

ДВА СЛУЧАЯ ДУПЛИКАЦИЙ ХРОМОСОМЫ X У ДЕВОЧЕК С ГРУБОЙ ЗАДЕРЖКОЙ РАЗВИТИЯ: СВЯЗЬ КЛИНИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ С ИНАКТИВАЦИЕЙ ХРОМОСОМЫ X

Колотий А.Д.^{1,2}, Юров И.Ю.^{1,2,4}, Демидова И.А.^{1,2,3}, Воинова В.Ю.^{1,2,3}, Зеленова М.А.^{1,2}, Юров Ю.Б.^{1,2,3}, Ворсанова С.Г.^{1,2,3}

¹ФГБУ Научный центр психического здоровья РАМН

²Обособленное структурное подразделение ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова «Научно-исследовательский клинический институт педиатрии» Минздрава России

³Московский городской психолого-педагогический университет

⁴Российская Медицинская Академия Последипломного Образования, email:ivan.iourov@gmail.com

В работе представлены два клинических случая дупликации хромосомы X по короткому Xp11.2->pter и длинному плечу Xq21.3->q28, уточненные молекулярно-цитогенетическими методами. В этих двух случаях не обнаружено равной инактивации хромосомы X. Для обеих пациенток, девочек в возрасте 5,5 лет и 10 месяцев, была характерна тяжелая степень задержки психомоторного и речевого развития, эпилепсия, врожденные пороки и малые аномалии развития. Цитогенетические исследования проводились на хромосомах лимфоцитов периферической крови, культивированных стандартным методом с применением GTG и CBG окрашивания. Молекулярно-цитогенетические исследования были проведены методом FISH с использованием ДНК пробы MCB (Multicolor chromosome banding) и сайтспецифичных ДНК проб, включавших пробу на ген MECP2, участки Xpter и Xqter. Данные случаи, как и опубликованные ранее, возможно, указывают на то, что дублицированные участки хромосомы X большего размера не подлежат инактивации, вызывая тяжелый клинический эффект.

Ключевые слова: дупликация хромосомы X, X-инактивация, молекулярно-цитогенетическая диагностика, грубая задержка развития.

TWO CASES OF X CHROMOSOME DUPLICATIONS IN GIRLS WITH SEVERE DEVELOPMENTAL DELAY: CONNECTING CLINICAL FEATURES AND X CHROMOSOME INACTIVATION

Kolotii A.D.^{1,2}, Iourov I.Y.^{1,2,4}, Demidova I.A.^{1,2,3}, Voinova V.Y.^{1,2,3}, Zelenova M.A.^{1,2}, Yurov Y.B.^{1,2,3}, Vorsanova S.G.^{1,2,3}

¹National Research Center of Mental Health, RAMS, Moscow, Russian Federation,

²Research and Clinical Institute for Pediatrics at the Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health, Moscow, Russian Federation,

³Moscow State University of Psychology and Education, Moscow, Russian Federation,

⁴Department of Medical Genetics, Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Ministry of Health, Moscow, Russian Federation. ivan.iourov@gmail.com

In this paper, we present two clinical cases of patients with severe developmental delay and a set of dysmorphic features. Cytogenetic method allowed us to reveal a duplication of a short arm (Xp11.2-> pter) of chromosome X in one patient and a duplication of a long arm (Xq21.3-> q28) in another case. Both results were further analyzed and confirmed using molecular cytogenetic methods. Both patients, the girls aged 5.5 years - and 10 months - old presented with severe psychomotor and speech development delay, epilepsy, congenital malformations and dysmorphic features. Cytogenetic studies were carried out using cultured peripheral blood lymphocytes by GTG and CBG staining. Molecular cytogenetic studies were performed by FISH using DNA probes for MCB (Multicolor chromosome banding) and site-specific DNA probes. Contrary to individuals without duplications, the described cases do not show random chromosome X inactivation. These cases, as well as the ones previously described in the literature, indicate that the large duplicated regions of X chromosome are randomly inactivated, causing thereby severe clinical consequences.

Keywords: chromosome X duplication, X-inactivation, molecular-cytogenetic diagnostics, severe developmental delay.

Среди структурной хромосомной патологии аномалии хромосомы X наблюдаются в основном у пациентов женского пола, нарушения хромосомы X у мужчин часто летальны [1]. Как правило, в случаях повреждения одной из хромосом X, происходит ее инактивация, за

счет чего основная функциональная роль переходит к неповрежденной хромосоме X. При дупликациях хромосомы X возможны два клинических варианта: отсутствие фенотипических проявлений (обычно при небольших дупликациях) или наличие таковых (при дупликациях большего размера) [2, 3, 8, 12, 16]. Как указывают многие наблюдения, различия фенотипических особенностей в зависимости от размера дупликаций связаны с тем, что обширные дуплицированные участки хромосом, находясь в инактивированной хромосоме X, сохраняют экспрессию генов, в отличие от небольших по размеру дупликаций. В данной работе мы представляем два случая крупных дупликаций большей части длинного и короткого плеч хромосомы X у девочек с тяжелыми клиническими проявлениями.

Цель работы

Целью работы явилось выявление и уточнение хромосомной патологии молекулярно-цитогенетическими методами, исследование особенностей инактивации пораженной хромосомы X в случаях дупликаций участков Xp11.2-> pter и Xq21.3-> q28 на хромосоме X и связи с клиническими проявлениями.

Материалы и методы

Цитогенетические исследования проводились на хромосомах лимфоцитов периферической крови, культивированных стандартным методом с применением GTG и CBG окрашивания [9]. Молекулярно-цитогенетические исследования были проведены методом FISH с использованием ДНК пробы MCB (Multicolor chromosome banding) [6] и сайтспецифичных ДНК проб, включавших пробу на ген *MECP2*, участки Xpter и Xqter из коллекции лаборатории генетики и геномики психических заболеваний НИЦПЗ РАМН [10,14]. Определение особенностей инактивации хромосом X проводилось на хромосомах, культивированных с 5-бром-2-дезоксимурином (BrdU), введенным в клеточную культуру за 6 часов до конца культивирования, по репликационному рисунку хромосом, окрашенных красителем Hoechst 33258 с применением центромерной ДНК пробы на хромосому X [15].

Результаты исследований

Мы приводим описания двух случаев.

Случай 1. Девочка в возрасте 5,5 лет имела следующие клинические проявления: грубую задержку физического, психомоторного и психоречевого развития, микроцефалию, атонически-астатический синдром, поражение зрительных проводящих путей обоих глаз, гипертелоризм глазных щелей, гипертрофию десен, короткую шею, клинодактилию, арахнодактилию, поперечную складку на обеих ладонях, изменения на МРТ по типу адренолейкодистрофии, эпилепсию, спленомегалию, очаги депигментации и гиперпигментации на коже.

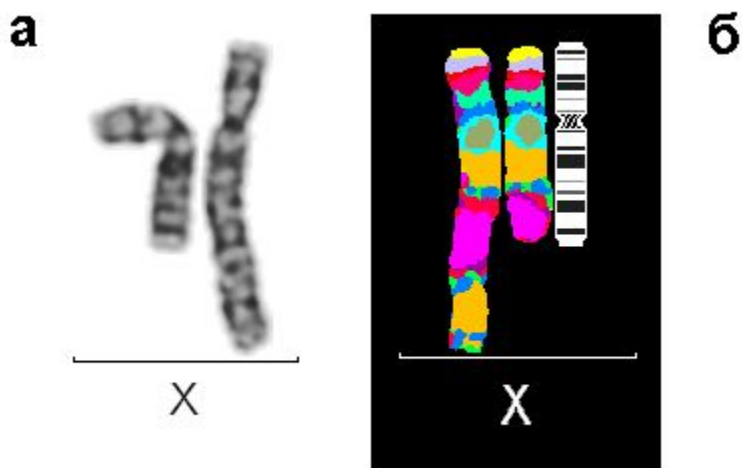


Рис. 1. Результаты исследований пациента 1: (а) Нормальная и anomальная хромосомы X после цитогенетического анализа, GTG-окраска; (б) Результат флюоресцентной гибридизации с MCB ДНК зондом на хромосому X

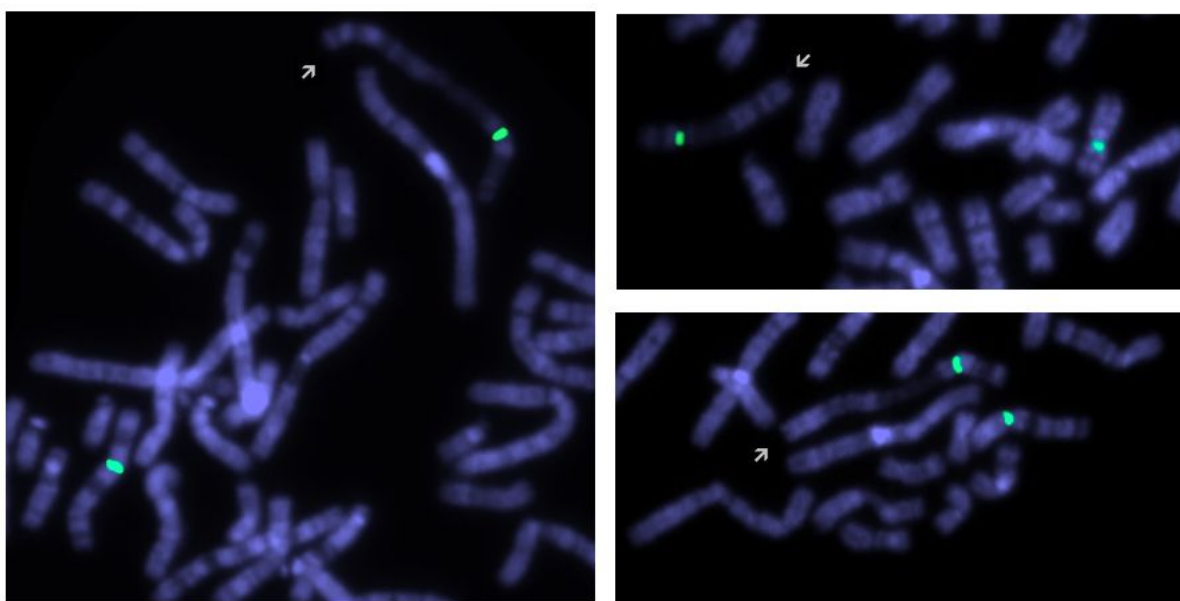


Рис 2. Результаты исследования паттерна репликации пациента: зеленый сигнал маркирует центромеру хромосомы X. Anomальная хромосома (указана стрелкой) демонстрирует рисунок поздней репликации. Светло окрашенные участки соответствуют наиболее рано реплицирующимся участкам (до введения BrdU).

При цитогенетическом исследовании у девочки был обнаружен дополнительный материал на длинном плече хромосомы X, определенный по GTG-окраске, как инвертированная дупликация длинного плеча хромосомы X. Помимо этого был выявлен дополнительный клон клеток с кариотипом 45,X. Молекулярно-цитогенетическое исследование с MCB пробой на хромосому X и ДНК пробой на ген *MESP2* позволило уточнить аномалию, как инвертированную дупликацию с частичной трипликацией длинного плеча (рис. 1). Кариотип пробанда после проведенных исследований следующий:

46,X,der(X)dup(q21.3q28)trp(q21.3q25)[57]/45,X[43]. Аномальная хромосома X была инактивирована в 100% клеток (рис. 2). Кариотипы родителей были нормальные.

Случай 2. Девочка в возрасте 10 месяцев имела грубую задержку психомоторного и психоречевого развития, врожденный порок сердца, эпилепсию, эпикант, аномальный разрез глазных щелей, запавшую переносицу, диспластичные ушные раковины, дополнительный сосок. Цитогенетическое исследование выявило дополнительный материал неизвестного происхождения на длинном плече хромосомы X. После проведения молекулярно-цитогенетического исследования с МСВ пробой на хромосому X и сайнс-пецифичными ДНК пробами, было определено, что данный материал является коротким плечом хромосомы X (рис. 3). Мозаицизм в этом случае отсутствовал. Кариотип пробанда был следующим: 46,X,der(X)dup(X)(p11.2pter),9ph или полная запись кариотипа: 46,X,der(X)(Xpter->Xq28::Xp11.2->Xpter),9ph.

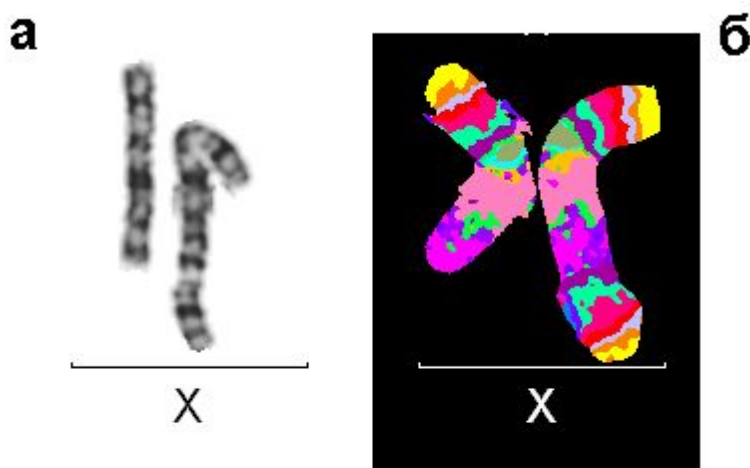


Рис. 3. Результаты исследований пациента 2: (а) нормальная и аномальная хромосомы X после цитогенетического анализа, GTG-окраска; (б) Результат флюоресцентной гибридизации с МСВ ДНК зондом на хромосому X.

При исследовании особенностей инактивации хромосом X, было выявлено 8% клеток, где аномальная хромосома была активной (рис. 4). Кариотипы родителей были нормальными: 46,XX и 46,XY,9ph. В обоих представленных случаях ген *MESP2*, расположенный в участке Xq28, присутствовал в аномальных хромосомах.

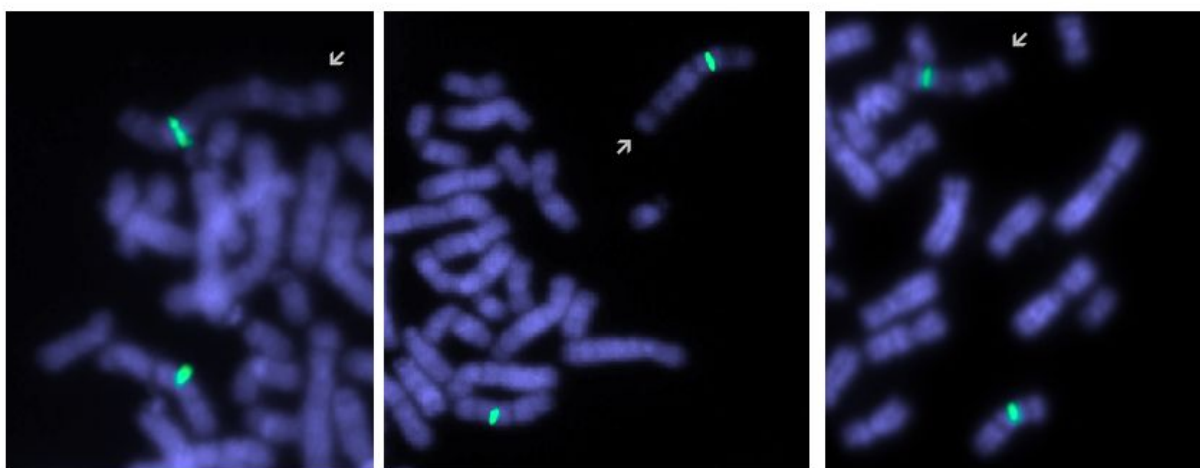


Рис. 4. Результаты исследования паттерна репликации пациента 2: зеленый сигнал маркирует центромеру хромосомы X. Аномальная хромосома (указана стрелкой) демонстрирует рисунок поздней репликации. Светло окрашенные участки соответствуют наиболее рано реплицирующимся участкам (до введения BrdU).

Обсуждение

В настоящее время в литературе описано несколько десятков случаев дубликации хромосомы X у девочек [7, 8, 11, 16]. Такие случаи рассматриваются по размерам и генонасыщенности дублицированного участка, степени инактивации аномальной хромосомы в клетках, клиническим проявлениям у пациентов и наличию или отсутствию мозаичной формы хромосомной патологии. В наших двух случаях дубликации были больших размеров: в первом случае дублицировано было почти все длинное плечо с частичной трипликацией проксимального участка, а в другом случае дубликация, которая локализовалась на конце длинного плеча, была размером, практически составлявшим все короткое плечо хромосомы X. В обоих случаях у пациентов наблюдались тяжелые клинические проявления, несмотря на то, что аномальная хромосома X была инактивирована в 100% клеток в случае 1, и в 92% в случае 2. В первом случае обнаруженный мозаицизм $46,X,der(X)[57]/45,X[43]$, вероятно, мог частично облегчать симптомокомплекс больной. Возможно, клон $45,X$, характерный для синдрома Шерешевского-Тернера, в данном случае, как ни парадоксально, оказывал положительное влияние на фенотип. Задержка физического развития у этой пациентки могла быть одним из проявлений синдрома Шерешевского-Тернера, хотя общая клиническая картина была значительно тяжелее и данному синдрому не соответствовала.

Суммируя полученные нами данные, можно сделать с большой вероятностью вывод о том, что дополнительные фрагменты хромосомы X не были инактивированы, вызывая тяжелые клинические проявления. Последние клинические наблюдения и лабораторные исследования показали, что X-инактивации подвержены в основном дублицированные фрагменты малого размера. Известно, что не все гены в хромосоме X инактивируются. Около 10-15% генов не подвергаются инактивации[4]. Эти гены распределены по длине хромосомы

X, а также в псевдоаутосомных участках (PAR), расположенных в терминальных регионах короткого и длинного плеч, и в участках, гомологичных хромосоме Y. Существует мнение о том, что негативные клинические проявления в случаях X-дупликаций вызваны влиянием дополнительной дозы этих генов [5]. Однако тяжесть клинических проявлений у пациентов с подобными перестройками хромосомы X свидетельствует не в пользу этого мнения. В наших случаях анализ репликационного рисунка на хромосомах X показал, что участки дублированного материала, наиболее удаленные от центра X-инактивации, демонстрируют рисунок, характерный для хромосом с ранней репликацией (рис. 2 и 4), что позволяет сделать предположение о транскрипционной активности генов в этих участках. Изменения рисунка репликации в дублированных участках наблюдались и другими исследователями [13]. Эти наблюдения являются подтверждением результатов, характерных для аутосомных фрагментов, транслоцированных на хромосому X [12]. Вероятно, существует общий механизм, благодаря которому, дополнительный материал на инактивированной хромосоме X остается активным. Как известно, процесс инактивации хромосомы X осуществляется за счет некодирующей XIST РНК, продуцирующейся центром инактивации XIST в участке Xq13.2 и покрывающей всю хромосому X. Возможно, случаи дополнительного материала на хромосоме X имеют связь с дозой XIST РНК. Нельзя также исключать тканеспецифических особенностей характера инактивации аномальной хромосомы X.

Заключение

Таким образом, полученные нами данные указывают на то, что обширные дублированные участки, состоящие из материала короткого или длинного плеч хромосомы X, расположенные в дистальной ее части, сохраняют свою транскрипционную активность, тогда как сама перестроенная хромосома подвергается инактивации. Для более полного понимания эпигенетических механизмов, за счет которых дополнительные фрагменты ДНК хромосомы X могут не инактивироваться, требуются дальнейшие молекулярные и молекулярно-цитогенетические исследования.

Исследование выполнено за счет гранта Российского Научного Фонда (проект №14-15-00411).

Список литературы

1. Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б., Чернышов В.Н. Медицинская цитогенетика (учебное пособие). – М. МЕДПРАКТИКА-М, 2006. – С. 300.
2. Armstrong L., McGowan-Jordan J., Brierley K., Allanson J.E. De novo dup(X)(q22.3q26) in a girl with evidence that functional disomy of X material is the cause of abnormal phenotype // *Am J Med Genet.* – 2003. – Т.116. - №1. –Р. 71-76.

3. Aughton D.J., Al Saadi A.A., Jhonson J.A., Transue D.J., Trock G.L. Dup(X)(q13-qter) in a girl with growth retardation, microcephaly, developmental delay, seizures, and minor anomalies // *Am J Med Genet.* –1993. – T.46. - №2. – P. 395-400.
4. Berletch J.B., Yang F., Xu J., Carrel L., Disteche C.M. Genes that escape from X inactivation // *Hum Genet.* – 2011. – T.130. - №2. – P. 237–245.
5. Carrel L., Willard H.F. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females // *Nature.* – 2005. – T.17. - №434(7031). –P.400-4
6. Liehr T., Weise A., Heller A., Starke H., Mrasek K., Kuechler F., Weier H-U G., Claussen U. Multicolor chromosome banding (MCB) with YAC/BAC-based probes and region-specific microdissection DNA libraries // *Cytogen. Genome Res.* –2002. –T.97. - №1-2. – P. 43-50.
7. Ozer O., Yilmaz Z., Simsek E., Derbent M., Guner S., Sahin F.I. Two patients with X chromosome duplication: dupXp and dupXq // *Balk J Med Genet.* – 2009. – T.12. - №2. –P.59-63
8. Schinzel A. Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man // 2nd ed. Walter de Gruyter Inc., Berlin. – 2001. – P. 966.
9. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. // *Lancet*, 1972.- 2.-971-972.
10. Soloviev I.V., Yurov Y.B., Ioannou P., Georghiou A., Hadjimarcou M., Patsalis P.C., Roizes G., Sharonin V.O., Kravets V.S., Vorsanova S.G. Identification and molecular-cytogenetic characterization of large subset of human plasmids, cosmids PAC and YAC clones: the search of DNA probes for pre- and postnatal diagnosis // *Cs Pediatr.* – 1997. – T.52. - №7. – P. 529-538.
11. Stankiewicz P., Thiele H., Schlicker M., Cseke- Friedrich A., Bartel-Friedrich S., Yatsenko S.A., Lupski J.R., Hansmann I. Duplication of Xq26.2-q27.1, including SOX3, in a mother and daughter with short stature and dyslalia // *Am J Med Genet A.* –2005. –T.138. - №1. – C. 11-17.
12. Tannan N.B., Brahmachary M., Garg P., Borel C., Alnefaie R., Watson C.T., Thomas N.S., Sharp A.J. DNA methylation profiling in X autosometranslocations supports a role for L1 repeats in the spread of X chromosome inactivation // *Hum. Mol. Genet.*, –2013. - №1. –P. 13.
13. Vokac N.K., Ciglenecki P.S., Erjavec A., Zagradisnik B., Zagorac A. Partial Xp duplication in a girl with dysmorphic features: the change in replication pattern of late- replicating dupX chromosome // *Clin Genet.* –2002. – T.61. - №1. – P. 54-61.
14. Yurov Y.B., Soloviev I.V., Vorsanova S.G., Alexandrov I.A., Sharonin V.O., Monachov V. DNA probes for pre- and postnatal diagnosis of chromosomal anomalies: a collection for FISH analysis // *Cs Pediatr.* –1997.- №7. – P. 550-554.
15. Yurov Y.B., Vorsanova S.G., Kolotii A.D., Iourov I.Y., Sheinson P.M., Monakhov V.V. FISH analysis of DNA replication of chromosome X loci in Rett syndrome using interphase fluorescence in situ hybridization // *Brain Development.* – 2002. – T.24. - №6. – P. 558-559.
16. Zhang A., Weaver D.D., Palmer C.G. Molecular cytogenetic identification of four X chromosome duplications // *Am J Med Genet.* – 1997. – T.68. - №1. – P. 29-38.

