

Молекулярное кариотипирование при недифференцированных формах интеллектуальных расстройств: от хромосомных мутаций к идентификации патогенетически значимых генов

Кашеварова А.А.^{1,2*}, Скрыбин Н.А.^{1,2}, Лопаткина М.Е.¹, Салюкова О.А.^{1,6}, Филимонова М.Н.¹, Лежнина О.В.¹, Шорина А.Р.^{3,4}, Масленников А.Б.³, Назаренко Л.П.^{1,6}, Culic V.⁵, Лебедев И.Н.^{1,2,6}

¹ — НИИ медицинской генетики, Томский НИМЦ, Томск; * anna.kashevarova@medgenetics.ru

² — Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск

³ — Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Новосибирской области «Государственный Новосибирский областной клинический диагностический центр», Новосибирск

⁴ — Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Новосибирской области «Государственный Новосибирский областной детский психоневрологический центр»

⁵ — Университетский госпитальный центр, Сплит, Хорватия

⁶ — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск

Актуальность. Одной из генетических причин интеллектуальных расстройств (ИР) являются вариации числа копий участков ДНК (CNV). Несмотря на то, что для некоторых вариаций показана связь с известными синдромами, большая их часть является редкими. Как правило, CNVs затрагивают протяженные области, включающие несколько генов. В ряде случаев мутации касаются единичных генов, что дает возможность связать изменение их дозы с наблюдаемыми клиническими аномалиями у пациента. **Цель.** Настоящая работа направлена на характеристику структурной вариабельности генома человека при ИР и картирование кандидатных генов. **Материалы и методы.** На микрочипах 44K и 60K (Agilent Technologies) проведено молекулярное кариотипирование 136 детей в возрасте от 3 до 17 лет с задержкой развития и ИР. **Результаты.** У 87 чел. (64%) кариотип оказался условно нормальным. Молекулярный диагноз поставлен 18 пациентам (13%). У 31 ребенка (23%) выявлены потенциально патогенные мутации. Для синдромов микроделеций 15q24 и 16p11.2 выделены минимальные регионы микроделеции, в которых идентифицированы гены-кандидаты. Впервые обнаружены реципрокные микроделеция и мипродупликация единственного гена *CNTN6*, экспрессирующегося в мозге и ставшего кандидатным для ИР. **Выводы.** aCGH-анализ является эффективным методом генетической диагностики, который при обнаружении моногенных мутаций является информативным для идентификации новых генов-кандидатов ИР.

Ключевые слова: недифференцированные интеллектуальные расстройства, матричная сравнительная геномная гибридизация, вариации числа копий участков ДНК, кандидатные гены

The molecular karyotyping of undifferentiated forms of intellectual disabilities: from chromosomal mutations to identification of pathogenic genes

Kashevarova A.A.^{1,2*}, Skryabin N.A.^{1,2}, Lopatkina M.E.¹, Salyukova O.A.^{1,6}, Filimonova M.N.¹, Lezhnina O.V.¹, Shorina A.R.^{3,4}, Maslennikov A.B.³, Nazarenko L.P.^{1,6}, Culic V.⁵, Lebedev I.N.^{1,2,6}

¹ — Research Institute of Medical Genetics, Tomsk NRMС, Tomsk, Russia; * anna.kashevarova@medgenetics.ru

² — National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

³ — State Novosibirsk Regional Clinical Diagnostic Center, Novosibirsk

⁴ — State Novosibirsk Regional Children's Psycho-Neurological Center, Novosibirsk

⁵ — University Hospital Centre, Split, Croatia

⁶ — Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

Introduction. One of the genetic causes of intellectual disabilities (ID) is copy number variation (CNV). Despite the fact that for some variations an association with known syndromes has been shown, most of them are rare. Usually CNVs involve extended regions, including several genes. In some cases CNVs include single genes, what enables to directly link a change of their dose with clinical abnormalities observed in a patient. **Aim.** This work aims to characterize structural genomic variation in patients with ID and map candidate genes. **Materials and methods.** Using Agilent 44K and 60K arrays the molecular karyotyping for 136 children of

3–17 years old with developmental delay, ID and dysmorphic features was performed. **Results.** Eighty-seven individuals (64%) had normal karyotype or benign CNVs. Known microdeletion or microduplication syndromes were identified in 18 patients (13%). In the remaining 31 children (23%) potentially pathogenic mutations were found. For 15q24 and 16p11.2 microdeletion syndromes, diagnosed in two and three patients, respectively, using the literature data the minimal deleted regions and candidate genes within them were identified. In two families the reciprocal microdeletion and microduplication of single *CNTN6* gene were found. This gene is expressed in the brain and, therefore, is a candidate for ID. **Conclusions.** aCGH-analysis is an effective method for genetic diagnosis, which, when mutations in single genes are detected, allows identification of new candidate genes for intellectual disability.

Key words: undifferentiated intellectual disability, array comparative genomic hybridization, DNA copy number variation, candidate genes

Введение

Основными причинами интеллектуальных расстройств (ИР), помимо средовых факторов, являются генетические, среди которых немаловажная роль в настоящее время отводится микроструктурным хромосомным мутациям (вариациям числа копий участков ДНК, CNV). Показано, что патогенные хромосомные мутации у пациентов с ИР обнаруживаются в 12% случаев [1]. Мутации, ассоциированные с данной патологией, идентифицированы более чем в 700 генах [2]. Важно, что, несмотря на доказанную связь нескольких десятков CNVs с известными синдромами, большая их часть является редкими, что затрудняет интерпретацию их клинической значимости [3, 4]. Особую роль в выявлении генов ИР имеют случаи моногенных реципрокных CNVs, когда значительно проще провести корреляции между изменением числа копий конкретного гена и клиническими особенностями пациента.

Целью исследования является характеристика структурной вариабельности генома человека при интеллектуальных расстройствах и картирование генов-кандидатов.

Материалы и методы

Обследовано 136 детей в возрасте от 3 до 17 лет с задержкой развития (до 5 лет) и ИР (IQ<70). Проведение исследования одобрено Комитетом по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИМГ». Информированное согласие от родителей пробандов получено.

Из лимфоцитов периферической крови пациентов и их родственников выделяли ДНК экстракцией смесью фенол–хлороформ. Поиск CNV осуществлялся с использованием микрочипов SurePrint G3 Human CGH 4 x 44K и 8 x 60K (Agilent Technologies, США). aCGH-анализ проводился согласно рекомендациям производителя [5]. Результаты обработаны в программе Cytogenomics (v3.0.2.11) (Agilent Technologies, США). Интерпретация CNVs проведена с использованием Базы данных геномных вариантов [6]. Для потенциально патогенетически значимых CNV с использованием базы «Gene» [7] были определены гены-кандидаты, на которые с помощью программы Primer3 [8] подобраны праймеры для ПЦР в режиме реального времени с целью подтверждения обнаруженной CNV у пробанда и определения ее происхождения.

Результаты и обсуждение

Молекулярный диагноз был поставлен 18 пациентам (13%), что согласуется с литературными данными, согласно которым патогенные хромосомные мутации у детей с ИР обнаруживаются в 12% случаев [1]. Нами обнаружены мутации, ассоциированные с синдромами микроделеции 1q21.1 (OMIM#274000), 1p36 (OMIM#607872), 7q11.23 (OMIM#194050), 15q11.2-q13.1 (OMIM#176270), 15q24 (OMIM#613406), 16p11.2-p12.2 (OMIM#611913), 22q11.2 (OMIM#188400) и микродупликация 1q21.1, 17p13.3 (OMIM#247200), 22q11.2 (OMIM#608363). У одного ребенка выявлена крупная делеция в области синдрома кошачьего крика. У пяти пробандов идентифицированы протяженные дупликации dup18q11.1q12.1 (12 млн п.н.), dup5p15.2p14.1 (16 млн п.н.), dup2p25.2p23.2 (22 млн п.н.), dup9p24.2p13.3 (32 млн п.н.), dup13q21.31q21.33 (11 млн п.н.). Для синдромов микроделений 15q24 и 16p11.2 определены минимальные перекрывающиеся регионы (МПР) и картированы кандидатные гены. Размер МПР при синдроме микроделеции 15q24 составляет 0,41 млн п.н. (72,49–72,9 млн п.н., hg18) и включает 12 генов, из которых *SEMA7A*, *CLK3*, *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CSK* могут быть ассоциированы с ИР. При синдроме микроделеции 16p11.2 МПР равен 0,5 млн п.н. (29,58–30,08 млн п.н., hg18) и включает 27 генов, из которых наиболее значимые — *QPRT*, *KIF22*, *MAZ*, *PRRT2*, *MVP*, *SEZ6L2*, *KCTD13*, *DOC2A*, *TAOK2*, *PPP4C*, *TBX6*.

У 87 пациентов (64%) кариотип оказался условно нормальным, т.е. не были выявлены несбалансированные хромосомные мутации или потенциально патогенные CNV.

У 31 пациента 23% идентифицированы новые потенциально патогенные хромосомные мутации (таблица). Белковые продукты генов, локализованных в пределах затронутых хромосомных регионов, выполняют такие функции, как транспорт ионов, нуклеиновых кислот, участие в формировании и функционировании синапсов, регуляция роста отростков нервных клеток, репарация ДНК, являются транскрипционными факторами.

В ходе aCGH-анализа зачастую выявляются протяженные хромосомные мутации, содержащие несколько генов. Значительно реже обнаруживаются моногенные микроделеции и микродупликации, особо значимые для описания кандидатных генов ИР. При выполнении исследования у пациентов с ИР впервые были описаны реципрокные микроделеция и микродупликация, затра-

гивающие единственный ген *CNTN6* [9]. Белок контактин 6 участвует в обеспечении роста аксонов и реализации межклеточных взаимодействий при развитии нервной системы.

Таким образом, aCGH-анализ является эффективным методом генетической диагностики, который при обнаружении мутаций в единичных генах, позволяет картировать новые гены-кандидаты ИР.

Таблица

Потенциально патогенные хромосомные мутации у пациентов с ИР

№	Результаты aCGH (ISCN (2013))	Размер, млн п.н.	Гены-кандидаты
1	arr[hg18]11p13(35,137,000-36,292,000) x 1	1,155	<i>SLC1A2, FJXI, TRIM44, LDLRAD3</i>
2	arr[hg18]11q22.3(107,970,000-108,140,000) x 1	0,17	<i>DDX10</i>
3	arr[hg18]11p15.4(9,718,000-9,967,000) x 1 dn	0,249	<i>SWAP70, SBF2</i>
4	arr[hg18]15q22.2(60,137,384-60,978,277) x 3	0,841	<i>TLN2</i>
5	arr[hg18]5q33.1(148,620,000-148,735,000) x 3 mat	0,115	<i>IL17B, ABLIM3, AFAP1L1</i>
6	arr[hg18]1q25.1.25.2(172,269,000-178,409,000) x 3 pat	6,14	<i>TNR, ASTN1</i>
7	arr[hg18]7q21.3(94,769-94,901) x 3	0,132	<i>PON1, PON2, PON3</i>
8	arr[hg18]2q12.3(107,971,000-108,435,000) x 1	0,464	<i>SLC5A7, SULT1C2, SULT1C3, SULT1C4</i>
9	arr[hg18]12q24.12q24.13(110,668,504-110,811,179) x 3 mat	0,143	<i>ACAD10, ALDH2, MAPKAPK5</i>
10	arr[hg18]10q24.32(104,147,000-104,668,000) x 1	0,521	<i>SUFU</i>
11	arr[hg18]6p22.2(25,677,000-26,393,000) x 3	0,716	<i>HFE, SCGN</i>
12	arr[hg18]14q11.2(20,767,632-22,722,130) x 3 dn	1,954	<i>SLC7A7, MMP14</i>
13	arr[hg18]10q11.21q11.22(45,478,103-47,125,152) x 3	1,6	<i>GPRIN2, NPY4R</i>
	arr[hg18]19p13.3(969,580-1,248,499) x 1	0,279	<i>ABCA7, SBNO2</i>
	arr[hg18]20q13.12(42,595,506-43,137,505) x 3	0,542	<i>ADA, WISP2</i>
14	arr[hg18]2p25.3p25.2(632,724-6,052,614) x 3 dn	5,42	<i>SOX11, MYT1L</i>
15	arr[hg18]2p25.3p25.2(32,444-6,476,735) x 3	6,444	<i>SOX11, MYT1L</i>
	arr[hg18]11q21q22.1(42,595,506-43,137,505) x 3	3,674	<i>CNTN5</i>
16	arr[hg18]2p25.3p25.2(74,669-4,038,588) x 3	3,964	<i>SOX11, MYT1L</i>
17	arr[hg18]20q13.33(57,945,309-59,244,861) x 3	1,3	<i>PPP1R3D</i>
18	arr[hg18]10q26.3(131,662,281-134,969,700) x 3	3,307	<i>GPR123, ADAM8</i>
	arr[hg18]20p11.23p11.21(21,175,185-25,510,482) x 3	4,335	<i>NKX2-2, SSTR4, THBN, CST3, SYNDIG1, VSX1, ABHD12</i>
19	arr[hg18]4q34.1q34.3(173,195,432-179,098,955) x 3 dn	5,9	<i>SCRG1, HAND2, GLRA3</i>
	arr[hg18]4q34.3q35.1(179,503,640-185,418,489) x 4 dn	5,9	<i>NEIL3, AGA, ING2</i>
	arr[hg18]4q35.1q35.2(185,485,228-191,133,668) x 1 dn	5,6	<i>IRF2, CASP3</i>
20	arr[hg18]4q21.21q21.22(82,189,943-83,801,062) x 4 dn	1,611	<i>BMP3, PRKG2, RASGEF1B, ENOPH1, SCD5</i>
21	arr[hg19]18p11.32(2,275,610-2,704,317) x 3 pat	0,428	<i>METTL4, NDC80, SMCHD1</i>
22	arr[hg19]3p26.3(701,645-1,467,721) x 3 pat	0,766	<i>CNTN6</i>
23	arr[hg19]3p26.3(1,172,623-1,467,721) x 1	0,295	<i>CNTN6</i>
24	arr[hg18]3p26.3(1,172,623-1,467,721) x 1	0,295	<i>CNTN6</i>
25	arr[hg18]17q21.31(41,566,540-41,700,815) x 3	0,134	<i>KANSL1</i>
26	arr[hg18]14q11.2(21,393,719-22,335,999) x 1	0,942	<i>DAD1, ABHD4, SLC7A7</i>
27	arr[hg18]14q11.2(21,392,430-22,208,271) x 1	0,816	<i>DAD1, ABHD4</i>
28	arr[hg18]17q21.31(41,587,723-41,700,815) x 3	0,113	<i>KANSL1</i>
29	arr[hg18]12q24.12(110,668,504-110,793,312) x 3 mat	0,125	<i>ACAD10, ALDH2, MAPKAPK5</i>
30	arr[hg18]3q22.1(133,649,717-133,761,328) x 1	0,111	<i>DNAJC13, ACAD11</i>
31	arr[hg18]Xq21.1(76,808,375-77,170,301) x 1	0,362	<i>ATRX, MAGT1, ATP7A</i>

Авторы не имеют конфликта интересов.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 14-15-00772.

Список литературы

1. Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Thung DT et al. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature*. 2014; 511(7509):344-347.
2. Vissers LE, Gilissen C, Veltman JA. Genetic studies in intellectual disability and related disorders. *Nat Rev Genet*. 2016; 17(1):9-18.
3. Nevado J, Mergener R, Palomares-Bralo M et al. New microdeletion and microduplication syndromes: A comprehensive review. *Genet Mol Biol*. 2014; 37(1):210-219.
4. Кашеварова А.А., Лебедев И.Н. Геномная архитектура хромосомных болезней человека. *Генетика*. 2016; 52(5):447-462.
5. Протокол aCGH для микрочипов Agilent Technologies — http://www.chem-agilent.com/pdf/G4410-90020v3_1_CGH_ULS_Protocol.pdf
6. База данных геномных вариантов — <http://projects.tcag.ca/variation/?source=hg18>
7. База данных «Ген» — <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>
8. Программа для подбора праймеров Primer3 — <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>
9. Kashevarova AA, Nazarenko LP, Schultz-Pedersen S et al. Single gene microdeletions and microduplication of 3p26.3 in three unrelated families: CNTN6 as a new candidate gene for intellectual disability. *Mol Cytogenet*. 2014; 7(1):97.