

Частота и спектр хромосомных микроудuplicаций у пациентов с нарушениями умственного развития

Беляева Е.О.^{1*}, Кашеварова А.А.¹, Скрябин Н.А.¹, Лопаткина М.Е.¹,
Салюкова О.А.^{1,2}, Филимонова М.Н.¹, Лежнина О.В.¹, Шорина А.Р.³,
Масленников А.Б.⁴, Назаренко Л.П.^{1,2}, Лебедев И.Н.^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск

² ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск

³ ГБУЗ Новосибирской области «Новосибирский областной детский клинический психоневрологический диспансер», Новосибирск

⁴ ГБУЗ Новосибирской области «Городская больница № 1», Новосибирск

* e-mail: eo-belyaeva@mail.ru

У пациентов с интеллектуальной недостаточностью и нарушениями развития описано более 230 микроделений и только порядка 80 микроудuplicаций с доказанной патогенетической значимостью. Факт зарегистрированного дисбаланса по числу CNV с преобладанием микроделений может являться косвенным подтверждением устоявшегося мнения, что микроудuplicации являются менее патогенными ввиду более мягкого клинического проявления. Цель исследования — определить частоту и спектр патогенетически значимых хромосомных микроудuplicаций у пациентов с нарушениями умственного развития, оценить соотношение клинически значимых микроудuplicаций и микроделений в данной группе больных. Выборка сформирована из 216 пациентов в возрасте от 2 до 18 лет: дети, страдающие нарушениями умственного развития и имеющие дизморфии и/или врожденные аномалии. Поиск хромосомных микроудuplicаций проводился методом матричной сравнительной геномной гибридизации на микрочипах (8х60K, Agilent Technologies). Для подтверждения обнаруженных у пробандов сегментных трисомий и определения их происхождения использовался метод количественной ПЦР в режиме реального времени. Среди выявленных патогенетически значимых вариаций числа копий участков ДНК, зарегистрированных у 81 пациента с нарушениями умственного развития (37%), несбалансированные транслокации или комбинации разных типов CNVs идентифицированы у 9 человек, 2 пациента явились носителями кольцевых хромосом 13 и 22, у 70 больных обнаружено 36 делеций и 34 дупликации, соотношение которых составило 51% и 49% соответственно. При анализе происхождения частичных трисомий установлено, что в 8 случаях (47%) микроудuplicации возникли *de novo*, а в 9 случаях (53%) были унаследованы от фенотипически здоровых родителей. Частота клинически значимых хромосомных микроудuplicаций в группе пациентов с нарушениями умственного развития составила 15,7%, микроделений — 16,7%. Равнопредставленность полярных изменений копийности ДНК в нашем исследовании, вероятно, может указывать на недоучет микроудuplicаций как причины развития патологии и на важность их более детального изучения.

Ключевые слова: нарушения умственного развития, вариации числа копий участков ДНК, хромосомные микроудuplicации, матричная сравнительная геномная гибридизация.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-15-10229.

Prevalence and spectrum of chromosomal microduplications in patients with mental retardation

Belyaeva E.O.^{1*}, Kashevarova A.A.¹, Skryabin N.A.¹, Lopatkina M.E.¹,
Salyukova O.A.^{1,2}, Filimonova M.N.¹, Lezhnina O.V.¹, Shorina A.R.³,
Maslennikov A.B.⁴, Nazarenko L.P.^{1,2}, Lebedev I.N.^{1,2}

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of Russian Academy of Sciences, Tomsk

² Siberian State Medical University, Tomsk

³ «Novosibirsk City Clinical Hospital № 1» Novosibirsk

⁴ «Novosibirsk Regional Children's Clinical Psychoneurologic Dispensary» Novosibirsk

* e-mail: eo-belyaeva@mail.ru

To date, more than 230 microdeletion and 80 microduplication syndromes were revealed in patients with intellectual deficiency and developmental delay. The fact that deletions predominate may be an indirect confirmation of the established opinion that microduplications are less pathogenic in case of a milder clinical manifestation. The aim of the study was to determine the frequency and spectrum of pathogenetically significant chromosomal microduplications among patients with disabilities of mental development, to estimate the ratio of clinically significant microdilutions and microdeletions in this group of patients. The sample consists of 216 patients aged 2 to 18 years: children with mental development disorders, and having dysmorphia and/or congenital anomalies. The

search for chromosomal microduplications was carried out using matrix comparative genomic hybridization on microarrays (8x60K, Agilent Technologies). To confirm the segmental trisomy identified in the probands and determine their parental origin, a quantitative real-time PCR method was used. Among the detected pathogenetically significant variations in the number of copies of DNA regions registered in 81 patients with mental development disorders (37%), unbalanced translocations or combinations of different types of CNVs were identified in 9 patients, 2 patients were carriers of ring chromosomes 13 and 22, 70 patients were found with 36 deletions and 34 duplications, the ratio of which was 51% and 49% respectively. In the process of analyze of the origin of partial trisomy it was established that 8 cases (47%) of microduplication appeared *de novo* and 9 cases (53%) were inherited from phenotypically healthy parents. The frequency of clinical significant chromosomal microduplications in the group of patients with mental development disorders was 15,7%, microdeletions — 16,7%. Perhaps this confirms the underestimation of microduplications as a cause of the development of pathological conditions and points to the importance of their more detailed study.

Keywords: disabilities of mental development, copy number variation, chromosomal microduplications, array-CGH.

Введение

Нарушения умственного развития являются одной из самых распространенных причин инвалидности в мире. Встречаясь у 1—3% населения [1], они представляют социально-значимую проблему. Эти нарушения могут возникать как вследствие неблагоприятных экзогенных влияний, так и обуславливаться генетическими факторами, которые, к сожалению, нередко остаются недифференцированными. Исследования генетической компоненты становятся более доступными в связи с развитием геномных технологий, внедрение в клиническую практику которых привело к описанию новых синдромов, связанных с микроструктурными хромосомными aberrациями (синдромы микроделений и микродuplicаций). Микроделения и микродuplicации — это вариации числа копий участков ДНК (CNVs), имеющие размер до 5 млн п.н. и не выявляемые при стандартном цитогенетическом исследовании (кариотипировании). Несмотря на то, что показана связь многих хромосомных микроперестроек с известными синдромами, большая их часть является редкой и представлена единичными наблюдениями. В настоящее время CNVs рассматриваются как одна из ведущих причин нарушений умственного развития. У пациентов с данной патологией описано более 230 микроделеционных, но только порядка 80 микродuplicационных синдромов [2]. Обращает на себя внимание тот факт, что патогенных микродuplicаций примерно в три раза меньше, чем микроделений, в связи с чем возникает вопрос о недооценке их значения в формировании патологических состояний.

Целью настоящего исследования явился поиск патогенетически значимых хромосомных микродuplicаций, определение их частоты и спектра у пациентов с нарушениями умственного развития и сравнение с частотой встречаемости клинически значимых микроделений в данной группе больных.

Материалы и методы

Обследовано 216 пациентов в возрасте от 2 до 18 лет (дети, страдающие нарушениями умственного развития и имеющие дизморфии и/или врожденные аномалии) методом матричной сравнительной геномной гибридизации на чипах (array CGH). Исследование одобрено Комитетом по

биомедицинской этике НИИ медицинской генетики ТНИМЦ и проводилось после получения информированного согласия родителей пробандов. Поиск микроструктурных хромосомных aberrаций осуществлялся на микрочипах Human Genome CGH SurePrintG3 HumanCGH 8x60K (Agilent Technologies, США), согласно рекомендациям производителя [3]. Результаты были визуализированы в программе Cytogenomics (v3.0.2.11) (Agilent Technologies, США). Интерпретация клинической значимости CNVs проводилась с использованием Базы данных геномных вариантов (DGV) и онлайн-версии Каталога наследственных болезней «Менделевское наследование у человека» (OMIM). С целью подтверждения наличия обнаруженных патогенетически значимых микродuplicаций у пробандов и определения их происхождения были подобраны праймеры и проведена количественная ПЦР в режиме реального времени на приборе AriaMXReal-TimePCRSytem (Agilent Technologies, США).

Результаты и обсуждение

В результате проведенного молекулярно-цитогенетического исследования у 135 индивидов из 216 (63%) не выявлены CNVs или зарегистрированы варианты, относящиеся к категории полиморфных. У 81 пациента (37%) обнаружены патогенные и потенциально патогенные CNVs. Среди данной группы 9 человек имели несбалансированные транслокации или комбинации разных типов CNVs, 2 пациента — кольцевые хромосомы 13 и 22, образование которых обусловлено микроделениями 13q34 и 22q13 (синдром Фелан-МакДермид, OMIM 606232) соответственно [4, 5]. Сочетания терминальных делеций и дупликаций, указывающих на несбалансированную транслокацию, описаны у 5 пациентов: del5p15.33-p15.1 (15 млн п.н.) и dup5q33.3-q35.3 (24,7 млн п.н.); del9p24.3 (1,4 млн п.н.) и dup16p13.3-p13.11 (16,1 млн п.н.); dup4p16.3-p15.32 (18,4 млн п.н.) и del9p24.3-p22.1 (18,8 млн п.н.); del5p15.33 и dup8q24.22-q24.3 у двух sib-сов. Еще у 4 пациентов показаны различные сочетания: dup4q34.1-q34.3 (5,9 млн п.н.), trip4q34.3-q35.2 (5,9 млн п.н.) и del4q35.1-q35.2 (5,6 млн п.н.); dup17p13.3 (732 т.п.н., OMIM 613215) и dup22q11.1-q12.2 (13,97 млн п.н.); del1q21.1 (115 т.п.н., OMIM 274000) и del22q11.21 (2,5 млн п.н., OMIM 188400, 192430); del9p24.3-p24.2 (3 млн п.н.), dup9p24.3-p13.3

(32,2 млн п.н.) и dup9p21.1-p13.3 (3,6 млн п.н.). Вклад определенной CNV в формирование аномального фенотипа при наличии нескольких вариаций у одного больного сложно оценить, поскольку их влияние может быть сочетанным, либо обусловлено модифицирующим или кумулятивным эффектом.

У 70 детей, имеющих патогенные и потенциально патогенные CNVs, идентифицировано 34 дупликации и 36 делеций, что в общей группе пациентов с умственной отсталостью составило соответственно 15,7% и 16,7%.

В обследованной нами выборке идентифицировано 9 известных микроделеционных и микродупликационных синдромов у 12 пациентов. Среди микроделеций выделено 7 синдромов: микроделеции регионов 1p36 (OMIM 607872), 7q11.23 (синдром Вильямса, OMIM 194050), 15q11-q13 (синдром Прадера-Вилли, OMIM 176270, 2 случая), 15q24 (OMIM 613406, 2 случая), 16p11.2-p12.2 (OMIM 613604, 2 случая), проксимальной микроделеции 22q11.2 (включая синдром Ди Джорджи (OMIM 188400) и велокардиофациальный (OMIM 192430)). Среди микродупликаций только 2: синдромы проксимальной и дистальной микродупликации 1q21.1 (OMIM 612475) и микродупликации 15q11-q13 (OMIM 608636).

Для 18 обнаруженных нами хромосомных микродупликаций была проведена подтверждающая диагностика методом количественной ПЦР в режиме реального времени (таблица). В большинстве случаев (у 13 больных) частичные трисомии оказались уникальными с вовлечением следующих хромосомных сегментов —

1q25.1-q25.2, 2p12-p11.2, 2p25.3-p25.2, 3p26.3, 5p15.2-p14.1, 5q33.1, 6p21.2-p12.2, 6p22.2, 7q34, 10q26.3, 14q11.2, 18p11.31, 20q13.12. И лишь для двух регионов (12p13.31, 12q24.12) зарегистрировано по две аналогичные микродупликации. Один пациент явился носителем впервые выявленной трипликации 4q21.21-q21.22, протяженностью 1,6 млн п.н., перекрывающейся с минимальной критической областью для известного синдрома микроделеции 4q21 (OMIM 613509) [6].

Впервые выявленные сегментные трисомии, ранее не описанные в литературе, установлены для 12 хромосомных регионов из 15. Патогенная или вероятно патогенная значимость микродупликаций определялась размерами перестройки, происхождением, количеством и статусом генов внутри абберации. Показано, что размер менее 500 т.п.н. характерен, как правило, для полиморфных вариантов, а более протяженные изменения копийности ДНК имеют выраженный патогенетический эффект. Большинство патогенных вариаций имеют размер более 1 млн п.н. Протяженные дупликации выявлены нами у двух пробандов dup5p15.2-p14.1 (15,8 млн п.н.) и dup6p21.2-p12.2 (11,47 млн п.н.). Особое значение имеет анализ генного состава CNV: чем большее количество генов содержит CNV, тем более вероятно, что она лежит в основе клинических признаков пациента. При этом необходимо учитывать функции генов, имеющие отношение к нарушению интеллектуального развития. Сложностью при определении патогенетической значимости дупликаций является природа их возникновения: *de novo*

Таблица

Подтвержденные патогенные и потенциально патогенные CNVs

Пациент	Регион	Кординаты (hg18)	Размер, млн п.н.	Происхождение
1	dup1q25.1-q25.2	chr1:172269000-178409000	6,14	Отцовское
2	dup2p12 — p11.2	chr2:75923094-83749392	7,82	<i>De novo</i>
3	dup2p25.3-p25.2	chr2:632724-6052614	5,42	<i>De novo</i>
4	dup3p26.3	chr3:701645-1467721	0,77	Отцовское
5	trip4q21.21-q21.22	chr4:82189943-83801062	1,61	<i>De novo</i>
6	dup5p15.2-p14.1	chr5:12625661-28429732	15,8	<i>De novo</i>
7	dup5q33.1	chr5:148620000-148735000	0,11	Материнское
8	dup6p21.2-p12.2	chr6:40109825-51588796	11,47	Материнское
9	dup6p22.2	chr6:25677000-26393000	0,71	—
10	dup7q34	chr7:137850612-138121572	0,27	<i>De novo</i>
11	dup10q26.3	chr10:131662281-134969700	3,31	<i>De novo</i>
12	dup12p13.31	chr12:7696275-7894740	0,2	Материнское
13	dup12p13.31	chr12:7696275-7894740	0,2	Материнское
14	dup12q24.12	chr12:110668504 -110853677	0,19	Материнское
15	dup12q24.12	chr12:110668504-110793312	0,12	Материнское
16	dup14q11.2	chr14:20767632-22722130	1,9	<i>De novo</i>
17	dup18p11.31	chr18:7005750-7050714	0,05	<i>De novo</i>
18	dup20q13.12	chr20:42595506-43137505	0,54	Отцовское

или унаследованные. Микроудупликации часто наследуются от кого-либо из условно здоровых родителей, поэтому считаются не патогенными и принимаются за случайные находки, а не причины патологий. В таком случае можно предположить, что такие CNVs представляют собой геномные полиморфизмы. В нашем исследовании для сегментных трисомий, обнаруженных у пробандов, был проведен анализ происхождения с использованием количественной ПЦР в режиме реального времени с предварительным подбором праймеров. Семейный материал (родителей, в некоторых случаях бабушек и дедушек) был доступен в 17 случаях. В результате идентифицированные микроудупликации в 8 случаях (47%) имели происхождение *de novo*, а в 9 случаях (53%) были унаследованы от фенотипически здоровых родителей; в 33% случаев выявленные изменения были отцовского происхождения, в 67% — материнского. Следует предполагать, что наследуемые делеции и дупликации могут иметь неполную пенетрантность, переменную экспрессивность или затрагивать импринтированные локусы, ассоциированные с нарушениями умственного развития.

В ситуации показанной нами равнопредставленности полярных изменений копийности генов (в нашей работе соотношение по числу делеций и дупликаций составило практически 1:1) правомерен вопрос о недооценке роли микроудупликаций в развитии патологии, в частности, при умственной отсталости. Подавляющее число работ по исследованию пациентов с психоневрологическими нарушениями, задержкой развития, врожденными аномалиями и дизморфиями демонстрируют преобладание делеций в группе зарегистрированных CNVs с патогенетической значимостью. К примеру, группа исследователей Park с соавторами обнаружила 8,3% патогенных CNVs в выборке из 407 пациентов с вышеобозначенными фенотипическими признаками, среди 34 выявленных дисбалансов 68% составили делеции (23 случая), а 32% — дупликации (11 случаев) [7]. Эти данные сопоставимы с результатами работ других ученых: у 52 из 329 больных выявлено 64% делеций (33 случая) и 36% дупликаций (19 случаев), которые обусловили 16% обнаруженных патогенных CNVs [8]; а также 61% делеций (65 CNVs) и 39% дупликаций (42 CNVs) установлено у 65 пациентов из 214 (30% патогенных CNVs) [9].

Частичное прояснение проблемы более редкого выявления патогенных дупликаций может содержаться в процессе возникновения реципрокных CNVs. Известно, что основным генетическим механизмом, обуславливающим генерацию таких нарушений, является внутри- или межхромосомная неаллельная гомологичная рекомбинация (NAHR). Однако при внутривхроматидной NAHR реципрокные дупликации отсутствуют [10]. Также гено-фенотипические корреляции при дупликациях не столь однозначны, как при делециях. И если очевидно, что делеции приводят к гаплонедостаточности, то дупликации в зависимо-

сти от точек разрыва, могут быть как нейтральными, так и приводить к реализации патологического фенотипа через усиление функции или снижение/потерю функции гена. Кроме того, дупликации принято считать менее патогенными, по сравнению с делециями, возможно, ввиду особенностей их клинического проявления, которое является более мягким и варибельным, в результате чего некоторые признаки могут остаться незамеченными врачом.

Таким образом, выявленная в нашей работе равнопредставленность патогенетически значимых полярных изменений копийности ДНК, в отличие от преобладающих аналогичных исследований, регистрирующих дисбаланс по числу клинически значимых CNV с преобладанием делеций, вероятно, может указывать на недоучет микроудупликаций как причины развития патологических состояний и на важность их более детального изучения. Подробная клинико-генетическая характеристика пациентов с патогенными микроудупликациями может привести в дальнейшем к выделению новых синдромов, ассоциированных с нарушениями умственного развития.

Список литературы

1. Khan MA, Khan S, Windpassinger C et al. The Molecular Genetics of Autosomal Recessive Nonsyndromic Intellectual Disability: a Mutational Continuum and Future Recommendations. *Ann Hum Genet.* 2016; 80(6):342-368.
2. Кашеварова А.А., Лебедев И.Н. Геномная архитектура хромосомных болезней человека // *Генетика.* 2016. 52. № 5. С.511-528.
3. Протокол CGH для микрочипов Agilent Technologies — http://www.chem-agilent.com/pdf/G4410-90020v3_1_CGH_ULS_Protocol.pdf
4. Кашеварова А.А., Лебедев И.Н. Траектории интерпретации фенотипа и кариотипа через призму взаимодействия врача-генетика и лабораторного генетика. Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике / Под ред. чл.-корр. РАЕН А.Б. Масленникова. 2017; 26:47-55.
5. Беляева Е.О., Кашеварова А.А., Никонов А.М. и др. Значимость молекулярного кариотипирования для уточнения диагноза при цитогенетически визуализируемой хромосомной патологии. *Медицинская генетика.* 2016; 7:17-20.
6. Lebedev IN, Nazarenko LP, Skryabin NA et al. A *de novo* microtriplication at 4q21.21-q21.22 in a patient with a vascular malignant hemangioma, elongated sigmoid colon, developmental delay, and absence of speech. *Am J Med Genet A.* 2016; 170(8):2089-2096.
7. Park, Sang-Jin, et al. Clinical implementation of whole-genome array CGH as a first-tier test in 5080 pre and postnatal cases. *Molecular cytogenetics.* 2011; 4(1):12.
8. D'Arrigo S. et al. The diagnostic yield of array comparative genomic hybridization is high regardless of severity of intellectual disability/developmental delay in children. 2016; 31(6):691-699.
9. Cappuccio, Gerarda, et al. New insights in the interpretation of array-CGH: autism spectrum disorder and positive family history for intellectual disability predict the detection of pathogenic variants. *Italian journal of pediatrics.* 2016; 42(1):39.
10. Carvalho C, Lupski JR. Mechanisms underlying structural variant formation in genomic disorders. *Nat. Rev. Genet.* 2016; 17(4):224-238.