

МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МАЛЫХ СВЕРХЧИСЛЕННЫХ МАРКЕРНЫХ ХРОМОСОМ 15 И 22 У АСИМПТОМАТИЧЕСКИХ НОСИТЕЛЕЙ

Д. А. Юрченко , Ж. Г. Маркова, М. Е. Миньженкова, Е. О. Воронцова, Н. В. Шилова

Медико-генетический научный центр имени Н. П. Бочкова, Москва, Россия

Малые сверхчисленные маркерные хромосомы (мСМХ) — структурно аномальные хромосомы, которые невозможно однозначно идентифицировать с использованием методов стандартной цитогенетики. Для более детального анализа морфологии таких хромосом и разработки стратегии медико-генетического консультирования пациентов-носителей мСМХ необходим комплексный подход, включающий молекулярно-цитогенетические методы. Общепринят тот факт, что формирование аномального фенотипа у пациентов с мСМХ в кариотипе связано с наличием материала эухроматиновых районов, вовлеченных в состав маркерной хромосомы. И, как следствие, обусловлено присутствием в геноме протяженных вариаций числа копий участков ДНК (copy number variations, CNV) в виде дупликации, трипликации и большей копийности, которые локализованы в прицентромерном районе соответствующей хромосомы. Прицентромерные CNV могут быть вовлечены в хромосомный дисбаланс и у асимптоматических носителей мСМХ, однако границы такого дисбаланса окончательно не установлены. Целью исследования было получить дополнительные сведения о геномной топографии участков ДНК, не чувствительных к увеличению копийности генов. Был проведен FISH-анализ с коммерческими и несерийными ДНК-зондами у 18 носителей мСМХ 15 и 22 без клинически значимых аномалий фенотипа. Установлено, что в 33% (6 из 18) случаев присутствуют участки прицентромерного эухроматина размером 1,2 м.п.н. и 714 т.п.н. соответственно. Мы предполагаем, что эти регионы не содержат потенциально чувствительных к дозе генов.

Ключевые слова: мСМХ, CNV, прицентромерный эухроматин, FISH, несерийный ДНК-зонд

Финансирование: исследование проведено в рамках темы НИР №122032300370-1 «Изучение структурно-функциональных особенностей и механизмов формирования хромосомных аномалий и геномного дисбаланса».

Вклад авторов: Д. А. Юрченко — дизайн исследования, разработка несерийных ДНК-зондов, проведение FISH-диагностики и интерпретация полученных данных, подготовка рукописи; Ж. Г. Маркова и М. Е. Миньженкова — проведение FISH-исследования с коммерческими ДНК-зондами; Е. О. Воронцова — отработка протокола FISH-исследования с несерийными ДНК-зондами; Н. В. Шилова — концепция и дизайн исследования, обсуждение результатов, научное редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ» (протокол № 4/2 от 19 апреля 2021 г.). Получено добровольное информированное согласие на участие пациентов в научном исследовании.

 **Для корреспонденции:** Дарья Александровна Юрченко
ул. Москворечье, д. 1, г. Москва, 115522, Россия; dashalbv@mail.ru

Статья получена: 23.10.2023 **Статья принята к печати:** 06.01.2024 **Опубликована онлайн:** 31.01.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.001

MOLECULAR CYTOGENETIC CHARACTERISTICS OF SMALL SUPERNUMERARY MARKER CHROMOSOMES 15 AND 22 IN ASYMPTOMATIC CARRIERS

Yurchenko DA , Markova ZhG, Minzhenkova ME, Vorontsova EO, Shilova NV

Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) are structurally abnormal chromosomes that cannot be identified unambiguously by standard cytogenetic methods. A comprehensive approach involving the use of molecular cytogenetic methods is required for the more thorough morphological assessment of such chromosomes, as well as for the development of strategy for genetic counseling of the patients being the sSMC carriers. It is widely accepted that the development of abnormal phenotype by the patients having sSMC in their karyotype is associated with the presence of euchromatic region material in the marker chromosome. Therefore, it results from the presence of relatively large DNA copy number variations (CNVs) in the form of duplication, triplication, and more increased copy numbers; which are localized in the pericentromeric region of the appropriate chromosome. Pericentromeric CNVs can be involved in the chromosome imbalance in asymptomatic carriers of sSMC as well, however, the boundaries of such imbalance have not been clearly identified. The study was aimed to acquire additional information about the genomic topology of the DNA regions insensitive to the genes copy number increase. FISH analysis with commercial and homemade DNA probes was performed in 18 carriers of sSMC 15 and 22 having no clinically significant phenotypic abnormalities. The molecular cytogenetic testing showed that pericentromeric euchromatic regions sized 1.2 Mb and 714 kb, respectively, were found in 33% of cases (6 out of 18). We assume that these regions comprise no potentially dosage-sensitive genes.

Keywords: sSMC, CNV, pericentromeric euchromatin, FISH, homemade DNA probe

Funding: this work was carried out at the expense of budgetary funds within the framework of research topic № 122032300370-1, "Study of Structural and Functional Features and Mechanisms of the Formation of Chromosomal Abnormalities and Genomic Imbalance."

Author contribution: Yurchenko DA — study design, development of homemade DNA probes, FISH diagnosis and data interpretation, manuscript writing; Markova ZhG and Minzhenkova ME — FISH analysis with commercial DNA probes; Vorontsova EO — implementation of the protocol of FISH with homemade DNA probes; Shilova NV — study concept and design, discussion, scientific editing of manuscript.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Research Centre for Medical Genetics (protocol № 4/2 dated 19 April 2021). The patients submitted the informed consent to participation in scientific research.

 **Correspondence should be addressed:** Darya A. Yurchenko
Moskvorechye, 1, Moscow, 115522, Russia; dashalbv@mail.ru

Received: 23.10.2023 **Accepted:** 06.01.2024 **Published online:** 31.01.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.001

Малые сверхчисленные маркерные хромосомы (мСМХ) представляют собой гетерогенную группу структурно аномальных добавочных хромосом, которые не могут быть однозначно идентифицированы при стандартном цитогенетическом исследовании в силу их малых размеров и особенностей генного состава, а именно присутствия субмикроскопических вариаций числа копий участков ДНК (copy number variations, CNV) [1]. Среди новорожденных доля носителей мСМХ в популяции составляет 0,044% и 70% из них не имеют видимых клинических проявлений [2, 3]. Показано, что мСМХ могут быть производными любой из 24 хромосом человека и иметь разнообразные морфологические формы, такие как инвертированные дупликации (inv dup), кольцевые (r) и минутные (min) хромосомы [4, 5]. Среди людей с кариотипом 47,XN,+mar мСМХ чаще всего представляют собой производные хромосомы 15 (примерно 30%) и хромосомы 22 (примерно 20%) [1]. Клинические проявления, связанные с наличием мСМХ в кариотипе, могут проявляться в широком спектре — от фенотипической нормы до значительных отклонений в физическом и психомоторном развитии — и зависят от хромосом, участвующих в их образовании, наличия эухроматиновых районов, генного состава, уровня мозаицизма и однородительской дисомии.

Фенотипически нормальные носители малых сверхчисленных маркерных хромосом могут иметь CNV в виде дупликации/трипликации, локализованных в прицентромерных эухроматиновых районах [6]. Это позволяет предположить, что такие CNV не содержат дозозависимых генов, поэтому увеличение их копийности не приведет к серьезным изменениям фенотипа. За последние десятилетия накапливается все больше фактов о том, что присутствие в геноме CNV, вовлекающих довольно протяженные, размером до нескольких миллионов пар нуклеотидов (м.п.н.), эухроматиновые районы, не вызывает фенотипических отклонений у их носителей [7].

Таким образом, эухроматиновые мСМХ в кариотипе асимптоматических носителей могут представлять собой идеальную модель для анализа протяженности областей генома человека, не чувствительных к изменению числа копий генов, расположенных в прицентромерных районах. Это позволит более точно определить границы, где заканчиваются дозочувствительные регионы и начинаются участки генома, изменение копийности которых может привести к аномалиям фенотипа и задержке психомоторного развития [8]. Подробное исследование каждого случая мСМХ и накопление дополнительных данных способствуют расширению наших знаний о механизмах образования и патогенетической значимости CNV, связанных с наличием в геноме этих добавочных маркерных хромосом. Целью исследования было получить дополнительные сведения о геномной топографии участков ДНК, не чувствительных к увеличению копийности генов.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования были 18 образцов периферической крови асимптоматических носителей мСМХ15 ($n = 9$: трое мужчин, шесть женщин) и мСМХ22 ($n = 9$: пятеро мужчин, четыре женщины). Критерии включения: показанием к кариотипированию было участие всех пациентов в программе вспомогательных репродуктивных технологий.

Цитогенетическое исследование GTG-окрашенных хромосом выполняли по стандартному протоколу [9].

Идентификацию маркерных хромосом проводили методом FISH с коммерческими ДНК-зондами на центромерные (прицентромерные) районы хромосомы 15 (SE 15, Kreatech; Нидерланды) и хромосомы 22 (CCP22-Pericentromeric, CytoTest Inc.; США), а также районы 15q11.2 (LSI SNRPN, Kreatech; Нидерланды) и 22q11.2 (LSI TBX1, Kreatech; Нидерланды) для исключения присутствия клинически значимых эухроматиновых районов в составе маркерной хромосомы. FISH-анализ с коммерческими ДНК-зондами проводили по протоколам фирм-производителей (Kreatech, CytoTest Inc.; США). Денатурацию и гибридизацию проводили с использованием гибридизационной системы ThermoBrite (StatSpin; США). Анализ проводили с использованием эпифлуоресцентного микроскопа Axiolmager M.1 (Carl Zeiss; Германия) и компьютерной программы обработки цифровых изображений Isis (MetaSystems; Германия)

Основополагающим этапом исследования были разработка собственных (несерийных) ДНК-зондов на прицентромерный эухроматин хромосом 15 и 22 и проведение FISH-анализа для выявления CNV, потенциально не чувствительных к увеличению копийности участков ДНК. Подбор праймеров осуществляли с помощью программы Primer-BLAST NCBI [10] и базы данных UCSC Genome Browser [11]. Для проверки специфичности выбранных праймеров использовали программу OligoAnalyzer™ Tool [12]. Праймеры были синтезированы в ЗАО «Евроген» (Россия). Нуклеотидные последовательности подобранных ДНК-праймеров представлены в табл. 1.

Последовательности подобранных ДНК-праймеров были использованы для проведения LR-ПЦР с использованием набора BioMaster LR HS-PCR (2x) («БиолабМикс»; Россия) на амплификаторе GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems; США) в соответствии с протоколом производителя [13]. Полученные ампликоны очищали на колонках с использованием набора diaGene для очистки ДНК из реакционных смесей («Диаэм»; Россия) согласно инструкции производителя, с последующим объединением в одну пробирку очищенных продуктов ПЦР для получения ДНК-зонда размером 10–30 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н). С целью введения флуоресцентной метки в ДНК-зонд использовали метод nick-трансляции [14–16].

Для проведения FISH с несерийными ДНК-зондами использовали отдельную денатурацию ДНК на хромосомном препарате и ДНК-зонда [14, 15, 17].

Для контрокрашивания хромосом использовали DAPI I (Abbott Molecular; США) в растворе Vectashield (Vector Labs; США) в соотношении 1:20. Для анализа изображений метафазных хромосом использовали программу обработки цифровых изображений Isis (MetaSystems; Германия), установленную в комплексе с эпифлуоресцентным микроскопом Axiolmager M.1 (Carl Zeiss; Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При стандартном цитогенетическом исследовании у всех пациентов ($n = 18$) выявлен кариотип с дополнительной маркерной хромосомой — 47,XN,+mar. Во всех случаях отмечали мозаицизм с высоким уровнем аномального клона (более 40%). FISH с коммерческими ДНК-зондами на центромерные районы акроцентрических хромосом позволил в девяти случаях идентифицировать мСМХ как производную хромосомы 15 и в девяти случаях —

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности использованных в работе праймеров

Хромосомный регион	Локализация ДНК-зонда относительно центромеры	Последовательности ДНК-праймеров	Длина ПЦР продукта (п.н.)
15q11.2	Проксимальный	F 5'-TACATCTTACACCCACCCACCCAAACC-3' R 5'-TTTGCGGAAGGCATTAGTCCCCTTTGTT-3'	9882
		F 5'-TTAAAACGTGGGCTCTTCATTATCGCCT-3' R 5'-TGGACACCAGACAAAACAAGGAGTCAA-3'	9323
	Дистальный	F 5'-TGACTCCTTTGTTTGTCTGGTGTCCAA-3' R 5'-CTTATCCTTCCACACTCGCTGAGAACAG-3'	9140
		F 5'-CATGGTAATGTTGCGGTGTGTCTTTGTT-3' R 5'-CTATCTTTAGGCTGCTTGTCTGGTGCTT-3'	9676
22q11.2	Проксимальный	F 5'-CCCATATCCTTTCCAAACTCAACACGA-3' R 5'-TTTTCCCTCTGAACCTGGTTTCTGCACT-3'	9441
		F 5'-AGTGCAGAAACCAGTTCAGAGGGAAAAA-3' R 5'-GAACCATCCACGAGGGAGAGTAGTTTTG-3'	9842
		F 5'-TCGCCATGTACTTCACTTTGTTCTGGTT-3' R 5'-GACTGGTCAAGGATGAGGATTTGTCAGG-3'	9600
	Медиальный	F 5'-TCTTCCTTGCTGGAGGTGGGATCTAGT-3' R 5'-GAGGAGGGAGGGTGTGACAAAAGTAA-3'	9531
		F 5'-CAATGTCTAGGGGCAACAGAGGGCAGAT-3' R 5'-AGGGCAGGAAATGTGTTCTGCTCGCTA-3'	9316
	Дистальный	F 5'-AGAGAGAGGAAGGGGTCCGGCTCAAAC-3' R 5'-TGTGGGGTGTGGTGCATGGAGTATGG-3'	9718
		F 5'-CAATCCATGCCACAAACATACCAGCCAC-3' R 5'-TATCACTGCCACCCCATCCCAATTCTG-3'	9862
		F 5'-CAGAAATGGGGATGGGGTGGCAGTGATA-3' R 5'-CAAGAGGCTGGGGCTTCTCTGGTCTTAG-3'	9761

как производную хромосомы 22 (рис. 1А). Кроме того, результаты молекулярно-цитогенетического анализа подтвердили отсутствие клинически значимых CNV на малых сверхчисленных маркерных хромосомах во всех наблюдаемых случаях (рис. 1Б).

FISH-анализ для выявления CNV в проксимальных эухроматиновых районах был проведен на хромосомных препаратах из культивированных лимфоцитов всех 18-ти асимптоматических носителей мСМХ — производных хромосом 15 и 22. Для этой цели были разработаны несерийные локус-специфичные ДНК-зонды (hm). В выборе локализации этих ДНК-зондов мы руководствовались сведениями об областях прицентромерного эухроматина на хромосомах 15 и 22, не чувствительных к дозе генов. Для хромосомы 15 она составляет 3 м.п.н. а для

хромосомы 22 — около 100 т.п.н. [7, 18] Таким образом, для хромосомы 15 были разработаны два hm размером порядка 10–30 т. п. н. Ближний по отношению к центромере проксимальный (hm-15-prox) ДНК-зонд расположен на расстоянии 1,2 м.п.н. от прицентромерного гетерохроматина, в то время как дистальный ДНК-зонд (hm-15-dist) локализован на расстоянии 2,2 м.п.н. от прицентромерного гетерохроматина хромосомы 15 (рис. 2А). Интервал между двумя ДНК-зондами составил в 1 м.п.н. Для изучения района прицентромерного эухроматина хромосомы 22 были разработаны три несерийных локус-специфичных ДНК-зонда (hm) длиной порядка 30 т.п.н. Ближний по отношению к центромере проксимальный ДНК-зонд (hm-22-proximal) локализован на расстоянии 478 т.п.н. от прицентромерного гетерохроматина,

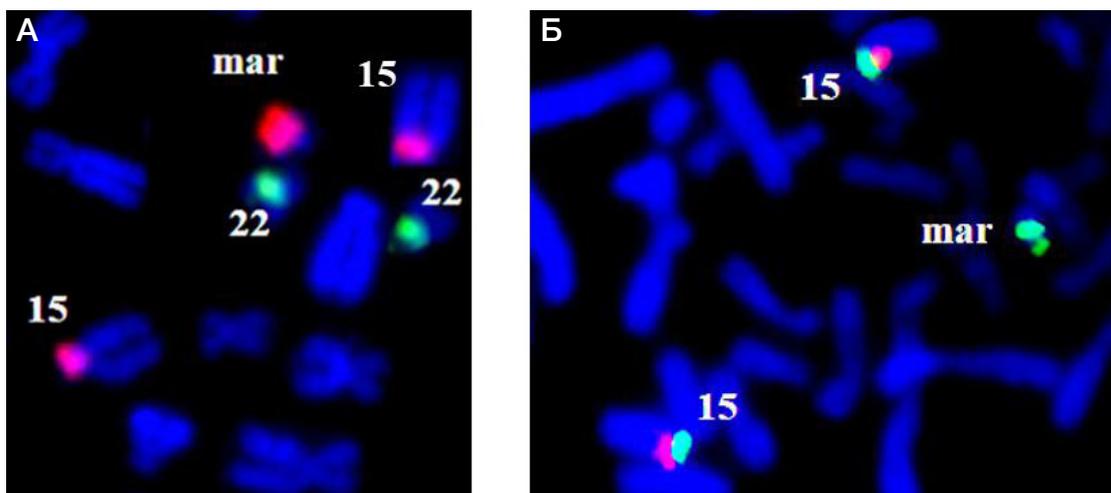


Рис. 1. Результат FISH с коммерческими ДНК-зондами на хромосому 15. А. Маркерная хромосома — производная хромосомы 15 в виде инвертированной дупликации (ish dic(15;15)(D15Z1+,D15Z1+)). Центромера хромосомы 15 (D15Z1) — красный гибридационный сигнал, прицентромерная область хромосомы 22 (CCP22-Pericentromeric) — зеленый гибридационный сигнал (контроль). Б. Маркерная хромосома — производная хромосомы 15 не содержит эухроматиновый район 15q11.2-q13. Центромера хромосомы 15 (D15Z1) — зеленый гибридационный сигнал, LSI SNRPN — красный гибридационный сигнал

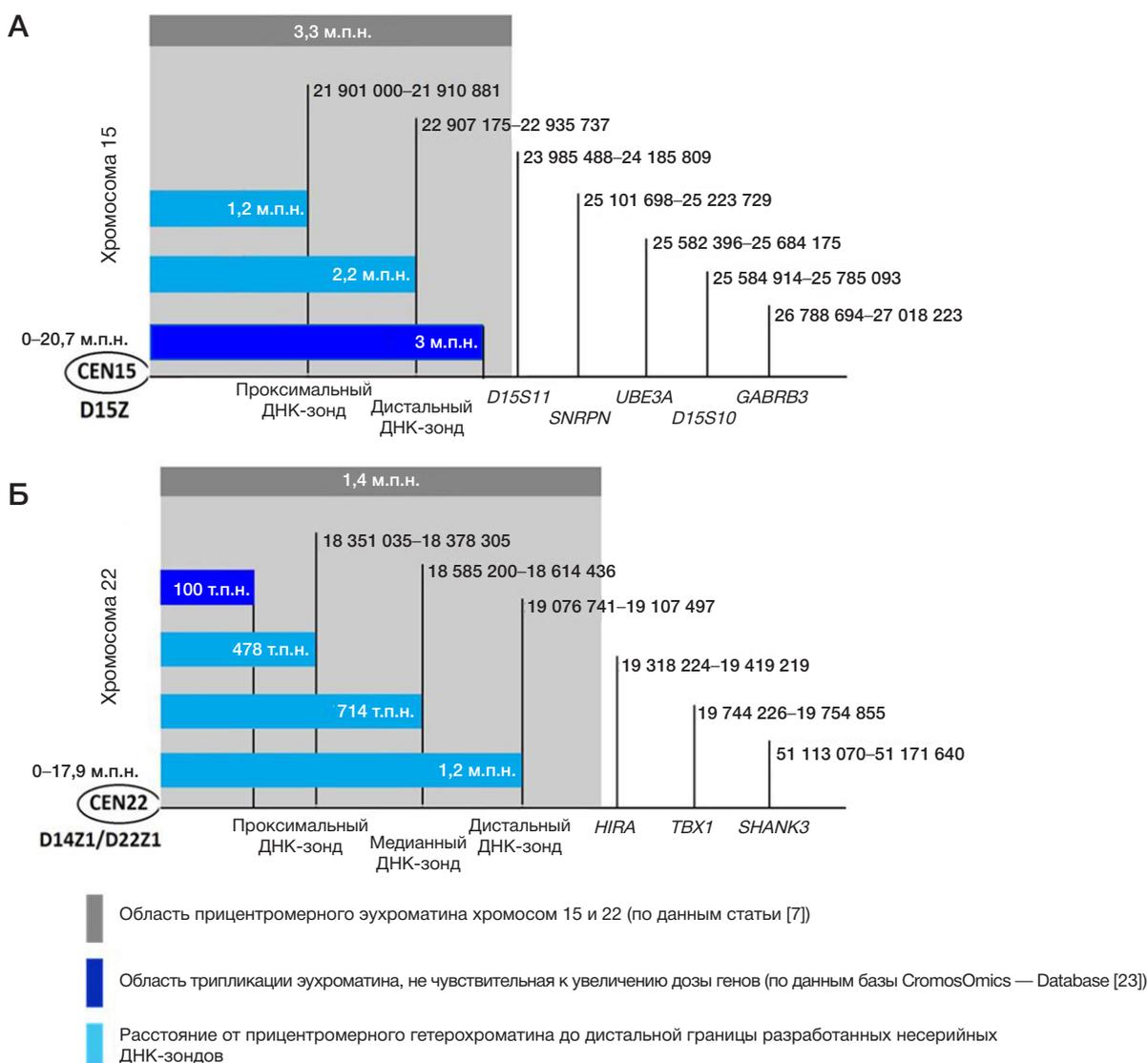


Рис. 2. А. Размер и локализация несерийных (homemade) ДНК-зондов в области прицентромерного эухроматинового района хромосомы 15. **Б.** Размер и локализация несерийных (homemade) ДНК-зондов в области прицентромерного эухроматинового района хромосомы 22

медианный ДНК-зонд (hm-22-median) — на расстоянии 714 т.п.н. от прицентромерного гетерохроматина и дистальный (hm-22-distal) ДНК-зонд, дальний по отношению к центромере, — на расстоянии 1,2 м.п.н. от прицентромерного гетерохроматина хромосомы 22 (рис. 2Б).

Результат FISH-исследования прицентромерных эухроматиновых районов мСМХ, производных хромосом 15 и 22, с разработанными несерийными ДНК-зондами представлен в табл. 2, во всех случаях было проанализировано 30 метафазных пластинок.

Как видно из табл. 2, у четырех пациентов с мСМХ15 и восьми пациентов с мСМХ22 прицентромерный эухроматин обнаружен не был, т. е. маркерные хромосомы содержали только гетерохроматиновые районы.

У пяти пациентов (№ 3, 6–9, табл. 2) на мСМХ, производной хромосомы 15, выявлен прицентромерный эухроматин, однако детектировался только гибридационный сигнал от проксимального ДНК-зонда, т. е. размер эухроматинового района не превышал 1,2 м.п.н. от прицентромерного гетерохроматина хромосомы 15 (рис. 3).

В одном случае (11 из табл. 2) на мСМХ 22 был выявлен прицентромерный эухроматин при гибридизации с двумя несерийными ДНК-зондами, а именно с проксимальным

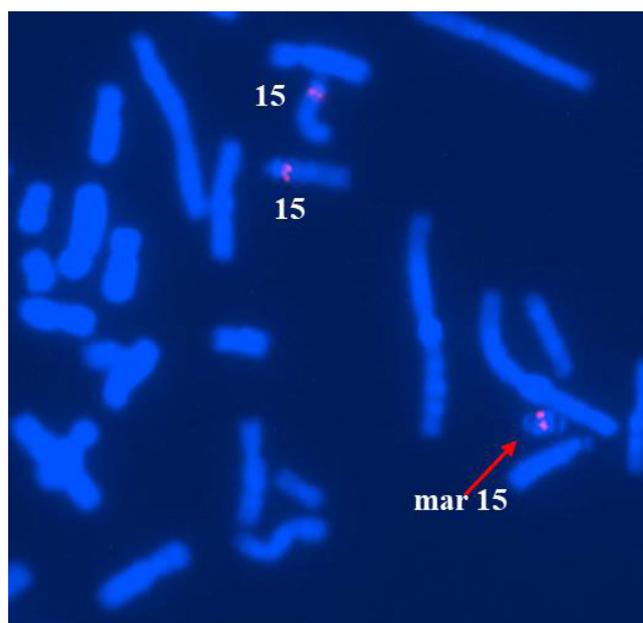


Рис. 3. Результат гибридизации с несерийным ДНК-зондом на прицентромерный эухроматин хромосомы 15 — hm-15-prox

Таблица 2. Молекулярно-цитогенетические характеристики мСМХ

№ п/п	Пол	FISH с коммерческими ДНК-зондами	FISH с несерийными ДНК-зондами (hm)		
			Проксимальный	Медианный	Дистальный
1	М	ish dic(15;15)(D15Z1+,SNRPN-;SNRPN-,D15Z1+)	hm15-	не предусмотрен для мСМХ 15	–
2	Ж	ish dic(15; 15)(D15Z1+,SNRPN-;SNRPN-,D15Z1+)	hm15-		–
3	Ж	ish dic(15; 15)(D15Z1+,D15S10-;D15S10-,D15Z1+)	hm15+		hm15-
4	Ж	ish dic(15; 15)(D15Z1+,SNRPN-;SNRPN-,D15Z1+)	hm15-		–
5	Ж	ish dic(15; 15)(D15Z1+,D15S10-;D15S10-,D15Z1+)	hm15-		–
6	Ж	ish dic(15; 15)(D15Z1+,D15S10-;D15S10-,D15Z1+)	hm15+		hm15-
7	М	ish dic(15; 15)(D15Z1+,D15S10-;D15S10-,D15Z1+)	hm15+		hm15-
8	М	ish dic(15; 15)(D15Z1+,D15S10-;D15S10-,D15Z1+)	hm15+		hm15-
9	Ж	ish dic(15; 15)(D15Z1+,D15S10-;D15S10-,D15Z1+)	hm15+		hm15-
10	Ж	ish dic(22; 22)(D14Z1/D22Z1+,TBX1-;TBX1-;D14Z1/D22Z1+)	hm22-	–	–
11	М	ish dic(22; 22)(D14Z1/D22Z1+,TBX1-;TBX1-;D14Z1/D22Z1+)	hm22++	hm22+	hm22-
12	М	ish r(22)(p13q11.1)(D14Z1/D22Z1+,TBX1-)	hm22-	–	–
13	Ж	ish dic(22; 22)(D14Z1/D22Z1+,TBX1-;TBX1-;D14Z1/D22Z1+)	hm22-	–	–
14	Ж	ish dic(22; 22)(D14Z1/D22Z1+,TBX1-;TBX1-;D14Z1/D22Z1+)	hm22-	–	–
15	М	ish i(22)(p10)(D14Z1/D22Z1+,acro-p++)	hm22-	–	–
16	Ж	ish dic(22; 22)(D14Z1/D22Z1+,TBX1-;TBX1-;D14Z1/D22Z1+)	hm22-	–	–
17	М	ish dic(22; 22)(D14Z1/D22Z1+,TBX1-;TBX1-;D14Z1/D22Z1+)	hm22-	–	–
18	М	ish dic(22; 22)(D14Z1/D22Z1+,TBX1-;TBX1-;D14Z1/D22Z1+)	hm22-	–	–

Примечание: hm (homemade) — несерийный ДНК-зонд.

и медианным, соответственно, размер вовлеченного в хромосомную перестройку дисбаланса составил суммарно 714 т.п.н. (рис. 4).

Таким образом, у носителей мСМХ, производных хромосом 15 и 22, без видимых клинических проявлений в 67% случаев (12/18) маркерные хромосомы содержат только гетерохроматиновые районы, а в 33% случаев определены участки эухроматина в прицентромерных районах длинных плеч хромосом 15 и 22, размером 1,2 м.п.н. (chr15 [hg19]: 20 700 000–21 910 881) и 714 т.п.н. (chr22 [hg19]: 17 900 000–18 614 436) соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Малые сверхчисленные маркерные хромосомы представляют собой редкую хромосомную аномалию, поскольку они одновременно являются числовой и структурной перестройкой [18]. Клинические проявления при мСМХ варьируют, но для некоторых описаны синдромные формы — например, синдром кошачьего глаза (MIM#115470), синдром Эмануэль (MIM#609029), синдром Паллистера–Киллиана (MIM#601803) и синдром изохромосомы 18p (MIM#614290) (OMIM — Online Mendelian Inheritance in Man; [19]).

Чаще всего особенности клинической картины в значительной степени объясняются вовлечением эухроматина в хромосомный дисбаланс, а именно с наличием (или отсутствием) чувствительных к дозе генов в прицентромерных эухроматиновых областях. Тем не менее, конкретные гены до сих пор не идентифицированы [7].

С развитием методов молекулярно-цитогенетического исследования появилась возможность определить хромосомное происхождение мСМХ и классифицировать их на основе наличия или отсутствия эухроматиновых районов, что облегчает анализ связи мСМХ с клиническими аномалиями фенотипа [6]. Лабораторные подходы к диагностике и изучению мСМХ широко представлены в

литературе [20–22]. Наиболее часто для идентификации структуры и определения генного состава используют метод флуоресцентной гибридизации *in situ* и хромосомный микроматричный анализ. Из недостатков последнего — трудности в интерпретации точного уровня мозаицизма, что является важным моментом, учитывая высокую частоту мозаичных форм мСМХ [1]. Использование FISH-метода более предпочтительно, но коммерческие ДНК-зонды не всегда покрывают интересующие хромосомные регионы. Таким образом, все большее значение приобретают несерийные ДНК-зонды, разработанные для решения конкретной задачи. В одном из исследований обсуждается возможность применения разработанного авторами набора PeCR-FISH для определения прицентромерного эухроматина в составе мСМХ, и было показано, что локус-специфичные несерийные ДНК-зонды на основе ВАС-клонов могут быть использованы для определения точного размера мСМХ и вовлеченности прицентромерного эухроматина [7]. В представленном исследовании были разработаны собственные несерийные олигонуклеотидные ДНК-зонды на прицентромерный эухроматин хромосом 15 и 22. Результаты FISH-анализа демонстрируют высокое качество гибридизационных сигналов и, как следствие, возможность использования такого подхода для изучения прицентромерного эухроматина у носителей мСМХ.

Полученные нами данные о размере прицентромерного эухроматина у асимптоматических носителей мСМХ 15 и 22 согласуются с известными литературными данными и дополняют их. На сегодняшний день опубликовано довольно много случаев присутствия в кариотипе мСМХ15 у пациентов без видимых аномалий фенотипа, а именно 418 случая, согласно базе данных по маркерным хромосомам (ChromosOmics — Database [23]), и большинство из них имеют в составе только гетерохроматин. Описанные случаи мСМХ с вовлечением эухроматина, не считая пренатальных, немногочисленны

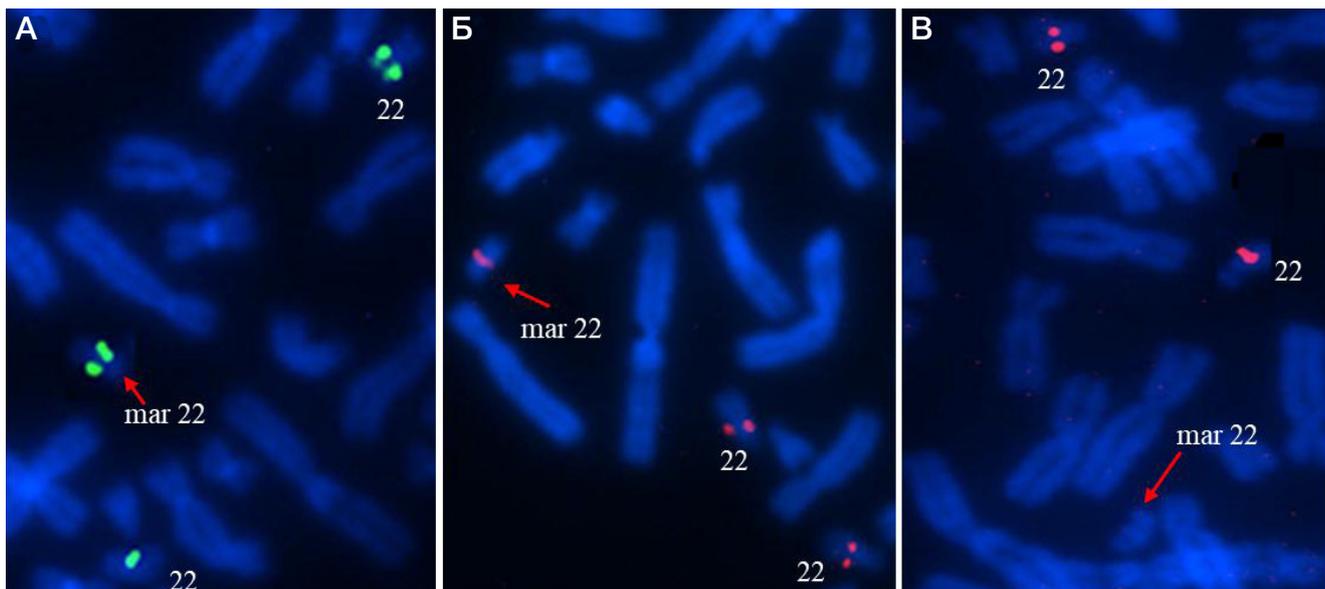


Рис. 4. Результат гибридизации с несерийными ДНК-зондами на прицентромерный эухроматин хромосомы 22. **А.** Проксимальный ДНК-зонд. **Б.** Медианный ДНК-зонд. **В.** Дистальный ДНК-зонд

[18]. Так, например, установлено, что у асимптоматической носительницы мСМХ15 с бесплодием в анамнезе протяженность не чувствительного к дозе генов региона составляет 3,8 м.п.н. (15-O-q11.2/2-6 в вышеуказанной базе данных). Стоит отметить, что у пациентки отмечали высокоуровневый мозаицизм (74% по аномальному клону). Регион проксимального прицентромерного эухроматина, выявленный у пяти асимптоматических носителей мСМХ15 в нашей выборке, оказался менее протяженным (1,2 м.п.н.), чем описанный ранее «некритический» регион, что позволяет существенно дополнить базу данных не чувствительного к дозе генов региона маркерной хромосомы 15.

Количество публикаций по исследованию мСМХ22 у асимптоматических носителей значительно меньше, что коррелирует с частотой встречаемости этой хромосомной аномалии [24]. На сегодняшний день опубликованы данные о 156 таких пациентах (согласно данным сайта), у большинства из которых в состав мСМХ входит только гетерохроматин [23]. Показано, что размер не чувствительного к дозе генов прицентромерного эухроматина хромосомы 22 при трипликации составляет около 100 т.п.н. Однако важно отметить, что описанный случай единичный и представлен детекцией трипликации у плода, т. е. выявлен при пренатальном исследовании, при этом после рождения отмечен нормальный фенотип [7, 18]. В выявленном нами случае размер прицентромерного эухроматина хромосомы

22 у асимптоматического носителя мСМХ22 составил 714 т.п.н., что значительно превышает по размеру описанные данные относительно «некритического» проксимального региона q-плеча хромосомы 22. Полученные новые данные о размере не чувствительного к дозе генов проксимального эухроматина хромосомы 22 могут иметь важное значение для пренатальной диагностики случаев выявления геномного дисбаланса хромосомы 22 (дупликации, трипликации) такого размера при проведении высокопроизводительного секвенирования или хромосомного микроматричного анализа.

ВЫВОДЫ

Проведенные нами исследования указывают на то, что, по-видимому, в прицентромерном эухроматине длинного плеча хромосомы 15 (chr15 (hg19): 20 700 000–21 910 881) и длинного плеча хромосомы 22 (chr22 (hg19): 17 900 000–18 614 436) не присутствуют гены, потенциально чувствительные к увеличению копийности участков ДНК. Геномный дисбаланс, представленный дупликацией/трипликацией этих районов, не приводит к нарушению интеллектуального развития и аномалиям развития. Разработанный подход с использованием несерийных ДНК-зондов демонстрирует высокую чувствительность и специфичность FISH-метода для анализа прицентромерного эухроматина хромосом 15 и 22.

Литература

- Liehr T. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans. *Cytogenet Genome Res.* 2004; 107 (1–2): 55–67. PMID: 15305057.
- Liehr T, Weise A. Frequency of small supernumerary marker chromosomes in prenatal, newborn, developmentally retarded and infertility diagnostics. *Int J Mol Med.* 2007; 19 (5): 719–31. PMID: 17390076.
- Liehr T. Small Supernumerary Marker Chromosomes (sSMC). A Guide for Human Geneticists and Clinicians; With contributions by UNIQUE (The Rare Chromosome Disorder Support Group). Heidelberg: Springer, 2012; p. 220.
- Dalprà L, Giardino D, Finelli P, Corti C, Valtorta C, Ilardi P, et al. Cytogenetic and molecular evaluation of 241 small supernumerary marker chromosomes: cooperative study of 19 Italian laboratories. *Genet Med.* 2005; 7 (9): 620–5. PMID: 16301863.
- Liehr T. Small supernumerary marker chromosomes (sSMCs): a spotlight on some nomenclature problems. *J Histochem Cytochem.* 2009; 57 (11): 991–3. PMID: 19654102.
- Hamid A, Weise A, Voigt M, Bucksch M, Kosyakova N, Liehr T, et al. Clinical impact of proximal autosomal imbalances. *Balkan J Med Genet.* 2012; 15 (2): 15–22. PMID: 24052727.
- Al-Rikabi ABH, Pekova S, Fan X, Jančůšková T, Liehr T. Small

- Supernumerary Marker Chromosome May Provide Information on Dosage-insensitive Pericentric Regions in Human. *Curr Genomics*. 2018; 19 (3): 192–9. PMID: 29606906.
8. Liehr T, Stumm M, Wegner RD, Bhatt S, Hickmann P, Patsalis PC, et al. 10p11.2 to 10q11.2 is a yet unreported region leading to unbalanced chromosomal abnormalities without phenotypic consequences. *Cytogenet Genome Res*. 2009; 124 (1): 102–5. PMID: 19372675.
 9. Гинтер Е. К. Цитогенетические методы диагностики хромосомных болезней. Методическое пособие для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009; 81 с.
 10. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012; 13: 134. PMID: 22708584.
 11. UCSC Genome Browser. Available from: <http://genome.ucsc.edu>.
 12. OligoAnalyzer™ Tool. Available from: <https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer/>.
 13. ООО «БиолабМикс»; Россия. Доступно по ссылке: <http://www.bioblabmix.ru>.
 14. Minzhenkova ME, Yurchenko DA, Semenova NA, Markova ZG, Tarlycheva AA, Shilova NV. Characterization of a complex chromosomal rearrangement in a girl with PURA syndrome. *Genetics and Molecular Research*. 2022; 21 (4): GMR19065.
 15. Юрченко Д. А., Миньженкова М. Е., Твеленева А. А., Воронцова Е. О., Харченко Т. В., Шилова Н. В. Цитогеномный подход в диагностике инвертированных дупликаций со смежными терминальными делециями. *Медицинская генетика*. 2023; 22 (5): 54–62.
 16. Liehr T. *Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) — Application Guide*. Berlin: Springer, 2017; p. 606.
 17. Юрченко Д. А. Молекулярно-цитогенетические характеристики и особенности диагностики вариаций числа копий участков ДНК (CNV) [диссертация]. М., 2022.
 18. Liehr T, Williams HE, Ziegler M, Kankel S, Padutsch N, Al-Rikabi A. Small supernumerary marker chromosomes derived from chromosome 14 and/or 22. *Mol Cytogenet*. 2021; 14 (1): 13. PMID: 33632263.
 19. OMIM — Online Mendelian Inheritance in Man. Available from: <https://www.omim.org/>.
 20. Hills LV, Nouri S, Slater HR. Pericentromeric euchromatin is conserved in minute human supernumerary chromosomes: a study using cross-species colour segmenting (RxFISH). *Chromosome Res*. 2003; 11 (4): 359–63. DOI: 10.1023/a:1024096024847.
 21. Liehr T, Weise A, Hamid AB, Fan X, Klein E, Aust N, et al. Multicolor FISH methods in current clinical diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*. 2013; 13 (3): 251–5.
 22. Hamid AB, Kreskowski K, Weise A, Kosyakova N, Mrasek K, Voigt M, et al. How to narrow down chromosomal breakpoints in small and large derivative chromosomes — a new probe set. *J. Appl. Genet*. 2012; 53 (3): 259–9.
 23. ChromosOmics — Database. Available from: <http://cs-tl.de/DB/CA/sSMC/15/a-Start.html>.
 24. Tug E, Karaoguz MY, Ergun MA. Prenatal and Postnatal Clinical Spectrum of a Mosaic Small Supernumerary Marker Chromosome 22. *International Journal of Pediatrics and Child Health*. 2019; 7: 36–9.

References

1. Liehr T. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans. *Cytogenet Genome Res*. 2004; 107 (1–2): 55–67. PMID: 15305057.
2. Liehr T, Weise A. Frequency of small supernumerary marker chromosomes in prenatal, newborn, developmentally retarded and infertility diagnostics. *Int J Mol Med*. 2007; 19 (5): 719–31. PMID: 17390076.
3. Liehr T. *Small Supernumerary Marker Chromosomes (sSMC). A Guide for Human Geneticists and Clinicians; With contributions by UNIQUE (The Rare Chromosome Disorder Support Group)*. Heidelberg: Springer, 2012; p. 220.
4. Dalprà L, Giardino D, Finelli P, Corti C, Valtorta C, Ilardi P, et al. Cytogenetic and molecular evaluation of 241 small supernumerary marker chromosomes: cooperative study of 19 Italian laboratories. *Genet Med*. 2005; 7 (9): 620–5. PMID: 16301863.
5. Liehr T. Small supernumerary marker chromosomes (sSMCs): a spotlight on some nomenclature problems. *J Histochem Cytochem*. 2009; 57 (11): 991–3. PMID: 19654102.
6. Hamid A, Weise A, Voigt M, Bucksch M, Kosyakova N, Liehr T, et al. Clinical impact of proximal autosomal imbalances. *Balkan J Med Genet*. 2012; 15 (2): 15–22. PMID: 24052727.
7. Al-Rikabi ABH, Pekova S, Fan X, Jančuškova T, Liehr T. Small Supernumerary Marker Chromosome May Provide Information on Dosage-insensitive Pericentric Regions in Human. *Curr Genomics*. 2018; 19 (3): 192–9. PMID: 29606906.
8. Liehr T, Stumm M, Wegner RD, Bhatt S, Hickmann P, Patsalis PC, et al. 10p11.2 to 10q11.2 is a yet unreported region leading to unbalanced chromosomal abnormalities without phenotypic consequences. *Cytogenet Genome Res*. 2009; 124 (1): 102–5. PMID: 19372675.
9. Ginter EK. *Tsitogeneticheskie metody diagnostiki khromosomnykh bolezney. Metodicheskoe posobie dlya vrachey*. М.: GEOTAR-Media, 2009; 81 p. Russian.
10. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012; 13: 134. PMID: 22708584.
11. UCSC Genome Browser. Available from: <http://genome.ucsc.edu>.
12. OligoAnalyzer™ Tool. Available from: <https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer/>.
13. ООО «БиолабМикс»; Russia. Available from: <http://www.bioblabmix.ru>. Russian.
14. Minzhenkova ME, Yurchenko DA, Semenova NA, Markova ZG, Tarlycheva AA, Shilova NV. Characterization of a complex chromosomal rearrangement in a girl with PURA syndrome. *Genetics and Molecular Research*. 2022; 21 (4): GMR19065.
15. Yurchenko DA, Minzhenkova ME, Tveleneva AA, Vorontsova EO, Kharchenko TV, Shilova NV. Cytogenomic approach in the diagnostics of inverted duplication/deletion rearrangements. *Medical Genetics*. 2023; 22 (5): 54–62. Russian.
16. Liehr T. *Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) — Application Guide*. Berlin: Springer, 2017; p. 606.
17. Yurchenko DA. *Молекулярно-цитогенетические характеристики и особенности диагностики вариаций числа копий участков ДНК (CNV) [диссертация]*. М., 2022. Russian.
18. Liehr T, Williams HE, Ziegler M, Kankel S, Padutsch N, Al-Rikabi A. Small supernumerary marker chromosomes derived from chromosome 14 and/or 22. *Mol Cytogenet*. 2021; 14 (1): 13. PMID: 33632263.
19. OMIM — Online Mendelian Inheritance in Man. Available from: <https://www.omim.org/>.
20. Hills LV, Nouri S, Slater HR. Pericentromeric euchromatin is conserved in minute human supernumerary chromosomes: a study using cross-species colour segmenting (RxFISH). *Chromosome Res*. 2003; 11 (4): 359–63. DOI: 10.1023/a:1024096024847.
21. Liehr T, Weise A, Hamid AB, Fan X, Klein E, Aust N, et al. Multicolor FISH methods in current clinical diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*. 2013; 13 (3): 251–5.
22. Hamid AB, Kreskowski K, Weise A, Kosyakova N, Mrasek K, Voigt M, et al. How to narrow down chromosomal breakpoints in small and large derivative chromosomes — a new probe set. *J. Appl. Genet*. 2012; 53 (3): 259–9.
23. ChromosOmics — Database. Available from: <http://cs-tl.de/DB/CA/sSMC/15/a-Start.html>.
24. Tug E, Karaoguz MY, Ergun MA. Prenatal and Postnatal Clinical Spectrum of a Mosaic Small Supernumerary Marker Chromosome 22. *International Journal of Pediatrics and Child Health*. 2019; 7: 36–9.