

# Методы верификации субмикроскопических клинически значимых вариаций числа копий участков ДНК

Твеленёва А.А., Шилова Н.В.

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»  
Россия, 115522, Москва, ул. Москворечье д., 1

Геномная вариабельность является основой эволюции генома человека и включает в себя вариации последовательности ДНК и структурную вариабельность. К структурной вариабельности относят вариации числа копий участка ДНК (copy number variation – CNV), размером от 1000 п.н. до нескольких десятков млн п.н. Среди них выделяют субмикроскопические CNV размером от 1000 п.н. до 3 млн п.н., часть из которых является клинически значимой, то есть ассоциирована с задержкой психомоторного развития, врожденными пороками и/или аномалиями развития, а также заболеваниями аутистического спектра. Для анализа CNV используют широкий спектр методов с различной разрешающей способностью. В качестве универсального метода детекции субмикроскопических CNV в клинической практике используется хромосомный микроматричный анализ. Однако все чаще для анализа CNV используются методы высокопроизводительного секвенирования. Наряду с развитием полногеномных технологий, разрабатывается большое количество биоинформатических алгоритмов анализа CNV, имеющих разную эффективность. В связи с этим возрастает потребность в подтверждении полученных данных с целью исключения ложноположительных результатов. Кроме того, информации только о наличии или отсутствии CNV недостаточно для медико-генетического консультирования. Для оценки повторного риска хромосомной патологии необходимо определить структуру и происхождение обнаруженной CNV. С этой целью используются молекулярно-генетические и молекулярно-цитогенетические методы. Ряд молекулярно-генетических методов, основанных на использовании ПЦР, имеют разрешающую способность, достаточную для подтверждения субмикроскопических CNV. Молекулярно-цитогенетические методы включают в себя различные модификации метода флуоресцентной *in situ* гибридизации. Анализ субмикроскопических CNV с использованием FISH-метода ограничен длиной и спецификой фрагментов ДНК в зондах, используемых в традиционных протоколах исследования. Поэтому актуальным становится использование методов на основе *in situ* гибридизации с ДНК-зондами длиной порядка нескольких т.п.н., что позволяет не только подтвердить CNV и установить ее происхождение, но и определить структуру хромосомной перестройки, лежащей в основе хромосомного/геномного дисбаланса. В статье обсуждаются возможности, преимущества и недостатки различных методов, используемых для верификации клинически значимых CNV.

**Ключевые слова:** структурная вариабельность, CNV, FISH, PRINS, TSA.

**Для цитирования:** Твеленёва А.А., Шилова Н.В. Методы верификации субмикроскопических клинически значимых вариаций числа копий участков ДНК. *Медицинская генетика* 2019; 18(3): 26-38.

**DOI:** 10.25557/2073-7998.2019.03. 26-38

**Автор для корреспонденции:** Твеленёва Александра Александровна; **e-mail:** al\_bardashevskaya@mail.ru

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России.

**Конфликт интересов.** Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила.** 15.02.2019

## Methods for verification of submicroscopic pathogenic copy number variations

Tveleneva A.A., Shilova N.V.

Research Centre for Medical Genetics,  
Moscovrechye str., 1, Moscow, 115478, Russia

Genomic variability is the basis of genetic diversity and evolution and includes sequence and structural variability. Structural variability refers to variations in the number of copies of DNA (copy number variations - CNVs), ranging from 1000 bp up to several megabases (Mb) in size. Among them, some submicroscopic CNVs up to 3 Mb, can lead to clinical signs such as developmental delay, intellectual disability, congenital malformations and/or dysmorphic features, as well as autism spectrum disorders. A wide range of methods with different resolution is used for CNVs analysis. To date, chromosomal microarray analysis (CMA) is a universal method for CNVs detection. However, with the advent methods of next-generation sequencing, their applicability for CNV analysis is increasingly being estimated. Therefore, with the development of genome-wide technologies and bioinformatic tools for CNV analysis, there is an increasing need to confirm the obtained data in order to establish the true values of their sensitivity and specificity.

---

Статья подготовлена по материалам доклада на научно-практической конференции «Новые аспекты пренатальной и преимплантационной генетической диагностики» (22 октября 2018 г., г. Томск).

In addition, information only about localization and gene content of CNVs is not enough for genetic counseling for the family. It is necessary to define structure and origin of the detected CNV to assess accurate recurrence risk of chromosome imbalance. For this purpose, molecular genetics and molecular cytogenetic methods are used. There are some methods of molecular genetics based on PCR with sufficient resolution to confirm submicroscopic CNV longer than 1000 bp. Analysis of submicroscopic CNVs by various modifications of FISH-method is limited by the length and specificity of DNA fragments in probes used in conventional FISH-protocols. Therefore, application of DNA probes of the order of several kb in length becomes relevant. If both group of methods allow to confirm CNVs detected by wide-genome technologies, than the latter are used to estimate the structure of chromosomal imbalance. Possibilities, advantages and disadvantages of different methods for CNVs verification are discussed.

**Keywords:** structural variability, CNV, FISH, PRINS, TSA

**For citation:** Tveleneva A.A., Shilova N.V. Methods for verification of submicroscopic pathogenic copy number variations. *Medicinskaya genetika* [Medical genetics] 2019; 18(3): 26-38 (In Rus)

**DOI:** 10.25557/2073-7998.2019.03.26-38

**Corresponding author:** Tveleneva Alexandra; **e-mail:** al\_bardashevskaya@mail.ru

**Funding.** The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation

**Conflict of interest.** Authors declare no conflict of interest.

**Accepted:** 15.02.2019.

## Введение

Геномная вариабельность обуславливает адаптацию и непрерывную эволюцию генома человека и включает в себя как вариации последовательности ДНК (однонуклеотидные полиморфизмы, инсерции/делеции, точковые мутации), так и структурную вариабельность, которая проявляется в виде изменения числа копий отдельных районов хромосом и нуклеотидных повторов размером от 2 до 1000 п.н. [1]. Выделяют отдельный класс вариаций числа копий ДНК (copy number variations — CNV) размером 1000 п.н. и более, к которому относятся делеции, дубликации, трипликации [2,3]. В зависимости от размеров принято выделять субмикроскопические (размером от 1 т.п.н. до 3 млн п.н.) и микроскопические (от 3 до нескольких десятков млн п.н) CNV [4].

Спектр фенотипических эффектов CNV значительно варьирует от адаптивного ответа до ранней внутриутробной гибели плода [5]. Структурная вариабельность некоторых районов генома не сопровождается патологическими изменениями фенотипа, в то время как геномный дисбаланс, обусловленный наличием CNV, в других регионах является клинически значимым [6]. Так, у 5–15% пациентов с умственной отсталостью [7, 8] и у 2–30% новорожденных с врожденными пороками сердца выявляются субмикроскопические CNV [9,10]. Клинически значимые CNV детектированы у 8–21% пациентов с заболеваниями аутистического спектра [11,12]. По результатам инвазивной пренатальной диагностики в группе беременных старше 35 лет, а также в группе беременных с эхографическими маркерами хромосомных аномалий у плода патогенные CNV выявлены в 5–6% и 0,5% случаев соответственно [13].

Для анализа CNV используется широкий спектр методов с различной разрешающей способностью. Одним из методов, позволяющих детектировать микроскопические CNV размером от 5 до нескольких десятков млн п.н., то есть и сегментные анеусомии, является стандартное цитогенетическое исследование. Однако разрешающая способность этого метода не позволяет выявлять хромосомный дисбаланс размером менее 5 млн п.н. Поэтому «золотым стандартом» для обнаружения CNV является хромосомный микроматричный анализ (ХМА). Внедрение ХМА в клинические цитогенетические лаборатории позволило в 3–5 раз повысить выявляемость клинически значимых CNV у пациентов с задержкой психомоторного развития, множественными врожденными пороками и/или аномалиями развития [14]. Поэтому ХМА в настоящее время считается исследованием первого уровня для детекции CNV у таких пациентов. Особенностью ХМА является возможность выявления как неполоморфных однокопийных последовательностей генома размером 25–60 п.н., так и однонуклеотидных полиморфных маркеров — SNP. Одновременный анализ обоих маркеров позволяет оценивать не только CNV, представленные увеличением или уменьшением копийности последовательностей ДНК, но также определять участки потери гетерозиготности, однородительские дисомии и т.д. Разрешающая способность ХМА зависит от используемой платформы и определяется средним расстоянием между зондами, которое зависит от их количества на чипе, т.е. от его плотности. Чем меньше расстояние между соседними локусами генома, тем больше маркеров используется для анализа и выше

плотность чипа. Основным ограничением метода является невозможность детектировать сбалансированные хромосомные перестройки. Но в некоторых случаях при наличии у пациента одновременно односегментного и двухсегментного хромосомного дисбаланса можно предположить наличие сбалансированной хромосомной перестройки у одного из родителей. Еще одним ограничением ХМА является невозможность детекции мозаицизма с долей аномального клона клеток менее 20%. Стоит отметить, что стандартное цитогенетическое исследование позволяет более точно оценить долю мозаичного клона клеток с микроскопическими CNV.

В эру полногеномных технологий особое место занимает исследование CNV методами высокопроизводительного секвенирования. Полногеномное секвенирование (WGS, whole-genome sequencing) дает информацию обо всех изменениях генома, включая однонуклеотидные варианты последовательности ДНК (SNV, single-nucleotide variant), CNV и другие структурные изменения, такие как инверсии и транслокации. На сегодня известно более 50 алгоритмов анализа структурных вариантов, в том числе CNV, на основании данных WGS. Алгоритмы, основанные на анализе глубины прочтения, в основном используются для поиска структурных вариантов размером более 1 т.п.н. Однако глубина прочтения, стандартно используемая при WGS, обуславливает необходимость подтверждения обнаруженных CNV небольшого размера альтернативными методами. Так Trost В. с соавт. указывают на такую необходимость для CNV менее 5 т.п.н., поскольку с уменьшением размера структурных вариантов снижается чувствительность метода их выявления [15]. Использование библиотек ДНК с длинными вставками и сочетание алгоритмов, основанных на парно-концевом чтении и глубине покрытия, позволяют повысить чувствительность. Было показано, что такой подход при покрытии 1x, 3x, 5x позволяет обнаруживать CNV размером 5–10 т.п.н. с чувствительностью 80% при использовании библиотек размером 5 т.п.н. [16]. Следует отметить, что WGS сегодня не часто используется в клинической практике. Широко используется метод полноэкзомного секвенирования (WES, whole-exome sequencing) для исследования SNV, инсерций/делеций. При этом подходы для анализа CNV постоянно совершенствуются. В основном это касается повышения чувствительности и специфичности обнаружения CNV, оптимизации однородности покрытия и повышения глубины прочтений. В последнее время разрабатываются все больше биоинформатических программ, позволяющих снизить долю ложноположительных результатов при анализе CNV [17,18].

Каждый из методов анализа CNV имеет свои преимущества и ограничения. Однако их общей проблемой является интерпретация клинической значимости выявленных изменений. При анализе полученных данных стоит учитывать только клинически значимые, то есть ассоциированные с аномальным фенотипом, CNV [19]. Согласно базам данных полиморфных и патогенных CNV (DGV и DECIPHER), в геноме человека идентифицировано около 7 млн CNV, из которых только около 0,5% являются патогенными. Большая часть обнаруживаемых CNV классифицируется как варианты с неизвестным клиническим значением. Для установления их возможной патогенности необходимы дополнительные исследования, включающие подтверждение наличия CNV у пациента, определение их происхождения (*de novo* или унаследованные) и структуры. Особенно это актуально в случаях, когда размер выявленного геномного дисбаланса ограничен несколькими тысячами пар нуклеотидов.

Для верификации CNV, выявленных при полногеномном исследовании, используются молекулярно-генетические методы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), а также таргетные молекулярно-цитогенетические методы [20]. Стоит отметить, что молекулярно-цитогенетические методы, используемые для установления происхождения выявленного CNV, позволяют определить тип сбалансированной структурной перестройки (инсерция, инверсия, сбалансированная транслокация), в то время как молекулярно-генетические методы дают информацию исключительно о копийности исследуемого региона. Исследовать структуру CNV, то есть определить вид структурной перестройки (например, прямая или инвертированная дупликация), а также локализацию в геноме (например, дупликация на одной хромосоме или дублированный сегмент располагается на негомологичной хромосоме) удается лишь молекулярно-цитогенетическими методами.

### 1. Молекулярно-генетические методы верификации субмикроскопических CNV

Существует много методов на основе ПЦР для верификации CNV. Наиболее известные из них и используемые в рутинной практике – методы количественной ПЦР (qPCR) и мультиплексной проба-зависимой лигазной реакции (MLPA, multiplex ligation-dependent probe amplification). Основной принцип qPCR состоит в том, что количество амплифицированного продукта напрямую зависит от количества копий исходной мишени. Таким образом, увеличение или уменьшение количества исходных копий геномной ДНК-мишени приведет к более раннему или более

позднему увеличению сигнала флуоресценции соответственно и, следовательно, к уменьшению или увеличению  $C_t$  — величины, при которой количество целевого ампликона достигает фиксированного порога. Одно из ограничений данного метода состоит в том, что количество локусов, которые могут быть проанализированы одновременно, ограничено четырьмя флуоресцентными профилями и оптическими свойствами аппаратного обеспечения [21].

Метод MLPA основан на использовании двух олигонуклеотидов, которые лигируются в случае их полной комплементарности области CNV. Такая конструкция ДНК-зондов позволяет исследовать до 50 последовательностей ДНК в одной пробирке с использованием одной пары праймеров. Олигонуклеотиды состоят из последовательности размером 20–30 п.н., комплементарной участку CNV, и последовательности, комплементарной универсальным праймерам, между которыми для разделения продуктов амплификации путём капиллярного электрофореза вставляют произвольную последовательность из нескольких нуклеотидов. Недостатком данного метода является то, что присутствие любого SNP в области отжига олигонуклеотидов может снижать эффективность гибридизации и препятствовать лигированию, что приводит к ложноположительному результату (обнаружение делеции). Поэтому гетерозиготные делеции, выявленные методом MLPA, требуют обязательной верификации [22].

Ниже рассмотрены альтернативные методы, позволяющие верифицировать субмикроскопические CNV.

### 1.1. Тест отношения паралогов

Тест отношения паралогов (PRT, Paralogue Ratio Test) основан на подборе одной пары праймеров к паралогам. Другими словами, одна и та же пара праймеров необходима для амплификации последовательности в локусе CNV и эталонной последовательности, которая имеет гомологию с CNV, *a priori* две копии на диплоидный набор хромосом и не входит в область CNV [23] (рис. 1А). В 2013 году группой авторов было разработано программное обеспечение PRTPrimer, которое позволяет автоматически осуществлять дизайн PRT [24]. На первом этапе область CNV разбивается на перекрывающиеся сегменты. Для каждого сегмента осуществляется подбор множества пар праймеров вне зависимости от типа последовательности (однокопийные последовательности, области сегментных дупликаций, SINE и т.д.). Затем каждый ампликон выравнивается на геном человека с целью выбора того, который совпадает с последовательностями в геноме дважды (локус CNV и эталонная последовательность).

На заключительном этапе отбирается только та пара праймеров, которая позволяет получить ампликоны, отличающиеся друг от друга по длине и не имеющие SNP в участках, комплементарных праймерам. PRT был успешно применен в ряде исследований CNV человека [25–31]. Основным недостатком этого метода является его зависимость от наличия гомологичных последовательностей в области CNV и других участках генома, что препятствует использованию PRT в качестве общего метода для крупномасштабного высокопроизводительного CNV-анализа.

### 1.2. Молекулярный подсчет количества копий

Еще один метод на основе ПЦР, позволяющий анализировать субмикроскопические CNV — метод молекулярного подсчета количества копий (MCC, Molecular Copy Number Counting). При его использовании создается система, включающая в себя праймеры и флуоресцентные зонды на область CNV и так называемую эталонную область, которая не гомологична CNV и представлена двумя копиями в диплоидном наборе. Принцип данного метода основан на создании массива аликвот со средней концентрацией 1 молекула ДНК/образец, полученных путем предельного разведения исходного образца. Таким образом, каждая из аликвот равновероятно может содержать молекулу ДНК с CNV и/или эталонную последовательность и является своеобразным микрореактором для одномолекулярной ПЦР [32] (рис. 1Б). Так как процесс приготовления большого количества проб путем разведения является весьма трудоемким, разработаны альтернативные способы создания большого числа микрореакторов для одномолекулярной ПЦР, в частности, эмульсионная ПЦР и микрофлюидные технологии [33]. С этой целью используются специальные катриджи, на которые наносят систему, включающую все компоненты смеси для ПЦР, ДНК и минеральное масло, после чего они помещаются в генератор микродисперсных капель, где образцы и масло пропускаются через микроканалы, и формируется эмульсия, состоящая из множества капель. По завершении амплификации с использованием автоматизированного устройства, содержащего тонкие капилляры, эмульсия разделяется на капли, с каждой из которых считывается уровень интенсивности флуоресценции, и тем самым определяется количество капель с CNV и/или эталонной последовательностью и рассчитывается относительное количество копий ДНК. Основным преимуществом данного метода является способность определять CNV в малом объеме сильно фрагментированной ДНК. Для этого необходимо подбирать ампликоны таким образом, чтобы их размер был порядка 100–120 п.н. [34].

Метод МСС был впервые успешно применен для изучения изменений количества копий ДНК, связанных с нерцепрокными транслокациями в клеточных линиях карциномы почки [35]. Daser A. с соавт., используя МСС-метод, определили точку разрыва на дериватной хромосоме 3 — *der(3)t(3;5)*, ассоциированной с почечно-клеточной карциномой, с точностью до 300 п.н. Используя дополнительные методы (метод гибридизации рестрикционных фрагментов на фильтрах и ПЦР-анализ в совокупности с МСС-методом) они показали, что данная хромосомная перестройка сопровождается небольшой делецией (700 п.н.) короткого плеча хромосомы 3 и инсерцией размером около 5 т.п.н., геномное происхождение которой не было определено.

**1.3. Количественная мультиплексная ПЦР коротких флуоресцентных фрагментов и мультиплексная количественная амплификация**

Количественная мультиплексная ПЦР коротких флуоресцентных фрагментов (QMPSF, Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent Fragments) является полуколичественным методом, в котором подбираются праймеры как на область локализации CNV, так и на фланкирующие её последовательности ДНК. При этом один из праймеров мечен на 5'-конце флуорофором. Разделение флуоресцентных продуктов реакции осуществляется методом капиллярного электрофореза (рис.1В). Сравнение результатов осуществляется с эталонным образцом ДНК, полученным от человека без исследуемого CNV. QMPSF — мультиплексный метод, позволяющий одновременно анализировать до 12

последовательностей ДНК. Charbonnier F. с соавт. использовали данный метод для определения протяженных делеций и дупликаций в генах репарации *MLH1* и *MSH2* в семьях с наследственным неполипозным колоректальным раком [36]. Для увеличения количества анализируемых фрагментов в одной реакции был разработан метод мультиплексной количественной амплификации (MAQ, Multiplex Amplicon Quantification), позволяющий исследовать до 50 таргетных областей. Данный метод основан на получении флуоресцентно меченных ампликонов с области CNV и эталонных областей, как и в методе МСС, в одной мультиплексной реакции, за которой следует разделение продуктов капиллярным электрофорезом. Вычисление коэффициента дозы (DQ) осуществляется путем сравнения нормализованных областей пика интенсивности флуоресценции между тестируемым и контрольным образцами. Для облегчения анализа данных разработано специальное программное обеспечение, которое позволяет рассчитывать и визуализировать DQ [4].

**1.4. Метод мультиплексной амплификации зондов для гибридизации**

Метод мультиплексной амплификации зондов для гибридизации (MAPH, Multiplex Amplifiable Probe Hybridization) основан на гибридизации ДНК-зондов, комплементарных таргетным последовательностям, на геномную ДНК, иммобилизованную на нейлоновом фильтре, с последующей отмывкой, амплификацией гибридизованных зондов и количественным анализом полученных продуктов ПЦР (рис.1Г) [37]. MAPH может использоваться как для анализа делеций или дупликаций в известных локусах генома

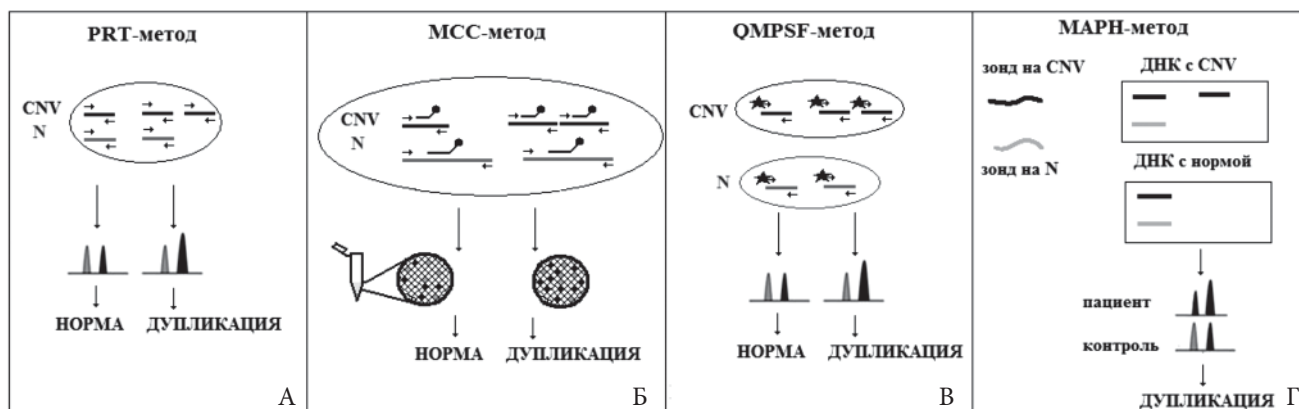


Рис.1. Молекулярно-генетические методы верификации субмикроскопических CNV (CNV — участок с вариациями числа копий ДНК, N — эталонная последовательность).

(*DMD*, *PMP22* и *SNRPN*), так и для обнаружения CNV, возникших *de novo* в любом месте генома (например, в субтеломерных или прицентромерных областях) [38, 39]. В этом случае 1 мкг геномной ДНК пациента фиксируется на нейлоновой мембране и гибридизуется с набором амплифицируемых ДНК-зондов (таргетные последовательности, в которых должны быть обнаружены CNV) и эталонными последовательностями ДНК, представленными двумя копиями на диплоидный набор хромосом. Для разработки таких ДНК-зондов используются два подхода. Первый подход состоит в том, чтобы *in silico* идентифицировать последовательность ДНК размером 100–600 п.н. в интересующей области, амплифицировать ее с уникальными праймерами из контрольной ДНК и клонировать амплифицированный продукт в вектор. Все зонды, клонированные в одном и том же плазмидном векторе, фланкированы общими универсальными последовательностями и могут быть амплифицированы одновременно в одной реакции. Второй подход к созданию зонда заключается в субклонировании фрагментов, полученных путем рестрикционной обработки ВАС-клона с последовательностью ДНК-зонда, и амплификации субклонированных фрагментов непосредственно из бактериальных клеток с использованием универсальных праймеров [4]. После гибридизации нейлоновую мембрану тщательно промывают для удаления несвязанных ДНК-зондов. После чего связанные ДНК-зонды элюируют с мембраны и амплифицируют с использованием универсальной пары праймеров с последующим разделением капиллярным электрофорезом. Количество ДНК-зонда, полученного путем повторной отмывки, пропорционально количеству копий таргетной последовательности в геномной ДНК пациента. Эффективное разрешение МАРН определяется размером ДНК-зондов [40]. Выбор зонда является ключевым шагом к успешному применению МАРН и основан на ряде важных критериев: последовательности ДНК должны быть уникальными, неповторяющимися, непалиндромными, размером 100–600 п.н., с содержанием GC-нуклеотидов около 50% [39]. Еще одной особенностью конструкции ДНК-зонда является то, что фрагменты ДНК, которые амплифицируются в одной мультиплексной реакции, должны существенно различаться по длине с целью их эффективного разделения электрофорезом. Модификация метода МАРН связана с внедрением технологии микрочипов, что позволило увеличить количество одновременно определяемых локусов. Patsalis P.C. с соавт. показали возможность одновременного анализа около 700 ДНК-зондов при использовании array-МАРН [41].

## 2. Молекулярно-цитогенетические методы верификации субмикроскопических CNV

### 2.1. FISH на однокопийные последовательности генома

Основная идея исследования субмикроскопических CNVs заключается в разработке ДНК-зондов размером в несколько т.п.н., комплементарных таргетной последовательности. Одним из таких методов является технология флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) на однокопийные последовательности генома (sc-FISH, single copy-FISH). Rogan P.K. с соавт. в 2001 г. разработали подход, позволяющий увеличить специфичность FISH-метода за счет использования ДНК-зондов длиной 2–10 т.п.н., комплементарных однокопийным последовательностям генома [42]. На первом этапе они проанализировали последовательность выбранного для анализа участка ДНК длиной примерно 100 т.п.н. в базе данных повторяющихся последовательностей (<http://www.girinst.org>) с целью установления границ интервалов с одной копией. Затем эти уникальные последовательности выровняли на референсный геном для выявления псевдогенов и других сложных низкокопийных повторов. После сортировки однокопийных интервалов в соответствии с их длинами (более 2 т.п.н.) к ним были подобраны праймеры и проведена LONG-PCR (ПЦР для амплификации длинных фрагментов ДНК). Продукты амплификации выделяли и метили путём nick-трансляции. FISH проводили с использованием ДНК-зондов с непрямым мечением для возможности амплификации гибридационного сигнала. При таком подходе удалось разработать ДНК-зонды на гены *MAGEL2*, *HIRA* и *CDC2L1*, находящиеся в критических областях, делеции которых приводят к развитию синдромов Прадера-Вилли/Энжельмена, Ди-Джорджи и моносомии 1p36 соответственно. В 2003 году этим же авторам удалось разработать ДНК-зонды для ряда других наследственных синдромов (Вольфа—Хиршхорна, Вильямса, Рубинштейна—Тейби, Смит—Магенис, Миллера—Дикера, Алажилля) [43].

Основным преимуществом ДНК-зондов к однокопийным последовательностям является отсутствие в них повторяющихся последовательностей ДНК, которые присутствуют в рекомбинантных ДНК-зондах и требуют избытка немеченой высокоповторяющейся ДНК, например, Cot I ДНК человека. Недостаточная супрессия повторяющихся последовательностей ДНК приводит к неспецифической (фоновой) гибридизации, что значительно затрудняет интерпретацию результатов исследования. Применение ДНК-зондов к однокопийным участкам генома не требует дополнительных мето-

дов, блокирующих повторяющиеся последовательности, что увеличивает специфичность FISH-метода [44].

Однако фрагменты ДНК-зондов, используемых в sc-FISH, достаточно короткие (2–10 т.п.н.) и интенсивность гибридизационного сигнала даже при использовании непрямого мечения флуорохромами является невысокой, что ограничивает чувствительность данного метода. Для повышения чувствительности в 2006 году Moga J.R. с соавт. предложили альтернативный способ усиления сигнала при FISH в диагностике злокачественной промиелоцитарной лейкемии [45]. Суть метода состояла в использовании флуоресцентно-меченных дендримеров, мономерами которых являются олигонуклеотиды, центральные части которых комплементарны, а 5'- и 3'- концы образуют свободные «хвосты». Построение дендримеров основано на комплементарности свободных концов разных мономеров, что позволяет создать разветвленную многослойную структуру, к которой можно присоединить специфический олигонуклеотид, флуорофор и/или антитела для детекции таргетной последовательности ДНК. Таким образом, авторам удалось повысить эффективность детекции гибридизационного сигнала до 50–90%.

Совершенно очевидно, что высокая специфичность sc-FISH делает ее надежным инструментом для исследования субмикроскопических CNV при повышении чувствительности метода за счет усиления гибридизационного сигнала. Для этого протокол sc-FISH должен включать не только выделение однокопийных последовательностей из области CNV, создание к ним ДНК-зондов методом ПЦР, но и усиление гибридизационного сигнала, например, с использованием дендримеров или тирамидной системы усиления сигнала, о которой будет сказано ниже.

## 2.2. *In situ* гибридизация с использованием уникальных праймеров

Полимеразная реакция *in situ* (PRINS, Primer in situ labeling) – молекулярно-цитогенетический метод, позволяющий детектировать участки ДНК размером 1 т.п.н. и более. PRINS разработана в качестве альтернативы традиционной FISH для верификации субмикроскопических CNV. Она основана на принципах полимеразной реакции с использованием нескольких немеченых, специфичных, расположенных на расстоянии 200–500 п.н. друг от друга олигонуклеотидов [46]. Олигонуклеотиды отжигаются на денатурированных хромосомах, ДНК которых содержит сайты, им комплементарные. Затем осуществляется элонгация цепи с использованием Taq-полимеразы в присутствии нуклеотидов, один из которых несет флуоресцентную или нефлуоресцентную метку. Такой подход оказался

весьма эффективным для детекции повторяющихся последовательностей ДНК [47]. Существенным недостатком PRINS считалась невозможность установления локализации уникальных последовательностей ДНК. В настоящее время существуют модификации метода, позволяющие визуализировать меченую ДНК уникальных последовательностей длиной менее 3 т.п.н. с помощью тирамидной системы усиления сигнала (TSA, Tyramide Signal Amplification). Принцип данного метода заключается в использовании антител к системе «метка – dUTP», меченных пероксидазой хрена. Пероксидаза хрена осуществляет активацию специфических тирамид, переводя их в радикалы, активно связывающиеся с тирозиновыми остатками белков, что позволяет накопить флуоресцирующие молекулы в зоне детекции. В 2000 г. Kadandale J.S. с соавт. с использованием метода PRINS и TSA-системы визуализировали ген *SRY*, размер которого меньше границы, определяющей размер CNV (887 п.н.) [48]. Таким образом, метод PRINS с последующим использованием TSA-системы потенциально может использоваться для верификации CNV, обнаруженных методами полногеномного анализа.

## 2.3. FISH с использованием амплификации ДНК-зонда по типу «катящегося колеса»

Ещё одним методом, который может использоваться для таргетной верификации субмикроскопических CNV, является FISH с амплификацией сигнала по типу «катящегося колеса» на основе padlock-зондов (RCA-FISH, Rolling Cycling Amplification). Такие зонды представляют собой олигонуклеотиды длиной около 90 п.н., из которых 15 п.н. с 5'- и 3'- конца гибридизируются последовательно друг за другом на таргетной последовательности и лигируются в случае полной комплементарности, а остальная часть образует петлю и используется для проведения изотермической амплификации по типу «катящегося колеса». Таким образом, усиление сигнала осуществляется за счет амплификации последовательности ДНК-зонда, что позволяет получить длинную повторяющуюся последовательность, на которую гибридизуют меченные флуорофором олигонуклеотиды [49].

Было предпринято несколько попыток обнаружения коротких последовательностей ДНК в геноме человека на основе padlock-зондов. Target-primed RCA – подход, который использовался для обнаружения точечных вариантов в митохондриальной ДНК человека [50] (рис. 2А). Данный метод основан на обработке ДНК-мишени рестриктазой и экзонуклеазой с последующим использованием 3'-конца мишени в качестве праймера для RCA и обнаружении продукта амплификации с флуоресцентными зондами. Этот

метод с большой специфичностью может быть использован для детекции отдельных молекул ДНК, но эффективность их выявления невысока и составляет около 10%. Lohmann J.S. с соавт. использовали RCA-FISH для обнаружения уникальных последовательностей на метафазных хромосомах [51]. Однако эффективность метода составила 1-10%, что свидетельствует о том, что этот метод лучше всего подходит для выявления повторяющихся последовательностей. В 2013 г. группа авторов применила пептидно-нуклеиновые кислоты (PNA — peptide nucleic acid) с последующим RCA-FISH для детекции уникальных последовательностей на интерфазных ядрах, метафазных хромосомах и на митохондриальной ДНК [52] (рис. 2Б). При этом PNA связываются с одной из цепей целевой последовательности, вытесняя комплементарную ей цепь, и тем самым открывают участок длиной 20–30 п.н. для дальнейшей гибридизации и лигирования padlock-зонда. Далее на таком кольцевом зонде осуществляется амплификация по типу «качающегося колеса» с помощью phi29-полимеразы. На образующемся продукте с множеством повторов гибридизуются олигонуклеотиды с флуоресцентной меткой. Эффективность детекции при использовании данного подхода на интерфазных ядрах составила 90%, а на метафазных хромосомах — 30%. При этом специфичность данного метода составила 100% при оценке эффективности гибридизации padlock-зондов с X- и Y-хромосомами. Таким образом, данный метод позволяет детектировать CNV в случаях, когда в области его локализации количество однокопийных последовательностей, к которым подбираются зонды в методе sc-FISH, невелико и их размер составляет менее 2 т.п.н.

## 2.4. FISH на хроматиновых волокнах ДНК

При изучении некоторых структурных перестроек, таких как дупликации, трипликации, важными являются их размер и способность метода FISH точно разделять два сигнала. Было определено, что более надежные результаты по определению последовательностей ДНК на метафазных хромосомах удается достичь при расстоянии 2 млн п.н. между двумя ДНК-мишенями, а на интерфазных ядрах — 50–1000 т.п.н. Однако при использовании метода FISH на хроматиновых волокнах ДНК (fiber-FISH), который основывается на флуоресцентной гибридизации *in situ* на растянутых хроматиновых нитях, разрешающая способность для двух сигналов составляет 1–10 т.п.н. Принцип данной техники включает в себя высвобождение и фиксацию молекул ДНК из интерфазных ядер на предметное стекло, с последующим линейным растяжением ДНК с использованием механических или гравитационных сил [53]. Было показано успешное применение fiber-FISH для определения ориентации (прямая или инвертированная) дупликаций и трипликаций [54,55].

## 2.5. Другие методы FISH для верификации субмикроскопических CNV

Существует категория методов FISH, которая согласно литературным данным пока не была использована для анализа субмикроскопических CNV, хотя успешно применяется для оценки локализации мРНК [56]. Суть данных методов сводится к усилению флуоресцентного сигнала при детекции мишени небольшого размера, поэтому они могут быть потенциально использованы и для детекции субмикроскопических последовательностей ДНК. К таким методам относится метод bDNA-FISH (branched DNA) и FISH-STICs (Se-

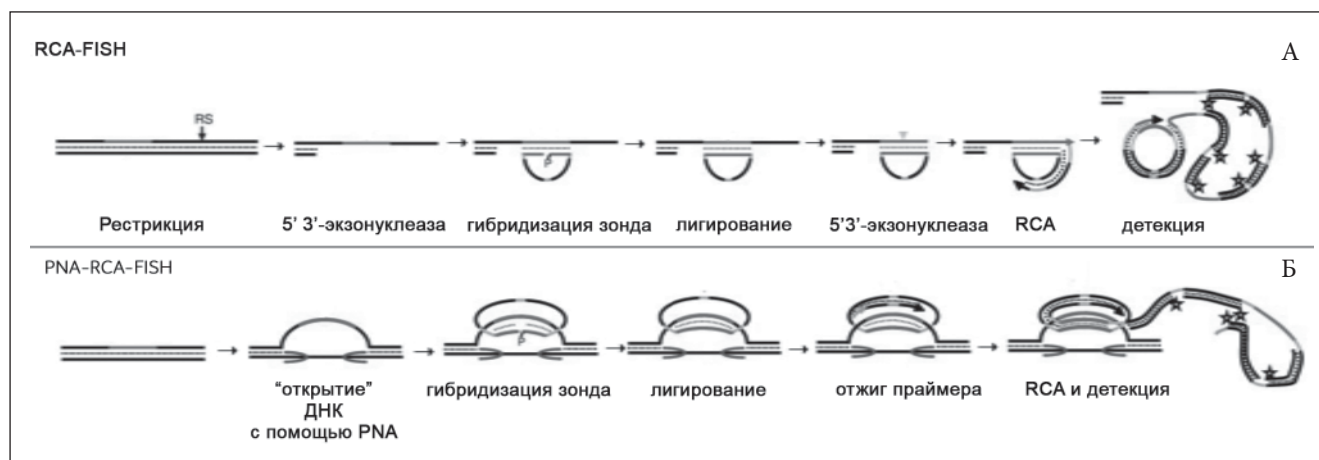


Рис. 2. Молекулярно-цитогенетические методы верификации CNV (Адаптировано из [49]).



**Методы верификации субмикроскопических CNV**

	Исходная концентрация ДНК	Минимальная разрешающая способность	Количество исследуемых локусов	Преимущества	Недостатки
Молекулярно-генетические методы верификации субмикроскопических CNV					
QPCR	5–10нг	1–100 п.н.	1–4	Высокая воспроизводимость, экономически эффективный.	Количество анализируемых локусов ограничено четырьмя флуоресцентными профилями.
MLPA	100–200нг	1–100 п.н.	>40 (при использовании коммерческих наборов) 5–8 (при разработке внутрилабораторной системы)	Исследование одновременно нескольких локусов с использованием одной пары праймеров.	Гетерозиготные делеции должны верифицироваться другими методами.
PRT	10–20нг	100 п.н.	1	Использование одной пары праймеров для участка CNV и эталонной последовательности.	Применимость метода зависит от наличия гомологичных последовательностей в области CNV и других участках генома.
MCC	от 8пг (1 молекула ДНК)	1–100 п.н.	1	Определение CNV в малом объеме сильно фрагментированной ДНК.	Дорогостоящее оборудование.
МАРН	0,5–1мкг	100 п.н.	>40	Исследование одновременно нескольких локусов с использованием одной пары праймеров.	Трудоемкий процесс пробподготовки, необходимость клонирования. Исследуемые CNV не всегда удовлетворяют условиям подбора зондов для данного метода.
QMPSF	100–200нг	100 п. н	до 12	Возможность анализировать в одной пробирке одновременно несколько локусов.	Трудность подбора праймеров для мультиплексной реакции.
Молекулярно-цитогенетические методы верификации субмикроскопических CNV					
sc-FISH	Фиксированная суспензия клеток	50 т.п.н. (при прямом мечении)	Зависит от количества имеющихся флуорофоров	Подбор зондов на однокопийные участки CNV. Не требует использования Cot 1 ДНК для супрессии повторяющихся последовательностей.	Необходимость использования системы усиления сигнала при анализе CNV от 1 до 50 т.п.н.
PRINS		от 1 т.п.н		Подбор праймеров на однокопийные участки, увеличение специфичности.	Необходимость использования системы усиления сигнала.
RCA-FISH		1–1000 п. н.		Нет необходимости в использовании дополнительных методов амплификации сигнала. В комбинации с PNA позволяет добиться 100% специфичности.	Трудоемкий процесс дизайна padlock-зондов.
Fiber-FISH		1–10 т.п.н. для двух сигналов		Увеличение разрешающей способности для двух сигналов. Возможна комбинация с любым типом зондов, используемых в других методах.	Трудоемкий и долгий процесс интерпретации результата.

quential Tethered and Intertwined ODN Complexes), принцип которых основан на использовании последовательной гибридизации олигонуклеотидных посредников, последние из которых мечены флуорофором. Для визуализации таких объектов используется конфокальная микроскопия.

## Заключение

CNV в геноме человека могут быть определены различными методами, в частности ХМА и высокопроизводительным секвенированием. Для верификации CNV используют молекулярно-генетические и молекулярно-цитогенетические методы, имеющие преимущества и недостатки (таблица). Основной недостаток молекулярно-генетических методов заключается в том, что они дают возможность подтвердить количественное изменение копийности (увеличение или недостаток) участков ДНК, однако не позволяют определить структуру и происхождение CNV. Совершенно очевидно, что этой информации недостаточно для понимания механизма возникновения дисбаланса. Сведения о локализации и структуре геномного дисбаланса позволяют уточнить механизм его возникновения. Например, дупликация или делеция могут возникать в геноме как *de novo*, так и являться следствием патологической мейотической родительской сегрегации некоторых структурных хромосомных аномалий (интер- и интрахромосомные инсерции, пара- и перичентрические инверсии, реципрокные транслокации). Так, интерстициальная дупликация, определяемая методом ХМА как участок увеличенной копийности по сравнению с референсным образцом, может быть тандемной или инвертированной. Тандемная интерстициальная дупликация вероятней возникает за счет неаллельной гомологичной рекомбинации (НАГР) между прямыми повторами сегментных дупликаций, инвертированная интерстициальная дупликация – между инвертированными повторами сегментных дупликаций сестринских хроматид. Известно, что НАГР является одним из механизмов формирования структурных перестроек *de novo*. Помимо этого инвертированная дупликация может быть следствием патологической мейотической сегрегации родительской парацентрической инверсии. Кроме того дублированный сегмент может локализоваться на негомологичной хромосоме, что косвенно указывает на носительство интерхромосомной инсерции. Определение происхождения CNV – наследственные или *de novo*, крайне важно для оценки повторного риска хромосомного (геномного) дисбаланса в семье, в которой есть больной ребенок [57, 58]. Поэтому разработка и совершенствование методов, позволяющих идентифицировать CNV

любого размера и локализации, позволит не только верифицировать субмикроскопические делеции, дупликации и трипликации, обнаруженные методами ХМА и высокопроизводительного секвенирования, но также определить структуру и происхождение этих CNV. С этой целью в первую очередь, используются молекулярно-цитогенетические методы, в частности, FISH. Однако традиционные FISH-технологии наиболее подходят для ситуаций, когда исследуемый фрагмент ДНК имеет значительные размеры (10–50 т.п.н). При необходимости верификации CNV меньшего размера требуется использование методов с более высокой чувствительностью и специфичностью, которые достигаются при применении в FISH различных методов амплификации гибридационного сигнала и последовательно-сти ДНК-зонда, а также разработкой ДНК-зондов к однокопийным последовательностям. Потенциальная возможность повсеместной геномной локализации CNV, выявляемых при использовании технологий полногеномного анализа, существенно ограничивает применение для их верификации коммерческих ДНК-зондов. Поэтому совершенствование подходов к разработке зондов на субмикроскопические CNV позволяет не только точно верифицировать количество геномных копий отдельных участков ДНК, но и детализировать структуру и происхождение геномного дисбаланса.

## Список литературы

1. Scherer S., Lee C., Birney E. et al. Challenges and standards in integrating surveys of structural variation. *Nature Genetics*. 2007;39(7s):S7-S15.doi: 10.1038/ng2093.
2. Feuk L., Carson A., Scherer S.. Structural variation in the human genome. *Nature Reviews Genetics*. 2006;7(2):85-97.doi: 10.1038/nrg1767.
3. Redon R., Ishikawa S., Fitch K., Feuk L. et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*. 2006;444(7118):444-454.doi: 10.1038/nature05329.
4. Ceulemans S., van der Ven K., Del-Favero J. Targeted Screening and Validation of Copy Number Variations. *Methods in Molecular Biology*. 2011;:311-328.doi: 10.1007/978-1-61779-507-7\_15.
5. Hurler M., Dermizakis E., Tyler-Smith C.. The functional impact of structural variation in humans. *Trends in Genetics*. 2008;24(5):238-245.doi: 10.1016/j.tig.2008.03.001.
6. Girirajan S., Campbell C., Eichler E. Human Copy Number Variation and Complex Genetic Disease. *Annual Review of Genetics*. 2011;45(1):203-226.doi: 10.1146/annurev-genet-102209-163544.
7. Koolen D., Pfundt R., de Leeuw N. et al. Genomic microarrays in mental retardation: A practical workflow for diagnostic applications. *Human Mutation*. 2009;30(3):283-292.
8. 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. *The American Journal of Human Genetics*. 2010;86(5):749-764.doi: 10.1016/j.ajhg.2010.04.006.
9. Andersen T., Troelsen K., Larsen L. Of mice and men: molecular genetics of congenital heart disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2013;71(8):1327-1352.doi: 10.1007/s00018-013-1430-1.

10. Lalani S., Belmont J. Genetic basis of congenital cardiovascular malformations. *European Journal of Medical Genetics*. 2014;57(8):402-413. doi: 10.1016/j.ejmg.2014.04.010.
11. Beaudet A. The Utility of Chromosomal Microarray Analysis in Developmental and Behavioral Pediatrics. *Child Development*. 2013;84(1):121-132. doi: 10.1111/cdev.12050.
12. Napoli E., Russo S., Casula L. et al. Array-CGH Analysis in a Cohort of Phenotypically Well-Characterized Individuals with "Essential" Autism Spectrum Disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 2017;48(2):442-449. doi: 10.1007/s10803-017-3329-4.
13. Fiorentino F., Napolitano S., Caiazzo F. et al. Chromosomal microarray analysis as a first-line test in pregnancies with a priori low risk for the detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *European Journal of Human Genetics*. 2012;21(7):725-730. doi: 10.1038/ejhg.2012.253.
14. Reiner J., Karger L., Cohen N, Mehta L., Edelmann L., Scott S.A. Chromosomal Microarray Detection of Constitutional Copy Number Variation Using Saliva DNA. *J Mol Diagn*. 2017;19(3):397-403. doi:10.1016/j.jmoldx.2016.11.006
15. Trost B., Walker S., Wang Z., et al. A Comprehensive Workflow for Read Depth-Based Identification of Copy-Number Variation from Whole-Genome Sequence Data. *Am J Hum Genet*. 2018;102(1):142-155. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.12.007
16. Zhou B., Ho S.S., Zhang X., et al. Whole-genome sequencing analysis of CNV using low-coverage and paired-end strategies is efficient an outperforms array-based CNV analysis. *Journal of Medical Genetics*. 2018;55:735-743. doi: 10.1136/jmedgenet-2018-105272
17. Sadedin S.P., Ellis J.A., Masters S.L., Oshlack A. Ximmer: a system for improving accuracy and consistency of CNV calling from exome data. *Gigascience*. 2018;7(10):giy112. Published 2018 Sep 6. doi:10.1093/gigascience/giy112
18. Samarakoon P.S., Sorte H.S., Stray-Pedersen A., Rødningen O.K., Rognes T., Lyle R. CNVcan: a CNV screening and annotation tool to improve the clinical utility of computational CNV prediction from exome sequencing data. *BMC Genomics*. 2016;17:51. Published 2016 Jan 14. doi:10.1186/s12864-016-2374-2
19. Kearney H.M., Thorland E.C., Brown K.K. et al. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med*. 2011;13:680-5. doi: 10.1097/GIM.0b013e3182217a3a
20. Lee J., Jeon J. Methods to detect and analyze copy number variations at the genome-wide and locus-specific levels. *Cytogenetic and Genome Research*. 2008;123(1-4):333-342. doi: 10.1159/000184725.
21. Gouas L., Goumy C., Véronèse L. et al. Gene dosage methods as diagnostic tools for the identification of chromosome abnormalities. *Pathologie Biologie*. 2008;56(6):345-353. doi: 10.1016/j.pat-bio.2008.03.010.
22. Sellner L., Taylor G. MLPA and MAPH: New techniques for detection of gene deletions. *Human Mutation*. 2004;23(5):413-419. doi: 10.1002/humu.20035.
23. Armour J., Palla R., Zeeuwen P. et al. Accurate, high-throughput typing of copy number variation using paralogue ratios from dispersed repeats. *Nucleic Acids Research*. 2007;35(3):e19-e19. doi: 10.1093/nar/gkl1089.
24. Veal C., Xu H., Reekie K. et al. Automated design of paralogue ratio test assays for the accurate and rapid typing of copy number variation. *Bioinformatics*. 2013;29(16):1997-2003. doi: 10.1093/bioinformatics/btt330.
25. Aldhous M., Abu Bakar S., Prescott N. et al. Measurement methods and accuracy in copy number variation: failure to replicate associations of beta-defensin copy number with Crohn's disease. *Human Molecular Genetics*. 2010;19(24):4930-4938. doi: 10.1093/hmg/ddq411.
26. Carpenter D., Walker S., Prescott N. et al. Accuracy and differential bias in copy number measurement of CCL3L1 in association studies with three auto-immune disorders. *BMC Genomics*. 2011;12(1).doi: 10.1186/1471-2164-12-418.
27. Fode P., Stegger M., Andersen P. Human  $\beta$ -defensin 3 (DEFB103) and its influence on *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *International Journal of Infectious Diseases*. 2011;15(6):e388-e394. doi: 10.1016/j.ijid.2011.02.003.
28. Hollox E., Detering J., Dehnugara T. An integrated approach for measuring copy number variation at the FCGR3(CD16) locus. *Human Mutation*. 2009;30(3):477-484. doi: 10.1002/humu.20911.
29. Morris D., Roberts A., Witherden A. et al. Evidence for both copy number and allelic (NA1/NA2) risk at the FCGR3B locus in systemic lupus erythematosus. *European Journal of Human Genetics*. 2010;18(9):1027-1031. doi: 10.1038/ejhg.2010.56.
30. Saldanha G., Potter L., Dyall L. et al. Detection of Copy Number Changes in DNA from Formalin Fixed Paraffin Embedded Tissues Using Paralogue Ratio Tests. *Analytical Chemistry*. 2011;83(9):3484-3492. doi: 10.1021/ac200153.
31. Haridan U., Mokhtar U., Machado L. et al. A Comparison of Assays for Accurate Copy Number Measurement of the Low-Affinity Fc Gamma Receptor Genes FCGR3A and FCGR3B. *PLOS ONE*. 2015;10(1):e0116791. doi: 10.1371/journal.pone.0116791.
32. Qi Y., Zhou X., Bu D. et al. Low copy numbers of FCGR3A and FCGR3B associated with Chinese patients with SLE and AASV. *Lupus*. 2017;26(13):1383-1389. doi: 10.1177/0961203317700485.
33. Qin J., Jones R., Ramakrishnan R.. Studying copy number variations using a nanofluidic platform. *Nucleic Acids Research*. 2008;36(18):e116-e116. doi: 10.1093/nar/gkn518.
34. McCaughan F. Darai-Ramqvist E., Bankier A. et al. Microdissection molecular copy-number counting ( $\mu$ MCC)-unlocking cancer archives with digital PCR. *The Journal of Pathology*. 2008;216(3):307-316. doi: 10.1002/path.2413.
35. Daser A., Thangavelu M., Pannell R. et al. Interrogation of genomes by molecular copy-number counting (MCC). *Nature Methods*. 2006;3(6):447-453. doi: 10.1038/nmeth880.
36. Charbonnier F., Raux G., Wang Q. et al. Detection of exon deletions and duplications of the mismatch repair genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families using multiplex polymerase chain reaction of short fluorescent fragments // *Cancer Research*. 2000;60(11) :2760-2763.
37. Armour J. Measurement of locus copy number by hybridisation with amplifiable probes. *Nucleic Acids Research*. 2000;28(2):605-609.
38. Hollox E. High throughput screening of human subtelomeric DNA for copy number changes using multiplex amplifiable probe hybridisation (MAPH). *Journal of Medical Genetics*. 2002;39(11):790-795.
39. Patsalis P., Kousoulidou L., Sismani C. et al. MAPH: from gels to microarrays. *European Journal of Medical Genetics*. 2005;48(3):241-249. doi: 10.1016/j.ejmg.2005.04.011.
40. Gibbons B., Datta P., Wu Y. et al. Microarray MAPH: accurate array-based detection of relative copy number in genomic DNA. *BMC Genomics*. 2006;7(1):163. doi: 10.1186/1471-2164-7-163.
41. Patsalis P., Kousoulidou L., Männik K. et al. Detection of small genomic imbalances using microarray-based multiplex amplifiable probe hybridization. *European Journal of Human Genetics*. 2006;15(2):162-172. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201738.
42. Rogan P. Sequence-Based Design of Single-Copy Genomic DNA Probes for Fluorescence In Situ Hybridization. *Genome Research*. 2001;11(6):1086-1094. doi: 10.1101/gr.171701.
43. Knoll J., Rogan P. Sequence-Based, in situ detection of chromosomal abnormalities at high resolution. *American Journal of Medical Genetics*. 2003;121A(3):245-257. doi: 10.1002/AJMG.A.20123.
44. Trifonov V., Vorobieva N., Serdyukova N., Rens W. FISH with and without COT1 DNA. In: Liehr T, ed. by. *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH): Application Guide*. 2nd ed. Germany, Berlin: Springer Protocols Handbooks; 2017. p. 123-133.
45. Mora J, Knoll J., Rogan P., Getts R., Wilson G. Dendrimer FISH detection of single-copy intervals in acute promyelocytic leukemia.

- Molecular and Cellular Probes. 2006;20(2):114-120.doi: 10.1016/J.MCP.2005.11.005.
46. Pellestor F. Development and adaptation of the PRINS technology: an overview. In: Pellestor F. (ed). PRINS and in situ PCR protocols. Humana, Totowa, NJ, pp.211-220.
  47. Koch J., Kolvraa S., Petersen K. et al. Oligonucleotide-priming methods for the chromosome-specific labelling of alpha satellite DNA in situ. *Chromosoma*. 1989;98(4):259-265.
  48. Kadandale J., Tunca Y., Tharapel A. Chromosomal Localization of Single Copy Genes SRY and SOX3 by Primed In Situ Labeling (PRINS). *Microbial & Comparative Genomics*. 2000;5(2):71-74.doi: 10.1089/10906590050179756.
  49. Wagner M., Haider S. New trends in fluorescence in situ hybridization for identification and functional analyses of microbes. *Current Opinion in Biotechnology*. 2012;23(1):96-102.doi: 10.1016/j.copbio.2011.10.010.
  50. Larsson C., Koch J., Nygren A. et al. In situ genotyping individual DNA molecules by target-primed rolling-circle amplification of padlock probes. *Nature Methods*. 2004;1(3):227-232.doi: 10.1038/nmeth723.
  51. Lohmann J., Stougaard M., Koch J. Detection of short repeated genomic sequences on metaphase chromosomes using padlock probes and target primed rolling circle DNA synthesis. *BMC Molecular Biology*. 2007;8(1):103.doi: 10.1186/1471-2199-8-103.
  52. Yaroslavsky A., Smolina I. Fluorescence Imaging of Single-Copy DNA Sequences within the Human Genome Using PNA-Directed Padlock Probe Assembly. *Chemistry & Biology*. 2013;20(3):445-453. doi: 10.1016/j.chembiol.2013.02.012.
  53. Ye C.J., Heng H.H. High Resolution Fiber-Fluorescence In Situ Hybridization. In: Wan T. (eds) *Cancer Cytogenetics. Methods in Molecular Biology*. 2017: vol 1541. Humana Press, New York, NY
  54. Shimojima K., Inoue T., Hoshino A. et al. Comprehensive genetic analyses of PLP1 in patients with Pelizaeus-Merzbacher disease applied by array-CGH and fiber-FISH analyses identified new mutations and variable sizes of duplications. *Brain Dev*. 2010;32:171-179. doi: 10.1016/j.braindev.2009.02.011.
  55. Shimojima K., Sugiura C., Takahashi H. et al. Genomic copy number variations at 17p13.3 and epileptogenesis. *Epilepsy Res*. 2010;89:303-309. doi: 10.1016/j.eplesyres.2010.02.002
  56. Sinnamon J., Czaplinski K. RNA detection in situ with FISH-STICs. *RNA*. 2013;20(2):260-266.doi: 10.1261/rna.041905.113.
  57. Bui T., Vetro A., Zuffardi O., Shaffer L. Current controversies in prenatal diagnosis 3: is conventional chromosome analysis necessary in the post-array CGH era?. *Prenatal Diagnosis*. 2011;31(3):235-243.doi: 10.1002/pd.2722.
  58. Шилова Н.В. Совершенствование подходов к диагностике хромосомных аномалий в рамках персонализированной медицины. Автореф. дисс. на соискание учёной степени д.мед.н. Москва, 2016. 48 с.
- ## References
1. Scherer S., Lee C., Birney E. et al. Challenges and standards in integrating surveys of structural variation. *Nature Genetics*. 2007;39(7s):S7-S15.doi: 10.1038/ng2093.
  2. Feuk L., Carson A., Scherer S.. Structural variation in the human genome. *Nature Reviews Genetics*. 2006;7(2):85-97.doi: 10.1038/nrg1767.
  3. Redon R., Ishikawa S., Fitch K., Feuk L. et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*. 2006;444(7118):444-454.doi: 10.1038/nature05329.
  4. Ceulemans S., van der Ven K., Del-Favero J. Targeted Screening and Validation of Copy Number Variations. *Methods in Molecular Biology*. 2011;:311-328.doi: 10.1007/978-1-61779-507-7\_15.
  5. Hurler M., Dermitzakis E., Tyler-Smith C.. The functional impact of structural variation in humans. *Trends in Genetics*. 2008;24(5):238-245.doi: 10.1016/j.tig.2008.03.001.
  6. Girirajan S., Campbell C., Eichler E. Human Copy Number Variation and Complex Genetic Disease. *Annual Review of Genetics*. 2011;45(1):203-226.doi: 10.1146/annurev-genet-102209-163544.
  7. Koolen D., Pfundt R., de Leeuw N. et al. Genomic microarrays in mental retardation: A practical workflow for diagnostic applications. *Human Mutation*. 2009;30(3):283-292.
  8. 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. *The American Journal of Human Genetics*. 2010;86(5):749-764.doi: 10.1016/j.ajhg.2010.04.006.
  9. Andersen T., Troelsen K., Larsen L. Of mice and men: molecular genetics of congenital heart disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2013;71(8):1327-1352.doi: 10.1007/s00018-013-1430-1.
  10. Lalani S., Belmont J. Genetic basis of congenital cardiovascular malformations. *European Journal of Medical Genetics*. 2014;57(8):402-413.doi: 10.1016/j.ejmg.2014.04.010.
  11. Beaudet A. The Utility of Chromosomal Microarray Analysis in Developmental and Behavioral Pediatrics. *Child Development*. 2013;84(1):121-132.doi: 10.1111/cdev.12050.
  12. Napoli E., Russo S., Casula L. et al. Array-CGH Analysis in a Cohort of Phenotypically Well-Characterized Individuals with "Essential" Autism Spectrum Disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 2017;48(2):442-449.doi: 10.1007/s10803-017-3329-4.
  13. Fiorentino F., Napoletano S., Caiazzo F. et al. Chromosomal microarray analysis as a first-line test in pregnancies with a priori low risk for the detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *European Journal of Human Genetics*. 2012;21(7):725-730.doi: 10.1038/ejhg.2012.253.
  14. Reiner J., Karger L., Cohen N, Mehta L., Edelman L., Scott S.A. Chromosomal Microarray Detection of Constitutional Copy Number Variation Using Saliva DNA. *J Mol Diagn*. 2017;19(3):397-403: doi:10.1016/j.jmoldx.2016.11.006
  15. Trost B., Walker S., Wang Z., et al. A Comprehensive Workflow for Read Depth-Based Identification of Copy-Number Variation from Whole-Genome Sequence Data. *Am J Hum Genet*. 2018;102(1):142-155. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.12.007
  16. Zhou B., Ho S.S., Zhang X., et al. Whole-genome sequencing analysis of CNV using low-coverage and paired-end strategies is efficient an outperforms array-based CNV analysis. *Journal of Medical Genetics*. 2018;55:735-743. doi: 10.1136/jmedgenet-2018-105272
  17. Sadedin S.P., Ellis J.A., Masters S.L., Oshlack A. Ximmer: a system for improving accuracy and consistency of CNV calling from exome data. *Gigascience*. 2018;7(10):giy112. Published 2018 Sep 6. doi:10.1093/gigascience/giy112
  18. Samarakoon P.S., Sorte H.S., Stray-Pedersen A., Rødningen O.K., Rognes T., Lyle R. CNVcan: a CNV screening and annotation tool to improve the clinical utility of computational CNV prediction from exome sequencing data. *BMC Genomics*. 2016;17:51. Published 2016 Jan 14. doi:10.1186/s12864-016-2374-2
  19. Kearney H.M., Thorland E.C., Brown K.K. et al. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med*. 2011;13:680-5. doi: 10.1097/GIM.0b013e3182217a3a
  20. Lee J., Jeon J. Methods to detect and analyze copy number variations at the genome-wide and locus-specific levels. *Cytogenetic and Genome Research*. 2008;123(1-4):333-342.doi: 10.1159/000184725.
  21. Gouas L., Goumy C., Véronèse L. et al. Gene dosage methods as diagnostic tools for the identification of chromosome abnormalities. *Pathologie Biologie*. 2008;56(6):345-353.doi: 10.1016/j.patbio.2008.03.010.
  22. Sellner L., Taylor G. MLPA and MAPH: New techniques for detection of gene deletions. *Human Mutation*. 2004;23(5):413-419.doi: 10.1002/humu.20035.

23. Armour J., Palla R., Zeeuwen P. et al. Accurate, high-throughput typing of copy number variation using paralogue ratios from dispersed repeats. *Nucleic Acids Research*. 2007;35(3):e19-e19. doi: 10.1093/nar/gkl1089.
24. Veal C., Xu H., Reekie K. et al. Automated design of paralogue ratio test assays for the accurate and rapid typing of copy number variation. *Bioinformatics*. 2013;29(16):1997-2003. doi: 10.1093/bioinformatics/btt330.
25. Aldhous M., Abu Bakar S., Prescott N. et al. Measurement methods and accuracy in copy number variation: failure to replicate associations of beta-defensin copy number with Crohn's disease. *Human Molecular Genetics*. 2010;19(24):4930-4938. doi: 10.1093/hmg/ddq411.
26. Carpenter D., Walker S., Prescott N. et al. Accuracy and differential bias in copy number measurement of CCL3L1 in association studies with three auto-immune disorders. *BMC Genomics*. 2011;12(1). doi: 10.1186/1471-2164-12-418.
27. Fode P., Stegger M., Andersen P. Human  $\beta$ -defensin 3 (DEFB103) and its influence on *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *International Journal of Infectious Diseases*. 2011;15(6):e388-e394. doi: 10.1016/j.ijid.2011.02.003.
28. Hollox E., Detering J., Dehngara T. An integrated approach for measuring copy number variation at the FCGR3(CD16) locus. *Human Mutation*. 2009;30(3):477-484. doi: 10.1002/humu.20911.
29. Morris D., Roberts A., Witherden A. et al. Evidence for both copy number and allelic (NA1/NA2) risk at the FCGR3B locus in systemic lupus erythematosus. *European Journal of Human Genetics*. 2010;18(9):1027-1031. doi: 10.1038/ejhg.2010.56.
30. Saldanha G., Potter L., Dyall L. et al. Detection of Copy Number Changes in DNA from Formalin Fixed Paraffin Embedded Tissues Using Paralogue Ratio Tests. *Analytical Chemistry*. 2011;83(9):3484-3492. doi: 10.1021/ac200153.
31. Haridan U., Mokhtar U., Machado L. et al. A Comparison of Assays for Accurate Copy Number Measurement of the Low-Affinity Fc Gamma Receptor Genes FCGR3A and FCGR3B. *PLOS ONE*. 2015;10(1):e0116791. doi: 10.1371/journal.pone.0116791.
32. Qi Y., Zhou X., Bu D. et al. Low copy numbers of FCGR3A and FCGR3B associated with Chinese patients with SLE and AASV. *Lupus*. 2017;26(13):1383-1389. doi: 10.1177/0961203317700485.
33. Qin J., Jones R., Ramakrishnan R.. Studying copy number variations using a nanofluidic platform. *Nucleic Acids Research*. 2008;36(18):e116-e116. doi: 10.1093/nar/gkn518.
34. McCaughan F. Darai-Ramqvist E., Bankier A. et al. Microdissection molecular copy-number counting ( $\mu$ MCC)-unlocking cancer archives with digital PCR. *The Journal of Pathology*. 2008;216(3):307-316. doi: 10.1002/path.2413.
35. Daser A., Thangavelu M., Pannell R. et al. Interrogation of genomes by molecular copy-number counting (MCC). *Nature Methods*. 2006;3(6):447-453. doi: 10.1038/nmeth880.
36. Charbonnier F., Raux G., Wang Q. et al. Detection of exon deletions and duplications of the mismatch repair genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families using multiplex polymerase chain reaction of short fluorescent fragments // *Cancer Research*. 2000;60(11):2760-2763.
37. Armour J. Measurement of locus copy number by hybridisation with amplifiable probes. *Nucleic Acids Research*. 2000;28(2):605-609.
38. Hollox E. High throughput screening of human subtelomeric DNA for copy number changes using multiplex amplifiable probe hybridisation (MAPH). *Journal of Medical Genetics*. 2002;39(11):790-795.
39. Patsalis P., Kousoulidou L., Sismani C. et al. MAPH: from gels to microarrays. *European Journal of Medical Genetics*. 2005;48(3):241-249. doi: 10.1016/j.ejmg.2005.04.011.
40. Gibbons B., Datta P., Wu Y. et al. Microarray MAPH: accurate array-based detection of relative copy number in genomic DNA. *BMC Genomics*. 2006;7(1):163. doi: 10.1186/1471-2164-7-163.
41. Patsalis P., Kousoulidou L., Männik K. et al. Detection of small genomic imbalances using microarray-based multiplex amplifiable probe hybridization. *European Journal of Human Genetics*. 2006;15(2):162-172. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201738.
42. Rogan P. Sequence-Based Design of Single-Copy Genomic DNA Probes for Fluorescence In Situ Hybridization. *Genome Research*. 2001;11(6):1086-1094. doi: 10.1101/gr.171701.
43. Knoll J., Rogan P. Sequence-Based, in situ detection of chromosomal abnormalities at high resolution. *American Journal of Medical Genetics*. 2003;121A(3):245-257. doi: 10.1002/AJMG.A.20123.
44. Trifonov V., Vorobieva N., Serdyukova N., Rens W. FISH with and without COT1 DNA. In: Liehr T, ed. by. *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH): Application Guide*. 2nd ed. Germany, Berlin: Springer Protocols Handbooks; 2017. p. 123-133.
45. Mora J, Knoll J., Rogan P., Getts R., Wilson G. Dendrimer FISH detection of single-copy intervals in acute promyelocytic leukemia. *Molecular and Cellular Probes*. 2006;20(2):114-120. doi: 10.1016/J.MCP.2005.11.005.
46. Pellestor F. Development and adaptation of the PRINS technology: an overview. In: Pellestor F. (ed). *PRINS and in situ PCR protocols*. Humana, Totowa, NJ, pp.211-220.
47. Koch J., Kolvraa S., Petersen K. et al. Oligonucleotide-priming methods for the chromosome-specific labelling of alpha satellite DNA in situ. *Chromosoma*. 1989;98(4):259-265.
48. Kadandale J., Tunca Y., Tharapel A. Chromosomal Localization of Single Copy Genes SRY and SOX3 by Primed In Situ Labeling (PRINS). *Microbial & Comparative Genomics*. 2000;5(2):71-74. doi: 10.1089/10906590050179756.
49. Wagner M., Haider S. New trends in fluorescence in situ hybridization for identification and functional analyses of microbes. *Current Opinion in Biotechnology*. 2012;23(1):96-102. doi: 10.1016/j.copbio.2011.10.010.
50. Larsson C., Koch J., Nygren A. et al. In situ genotyping individual DNA molecules by target-primed rolling-circle amplification of padlock probes. *Nature Methods*. 2004;1(3):227-232. doi: 10.1038/nmeth723.
51. Lohmann J., Stougaard M., Koch J. Detection of short repeated genomic sequences on metaphase chromosomes using padlock probes and target primed rolling circle DNA synthesis. *BMC Molecular Biology*. 2007;8(1):103. doi: 10.1186/1471-2199-8-103.
52. Yaroslavsky A., Smolina I. Fluorescence Imaging of Single-Copy DNA Sequences within the Human Genome Using PNA-Directed Padlock Probe Assembly. *Chemistry & Biology*. 2013;20(3):445-453. doi: 10.1016/j.chembiol.2013.02.012.
53. Ye C.J., Heng H.H. High Resolution Fiber-Fluorescence In Situ Hybridization. In: Wan T. (eds) *Cancer Cytogenetics. Methods in Molecular Biology*. 2017: vol 1541. Humana Press, New York, NY
54. Shimojima K., Inoue T., Hoshino A. et al. Comprehensive genetic analyses of PLP1 in patients with Pelizaeus-Merzbacher disease applied by array-CGH and fiber-FISH analyses identified new mutations and variable sizes of duplications. *Brain Dev*. 2010;32:171-179. doi: 10.1016/j.braindev.2009.02.011.
55. Shimojima K., Sugiura C., Takahashi H. et al. Genomic copy number variations at 17p13.3 and epileptogenesis. *Epilepsy Res*. 2010;89:303-309. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2010.02.002
56. Sinnamon J., Czaplinski K. RNA detection in situ with FISH-STICs. *RNA*. 2013;20(2):260-266. doi: 10.1261/rna.041905.113.
57. Bui T., Vetro A., Zuffardi O., Shaffer L. Current controversies in prenatal diagnosis 3: is conventional chromosome analysis necessary in the post-array CGH era?. *Prenatal Diagnosis*. 2011;31(3):235-243. doi: 10.1002/pd.2722.
58. Shilova N.V. Sovershenstvovanie podkhodov k diagnostike khromosomnykh anomalii v ramkakh personalizirovannoi meditsiny [Improving approaches to the diagnosis of chromosomal abnormalities in the framework of personalized medicine. *Dissertation*]. Moscow. 2016. 48p. (In Russ).