

# Интерпретация клинически значимых вариаций числа копий ДНК

Шилова Н.В., Миньженкова М.Е.

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», г. Москва, e-mail: nvsh05@mail.ru

Хромосомный микроматричный анализ (ХМА) все чаще является методом исследования первой линии в идентификации субмикроскопических и микроскопических, размером менее 5 млн п.н., вариаций числа копий ДНК (CNVs) у пациентов с недифференцированной умственной отсталостью, множественными врожденными аномалиями и/или пороками развития, а также при заболеваниях аутистического спектра. ХМА является эффективным методом выявления клинически значимых CNVs в виде делеций или дупликаций (трипликаций), однако не может предоставить информацию о числе и структуре хромосом, вовлеченных в перестройку. Метод стандартного кариотипирования в комбинации, если необходимо, с FISH-анализом дает возможность не только визуализировать метафазные хромосомы, но и установить механизм, приводящий к определенному хромосомному дисбалансу. Сведения о топографии и структуре хромосомного дисбаланса позволяют не только уточнить механизм его возникновения, но также важны и для медико-генетического консультирования семьи и выяснения характера перестройки — наследственной или *de novo* — с целью оценки повторного риска рождения ребенка с хромосомным дисбалансом. В представленном исследовании рассматриваются типы хромосомных перестроек, приводящих к возникновению CNVs, механизмы формирования хромосомного дисбаланса и обсуждается необходимость проведения дополнительных исследований по результатам ХМА у пациентов с задержкой психомоторного развития и множественными врожденными аномалиями.

**Ключевые слова:** клинически значимые CNVs, хромосомный микроматричный анализ, кариотипирование, FISH, двухсегментный хромосомный дисбаланс, односегментный хромосомный дисбаланс, хромосомные аномалии, патологическая мейотическая сегрегация.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

## Interpretation of pathogenic copy number variations

Shilova N.V., Minzhenkova M.E.

Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia, e-mail: nvsh05@mail.ru

Chromosomal microarray (CMA) testing is a first-tier test for patients with developmental delay, autism spectrum disorder, or congenital anomalies. CMA has high diagnostic yield for those patients and can detect chromosomal aberrations of less than 5 Mb. However, copy number variations (CNVs) detected by CMA in the form of deletion and duplication (triplication) cannot always be visualized in the context of metaphase chromosomes and hence, the mechanism causing the chromosomal imbalance cannot be identified. In some cases further techniques are needed for detailed characterization of chromosomal abnormalities to understand the structure of the abnormalities. The only way to do this is by karyotyping of metaphase chromosomes, combined, if necessary with FISH. Identification of the underlying mechanism is required for genetic counseling purposes, for example for presenting an estimate of the recurrence risk to the patient's parents. Follow-up studies after CMA in patients with developmental delay and/or congenital anomalies, suspected chromosome abnormalities leading to the formation of pathogenic CNVs and the mechanisms causing the chromosome imbalance are discussed.

**Key words:** pathogenic CNVs, chromosomal microarray, karyotyping, FISH, double-segment chromosome imbalance, single-segment chromosome imbalance, chromosome abnormalities, meiotic malsegregation.

### Введение

Структурная вариабельность генома проявляется на различных уровнях его организации. Вариации количества копий участков ДНК (copy number variations — CNVs) являются важным источником модификаций генома человека и могут быть ассоциированы с аномалиями фенотипа. Идентификация CNVs, приводящих к хромосомному дисбалансу, является важным этапом обследования пациентов с задержкой психомоторного развития и множественными врожденными аномалиями и/или пороками развития.

Внедрение в клиническую цитогенетику технологий полногеномного анализа, возможность проведения скрининговых исследований привели к открытию новых классов наследственных болезней, причиной возникновения которых являются структурные микроперестройки хромосом, обусловленные клинически значимыми CNVs в виде делеций, дупликаций и трипликаций. Использование метода хромосомного микроматричного анализа (ХМА) позволяет повысить эффективность выявления клинически значимых CNVs до 20—55% у пациентов с идиопатиче-

ской умственной отсталостью и множественными врожденными аномалиями развития, а также заболеваниями аутистического спектра [1–5].

Возможность полногеномного сканирования и достаточно высокая эффективность выявления субмикроскопических (микроскопических) CNVs методом ХМА поднимают вопрос о роли и месте стандартного кариотипирования и FISH в этиологической диагностике пациентов с задержкой психомоторного развития и множественными врожденными аномалиями.

Кариотипирование и ХМА представляют два различных, но комплементарных подхода к идентификации патогенетически значимых CNVs в геноме у пациентов с умственной отсталостью и множественными врожденными аномалиями и/или пороками развития. Так, ХМА, обладая высокой разрешающей способностью, является эффективным методом выявления клинически значимых CNVs, позволяя определить тип хромосомного дисбаланса (дупликации, трипликации или делеции), его размер, генный контент и локализацию в геноме, однако не может предоставить информацию о числе и структуре хромосом, вовлеченных в перестройку, а также не позволяет установить механизм, приводящий к определенному хромосомному дисбалансу. Определить структуру хромосомного дисбаланса позволяет кариотипирование метафазных хромосом в комбинации, если необходимо, с FISH-анализом. Одним из существенных недостатков метода ХМА является невозможность детекции сбалансированных хромосомных аномалий, в частности, робертсоновских, реципрокных транслокаций, инверсий и инсерций [6]. Традиционный цитогенетический анализ, и, при необходимости, молекулярно-цитогенетическое исследование родителей при обнаружении у ребенка субмикроскопических клинически значимых CNVs позволяют выявлять сбалансированные хромосомные перестройки у родителей и других членов семьи. Идентификация механизма формирования и происхождения хромосомного дисбаланса крайне важна для оценки повторного риска рождения ребенка с хромосомной патологией, планирования тактики пренатальной диагностики при последующих беременностях и, если необходимо, преимплантационной генетической диагностики [7].

#### **Тактика цитогенетического и молекулярно-цитогенетического исследования при выявлении клинически значимых CNVs**

В таблице представлены различные варианты наиболее вероятных клинически значимых CNVs, которые могут быть выявлены при ХМА у пациентов с задержкой психомоторного развития и множественными врожденными аномалиями, хромосомные аномалии, приводящие к возникновению таких CNVs, механизмы их формирования, а также тактика обследования родителей пациента и других членов семьи для установления происхождения хромосомного дисбаланса.

Двухсегментный хромосомный дисбаланс, представленный одновременным присутствием CNVs в виде делеции и дупликации негомологичных хромосом или терминальной делецией и дупликацией одного плеча одной хромосомы, как правило, является следствием патологической мейотической сегрегации реципрокных транслокаций или перичентрических инверсий соответственно, что определяет обязательное обследование родителей пациента для выявления носителя сбалансированной хромосомной аномалии [8, 9]. При верификации CNVs и обследовании родителей выбор метода исследования зависит от вида выявленного хромосомного дисбаланса, его размера и локализации в геноме. При достаточно крупных CNVs, размером более 10 млн п.н., это может быть стандартное кариотипирование с использованием GTG-дифференциального окрашивания хромосом на уровне 550 бэндов. Если необходимо, проводят комплексное молекулярно-цитогенетическое исследование (FISH) с коммерческими локус-специфичными, субтеломерными, центромеро-специфичными, пэйттинговыми (цельнохромосомными или частично окрашивающими хромосому) ДНК-зондами, использованием многоцветных технологий FISH. В случаях, когда CNVs не ассоциированы с хорошо известными микроделеционными (микродупликационными) синдромами и коммерческих локуспецифичных ДНК-зондов не существует, для молекулярно-цитогенетической диагностики необходимы специфичные ДНК-зонды на основе клонированных фрагментов ДНК или ДНК-зонды собственного производства (home-made). Следует отметить, что для верификации результатов ХМА могут быть использованы любые таргетные методы исследования, такие, как количественная флуоресцентная ПЦР и MLPA.

Определенный паттерн двухсегментного хромосомного дисбаланса характерен и для таких структурных перестроек как кольцевая хромосома и инвертированная дупликация со смежной делецией (inv dup del). Такие структурные хромосомные аномалии являются спорадическими по происхождению и не требуют дополнительного обследования родителей.

Наибольшую настороженность в плане интерпретации вызывает односегментный хромосомный дисбаланс, когда при ХМА у пациента выявляют клинически значимые CNVs в виде либо делеции, либо дупликации. Зачастую при обнаружении такого хромосомного дисбаланса делается заключение об этиологической значимости выявленного дисбаланса и консультирование семьи проводится исходя из общепринятого мнения, что случаи терминальных и интерстициальных делеций (дупликаций) являются спорадическими, что, в свою очередь, определяет крайне низкий (близкий к общепопуляционному) повторный риск рождения ребенка с аналогичной хромосомной аномалией. Однако следует помнить, что предоставляемая при проведении ХМА информация отражает лишь число копий хромосом или их отдельных районов, но ни в коем случае не дает представления о структуре хромосом, на которых локализованы CNVs.

**Цитогенетическая и молекулярно-цитогенетическая интерпретация клинически значимых CNVs: верификация, механизмы формирования, происхождение**

| CNVs, выявленные при ХМА                                                                                      | Предполагаемая хромосомная аномалия                                                                                                | Верификация и определение структуры CNV         | Механизмы формирования хромосомного дисбаланса                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Установление происхождения CNV (обследование родителей)                                                        |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Двухсегментный хромосомный дисбаланс</b>                                                                   |                                                                                                                                    |                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                |
| Терминальная делеция и терминальная дупликация негомологичных хромосом                                        | Несбалансированная транслокация                                                                                                    | Кариотипирование; FISH с tel                    | Патологическая 2:2 мейотическая сегрегация родительской аутомсомной реципрокной транслокации по совместному-1 типу                                                                                                                                                                                                                                                   | Кариотипирование; FISH с tel                                                                                   |
| Терминальная делеция короткого плеча (p) и терминальная делеция длинного плеча (q) одной хромосомы            | Кольцевая хромосома                                                                                                                | Кариотипирование; FISH с tel, PCP p/q           | Спорадические случаи*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Нет необходимости                                                                                              |
| Терминальная делеция и терминальная дупликация одного плеча одной хромосомы (p/p, q/q)                        | Рекомбинантная хромосома                                                                                                           | Кариотипирование; FISH с tel, PCP p/q, MCB      | Патологическая мейотическая сегрегация родительской перичентрической инверсии                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Кариотипирование; FISH с PCP p/q, MCB                                                                          |
| Терминальная делеция с интерстициальной дупликацией соседнего района в одном плече одной хромосомы (p/p, q/q) | Инвертированная дупликация с делецией (inv dup del)                                                                                | FISH с tel, MCB                                 | Спорадические случаи*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Нет необходимости                                                                                              |
| Интерстициальная делеция и интерстициальная дупликация негомологичных акроцентрических хромосом               | Несбалансированная транслокация                                                                                                    | Кариотипирование; FISH с WCP                    | Патологическая 2:2 мейотическая сегрегация родительской аутомсомной реципрокной транслокации по совместному-2 типу                                                                                                                                                                                                                                                   | Кариотипирование; FISH с WCP                                                                                   |
| Дупликация интерстициального района и дупликация терминального района негомологичных хромосом                 | Несбалансированная транслокация со сверхчисленной деривативной хромосомой                                                          | Кариотипирование; FISH с tel, WCP               | Патологическая 3:1 мейотическая сегрегация родительской аутомсомной реципрокной транслокации с третичной трисомией                                                                                                                                                                                                                                                   | Кариотипирование; FISH с tel, WCP                                                                              |
| Делеция интерстициального района и делеция терминального района негомологичных хромосом                       | Несбалансированная транслокация с моносомией по нормальному гомологу                                                               | Кариотипирование; FISH с tel, WCP               | Патологическая 3:1 мейотическая сегрегация родительской аутомсомной реципрокной транслокации с третичной моносомией                                                                                                                                                                                                                                                  | Кариотипирование; FISH с tel, WCP                                                                              |
| <b>Односегментный хромосомный дисбаланс</b>                                                                   |                                                                                                                                    |                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                |
| Терминальная делеция/терминальная дупликация                                                                  | Делеция/дупликация; несбалансированная транслокация                                                                                | Кариотипирование; FISH с tel                    | — Спорадические случаи*;<br>— Патологическая 2:2 мейотическая сегрегация родительской аутомсомной реципрокной транслокации по совместному-1 типу с вовлечением теломерных (гетерохроматиновых) районов хромосом                                                                                                                                                      | Кариотипирование; FISH с tel для установления (исключения) носительства сбалансированной ХА                    |
| Интерстициальная делеция / интерстициальная дупликация                                                        | Делеция/дупликация; сверхчисленная маркерная хромосома с неоцентромерой; рекомбинантная хромосома; несбалансированная транслокация | Кариотипирование; FISH с LSI, PCP p/q, CEN, MCB | — Спорадические случаи*<br>— Патологическая мейотическая сегрегация родительской межхромосомной и внутрихромосомной инсерции, парацентрической инверсии<br>— Патологическая 2:2 мейотическая сегрегация родительской аутомсомной реципрокной транслокации по совместному-2 типу с вовлечением прицентромерных (гетерохроматиновых) районов акроцентрических хромосом | Кариотипирование; FISH с PCP p/q, WCP, CEN, MCB для установления (исключения) носительства сбалансированной ХА |

Таблица (окончание)

| CNVs, выявленные при ХМА                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Предполагаемая хромосомная аномалия                                                    | Верификация и определение структуры CNV    | Механизмы формирования хромосомного дисбаланса | Установление происхождения CNV (обследование родителей) |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Трипликация                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Трипликация; сверхчисленная маркерная хромосома (inv dup с эухроматином, изохромосома) | Кариотипирование; FISH с LSI, PCP p/q, MCB | Спорадические случаи*                          | Нет необходимости                                       |
| Примечание. tel — ДНК-зонды на субтеломерные районы хромосом; PCP p/q (Partial Chromosome Paints) — ДНК-зонды на разные плечи одной хромосомы; MCB (Multicolor Banding) — многоцветный бэндинг хромосом; WCP (Whole Chromosome Paints) — целнохромосомные ДНК-зонды; CEN — центромероспецифичные ДНК-зонды; LSI (Locus Specific Identifier) — локусспецифичные ДНК-зонды; ХА — хромосомная аномалия;<br>* — различные механизмы формирования <i>de novo</i> хромосомных перестроек, в т.ч. неаллельная гомологичная рекомбинация, негомологичное соединение концов хромосом, опосредованные микрогомологией ошибки репликации и т.д. [10, 11] |                                                                                        |                                            |                                                |                                                         |

Помимо спорадических, возникающих *de novo*, случаев делеций и дупликаций, такие *вариации числа копий ДНК могут быть следствием* патологической мейотической сегрегации родительской межхромосомной и внутрихромосомной инсерции, а также парацентрической инверсии [8, 12].

Возможности ХМА ограничены разрешающей способностью микроматрицы, в том числе отсутствием на ней локусов гетерохроматиновых районов хромосом, в которых, в свою очередь, отсутствуют структурные гены (так называемая «серая зона» генома). Поэтому некоторые перестройки, затрагивающие эти районы, не могут быть выявлены при ХМА. И хотя хромосомный дисбаланс по гетерохроматиновым районам хромосом не ассоциирован с аномалиями фенотипа, необходимо оценивать его участие в структуре дисбаланса, поскольку CNVs в виде делеции или дупликации могут быть также следствием патологической мейотической сегрегации родительской аутомсомной реципрокной транслокации с вовлечением гетерохроматиновых прицентромерных и теломерных районов хромосом. Поэтому в каждом случае выявления у ребенка с аномальным фенотипом CNVs в виде односегментного хромосомного дисбаланса необходимо обследовать родителей для выявления носительства сбалансированных хромосомных перестроек. Известно, что при некоторых структурных хромосомных перестройках, например, инсерциях, отмечается крайне высокий риск (до 50%) рождения ребенка с хромосомным дисбалансом в отличие от спорадических случаев терминальной делеции (дупликации) [8].

Следует отметить, что в таблице представлены наиболее общие механизмы формирования односегментного и двухсегментного хромосомного дисбаланса, обусловленные особенностями гаметического возникновения и мейотической сегрегации различных хромосомных аномалий, и не рассматриваются более редкие ситуации комплексных хромосомных перестроек, когда имеет место делеция и/или дупликация по меньшей мере трех сегментов трех негомологичных хромосом, а также CNVs в виде делеции и дупликации целых хромосом.

### Заключение

Комплексный подход в диагностике CNVs, ассоциированных с умственной отсталостью и аномальным фенотипом у пациента, позволяет не только точно определять количество геномных копий отдельных участков ДНК, но и детализировать структуру и происхождение геномного дисбаланса в клинически гетерогенной группе пациентов. Поскольку хромосомы и гены представляют различные уровни генетической информации, анализ кариотипа не может быть заменен ни секвенированием ДНК, ни молекулярным кариотипированием и всесторонняя оценка кариотипа может быть достигнута только при комбинации этих методов [13, 14]. Идеальной с точки зрения комплексной оценки кариотипа является такая схема организации рабочего процесса, когда в лаборатории, выполняющей ХМА, проводят также и сопутствующие цитогенетическое и/или молекулярно-цитогенетическое (генетическое) исследования. И такие исследования нужно осуществлять не столько с целью валидации полученных при ХМА результатов, сколько с целью получения информации о структуре, механизме формирования и происхождении выявленного хромосомного дисбаланса. Для этого необходимо знать особенности мейотической сегрегации хромосом при различных структурных хромосомных перестройках и хорошо понимать механизм формирования хромосомных аномалий, что традиционно является профессиональной обязанностью клинического цитогенетика. Поэтому только тесное взаимодействие специалистов в области цитогенетики, молекулярной цитогенетики и молекулярной генетики при проведении ХМА и интерпретации полученных результатов позволит установить этиологический диагноз и завершить тем самым диагностическую одиссею пациентов с задержкой психомоторного развития и множественными врожденными аномалиями, а также выработать тактику и стратегию медико-генетического консультирования семьи.

# Список литературы

1. Miller D, Adam M, Aradhya S. et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am. J. Hum. Genet.* 2010;86:749-764.
2. Ahn J, Bint S, Bergbaum A. et al. Array CGH as a first line diagnostic test in place of karyotyping for postnatal referrals results from four years' clinical application for over 8,700 patients. *Molecular Cytogenetics.* 2013;6:16.
3. Lay-Son G, Espinoza K, Vial C. et al. Chromosomal microarrays testing in children with developmental disabilities and congenital anomalies. *J. Pediatr (Rio J).* 2015;91:189-195.
4. Ho KS, Wassman ER, Baxter AL. et al. Chromosomal microarray analysis of consecutive individuals with autism spectrum disorders using an ultra-high resolution chromosomal microarray optimized for neurodevelopmental disorders. . 2016;17(12): 2070.
5. Fan Y, Wu Y, Wang L. et al. Chromosomal microarray analysis in developmental delay and intellectual disability with comorbid conditions. *BMC Medical Genomics.* 2018;11:49.
6. Kang, S-H, Shaw C, Ou G. et al. Insertional translocation detected using FISH confirmation of array-comparative genomic hybridization (aCGH) results .*Am. J. Med. Genet.* 2010;152A:1111 — 1126.
7. Bui T, Vetro A, Zuffardi O. et al. Current controversies in prenatal diagnosis 3: is conventional chromosomal analysis necessary in the post-array CGH era? *Prenat. Diagn.* 2011;31:235-243.
8. Chromosome abnormalities and genetic counseling. Oxford monographs of medical genetics no. 6, Gardner RJ, Sutherland GR, Shaffer LG (eds); Int. Oxford press 2012.
9. Золотухина ТВ., Канивец ИВ., Коростелев СА. и др. Опыт использования комплекса современных методов исследования в конституциональной цитогенетике. *Медицинская генетика.* 2014;(12):22-28.
10. Hermetz KE, Newman S, Connely KN. et al. Large inverted duplications in the human genome form via a fold-back mechanism. *PLOS Genetics.* 2014;10(1):e1004139.
11. Weckselblatt B, Rudd MK. Human structural variation: mechanisms of chromosomal rearrangements. *Trends in Genetics.* 2015;31(10):587-599.
12. Миньженкова МЕ, Маркова ЖГ, Дадали ЕЛ, Шилова НВ. Интерхромосомная и интрахромосомная инсерции с участием хромосомы 2. *Медицинская генетика.* 2018;17(2):12-17.
13. Shaffer LG, Rosenfeld JA. Microarray-based prenatal diagnosis for the identification of fetal chromosome abnormalities. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2013;13(6):601-611.
14. Liehr T. «Classical genetics» is not equal to «banding cytogenetics». *Molecular Cytogenetics.* 2017;10:3.