

Распространенность и спектр моногенных CNV у пациентов с нарушениями интеллектуального развития

Кашеварова А.А., Лопаткина М.Е., Беляева Е.О., Федотов Д.А., Дроздов Г.В., Назаренко Л.П., Лебедев И.Н.

Научно-исследовательский институт медицинской генетики,
Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук
634050, г.Томск, ул. Набережная реки Ушайки, д. 10

Моногенные вариации числа копий участков ДНК (CNV) зарегистрированы с частотой 4,4% среди пациентов с интеллектуальными нарушениями и задержкой развития и охарактеризованы по таким критериям как тип (делеция/дупликация), локализация, происхождение. Показано, что не все моногенные варианты, выявленные микроматричным анализом, можно подтвердить методом ПЦР в реальном времени.

Ключевые слова: вариации числа копий участков ДНК, моногенные CNV, интеллектуальные нарушения, ПЦР в реальном времени.

Для цитирования: Кашеварова А.А., Лопаткина М.Е., Беляева Е.О., Федотов Д.А., Дроздов Г.В., Назаренко Л.П., Лебедев И.Н. Распространенность и спектр моногенных CNV у пациентов с нарушениями интеллектуального развития. *Медицинская генетика* 2021; 20(10): 44-46 .

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.10.44-46

Автор для корреспонденции: Кашеварова А.А., e-mail: anna.kashevarova@medgenetics.ru

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ № 21-65-00017.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Поступила: 25.09.2021.

Prevalence and spectrum of single-gene CNVs in patients with intellectual disability

Kashevarova A.A., Lopatkina M.E., Belyaeva E.O., Fedotov D.A., Drozdov G.V., Nazarenko L.P., Lebedev I.N.

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences
10 Naberejnaya Ushaiki, Tomsk, 634050, Russian Federation

Single-gene CNVs were observed in 4.4% of patients with intellectual disabilities and developmental delay and were characterized by such criteria as type (deletion/duplication), localization, and origin. It has been shown that not all single-gene variants identified by aCGH can be confirmed by real-time PCR.

Keywords: copy number variation, CNV, single-gene CNV, intellectual disability, real-time PCR.

For citation: Kashevarova A.A., Lopatkina M.E., Belyaeva E.O., Fedotov D.A., Drozdov G.V., Nazarenko L.P., Lebedev I.N. Prevalence and spectrum of single-gene CNVs in patients with intellectual disability. *Medicinskaya genetika [Medical genetics]* 2021; 20(10): 44-46. (In Russ.)

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.10.44-46

Corresponding author: A.A. Kashevarova, e-mail: anna.kashevarova@medgenetics.ru

Funding. The research was supported by a grant from the Russian Science Foundation No. 21-65-00017.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Accepted: 25.09.2021.

Выявление методом сравнительной геномной гибридизации (aCGH) новых микроделеций и микродупликаций у пациентов с интеллектуальными нарушениями и задержкой развития является важной научно-практической задачей. В ряде случаев в области перестройки оказывается локализован только один ген (single-gene CNV), что дает возможность более достоверно оценить эффект обнаруженной структурной мутации на формирование патологического фенотипа. Кроме того, дополнительный вклад в развитие клинической картины за-

болевания может вносить рецессивная мутация на интактном аллеле гена, не затронутом CNV, переходящая в гемизиготное состояние вследствие микроделеции. Открытым остается вопрос о механизме проявления моногенных CNV: изменение копийности целого гена, вовлеченного в CNV или нарушение структуры транскрипта, когда имеет место делеция или дупликация одного или нескольких экзонов гена. Таким образом, моногенные CNV оказываются в центре внимания как особая форма хромосомной изменчивости.

Целью данной работы стала характеристика моногенных CNV, выявленных при проведении микроматричного анализа у пациентов с интеллектуальными нарушениями и задержкой развития, и верификация их с помощью ПЦР в реальном времени.

Всего с помощью микрочипов SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit (8 × 60K) (Agilent Technologies, США) нами обследовано 1099 пациентов с интеллектуальными нарушениями и задержкой развития. После интерпретации полученных результатов и исключения полиморфных вариантов, присутствующих у здоровых индивидов и представленных в Базе данных геномных вариантов (DGV), патогенные/потенциально патогенные структурные хромосомные aberrации были обнаружены у 320 индивидов (29%). Из них 51 ребенок оказался носителем потенциально патогенной моногенной CNV, что составило 16% от общей выборки пациентов с aberrациями и 5% в группе детей, обследованных в ходе микроматричного анализа.

Моногенных делеций было почти в два раза больше, чем амплификаций (33 делеции в сравнении с 17 дупликациями и 1 трипликацией). Моногенные CNV были выявлены практически на всех хромосомах (1-4, 6-13, 15, 16, 20, 21 и X), с наибольшей их концентрацией на хромосомах 3 (пять пациентов, из них три с делецией/дупликацией гена *CNTN6* [1]), 4 (пять пациентов, из них два с делецией гена *NR3C2*), 6 (четыре пациента, из них два с делецией и один с трипликацией гена *PRKN*), 7 (восемь пациентов, из них семь с делецией гена *IMMP2L* [2]), 10 (пять пациентов, из них два с дупликацией гена *PFKP*), X (шесть пациентов, из них два с дупликацией гена *TSPAN7*).

Поскольку очевидно, что локализация моногенной CNV в составе гена может влиять на ее клиническое проявление, нами были выделены следующие группы вариантов: вовлечен целый ген – 3 CNV, N экзонов с 3'-конца гена – 6 CNV, N экзонов с 5'-конца гена – 7 CNV, внутригенные CNV - 35 вариантов. Полностью в CNV вовлечены гены *CNTN6*, *GYPА*, *CYP2C1*, из которых только контактин 6 имеет более низкий индекс гаплонедасточности – 40% (для гаплонедасточных генов – 0–10%) [3]. Потенциально изменение дозы гена может привести к изменению количества соответствующего белкового продукта. В шесть из семи CNV, включающих экзоны с 5'-конца гена, также вовлечены промоторы генов согласно Регистру кандидатных регуляторных cis-элементов ENCODE, что, следовательно, может влиять на транскрипцию. Делеция или дупликация отдельных экзонов внутри гена может привести к изменению длины транскрипта и конформации белковой молекулы.

Известно, что результаты aCGH требуют обязательного подтверждения альтернативными методами – ПЦР в реальном времени, FISH, MLPA. Каждый из методов имеет свои преимущества и ограничения. Например, FISH-анализ является не информативным при подтверждении амплификаций, а также для делеций размером менее 100 т.п.н. [4]. MLPA требует накопления большого количества образцов для запуска, не давая возможности оперативно исследовать одну CNV в одной семье. Определенные сложности возникают при интерпретации результатов MLPA при делекции CNV [4]. Напротив, ПЦР в реальном времени позволяет оперативно подобрать и синтезировать праймеры на исследуемый регион, провести анализ в одной конкретной семье, если это необходимо срочно, не требует большого количества ДНК. Таким образом, данный метод является наиболее подходящим и универсальным для подтверждения CNV, выявленных с помощью микрочипов у пробандов, и установления их происхождения – *de novo* или наследование от родителей.

В рамках данной работы нами создана панель из 17 пар праймеров на гены, вовлеченные в моногенные CNV, для верификации их методом ПЦР в реальном времени. Подтверждающая ПЦР-диагностика выполнена 21 пациенту (41%). Из них 10 CNV были материнского происхождения, четыре – отцовского, две возникли *de novo*, две вариации подтверждены без анализа родительского происхождения и три подтвердить не удалось.

Согласно литературным данным, преимущественное наследование от матери наблюдалось для дополнительных CNV у пациентов с синдромальными делециями в области 16p11.2 [5]. Авторы обсуждают, что данный феномен характерен для CNV небольшого размера и SNV. В то же время, наследование CNV от здоровых родителей может указывать на наличие некоторых модифицирующих факторов. Так, нами показано, что дупликация гена *CNTN6* унаследована пробандом от здоровых отца и бабушки по отцовской линии. Для данного гена нами впервые зарегистрирован феномен неравной аллельной экспрессии в нейронах, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных от пациентов с дупликацией гена и с нормальным числом его копий [6]. Показано, что преимущественная экспрессия гена происходит с хромосомы материнского происхождения. Другой причиной неполной пенетрантности моногенной CNV может быть компенсаторное изменение уровня метилирования ДНК у родителей-носителей аналогичного хромосомного варианта. Методом бисульфитного секвенирования CpG-сайтов

в гене *IMMP2L* нами показано, что уровень метилирования этих сайтов был одинаков у пробандов и их родственников без микроделеции (здоровые сибсы и отцы), в то время как у здоровых матерей-носительниц аберрации уровень метилирования ДНК был снижен, а экспрессия гена *IMMP2L*, соответственно, повышена по сравнению с пробандами. Полученные результаты указывают на возможную частичную компенсацию гаплонедостаточности гена *IMMP2L* у здоровых матерей с микроделецией данного локуса путем снижения уровня метилирования ДНК [2].

Важным результатом нашего исследования является свидетельство того, что результаты микроматричного анализа необходимо подтверждать альтернативными методами. Так, методом ПЦР в реальном времени нами не были подтверждены дубликации экзона 3 гена *NR3C2*, интрона 18 гена *PFKP* и делеция экзонов 8-11 гена *THSD4*. Это может быть как следствием ложноположительного результата aCGH, так и обусловлено ограничениями метода ПЦР в реальном времени. Например, сложности с подтверждением возникают, если CNV имеет непротяженный размер, затрагивает только интрон, локализована в области гетерохроматина, затрагивает ген из многочисленного семейства, распределенного по разным хромосомам и др.

Три пробанда с CNV, не подтвержденными методом ПЦР в реальном времени, были исключены из общей выборки при расчете частоты моногенных аберраций. Всего осталось 48 пациентов с моноген-

ными вариациями, что составило 4,4% среди всех обследованных детей с интеллектуальными нарушениями, включенными в работу. Данный тип структурных хромосомных аберраций имеет большое значение для поиска новых кандидатных генов заболеваний и представляет особый интерес для анализа механизмов патологического проявления вариаций числа копий участков ДНК.

Литература/References

1. Kashevarova A.A., Nazarenko L.P., 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.
2. Vasilyev S.A., Skryabin N.A., Kashevarova A.A. et al. Differential DNA methylation of the *IMMP2L* gene in families with maternally inherited 7q31.1 microdeletions is associated with intellectual disability and developmental delay. *Cytogenet Genome Res.* 2021; 161(3-4): 105-119.
3. DECIPHER, DatabasE of genomiC variation and Phenotype in Humans using Ensembl Resources. Available at: <https://www.deciphergenomics.org/>
4. Stuppia L., Antonucci I., Palka G., Gatta V. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *Int J Mol Sci.* 2012;13(3):3245-76.
5. Duyzend M.H., Nettle X., Coe B.P. et al. Maternal Modifiers and Parent-of-Origin Bias of the Autism-Associated 16p11.2 CNV. *Am J Hum Genet.* 2016; 98(1): 45-57.
6. Gridina M.M., Matveeva N.M., Fishman V.S. et al. Allele-Specific Biased Expression of the *CNTN6* Gene in iPS Cell-Derived Neurons from a Patient with Intellectual Disability and 3p26.3 Microduplication Involving the *CNTN6* Gene. *Mol Neurobiol.* 2018; 55(8): 6533-6546.