

## ОЦЕНКА АССОЦИИ ВАРИАЦИЙ ЧИСЛА КОПИЙ ГЕНА *CNTN6* С ИДИОПАТИЧЕСКИМИ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНЫМИ РАССТРОЙСТВАМИ

© 2016 г. М. Е. Лопаткина<sup>1</sup>, А. А. Кашеварова<sup>1,2</sup>, И. Н. Лебедев<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томск 634050

<sup>2</sup>Национальный исследовательский Томский государственный университет,  
Биологический институт, Томск 634050

e-mail: maria.lopatkina@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 08.12.2015 г.

Проведен анализ распространенности вариаций числа копий гена *CNTN6*, выделенного недавно в качестве кандидатного для интеллектуальных расстройств. С помощью количественной ПЦР в режиме реального времени в группе из 200 пациентов с идиопатической умственной отсталостью и задержкой интеллектуального развития не обнаружено ни одного случая изменения числа копий гена *CNTN6*. С учетом описанных нами ранее пациентов и данных литературы оценена суммарная частота изолированных микроделетий и микродупликаций *CNTN6*, которая составила 1 : 265 (0.4%). При сравнительном анализе фенотипических особенностей пациентов с микроделетиями и микродупликациями гена *CNTN6*, независимо от типа хромосомной мутации, выявлены расстройства аутистического спектра, задержка физического и психомоторного развития, умственная отсталость, снижение когнитивных функций, эпилептиформные припадки, кардиологические нарушения и поведенческие проблемы.

**Ключевые слова:** идиопатические интеллектуальные расстройства, CNV, микроделеционные/микродупликационные синдромы, *CNTN6*, количественная ПЦР в режиме реального времени, гено-фенотипические корреляции.

DOI: 10.7868/S0016675816090095

Применение современных полногеномных технологий (матричная сравнительная геномная гибридизация, секвенирование нового поколения) для идентификации генетических причин задержки развития и интеллектуальных расстройств зачастую дает целый список вариаций числа копий участков ДНК (CNV), среди которых встречаются как полиморфные и патогенные варианты, так и мутации с неясной патогенетической значимостью (потенциально патогенные вариации). При этом регионы хромосомных мутаций обычно содержат несколько генов, что затрудняет оценку вклада каждого из них в формирование фенотипа и осложняет идентификацию кандидатных генов заболевания. В таком случае особый интерес для доказательства патогенетической значимости мутаций приобретают реципрокные моногенные CNVs, представленные микроделетиями и микродупликациями в одном и том же хромосомном регионе с вовлечением единственного гена.

Четыре уникальных случая реципрокных хромосомных мутаций в субсегменте 3p26.3, содержащих только один ген *CNTN6*, были впервые описаны нами ранее при исследовании пациентов с умственной отсталостью (УО) [1]. *CNTN6*

является нейрональной молекулой межклеточной адгезии, экспрессирующейся преимущественно в ЦНС и вовлеченной в процессы развития нейронов, формирования синапсов и миелинизации аксонов [1]. Таким образом, *CNTN6* может участвовать в процессах развития и функционирования ЦНС, а мутации, затрагивающие ген *CNTN6*, могут быть ассоциированы с УО. Целью настоящей работы явился поиск реципрокных микроделетий и микродупликаций гена *CNTN6* в расширенных выборках пациентов с задержкой развития и УО, а также сравнительный анализ фенотипических особенностей пациентов с данными хромосомными мутациями.

Было обследовано 200 детей, в том числе 46 пациентов в возрасте от 3 до 5 лет с задержкой интеллектуального развития (35 мальчиков и 11 девочек) и 154 ребенка в возрасте от 5 до 18 лет с диагнозом умственная отсталость неуточненная, код F79 по МКБ10 (107 мальчиков и 47 девочек). Средний возраст пациентов составил  $9 \pm 3.89$  года. В контрольную группу (популяционная выборка) вошли 97 здоровых мужчин и 103 женщины (всего 200 человек) в возрасте от 23 до 69 лет ( $35 \pm 7.55$  года). Обследование пациентов и сбор клинического

**Таблица 1.** Структура праймеров на гены *CNTN6* и *HEXB*

Регион	Праймер	Последовательность
3p26.3	CNTN6_A F	5'-TTTGTTCACCTGATTGTATGG-3'
	CNTN6_A R	5'-GAAGAGTTTATGAGTGGCAGCA-3'
	CNTN6_B F	5'-CTGGACAGATGACTCCAAAGAA-3'
	CNTN6_B R	5'-CCTGTCCCAGCAGTGTGTGTA-3'
5q13.3	HEXB F	5'-CCGGGCACAATAGTTGAAGT-3'
	HEXB R	5'-TCCTCCAATCTTGTCCATAGC-3'

материала осуществляли на базе генетической клиники НИИ медицинской генетики г. Томска. Информированное согласие от родителей пробандов и индивидов контрольной группы было получено во всех случаях. Проведение исследования было одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики.

Количественная ПЦР в режиме реального времени была проведена на приборе CFX96 Real-Time PCR (Bio-Rad, США) с использованием двух пар праймеров на кодирующую область гена *CNTN6* (табл. 1). В качестве контрольного локуса был использован *HEXB* (5q13.3).

У всех обследованных пациентов было выявлено нормальное (дисомное) число копий гена *CNTN6*. Ни одного случая микроделеции или микродупликации *CNTN6* ни в одной из исследованных групп нами обнаружено не было. Полученный результат может быть связан с тем, что локус-специфичная частота CNV в среднем составляет  $10^{-5}$ – $10^{-4}$ , поэтому перестройка могла быть не зарегистрирована в относительно небольших выборках, исследованных в данной работе. Однако у обследованных нами ранее с помощью матричной сравнительной геномной гибридизации на ДНК-микрочипах высокого разрешения (aCGH) 79 пациентов с УО микроделеция данного гена была обнаружена у двух сибсов, а микродупликация у одного пациента [1] и частота встречаемости хромосомной мутации в регионе 3p26.3 в российской популяции составила 1 : 93 среди пациентов с нарушением интеллектуального развития (1%).

Примечательно, что в августе 2015 г. зарубежными исследователями были опубликованы результаты по ретроспективному поиску вариаций числа копий *CNTN6* среди 3724 пациентов с множественными врожденными пороками развития, пороками сердца, низкорослостью, задержкой развития и интеллектуальными расстройствами, а также заболеваниями аутистического спектра и эпилептиформными припадками [2]. Всего было идентифицировано 14 CNVs, затрагивающих *CNTN6*, у детей в возрасте от 1 года до 15 лет. Семь пациентов имели либо полную, либо внутригенную делецию *CNTN6*. У 5 пациентов была диагно-

стирована внутригенная дупликация *CNTN6*. Еще 2 пациента имели дупликацию колокализированных генов *CHLI/CNTN6* и *CHLI/CNTN6/CNTN4* соответственно. Исследователи указывают, что частота вариаций числа копий *CNTN6* составила 4 : 1000 (0.4%), однако, на наш взгляд, из этой группы следует исключить двух пациентов со смежными генными микродупликациями, затрагивающими и соседние гены, которые считаются патогенетически значимыми при синдроме делеции короткого плеча хромосомы 3 (синдром 3p-; OMIM 613792) [3]. Таким образом, частота изолированных вариаций в числе копий *CNTN6*, обнаруженных Hu et al. [2], составила 1 : 310 (0.3%). Hu с коллегами отмечают, что неполная пенетрантность и переменная экспрессивность CNV могут затруднять подсчет частоты хромосомных мутаций в субсегменте 3p26.3, поскольку некоторые пациенты могут иметь слабовыраженные клинические признаки или нормальный фенотип [2]. Выявление у клинически здоровых индивидов CNVs, затрагивающих *CNTN6*, не исключает возможности того, что данные мутации могут оказаться фактором риска развития неврологических нарушений. Именно поэтому контрольную группу в нашем исследовании составили взрослые индивиды.

Учитывая новые данные, представленные Hu с соавторами, а также ряд других работ, в которых упоминались пациенты с микроделециями и микродупликациями *CNTN6* [4–7], случаи, представленные в базе DECIPHER [8], и полученные нами ранее результаты, мы провели сравнительный анализ фенотипических особенностей у таких пациентов (табл. 2). В группу для исследования вошли 40 детей в возрасте от 1 года до 15 лет с задержкой развития или УО. Среди 40 пробандов, независимо от типа хромосомной мутации, наиболее часто регистрировались расстройства аутистического спектра и задержка физического и психомоторного развития. Чуть реже выявлялись УО и снижение когнитивных функций. Более подробное клиническое описание доступно лишь для 16 пациентов [1, 2]. Среди них примерно в половине случаев отмечены эпилептиформные припадки и кардиологические нарушения. У некоторых детей регистрировались нарушения по-

**Таблица 2.** Фенотипические особенности пациентов с микроделецией и микродупликацией *CNTN6*

Клинические признаки	Микродупликация <i>CNTN6</i>	Микроделеция <i>CNTN6</i>
Общие	Расстройства аутистического спектра (17/40), задержка физического и психомоторного развития (15/40), умственная отсталость (8/40), снижение когнитивных функций (7/40), эпилептиформные припадки (7/16), кардиологические нарушения (6/16), нарушение поведения (5/16), нарушение структуры и роста волос (5/16), аномалии пальцев верхних и нижних конечностей (5/16), широкая переносица (4/16), готическое нёбо (4/16), микроцефалия (4/16), низкорослость (4/16), отклонение от нормы показателей ЭЭГ (4/16), эпикант (4/16), антимонголоидный разрез глаз (3/16), аномалии зубов и десен (3/16), аномалии ушей (3/16), гипермобильность суставов (3/16), выступающие лобные бугры (3/16), гидроцефалия (3/16), изменение формы черепа (3/16), сколиоз (3/16), страбизм (2/16), гипотиреоз (2/16), дизартрия (2/16), задержка речевого развития (2/16), короткий фильтр (2/16), макроцефалия (2/16), мышечная спастичность (2/16)	
Уникальные	Синдром дефицита внимания и гиперактивности (3/16), рефлюкс (2/16), крипторхизм (1/16), микрогнатия (1/16)	Гипоплазия щитовидной железы (2/16), заболевания почек (2/16)

Примечание. Таблица составлена на основе клинических данных, представленных в статьях [1, 2, 4–7] и базе DECIPHER [8]. В скобках указаны частоты встречаемости признака.

ведения, аномалии волос, черепа, опорно-двигательной системы, пальцев и ряд лицевых дисморфий. Дополнительно в группе пациентов с микродупликацией отмечены случаи синдрома дефицита внимания и гиперактивности и рефлюкс, а среди пациентов с микроделецией – гипоплазия щитовидной железы и заболевания почек. Таким образом, данные реципрокные микроструктурные aberrации могут быть отнесены к хромосомным мутациям с частично перекрывающимися и уникальными фенотипами, а изменение дозы гена *CNTN6* может влиять на нормальное развитие не только нервной ткани, но и других органов и систем.

Использование высоко разрешающих геномных технологий позволяет в случае известных хромосомных синдромов, диагностируемых стандартным цитогенетическим методом и захватывающих протяженные хромосомные участки, идентифицировать более мелкие и даже моногенные клинически значимые варианты. Не исключено, что некоторые из них, при накоплении и сопоставлении клинических и генетических данных, могут сформировать самостоятельные синдромы. На сегодняшний день микроделецию и/или микродупликацию *CNTN6* еще не ассоциируют с самостоятельными синдромами, тем не менее данные CNVs попадают в область известного синдрома делеции 3p- (OMIM 613792). Наличие таких клинических признаков, как микроцефалия, задержка роста и психомоторного развития как при синдроме делеции 3p-, так и при изолированном изменении числа копий *CNTN6*,

позволяет предположить, что белок контактин 6 играет определенную роль в их формировании. Кроме того, в области синдрома 3p- обнаружены клинически значимые микроделеции и микродупликации и другого соседнего гена *CHLI* [9].

Всего на сегодняшний день в литературе и базе DECIPHER представлено 40 случаев изолированных микроделений и микродупликаций *CNTN6* среди пациентов с нейропсихическими и неврологическими нарушениями [1, 2, 4–8]. Однако общие объемы выборок, в которых были выявлены данные пациенты, указаны лишь в некоторых исследованиях [1, 2, 4, 5]. С учетом этого суммарная частота микроделений и микродупликаций *CNTN6* среди пациентов с недифференцированной УО может быть оценена как 1 : 265 (0.4%, 19 из 5049 человек). Эта оценка относит вариации в регионе 3p26.3 в разряд высокораспространенных при недифференцированных формах интеллектуальных нарушений. Так, например, частота наиболее распространенных микроделеционных синдромов 22q11.2 и 16p11.2 составляет 1 : 167 и 1 : 241, соответственно, среди пациентов с УО [10]. Учитывая функциональные особенности, пространственно-временную экспрессию гена, а также наличие изменений его копийности у пациентов с интеллектуальными расстройствами, очевидно, что изменение дозы белка *CNTN6* может являться значимым для патогенеза нейрокогнитивных расстройств.

Работа получила финансовую поддержку гранта РНФ № 14-15-00772.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kashevarova A.A., Nazarenko L.P., Schultz-Pedersen S. et al. Single gene microdeletions and microduplication of 3p26.3 in three unrelated families: *CNTN6* as a new candidate gene for intellectual disability // *Mol. Cytogenet.* 2014. V. 7. P. 97. doi 10.1186/s13039-014-0097-0
2. Hu J., Liao J., Sathanoori M. et al. *CNTN6* copy number variations in 14 patients: a possible candidate gene for neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders // *J. Neurodev. Disord.* 2015. V. 7. № 1. P. 26. doi 10.1186/s11689-015-9122-9
3. Online Mendelian Inheritance in Man (Database). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim> (accessed 2 December 2015).
4. Pinto D., Pagnamenta A.T., Klei L. et al. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders // *Nature.* 2010. V. 466. P. 368–372. doi 10.1038/nature09146
5. van Daalen E., Kemner C., Verbeek N.E. et al. Social Responsiveness Scale-aided analysis of the clinical impact of copy number variations in autism // *Neurogenetics.* 2011. V. 12. P. 315–323. doi 10.1007/s10048-011-0297-2
6. Wang K., Zhang H., Bloss C.S. et al. A genome-wide association study on common SNPs and rare CNVs in anorexia nervosa // *Mol. Psychiatry.* 2011. V. 9. P. 949–959. doi 10.1038/mp.2010.107
7. Zuko A., Kleijer K.T.E., Oguro-Ando A. et al. Contactins in the neurobiology of autism // *Eur. J. Pharmacol.* 2013. V. 719. P. 63–74. doi 10.1016/j.ejphar.2013.07.016
8. Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. Available at: <http://decipher.sanger.ac.uk> (accessed 2 December 2015).
9. Palumbo O., Fischetto R., Palumbo P. et al. De novo microduplication of *CHL1* in a patient with non-syndromic developmental phenotypes // *Mol. Cytogenet.* 2015. V. 8. P. 66. doi 10.1186/s13039-015-0170-3
10. Moreno-De-Luca A., Myers S.M., Challman T.D. et al. Developmental brain dysfunction: revival and expansion of old concepts based on new genetic evidence // *Lancet Neurol.* 2013. V. 12. № 4. P. 406–414. doi 10.1016/S1474-4422(13)70011-5

## Estimation of Association of *CNTN6* Copy Number Variation with Idiopathic Intellectual Disability

M. E. Lopatkina<sup>a</sup>, A. A. Kashevarova<sup>a, b</sup>, and I. N. Lebedev<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup>Research Institute of Medical Genetics, Tomsk, 634050 Russia

e-mail: maria.lopatkina@medgenetics.ru

<sup>b</sup>Department of Cytology and Genetics, National Research Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia

Analysis of the prevalence of copy number variations of the *CNTN6* gene, recently selected as a new candidate gene for intellectual disorders, was performed. Real-time PCR did not detect any change in the number of *CNTN6* gene copies in a group of 200 patients with impaired intellectual development. However, taking into account our data from the previous aCGH analysis and published data, the overall frequency of microdeletions and microduplications of *CNTN6* was estimated as 1 : 265 (0.4%). The common phenotypic features of 40 patients with microdeletions and microduplications of *CNTN6* appeared to be the autism spectrum disorders, developmental delay, intellectual disability, seizures, cognitive impairment, cardiological defects, and behavioral problems. English translation of the paper published in *Russian Journal of Genetics*, 2016, Vol. 52, No. 9, is available ONLINE by subscription from: <http://www.springer.com/>, <http://link.springer.com>.

**Keywords:** idiopathic intellectual disability, CNV, microdeletion/microduplication syndromes, *CNTN6*, real-time PCR, genotype–phenotype correlations.