

# Паттерн метилирования ДНК в участках генома с наследуемыми CNV

Скрябин Н.А.<sup>1,2</sup>, Васильев С.А.<sup>1,2</sup>, Толмачева Е.Н.<sup>1,2</sup>, Шорина А.Р.<sup>3</sup>,  
Савченко Р.Р.<sup>1</sup>, Кашеварова А.А.<sup>1,2</sup>, Лебедев И.Н.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Научно-исследовательский институт медицинской генетики, г. Томск, Россия

<sup>2</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск

<sup>3</sup> Новосибирский областной детский клинический психоневрологический диспансер, Новосибирск

Роль CNV в патогенезе умственной отсталости и аутизма значительна. Тем не менее, при анализе CNV-ассоциированных заболеваний дискуссионным вопросом остается выделение патогенетически значимых CNV, при этом механизмы фенотипического проявления унаследованных полиморфных вариантов и их неполной пенетрантности остаются во многом неясными. В настоящее время неполная пенетрантность CNV объясняется, в основном, с точки зрения аллельных взаимодействий различных генетических вариантов. При этом эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов в контексте структурных вариаций генома остаются практически неизученными. Целью настоящей работы являлся поиск дифференциально метилированных CpG-сайтов, локализованных в регионах с унаследованными CNV, в семьях с умственной отсталостью и аутизмом. В результате проведенной работы идентифицировано дифференциальное метилирование внутригенных CpG-сайтов гена *IMMP2L* в семье больного с умственной отсталостью и микроделецией 7q31.1. Полученные данные указывают на возможность участия метилирования ДНК в реализации механизмов неполной пенетрантности CNV-ассоциированных патологических состояний.

**Ключевые слова:** CNV, метилирование ДНК, умственная отсталость, аутизм.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 16-15-10229

## DNA methylation pattern in regions of the genome with inherited CNV

Skryabin N.A.<sup>1,2</sup>, Vasiliev S.A.<sup>1,2</sup>, Tolmacheva E.N.<sup>1,2</sup>, Shorina A.R.<sup>3</sup>, Savchenko R.R.<sup>1</sup>,  
Kashevarova A.A.<sup>1,2</sup>, Lebedev I.N.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk

<sup>2</sup> National Research Tomsk State University, Tomsk

<sup>3</sup> Novosibirsk Regional Children's Clinical Psychoneurological Dispensary, Novosibirsk

The role of CNV in pathogenesis of intellectual disability and autism is significant. Nevertheless, in the analysis of CNV-associated diseases, the interpretation of pathogenetically significant CNV remains a debatable issue, while the mechanisms of the phenotypic manifestation of inherited CNVs and their incomplete penetrance remain largely unclear. At present, the incomplete penetrance of CNV is explained mainly from the point of view of allelic interactions of various genetic variants. At the same time, the epigenetic mechanisms of gene expression regulation in the context of structural genome variations remain practically unexplored. The purpose of this study was to search for differentially methylated CpG sites located in regions with inherited CNV in families with mental retardation and autism. As a result, differential methylation of intragenic CpG sites of the *IMMP2L* gene in the family of a patient with intellectual disability and 7q31.1 microdeletion was identified. The data obtained indicate the possibility of the involvement of DNA methylation in the regulatory mechanisms of incomplete penetration of CNV-associated diseases.

**Keywords:** CNV, DNA methylation, mental retardation, autism.

### Актуальность

Геном человека характеризуется высокой вариабельностью по копияности отдельных регионов (copy number variation, CNV), размеры которых варьируют от нескольких десятков до миллиона пар оснований. Около 90% регионов CNV перекрываются с известными генами, что указывает на их возможную роль в регуляции экспрессии через эффект дозы или положения гена. Точное число наследственных заболеваний, обусловленных CNV, остается неизвестным, однако очевидно,

что их количество может быть очень значительным. Показано, что CNV лежат в основе 14–18% случаев умственной отсталости (УО) неясной этиологии [1]. Другой частой нозологией, ассоциированной с CNV, является аутизм — от 6% до 10% случаев аутизма и расстройств аутистического спектра (РАС) ассоциированы с CNV [2].

Учитывая значительное количество CNV в геноме здоровых индивидов, важной проблемой является оценка потенциальной патогенетической значимости различных CNV. Возможно, данные перестройки могут

проявляться фенотипически, но с низким уровнем пенетрантности. Однако практически нет данных, объясняющих неполную пенетрантность унаследованных структурных вариаций генома, которая может лежать в основе недостаточной оценки патогенетически значимых CNV. Это приводит к сложностям в выявлении хромосомных перестроек и кандидатных генов у больных, а также к неопределенности прогноза наследования таких нарушений и повышению риска возникновения различных CNV-ассоциированных заболеваний в потомстве носителей полиморфных вариантов.

В настоящее время неполная пенетрантность CNV объясняется, в основном, с точки зрения аллельных взаимодействий различных генетических вариаций [3, 4]. В частности, рассматриваются варианты взаимодействия «CNV-CNV», «CNV-анеуплоидия» и «CNV-точковые мутации». При этом варианты взаимодействия CNV с эпигенетическими модификациями генома рассматриваются лишь в отдельных случаях, в основном, в контексте импринтированных локусов генома [5]. *Целью настоящего исследования* явился поиск дифференциально метилированных CpG-сайтов, локализованных в регионах с унаследованными CNV, в семьях с УО и аутизмом.

#### Материалы и методы

Проанализировано 42 образца ДНК из 13 семей (13 пробандов, 5 сибсов, 11 отцов и 13 матерей). Исследование было выполнено с использованием оборудования ЦКП «Медицинская геномика» на базе НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, а также с использованием образцов ДНК из биобанка «Биобанк населения Северной Евразии». Все семьи, принявшие участие в исследовании, подписали информированное согласие. Проведение работы было одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Детекция несбалансированных микроструктурных хромосомных перестроек была проведена с использованием микрочипов SurePrint G3 Human CGH Microarray 8 x 60K (Agilent Technologies, США). Методом количественной ПЦР были подтверждены все идентифицированные CNV и установлено их родительское происхождение.

Для анализа статуса метилирования ДНК было использовано бисульфитное секвенирование ампликонов (Bisulfite Amplicon Sequencing, BSAS) [5]. Метод основан на ПЦР амплификации бисульфит-конвертированной ДНК с последующим секвенированием методом NGS. После бисульфитной конвертации ДНК была проведена амплификация участков 300–800 п.н. в промоторных регионах выбранных генов и во внутригенных CpG-сайтах путём ПЦР. Присоединение адаптеров и индексов осуществлялось с использованием набора Nextera XT (Illumina, США). Секвенирование проводилось на сек-

венаторе MiSeq с использованием набора MiSeq Reagent Nano Kit v2 (Illumina, США). Для цитозина в составе CpG-пар оценивался индекс метилирования (отношение числа ридов с C/T).

#### Результаты и обсуждение

В лаборатории цитогенетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, начиная с 2012 года проводятся работы по поиску микроструктурных хромосомных аномалий при различных нозологиях, в частности при недифференцированной УО, аутизме и РАС. Для настоящего исследования из накопленной базы данных были отобраны 13 семей больных с УО и аутизмом, в которых были идентифицированы унаследованные патогенетически значимые CNV или унаследованные CNV с неизвестной патогенетической значимостью, не являющиеся полиморфными вариантами. Всего было выделено девять микроструктурных хромосомных перестроек, удовлетворяющих указанным требованиям — 5 дупликаций (3p26.3, 5q33.1, 12q24.12, 17p13.3, 18p11.32) и 4 делеции (7q31.1, 9p21, 12p11.1, 17q12). Три хромосомные аберрации повторялись в двух независимых родословных — делеции 7q31.1 и 17q12 и дупликация 12q24.12. Все идентифицированные CNV были подтверждены методом ПЦР в реальном времени, также этим методом были установлены их наследование и происхождение. У всех родителей, являющихся носителями CNV, клиническая картина не проявлялась.

В выявленных регионах с CNV были отобраны гены, изменение экспрессии которых могло привести к развитию клинической картины у пробандов. Основным критерием отбора генов являлась функция гена, т.е. были отобраны гены, продукты которых участвуют в функционировании нервной системы. Также учитывалось наличие CpG-островков в промоторных регионах генов и/или внутригенных CpG-сайтов. Отобранные гены отображены в таблице.

В результате анализа промоторных областей генов *SYT10*, *LINGO2* и *ASTN1* дифференциального метилирования CpG-сайтов не было выявлено. Уровень метилирования исследованных CpG-сайтов в промоторных областях был очень низким (0–10%). В промоторах генов *ACAD10*, *NDC80*, и *SLFN11*, напротив, был выявлен очень высокий уровень метилирования — 80–100%.

Дифференциальное метилирование было выявлено при анализе профилей метилирования CpG-сайтов в первом экзоне, а также в первом, третьем, четвертом и пятом интронах гена *IMMP2L* в семье № 9. В литературе также описаны CNV, затрагивающие ген *IMMP2L*, при этом все они являются унаследованными, преимущественно от отцов, которые были как клинически здоровыми, так и с различными неврологическими расстройствами [6, 7]. При сравнении профилей метилирования в образцах ДНК родителей, пробанда и здорового сибса было показано, что паттерны метилирования детей и от-

Исследованные микроструктурные хромосомные перестройки и гены, в них локализованные

№ семей	CNV	Размер CNV, т.п.н.	Происхождение	Гены	Число изученных CpG-сайтов
1	dup18p11.32	432	Отцовское	<i>SMCHD1</i>	36
				<i>NDC80</i>	5
2	dup12q24.12	125	Материнское	<i>ACAD10</i>	14
3	dup12q24.12	125	Материнское	<i>ACAD10</i>	14
4	dup5q33.1	115	Материнское	<i>GRPEL2</i>	1
5	del1q25.2	6140	Материнское	<i>ASTN1</i>	72
6	dup3p26.3	832	Отцовское	<i>CNTN6</i>	18
7	dup17p13.3	733	Материнское	<i>GEMIN4</i>	14
8	del12p11.1	517	Материнское	<i>SYT10</i>	65
9	del7q31.1	114	Материнское	<i>IMMP2L</i>	87
10	del7q31.1	44	Материнское	<i>IMMP2L</i>	87
11	del17q12	51	Отцовское	<i>SLFN11</i>	15
12	del17q12	51	Материнское	<i>SLFN11</i>	15
13	del9p21.1	112	Материнское	<i>LINGO2</i>	25

ца схожи, в то время как паттерн метилирования матери отличается от остальных членов семьи (рис. 1). Было выявлено, что у матери наблюдается гипометилирование CpG-сайтов в интронах гена *IMMP2L* по сравнению с детьми (рис. 2). CpG-сайты, локализованные в первом экзоне, во всех случаях были не метилированы. Однако в интронах наблюдался более низкий уровень метилирования у матери по отношению к обоим детям, в частности по 17 CpG-сайтам разница в уровне метилирования составляла более 10%. Тот факт, что профиль метилирования детей и отца был примерно одинаковым, свидетельствует в пользу того, что гипометилирование у матери не является возрастзависимым эффектом.

В семье № 10 также была выявлена небольшая внутригенная делеция в гене *IMMP2L* у двух детей и

у здоровой матери. В результате кластерного анализа было показано, что профили метилирования детей и отца схожи, в то время как профиль метилирования матери отличается от остальных членов семьи (рис. 3). В отличие от семьи № 9, в семье № 10 паттерн метилирования детей оказался более сходным (рис. 4). Возможно, это является отражением того, что в данном случае оба ребенка являются больными. Гипометилирование у матери наблюдалось по меньшему числу сайтов, чем в семье № 9 — в девяти гипометилированных CpG-сайтах разница уровня метилирования составляла более 10%.

На настоящий момент роль метилирования внутригенных CpG-сайтов в регуляции экспрессии генов изучена мало. Было показано что в генах со средним

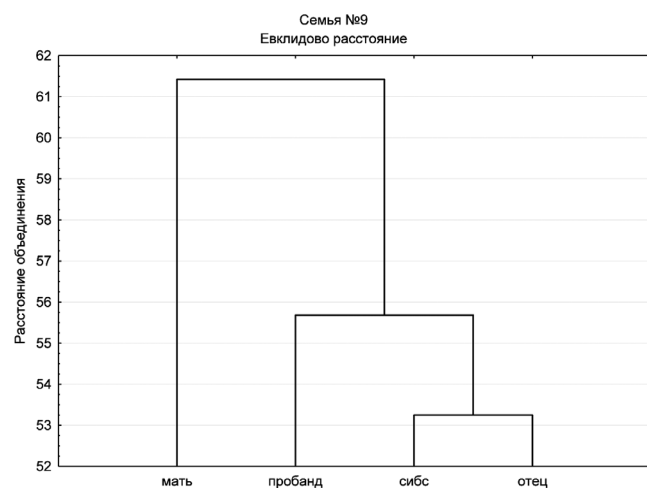


Рис. 1. Кластерный анализ профиля метилирования в гене *IMMP2L* у членов семьи № 9.

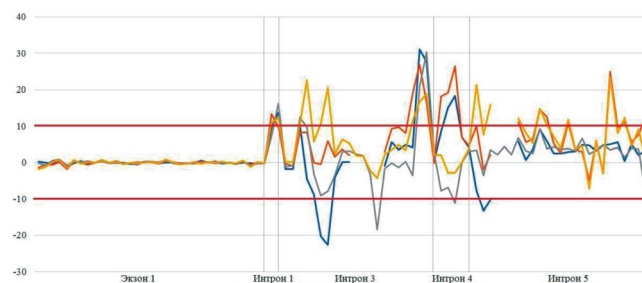


Рис. 2. Отношение индексов метилирования CpG-сайтов в гене *IMMP2L* между детьми и родителями семье № 9. Синим цветом обозначены значения отношения профиля метилирования CpG-сайтов пробанда к профилю метилирования CpG-сайтов отца; серый — отношение профиля метилирования CpG-сайтов сибса к профилю метилирования CpG-сайтов отца; оранжевый — отношение профиля метилирования CpG-сайтов пробанда к профилю метилирования CpG-сайтов матери; желтый — отношение профиля метилирования CpG-сайтов сибса к профилю метилирования CpG-сайтов матери.

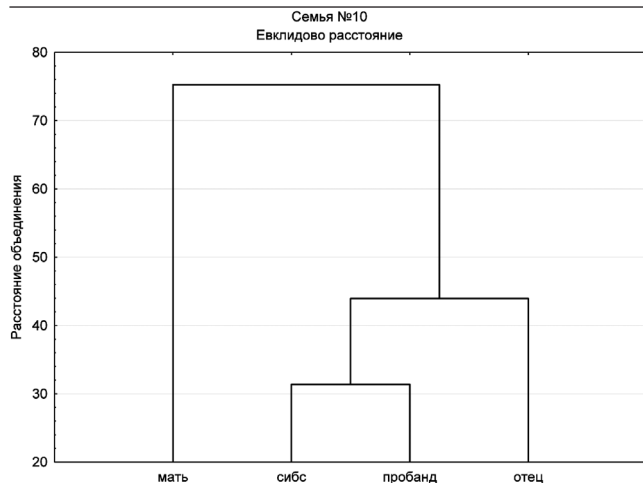


Рис. 3. Кластерный анализ профиля метилирования в гене *IMMP2L* у членов семьи № 10.

уровнем экспрессии наблюдается прямая корреляция уровня метилирования этих областей и экспрессии, тогда как в низко- и высокоэкспрессирующихся генах корреляция обратная [8]. В семьях № 9 и № 10 есть вероятность того, что гипометилирование внутригенных CpG-сайтов гена *IMMP2L* у матерей, носителей делеции, приводит к повышению уровня экспрессии гена и соответственно к компенсации количества белкового продукта.

### Заключение

В настоящей работе было идентифицировано дифференциальное метилирование ДНК в субсегменте 7q31.1 с делециями в гене *IMMP2L* между здоровыми матерями, носителями делеции, и остальными членами семей. Данная находка указывает на возможность участия эпигенетических модификаций генома в реализации механизмов неполной пенетрантности унаследованных CNV.

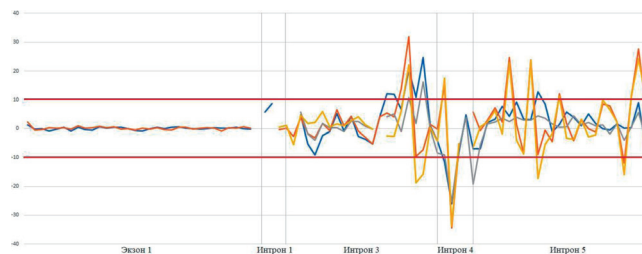


Рис. 4. Отношение индексов метилирования CpG-сайтов в гене *IMMP2L* между детьми и родителями семье № 10. Синим цветом обозначены значения отношения профиля метилирования CpG-сайтов пробанда к профилю метилирования CpG-сайтов отца; серый — отношение профиля метилирования CpG-сайтов сибса к профилю метилирования CpG-сайтов отца; оранжевый — отношение профиля метилирования CpG-сайтов пробанда к профилю метилирования CpG-сайтов матери; желтый — отношение профиля метилирования CpG-сайтов сибса к профилю метилирования CpG-сайтов матери.

### Список литературы

1. Hochstenbach R, Buizer-Voskamp JE, Vorstman JAS et al. Genome arrays for the detection of copy number variations in idiopathic mental retardation, idiopathic generalized epilepsy and neuropsychiatric disorders: Lessons for diagnostic workflow and research. *Cytogenet Genome Res.* 2011;135(3-4):174-202.
2. Persico AM, Napolioni V. Autism genetics. *Behav Brain Res.* 2013; 251:95-112.
3. Beckmann JS, Estivill X, Antonarakis SE. Copy number variants and genetic traits: closer to the resolution of phenotypic to genotypic variability. *Nat Rev Genet.* 2007;8(8):639-46.
4. Lee C, Scherer SW. The clinical context of copy number variation in the human genome. *Expert Rev Mol Med.* 2010;12(March):e8.
5. Smith AC, Suzuki M, Thompson R, et al. Maternal gametic transmission of translocations or inversions of human chromosome 11p15.5 results in regional DNA hypermethylation and downregulation of CDKN1C expression. *Genomics.* 2012;99(1):25-35.
6. Gimelli S, Capra V, Di Rocco M, et al. Interstitial 7q31.1 copy number variations disrupting *IMMP2L* gene are associated with a wide spectrum of neurodevelopmental disorders. *Mol Cytogenet.* 2014;7:54.
7. Bertelsen B, Melchior L, Jensen LR et al. Intragenic deletions affecting two alternative transcripts of the *IMMP2L* gene in patients with Tourette syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2014;22(11):1283-1289.
8. Jjingo D, Conley AB, Yi SV et al. On the presence and role of human gene-body DNA methylation. *Oncotarget.* 2012;3(4):462-474.