализ для выявления семейных случаев ТС или определения статуса мутации “de novo” методом прямого секвенирования по Сэнгеру, подтверждение статуса патогенности согласно руководству по интерпретации

данных, полученных методами массового параллельного секвенирования, MLPA, реанализ результатов ВПС для выявления мозаичных случаев.

2. Так как 93,3% случаев мутаций являются точковыми мутациями, следует начинать генетический анализ ТС с секвенирования генов *TSC1* и *TSC2* методом ВПС.

3. При наличии поликистозной болезни почек рекомендуется проведение в первую очередь анализа гена *TSC2* методом MLPA с включением зондов к последовательности гена *PKD1*.

4. С учетом возможности соматического мозаицизма (6,15% пациентов) по патогенной мутации, очень важную роль играет тщательное клиническое обследование пробанда с привлечением дополнительных клинических методов обследования, позволяющих выявить все первичные и вторичные проявления ТС.

5. Высокая частота *de novo* мутаций (85% случаев) при ТС требует более тщательного фенотипического анализа ближайших кровных родственников с дополнительными клиническими исследованиями, включающими методы, позволяющие определить все первичные и вторичные проявления ТС, и клинико-генеалогического анализа.

6. Проявления лишь в одной системе органов, характерные для ТС, являются достаточными для проведения пробанду молекулярно-генетического анализа генов *TSC1* и *TSC2*.

7. Необходимо проведение дифференциальной молекулярно-генетической диагностики опухолей почки, морфологически мимикрирующих под АМЛ и не несущих драйверных мутаций в генах *TSC1* или *TSC2*, для уточнения клинического диагноза и корректировки лечения и медико-генетического консультирования.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Кузнецова Е.Б., Мосякова К.М., Танас А.С., Чаплыгина М.С., Алексеева Е.А., Шпоть Е.В., Аношкин К.И., Залетаев Д.В., Винаров А.З., Стрельников В.В. Опыт использования высокопроизводительного параллельного секвенирования ДНК для характеристики молекулярно-генетических особенностей ангиомиолипом почки // Клиническая нефрология. 2016. - № 1. – С. 29-32.

2. Аношкин К.И., Карандашева К.О., Танас А.С., Бессонова Л.А., Демина Н.А., Петухова М.С., Анисимова И.В., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. Медицинская технология комплексной ДНК-диагностики туберозного склероза. Медицинская генетика. 2018. - Т.17. №8. - С. 32-37. DOI: 10.25557/2073-7998.2018.08.32-37.

3. Аношкин К.И., Мосякова К.М., Карандашева К.О., Пьянков Д.В., Канивец И.В., Кузнецова Е.Б., Танас А.С., Шпоть Е.В., Винаров А.З., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. Новые регионы с потерей гетерозиготности участков хромосом при спорадической ангиомиолипоме почки // Медицинская генетика. 2018. - Т. 17. №9. – С. 45-50. DOI: 10.25557/2073-7998.2018.09.45-50

4. Аношкин К. И., Карандашева К.О., Горячева К.М., Шпоть Е.В., Винаров А.З., Залетаев Д.В., Танас А.С., Стрельников В.В. Герминальные и соматические мутации генов, вовлеченных в опухолеобразование, при спорадической ангиомиолипоме почки // Генетика, 2019, - Т. 55, №.9, - С. 1059–1065. DOI: 10.1134/S0016675819090029 (SCOPUS, WoS)

Публикации в других изданиях:

1. **Аношкин К. И.**, Кузнецова Е. Б., Мосякова К. М., Танас А. С., Чаплыгина М. С., Алексеева Е. А., Шпоть Е. В., Залетаев Д. В., Винаров А. З., Стрельников В. В. Молекулярно-генетические особенности ангиомиолипомы почки // Журнал «Успехи молекулярной онкологии». – 2015. – С. 41.

2. **Anoshkin K.I.**, Kuznetsova E.B., Mosyakova K.M., Tanas A.S., Chaplygina M.S., Alekseeva E.A, Shpot E.V., Zaletayev D.V., Vinarov A.Z., Strelnikov V.V.// Frequent mutations in renal angiomyolipoma // 21st International Charles Heidelberger symposium on cancer research, P.40-41.

3. **Аношкин К.И.**, Кузнецова Е.Б., Мосякова К.М., Танас А.С., Чаплыгина М.С., Алексеева Е.А., Шпоть Е.В., Залетаев Д.В., Винаров А.З., Стрельников В.В. Соматические и герминальные мутации при ангиомиолипоме почки // Лаборатория. – 2016. - №1. – С. 4.

4. **Аношкин К.И.**, Кузнецова Е.Б., Мосякова К.М., Танас А.С., Чаплыгина М.С., Алексеева Е.А., Шпоть Е.В., Залетаев Д.В., Винаров А.З., Стрельников В.В. Молекулярно-генетические аспекты ангиомиолипомы почки // Сборник тезисов XI Международной (XX Всероссийской) Пироговской научной конференции студентов и молодых ученых. – 2016. – С. 314-315.

5. **Аношкин К.И.**, Танас А.С., Мосякова К.М., Винаров А.З., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. «Комплексная ДНК-диагностика туберозного склероза и его осложнений» // Лабораторная Служба. Материалы III Российского конгресса лабораторной медицины, научно-практический журнал, №3'2017, том 6. с. 101.

6. **Аношкин К.И.**, Танас А. С., Мосякова К. М., Карандашева К. О., Винаров А. З., Залетаев Д. В., Стрельников В. В. // Сборник Научных Работ III Петербургского Международного Онкологического Форума "Белые Ночи 2017" - 2017. С. 130-131.

7. **Anoshkin K.I.**, Pachenko M.S., Piankov D.V. Comprehensive DNA diagnostics of tuberous sclerosis and its complications // Сборник тезисов «XII Международная (XXI Всероссийская) Пироговская медицинская конференция студентов и молодых ученых» - 2017. - С. 61-62.

8. **Аношкин К.И.**, Кузнецова Е.Б., Мосякова К.М., Танас А.С., Пащенко М.С., Алексеева Е.А., Шпоть Е.В., Залетаев Д.В., Винаров А.З., Стрельников В.В. Потери гетерозиготности при спорадической ангиомиолипоме почки // Сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2017» - 2017. – Т. 2. – С. 291-292.

9. **Аношкин К.И.** Выявление новых соматических мутаций при спорадической ангиомиолипоме почки // Сборник тезисов конференции молодых ученых ФГБНУ «МГНЦ» - 2017. – С. 2.

10. **Anoshkin K.I.**, Vasilyev I.A., Mosyakova C., Tanas A.S., Karandasheva K., Bagmet N., Karagyozyan G.A., Doludin Y.V., Kuznetsova E.B., Gurevich L., Vinarov A., Zaletayev D.V., Sekacheva M., Strelnikov V.V. 74P Mutations in *TSC1/TSC2* genes are prevalent in sporadic renal angiomyolipoma and insulinoma tumors, supporting their responsiveness to mTOR inhibitors // *Annals of Oncology*, - 2018, Vol. 29, Issue suppl_6, mdy314.015. DOI: 10.1093/annonc/mdy314.015

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

A3 – аминокислотная замена

AMJ – ангиомиолипома почки

AЧ – аллельная частота

ВПС - высокопроизводительное параллельное секвенирование

ГП – глубина прочтения

ЛАМ – лимфоангиомиолеоматоз

ПААГ – полиакриламидный гель

cAMJ – спорадическая ангиомиолипома почки

СЭГА - субэпидемальная гигантоклеточная астрацитома

СЭУ - субэпидемальные узлы

ТС- туберозный склероз

ХМА - Хромосомный микроматричный анализ

MLPA - мультиплексная амплификация лигированных зондов

NMI- мутаций не найдено

SNV - однонуклеотидные генетические варианты