

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2022.12.60-63>

Оценка частоты рекомбинации в инверсионной петле у носителя полиморфной парацентрической инверсии 8p23.1

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

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова»,
115522, Россия, г. Москва, ул. Москворечье, д.1

Парацентрическая инверсия 8p23.1 является одной из самых протяженных полиморфных инверсий у человека. В результате патологической мейотической сегрегации парацентрической инверсии образуются гаметы и впоследствии зиготы с рекомбинантными хромосомами, а именно с хромосомным/геномным дисбалансом в виде инвертированной дупликации со смежной делецией (inv dup del) или с терминальной делецией (del). В исследовании впервые проведена оценка частоты рекомбинации в инверсионной петле у носителя полиморфной парацентрической инверсии 8p23.1. Установлено, что в мужском гаметогенезе при гетерозиготном носительстве данной инверсии частота мейотической рекомбинации составляет 0,03%.

Ключевые слова: парацентрическая инверсия, рекомбинантная хромосома, FISH, inv dup del(8p), мейотическая рекомбинация.

Для цитирования: Юрченко Д.А., Тарлычева А.А., Миньженкова М.Е., Маркова Ж.Г., Шилова Н.В. Оценка частоты рекомбинации в инверсионной петле у носителя полиморфной парацентрической инверсии 8p23.1. *Медицинская генетика* 2022; 21(12): 60-63.

Автор для корреспонденции: Юрченко Дарья Александровна; e-mail: dashalbv@mail.ru

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

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Дата представления рукописи: 20.11.2022

Estimation of the frequency of recombination in the inversion loop in a carrier of polymorphic paracentric inversion 8p23.1

Yurchenko D.A., Tarlycheva A.A., Minzhenkova M.E., Markova Zh.G., Shilova N.V.

Research Centre for Medical Genetics
1, Moskvorechye str., Moscow 115522, Russian Federation

The 8p23.1 paracentric inversion is the largest polymorphic inversion in the human genome. As a result of meiotic malsegregation of paracentric inversion, gametes and subsequently zygotes are formed with recombinant chromosomes, namely with a chromosomal genomic imbalance such as an inverted duplication with an adjacent deletion (inv dup del) or with a terminal deletion (del). In this study, for the first time, the frequency of recombination in the inversion loop was estimated in a carrier of polymorphic paracentric inversion 8p23.1. It was shown that the frequency with which meiotic recombination happens in male gametogenesis is 0.03%.

Keywords: paracentric inversion, recombinant chromosome, FISH, inv dup del(8p), meiotic recombination.

For citation: Yurchenko D.A., Tarlycheva A.A., Minzhenkova M.E., Markova Zh.G., Shilova N.V. Estimation of the frequency of recombination in the inversion loop in a carrier of polymorphic paracentric inversion 8p23.1. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]* 2022; 21(12): 60-63. (In Russ.)

Corresponding author: Darya A. Yurchenko; e-mail: dashalbv@mail.ru

Funding. The reported study was funded by research work № 122032300370-1 «Study of structure-functional features and mechanisms formation of the chromosomal abnormalities and genomic imbalance».

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Accepted: 20.11.2022

Введение

Полиморфные парацентрические инверсии (ППИ) довольно широко представлены в геноме человека. Одной из самых частых и протяженных является субмикроскопическая ППИ короткого плеча хромосомы 8, локализованная в хромосомном регионе 8p23.1, размером около 4,7 млн п.н. [1]. Частота гетерозиготного носительства данной инверсии у индивидуумов европейского происхождения составляет 26% [2]. Риск образования несбалансированных гамет у гетерозиготных носителей парацентрической инверсии в основном зависит от возникновения рекомбинационных событий в инвертированном сегменте хромосомы. В пахитене профазы мейоза I при конъюгации хромосомы с инверсией со своим нормальным гомологом образуется петлевая структура, так называемая инверсионная петля, для достижения полного гомосинапсиса. В результате кроссинговера в пределах петли при последующей сегрегации хромосом формируются дицентрическая хромосома и ацентрический фрагмент. Оба продукта мейотической рекомбинации нестабильны. Ацентрический фрагмент теряется в процессе клеточного деления, а дицентрическая хромосома претерпевает разрыв с образованием двух реципрокных продуктов — хромосомы с инвертированной интерстициальной дупликацией со смежной терминальной делецией (*inv dup del*) и хромосомы с терминальной делецией на этом же плече [3-5].

Инвертированная дупликация со смежной терминальной делецией короткого плеча хромосомы 8 (*inv dup del*(8p)) является рекуррентной комплексной конституциональной структурной хромосомной перестройкой, которая встречается с частотой 1/10000—1/30000 живорожденных и относится к синдромальной хромосомной патологии (ORPHA#96092) [6]. В качестве основного механизма формирования рекуррентной *inv dup del*(8p) выделяют патологическую мейотическую сегрегацию парацентрической инверсии в коротком плече хромосомы 8 вследствие кроссинговера в инверсионной петле в гаметогенезе одного из родителей, гетерозиготного носителя ППИ [6,7].

На сегодняшний день мнения о реализации механизма сегрегации парацентрических инверсий противоречивы. Предполагается, что ввиду небольшого размера парацентрической инверсии 8p23.1 вероятность рекомбинационного события очень мала [8, 9], однако точные данные о частоте рекомбинации в инверсионной петле отсутствуют.

Цель: оценить частоту гамет с рекомбинантными хромосомами у гетерозиготного носителя ППИ хромосомы 8(p23.1).

Материалы и методы

Материалом для исследования являлись образцы эякулята от мужчины, гетерозиготного носителя парацентрической инверсии 8(p23.1), отца пациента с синдромом *inv dup del*(8p), и мужчины с нормальным кариотипом в качестве контроля (**рис. 1А**). Для установления носительства парацентрической инверсии использовали метафазную FISH на культивированных лимфоцитах периферической крови с двумя несерийными ДНК-зондами, размером около 30 т.п.н. каждый на регион 8p23.1 (*chr8*(hg19):11,612,228—11,642,422; *chr8*(hg19):8,145,883—8,175,123), полученными методом ПЦР длинных фрагментов и мечеными в реакции *nick*-трансляции различными флуорохромами.

Молекулярно-цитогенетическое исследование препаратов эякулята проводили с использованием коммерческих ДНК-зондов: Subtel 8p (Sp.Green); CEP 8 (Sp.Orange); CEP 18 (Sp.Aqua) (Kreatech, Нидерланды).

Анализ гибридизационных сигналов осуществляли на эпифлуоресцентном микроскопе «AxioImager M.1» (CarlZeiss, Германия) с соответствующим набором светофильтров и использованием компьютерной программы обработки цифровых изображений «Isis» (MetaSystems, Германия).

Результаты и обсуждение

FISH с комбинацией ДНК-зондов на субтеломерную область короткого плеча и центромерный район хромосомы 8 обеспечивает возможность детектировать как нерекомбинантные (хромосома с родительской инверсией или интактная, неперестроенная хромосома), так и рекомбинантные хромосомы (дицентрическая хромосома, *inv dup del*(8p) или *del*(8p)). Использование трёх коммерческих ДНК-зондов на соответствующие районы позволило идентифицировать все возможные сегрегационные варианты ППИ 8p23.1 по различному паттерну гибридизации в сперматозоидах (**рис. 1Б**).

В гаметах с нерекомбинантными хромосомами наблюдаются один зеленый и один красный гибридизационные сигналы. При наличии в гаметах рекомбинантных хромосом не будет визуализироваться зеленый гибридизационный сигнал, поскольку на всех хромосомах имеет место терминальная делеция короткого плеча хромосомы 8. При этом гаметы с рекомбинантной дицен-

трической хромосомой можно определить по наличию двух красных гибридизационных сигналов, соответствующих центромерному району хромосомы 8. Гаметы, содержащие *inv dup del(8p)* или *del(8p)* при FISH-анализе дифференцировать не представляется возможным, поскольку в них визуализируется только один красный гибридизационный сигнал от центромерного района хромосомы 8. Для контроля плоидности клетки был использован коммерческий ДНК-зонд на центромерную область хромосомы 18 (голубой гибридизационный сигнал).

В ходе исследования было проанализировано около 10 тыс. ядер сперматозоидов у мужчины-носителя

парацентрической инверсии 8p23.1 и в контрольном образце. Результаты молекулярно-цитогенетического и исследования представлены в **таблице**.

Рекомбинантные хромосомы в сперматозоидах были выявлены только у мужчины-носителя парацентрической инверсии 8p23.1 и представлены как дицентрической хромосомой 8, так и реципрокными продуктами ее разрыва *inv dup del(8p)* и *del(8p)*. Неожиданным явилось обнаружение в исходе мейоза II дицентрической хромосомы, которая, будучи нестабильной, должна претерпевать разрыв при метафазно-анафазном переходе еще в мейозе I [8]. Однако

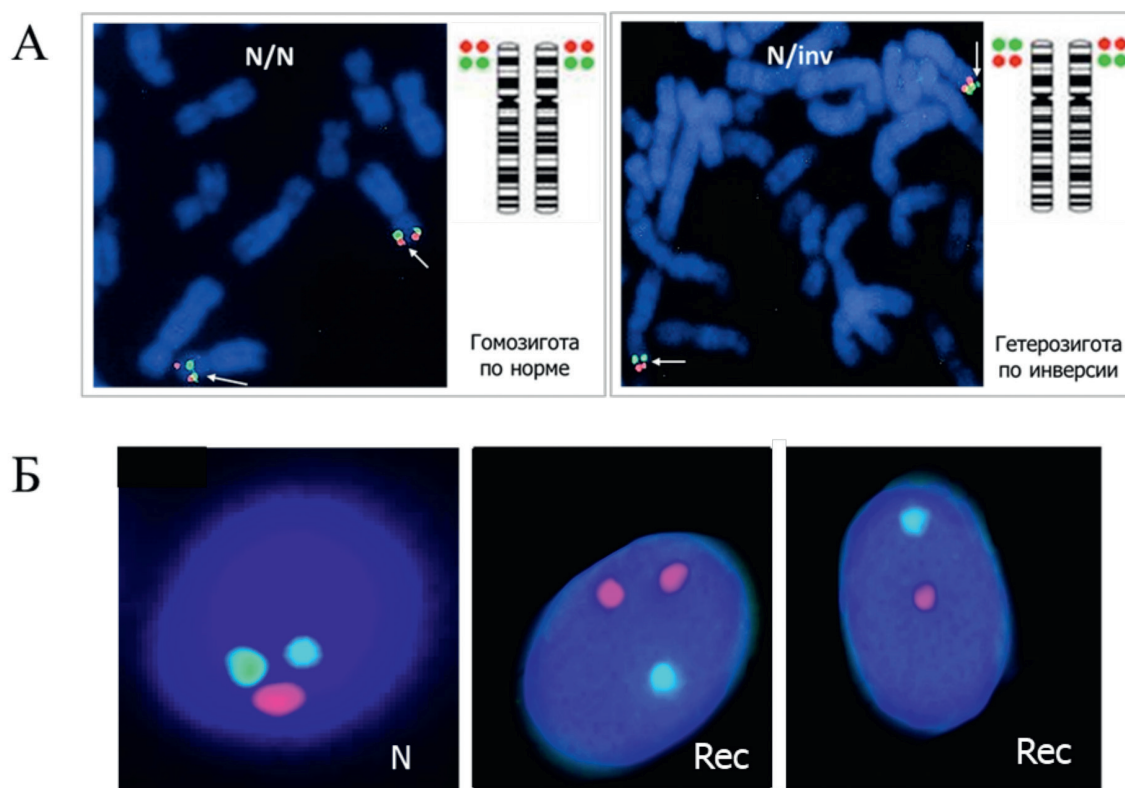


Рис. 1. Результаты молекулярно-цитогенетического исследования: А. Результат FISH с несерийными (homemade) ДНК-зондами на короткое плечо хромосомы 8: слева – парацентрическая инверсия не выявлена; справа – полиморфная инверсия 8p23.1. Б. Распределение гибридизационных сигналов в гаметах гетерозиготного носителя парацентрической инверсии при FISH с субтеломерными ДНК-зондами на р-плечо хромосомы 8 (зеленый сигнал), центромерный район хромосомы 8 (красный сигнал) и центромерный район хромосомы 18 (голубой сигнал): N – ядро сперматозоида с интактной хромосомой 8, Rec – ядро сперматозоида с рекомбинантными хромосомами (с дицентрической хромосомой 8 в центре, с *inv dup del(8p)/del(8p)* справа).

Fig. 1. Results of a molecular cytogenetic study: A. FISH with non-serial (homemade) DNA probes on the short arm of chromosome 8: on the left, paracentric inversion was not detected; on the right, polymorphic inversion 8p23.1. B. FISH with subtelomeric DNA probes on the p-arm (green signal) and the centromeric region of chromosome 8 (red signal) and the centromeric region of chromosome 18 (blue signal) in gametes of a heterozygous carrier of paracentric inversion. N is the nucleus with an intact chromosome 8, Rec – nuclei with recombinant chromosomes (dicentric chromosome 8 in the center and *inv dup del(8p)/del(8p)* on the right).

Результат FISH-исследования ядер сперматозоидов гетерозиготного носителя парацентрической инверсии 8p23.1 и индивидуума с нормальным кариотипом

FISH study of sperm nuclei of a heterozygous carrier of paracentric 8p23.1 inversion and an individual with a normal karyotype

Образец	N		Rec		Диплоидия		Дисомия		Всего клеток
	Кол-во клеток	%	Кол-во клеток	%	Кол-во клеток	%	Кол-во клеток	%	
контроль	8 665	99,7	—	—	10	0,1	15	0,2	8 700
inv(8) (p23.1p23.1)	10 000	99,8	3	0,03	10	0,1	3	0,03	10 016

Примечание: N — нормальная хромосома 8/хромосома с инверсией; Rec — рекомбинантная хромосома.

имеется сообщение о рождении ребенка с мозаичной формой синдрома inv dup del(8p), что демонстрирует возможность постзиготического разрыва дицентрической хромосомы 8 [10].

Частота гамет с рекомбинантными хромосомами у гетерозиготного носителя ППИ в коротком плече хромосомы 8 составила 0,03%, что свидетельствует о низкой частоте рекомбинации в гаметогенезе. Эти данные подтверждают предположение, что при инверсии небольшого размера вероятность рекомбинантного события очень мала [9].

Несмотря на то, что популяционная частота гетерозиготного носительства ППИ 8p23 достаточно высока, не было зарегистрировано ни одного повторного случая рождения в семье ребенка с синдромом inv dup del(8p) [6, 11]. Полученные нами экспериментальные данные, демонстрирующие очень низкую частоту формирования гамет и впоследствии зигот с хромосомным дисбалансом, позволяют объяснить этот факт.

Оценка частоты рекомбинационных событий в гаметогенезе важна не только для дальнейшего понимания механизмов формирования хромосомной аномалии inv dup del, но и позволяет индивидуализировать повторный риск рождения ребенка с хромосомной патологией для оптимизации медико-генетического консультирования.

Выводы

При молекулярно-цитогенетическом исследовании сперматозоидов у гетерозиготного носителя полиморфной парацентрической инверсии 8(p23.1) установлены относительная стабильность дицентрической хромосомы 8 и крайне низкая частота формирования гамет с рекомбинантными хромосомами, что свидетельствует о низкой вероятности рекомбинации в инверсион-

ной петле и позволяет считать повторный риск рождения ребенка с inv dup del(8p) низким.

Литература/References

1. Sugawara H., Harada N., Ida T., et al. Complex low-copy repeats associated with a common polymorphic inversion at human chromosome 8p23. *Genomics*. 2003;82(2):238–44. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0888-7543\(03\)00108-3](https://doi.org/10.1016/s0888-7543(03)00108-3).
2. Giglio S., Broman K.W., Matsumoto N. et al. Olfactory receptor-gene clusters, genomic-inversion polymorphisms, and common chromosome rearrangements. *Am J Hum Genet*. 2001;68(4):874–883. DOI: <https://doi.org/10.1086/319506>.
3. Rowe L.R., Lee J.-Y., Rector L., et al. U-type exchange is the most frequent mechanism for inverted duplication with terminal deletion rearrangements. *J Med Genet*. 2009;46(10):694–702. DOI: <https://doi.org/10.1136/jmg.2008.065052>.
4. Yu S., Graf W.D. Telomere capture as a frequent mechanism for stabilization of the terminal chromosomal deletion associated with inverted duplication. *Cytogenet Genome Res*. 2010;129(4):265–74. DOI: <https://doi.org/10.1159/000315887>.
5. Zuffardi O., Bonaglia M., Ciccone R., Giorda R. Inverted duplications deletions: underdiagnosed rearrangements? *ClinGenet*. 2009;75(6):505–13. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2009.01187.x>.
6. Garcia-Santiago F.A., Martinez-Glez V., Santos F., et al. Analysis of invdupdel(8p) rearrangement: Clinical, cytogenetic and molecular characterization. *Am. J. Med. Genet. Part A*. 2015;167A(5):1018–25. DOI: <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36879>.
7. Shimokawa O., Kurosawa K., Ida T. et al. Molecular characterization of inv dup del(8p): Analysis of five cases. *Am J Med Genet*. 2004;128A(2):133–7. DOI: <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30063>.
8. Gardner R.J., Amor D.J. Gardner and Sutherland's Chromosome Abnormalities and Genetic Counselling (5 ed.). Oxford University Press. 2018.
9. Anton E., Blanco J., Egozcue J., et al. Sperm studies in heterozygote inversion carriers: a review. *Cytogenet Genome Res*. 2005;111(3–4):297–304. DOI: <https://doi.org/10.1159/000086903>.
10. Vermeesch J.R. Mosaicism del(8p)/inv dup(8p) in a dysmorphic female infant: a mosaic formed by a meiotic error at the 8p OR gene and an independent terminal deletion event. *Journal of Medical Genetics*. 2003;40(8), 93e–93. DOI: <https://doi.org/10.1136/jmg.40.8.e93>.
11. Okur V., Hamm L., Kavus H., et al. Clinical and genomic characterization of 8p cytogenomic disorders. *Genet. Med*. 2021;23(12):2342–2351. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41436-021-01270-2>.