

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

СЛУЧАЙ ПАЦИЕНТА С ДИАГНОЗОМ “ОВИН?”: ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕТЕРОЗИГОТНОЙ МИССЕНС-МУТАЦИИ E1021K В ГЕНЕ PIK3CD С ПОМОЩЬЮ ЭКЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

© 2018 г. М. А. Гордукова^{1*}, А. А. Кечин^{2,3}, С. Б. Зимин¹,
И. Ю. Серпокрялова^{3,4}, М. Л. Филипенко^{2,3}, А. П. Продеус^{1,5}

*E-mail: ma.gordukova@dgkb-9.ru

¹ГБУЗ “ДГКБ № 9 им. Г.Н. Сперанского ДЗМ”, Москва, Россия;

²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия;

³Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия;

⁴ООО Биоссет, Новосибирск, Россия;

⁵Университетская клиника детских болезней РНИМУ им Н.И. Пирогова, Москва, Россия

Поступила: 16.12.2017. Принята: 25.01.2018

Полноэкзомное секвенирование было проведено с целью установления окончательного диагноза 17-летнему мальчику (НС), имевшему в анамнезе признаки общей вариабельной иммунной недостаточности (ОВИН), рецидивирующие легочные инфекции, хроническую вирусную ЭБВ, лимфаденопатию, снижение субкласса IgG3 и отсутствие субкласса IgG4, многократно госпитализированного в отделение иммунопатологии многопрофильного стационара. Мы показали наличие гетерозиготной миссенс-мутации E1021K в гене PIK3CD, кодирующем p110d (с.3061G > A [p.E1021K]). Присутствие данной мутации в геноме пациента было подтверждено с помощью секвенирования по Сэнгеру, а ее отсутствие в образцах ДНК от родителей пациента свидетельствует о возникновении этой мутации de novo. Другие мутации в генах, задействованных в функционировании иммунной системы, также были подтверждены секвенированием по Сэнгеру, включая TLR3 p.L412F, TNFRSF1A p.R121Q (rs4149584), ассоциированные с периодической болезнью.

Ключевые слова: экзом, секвенирование, общая вариабельная иммунная недостаточность (ОВИН), первичные иммунодефициты (ПИД), NGS, PIK3CD, p110d

DOI: 10.7868/S1028722118010070

Адрес: 123317, г. Москва, Шмитовский проезд, 29, Гордукова Мария Александровна. Тел.: 89262913865.

E-mail: ma.gordukova@dgkb-9.ru

Авторы:

Гордукова М.А., биолог, клиническая диагностическая лаборатория ДГКБ № 9 им. Г.Н. Сперанского ДЗМ, Москва, Россия;

Кечин А.А., инженер в лаборатории фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия;

Зимин С.Б., заведующий отделением Иммунопатологии ДГКБ № 9 им. Г.Н. Сперанского ДЗМ, Москва, Россия;

Серпокрялова И.Ю., инженер, ООО Биоссет, Новосибирск, Россия;

Филипенко М.Л., к.б.н., заведующий лабораторией фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия;

Продеус А.П., д.м.н., профессор, врач педиатр-иммунолог, главный специалист по педиатрии, директор университетской клиники РНИМУ им Н.И. Пирогова, ГБУЗ Детская городская клиническая больница № 9 им. Г.Н. Сперанского ДЗ Москвы, Москва, Россия;

ВВЕДЕНИЕ

Общая вариабельная иммунная недостаточность (ОВИН) представляет собой большую гетерогенную группу первичных иммунодефицитов. Наиболее важной чертой ОВИН является гипогаммаглобулинемия, которая приводит к повышению восприимчивости к инфекциям. ОВИН характеризуется различными молекулярными фенотипами и нарушением врожденного и адаптивного иммунного ответа [1]. Существуют различные типы классификации ОВИН, основанные на данных иммунофенотипирования субпопуляций Т- и В-лимфоцитов и клинической манифестации заболевания [2]. Однако выделяемые группы остаются генетически гетерогенными, так что остается вопрос о конкретном молекулярном механизме, дефект

Таблица 1. Показатели гуморального звена (общие сывороточные иммуноглобулины классов IgA, IgM и IgG).

Дата	IgA	IgM	IgM (норма)	IgG	IgG (норма)
24.01.13	2,67	6,80	0,6–2,0	6,95	8,2–10,7
04.02.13	3,12	7,61	0,6–2,0	10,01	8,2–10,7
05.03.13	2,93	7,03	0,6–2,0	7,10	8,2–10,7
06.06.13	3,21	8,08	0,6–2,0	6,81	8,2–10,7
08.08.13	3,38	7,16	0,6–2,0	7,45	8,2–10,7
14.05.14	1,70	2,80	0,6–2,0	5,73	8,2–10,7
15.01.15	1,31	2,40	1,0–2,7	5,23	8,5–14,6
06.05.15	1,16	1,55	1,0–2,7	4,41	8,5–14,6
02.07.15	1,05	1,46	1,0–2,7	3,97	8,5–14,6
02.09.15	1,23	1,67	1,0–2,7	4,44	8,5–14,6
07.10.15	1,26	1,77	1,0–2,7	5,50	8,5–14,6
15.12.15	1,09	1,39	1,0–2,7	4,84	8,5–14,6
14.01.16	1,06	1,56	1,0–2,7	4,95	8,5–14,6

Примечание: Полужирным шрифтом выделены значения, отличные от нормальных по возрасту.

которого привел к развитию синдрома [3]. Значительный прогресс в технологии секвенирования привел к обнаружению множества новых генов, мутации в которых связаны с развитием ОВИН, но до сих пор этими мутациями можно объяснить патогенез только у части пациентов. Более того, размытость клинической манифестации большого количества ОВИН-подобных синдромов часто не дает информации о природе генетического дефекта. В свою очередь, это затрудняет поиск клинически значимой мутации и постановку диагноза. Стремительно ворвавшееся в клиническую практику секвенирование экзома человека с помощью массового параллельного секвенирования или секвенирования следующего поколения (NGS) отчасти позволяет решить эту проблему путем определения нуклеотидной последовательности кодирующей белки области генома, где локализовано до 85% мутаций, вызывающих моногенные заболевания [4]. В представляемом исследовании мы применили экзомное секвенирование для расшифровки механизмов патогенеза ОВИН-подобного синдрома у 17-летнего мальчика.

КЛИНИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ

Мальчик в возрасте 17 лет 10 мес. (дата рождения 23.01.1998) был госпитализирован в ДГКБ № 9 им. Г.Н. Сперанского, Москва. Ребенок от 4-й беременности, протекавшей с гестозом, угрозой прерывания на 6 и 14 неделе, был рожден путем кесарева сечения на 35 неделе. При рождении масса ребенка была 2600г,

рост составил 44см, оценка по Апгар 6/7 баллов. В течение 2-х первых недель жизни находился на ИВЛ. Выписан с диагнозом: перинатальное поражение ЦНС; нарушение мозгового кровообращения; гипертензионно-гидроцефальный синдром; судорожный синдром; конъюгационная желтуха; двусторонняя мелкоочаговая пневмония. До 1 года рос и развивался с отставанием в физическом и психомоторном развитии, перенес острый энтероколит, ОРВИ.

С 2-х лет наблюдается прогрессирующий лимфопролиферативный синдром, ассоциированный с персистирующей ЭБВ-инфекцией. ЭБВ-инфекция приводила к аутостимуляции В-лимфоцитов и к выработке повышенного количества сывороточного IgM. По результатам гистологического исследования биоптатов лимфоузлов данных за злокачественное заболевание не получено. В 7 лет впервые проведено развернутое иммунологическое обследование, по результатам которого был исключен аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (клинически увеличение размеров всех групп лимфоузлов и гепатоспленомегалия) с учетом умеренной гипогаммаглобулинемии (табл. 1) и нарушениями в В-клеточном звене, и верифицирован диагноз ОВИН. На протяжении 3-х лет в динамике пациенту были проведены в параллели иммунофенотипирование и количественная оценка молекул TREC (эксцизионное кольцо Т-клеточного рецептора) и KREC (рекомбинационное кольцо каппа-делеционного элемента) в периферической крови (табл. 2). Выявлена активная персистирующая ЭБВ-инфекция. На фоне регулярной длительной заместительной терапии внутривенными

Таблица 2. Результаты количественного определения молекул TREC и KREC в периферической крови пациента в динамике

Возраст, лет	Дата анализа	TREC на 10^5 кл	KREC на 10^5 кл
15,55	08.08.2013	2,53E + 04	8,94E + 03
15,87	03.12.2013	4,71E + 03	1,84E + 03
16,01	24.01.2014	1,39E + 04	5,84E + 03
16,32	17.05.2014	5,51E + 03	1,38E + 04
16,99	15.01.2015	1,56E + 03	2,84E + 03
17,29	06.05.2015	5,65E + 03	2,09E + 04
17,90	15.12.2015	6,35E + 03	1,79E + 04

Примечание: Нормальное количество TREC в цельной крови в возрастной группе от 12 до 18 лет – $2,3 \times 10^3$ – $2,5 \times 10^4$ на 10^5 клеток

Нормальное количество KREC в цельной крови в возрастной группе от 12 до 18 лет – 1×10^3 – 1×10^5 на 10^5 клеток

Полужирным цветом выделено значение TREC, отличное от нормального по возрасту.

иммуноглобулинами получен контроль над реактивацией ЭБВ-инфекцией со снижением проявлений лимфопролиферативного синдрома и сывороточного IgM до нормального значения. Значительное повышение количества незрелых и транзиторных В-клеток с фенотипами CD19CD21^{low} и CD19IgM^{hi}CD38^{hi} до 70% и более от общей популяции В-лимфоцитов, снижение количества наивных Т-лимфоцитов и пограничный уровень TREC являлись основанием для проведения полноэкзомного секвенирования этому пациенту.

МЕТОДЫ

Полноэкзомное секвенирование было проведено с помощью селекции экзомных последовательностей набором SureSelect V4 51 Mbp (Agilent) и секвенированием полученной библиотеки на платформе Illumina HiSeq2000 в центре секвенирования BGI. С полученными прочтениями было построено выравнивание на референсный геном человека версии hg19 с помощью алгоритма Burrows-Wheeler Aligner [5]. Локальное выравнивание, повторная калибровка по качеству прочтений, выявление вариаций и аннотация SNV/Indel были выполнены с использованием Genome Analysis Tool Kit (GATK) (версия 3) [6] и wAnnotar [7,8]. Мутации описывали согласно методическим рекомендациям по номенклатуре общества вариаций генома человека (www.hgvs.org/mutnomen) [9]. Приоритизацию мутаций выполнили путем фильтрации исходящего файла с помощью скрипта и собственной базы данных по генам, задействованным в развитии ОВИН, и базы данных ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).

Для подтверждения наличия мутаций, выявленных с помощью NGS, ПЦР-фрагменты были подвергнуты секвенированию по Сэнгеру на приборе 3730XL с использованием набора BigDye Taq FS Terminator V 3.1. Секвенирование по Сэнгеру применяли также для выяснения вопроса о наличии выявленных в ходе NGS мутаций в геномах родителей и брата пациента.

Для экстракции ДНК из периферической крови применяли комплект реагентов “РИБО-преп” (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, Москва) согласно инструкции производителя с элюцией в 100 мкл РНК-буфера. Количественный анализ TREC и KREC выполняли с помощью мультиплексной ПЦР в режиме реального времени с использованием набора реагентов “БиТ-тест” (ООО “АБВ-ТЕСТ”, Москва), как описано в [10]. Количество копий TREC и KREC рассчитывали на 10^5 лейкоцитов по формуле: количество TREC (KREC) = (кол-во копий TREC(KREC) на мл / кол-во копий Albumin)*200000, подразумевая, что в каждой клетке содержится две копии гена ALB.

С целью поиска мутации с.3061G > А в гене PIK3CD в группах пациентов с диагнозами: ОВИН и ОВИН?, гипогаммаглобулинемия, дефицит субклассов IgG и гипер-IgM синдром, были использованы архивные образцы ДНК, полученные из цельной крови пациентов, которым был назначен анализ на определение TREC/KREC.

Для скринингового исследования по выявлению мутации с.3061G > А в гене PIK3CD использовали ПЦР в режиме реального времени со следующими условиями амплификации: реакционная смесь в объеме 20 мкл содержала 20–50 нг ДНК, 1x PCR Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), по 300 нМ прямого PIK3CD-1U 5'-А

Таблица 3. Результаты отчета по качеству NGS

		Пациент (НС)
Общая длина отобранных для анализа участков (экзомные последовательности)	Mb	6092.48
% исследуемых регионов с покрытием > 10	%	97.40%
Среднее покрытие исследуемого региона (%)	%	99.70%
Общее количество SNPs		84563
Общее количество INDELs		9610

GGAGGGCACTGAAGCACTTCC-3' и обратного PIK3CD-2R 5'-CCAGCCAGTTCACTTTGGTTTTC-3' праймеров, и по 100 нМ флуоресцентно-меченных зондов PIK3CD-PA 5'-FAM-ACAAAGCCCTCCGTGAGAGC-BHQ-3', PIK3CD-PG 5'-HEX-ACGAAGCCCTCCGTGAGAGC-BHQ-3' и 5'-HEX-ACGAAGCCCTCCGTGAGAGC-BHQ-3'. Реакцию проводили на приборе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) по программе амплификации: 95°C – 5 мин., 42 цикла 95°C – 15 с и 60°C – 20 с.

Для подтверждения выявленных с помощью NGS мутаций в геномах родственников и других пациентов применяли амплификацию участков, содержащих эти мутации у пациента, с интеркалирующим красителем и дальнейшим плавлением с высоким разрешением продуктов амплификации (HRM): локусы PIK3CD и TNFRSF1A. HRM-анализ проводили в объеме 20 мкл, содержащем 10 мМ трис-HCl (pH 8,9); 50 мМ хлорида калия; 2,5 мМ хлорида магния; 0,01% Твин 20; 0,2 мМ дНТФ; 0,5 мкМ растворов олигонуклеотидных праймеров PIK3CD-2R5'-CCAGCCAGTTCACTTTGGTTTTC-3' и

PIK3CD-3U 5'-CCGCTGTGATTTGTTTGCAG-3', TNFRSF1A-U5'GCTGCGCTCACAGGAGAGG-3' и TNFRSF1A-R5'-GAAATGGGTCAGGTGGAGATC-3', 2,5 мМ SYTO9 и 1 ЕД/акт Taq-полимеразы. Реакцию проводили на амплификаторе LightCycler96 (Roche, USA) с начальной денатурацией при 96°C 3 мин., далее в течение 35 циклов с денатурацией при 95°C 5 с, отжигом праймеров при температуре 60°C в течение 5 с и синтезом при 72°C 5 с. Для анализа кривой плавления ПЦР смесь нагревали до 96°C 5 мин., далее инкубировали 1 мин. при температуре 60°C и проводили плавление со скоростью 0,2°C на один шаг снятия флуоресцентного сигнала до 96°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате экзомного секвенирования и анализа данных было выявлено 84563 однонуклеотидных замен (SNP's), а общее число инсерций и делеций составило 9610 по сравнению с референсным геномом человека (сборка hg19). Сводные данные из отчета по качеству и выявленных вариациях представлены в табл. 3.

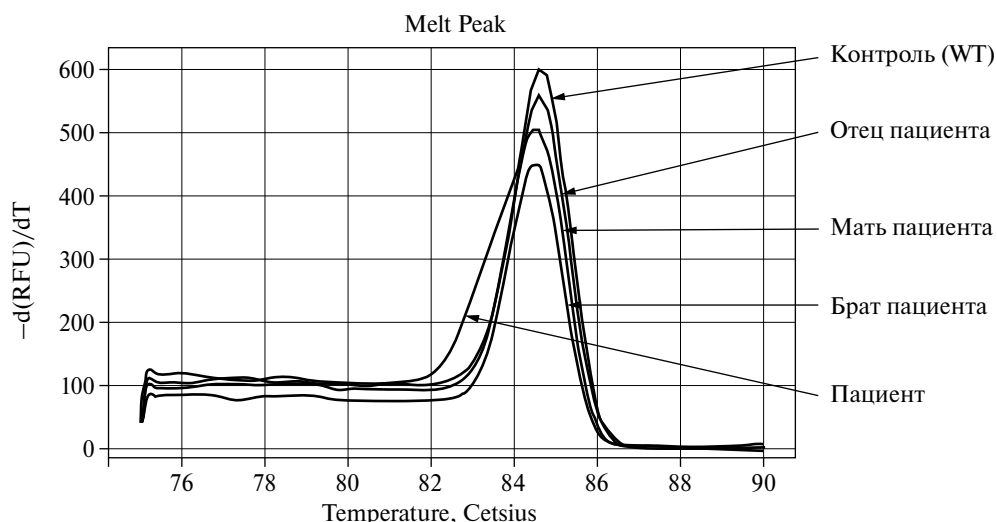


Рис. 1. Результаты анализа плавления с высоким разрешением: гетерозиготная мутация NM_005026.3(PIK3CD): c.3061G >A (p.Glu1021Lys) у пациента НС, отсутствие мутации у родителей и брата пациента

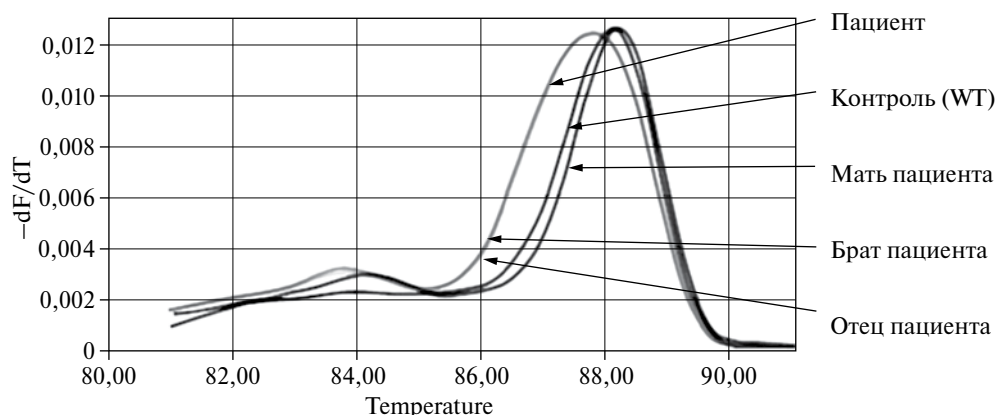


Рис. 2. Результаты анализа плавления с высоким разрешением: мутация TNFRSF1A с.362G > A обнаружена также у брата и отца пациента НС.

Мы обнаружили в геноме пациента с диагнозом “ОВИН?” гетерозиготную миссенс-мутацию E1021K в гене PIK3CD, который кодирует δ -субъединицу фосфоинозитол-3-киназы p110d (с.3061G > A [p.E1021K]). Наличие этой мутации у пациента было подтверждено с помощью секвенирования по Сэнгеру и путем амплификации целевого фрагмента с интеркалирующим красителем и дальнейшим его плавлением с высоким разрешением (HRM) (рис. 1), при этом E1021K отсутствовала в образцах геномной ДНК от обоих родителей, что позволяет классифицировать эту мутацию как возникшую *de novo*. Другие мутации в генах, задействованных в работе иммунной системы, также были выявлены с помощью NGS и подтверждены секвенированием по Сэнгеру, включая TLR3 p.L412F, TNFRSF1A p.R121Q (rs4149584), ассоциированные с периодической болезнью. Мутация TNFRSF1A p.R121Q обнаружена также у брата и отца пациента с помощью HRM (рис. 2). Кроме того, были найдены мутации в генах, ассоциированных с развитием ОВИН, таких как DOCK8 и SPINK5, однако, это были слишком частые мутации, которые согласно данным проекта “1000 геномов” встречаются с частотой более 1%, чтобы их можно было расценивать как вредные. Эти и дополнительные клинически значимые или потенциально значимые структурные варианты, идентифицированные в данном исследовании с помощью NGS, приведены в табл. 4.

В связи с тем, что ранее было описано, что активирующая аутосомно-доминантная мутация в гене PIK3CD ассоциирована с комбинированным иммунодефицитом, характеризующимся рецидивирующими синопульмональными инфекциями, лимфопенией CD4+, сокращением

количества переключенных В-лимфоцитов памяти, лимфаденопатией, CMV и/или EBV вирусемией, и при этом у части пациентов был повышен уровень сывороточных IgM, то были исследованы пациенты с гипер-IgM синдромом. У трех таких пациентов из двух несвязанных семей было выявлено гетерозиготное носительство мутации в PIK3CD [11]. В то же время, показано, что у пациентов, несущих мутацию в гене PIK3CD, наблюдается характерная дисрегуляция в В-клеточном звене, а именно, увеличение количества транзиторных клеток и плазмобластов, увеличение фосфорилирования киназы АКТ и частоты апоптоза. Таким образом, генетический дефект в PI3K δ нарушает дифференцировку и созревание В-лимфоцитов, что приводит к гипогаммаглобулинемии и рецидивирующим инфекциям [12]. При этом, в 2015 году Elgizouli с соавт. была выполнена работа по поиску точечных мутаций в гене PIK3CD у 669 пациентов с ПИД, среди которых были преимущественно пациенты с диагнозом ОВИН, а также были исследованы пациенты с аутоиммунным лимфопролиферативным синдромом (АЛПС), у которых не был идентифицирован дефект в Fas-апоптотическом пути, с гипер-IgM синдромом, со специфическим антительным дефицитом, комбинированным иммунодефицитом, селективным дефицитом IgA, агаммаглобулинемией и другими минорными антительными дефицитами. В итоге, мутации в гене PIK3CD были обнаружены у 3 родственных пациентов с диагнозом ОВИН и в двух спорадических случаях комбинированного иммунодефицита [13]. В связи с этим любопытно было посмотреть, встретится ли и с какой частотой выявленная мутация E1021K в гене PIK3CD у пациента с диагнозом “ОВИН?”

Таблица 4. Характеристика выявленных с помощью NGS мутаций у пациента НС

Хромосома	1	12	4	9	5
Позиция	9787030	6442643	187004074	271638, 286491, 286593	147466001, 147475386, 147477551, 147480027, 147480080, 147480955, 147498019
Название гена refseq	<i>PIK3CD</i> NM_005026	<i>TNFRSF1A</i> NM_001065	<i>TLR3</i> NM_003265	<i>DOCK8</i> NM_203447	<i>SPINK5</i> NM_001127698
Референсная последовательность ПРОБАНД: количе- ство ридов, совпав- ших с референсной последовательностью	G	C	C	C, G, A	G, A, C, G, G, A, G
ПРОБАНД: альтерна- тивный аллель ПРОБАНД: количе- ство ридов с альтерна- тивным аллелем	4	47	46	26, 8, 13	9, 12, 21, 18, 3, 18, 47
Другие обследован- ные родственники (NGS или секвени- рование по Сэнгеру) и результат	A	T	T	T, A, A	A, G, T, A, A, G, A
	5	23	38	11, 14, 11	23, 9, 21, 7, 13, 17, 34
	Отец: отсутствует (Сэнгер) Мать: отсутству- ет (Сэнгер) Сиблинг 2: отсут- ствует (Сэнгер)	Отец: присут- ствует (Сэнгер) Мать: отсутству- ет (Сэнгер) Сиблинг 2: присут- ствует (Сэнгер)	Отец: от- сутствует (Сэнгер) Мать: при- сутствует (Сэнгер) Сблинг: от- сутствует (Сэнгер)		
Тип мутации Мутация: ДНК (номенклатура HGVS_c.)	миссенс с.3061G>A	миссенс с.362G>A	миссенс с.1234C>T	все миссенс с.65C>T, с.187G>A, с.289C>A	все миссенс с.316G>A, с.800A>G, с.1004C>T, с.1103G>A, с.1156G>A, с.1258A>G, с.2132G>A
Мутация: белок (номенклатура HGVS_p.)	p.Glu1021Lys	p.Arg121Gln	p.Leu412Phe	p.Ala22Val, p.Asp63Asn, p.Pro97Thr	p.Asp106Asn, p.Gln267Arg, p.Ala335Val, p.Ser368Asn, p.Asp368Asn, p.Lys420Glu, p.Arg711Gln
Предсказание < SIFT	Повреждающая	Толерантная	Повреждаю- щая	Поврежда- ющая, то- лерантная, Повреждающая	Все толерантные
Предсказание < < PolyPhen-2	Возможно повреждающая	Возможно по- вреждающая / легкая форма	Возможно по- вреждающая	Легкая фор- ма, Возмож- но повреждаю- щая, Возможно повреждающая	Все легкая форма
Предсказание < LRT	Повреждающая	Нейтральная	Нейтральная	-, -, Повреждающая	Все нейтральные
Предсказание < < MutationTaster	Вызывающая болезнь	Полиморфизм	Полиморфизм	Все полиморфизмы	Все полиморфизмы

Таблица 4 (окончание)

Хромосома	1	12	4	9	5
Предсказание < < MutationAssessor	Нефункциональная	Нефункциональная	Функциональная	Нефункциональная, Функциональная, Функциональная	Все нефункциональные
Предсказание < < FATHMM	Толерантная	Повреждающая	Толерантная	Все толерантные	Все толерантные
Предсказание < < RadialSVM	Повреждающая	Толерантная	Толерантная	Все толерантные	Все толерантные
Предсказание < LR	Повреждающая	Толерантная	Толерантная	Все толерантные	Все толерантные

у других пациентов с ПИД, госпитализированных в Отделение иммунопатологии ДГКБ № 9 в период с апреля 2013 по август 2016 года. Методом ПЦР в режиме реального времени с конкурирующими аллель-специфичными Taq-man зондами на наличие мутации в гене PIK3CD были исследованы образцы ДНК от 47 пациентов с диагнозом ОВИН и “ОВИН?”, 39 пациентов с диагнозом гипогаммаглобулинемия или дефицит субклассов IgG и 10 пациентов с диагнозом гипер-IgM синдром. Во всех случаях данная мутация отсутствовала в геномах исследуемых пациентов. Представленные данные свидетельствуют о том, что эта мутация менее распространена в российской популяции по сравнению с европейской.

ОБСУЖДЕНИЕ

Синдром активированной фосфоинозитол 3-киназы- δ (PI3K δ ; APDS синдром) был описан недавно как ПИД нового типа, в основе которого лежит гетерозиготная мутация приобретения функции (активирующая мутация) в гене PIK3CD или мутация потери функции в регуляторной субъединице p85 α (PIK3R1) (инактивирующая мутация). Эти мутации обнаруживались у пациентов со сходными клиническими признаками, но не среди здоровых людей [14]. Для пациентов с этим синдромом характерны клинические проявления как иммунодефицитного состояния, так и иммунной дисрегуляции.

Было показано, что отличительными чертами этого типа ПИД являются рецидивирующие респираторные инфекции, прогрессирующая лимфопения, увеличение в циркуляции транзиторных В-лимфоцитов, увеличение сывороточного IgM, нарушенный антительный синтез, снижение уровня IgG2 и слабый ответ на вакцинацию. Часто встречаются

тяжелые рецидивирующие и хронические инфекции герпес вирусами, в частности, вирусом Эпштейна-Барр (EBV), простого герпеса (HSV), ветряной оспы (VZV) или цитомегаловирусом (CMV). Синдром также характеризуется увеличенной склонностью к формированию абсцессов, в основном вызванных *Staphylococcus aureus*. Доброкачественная пролиферация лимфоцитов — лимфаденопатия, гепатоспленомегалия и узловая лимфоидная гиперплазия — также входят в симптомокомплекс при синдроме активированной PI3K δ [12–16]. Кроме того, Kracker с соавт. предположил наличие предрасположенности к новообразованиям у таких пациентов за счет конститутивно активированной PI3K δ [17].

В представленной работе мы описали клинический случай 17-летнего пациента, которому удалось установить окончательный диагноз в результате полноэкзомного секвенирования. Клинические проявления у данного пациента не противоречили описанной ранее клинической картине у пациентов с активирующей мутацией в гене PIK3CD, но и не являлись типичными, что не позволило лечащему врачу предположить APDS синдром только на основании клинических данных. В реальной практике часто имеются серьезные трудности в установлении возможных генетических дефектов в связи с их большим количеством и вариативностью клинических проявлений, так как одни и те же мутации могут проявляться по-разному у разных пациентов. Заболевания, связанные с мутациями потери функции гена, часто сложно заподозрить клинически, но еще в большей степени это касается активирующих мутаций.

У описываемого нами пациента имели место как нарушения регуляции пролиферации клеточного звена, манифестирующие

лимфопролиферативным синдромом и низким уровнем антител (IgG менее 7 г/л), так и нарушения специфического ответа, как к вирусным, так и бактериальным патогенам. В этой ситуации метод экзомного секвенирования послужил нам единственным адекватным способом для верификации генетического дефекта с целью прогнозирования течения заболевания и выбора тактики лечения. Более того, представляется важным выяснение других возможных генетических особенностей пациента для более полного понимания, прогноза и оценки влияния основной мутации.

В описываемом нами случае пациент имеет еще две мутации в гетерозиготном состоянии, которые потенциально могут взаимодействовать с активированным PIK3 сигнальным путем и, таким образом, быть также значимыми для его клинического состояния. Прежде всего, это мутация в гене кодирующем TNF-рецептор. Миссенс-мутации во внеклеточном домене TNFR1 нарушают фолдинг и протеолиз рецептора, что приводит к развитию TNFR-ассоциированного периодического синдрома (TRAPS, OMIM 142680). TRAPS представляет собой аутосомно-доминантное аутовоспалительное заболевание, для которого характерны длительные приступы лихорадки и воспаление мягких тканей. Частый вариант R92Q (rs4149584; c.362G > A; p.Arg121Gln) встречается в 5% общей популяции. Вариант умеренно влияет на нормальные функции TNFR1 и ассоциирован с атипичным воспалительным фенотипом [18]. Это может служить объяснением отсутствия клинических проявлений TRAPS у родственников пациента.

В исследовании Di Gioia с соавт. было показано, что вариант TNFRSF1A R121Q часто ассоциирован с мягкой формой TRAPS в семьях с периодической лихорадкой, афтозным стоматитом, фарингитом и шейным аденитом (PFAPA) [19]. Более того, недавно Grandemange с коллегами описали возможный дозозависимый клинический эффект варианта R92Q [20].

Другая гетерозиготная мутация p.L412F обнаружена в гене, кодирующем толл-подобный рецептор 3. TLR3 специфически распознает двухцепочечные молекулы РНК и индуцирует множественные сигнальные события, включая активацию NF-каппаВ и продукцию интерферона 1-го типа, который принимает участие во врожденном иммунном ответе на различные вирусные инфекции. Функциональное значение идентифицированного варианта пока неясно. Различные варианты оценки

in silico потенциального эффекта этой мутации на функцию белка дают варьирующие результаты, что, впрочем, не исключает наличия клинического значения мутации.

Таким образом, мы обнаружили у пациента две мутации с приобретением функции, которые ведут к неспецифической активации иммунного ответа, неэффективной лимфопролиферации и дисрегуляции адаптивного иммунного ответа. Это отражается в иммунном статусе пациента неспецифической поликлональной активацией юных В-лимфоцитов (как В1, так и В2), в повышении уровня IgM, что свидетельствует о выраженных проблемах эффективного переключения В-клеток на синтез IgG, и нарушении опосредованного им специфического иммунного ответа. Возможно, взаимодействие последствий описанных мутаций могло стимулировать хронизацию EBV-вирусного процесса у этого пациента. Регулярная заместительная терапия иммуноглобулинами помогла не только прекратить персистенцию EBV, но и уменьшить число триггеров, приводящих к активной лимфопролиферации.

Таким образом, применение современных технологий секвенирования ДНК дало возможность уточнить и верифицировать диагноз пациента, в основе которого лежал конкретный дефект, длительное время остававшийся не установленным. Отсутствие возможности провести адекватную диагностику вело к неправильным диагнозам и неверной тактике лечения. Стертые клинические проявления не позволяли заподозрить выявленный генетический дефект, несмотря на описанные ранее случаи и их некоторую схожесть проявлений. Результаты секвенирования позволяют предсказать потенциальный путь лечения пациентов с APDS, поскольку одобренный FDA препарат idelalisib ингибирует p110δ и все связанные с синдромом мутации [21].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Большинство пациентов с ПИД имеют гетерогенную клиническую природу проявлений, связанную с многообразием дефектов генов. К сожалению, клиническая картина и стандартные иммунологические исследования не всегда дают возможность точно оценить локализацию дефекта. Это обуславливает необходимость проведения в таких случаях экзомного секвенирования для понимания истинной природы заболевания. В работе мы показали необходимость применения данного подхода у пациента с нетипичными клиническими

проявлениями: одновременным нарушением регуляции пролиферации клеточного звена и специфического иммунного ответа. В результате полноэкзомного секвенирования диагноз “ОВИН?” был уточнен и изменен на “синдром активированной фосфоинозитол 3-киназы- δ ”, для которого описаны возможные таргетные пути терапии. Понимание молекулярно-генетических аспектов заболевания пациента дает как врачу, так пациенту и его семье возможность правильно выработать тактику лечения, поведения и репродуктивного планирования.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана в рамках проекта “Развитие методов персонализированной медицины” (№ 0309-2016-0007).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Chapel H., Lucas M., Lee M., Bjorkander J., Webster D., Grimbacher B., Fieschi C., Thon V., Abedi M.R., Hammarstrom L. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes, *Blood* 2008 (112), 277–286.
2. Abbott J.K., Gelfand E.W. Common Variable Immunodeficiency: Diagnosis, Management, and Treatment. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 2015, 35(4), 637–658.
3. Bogaert D.J., Dullaers M., Lambrecht B.N., Vermaelen K.Y., De Baere E., Haerynck F. Genes associated with common variable immunodeficiency: one diagnosis to rule them all? *Journal of Medical Genetics* 2016, 53(9), 575–590.
4. Ameratunga R., Lehnert K., Woon S.T., Gillis D., Bryant V.L., Slade C.A., Steele R. Review: Diagnosing Common Variable Immunodeficiency Disorder in the Era of Genome Sequencing. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 2017, <https://doi.org/10.1007/s12016-017-8645-0>
5. Li H., Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009, 25(14), 1754–1760. doi: 10.1093/bioinformatics/btp324.
6. McKenna A., Hanna M., Banks E., Sivachenko A., Cibulskis K., Kernysky A., Garimella K., Altshuler D., Gabriel S., Daly M., DePristo M.A. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research* 2010, 20(9), 1297–1303. doi: 10.1101/gr.107524.110.
7. Chang X., Wang K. wANNOVAR: annotating genetic variants for personal genomes via the web. *Journal of Medical Genetics* 2012, 49(7), 433–436. doi: 10.1136/jmedgenet-2012-100918.
8. Yang H., Wang K. Genomic variant annotation and prioritization with ANNOVAR and wANNOVAR. *Nature Protocols* 2015, 10(10), 1556–1566. doi: 10.1038/nprot.2015.105.
9. den Dunnen J.T., Antonarakis S.E. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Human Mutation* 2000, 15(1), 7–12.
10. Гордукова М.А., Оскорбин И.П., Мишукова О.В., Зимин С.Б., Зиновьева Н.В., Давыдова Н.В., Смирнова А.С., Никитина И.А., Корсунский И.А., Филипенко М.Л., Продеус А.П. Разработка набора реагентов для количественного определения молекул ДНК TREC и KREC в цельной крови и сухих пятнах крови методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени. *Медицинская иммунология* 2015, 17(5), 467–478. DOI:10.15789/1563-0625-2015-5-467-478. [Gor dukova M.A., Oskorbin I.P., Mishukova O.V., Zimin S.B., Zinovieva N.V., Davydova N.V., Smirnova A.S., Nikitina I.A., Korsunsky I.A., Filipenko M.L., Prodeus A.P. Development of real-time multiplex PCR for the quantitative determination of TREC's and KREC's in whole blood and in dried blood spots”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2015, 17(5), 467–478. doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-467-478.]
11. Crank M.C., Grossman J.K., Moir S., Pittaluga S., Buckner C.M., Kardava L., Agharahimi A., Meuwissen H., Stoddard J., Niemela J., Kuehn H., Rosenzweig S.D. Mutations in PIK3CD can cause hyper IgM syndrome (HIGM) associated with increased cancer susceptibility. *Journal of Clinical Immunology* 2014, 34(3), 272–276. doi: 10.1007/s10875-014-0012-9.
12. Wentink M., Dalm V., Lankester A.C., van Schouwenburg P.A., Schölvink L., Kalina T., Zachova R., Sediva A., Lambeck A., Pico-Knijnenburg I., van Dongen J.J., Pac M., Bernatowska E., van Hagen M., Driessen G., van der Burg M. Genetic defects in PI3K δ affect B-cell differentiation and maturation leading to hypogammaglobulinemia and recurrent infections. *Clinical Immunology* 2017, 176, 77–86. doi: 10.1016/j.clim.2017.01.004
13. Elgizouli M., Lowe D.M., Speckmann C., Schubert D., Hülsdünker J., Eskandarian Z., Dudek A., Schmitt-Graeff A., Wanders J., Jørgensen S.F., Fevang B., Salzer U., Nieters A., Burns S., Grimbacher B. Activating PI3K δ mutations in a cohort of 669 patients with primary immunodeficiency. *Clinical & Experimental Immunology* 2016, 183(2), 221–229. doi: 10.1111/cei.12706
14. Angulo I., Vadas O., Garçon F., Banham-Hall E., Plagnol V., Leahy T.R., Baxendale H., Coulter T., Curtis J., Wu C., Blake-Palmer K., Perisic O., Smyth D., Maes M., Fiddler C., Juss J., Cilliers D., Markelj G., Chandra A., Farmer G., Kielkowska A., Clark J., Kracker S., Debré M., Picard C., Pellier I., Jabado N., Morris J.A., Barcenas-Morales G., Fischer A., Stephens L., Hawkins P., Barrett J.C., Abinun M., Clatworthy M., Durandy A., Doffinger R., Chilvers E.R., Cant A.J., Kumararatne D., Okkenhaug K., Williams R.L., Condliffe A., Nejentsev S. Phosphoinositide 3-kinase δ gene mutation predisposes to respiratory infection and airway damage. *Science* 2013, 342(6160), 866–871. doi: 10.1126/science.1243292.

15. Lucas C.L., Kuehn H.S., Zhao F., Niemela J.E., Deenick E.K., Palendira U., Avery D.T., Moens L., Cannons J.L., Biancalana M., Stoddard J., Ouyang W., Frucht D.M., Rao V.K., Atkinson T.P., Agharahimi A., Hussey A.A., Folio L.R., Olivier K.N., Fleisher T.A., Pittaluga S., Holland S.M., Cohen J.I., Oliveira J.B., Tangye S.G., Schwartzberg P.L., Lenardo M.J., Uzel G. Dominant-activating germline mutations in the gene encoding the PI(3) K catalytic subunit p110 δ result in T cell senescence and human immunodeficiency. *Nature Immunology* 2014, 15(1), 88–97. doi: 10.1038/ni.2771.
16. Coulter T.I., Chandra A., Bacon C.M., Babar J., Curtis J., Screation N., Goodlad J.R., Farmer G., Steele C.L., Leahy T.R., Doffinger R., Baxendale H., Bernatoniene J., Edgar J.D., Longhurst H.J., Ehl S., Speckmann C., Grimbacher B., Sediva A., Milota T., Faust S.N., Williams A.P., Hayman G., Kucuk Z.Y., Hague R., French P., Brooker R., Forsyth P., Herriot R., Cancrini C., Palma P., Ariganello P., Conlon N., Feighery C., Gavin P.J., Jones A., Imai K., Ibrahim M.A., Markelj G., Abinun M., Rieux-Laucat F., Latour S., Pellier I., Fischer A., Touzot F., Casanova J.L., Durandy A., Burns S.O., Savic S., Kumararatne D.S., Moshous D., Kracker S., Vanhaesebroeck B., Okkenhaug K., Picard C., Nejentsev S., Condliffe A.M., Cant A.J. Clinical spectrum and features of activated phosphoinositide 3-kinase δ syndrome: A large patient cohort study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2017, 139(2), 597–606. e4. doi: 10.1016/j.jaci.2016.06.021.
17. Kracker S., Curtis J., Ibrahim M.A., Sediva A., Salisbury J., Campr V., Debré M., Edgar J.D., Imai K., Picard C., Casanova J.L., Fischer A., Nejentsev S., Durandy A. Occurrence of B-cell lymphomas in patients with activated phosphoinositide 3-kinase δ syndrome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2014, 134(1), 233–236. doi: 10.1016/j.jaci.2014.02.020.
18. Simon A., Park H., Maddipati R., Lobito A.A., Bulua A.C., Jackson A.J., Chae J.J., Ettinger R., de Koning H.D., Cruz A.C., Kastner D.L., Komarow H., Siegel R.M. Concerted action of wild-type and mutant TNF receptors enhances inflammation in TNF receptor 1-associated periodic fever syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2010, 107(21), 9801–9806. doi: 10.1073/pnas.0914118107
19. Di Gioia S.A., Bedoni N., von Scheven-Gête A., Vanoni F., Superti-Furga A., Hofer M., Rivolta C. Analysis of the genetic basis of periodic fever with aphthous stomatitis, pharyngitis, and cervical adenitis (PFAPA) syndrome. *Scientific Reports – Nature* 2015, 5:10200. doi: 10.1038/srep10200.
20. Grandemange S., Cabasson S., Sarabay G., Pène J., Rittore C., Sanchez E., Chastang M.C., Guyon G., Pillet P., Touitou I. Clinical dose effect and functional consequences of R92Q in two families presenting with a TRAPS/PFAPA-like phenotype. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 2017, 5(2), 110–116.
21. Dornan G.L., Siempelkamp B.D., Jenkins M.L., Vadas O., Lucas C.L., Burke J.E. Conformational disruption of PI3K δ regulation by immunodeficiency mutations in PIK3CD and PIK3R1. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2017, 114(8), 1982–1987. doi: 10.1073/pnas.

A CASE OF CVID PATIENT: EXOME SEQUENCING REVEALED HETEROZYGOUS MISSENSE MUTATION E1021K IN THE PIK3CD GENE

M.A. Gordukova^{1,*}, A.A. Kechin^{2,3}, S.B. Zimin¹,
I. Yu. Serpokyrylova^{3,4}, M.L. Filipenko^{2,3}, A.P. Prodeus^{1,5}

*E-mail: ma.gordukova@dgkb-9.ru

¹Moscow City Paediatric Hospital № 9 named by Speransky, Moscow, Russia, Moscow, Russia;

²Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia;

³Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia, Novosibirsk, Russia;

⁴BIOSSET Ltd., Novosibirsk, Russia

⁵University Clinic of Children's Diseases of Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU), Moscow, Russia

Received: 16.12.2017. Accepted: 25.01.2018

To establish a definitive molecular diagnosis for the case of a 17-Year-Old Boy (NS) with a history of CVID, recurrent pulmonary infections, chronic EBV viremia, lymphadenopathy and a decrease of IgG3 and lack of IgG4 who presented for follow-up in the immunodeficiency clinic whole exome capture and next-generation sequencing were performed. We showed a presence of heterozygous missense mutation E1021K in the PIK3CD gene that encodes p110 δ (c.3061G>A [p.E1021K]). The mutation was verified by Sanger sequencing and not found in parents genomic DNA, thus classifying this E1021K mutation as *de novo*. Several additional mutations relevant to immune system pathways were found and confirmed by Sanger sequencing including TLR3 p.L412F, TNFRSF1A p.R121Q (rs4149584), associated with periodic disease.

Key words: whole exome sequencing, CVID, PID, NGS, PIK3CD, p1

Authors:

Gordukova M.,  biologist of clinical diagnostic laboratory Speranskiy Children's Hospital № 9, Moscow, Russia; 123317, Russia. Moscow, 29 Shmitovsky. Tel.: 89262913865. **E-mail:** ma.gordukova@dgkb-9.ru;

Kechin A., laboratory technician in Laboratory of Pharmacogenomics Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS Novosibirsk, Russia;

Zimin S., head of the Immunopathology department Speranskiy Children's Hospital № 9 Shmitovsky, Moscow, Russia;

Serpokrylova I., laboratory technician in Laboratory of Pharmacogenomics Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS 8 Lavrentiev Avenue, Novosibirsk, Russia; BIOSSET Ltd., Novosibirsk, Russia;

Filipenko M., PhD, head of the Laboratory of Pharmacogenomics Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS 8 Lavrentiev Avenue, Novosibirsk, Russia, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia;

Prodeus A., MD, PhD, professor, pediatrician-immunologist, chief specialist in pediatrics, director of the university clinic University Clinic of Children's Diseases of Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU), Moscow, Russia.