

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2022.11.44-47>

Комплексные геномные перестройки в этиологии «хромосомного фенотипа»

Миньженкова М.Е.¹, Маркова Ж.Г.¹, Юрченко Д.А.¹, Тарлычева А.А.¹, Маркова Т.В.¹, Семенова Н.А.¹, Муртазина А.Ф.¹, Кадышев В.В.¹, Гридина М.М.^{2,3}, Весна Э.^{2,3}, Фишман В.С.^{2,3}, Шилова Н.В.¹

1 – ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д.1,

2 – ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»
630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, д. 10

3 – ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»
630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2

Представлены результаты молекулярно-генетического исследования четырех пациентов с комплексными геномными перестройками и «хромосомным фенотипом», который может включать нарушение интеллектуального развития и множественные врожденные пороки и аномалии развития. С целью выявления геномного дисбаланса и оценки влияния геномных перестроек на проявление фенотипических аномалий проведены FISH-исследование, XMA и Hi-C у пациентов с «по-видимому» сбалансированными хромосомными перестройками. Идентификация геномного дисбаланса, его структуры и механизмов формирования в этих случаях позволяет охарактеризовать комплексные геномные перестройки в целом и оценить индивидуальные генетические риски в семье.

Ключевые слова: комплексные геномные перестройки, XMA, CNV, FISH, ТАД, Hi-C.

Для цитирования: Миньженкова М.Е., Маркова Ж.Г., Юрченко Д.А., Тарлычева А.А., Маркова Т.В., Семенова Н.А., Муртазина А.Ф., Кадышев В.В., Гридина М.М., Весна Э., Фишман В.С., Шилова Н.В. Комплексные геномные перестройки в этиологии «хромосомного фенотипа». *Медицинская генетика* 2022; 21(11): 44-47.

Автор для корреспонденции: Миньженкова Марина Евгеньевна; **e-mail:** maramin@mail.ru

Финансирование. Исследование проведено в рамках темы НИР № 122032300370-1 «Изучение структурно-функциональных особенностей и механизмов формирования хромосомных аномалий и геномного дисбаланса».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 20.10.2022

Complex genomic rearrangements in etiology of the «chromosomal phenotype»

Minzhenkova M.E.¹, Markova Z.G.¹, Yurchenko D.A.¹, Tarlycheva A.A.¹, Markova T.V.¹, Semenova N.A.¹, Murtazina A.F.¹, Kadyshov V.V.¹, Gridina M.M.^{2,3}, Viesná E.^{2,3}, Fishman V.S.^{2,3}, Shilova N.V.¹

1 – Research Centre for Medical Genetics

1, Moskvorechye st., Moscow, 115522, Russian Federation

2 – Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences

10, Ac. Lavrentieva ave., Novosibirsk, 630090

3 – Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

1, Pirogova str., Novosibirsk, 630090, Russian Federation

We present the results of a molecular-genetic study of 4 patients with complex genomic rearrangements and «chromosomal phenotype», which may include phenotype anomalies, intellectual disabilities, and multiple congenital abnormalities. FISH analysis, CMA and Hi-C were carried out in patients with “apparently” balanced chromosomal rearrangements associated with an abnormal phenotype to identify and estimate the genomic imbalance. The identification of the structure, mechanisms of formation and genomic imbalance in these cases allows us to characterize complex genomic rearrangements and assess individual genetic risks in the family.

Keywords: complex genomic rearrangements, CMA, FISH, CNV, TAD, Hi-C.

For citation: Minzhenkova M.E., Markova Z.G., Yurchenko D.A., Tarlycheva A.A., Markova T.V., Semenova N.A., Murtazina A.F., Kadyshov V.V., Gridina M.M., Viesná E., Fishman V.S., Shilova N.V. Complex genomic rearrangements in etiology of the «chromosomal phenotype». *Medical genetics [Medicinskaya genetika]* 2022; 21(11): 44-47. (In Russ.)

Corresponding author: Minzhenkova Marina; **e-mail:** maramin@mail.ru

Funding. The work was supported by research № 122032300370-1 “Study of structure-functional features and mechanisms of formation of the chromosomal abnormalities and genomic imbalance”.

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

Accepted: 20.10.2022

Введение

Комплексные хромосомные перестройки являются структурными аномалиями с участием двух и более хромосом и наличием более чем двух точек разрывов. По литературным данным примерно 20–25% обнаружены у пациентов с различными врожденными пороками и нарушением интеллектуального развития [1]. Сбалансированные комплексные перестройки могут быть образованы как путем взаимного трехэтапного обмена между тремя хромосомами, так и вследствие комплексных транслокаций, вовлекающих четыре или пять хромосом со множеством точек разрывов, инверсий и инсерций. Однако подавляющее большинство представлено именно комбинациями транслокаций. В некоторых исследованиях показано, что даже «по-видимому сбалансированные» реципрокные транслокации могут на самом деле являться более сложными комплексными хромосомными перестройками, и «скрытый» геномный дисбаланс в этих случаях является причиной появления аномального фенотипа. Поэтому в последних публикациях для обозначения таких состояний используют термин «complex genomic rearrangements» комплексные геномные перестройки (КГП) [2]. Идентификация структуры и происхождения КГП позволяет определить их механизмы формирования и оценить повторный риск рождения ребенка с хромосомным дисбалансом.

Методы

Анализ кариотипа был выполнен на хромосомных препаратах, полученных по стандартным протоколам из культуры лимфоцитов периферической крови при GTG-окрашивании метафазных хромосом. FISH анализ выполняли по протоколам, предложенным фирмами производителями с использованием соответствующих ДНК-зондов (Kreatech, Нидерланды) и многоцветных технологий – mFISH, mBAND (MetaSystems, Германия). Хромосомный микроматричный анализ (ХМА) проводили на платформе «Affymetrix» с использованием олигонуклеотидных микроматриц высокой плотности Cytoscan HD в соответствии с протоколом производителя (Affymetrix, США). Нi-C библиотеки были приготовлены по протоколу ДНКазной Нi-C [3].

Результаты и обсуждение

При стандартном цитогенетическом и молекулярно-цитогенетическом исследованиях выявлено 4 слу-

чая комплексных геномных перестроек, ассоциированных с «хромосомным фенотипом» (таблица). Геномный дисбаланс при молекулярном кариотипировании в виде делеций обнаружен в 3 случаях.

Дополнительные исследования с использованием FISH-метода и ревизии кариотипа позволили определить структуру и происхождение дисбаланса, а также верифицировать выявленные хромосомные аномалии. Так, в случае 1 сбалансированная транслокация с участием хромосом 4,5,7 после детального комплексного анализа оказалась сложной геномной перестройкой с инсертированным фрагментом, шестью точками разрывов и четырьмя микроделециями в точках разрывов. Анализ выявленных CNV позволил установить, что основной вклад в формирование «хромосомного фенотипа» внес ген *PURA*, патогенные варианты в котором могут проводить к нарушению развития нервной системы, гипотонии и аномалиям фенотипа (миопатическое лицо, полные щеки, монголоидный разрез глаз, длинный фильтр, диспластичные ушные раковины).

В случае 2 при стандартном цитогенетическом исследовании определены две реципрокные транслокации между хромосомами 2 и 6 и хромосомами 7 и 11, подтвержденные FISH-методом. ХМА позволил выявить делецию 6q14.1 в точке разрыва на длинном плече хромосомы 6. Геном-кандидатом, ассоциированным с клиническими симптомами у пациента, оказался ген *RHIP*, гаплонедостаточность которого приводит к задержке интеллектуального и психомоторного развития, ожирению, порокам глаз, мочеполовой, скелетной систем и лицевым диморфиям (синофриз, нос с вздернутым кончиком и узкими крыльями, длинный фильтр, крупные ушные раковины, тонкая верхняя губа).

Еще один случай КГП представлен у пациента с фенотипическим проявлением синдрома WAGR (MIM #194072). При проведении стандартного цитогенетического анализа была выявлена реципрокная транслокация между хромосомами 10 и 11. Для уточнения точек разрывов и выявления геномного дисбаланса использовали FISH и ХМА. В результате было установлено, что дериватная хромосома 11, образовавшаяся в результате транслокации, содержала также перицентрическую инверсию, а две делеции в точках разрывов отражают многоэтапный механизм возникновения хромосомной перестройки.

Вышеописанные случаи демонстрируют основной механизм возникновения аномалий развития у пациентов с КГП, который ассоциирован с появлением CNV (copy number variations – изменение числа копий ДНК) в точках разрывов. Действительно, в последние

десетилетия идентификация КГП и выявление геномного дисбаланса значительно улучшились благодаря внедрению молекулярно-цитогенетических методов [4, 5]. Все большее число сообщений показывает, что они могут быть более сложными и распространенными, чем первоначально предполагалось, что требует от цитогенетиков значительного внимания к определению их точной структуры и происхождения.

Тем не менее, в некоторых случаях КГП дисбаланс не выявляется и диагностика этиологии «хромосомного фенотипа» должна быть продолжена молекулярными методами более высокого разрешения (полногеном-

ное секвенирование, методы, основанные на захвате конформации хромосом - High-Throughput Chromosome conformation capture – HiC). Картирование и секвенирование точек разрывов при сбалансированных хромосомных перестройках, анализ мутаций и генной экспрессии позволяют отобразить этиопатогенез вариабельного аномального фенотипа в каждом конкретном случае. Точки разрывов при сбалансированных хромосомных перестройках могут находиться во внутригенных областях и влиять на регуляцию близлежащих генов путем реорганизации топологических ассоциированных доменов (ТАД). Отмечено,

Клиническая и молекулярно-цитогенетическая характеристика пациентов с КГП

Clinical and molecular cytogenetic characteristics of patients with complex genomic rearrangements

№ п\п	Кариотип	Фенотип	Результаты исследования (ISCN 2020) XMA, FISH, ревизия GTG, Hi-C*	Этиология «хромосомного фенотипа»
1	46,XX,t(4;7;5) (q?31;p?21;q?31)dn	ЗПМР, МРТ картина – гипоплазия мозжечка и мозолистого тела, микроцефалия, гипотония, судороги, эпикант, длинные ресницы, полные щеки, маленький нос, длинный фильтр, асимметричные крупные ушные раковины	46,XX,der(4)(4pter→4q31.2::5q31.2→5qter),der(5)(5pter→5q31.1::4q32→4q34::5q31.1→5q31.2→::7p21→7pter),der(7)(4qter→4q34::4q32→4q31.3::7p21→7qter)dn.arr [hg19] 4q31.23(148822943_150512297)x1,4q32.1q32.2(158325898_163127979)x1,5q31.1(134944147_136148325)x1,5q31.2q31.3(139385563_141214796)x1	Делекция 5q31.2q31.3, включающая ген <i>PURA</i> (MIM #600473)
2	46,XY,t(2;6) (p13;q13),t(7;11) (q31.2;p15.3)dn	ЗПМР, деформация стоп, позвоночника, контрактуры тазобедренных суставов, гиперметропия, амблиопия, правосторонняя каликоэктазия, неполное удвоение правой почки, выраженное варикоцеле слева, гипотрофия правого яичка, сперматоцеле, билиарная дисфункция на фоне аномалии развития желчного пузыря	46,XY,t(2;6)(p13;q13),t(7;11)(q31.2;p15.3)dn.ish t(2;6)(p13-,q13+;q13-,p13+)(SHGC-85549-,WI-5704+,WI-5704-,SHGC-85549+),t(7;11)(q31.2-,p15.3+;p15.3-,q31.2+)(RH48601-,GDB:197852+;GDB:197852-,RH48601+).arr [hg19] 6q14.1(75917165_83621563)x1	Делекция 6q14.1, включающая ген <i>RHIP</i> (MIM #612870)
3	46,XY,t(10;11) (p14;p12?)	Аниридия, поражение ЦНС	46,XY,der(10)t(10;11)(p15;p13),der(11)inv(11)(p13q12)(10;11)dn.arr [hg19] 11p14.1p13(30440294_32696663)x1, 11p13p12(32772515_36857171)x1	Делекция 11p14.1p13, включающая гены <i>WT1</i> (MIM #607102) и <i>PAX6</i> (MIM #607108)
4	46,XY,t(2;4) (p?;p?),t(2;4)(q?;q?)dn	ЗПМР, большой лоб, оттопыренные диспластичные ушные раковины, удлиненный нос, макростомия, уголки рта опущены вниз, длинные с зауженными дистальными фалангами пальцы рук и ног, плоскостопие, варусная деформация 4-5 пальцев стоп, светлая кожа с выраженной подкожной сосудистой сетью на лице, ушах, туловище	46,XY,der(2)(4pter→4p14::2p21→2p15::4p12→4p14::2p15→2p15::2p13.3→2q23.1::4q12→4qter),der(4)(2pter→2p21::2p15→2p13.3::4p12→4q12::2q23.1→2qter)dn.arr(X-,Y)×1,(1-22)×2	Граница перестройки на хромосоме 2 располагается на расстоянии 85 т.п.н. от гена <i>MBD5</i> (MIM #611472), нарушение экспрессии которого может приводить к аномалиям развития

Примечание: * Hi-C исследование проведено только пациенту 4, ЗПМР – задержка психомоторного развития, МРТ – магнитно-резонансная томография, ЦНС – центральная нервная система.

что объединение ТАД в результате утраты разделяющего их участка ДНК приводит к существенным нарушениям экспрессии генов, и, следовательно, является патогенетическим механизмом формирования аномалий развития [6, 7].

Случай 4 демонстрирует применение технологии анализа трехмерной конформационной организации хроматина (Hi-C), который позволяет определить пространственную систему взаимодействия элементов между различными участками целого генома для уточнения структуры хромосомной перестройки и поиска причин формирования «хромосомного фенотипа». На основе Hi-C-данных, FISH-анализа и ревизии кариотипа был охарактеризован сложный случай КГП между хромосомами 2 и 4, представленный двумя транслокациями между короткими и длинными плечами хромосом 2 и 4 и двумя инвертированными инсерциями материала короткого плеча хромосомы 2 и короткого плеча хромосомы 4 в дериватные хромосомы 2 и 4 (таблица). Результаты Hi-C-анализа позволили локализовать точки разрывов на хромосомах и установить, что граница перестройки на хромосоме 2 располагается на расстоянии 85 т.п.н. от гена *MBD5*, нарушение экспрессии которого может приводить к нарушению интеллектуального развития 1 типа и аномалиям фенотипа (MIM #156200). Сходство фенотипических особенностей пациента и характерных проявлений этого синдрома позволяет предположить влияние гена *MBD5* на развитие клинической картины.

Использование комплекса новейших молекулярно-генетических технологий является перспективным направлением не только в диагностике «скрытого» геномного дисбаланса, но также позволяет установить этиопатогенез аномалий развития и «хромосомного фенотипа» при дезрегуляции работы генов в случаях сбалансированных КГП.

Литература/ References

1. Schluth-Bolard C., Delobel B., Sanlaville D., et al. Cryptic genomic imbalances in *de novo* and inherited apparently balanced chromosomal rearrangements: array CGH study of 47 unrelated cases. *Eur J Med Genet.* 2009;52(5):291–296.
2. Zhang F., Carvalho C.M., Lupski J.R. Complex human chromosomal and genomic rearrangements. *Trends Genet.* 2009;25(7):298–307. doi:10.1016/j.tig.2009.05.005
3. Gridina M., Mozheiko E., Valeev E., Nazarenko L.P., Lopatkina M.E., Markova Z.G., Yablonskaya M.I., Voinova V.Y., Shilova N.V., Lebedev I.N., Fishman V. A cookbook for DNase Hi-C. *Epigenetics Chromatin.* 2021 Mar 20;14(1):15. doi: 10.1186/s13072-021-00389-5.
4. Feenstra I., Hanemaaijer N., Sikkema-Raddatz B., et al. Balanced into array: Genome-wide array analysis in 54 patients with an apparently balanced *de novo* chromosome rearrangement and a metaanalysis. *Eur J Hum Genet.* 2011;(19):1152–1160.
5. Higgins A.W. et al. Characterization of apparently balanced chromosomal rearrangements from the Developmental Genome Anatomy Project. *Am J Hum Genet.* 2008;82:712–722.
6. Lupia 'n'ez D.G., Kraft K., Heinrich V. et al. Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell.* 2015;161:1012–1025.
7. Aristidou K. et al., Position effect, cryptic complexity, and direct gene disruption as disease mechanisms in *de novo* apparently balanced translocation cases. *PLoS ONE.* 2018;13:10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205298>