

Редкие вариации числа копий ДНК: микродупликация 20p13 материнского происхождения у пациента с комплексным пороком сердца и аномалией бронхов

Слепухина А.А.^{1,2}, Скрябин Н.А.^{1,3}, Кашеварова А.А.^{1,3},
Новикова М.А.⁴, Лифшиц Г.И.², Лебедев И.Н.^{1,3}

¹ Научно исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск, Россия. a.slepukhina@medgenetics.ru

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской Академии Наук, Новосибирск, Россия

³ Национальный исследовательский томский государственный университет, Томск, Россия

⁴ Сибирский федеральный биомедицинский исследовательский центр им. академика Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия

В работе представлены клинические данные и молекулярно-цитогенетическое описание редкой микродупликации в регионе 20p13 у пациентки с комплексным пороком сердца, аномалией бронхов, дисморфичными фенотипическими чертами, гидроцефалией. Материалы и методы. Пациентке в возрасте 4 месяцев, был проведен полногеномный анализ с использованием ДНК-микрочипов высокого разрешения SurePrint G3 Human Genome CGH+SNP Microarray Kit, 8 x 60K. Результаты. Унаследованная от матери микродупликация включает 46 генов. Фенотип пациентки и данные анамнеза могут быть частично объяснены входящими в перестройку генами. Дупликация генов *GnRH-II*, *OXT* у матери могла повлиять на преждевременное рождение ребенка. Гены *EBF4*, *CENPB*, участвуют в процессах клеточного деления и миграции клеток, активации MAP-киназного пути, и таким образом могут быть вовлечены в эмбриогенез. Ген *ADAM33* влияет на межклеточные взаимодействия в легких и возможно, связан с развитием бронхиальных аномалий у ребенка. Дальнейшее наблюдение за ребенком и обследование матери позволят уточнить влияние микродупликации 20p13 на фенотип.

Ключевые слова: вариации числа копий повторов, врожденные пороки сердца, микродупликация, 20p13, *GnRH-II*, гонадотропин-рилизинг гормон.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Rare copy number variations: maternal microduplication 20p13 region in a patient with complex heart disease and bronchial anomaly

Slepukhina A.A.^{1,2}, Skryabin N.A.^{1,3}, Kashevarova A.A.^{1,3},
Novikova M.A.⁴, Lifshits G.I.², Lebedev I.N.^{1,3}

¹ Research Institute of Medical Genetics of Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russia. e-mail: a.slepukhina@medgenetics.ru

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

⁴ Meshalkin Siberian Federal Biomedical Research Center, Novosibirsk, Russia

This paper presents clinical data and molecular-cytogenetic description of rare microduplication 20p13 region in a patient with complex heart disease, bronchial anomaly, dysmorphic phenotypic traits, hydrocephalus. Materials and methods. A 4-month-old patient underwent a full-genomic analysis using high-resolution DNA microarrays SurePrint G3 Human Genome CGH + SNP Microarray Kit, 8 x 60K. Results. The microduplication inherited from the mother includes 46 genes. The patient's phenotype and medical history can be partially explained by the genes involved in rearrangement. The duplication of the genes *GnRH-II*, *OXT* in the mother could affect the premature birth of the child. Genes *EBF4*, *CENPB* participate in the processes of cell division and cell migration, activation of the MAP-kinase pathway, and thus can be involved in embryogenesis. The gene *ADAM33* influences the intercellular interactions in the lungs and is possibly associated with the development of bronchial abnormalities in the child. Further monitoring of the patient and a mother's examination will make it possible to clarify the effect of microduplication 20p13 on the phenotype.

Key words: Copy number variations, congenital heart defects, microduplication, 20p13, *GnRH-II*, gonadotropin-releasing hormone.

Введение

Методы полногеномного анализа с использованием ДНК-микрочипов активно вошли в клиническую практику после 2010 года и были рекомендованы к использованию у лиц с расстройствами аутистического спектра (РАС), задержкой развития, интеллектуальной недостаточностью, когнитивными расстройствами и множест-

венными пороками развития [1]. Как правило, микро-матричный анализ ДНК является инструментом диагностики геномного дисбаланса в случае увеличения или уменьшения копийности участков ДНК размером 0,1—10 млн п.н. — это является основой его диагностических возможностей, т.е. анализ направлен на выявление субмикроскопических перестроек ДНК, отличающихся по числу копий от референсного генома. Нарас-

тающий объем данных по результатам этого анализа открыл некоторые трудности в классификации патогенности выявленных вариаций. Прежде всего это связано с невозможностью достоверно определить и разграничить одновременное влияние нескольких (или нескольких десятков) генов, включенных в дублированный или делетированный участок ДНК, на формирование сложного фенотипа. Возникающие системные изменения связывают с увеличением или уменьшением дозы множества генов, расположенных в участке, подверженном изменению числа копий ДНК и с расстройством координации экспрессии генов [2]. Рекуррентные перестройки приводят к развитию микроделеционных и микродупликационных синдромов. Варианты числа копий ДНК, классифицированные как условно непатогенные, неизвестного клинического значения и условно патогенные становятся главной трудностью в работе врача генетика, так как вводят пациента в группу неопределенного диагностического поиска, врач должен принять нетривиальные решения, чтобы попытаться подтвердить или опровергнуть влияние выявленного варианта на фенотип. В основном, индивидуальные редкие вариации числа копий ДНК попадают в эти промежуточные категории.

Материалы и методы

Клиническое и инструментальное обследование было проведено пробанду с диагнозом *врожденный порок сердца* (ВПС). Диагноз ВПС устанавливался на основании эхокардиографических данных, согласно рекомендациям РКО [3]. Присутствие экстракардиальной патологии у пробанда стало основанием для проведения полногеномного анализа с использованием сравнительной геномной гибридизации на чипах. Образцы ДНК были получены от родителей для оценки происхождения выявляемых вариаций числа копий ДНК. ДНК детей и родителей для молекулярно-цитогенетического анализа выделяли с использованием стандартного протокола фенол-хлороформной экстракции из лимфоцитов периферической крови.

Мечение обеих анализируемой и контрольной ДНК проводилось с использованием набора SureTag Complete DNA Labeling Kit в соответствии с протоколом производителя (Agilent Technologies, США). Гибридизацию проводили на ДНК-микрочипах высокого разрешения SurePrint G3 Human Genome CGH+SNP Microarray Kit, 8 x 60K в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем (Agilent Technologies, США). Данные получали с помощью программ Scan (v. 9.1.1.1), визуализировали в программе Cyto-genomics (v. 3.0) (Agilent Technologies, США) и анализировали с использованием публично доступных баз данных DGV (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>) и DECIPHER (<https://decipher.sanger.ac.uk/>). Описания функций генов, локализованных в областях пере-

строек, были получены из баз данных NCBI Gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>), GeneCards (<http://www.genecards.org/>) и OMIM (<http://www.omim.org/>).

Верификацию вариантов числа копий ДНК проводили с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Реал-тайм ПЦР) по ранее опубликованному подробному описанию технологии [4].

ДНК-праймеры на область микроделеции / микродупликации 20p13 (ген *SLC4A11*)

SLC4A11 F 5'- AAACAAGGCTGTGGGCAAAT -3'

SLC4A11 R 5'- CATTGAGAGACCCGAAAGCG -3'

В качестве контроля использовались праймеры на последовательность гена *HEXB*

HEXB F 5'-CCGGGCACAATAGTTGAAGT-3'

HEXB R 5'-TCCTCCAATCTTGTCCATAGC-3'

Подбор оптимальных праймеров для проведения реакции проводили с помощью программ Primer3. Проверку специфичности последовательности выбранных праймеров проводили с использованием программы Primer-BLAST.

Исследование выполнено с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» и ресурсов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Результаты и обсуждение

Пробанд рожден на 33 неделе от первой беременности. О пороке сердца известно с 20 недель беременности, также в ходе ультразвукового скрининга установлена задержка внутриутробного развития тяжелой степени. На момент обследования возраст 4 месяца, проведено оперативное лечение на основании диагноза: дефект межжелудочковой перегородки, открытое овальное окно, открытый артериальный проток, недостаточность кровотока легочных вен в верхнюю полую вену; высокая легочная гипертензия. При осмотре припухлость век, большие щеки, нос грушевидный, квадратная форма головы. Помимо бронхолегочной дисплазии недоношенных детей, также отмечались аномалия строения бронхиального древа правого легкого, дыхательная недостаточность средней степени тяжести, умеренная наружная гидроцефалия. В результате ДНК-диагностики с использованием микрочипов выявлена микродупликация *arr[hg18]20p13(2412867_3824216)x3* mat размером 1411 т.п.н., которая была расценена как условно патогенная, так как отсутствует в таком виде в DGV, содержит 5 генов, кодирующих ферменты, ген транскрипционного фактора *EBF4*, влияющий на миграцию клеток нервного гребня, гены, ответственные за половое созревание, деторождение — гены гонадотропин-рилизинг гормона 2 (ГнРГ2) и окситоцина. Ген *ADAM33*, также включенный в регион дупликации, связан с межклеточ-

ными взаимодействиями, ассоциирован с ранней детской астмой и участвует в регуляции функционирования легких [5]. Ген *CENPB* ответственен за формирование центромеры и является высоко консервативным белком, в том числе экспрессируется в гладкомышечных клетках сосудов и связан с перекрестной активацией MAP-киназного пути [6]. Сходные дубликации (перекрывание около 30%) в регионе 20p13 в базе DECIPHER отмечены как дубликации неизвестного клинического значения или условно патогенные. Есть отдельные схожие черты фенотипического описания: полные щеки, задержка внутриутробного развития, пороки сердца. У двух пациенток с делецией региона 20p13 (частично пересекается с найденным, в генах ГнРГ2 и окситоцина), есть отклонения в наступлении полового созревания, что предполагается возникло по причине изменения доз указанных генов [7]. ГнРГ2 является членом семейства гонадолиберина и контролирует пиковое напряжение лютеинизирующего гормона перед овуляцией, стимулируется эстрадиолом по принципу положительной обратной связи. Нейроны, продуцирующие ГнРГ2 находятся как в гипоталамусе, так и в нервных клетках энтеральной нервной системы, и могут влиять на моторную функцию кишечника [8]. Окончательно функции ГнРГ2 еще не определены, так как не у всех позвоночных существует этот класс белков. В недавнем исследовании женщин с эндометриозом регион arr[hg18]20p13(2472509_2481915) x 3 размером 9,4 т.п.н. был ассоциирован с этим заболеванием [9]. Отметим, что эндометриоз — многофакторное заболевание, связанное с патологическим разрастанием тканей эндометрия за пределами внутреннего слоя матки. Рост эндометрия контролируется женскими половыми гормонами, которые в свою очередь регулируются тропными гормонами и рилизинг факторами. В обзорной статье по лечению эндометриоза описаны положительные эффекты от применения агонистов ГнРГ (при длительном применении проявляются как антагонисты половых гормонов вследствие десенсибилизации рецепторов ГнРГ гипофиза) [10]. Оценка влияния дубликации на репродуктивный статус матери не может быть проведена по причине отсутствия гинекологического анамнеза.

У другой пациентки с делецией региона 20p13, перекрывающейся с выявленной дубликацией, описаны сердечно-сосудистые мальформации, но не указаны причастные гены-кандидаты [11], указаний на нарушение полового созревания в работе нет, данные о сроке рождения не представлены. Некоторые исследователи склоняются к тому, что сама по себе задержка внутриутробного развития может являться следствием неспецифического действия хромосомных аномалий и также проявляться в виде пороков по типу гипоморфий, недоразвития органов [12]. Неспецифические пороки сердца у пробанда, таким образом, могут быть отчасти объяснены этой теорией. В то же время имеется ряд публикаций, излагающих точку зрения, что редкие вариации

числа копий ДНК являются причиной пороков сердца (как с использованием ген-кандидатного подхода, так и без) [13—17]. Дубликация унаследована пробандом от матери. Возможно влияние дубликации на экспрессию гена окситоцина, который непосредственно запускает процесс родов, и может приводить к преждевременным родам. Матери пациентки эхокардиография не проводилась.

Известны данные о связи локуса 20p13 (LOD score 3,81) с аутизмом. В нашем случае, учитывая возраст ребенка, пока невозможно получить клинические данные о проявлениях аутистических черт, также нет информации о психологических или поведенческих особенностях матери [18].

Ребенку и матери (перед планированием деторождения, во время беременности) следует пройти анализ уровня половых гормонов и их рилизинг факторов, чтобы оценить текущее состояние репродуктивной системы. Для дальнейшего прогноза репродуктивного здоровья ребенка педиатру и родителям следовало бы внимательно отслеживать клинические изменения при наступлении пубертатного периода. Безусловно, требуется полное клиническое обследование матери. При наступлении следующей беременности, в случае отклонений у плода, рекомендуется проведение пренатальной диагностики для оценки носительством плода дубликации с последующим наблюдением за течением беременности и родоразрешением.

Список литературы

1. Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med.* 2011;13(7):680-5. doi:10.1097/GIM.0b013e3182217a3a.
2. Fahed AC, Gelb BD, Seidman JG, Seidman CE. Genetics of congenital heart disease: the glass half empty. *Circ Res.* 2013;112(4):707-20. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.300853.
3. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, и др. Рекомендации по количественной оценке структуры и функции камер сердца. *Российский кардиологический журнал.* 2012;3(95):3-28.
4. Слепухина АА, Кашеварова АА, Скрыбин НА, Новикова МА, Лифшиц ГИ, Лебедев ИН. Алгоритм молекулярно-цитогенетической диагностики микроделеционных синдромов врожденных пороков развития. В: Методические рекомендации по медицинским технологиям диагностики и лечения хромосомных, орфанных и многофакторных заболеваний человека/ под редакцией проф. В.А. Степанова. Академизда. Новосибирск; 2016:175-194.
5. Wang X, Li W, Huang K, и др. Genetic variants in ADAM33 are associated with airway inflammation and lung function in COPD. *BMC Pulm Med.* 2014;14:173. doi:10.1186/1471-2466-14-173.
6. Robitaille G, Christin M-S, Clement I, Senecal J-L, Raymond Y. Nuclear autoantigen CENP-B transactivation of the epidermal growth factor receptor via chemokine receptor 3 in vascular smooth muscle cells. *Arthritis Rheum.* 2009;60(9):2805-16. doi:10.1002/art.24765.

7. Martin MM, Vanzo RJ, Sdano MR, Baxter AL, South ST. Mosaic deletion of 20pter due to rescue by somatic recombination. *Am J Med Genet Part A*. 2016;170(1):243-248. doi:10.1002/ajmg.a.37407.
8. Ohlsson B. Gonadotropin-Releasing Hormone and Its Role in the Enteric Nervous System. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:110. doi:10.3389/fendo.2017.00110.
9. Mafra F, Mazzotti D, Pellegrino R, и др. Copy number variation analysis reveals additional variants contributing to endometriosis development. *J Assist Reprod Genet*. 2017;34(1):117-124. doi:10.1007/s10815-016-0822-1.
10. DiVasta AD, Laufer MR. The use of gonadotropin releasing hormone analogues in adolescent and young patients with endometriosis. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2013;25(4):287-292. doi:10.1097/GCO.0b013e32836343eb.
11. Firth HV. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources. *Am J Hum Genet*. 2009;84:524-533.
12. Гринберг КН, Кухаренко ВИ. Реализация фенотипического эффекта хромосомных аномалий у человека. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013;17(1):32-39.
13. Fakhro KA, Choi M, Ware SM, и др. Rare copy number variations in congenital heart disease patients identify unique genes in left-right patterning. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108(7):2915-2920. doi:10.1073/pnas.1019645108.
14. Hitz M-P, Lemieux-Perreault L-P, Marshall C, и др. Rare Copy Number Variants Contribute to Congenital Left-Sided Heart Disease. *Spinner NB, ред. PLoS Genet*. 2012;8(9):e1002903. doi:10.1371/journal.pgen.1002903.
15. Priest JR, Girirajan S, Vu TH, Olson A, Eichler EE, Portman MA. Rare copy number variants in isolated sporadic and syndromic atrioventricular septal defects. *Am J Med Genet Part A*. 2012;158A(6):1279-1284. doi:10.1002/ajmg.a.35315.
16. Lalani SR, Shaw C, Wang X, и др. Rare DNA copy number variants in cardiovascular malformations with extracardiac abnormalities. *Eur J Hum Genet*. 2013;21(2):173-81. doi:10.1038/ejhg.2012.155.
17. Xie L, Chen J-L, Zhang W-Z, и др. Rare De Novo Copy Number Variants in Patients with Congenital Pulmonary Atresia. *Zwick ME, ред. PLoS One*. 2014;9(5):e96471. doi:10.1371/journal.pone.0096471.
18. Weiss LA, Arking DE, Gene Discovery Project of Johns Hopkins & the Autism Consortium TGDP of JH the A, Daly MJ, Chakravarti A. A genome-wide linkage and association scan reveals novel loci for autism. *Nature*. 2009;461(7265):802-8. doi:10.1038/nature08490.