

УДК 575.1

СТРУКТУРНЫЕ ВАРИАЦИИ ГЕНОМА У УМСТВЕННО ОТСТАЛЫХ БОЛЬНЫХ

Д. К. Омарова¹, Ф. Р. Гургенова¹, Т. Н. Максимова²,
К. Б. Булаева¹, О. А. Булаев¹

¹ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

² Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова

Обнаружены статистически значимые ($p < 0.05$) пики сцеплений (LOD) в 10 геномных регионах: 1q41, 2p25.3-p24.2, 3p13-p12.1, 4q13.3, 10p11, 11q23, 12q24.22-q24.31, 17q24.2-q25.1, 21q22.13 и 22q12.3-q13.1. Анализы сцеплений и структурных геномных вариаций в удаленных высокогорных генетических изолятах с агрегацией умственной отсталости показали, что даже в высокоизолированной популяции с большой частотой родственных браков, геномные механизмы патогенеза умственной отсталости являются сложными и носят олиго- или полигенный характер.

The number of statistically significant ($p \leq 0.05$) suggestive linkage peaks with $1.3 < \text{LOD} < 3.0$ we detected in a total of 10 genomic regions: 1q41, 2p25.3-p24.2, 3p13-p12.1, 4q13.3, 10p11, 11q23, 12q24.22-q24.31, 17q24.2-q25.1, 21q22.13 and 22q12.3-q13.1. Our linkage and structural genomic variation analyses in a remote highland genetic isolate with aggregation of ID demonstrated that even highly isolated single kindred ID has oligo/polygenic pathogenesis.

Ключевые слова: умственная отсталость; генетический изолят; полногеномный анализ сцеплений; STRs, SNPs, CNV, ROH.

Keywords: intellectual disability; genetic isolate; genome-wide linkage scan; STRs – SNPs – CNV – ROH.

Введение

Умственная отсталость (intellectual disability, ID) – распространенное психоневрологическое расстройство, которое характеризуется нарушением когнитивных функций и является существенной проблемой здравоохранения во всем мире. Умственная отсталость встречается у 2–3% новорожденных из всей популяции, и, как полагают, мутации в более чем 500 генах влияют на риск ее развития [1–4].

В исследованиях последних лет было установлено, что количественные показатели размеров мозга и особенно в области гиппокампа – это структура мозга, важная для когнитивных процессов, таких как обучение и память, связаны с умственной отсталостью. Так, мета-анализы показывают, что объем гиппокампа уменьшается при шизофрении и при большинстве различных типов депрессивных расстройств [5–8], а также его объем постепенно уменьшается при болезни Альцгеймера и умственной отсталости [9, 10].

Ранее сообщалось о наших исследованиях со сканированными по всему геному сцеплениями с умственной отсталостью в родословной из генетического изолята Дагестана [11]. Такие генетически гомогенные изоляты представляют интерес для выявления генов предрасположенности к комплексным заболеваниям человека. В таких изолятах кровное родство общепринято и аутомные рецессивные заболевания более распространены. Недавний прогресс в молекулярной генетике и биоинформатике позволяет определить роль родства в выявлении причинно-следственных мутаций при аутомно-рецессивных заболеваниях эффективным и экономически выгодным способом, в сравнении с генетически гетерогенными аутбредными популяциями [12].

Целью исследования явилось изучение молекулярных механизмов неспецифической умственной отсталости в одном из генетических изолятов Дагестана с использованием комбинации популяционного и молекулярно-генетического анализов. В данной статье представлены результаты наших следующих этапов анализа геномных механизмов патогенеза умственной отсталости.

Материал и методы

Описание популяций. В Дагестане 26 коренных малочисленных этнических групп, которые, согласно археологическим данным, существуют более 10 000 лет в одних и тех же высокогорных регионах. Этнические группы подразделяются на многочисленные отдаленные высокогорные аулы; в соответствии с принятой популяционной классификацией, некоторые из них являются генетическими изолятами.

Больные неспецифической умственной отсталостью были диагностированы в дагестанских психиатрических больницах в раннем детстве. В общей сложности из 21 наблюдаемого случая умственной отсталости у двух пробандов обнаружено сопутствующее заболевание – шизоаффективное расстройство и у трех пробандов – нейросенсорная глухота.

Клинические диагнозы больных базировались на сочетании диагнозов региональных и республиканских психиатрических больниц, а также на собственном обследовании врачом-пси-

хиатром нашей экспедиции больных с применением переведенного на русский язык структурированного диагностического интервью для генетических исследований (DIGS, US), разработанного на основе диагностических критериев DSM-IV [13], а также при использовании ICD-10. Диагностические интервью проводили врачи-психиатры – участники наших экспедиций.

Генотипирование. Биоматериал для ДНК был собран у представителей четырех ныне живущих поколений больных и здоровых членов родословной. Геномную ДНК выделили из лейкоцитов периферической крови согласно стандартным протоколам. Примерно 400 мг ДНК было выделено из образцов крови каждого обследуемого с использованием стандартных протоколов. Для изучения наличия и локализации геномных сцеплений ДНК больных и здоровых членов родословных было сканировано по 10 сМ, получено по 400 STRs у каждого обследованного индивидуума. Полученные геномы были использованы для многомерных параметрических анализов сцепления. В сцепленных регионах проверяли структурные вариации геномов в виде вариаций числа копий и потерь гетерозиготности (CNVs и LOH на основе 500 тыс. SNP-ов Affymetrix SNP 5.0).

Статистический анализ. Для анализа сцепления мы обозначили членов родословной с умственной отсталостью как «пораженных», а «непораженными» считались члены родословной, если они были определены как не имеющие психических заболеваний на основе всей имеющейся клинической информации. Другие лица, включая членов родословной с неясными клиническими симптомами, считались «неизвестными». Для полногеномного STR анализа сцеплений нами использовались компьютерные пакеты, разработанные на основе алгоритма Маркова / Монте-Карло (MCMC) [14]. Используя многомерный параметрический анализ сцеплений, мы последовательно тестировали и доминантную и рецессивную модели с модой наследования с 90% пенетрантностью. После анализа сцеплений геномы обследованных были проанализированы с использованием Affymetrix 5,0 SNP-ов для уточнения информации о вкладе CNV и ROH в патогенез изучаемого заболевания. SNP-ы были отфильтрованы по стандартным методам с тем, чтобы свести к минимуму всевозможные ошибки типирования.

Результаты

Демографические и клинические характеристики для изолята с ID представлены в табл. 1. Родословная была построена с больными в количестве 21 (доступные для нашего экспедиционного исследования из общего числа выборки – 27 человек) и всего – 35 членов родословной. Восстановленная обширная родословная показала, что все больные с ID в данном изоляте локализуются в одной родословной с ограниченным числом общих предков. Интересно, что благодаря дрейфу генов многие соседние высокогорные аулы Дагестана с той же этнической принадлежностью и тотальным объемом не имеют ни одного диагностированного случая ID. Восстановленная нами родословная содержит 187 членов из 11 поколений (табл. 1). Соотношение полов в данном изоляте и в родословной одинаковое и составляет примерно 1:1.

Таблица 1. Демографическая структура обследованного изолята и восстановленной родословной с накоплением умственной отсталости

Параметры	Численность
Nt *	2000
Частота эндогамных браков (%)	83
Объем родословной	187
F _{prop} /ped **	0.0066/ 0.0346
Соотношение мужчин и женщин (%)	1.1:0.9
Всего больных с умственной отсталостью	27
Число обследованных в изоляте (больных)	35(21)

Примечание: *Nt – тотальный объем в изучаемом изоляте; **F – средний коэффициент инбридинга, оцененный по традиционной для популяционной генетики методике (F_{prop}) и в реконструированной родословной (F_{ped}).

Нами проанализирована брачная структура в изучаемой родословной и установлен высокий уровень традиционной эндогамии (внутриаульные браки) – 88%, из которых 57% составляют родственные браки. Посчитали коэффициент инбридинга F, используя несколько методов: (а) F_{prop} – на основе традиционных популяционно-генетических исследований – анализа браков в трех поколениях обследуемых (F_{prop} = 0,0066); и (б) F_{ped} – на основе брачной структуры в реконструированной родословной (F_{ped} = 0,0346), т.е. F_{prop} в пять раз ниже, чем F_{ped}. Мы получили аналогичные различия между обследованными больными и здоровыми в среднем

коэффициенте инбридинга, который у больных с ID оказался в 2,7 раз выше, чем у здоровых. Различия достоверны: $\chi^2 = 30,5$; $df = 1$; $p = 0,000$.

Нами проведено сканирование сцеплений по всему геному у всех обследованных членов родословной (табл. 2). Параметрический анализ сцеплений проводили в родословной с определенным заданным уровнем пенетрантности и частотой больных аллелей.

Статистически значимые ($p < 0,05$) сцепления обнаружены в 10 геномных регионах: 1q41, 2p25.3-p24.2, 3p13-p12.1, 4q13.3, 10p11, 11q23, 12q24.22-q24.31, 17q24.2-q25.1, 21q22.13 и 22q12.3-q13.1. Три самых существенных сцепления с $LOD > 3$ были получены нами в 2p25.3-p24.2 с соответствием доминантной модели, с пиком в 21 сМ, с ближайшими локусами D2S2976 и D2S2952; в 12q24.22-q24.31 с соответствием рецессивной модели с пиком – 120 сМ, с ближайшими локусами D12S2070 и D12S395 и в 22q12.3 с доминантной моделью, с пиком 32 сМ и локусами D22S683 и D22S445 (табл. 2).

Нами проанализированы сцепленные регионы на содержание генов-кандидатов ID в соответствии с предыдущими исследованиями, в установленных нами сцепленных наиболее надежных регионах с $LOD > 3$: 2p25.3-p24.2, 12q24.22-q24.31 и 22q12.3-q13.1 (табл. 2). Эти сцепленные регионы содержат гены, участвующие в патогенезе ID или других нарушений развития нервной системы (табл. 2, рис 1a-d).

Таблица 2. Сканирование сцеплений с умственной отсталостью по всему геному и гены-кандидаты заболевания в установленных нами сцепленных регионах

Сцепленный регион	LOD, D/M-R/M	Соседние локусы, пик (сМ)	Начало – конец (bp)	Гены
1q41	1.4, D/M	D1S2141- D1S549, 231	215,095,283– 220,743,932	<i>KCNK2, USH2A, RAB3GAP2, MARK1</i>
2p25.3-p24.2	3.77, D/M	D2S2976- D2S2952, 21	835,510– 11,707,195	<i>MYT1L, SNTG2, TPO, SOX11, KIDINS220, ASAP2</i>
3p13-p12.1	1.7, D/M	D3S2406- D3S4529, 90	73,158,376– 85,952,736	<i>MITF, RYBP, ROBO1, ROBO2, FOXP1, GBE1</i>
4q13	1.5, D/M	D4S3243 - D4S1647, 68	68,182,802– 81,032,553	<i>GNRHR, HUNK, GC, SLC44A4, AFP</i>
10p11.23-p11.21	2.5, D/M	D10S1426- D10S1208, 32	30,435,660– 35,397,920	<i>NRP1, EPC1, ARHGAP12, REM,</i>
11q22.3-q23.1	2.1, R/M	D11S1986- D11S1998, 107	111,123,472– 117,798,030	<i>DRD2, HTR3A, HTR3B, FXYD6, ANKK1, ZBTB16</i>
12q24.22-q24.31	3.87, R/M	D12S2070- D12S395, 120	114,466,941– 126,627,408	<i>MED13L, HRK, TESC, FBXW8, SBNO1, CDK2AP1, NOS1, PLA2G1B, CCDC60,</i>
17q24.2-q25.1	1.6, D/M	D17S2193- D17S1301, 96	66,447,685– 72,781,109	<i>HN1, SLC25A19, ACOX1, SRP68, KCNJ2, KCNJ16, KCTD2, GRIN2C, SLC25A19, ACOX1, SRP68</i>
21q22.13	1.9, D/M	D21S1440- D21S2055, 36	39,041,451– 41,291,662	<i>KCNJ6, CLDN14, PCP4, HMGN1, DYRK1A</i>
22q12.3-q13.1	3.4, D/M	D22S683- D22S445, 32	36,413,691– 37,666,244	<i>LARGE, APOL1-APOL4, CSNK1E, RBM9, MYH9, IL2RB, CACNG2, SOX10, RPSAP52, IL2RB, DDX17</i>

Примечание: Гены, ассоциации которых с когнитивными процессами были установлены, выделены жирным шрифтом в качестве кандидатных для умственной отсталости.

В сцепленном регионе 2p25.1-p24.2 с $LOD = 3,8$ выявлены гены *MYT1L SNTG2, TPO, COLEC11, SOX11, KIDINS220, ASAP2*, ассоциации которых с нарушениями когнитивных способностей сообщали в ряде публикаций.

Сцепленный регион 12q24.22-q24.32 с $LOD = 3,87$ содержит гены, связанные с умственными способностями и психозами – *TESC, HRK, FBXW8, SBNO1, MED13, CDK2AP1, CIT, DYNLL1, P2RX7, NOS1, PLA2G1B, CCDC60* (табл. 2; рис 1c). Регион 22q12.3-q13.1, где мы получили $LOD = 3,4$, содержит хорошо известный белок-кодирующий ген *LARGE* (like-glycosyltransferase), сцепленный с ID, а также ген *SYN3* (Synapsin III), который связан с познавательной способностью и психозами. Другие гены *TOM1, CSNK1E, PVALB, APOL1-APOL4,*

RBM9, *MYH9*, *IL2RB*, *CACNG2*, *SOX10*, *DDX17*, *RPSAP52* были ранее установлены как ассоциированные с когнитивными нарушениями и с аспектами развития нервной системы или нейродегенеративными расстройствами (табл. 2; рис 1d.).

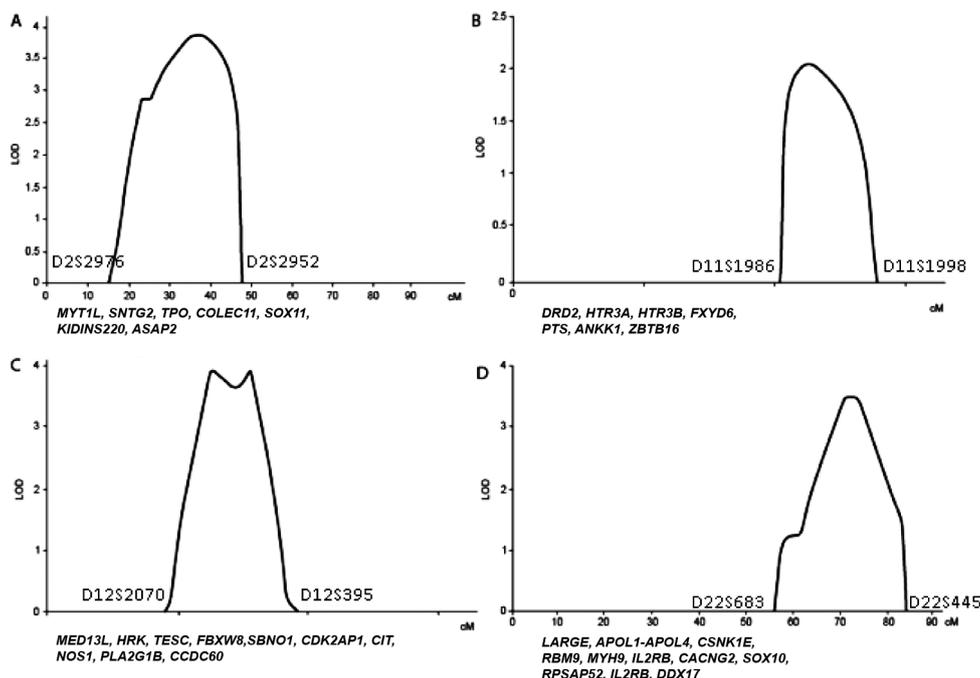


Рис. 1. Показатели геномных сцеплений с умственной отсталостью в изученной родословной из изолята Дагестана со значениями LOD scores = 2.1–3.87 и генами, локализованными в сцепленном регионе хромосом 2 (A), 11(B), 12 (C) и 22 (D)

После того как набор генов был выбран в качестве возможных кандидатов в конкретных хромосомных регионах, нами проведен исследовательский поиск для ROH и CNV, основанный на сканированных по всему геному каждого обследованного члена родословной SNP-ам для выявления структурных геномных вариаций в пяти ID-сцепленных регионах с LOD = 2.0–3.9. В этих отобранных регионах получили 173 ROH сегмента и 98 CN сегментов. Нами проверены размеры длины сегмента ROH и CN в отобранных сцепленных регионах и определены статистически значимые различия между умственно отсталыми и здоровыми членами родословной. Полученные данные показали, что средняя длина сегментов ROH и CN была выше у ID больных, по сравнению со здоровыми (рис. 2а–б). Рис. 2а демонстрирует различия длины сегмента CN между здоровой (N) и больной (ID) группами – эти различия являются статистически значимыми ($p < 0,05$). Изучение таких же различий по длине сегментов ROH среди ID и здоровых членов родословной показали, что в группе ID длина сегментов ROH была в среднем в 1,8 раз больше по сравнению со здоровыми членами родословной ($p \leq 0.018$) (рис. 2б).

Обе выборки – здоровые и больные члены родословной продемонстрировали статистически значимый высокий уровень потерь гетерозиготности среди потомков близкородственных браков по сравнению с потомками от неродственных браков. При этом обнаружено, что инбридинг с близкими родственниками приводит к появлению длинных отрезков гомозиготности (ROH) среди потомков, т.к. супруги имеют большое количество ДНК, полученного от общего предка. Эндогамные браки также приводят к увеличению протяженностей ROH, но они короче, чем в случае потомков браков между близкими родственниками. В нашем генетическом изоляте мы изучали потомков от двух типов браков – родственных и неродственных. Используя все типы браков, обнаруженных в родословной, мы проанализировали длину сегмента ROH среди потомков от таких типов браков: средняя длина сегмента среди потомков родственных браков была равна $2,652 \pm 1,163$ kb, а среди потомков неродственных браков – 702 ± 122 kb ($t = 2,87$, $p = 0,008$). Говоря иначе, у потомков родственных браков средняя длина сегмента с потерей гетерозиготности в геномах более чем в 3 раза больше по сравнению с потомками неродственных браков. С целью выявления наиболее выраженных сегментов с потерей гетерозиготности в геномах больных умственной отсталостью по сравнению со здоровыми нами проведен детальный анализ относительно более надежно сцепленных с этой патологией локусов.

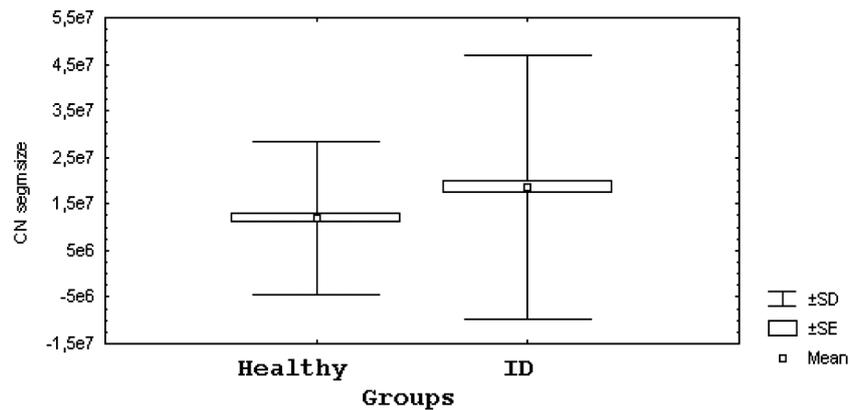


Рис. 2а. Бокс-плот, отражающий различия в размерах сегментов числа копий CN между группами здоровых (N) и умственно отсталых (ID). Различия статистически достоверны по не параметрическому показателю: Mann-Whitney Zadj = 1,93, $p \leq 0.050$

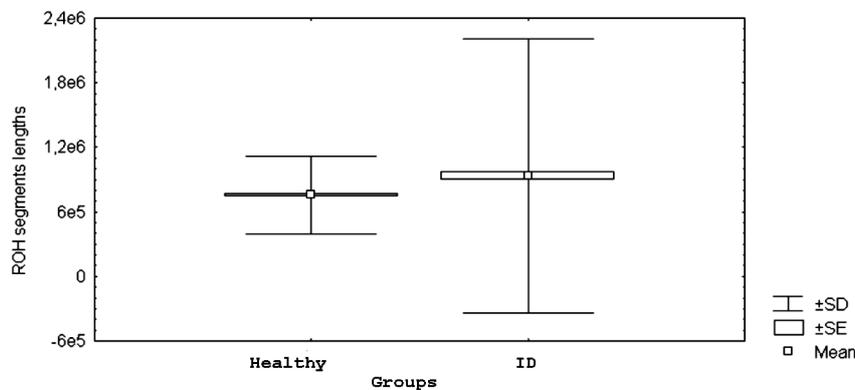


Рис. 2б. Бокс-плот, отражающий различия в размерах сегментов с потерей гетерозиготности ROH между группами здоровых (N) и умственно отсталых (ID). Различия статистически достоверны по не параметрическому показателю: Mann-Whitney Zadj = 2,37, $p \leq 0.018$

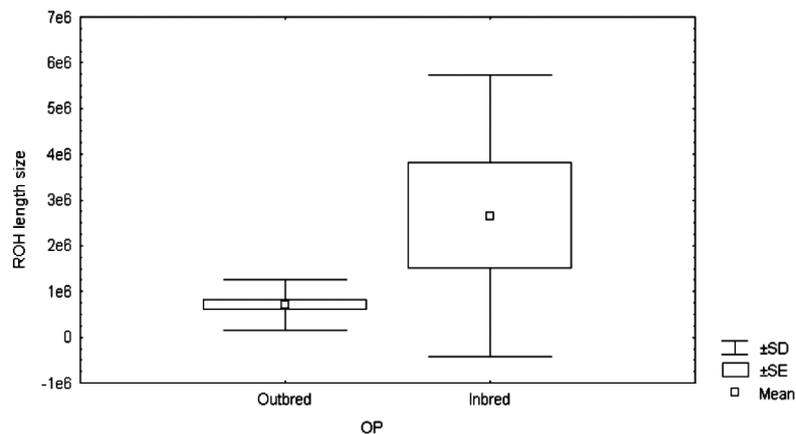


Рис. 3. Различия между потомками родственных и неродственных браков в средних значениях длины сегмента ROH

Нами установлены в сцепленном регионе 2p25.3-p24.2 делеции в генах MYTL, SNTG2 и TPO у 5 (около 24%) из 21 больных.

В регионе 12q24.22-12q24.31 в 19 из 21 больных (91%) выявлены сегменты с CN и у 20 из 21 (95%) сегменты с ROH. Средний размер длины сегмента: у больных 2512 kb (дисперсия 500–6,472 kb) и у здоровых 682 kb (531–986 kb). Говоря иначе, средний размер длины сегмента в сцепленном 12q24.22-12q24.31 регионе у больных в 3,7 раза больше, чем у здоровых и гомозиготность такая, как в данном регионе, встречается почти у всех больных. Эти сегменты

выявляются в регионе 12q24.21 и включают гены *MED13L*, *HRK*, *FBXW8* и *TESC*, которые, судя по представленным результатам, играют существенную роль в этиопатогенезе умственной отсталости.

В сегментах с ROH, выявленным в регионе 12q24.31, 15 из 21 (71%) случаев умственной отсталости в родословной продемонстрировали потерю гетерозиготности в гене *SBNO1* – в 4 случаях между rs62774561 и rs10773005, в 11 случаях между rs62774561 и rs11268916. В табл. 3 представлены размеры длин сегментов для ROH и CN в сцепленных с 12q24.21-q24.31 областях для больных ID и их здоровых родственников в нижеприведенном фрагменте родословной (рис. 4).

Таблица 3а. ROH сегменты в сцепленном регионе 12q24 с локализованными там генами

DGH_#	Start (kb)	End (kb)	Length (kb)	Gene Name
DGH001	1157800	1159272	1472	<i>MED13L</i> , <i>MIR620</i> , <i>MIR4472-2</i> , <i>NCRNA00173</i> , <i>MAP1LC3B2</i> , <i>C12orf49</i> , <i>RNFT2</i> , <i>HRK</i> , <i>FBXW8</i> , <i>TESC</i> , <i>FBXO21</i> , <i>NOS1</i> , <i>KSR2</i> , <i>RFC5</i> , <i>WSB2</i> , <i>VSIG10</i> , <i>PEBP1</i> , <i>TAOK3</i> , <i>SUDS3</i> , <i>SRRM4</i> , <i>HSPB8</i> , <i>LOC144742</i> , <i>CCDC60</i> , <i>TMEM233</i> , <i>PRKAB1</i> , <i>CIT</i> , <i>MIR1178</i> , <i>CCDC64</i> , <i>RAB35</i> ,
DGH002	1157800	1159272	1472	<i>MED13L</i> , <i>MIR620</i> , <i>MIR4472-2</i> , <i>NCRNA00173</i> , <i>MAP1LC3B2</i> , <i>C12orf49</i> , <i>RNFT2</i> , <i>HRK</i> , <i>FBXW8</i> , <i>TESC</i> , <i>FBXO21</i> , <i>NOS1</i> , <i>KSR2</i> , <i>RFC5</i> , <i>WSB2</i> , <i>VSIG10</i> , <i>PEBP1</i> , <i>TAOK3</i> , <i>SUDS3</i> , <i>SRRM4</i> , <i>HSPB8</i> , <i>LOC144742</i> , <i>CCDC60</i> , <i>TMEM233</i> , <i>PRKAB1</i> , <i>CIT</i> , <i>MIR1178</i> , <i>CCDC64</i> , <i>RAB35</i> ,
DGH003	1157800	1159272	1472	<i>MED13L</i> , <i>MIR620</i> , <i>MIR4472-2</i> , <i>NCRNA00173</i> , <i>MAP1LC3B2</i> , <i>C12orf49</i> , <i>RNFT2</i> , <i>HRK</i> , <i>FBXW8</i> , <i>TESC</i> , <i>FBXO21</i> , <i>NOS1</i> , <i>KSR2</i> , <i>RFC5</i> , <i>WSB2</i> , <i>VSIG10</i> , <i>PEBP1</i> , <i>TAOK3</i> , <i>SUDS3</i> , <i>SRRM4</i> , <i>HSPB8</i> , <i>LOC144742</i> , <i>CCDC60</i> , <i>TMEM233</i> , <i>PRKAB1</i> , <i>CIT</i> , <i>MIR1178</i> , <i>CCDC64</i> , <i>RAB35</i> ,
DGH004	123201	123822	621	<i>HCAR3</i> , <i>HCAR1</i> , <i>DENR</i> , <i>CCDC62</i> , <i>HIP1R</i> , <i>VPS37B</i> , <i>ABCB9</i> , <i>OGFOD2</i> , <i>ARL6IP4</i> , <i>PITPNM2</i> , <i>MIR4304</i> , <i>LOC100507091</i> , <i>MPHOSPH9</i> , <i>C12orf65</i> , <i>CDK2AP1</i> , <i>SBNO1</i>
DGH004	116000	117387	1387	<i>MED13L</i> , <i>MIR620</i> , <i>MIR4472-2</i> , <i>NCRNA00173</i> , <i>MAP1LC3B2</i>
DGH005	123105	123822	717	<i>KNTC1</i> , <i>HCAR2</i> , <i>HCAR3</i> , <i>HCAR1</i> , <i>DENR</i> , <i>CCDC62</i> , <i>HIP1R</i> , <i>VPS37B</i> , <i>ABCB9</i> , <i>OGFOD2</i> , <i>ARL6IP4</i> , <i>PITPNM2</i> , <i>MIR4304</i> , <i>LOC100507091</i> , <i>MPHOSPH9</i> , <i>C12orf65</i> , <i>CDK2AP1</i> , <i>SBNO1</i>
DGH005	117000	117500	500	<i>C12orf49</i> , <i>RNFT2</i> , <i>HRK</i> , <i>FBXW8</i> , <i>TESC</i> , <i>FBXO21</i> , <i>NOS1</i> , <i>KSR2</i> , <i>RFC5</i> , <i>WSB2</i> , <i>VSIG10</i> , <i>PEBP1</i> , <i>TAOK3</i> , <i>SUDS3</i> , <i>SRRM4</i> , <i>HSPB8</i> , <i>LOC144742</i> , <i>CCDC60</i> , <i>TMEM233</i> , <i>PRKAB1</i> , <i>CIT</i> , <i>MIR1178</i> , <i>CCDC64</i> , <i>RAB35</i> ,
DGH006	125089	128647	3559	<i>SCARB1</i> , <i>UBC</i> , <i>DHX37</i> , <i>BRI3BP</i> , <i>AACS</i> , <i>TMEM132B</i> , <i>LOC400084</i> , <i>LOC100128554</i> , <i>LOC387895</i> , <i>LOC100507206</i> , <i>LOC440117</i> , <i>FLJ37505</i>
DGH007	122804	123790	986	<i>CLIP1</i> , <i>ZCCHC8</i> , <i>RSRC2</i> , <i>KNTC1</i> , <i>HCAR2</i> , <i>HCAR3</i> , <i>HCAR1</i> , <i>DENR</i> , <i>CCDC62</i> , <i>HIP1R</i> , <i>VPS37B</i> , <i>ABCB9</i> , <i>OGFOD2</i> , <i>ARL6IP4</i> , <i>PITPNM2</i> , <i>MIR4304</i> , <i>LOC100507091</i> , <i>MPHOSPH9</i> , <i>C12orf65</i> , <i>CDK2AP1</i> , <i>SBNO1</i>
DGH008	122804	123790	986	<i>CLIP1</i> , <i>ZCCHC8</i> , <i>RSRC2</i> , <i>KNTC1</i> , <i>HCAR2</i> , <i>HCAR3</i> , <i>HCAR1</i> , <i>DENR</i> , <i>CCDC62</i> , <i>HIP1R</i> , <i>VPS37B</i> , <i>ABCB9</i> , <i>OGFOD2</i> , <i>ARL6IP4</i> , <i>PITPNM2</i> , <i>MIR4304</i> , <i>LOC100507091</i> , <i>MPHOSPH9</i> , <i>C12orf65</i> , <i>CDK2AP1</i> , <i>SBNO1</i>
DGH009	122804	123790	986	<i>CLIP1</i> , <i>ZCCHC8</i> , <i>RSRC2</i> , <i>KNTC1</i> , <i>HCAR2</i> , <i>HCAR3</i> , <i>HCAR1</i> , <i>DENR</i> , <i>CCDC62</i> , <i>HIP1R</i> , <i>VPS37B</i> , <i>ABCB9</i> , <i>OGFOD2</i> , <i>ARL6IP4</i> , <i>PITPNM2</i> , <i>MIR4304</i> , <i>LOC100507091</i> , <i>MPHOSPH9</i> , <i>C12orf65</i> , <i>CDK2AP1</i> , <i>SBNO1</i>
DGH010	122804	123790	986	<i>CLIP1</i> , <i>ZCCHC8</i> , <i>RSRC2</i> , <i>KNTC1</i> , <i>HCAR2</i> , <i>HCAR3</i> , <i>HCAR1</i> , <i>DENR</i> , <i>CCDC62</i> , <i>HIP1R</i> , <i>VPS37B</i> , <i>ABCB9</i> , <i>OGFOD2</i> , <i>ARL6IP4</i> , <i>PITPNM2</i> , <i>MIR4304</i> , <i>LOC100507091</i> , <i>MPHOSPH9</i> , <i>C12orf65</i> , <i>CDK2AP1</i> , <i>SBNO1</i>

DGH011	123201	123822	621	<i>HCAR3, HCARI, DENR, CCDC62, HIP1R, VPS37B, ABCB9, OGFOD2, ARL6IP4, PITPNM2, MIR4304, LOC100507091, MPHOSPH9, C12orf65, CDK2AP1, SBNO1</i>
DGH012	122804	123790	986	<i>CLIP1, ZCCHC8, RSRC2, KNTC1, HCAR2, HCAR3, HCARI, DENR, CCDC62, HIP1R, VPS37B, ABCB9, OGFOD2, ARL6IP4, PITPNM2, MIR4304, LOC100507091, MPHOSPH9, C12orf65, CDK2AP1, SBNO1</i>
DGH013	123105	123822	717	<i>KNTC1, HCAR2, HCAR3, HCARI, DENR, CCDC62, HIP1R, VPS37B, ABCB9, OGFOD2, ARL6IP4, PITPNM2, MIR4304, LOC100507091, MPHOSPH9, C12orf65, CDK2AP1, SBNO1</i>
DGH014	123105	123743	639	<i>KNTC1, HCAR2, HCAR3, HCARI, DENR, CCDC62, HIP1R, VPS37B, ABCB9, OGFOD2, ARL6IP4, PITPNM2, MIR4304, LOC100507091, MPHOSPH9, C12orf65, CDK2AP1, SBNO1</i>
DGH015	123105	123822	717	<i>KNTC1, HCAR2, HCAR3, HCARI, DENR, CCDC62, HIP1R, VPS37B, ABCB9, OGFOD2, ARL6IP4, PITPNM2, MIR4304, LOC100507091, MPHOSPH9, C12orf65, CDK2AP1, SBNO1</i>
DGH016	123201	123822	621	<i>HCAR3, HCARI, DENR, CCDC62, HIP1R, VPS37B, ABCB9, OGFOD2, ARL6IP4, PITPNM2, MIR4304, LOC100507091, MPHOSPH9, C12orf65, CDK2AP1, SBNO1</i>
DGH017	123201	123822	621	<i>HCAR3, HCARI, DENR, CCDC62, HIP1R, VPS37B, ABCB9, OGFOD2, ARL6IP4, PITPNM2, MIR4304, LOC100507091, MPHOSPH9, C12orf65, CDK2AP1, SBNO1</i>

Примечание: Гены-кандидаты, ассоциированные с ID, выделены жирным шрифтом.

Таблица 3б. CN сегменты в сцепленном регионе 12q24.21-q24.31 с локализованными там генами

DGH_#	Position	End Position	Segment Mean	Length (kb)	Gene Name
DGH001	116396381	78410558	-0,16622	9416	MED13L, HRK, FBXW8, TESC, NOS1
DGH002	97801884	125931905	-0,04391	28130	MED13L, HRK, FBXW8, TESC, CDK2AP1, SBNO1
DGH003	115688402	117344276	0,743	1656	MED13L, HRK
DGH004	116396381	78410558	-2,14765	9416	MED13L, HRK, FBXW8, TESC, NOS1
DGH007	116396381	77450413	-1,02624	8455	MED13L, HRK, FBXW8, TESC, NOS1
DGH010	117617646	124558791	-2,09709	6941	CDK2AP1, SBNO1
DGH010	115688402	117344276	0,743	1656	MED13L, HRK
DGH012	116192880	124558791	0,509505	8366	MED13L, HRK, FBXW8, TESC, CDK2AP1, SBNO1
DGH013	118227544	119376800	-2,8537	1149	CDK2AP1, SBNO1
DGH015	118227544	119376800	-2,345	1149	CDK2AP1, SBNO1
DGH016	123757861	124558791	-2,71676	801	SBNO1
DGH017	116396381	122613000	-0,1891	53715	MED13L, HRK, FBXW8, TESC, NOS1

С целью определения характера выявленных молекулярных aberrаций – являются ли они спорадическими и наследуются в семьях в поколениях – нами проведен генеалогический анализ выявленных сегментов ROH и CNV. Рис. 4 демонстрирует результаты такого анализа в одном фрагменте родословной с самой высокой агрегацией генотипированных больных и здоровых членов. Это фрагмент родословной с потомками от общего предка, существовавшего 7 поколений назад. Увеличение агрегации ID среди потомков в 6–7-м поколениях в основном связано

с высокой частотой родственных браков (рис. 4). В ядерной семье с бабушкой № 22 мы нашли расширенный CN сегмент с длиной 8365912 bp (12q24,21-q24,31), который в следующих поколениях детей и внуков был сегрегирован в меньшие по размеру сегменты вследствие рекомбинаций (рис.4; табл. 3). Как показано на рис. 4, в 12q24.22 области в данной семье в 11 случаях наблюдаются сегменты CNV (делеции) и в 15 случаях – сегменты ROH, которые включают гены *MED13L*, *HRK*, *FBXW8* и *TESC* (rs11609741, rs79667445 и rs4767490) (рис. 4). В том же 12q24.22 межгенном регионе с rs7294919 (между *HRK* и *FBXW8*) в геномах трех из наиболее сильно отягощенных больных ID также обнаружен сегмент ROH (рис. 4).

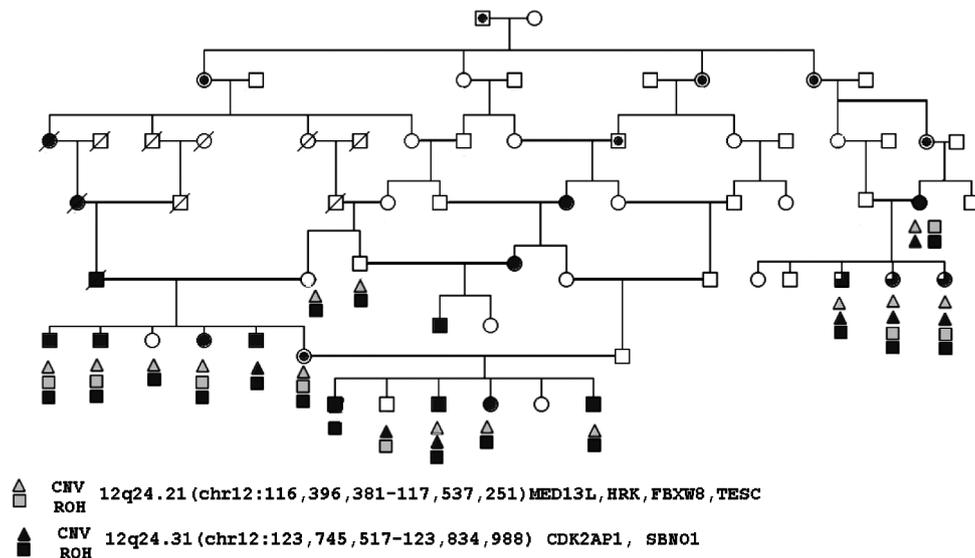


Рис. 4. Семейная агрегация и наследование сегментов ROH и CN в сцепленном регионе 12q24.22 и 12q24.31.

Ветвь расширенной родословной из дагестанского генетического изолята с агрегацией ID. Больные члены родословной обозначены красным, вероятно больные – красной точкой. Результат параметрического анализа сцеплений: LOD = 3.87

В регионе 12q24.31 в генах *CDK2AP1* и *SBNO1* мы получили ROH в 15 больных членах данной семьи и сегменты CN у 7 больных (рис. 4). В гене *CDK2AP1* нами установлена потеря гетерозиготности между rs4759414 и rs10846494 у одного члена родословной – у матери, которая имеет четырех потомков, с ярко выраженной ID. Эти четверо детей также характеризовались потерями гетерозиготности в гене *MED13L*, между rs34802971 и rs3851642. В трех других больных обнаружена потеря гетерозиготности между rs60354985 и rs10774903 в области 12q24.22, в которой находятся гены *HRK*, *FBXW8* и *TESC* (рис. 4).

У здоровых членов родословной мы нашли 4 ROH и CN сегменты, три из них в 12q24.31 и один в 12q24.22 регионе (рис. 4).

В сцепленном регионе 22q12.3 у 7 из 21 (33%) больных членов родословной обнаружены сегменты с делециями, которые включают в том числе геномные варианты гена *LARGE* – rs8141384 и в rs8140012. У 8 (38%) больных установлены сегменты с ROH.

Обсуждение

Полученные нами результаты проведенного исследования подтверждают геномную гетерогенность ID – статистически значимые LOD получены в 10 геномных регионах. Мы установили LOD > 3 для ID в 3 геномных регионах (табл. 2). Эти сцепленные регионы содержат гены, участвующие в патогенезе ID и / или других психических расстройств нервной системы. Сцепленный регион 2p25.3-p24.2 с LOD = 3,8 содержит *MYT1L* (миелиновый транскрипционный фактор 1), который был ассоциирован с ID, а также с шизофренией (SCZ), MDD и ADHD [15–18]. Этот ген функционально вовлечен в нейрональную дифференциацию и в развитие нейронов и олигодендроглии в ЦНС. В указанных работах также сообщалось об ассоциации гена *TPO* с гипотиреозом и гена *COLEC11* с нарушением способности к обучению. Гены *SOX11*, *KIDINS220* и *ASAP2* ассоциированы с нейронитом (табл. 2; рис. 1). Таким образом, выявленные нами сцепленные ID гены в регионе с 2p25.3-p24.2 в большей или в меньшей степени участвуют в патогенезе когнитивных нарушений.

Регион 22q12.3-q13.1, где мы получили $LOD = 3,4$, содержит ген *LARGE*. Мутация в гене *LARGE* может привести к двум различным формам мышечной дистрофии (<http://omim.org/entry/603590>): (MDDG) – тяжелая врожденная форма с аномалиями мозга и глаз (тип A6; *MDDGA6*, 613154), ранее называемая синдромом Уокер – Варбурга (WWS) или заболевание мышц, глаз и головного мозга (MEB), а также менее тяжелые врожденные формы умственной отсталости (типа B6; *MDDGB6*; 608840), ранее известные как врожденная мышечная дистрофия типа 1D (*MDC1D*). Другим важным геном, ассоциированным с познавательной способностью и психозом, в этом геномном регионе является *SYN3*, который кодирует нейронные фосфопротеины, ассоциированные с цитоплазматической поверхностью синаптических пузырьков. Семейство этого гена характеризуется общими белковыми доменами, которые вовлечены в синаптогенез и модуляцию высвобождения нейротрансмиттеров, и, как предполагают, это семейство играет потенциальную роль в развитии нескольких психоневрологических заболеваний, что было поддержано в предыдущих исследованиях ассоциаций с шизофренией, биполярным расстройством, рассеянным склерозом и ADHD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8224>). Ген *TOM1* (Target Of Myb Protein 1) является белок-кодирующим геном, который ассоциирован с биполярным расстройством и муковисцидозом (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR014645>). Другие гены, такие как: *CSNK1E*, *PVALB*, *APOL1-APOL4*, *RBM9*, *MYH9*, *IL2RB*, *CACNG2*, *SOX10*, *DDX17*, *RPSAP52*, были ранее представлены как сцепленные с когнитивными нарушениями или с аспектами развития нервной системы или нейродегенеративными заболеваниями (табл. 2; рис. 1).

Ген *KCNJ2*, расположенный в сцепленном с ID регионе 17q24.2-q25.1, имеет большое значение в развитии заячьей губы и неба, так же как и *KCNJ16* и *USH2A*, которые связаны с сенсорно-нервной потерей слуха. Нами найдено сочетание этих сопутствующих заболеваний в трех случаях ID в изученном изоляте. Обнаружены 3 геномных региона, связанных с ID: 11q23, 12q24.23-q24.32 и 22q12.3-q13.1, которые, как ранее сообщалось, ассоциированы с SCZ и MDD [19].

Особый интерес представляет ID-сцепленный регион 12q24, выдающий высокий уровень $LOD = 3,87$. Это тот же самый регион, где недавние исследования с использованием MPT сканирования головного мозга 21,151 индивидов обнаружили ассоциации с объемами основных структур мозга, связанных с познанием, что также может влиять на патогенез ID. Эта область содержит около 30 генов; некоторые из них были вовлечены в ID, в том числе *ESC*, *HRK*, *FBXW8*, *SBNO1* и *CDK2AP1*, так же как и в патогенез других нервно-психических расстройств (SCZ, MDD и BPD), включая гены *CIT*, *DYNLL1*, *P2RX7*, *NOS1*, *PLA2G1B*, и *CCDC60*. Было показано, что ген *CIT* связан с шизофренией и ген *NOS1* известен как ген – кандидат импульсивности и агрессивности. Те гены, которые связаны с ID, содержат SNPs, связанные с объемом гиппокампа и общим объемом мозга [20]. В нашем исследовании мы обнаружили, что у всех ID наблюдалась потеря гетерозиготности в гене *SBNO1*, расположенном внутри сцепленной части сегмента с ROH. В нашем собственном исследовании в рамках консорциума ENIGMA (<http://enigma.ini.usc.edu>) мы обнаружили, что межгенный вариант rs7294919 был сцеплен с показателем объема гиппокампа (12q24.22, $N = 21151$; $P = 6,70 \times 10^{-16}$) и с уровнем экспрессии позиционного кандидата *TESC* в ткани мозга [20–22]. Экспрессия *TESC* строго регулируется во время дифференцировки клеток в видоспецифичных клетках и играет важную роль в пролиферации и дифференцировке клеток [23, 24], который, вероятно, имеет отношение к объему гиппокампа и развитию мозга [25, 20]. Наши результаты показывают, что по крайней мере некоторые из впервые нами обнаруженных ROH связаны с делециями в CNVs. Например, в *FBXW8* были обнаружены и ROH и CN-делеции. Кроме того, скрининг структурных изменений в таком же геномном регионе, сцепленном с ID, в нашей родословной показал, что в этой области восемь ID случаев имеют CNV в генах *FBXW8* и *TESC* (rs11609741, rs79667445 и rs4767490). В той же 12q24.22 области с rs7294919, что лежит между *HRK* и *FBXW*, три наиболее пораженных умственной отсталостью пробанда продемонстрировали ROH.

Наши анализы сцеплений и структурных геномных вариаций в удаленных высокогорных генетических изолятах с агрегацией умственной отсталости показали, что даже в высокоизолированной популяции с большой частотой родственных браков геномные механизмы патогенеза умственной отсталости являются сложными и носят олиго- или полигенный характер. Это подтверждает эффективность наших исследований в генетических изолятах и применение разработанного нами популяционного подхода к картированию генов, в ходе которого мы устанавливаем как новые, так и подтверждаем ранее установленные гены, участвующие в патогенезе таких комплексных заболеваний, как умственная отсталость.

Таким образом, мы установили “hot spots” (горячие точки с наибольшей частотой таких потерь гетерозиготности и вариаций числа копий) – высокие частоты CNV и ROH сегментов

в регионе 12q24.21-q24.31, в котором недавние исследования показали ассоциации с ключевыми структурами мозга, связанными с познавательными (когнитивными) способностями [20, 26]. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что выявленные нами впервые молекулярные аберрации в виде CNV и ROH в 12q24.22-q24.31 регионе являются общими для геномов пациентов с умственной отсталостью. Эти молекулярные аберрации больных ID членов родословной ныне живущего поколения получены от одного вероятно больного общего предка, существовавшего в 7-м поколении ретроспективно (по семейной истории). Установление таких «горячих точек» с потерями гетерозиготности в жестко сцепленном с умственной отсталостью геномном регионе 12q24.22-12q24.31 может свидетельствовать об обнаружении нами физического сцепления данного участка 12-й хромосомы с кластером генов-кандидатов, в которых потеряны неизменные у здоровых членов родословной аллели, что и служит причиной патогенеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Roeleveld N., Zielhuis G.A., Gabreehls F.* The prevalence of mental retardation: a critical review of recent literature // *Dev Med Child Neurol.* 1997. N 39(2). P. 125–132.
2. Reported biomedical causes and associated medical conditions for mental retardation among 10-year-old children, metropolitan Atlanta, 1985 to 1987 / *M. Yeargin-Allsopp, C.C. Murphy, J.F. Cordero, B.P. Decoufle, J.G. Hollowell* // *Dev Med Child Neurol.* 1997. N 39(3). P. 142–149.
3. *Kaufman L., Ayub M., Vincent J.B.* The genetic basis of nonsyndromic intellectual disability: a review // *J. Neurodev Disord.* 2010. N 2(4). P. 182–209.
4. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders / *H. Najmabadi, H. Hu, M. Garshasbi, T. Zemojtel, S.S. Abedini et al.* // *Nature.* 2011. N 7367. P. 57–63.
5. Navigation-related structural change in the hippocampi of taxi drivers / *E.A. Maguire, D.G. Gadian, I.S. Johnsrude, C.D. Good, J. Ashburner, R.S. Frackowiak, C.D. Frith* // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000. N 97. P. 4398–4403.
6. *Burgess N., Maguire E.A., O'Keefe J.* The human hippocampus and spatial and episodic memory // *Neuron.* 2002. N 35. P. 625–641.
7. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour / *J.S. Snyder, A. Soumier, M. Brewer, J. Pickel, H.A. Cameron* // *Nature.* 2011. N 476. P. 458–461.
8. Total brain volume and corpus callosum size in medication-naive adolescents and young adults with autism spectrum disorder / *C.M. Freitag, E. Luders, H.E. Hulst, K.L. Narr, P.M. Thompson, A.W. Toga, C. Krick, C. Konrad* // *Biol Psychiatry.* 2009. N 66. P. 316–319.
9. Steps to standardization and validation of hippocampal volumetry as a biomarker in clinical trials and diagnostic criterion for Alzheimer's disease / *C.R. Jr. Jack, F. Barkhof, M.A. Bernstein, M. Cantillon, P.E. Cole, C. Decarli, B. Dubois, S. Duchesne, N.C. Fox, G.B. Frisoni, H. Hampel, D.L. Hill, K. Johnson, J.F. Mangin, P. Scheltens, A.J. Schwarz, R. Sperling, J. Suhy, P.M. Thompson, M. Weiner, N.L. Foster* // *Alzheimers Dement.* 2011. N 7(4). P. 474–485.
10. Volume and number of neurons of the human hippocampal formation in normal aging and Alzheimer's disease / *G. Simic, I. Kostovic, B. Winblad, N. Bogdanovic* // *J. Comp Neurol.* 1997. N 379. P. 482–494.
11. Mapping genes of complex psychiatric diseases in Daghestan genetic isolates / *K.B. Bulayeva, S.M. Leal, T.A. Pavlova, R.M. Kurbanov, S.J. Glatt, O.A. Bulayev et al.* // *Am J. Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2005. N 132B(1). P. 76–84.
12. The ascertainment of schizophrenia pedigrees in Dagestan genetic isolates / *K.B. Bulayeva, S. Leal, T.A. Pavlova, R.M. Kurbanov, S. Coover, O.A. Bulayev, W. Byerley* // *Psychiatr Genet.* 2000. N 10(2). P. 67–72.
13. Diagnostic interview for genetic studies: rationale, unique features and training / *J. Nurnberger, M. Blehar, C. Kaufman, C. York-Cooler, S. Simpson, J. Harkavy-Friedman et al.* // *Arch Gen Psychiatry.* 1994. N 51. P. 849–862.
14. *Sobel E., Lange K.* Descent graphs in pedigree analysis: applications to haplotyping, location scores, and marker sharing // *Am J. Hum. Genet.* 1996. N 58. P. 1323–1337.
15. Microduplications disrupting the MYT1L gene (2p25.3) are associated with schizophrenia / *Y. Lee, A. Mattai, R. Long, J.L. Rapoport, N. Gogtay, A.M. Addington* // *Psychiatr Genet.* 2012. N 22. P. 206–209.
16. Association study of myelin transcription factor 1-like polymorphisms with schizophrenia in Han Chinese population / *W. Li, X. Wang, J. Zhao, J. Lin, X.Q. Song, Y. Yang et al.* // *Genes Brain Behav.* 2012. N 11. P. 87–93.
17. MYT1L is a candidate gene for intellectual disability in patients with 2p25.3 (2pter) deletions / *S.J. Stevens, C.M. van Ravenswaaij-Arts, J.W. Janssen, J.S. Klein Wassink-Ruiter, A.J. van Essen, T. Dijkhuizen et al.* // *Am J. Med Genet.* 2011. N 155A. P. 2739–2745.
18. Molecular genetics of adult ADHD: converging evidence from genome-wide association and extended pedigree linkage studies / *K.P. Lesch, N. Timmesfeld, T.J. Renner, R. Halperin, C. Rohser, T.T. Nguyen, D.W. Craig, J. Romanos, M. Heine, J. Meyer, C. Freitag, A. Warnke, M. Romanos, H. Schahfer, S. Walitza, A. Reif, D.A. Stephan, C. Jacob* // *J. Neural Transm.* 2008. N 115. P. 1573–1585.

19. Genome-wide linkage scan of major depressive disorder in two Dagestan genetic isolates / *K.B. Bulayeva, T. Lencz, S. Glatt, T. Takumi, F.R. Gurganova, O.A. Bulayev* // *Cent Eur J. Med.* 2011. N 6. P. 616–624.
20. Identification of common variants associated with human hippocampal and intracranial volumes / *J.L. Stein, S.E. Medland, A.A. Vasquez, D.P. Hibar, R.E. Senstad* // *Nat Genet.* 2012. N 44. P. 552–561.
21. The ENIGMA Consortium: large-scale collaborative analyses of neuroimaging and genetic data / *P.M. Thompson, J.L. Stein, S.E. Medland, D.P. Hibar, A.A. Vasquez, M.E. Renteria, R. Toro et al.* // *Brain Imaging Behav.* 2014. N 8(1). P. 153–182.
22. Common variants at 12q14 and 12q24 are associated with hippocampal volume / *J.C. Bis, C. DeCarli, A.V. Smith, V. van der Lijn, F. Crivello, M. Fornage et al.* // *Nat Genet.* 2012. N 44. P. 545–551.
23. *Levay K., Slepak V.Z.* Tescalcin is an essential factor in megakaryocytic differentiation associated with Ets family gene expression // *J. Clin Invest.* 2007. N 117. P. 2672–2683.
24. *Levay K., Slepak V.Z.* Up- or downregulation of tescalcin in HL-60 cells is associated with their differentiation to either granulocytic or macrophage-like lineage // *Exp Cell Res.* 2010. N 316. P. 1254–1262.
25. *Stein J.L., Hibar D.P., Madsen S.K. et al.* Discovery and replication of dopamine-related gene effects on caudate volume in young and elderly populations (N = 1198) using genome-wide search // *Mol Psychiatry.* 2011. N 16. P. 927–937.
26. Common variants at 6q22 and 17q21 are associated with intracranial volume / *M.A. Ikram, M. Fornage, A.V. Smith, S. Seshadri, R. Schmidt et al.* // *Nat Genet.* 2012. N 44. P. 539–544.

Поступила в редакцию 12.03.2015 г.
Принята к печати 28.09.2015 г.