

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2022.12.56-59>

## Оценка патогенности дупликаций, выявленных при микроматричном анализе, на примере двух пациентов с картиной мышечной дистрофии Дюшенна

Маркова Ж.Г., Миньженкова М.Е., Шаркова И. В., Петухова М.С., Шилова Н.В.

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

Внутригенные делеции и дупликации представляют собой серьезную проблему при оценке результатов хромосомного микроматричного анализа у пациентов с подозрением на моногенное заболевание. Оценка клинической значимости и каузативности таких генетических вариантов, особенно протяженных дупликаций, затруднена, поскольку CNV, затрагивающие один или несколько экзонов гена, могут иметь различные фенотипические эффекты. В статье представлены результаты обследования двух пациентов с направительным диагнозом мышечная дистрофия. У обоих пациентов при проведении хромосомного микроматричного анализа диагностированы внутригенные дупликации в гене *DMD*. В работе обсуждаются особенности интерпретации таких CNV и предлагаются рекомендации для окончательной постановки генетического диагноза.

**Ключевые слова:** мышечная дистрофия Дюшенна, внутригенная дупликация, *DMD*, хромосомный микроматричный анализ.

**Для цитирования:** Маркова Ж.Г., Миньженкова М.Е., Шаркова И. В., Петухова М.С., Шилова Н.В. Оценка патогенности дупликаций, выявленных при микроматричном анализе, на примере двух пациентов с картиной мышечной дистрофии Дюшенна. *Медицинская генетика* 2022; 21(12): 56-59.

**Автор для корреспонденции:** Маркова Ж.Г.; e-mail: zhmark71@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

**Дата представления рукописи:** 20.11.2022

## Assessment of the duplication`s pathogenicity detected by chromosomal microarray, in the example of two patients with Duchenne muscular dystrophy

Markova Zh.G., Minzhenkova M.E., Sharkova I.V., Petukhova M.S., Shilova N.V.

Research Centre for Medical Genetics  
1, Moskvorechye str., Moscow 115522, Russian Federation

Intragenic deletions and duplications are a major problem in the interpretation of the chromosomal microarray results in patients with suspected monogenic disease. Assessing the clinical significance and causation of such genetic variants, especially extended duplications, is difficult because CNV`s affecting one or more gene exons can have different phenotypic effects. The article presents the results of the examination of two patients with an incoming diagnosis of muscular dystrophy. Intragenic duplications in the *DMD* gene were diagnosed in both patients during chromosomal microarray analysis. The paper discusses the interpretation features of such CNVs and suggests recommendations for confirmation of the of muscular dystrophy genetics diagnosis.

**Keywords:** Duchenne Muscular Dystrophy, intragenic duplication, chromosomal microarray analysis.

**For citation:** Markova Zh.G., Minzhenkova M.E., Sharkova I.V., Petukhova M.S., Shilova N.V. Assessment of the duplication`s pathogenicity detected by chromosomal microarray, in the example of two patients with Duchenne muscular dystrophy. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]* 2022; 21(12): 56-59. (In Russ.)

**Corresponding author:** Markova Zh.G.; e-mail: zhmark71@mail.ru

**Funding.** The reported study was funded by research work № 122032300370-1 "Study of structure-functional features and mechanisms formation of the chromosomal abnormalities and genomic imbalance".

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

**Accepted:** 20.11.2022

### Введение

Внедрение в клиническую практику передовых (ХМА), стало новым этапом в диагностике субмикроскопических хромосомных перестроек. Этот метод позволяет проводить высокоразрешающий анализ для молекулярно-цитогенетических методов, таких как хромосомный микроматричный анализ

выявления вариации числа копий участков ДНК (copy number variation, CNV) с точностью до одного экзона в некоторых генах [1].

Клиническая интерпретация CNV основывается на их предсказанном воздействии на транскрипт и установленном мутационном механизме для каждого гена. Несмотря на это, некоторые CNV, в том числе внутригенные делеции и дупликации, по-прежнему представляют собой серьезную проблему при оценке результатов ХМА.

Известно, что делеции и дупликации, затрагивающие один или несколько экзонов гена, могут иметь различные последствия. При этом важно отметить, что существует принципиальное различие между делециями и дупликациями. Когда ХМА детектирует делецию, то есть потерю количества копий ДНК, совершенно очевидно, что эта область гена отсутствует на одной из гомологичных хромосом.

При дупликации ХМА обнаруживает наличие дополнительной копии определенной последовательности, но не ее местонахождение в геноме. Дублированная последовательность ДНК не обязательно должна находиться внутри гена. В редких случаях дополнительная копия может быть инсертирована в другое место генома при сохранении функции гена. Нельзя исключить, что дупликация может быть ассоциирована с более сложной перестройкой (например, сопровождается делецией вблизи точки разрыва, инверсией и т.д.). Часто, чтобы сделать какой-либо надежный вывод о клинических последствиях интрагенных дупликаций, необходимо провести дополнительные исследования [2].

Сведений о распространенности и влиянии на фенотип внутригенных делеций и дупликаций относительно мало. Исключение составляет небольшое количество наследственных заболеваний, таких как мышечная дистрофия Дюшенна, для которых достаточно изучена каузативность таких CNV.

Ген дистрофина *DMD* (300377) является крупнейшим известным геном человека, охватывающим 2,2 млн п.н. геномной ДНК, и включает 79 конститутивных экзонов, кодирующих мышечную изоформу (Dp427m) [3]. Крупный размер гена предрасполагает к значительному количеству мутаций, причем почти в 30% случаев мутации в гене возникают *de novo*.

Описаны также крайне редкие варианты, такие как интронные CNV в гене *DMD*. Эти варианты могут провоцировать пропуски экзона путем возникновения новых криптических сайтов сплайсинга, псевдоэкзонов или инвертированной ориентации экзона. Такие атипичные геномные конфигурации сложно выявить су-

ществующими методами молекулярной диагностики (MLPA, секвенирование), и их идентификация основывается на функциональном анализе РНК [4].

**Целью исследования** стало изучение особенностей интерпретации внутригенных дупликаций в гене *DMD* при анализе данных сравнительной геномной гибридизации на примере двух пациентов с мышечной дистрофией Дюшенна.

### Материалы и методы

ХМА проводили на платформе «Affymetrix» с использованием олигонуклеотидных микроматриц высокой плотности Cytoscan HD Array Kit (Affymetrix Inc., Калифорния, США) в соответствии с протоколом производителя – (Applied Biosystems). Данные были обработаны и проанализированы с помощью Affymetrix Chromosome Analysis Suite (ChAS) 4.0 (версия референсного генома NA33.1 (hg19)).

### Результаты и обсуждение

Пробанд 1 – мальчик, 10 лет, с двигательными нарушениями, увеличением мышц голени, повышением уровня креатинфосфокиназы (более 5000), отставанием в умственном развитии. Фенотип на момент обследования: рост 138 см, вес 24 кг, окружность головы 52 см. Нормального телосложения. Лицевые особенности: выступающая нижняя челюсть, оттопыренные уши, псевдогипертрофия икроножных мышц. Пробанд был направлен в консультативное отделение ФГБНУ МГНЦ для уточнения диагноза *мышечная дистрофия Дюшенна* с результатами ранее проведенного секвенирования клинического экзона. По результатам анализа получены данные в пользу дупликации сегмента хромосомы X размером 338 519 п.н., включающей ген *DMD*. Пробанд направлен на ХМА для подтверждения дупликации. В результате ХМА у пробанда обнаружена патогенная дупликация района короткого плеча хромосомы X размером 360 437 п.н. Молекулярный кариотип пробанда (согласно ISCN 2020): arr[hg 19] Xp21.2p21.1(31166892\_31527329)x2. В область дупликации попадает часть гена *DMD* в интервале с 56 по 74 экзон.

Обычно выявление дупликации целых экзонов считается достаточным для подтверждения диагноза у пациентов с подозрением на дистрофинопатию. Тем не менее, при анализе вариантов в гене *DMD* по базе данных LOVD ([www.LOVD.nl/DMD](http://www.LOVD.nl/DMD)) обнаружено, что дупликации в интервале с 56 по 74 экзона ранее не описаны.

Отмечены лишь единичные случаи дупликаций меньшего размера (экзонов 55–61, 55–62 гена *DMD*), которые расценивались как патогенные [5]. Известно, что выявленная дупликация может быть следствием инсерции в другое место генома и не приводить к нарушению последовательности гена *DMD* и появлению клинической картины заболевания. Поэтому у пациентов с фенотипическими признаками дистрофинопатии вероятность такой перестройки крайне мала. Однако этот факт стоит учитывать при оценке патогенности пренатально выявленных дупликаций или установлении факта носительства мутации. Так, Bai Y. с соавт. выявили идентичные дупликации экзонов 56–61 в гене *DMD* у двух мужчин с различными фенотипами. Дупликация участка гена *DMD* в виде тандемного повтора привела к сдвигу рамки и типичному фенотипу мышечной дистрофии Дюшенна, тогда как у бессимптомного носителя дуплицированный фрагмент находился вне гена [6]. Следовательно, при оценке клинической значимости внутригенной дупликации, выявленной при пренатальной диагностике или при отсутствии информации о фенотипе пациента, правило рамки считывания следует применять только с последующим назначением функционального анализа.

Пробанд 2, мальчик 15 лет с фенотипическими проявлениями мышечной дистрофии и нарушением интеллектуального развития. Ребенок от первой беременности, отмечены задержка психомоторного и речевого развития. С 3 лет нарастали трудности при ходьбе, подъеме по лестнице, вставании из положения лежа и сидя, появились боли в икроножных мышцах и умеренная гипертрофия голеней. Биопсия мышечной ткани показала отсутствие дистрофина по всем маркерам. С 12 лет пациент перестал ходить. При секвенировании гена *DMD* и секвенировании клинического экзона, патогенных вариантов не выявлено. Для уточнения диагноза проведен ХМА.

По результатам ХМА обнаружены две несмежные микродупликации на коротком плече хромосомы X. Молекулярный кариотип пациента (согласно ISCN 2020): arr[hg19] Xp21.1(32881255\_33017246)x2, Xp21.3p21.2(29196155\_29382046)x2. Первая дупликация локализована в интервале между экзонами 2 и 3 гена *DMD* и захватывает исключительно интрон 2. В область второй дупликации входит экзон 3 гена *ILIRAPL1* (300206).

Стоит отметить, что делеции и дупликации в гене *DMD* возникают неслучайно и с разным распределением. С самой высокой частотой дупликации наблюдаются около 5'-конца гена, при этом дупликация эк-

зона 2 представлена в наибольшем количестве публикаций [7, 8]. Примечательно, что интронные мутации не всегда приводят к нарушению функции гена и развитию мышечной дистрофии [7]. Например, Bovolenta с соавт. были описаны доброкачественные CNV в виде дупликации в области интрона 2 размером 1,4 т.п.н в группе пациентов с клинической картиной мышечной дистрофии Дюшенна без сопутствующих патогенных вариантов в кодирующей области гена *DMD*. При этом анализ РНК показал неизмененную амплификацию транскрипта экзонов 2 и 3, что исключает нарушение сплайсинга. Кроме того, аналогичные CNV были выявлены и у здоровых мужчин [9]. Однако дупликации в области второго интрона, идентичные выявленной у нашего пациента, описаны не были. В литературе встречаются сообщения о патогенных дупликациях других интронов гена *DMD*, однако они значительно крупнее дупликаций, представленных в работе Bovolenta [7]. Вероятно, именно размер дупликации в интронной области играет определенную роль в изменении процесса сплайсинга. У нашего пациента дупликация составляет 136 т.п.н. и, возможно, приводит к аномалиям сплайсинга, что требует подтверждения путем функционального анализа РНК.

Более того, можно предположить, что две несмежные CNV образовались в точках разрывов на коротком плече хромосомы X вследствие хромосомной перестройки, например, инверсии. Несомненно, инверсии являются нечастой причиной МДД, а парацентрические инверсии встречаются крайне редко, однако такие случаи опубликованы [4,10]. Помимо инверсии в самом гене *DMD*, точки разрывов могут находиться и в межгенной области с вовлечением в перестройку другого гена [10]. Поэтому гипотеза происхождения дупликации в интронной области гена *DMD* совместно с дополнительной дупликацией в области экзона 3 гена *ILIRAPL1* должна быть рассмотрена и проверена с использованием дополнительных методов полногеномного анализа.

В базе данных OMIM аннотирован синдром нарушения интеллектуального развития (# 300143 MENTAL RETARDATION, X-LINKED 21; MRX21), ассоциированный с делецией или мутацией в гене *ILIRAPL1* (300206). Ген *ILIRAPL1* кодирует белок с высоким уровнем экспрессии в нейронах головного мозга. В базе клинических данных DECIPHER описаны микродупликации с близкими координатами, где они классифицированы как варианты с неизвестной клинической значимостью (ID's: 782, 274669) и вероятно патогенный вариант (ID: 349605). Описан случай микродупли-

кации участка короткого плеча хромосомы Xp21.2, захватывающей ген *ILIRAPL1*, у пациента с умственной отсталостью, спастической диплегией, оральной двигательной апраксией [11].

### Выводы

Подтверждение мутации в виде внутригенной дупликации гена *DMD* имеет огромное значение для прогноза заболевания и качественного генетического консультирования. Метод сравнительной геномной гибридизации на основе олигонуклеотидов оказался полезным инструментом для идентификации внутригенных CNV в гене *DMD* [5,9]. ХМА высокого разрешения позволяет обнаружить CNV в виде дупликаций с точками разрывов как в экзонной, так и в интронной областях. Однако этот метод не дает представления о расположении (тандемная дупликация или инсерция) или ориентации (прямая или инвертированная) дублированного сегмента гена [10], поэтому он не является окончательным в постановке молекулярного диагноза. При выявлении при ХМА внутригенных дупликаций у пациентов с подозрением на мышечную дистрофию требуются дополнительные исследования, в частности, полногеномное секвенирование или функциональный анализ. Наблюдения о дупликациях гена *DMD* могут быть полезны при интерпретации многих внутригенных CNV.

### Литература/References

1. Waggoner D., Wain K.E., Dubuc A.M., Conlin L., Hickey S.E., Lamb A.N., Martin C.L., Morton C.C., Rasmussen K., Schuette J.L., Schwartz S., Miller D.T.; ACMG Professional Practice and Guidelines Committee. Yield of additional genetic testing after chromosomal microarray for diagnosis of neurodevelopmental disability and congenital anomalies: a clinical practice resource of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med.* 2018;20(10):1105-1113. doi: 10.1038/s41436-018-0040-6.
2. Aartsma-Rus A., den Dunnen J.T. Phenotype predictions for exon deletions/duplications: A user guide for professionals and clinicians using Becker and Duchenne muscular dystrophy as examples. *Hum Mutat.* 2019;40(10):1630-1633. doi: 10.1002/humu.23850.
3. Muntoni F., Torelli S., Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol* 2003; 2: 731-40. doi: 10.1016/S1474-4422(03)00585-4
3. Baskin B., Stavropoulos D.J., Rebeiro P.A., Orr J., Li M., Steele L., Marshall C.R., Lemire E.G., Boycott K.M., Gibson W., Ray P.N. Complex genomic rearrangements in the dystrophin gene due to replication-based mechanisms. *Mol Genet Genomic Med.* 2014;2(6):539-47. doi: 10.1002/mgg3.108.
4. del Gaudio D., Yang Y., Boggs B.A., Schmitt E.S., Lee J.A., Sahoo T., Pham H.T., Wiszniewska J., Chinault A.C., Beaudet A.L., Eng C.M. Molecular diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy: enhanced detection of dystrophin gene rearrangements by oligonucleotide array-comparative genomic hybridization. *Hum Mutat.* 2008;29(9):1100-7. doi: 10.1002/humu.20841.
5. Bai Y., Liu J., Xu J., Sun Y., Li J., Gao Y., Liu L., Jia C., Kong X., Wang L. Long-Read Sequencing Revealed Extragenic and Intragenic Duplications of Exons 56-61 in DMD in an Asymptomatic Male and a DMD Patient. *Front Genet.* 2022;13:878806. doi: 10.3389/fgene.2022.878806.
6. Bladen C.L., Salgado D., Monges S., et al. The TREAT-NMD DMD Global Database: analysis of more than 7,000 Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum Mutat.* 2015;36(4):395-402. doi: 10.1002/humu.22758.
7. Sheikh O., Yokota T. Advances in Genetic Characterization and Genotype-Phenotype Correlation of Duchenne and Becker Muscular Dystrophy in the Personalized Medicine Era. *J Pers Med.* 2020;10(3):111. doi: 10.3390/jpm10030111.
8. Bovolenta M., Neri M., Fini S., et al. A novel custom high density-comparative genomic hybridization array detects common rearrangements as well as deep intronic mutations in dystrophinopathies. *BMC Genomics.* 2008;9:572. doi: 10.1186/1471-2164-9-572.
9. Zaum A.K., Nanda I., Kress W., Rost S. Detection of pericentric inversion with breakpoint in DMD by whole genome sequencing. *Mol Genet Genomic Med.* 2022;10(10):e2028. doi: 10.1002/mgg3.2028.
10. Whitehead M.T., Helman G., Gropman A.L.. MR Imaging Findings in Xp21.2 Duplication Syndrome. *J Radiol Case Rep.* 2016;10(5):9-14. doi: 10.3941/jrcr.v10i5.2563.