

Спонтанная хромосомная нестабильность в клетках с кольцевой хромосомой как основа хромосомной терапии

Кашеварова А.А.^{1*}, Беляева Е.О.¹, Никонов А.М.², Плотникова О.В.²,
Гергерт И.Г.³, Никитина Т.В.¹, Скрябин Н.А.¹, Мензоров А.Г.⁴, Гридина М.М.⁴,
Васильев С.А.¹, Лопаткина М.Е.¹, Савченко Р.Р.¹, Чурилова А.В.⁵,
Толмачева Е.Н.¹, Серов О.Л.⁴, Назаренко Л.П.¹, Лебедев И.Н.¹

¹ Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск

² Краевое государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Диагностический центр Алтайского края», Барнаул

³ Алтайский Краевой Клинический Перинатальный центр «Дар», Барнаул

⁴ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск

⁵ ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск

* e-mail: anna.kashevarova@medgenetics.ru

Протяженные хромосомные аберрации часто являются причиной задержки психомоторного развития, интеллектуальных нарушений и врожденных пороков развития. Несмотря на высокую частоту мутаций, вовлекающих, как правило, нескольких генов, а также большое разнообразие самих хромосомных аномалий, в настоящее время не существует способов эффективного лечения таких пациентов. Цель – изучение спонтанной хромосомной нестабильности у пациентов с кольцевыми хромосомами в дифференцированных и индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (ИПСК). У пациентов с интеллектуальными нарушениями и аномалиями развития в ходе стандартного кариотипирования выявлены кольцевые хромосомы 13 и 22. С использованием микрочипов Agilent 860K в кариотипе пробандов идентифицирован ряд дополнительных хромосомных мутаций. ИПСК получены путем экзогенной экспрессии транскрипционных факторов (KLF4, OCT4, SOX2 и c-MYC человека) из фибробластов кожи. У пациентов идентифицированы терминальные делеции 13q34 и 22q13.32-q13.33, обусловившие образование кольцевых хромосом 13 и 22, соответственно. Методом FISH-анализа подтверждено наличие кольцевых хромосом и установлено, что доля лимфоцитов с моносомией по хромосоме 13 составила 47%, по хромосоме 22 – 8%. На первом пассаже 50% и 24% фибробластов оказались моносомными по хромосомам 13 и 22 соответственно. На 9 пассаже зарегистрировано 56% фибробластов с моносомией по хромосоме 13. Среди лимфоцитов и фибробластов на 9 пассаже 1,8% и 1% клеток соответственно имели нормальный кариотип. К 33 пассажу число фибробластов с моносомией по хромосоме 22 достигло 44% и статистически значимо превысило исходный уровень ($p < 0,05$). Доля ИПСК, моносомных по хромосоме 22, варьировала в пределах 6,3–17% для разных клонов. Наличие моносомных клеток у пациентов с кольцевой хромосомой указывает на хромосомную нестабильность уже *in vivo*. *In vitro* наблюдается статистически значимое увеличение числа клеток с моносомией по хромосоме 22. Клетки с нормальным кариотипом могут являться свидетельством процессов коррекции хромосомного дефекта, что лежит в основе начинавшей разрабатываться так называемой «хромосомной терапии» генетических заболеваний.

Ключевые слова: интеллектуальные расстройства, кольцевые хромосомы, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, хромосомная нестабильность, хромосомная терапия.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Экспериментальная часть исследования выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 16-15-10231. Клиническое обследование пациентов проведено в рамках темы поисковых научных исследований «Разработка алгоритма молекулярно-цитогенетической диагностики кольцевых хромосом пациентов с множественными врожденными пороками развития и задержкой интеллектуального развития» государственного задания ФАНО РФ для НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Spontaneous chromosomal instability in cells with a ring chromosome as the basis for chromosomal therapy

Kashevarova A.A.^{1*}, Belyaeva E.O.¹, Nikonov A.M.², Plotnikova O.V.³,
Gergert I.G.³, Nikitina T.V.¹, Skryabin N.A.¹, Menzorov A.G.⁴, Gridina M.M.⁴,
Vasilyev S.A.¹, Lopatkina M.E.¹, Savchenko R.R.¹, Churilova A.V.⁵,
Tolmacheva E.N.¹, Serov O.L.⁴, Nazarenko L.P.¹, Lebedev I.N.¹

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk

² Diagnostic Center of the Altai Region, Barnaul

³ Altai Regional Clinical Perinatal Center «Dar», Barnaul

⁴ Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

⁵ Tomsk State University, Tomsk

* e-mail: anna.kashevarova@medgenetics.ru

Introduction: Extensive chromosomal aberrations are often associated with psychomotor development delay, intellectual disability, and congenital malformations. Despite the high frequency of mutations and due to the involvement, as a rule, of several genes, as well as the wide variety of chromosomal abnormalities themselves, there are currently no ways to effectively treat such patients. **Aim:** To study spontaneous chromosomal instability in patients with ring chromosomes in differentiated and induced pluripotent stem cells (iPSC). **Materials and methods:** In patients with intellectual disability and developmental abnormalities, ring chromosomes 13 and 22 were identified during standard karyotyping. A number of additional chromosomal mutations in their karyotype were identified using Agilent 860K microarrays. FISH analysis confirmed ring chromosomes and found mosaicism for them in lymphocytes, fibroblasts, and iPSCs of the patients. iPSCs were obtained from skin fibroblasts by exogenous expression of transcription factors (KLF4, OCT4, SOX2, and human c-MYC). **Results:** Terminal 13q34 and 22q13.32-q13.33 deletions were identified in patients, resulting in the formation of ring chromosomes 13 and 22, respectively. FISH analysis confirmed the presence of ring chromosomes and found that 47% and 8% of lymphocytes of the patients had monosomies 13 and 22, respectively. At the first passage 50% and 24% of the fibroblasts were monosomic for chromosomes 13 and 22, respectively. On the 9th passage 56% of fibroblasts demonstrated monosity 13. Among the lymphocytes and fibroblasts at the 9th passage, 1.8% and 1% of the cells, respectively, had a normal karyotype. By the 33rd passage, the number of fibroblasts with monosity 22 reached 44% and statistically significantly exceeded the initial level ($P < 0.05$). The proportion of iPSC monosomic for chromosome 22 varied between 6.3–17% for different clones. **Conclusion:** The presence of monosomic cells in patients with a ring chromosome indicates chromosomal instability already in vivo. In vitro a statistically significant increase in the number of cells with monosity 22 is observed. Cells with normal karyotype can be evidence of chromosomal defect correction processes, which are the basis of the chromosomal therapy of genetic diseases that is beginning to be developed.

Key words: intellectual disability, ring chromosomes, induced pluripotent stem cells, chromosomal instability, chromosomal therapy.

Интеллектуальные расстройства в детском возрасте в среднем в разных популяциях встречаются с частотой 1–3% [1]. Причинами данной патологии являются как средовые, так и генетические факторы. Последние обуславливают заболевание у 50–60% пациентов. Несмотря на значительный прогресс в области клинической и молекулярной диагностики интеллектуальных нарушений, определение генетических причин заболевания все еще остается проблемным вследствие их гетерогенности, в результате которой различные генетические нарушения приводят к клинически трудноразличимым фенотипам. По последним данным, более 800 генов участвуют в патогенезе синдромальных и несиндромальных форм интеллектуальных расстройств, в то время как по предварительным оценкам в геноме таких генов может насчитываться около 2000 [2]. Учитывая огромное количество вовлеченных генов и клинический полиморфизм заболеваний, на сегодняшний день для них нет специфической терапии, а пациентам может быть предложено только симптоматическое облегчение состояния.

Недавно была высказана идея о так называемой «хромосомной терапии» заболеваний, обусловленных протяженными хромосомными мутациями. В ее основу лег феномен потери кольцевой хромосомы при культивировании индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), полученных из фибробластов пациентов с микроделекционными синдромами, возникшими вследствие терминальной хромосомной микроделции при образовании кольца [3, 4]. Дальнейшее удвоение оставшегося нормального гомолога может привести к нормализации числа и структуры хромосом в кариотипе, а направленная дифференцировка ИПСК с редактированным кариотипом в заданный тип клеток может составить основу заместительной клеточной терапии. Данная идея инициировала настоящее исследование, целью которого явилось изучение особенностей спонтанной хромосомной нестабильности у пациентов

с кольцевыми хромосомами в дифференцированных клетках и ИПСК.

Материалы и методы

Лимфоциты периферической крови и фибробlastы кожи были получены от пробандов с интеллектуальными нарушениями и аномалиями развития, у которых методом стандартного кариотипирования были выявлены кольцевые хромосомы 13 и 22. С использованием микрочипов Human Genome CGH Microarray Kits 8 x 60K (Agilent Technologies, США) проведено исследование точек разрывов делеций, обусловивших замыкание хромосом в кольцо, а также полногеномный поиск других возможных генетических аномалий [5]. Интерпретация CNVs проведена с использованием базы данных геномных вариантов (DGV) [6] и онлайн-версии каталога наследственных болезней «Мендельевское наследование у человека» (OMIM) [7]. Патогенетически значимые CNV подтверждены методом ПЦР в реальном времени, и определено их происхождение. Последовательности праймеров приведены в табл. 1. В качестве контрольного локуса был использован ген *HEXB* (5q13.3).

Структура кольцевых хромосом и их частота при культивировании лимфоцитов периферической крови, первичной культуры фибробластов кожи и полученных из них ИПСК исследованы FISH-методом с зондами на центромеры хромосом 13/21 (D13Z1/D21Z1), 14/22 (D14Z1/D22Z1), субтеломерным зондом 13q и зондом на ген *TBC1D22A*, локализованный в дистальной области длинного плеча хромосомы 22 и попавший в область микроделции при образовании кольцевой хромосомы. Клоны *E.coli*, несущие плазмида со вставками центромероспецифичных альфа-сателлитных последовательностей ДНК, а также BAC-клон bA569D были любезно предоставлены профессором М. Роччи (Resources for Molecular Cytogenetics, Институт генетики г. Бари, Ита-

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

лия). Зонд на ген *TBC1D22A* был получен в ходе ПЦР длинных фрагментов (набор BioLabMix, Россия). Последовательности праймеров приведены в табл. 1. Зонды 13q, 14/22 и 13/21, *TBC1D22A* были мечены TAMRA-dUTP и Fluorescein-dUTP соответственно (BioSan, Россия).

Фибробlastы кожи пациентов с кольцевыми хромосомами 13 и 22 трансдуцированы в ИПСК путем экзогенной экспрессии транскрипционных факторов KLF4, OCT4, SOX2 и c-MYC человека в клетках-мишениях с использованием лентивирусных векторов LeGO. Эти векторы содержат транскрипционные факторы человека и репортерный ген зеленого флуоресцентного белка (green fluorescent protein, *GFP*). Использование гена *GFP* позволяло оценивать эффективность трансфекции фибробластов лентивирусами по свечению зеленого флуоресцентного белка. Получение ИПСК проводили по протоколу, предложенному группой Яманака [8], с модификациями, увеличивающими эффективность пере-программирования, в частности с использованием валь-проевой кислоты — ингибитора гистоновых деацетилаз и ряда других низкомолекулярных ингибиторов.

Проведение исследования одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики

Томского НИМЦ. Информированное согласие от родителей пробандов получено. Исследование выполнено на базе Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ с использованием ресурсов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии».

Результаты и обсуждение

Спектр известных на сегодняшний день патогенных хромосомных вариаций чрезвычайно разнообразен; уже 27 тыс. мутаций представлено в базе данных геномных вариантов и фенотипов DECIPHER [9]. Если обратиться к списку основных симптомов микроделеционных и микродупликационных синдромов, описанных в каталоге OMIM, доминирующими среди них будут нарушения интеллектуального развития, поведения, речи, аномалии формы черепа, неспецифические лицевые аномалии, аномалии скелета и др. В подавляющем большинстве случаев эти аномалии обусловлены протяженной мутацией, затрагивающей много генов, фенотипические эффекты которых и пути взаимодействии могут оставаться неясными. В связи с этим, для оказания эффективной помощи больному кажется целесообразным раз-

Таблица 1

Структура праймеров для ПЦР в реальном времени и синтеза зондов для FISH-анализа

Регион	Праймер	Последовательность	Анализ
3q12.2	ADGRG7ex12 F	5'-TGCAGACAAGTGATGGTGAC-3'	ПЦР в реальном времени
	ADGRG7ex12 R	5'-ATAGTGCAGTAAGGCGGCAA-3'	
3q13.31	TUSC7 F	5'-GAGCCAGCTTCACTGGAAAC-3'	
	TUSC7 R	5'-CCCTGTGGCTCTACAAGAGG-3'	
5q13.3	HEXB F	5'-CCGGGCACAATAGTTGAAGT-3'	
	HEXB R	5'-TCCTCCAATCTGTCCATAGC-3'	
13q34	CHAMP1 F	5'-CCACCAGAACTCCGAAAGAC-3'	
	CHAMP1 R	5'-TTGCGAAGCTCTGGAGACA-3'	
22q13.32-q13.33	FAM19A5ex4 F	5'-TGAGGTTGGGTTGTCACTCA-3'	
	FAM19A5ex4 R	5'-CTGCCCTCGAAGGTGTCTAC-3'	
	SHANK3ex2 F	5'-CAGGACGCGCTCAACTATG-3'	
	SHANK3ex2 R	5'-GGTTGGCGGGTACTCCT-3'	
	ACRex2 F	5'-GGTTACGGTCAGGCAAAAC-3'	
	ACRex2 R	5'-AGTGAGCACCCATCGTGAAT-3'	
22q13.31	TBC1D22A F1	5'-TTGTGGTGGAGCACCTGTT-3'	FISH
	TBC1D22A R1	5'-AAGCAGCCAATGACCCCTCTC-3'	
	TBC1D22A F2	5'-TGACCACCATCCTCATGCAC-3'	
	TBC1D22A R2	5'-AGATTCAAGCAGACGCACCAA-3'	
	TBC1D22A F3	5'-CAATCCTCCCGTGCTATCCC-3'	
	TBC1D22A R3	5'-AGGCGAGATGACGCATAAGG-3'	
	TBC1D22A F4	5'-CCTTGTTGGGATGGGATGCT-3'	
	TBC1D22A R4	5'-GCGCCTCCCTAGTGTACCC-3'	

разработать универсальный метод коррекции хромосомных дефектов. В основу такого метода может лечь описанный недавно феномен потери кольцевой хромосомы при культивировании ИПСК, полученных из фибробластов самого пациента, с последующей дупликацией нормального гомолога и восстановлением хромосомного набора [3, 4, 10].

Нами в рамках разработки технологий хромосомной терапии ведется изучение спонтанной хромосомной нестабильности у пациентов с кольцевыми хромосомами 13 и 22 в дифференцированных клетках (лимфоциты периферической крови и фибробласти кожи) и ИПСК. Ниже мы приводим результаты клинических и молекуларно-цитогенетических исследований двух пациентов.

Случай 1. Пациент Г. с кольцевой хромосомой 13. Возраст 17 лет. На момент осмотра вес 93 кг (97 процентиль), рост 178 см (50–75 процентиль), окружность головы 58 см (98 процентиль). Отмечены глубоко посаженные глаза, изогнутая верхняя губа, аномальный рост волос на макушке, волосы жесткие, светлые, избыточный рост волос на предплечьях, микроорхидизм, сандалевидная щель стопы. В связи с задержкой полового развития состоит на учете у эндокринолога и андролога с диагнозом *гипоталамический синдром пубертатного периода на фоне резидуально-органического заболевания головного мозга с задержкой полового развития, средняя степень тяжести, перманентное течение; ожирение второй степени* [11].

В возрасте 9 лет пробанд был направлен на цитогенетическое исследование, в результате которого в периферической крови ребенка выявлена кольцевая хромосома 13 (кариотип — 46,XY,r(13)(p13q34)) (рис. 1). Для уточнения границ делеции, повлекшей за собой образование кольца, нами проведен аCGH-анализ и дополнительно выявлены микроделеции в области 13q34 (1,924 млн п.н.) и трипликация 3q12.2 (74 т.п.н.) (рис. 2). Клиническая значимость амплификации области 3q12.2 на сегодняшний день не ясна. Она выявляется как у относительно здоровых людей, так и у онкологических больных [12]. Данная трипликация приводит к образованию химерного транскрипта TFG-GPR128. Мутации в гене *TFG* (OMIM 602498) ассоциированы с нарушением белковых секреторных путей и функций периферической нервной системы. Методом ПЦР в реальном времени показано, что микроделеция возникла *de novo*, а трипликация имеет отцовское происхождение (рис. 3). В первичной культуре фибробластов кожи аCGH также выявил микроделецию 13q34 (2,099 млн п.н.), но дополнительно еще и моносомию по хромосоме 13 (рис. 4). Методом FISH с зондами на центромерные регионы хромосом 13 и 21 и субцентромерную область длинного плеча хромосомы 13 подтверждено наличие кольцевой хромосомы и обнаружено, что 50% фибробластов моносомны по хромосоме 13 (табл. 2, рис. 5). Далее моносомия 13 нами была также выявлена

в 47% культивированных лимфоцитов и 56% фибробластов на 9 пассаже (табл. 2). Полученные результаты указывают на то, что в ходе клеточного деления теряется именно кольцевая хромосома. Судя по высокому проценту моносомного клона, можно предположить, что потеря кольца произошла довольно давно, что привело к дальнейшей пролиферации двух клонов — дисомного и моносомного. Кроме того, обращает на себя внимание наличие небольшого количества клеток с нормальным кариотипом — 1,8% в лимфоцитах и 1% в фибробластах на пассаже 9, что может быть результатом потери кольцевой хромосомы 13, амплификации нормального гомолога и, следовательно, коррекции кариотипа. Именно этот спонтанный процесс и может лечь в основу разрабатываемой хромосомной терапии.

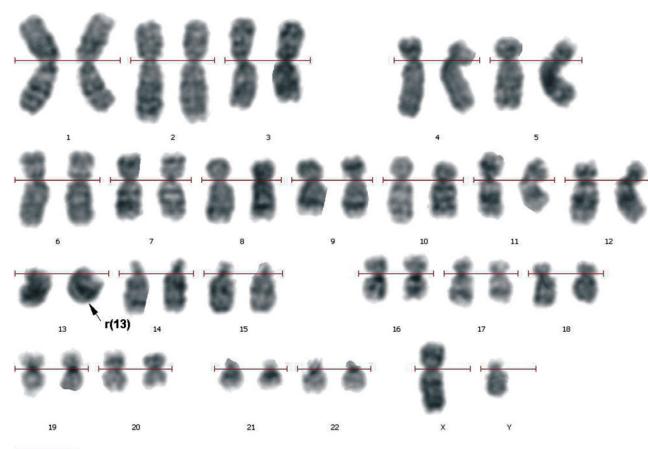


Рис. 1. Кариограмма пациента 1. Стрелкой отмечена кольцевая хромосома 13.

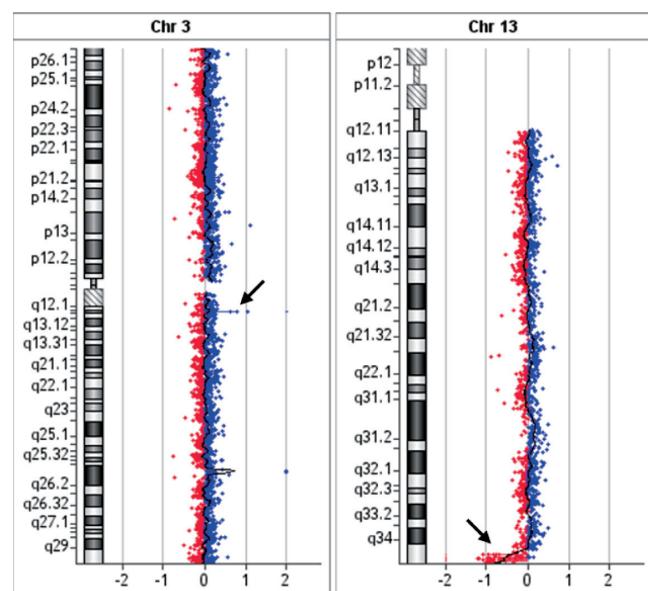


Рис. 2. aCGH профили хромосом 3 и 13 в лимфоцитах пациента 1. Стрелками отмечены трипликация 3q12.2 и микроделеция 13q34.

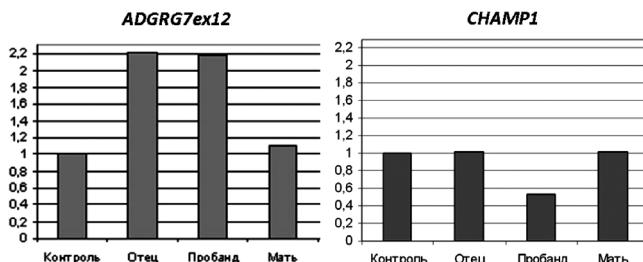


Рис. 3. Результаты ПЦР в реальном времени семьи пациента 1 с праймерами на гены *ADGRG7ex12* (*trip3q12.1*), *CHAMP1* (*del13q34*).

Случай 2. Пациентка 3. с кольцевой хромосомой 22. Возраст 4 года. Вес — 14,5 кг (25 процентиль), рост — 108 см (95 процентиль). Телосложение астеничное, узкое туловище. Из фенотипических особенностей отмечаются микроцефалия (окружность головы 45,5 см, <2 процентиля), выступающие лобные бугры, склонный затылок, прямые брови, монголоидный разрез глаз, эпикант, телекант, широкая, запавшая переносица, мясистый кончик носа, сглаженный фильтр, тонкая верх-

няя губа, короткая шея, широкое пупочное кольцо, брахидаактилия I и V пальцев кистей рук и всех пальцев ног, утолщенная дистальная фаланга больших пальцев кистей и стоп, плоско-вальгусная стопа, крестцово-копчиковая ямка. Обследование затруднено из-за беспокойства и выраженной активности девочки. На МРТ головного мозга визуализирована картина варианта Денди—Уолкера [13].

В возрасте двух лет ребенок был направлен на цитогенетическое исследование. Была выявлена кольцевая хромосома 22 (кариотип — 46,XX,r(22)) (рис. 6). Позднее на ми был проведен аCGH-анализ и идентифицирована микроделекция 22q13.32-q13.33 (рис. 7), обусловившая образование кольцевой хромосомы 22. Делекция подтверждена в ходе ПЦР в режиме реального времени; она возникла *de novo* (рис. 8). Для подтверждения кольцевой структуры хромосомы 22 был проведен FISH-анализ с зондом к центромеро-специфичной альфа-сателлитной последовательности хромосомы 22. Однако, анализируя результат гибридизации, мы обнаружили два неодинаковых по величине и интенсивности сигнала: один сигнал был крупный и

Таблица 2

Результаты интерфазного FISH-анализа лимфоцитов и фибробластов кожи пациента 1 с кольцевой хромосомой 13

Тип клеток/ Продолжительность культтивирования или номер пассажа	Число и сочетание сигналов	Число клеток	Интерпретация	%
Лимфоциты/72 ч	CEN13/21 x 2, 13q x 1	3	Моносомия 13 и 21 или кольцевая хромосома 13 и нулисомия 21	1,76
	CEN13/21 x 3, 13q x 1	80	Моносомия 13	47,06
	CEN13/21 x 4, 13q x 1	80	Кольцевая хромосома 13	47,06
	CEN13/21 x 5, 13q x 1	3	Кольцевая хромосома 13 и трисомия 21 или две кольцевых хромосомы 13	1,76
	CEN13/21 x 3, 13q x 2	1	Моносомия 21	0,59
	CEN13/21 x 4, 13q x 2	3	Нормальный кариотип	1,76
	Всего	170		
Фибробlastы/П1	CEN13/21 x 2, 13q x 1	3	Моносомия 13 и 21 или кольцевая хромосома 13 и нулисомия 21	2,27
	CEN13/21 x 3, 13q x 1	66	Моносомия 13	50,00
	CEN13/21 x 4, 13q x 1	61	Кольцевая хромосома 13	46,21
	CEN13/21 x 5, 13q x 1	1	Кольцевая хромосома 13 и трисомия 21 или две кольцевых хромосомы 13	0,76
	CEN13/21 x 3, 13q x 0	1	Кольцевая хромосома 13 и отсутствие нормального гомолога хромосомы 13	0,76
	Всего	132		
Фибробlastы/П9	CEN13/21 x 2, 13q x 1	6	Моносомия 13 и 21 или кольцевая хромосома 13 и нулисомия 21	2,97
	CEN13/21 x 3, 13q x 1	113	Моносомия 13	55,94
	CEN13/21 x 4, 13q x 1	78	Кольцевая хромосома 13	38,61
	CEN13/21 x 5, 13q x 1	2	Кольцевая хромосома 13 и трисомия 21 или две кольцевых хромосомы 13	0,99
	CEN13/21 x 3, 13q x 2	1	Моносомия 21	0,49
	CEN13/21 x 4, 13q x 2	2	Нормальный кариотип	0,99
	Всего	202		

яркий, а второй — очень мелкий, практически невидимый. Оказалось, что причиной данного эффекта может быть частый гетероморфизм гомологов хромосомы 22 по содержанию данных альфа-сателлитов [14]. Об этой биологической особенности хромосомы 22 следует помнить при использовании данного зонда во избежание ложноположительного результата. В случае с нашей пациенткой зонд, специфичный исключительно к центромере хромосомы 22, был неинформативен, поэтому в дальнейшемами был использован зонд, гибридизующийся на центромерах хромосом 14 и 22 (рис. 9).

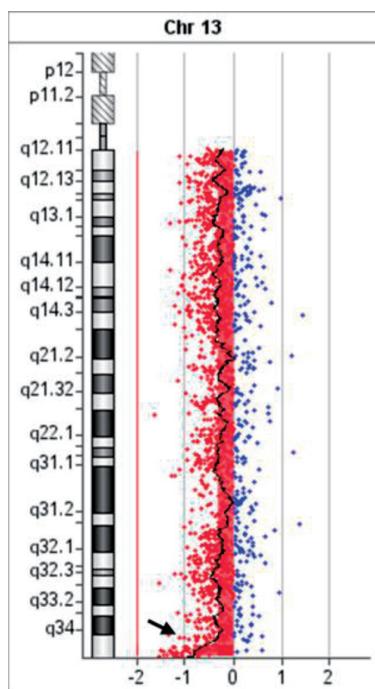


Рис. 4. aCGH профиль, демонстрирующий моносомию хромосомы 13 в фибробластах кожи пациента 1. Стрелкой отмечена микроделеция 13q34.

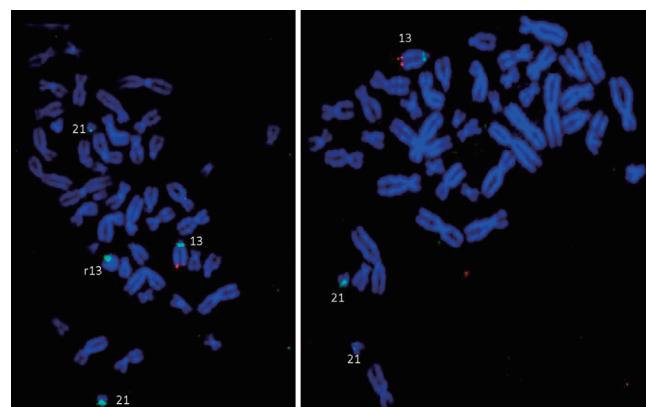


Рис. 5. FISH-анализ фибробластов кожи пациента 1. Кольцевая хромосома 13 (слева) и моносомия 13 (справа). Использованы центро-мероспецифичный зонд D13Z1/D21Z1 (зеленый) и субтеломерный зонд 13q (красный).

Кроме того, при проведении аCGH у девочки была обнаружена микроделеция 3q13.31 (рис. 7), затрагивающая регион синдрома микроделеции 3q13.31 (OMIM 615433). По данным ПЦР в реальном времени, данная микроструктурная хромосомная аномалия была унаследована пробандом от здоровой матери, которая, в свою очередь, унаследовала ее от своей матери (рис. 10). В фибробластах ребенка при использовании аCGH также выявлена микроделеция 22q13.32-q13.33. При подтверждении кольцевой хромосомы 22 методом FISH в фибробластах на первом пассаже нами было об-

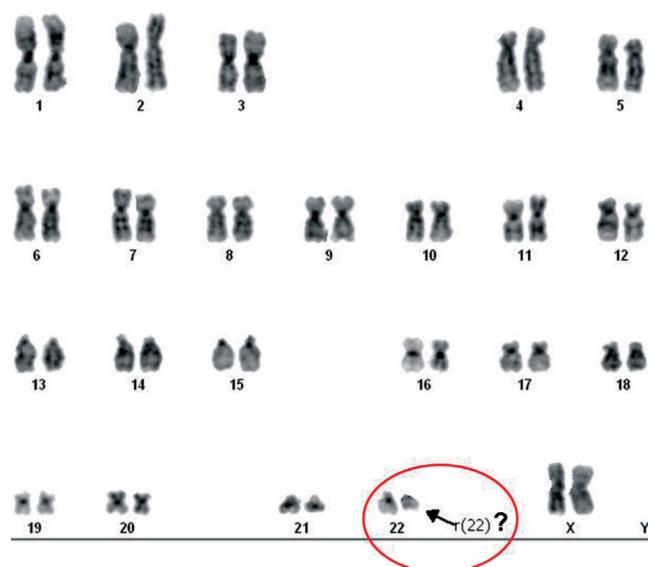


Рис. 6. Кариограмма пациентки 2. Стрелкой отмечена кольцевая хромосома 22.

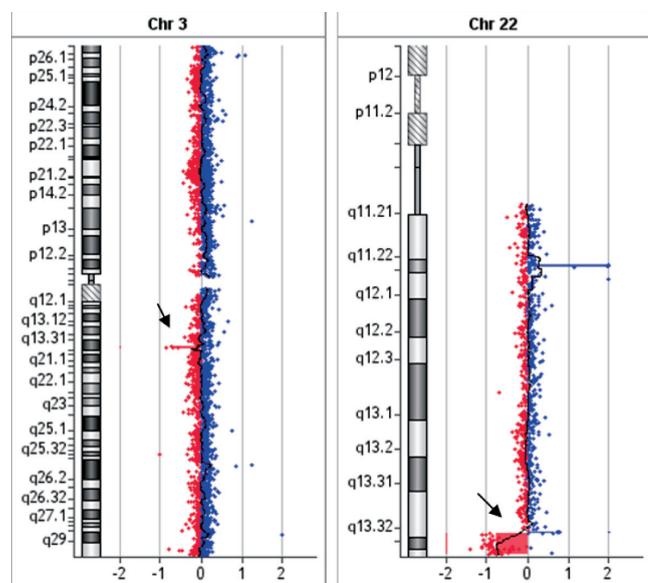


Рис. 7. aCGH профили хромосом 3 и 22 в лимфоцитах пациентки 2. Стрелками отмечены микроделеции 3q13.31 и 22q13.32-q13.33.

наружено, что 24% клеток были моносомными по хромосоме 22 (табл. 3, рис. 11). Далее наблюдалось увеличение числа моносомных клеток с ростом числа пассажей, которое к 33 пассажу достигло 44%. С использованием критерия χ^2 показано статистически значимое увеличение уровня моносомных клеток от 5 пассажа к 25 пассажу ($\chi^2 = 6,649$, $p < 0,05$). Однако при культиви-

ровании клонов ИПСК, полученных из фибробластов пробанда, доля моносомных клеток была несколько меньше и составила для клона iTAF29 17% на пассаже 7 и 12,5% на пассаже 11; а для клона iTAF32 — 6,3% на пассаже 9. Уменьшение уровня моносомных клеток для iTAF29 с Р7 до Р11 не являлось статистически значимым ($\chi^2 = 0,437$, $p > 0,05$).

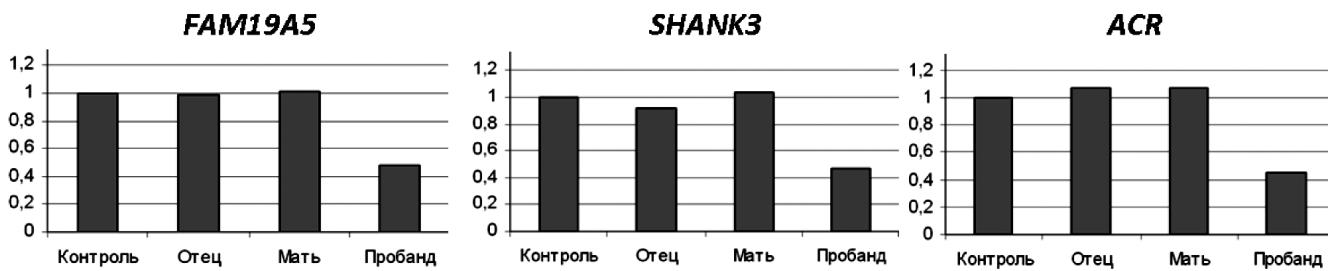


Рис. 8. Результаты ПЦР в реальном времени для семьи пациентки 2 с праймерами на гены *FAM19A5*, *SHANK3*, *ACR* (del22q13.32-q13.33).

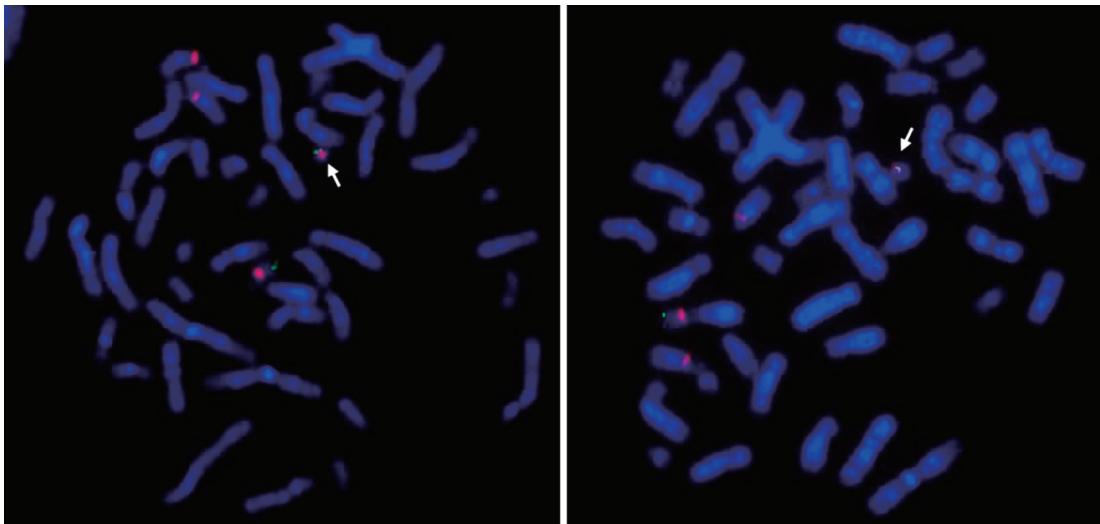


Рис. 9. FISH-анализ для лимфоцитов пациентки 2. Кольцевая хромосома 22 отмечена стрелкой. Использованы центромероспецифичный зонд D14Z1/D22Z1 (красный) и зонд на ген *TBC1D22A* (зеленый).

Результаты интерфазного FISH-анализа лимфоцитов, фибробластов кожи и ИПСК пациента 2 с кольцевой хромосомой 22

Таблица 3

Тип клеток/продолжительность культивирования или номер пассажа	FISH			
	D14Z1/D22Z1 x 3	D14Z1/D22Z1 x 4	Всего	% клеток с моносомией 22
Лимфоциты/72 ч	41	438	479	8,56
Фибробlastы/П1	27	86	113	23,89
Фибробlastы/П3	59	237	296	19,93
Фибробlastы/П5	56	120	176	31,81
Фибробlastы/П15	98	140	238	41,18
Фибробlastы/П25	88	110	198	44,44
Фибробlastы/П33	84	108	192	43,75
ИПСК29/П7	9	44	53	16,98
ИПСК29/П11	7	49	56	12,50

Важно отметить, что моносомии у представленных пациентов впервые были зарегистрированы только в фибробластах методом FISH и не обнаружены в лимфоцитах при стандартном кариотипировании. Это подчеркивает важность исследования более чем одной ткани в случае, если фенотип пациента невозможно объяснить уже обнаруженными мутациями или ни одной аномалии не было выявлено в лимфоцитах периферической крови. Кроме того, что особенно важно для разработки технологий хромосомной терапии, наличие моносомного клона указывает на нестабильность кольцевой хромосомы уже *in vivo* и дает надежду на эффективную ее коррекцию в ИПСК.

В аналогичной работе Bershteyn с соавторами были получены ИПСК из клеток кожи пациентов с множественными врожденными аномалиями, 80–100% фибробластов которых содержали кольцевую хромосому 13, а в остальных клетках наблюдалось 45 хромосом с потерей кольца или неклональные aberrации с вовлечением *r*(13) [10]. Анализ кариотипа ИПСК на шести пассажах показал, главным образом, наличие кариотипа 46,XY,*r*(13); при этом в части клеток кольцевая хромосома отсутствовала. Шесть из девяти клонов после восьмого пассажа демонстрировали нормальный кариотип. Например, клон 4, содержащий преимущественно клетки с кариотипом 46,XY,*r*(13) на шестом пассаже, на двенадцатом пассаже имел кариотип 46,XY. Данные результаты, по мнению авторов, представляют динамичный мозаицизм между клонально-родственными клетками, приводя к преимущественному выживанию кариотически нормальных ИПСК в течение шести пассажей, чего не происходит в фибробластах. FISH-анализ подтвердил нормальный кариотип в клонах ИПСК. SNP-микроципы показали отсутствие делеций и полную гомозиготность по хромосоме 13. ИПСК с исправленным кариотипом экспрессировали маркеры стволовых клеток и дифференцировались в три зародышевых листка. По мнению авторов, феномен спонтанного восстановления нормального числа хромосом в стволовых клетках можно объяснить тем, что репрограммирование, активируя клеточное деление, повышает возможность случайного нерасхождения хромосом и компенсацию потери кольца. Далее изодисомные клетки имеют преимущество в делении и росте над клетками с кольцевой хромосомой 22, несущей крупную делецию, что в итоге приводит к появлению клона клеток с нормальным кариотипом.

Разрабатывая и применяя в дальнейшем технологии хромосомной терапии, следует помнить, что полученные клетки с исправленным кариотипом имеют однородительскую дисомию по восстановленной хромосоме, что может приводить к нежелательным клиническим последствиям за счет гомозиготизации рецессивных мутаций или нарушения импринтинга, если хромосома содержит импринтированный регион. Кроме потенциальной возможности использования данных технологий

в целях оказания помощи больному, они могут иметь большое значение и для науки. Методами редактирования генома возможно получение клеточных линий с исправленным кариотипом, изогенных по отношению к мутантным линиям, представляющим собой модель заболевания. Такие линии будут иметь один и тот же генетический фон и отличаться только наличием исследуемой мутации в последних, что позволит выявлять реальные различия, обусловленные аберрацией, на клеточном и молекулярном уровнях. Таким образом, появля-

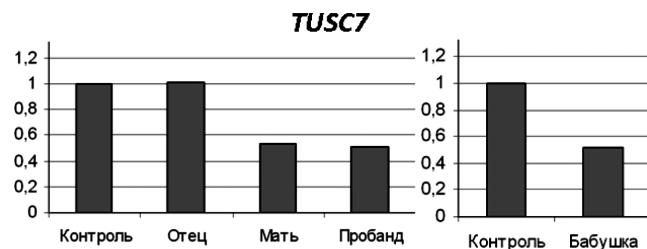


Рис. 10. Результаты ПЦР в реальном времени для семьи пациентки 2 с праймерами на ген *TUSC7* (del3q13.31).

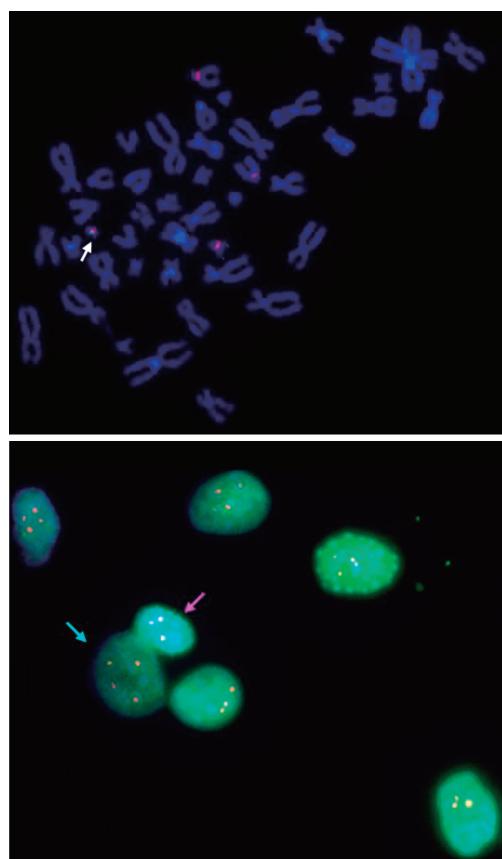


Рис. 11. FISH-анализ для фибробластов кожи пациентки 2. Кольцевая хромосома 22 отмечена белой стрелкой. Голубой и малиновой стрелками отмечены клетка с кольцевой хромосомой 22 и с моносомией 22 соответственно. Использованы центромероспецифичный зонд D14Z1/D22Z1 (красный) и зонд на ген *TBC1D22A* (зеленый).

ется новая возможность для изучения патогенеза заболеваний, обеспечивая потенциальные точки приложения терапевтических подходов в будущем.

Развитие методов замыкания хромосомы в кольцо в культуре клеток открывает новые перспективы для исследования кольцевых хромосом *in vitro*, что в настоящее время невозможно, поскольку подобные хромосомы крайне нестабильны и быстро теряются на ранних этапах культивирования ИПСК. Получение кольцевых хромосом генно-инженерными методами с использованием стабилизирующих или дестабилизирующих факторов позволит обеспечить стабильность колец для последующего анализа их эффектов или индуцировать их потерю для целей терапии.

Список литературы

1. Khan MA, Khan S, Windpassinger C et al. The Molecular Genetics of Autosomal Recessive Nonsyndromic Intellectual Disability: a Mutational Continuum and Future Recommendations. *Ann Hum Genet.* 2016; 80(6):342-368.
2. Chiurazzi P, Pirozzi F. Advances in understanding — genetic basis of intellectual disability. 2016; doi: 10.12688/f1000research.7134.1.
3. Kim T, Bershteyn M, Wynshaw-Boris A. Chromosome therapy. Correction of large chromosomal aberrations by inducing ringchromosomes in induced pluripotent stem cells (iPSCs). *Nucleus.* 2014; 5(5):391-395.
4. Plona K, Kim T, Halloran K, Wynshaw-Boris A. Chromosome therapy: Potential strategies for the correction of severe chromo-
- some aberrations. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2016; 172(4):422-430.
5. Протокол аCGH для микрочипов Agilent Technologies — http://www.chem-agilent.com/pdf/G4410-90020v3_1_CGH_ULS_Protocol.pdf
6. База данных геномных вариантов — <http://projects.tcag.ca/variation/?source=hg18>
7. Каталог «Менделевское наследование у человека» — <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>
8. Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc.* 2007; 2(12):3081-3089.
9. База данных геномных вариантов и фенотипов — <https://decipher.sanger.ac.uk/>
10. Bershteyn M, Hayashi Y, Desachy G et al. Cell-autonomous correction of ring chromosomes in human induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2014;507(7490):99-103.
11. Кашеварова АА, Лебедев ИН. Траектории интерпретации фенотипа и кариотипа через призму взаимодействия врача-генетика и лабораторного генетика. Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике / Под ред. чл.-корр. РАН А.Б. Масленникова. — Вып. 26. — Новосибирск: Академиздат, 2017; 47-55.
12. Izzykowska K, Przybylski GK, Gand C et al. Genetic rearrangements result in altered gene expression and novel fusion transcripts in Sezary syndrome. *Oncotarget.* 2017; 8(24):39627-39639.
13. Беляева ЕО, Кашеварова АА, Никонов АМ и др. Значимость молекулярного кариотипирования для уточнения диагноза при цитогенетически визуализируемой хромосомной патологии. *Медицинская генетика.* 2016; 7:17-20.
14. Rocchi M, Archidiacono N, Carbone R et al. Isolation of a human chromosome 22-specific alpha satellite clone. *Cytogenet. Cell Genet.* 1991; 58:2050-2051.