

Интерхромосомная и интрахромосомная инсерции с участием хромосомы 2

Миньженкова М.Е., Маркова Ж.Г., Дадали Е.Л., Шилова Н.В.

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»
E-mail: maramin@mail.ru

Представлено два семейных случая инсерций с участием хромосомы 2. В обоих случаях хромосомный дисбаланс в виде дупликации инсертированного района является следствием мейотической сегрегации инсерции у отцов-носителей перестройки. Случай 1 характеризуется несбалансированной интерхромосомной инсерцией у пациента, обследованного по поводу задержки темпов психомоторного развития, судорог неизвестной этиологии и аномального фенотипа. В результате комплексного обследования пациента и его родителей установлен следующий кариотип: 46,XY,der(2)ins(2;7)(q35;q31.33q34)pat. Случай 2 представлен несбалансированной интрахромосомной инсерцией у пациента с неонатальными судорогами. Стандартное цитогенетическое и молекулярно-цитогенетическое обследование пациента и его родителей позволили определить кариотип пациента: 46,XY,rec(2)dup(2q)inv ins(2)(p11.2q23.3q31)pat. Носительство инсерций характеризуется высоким репродуктивным риском, поэтому очень важным является идентификация и характеристика данной хромосомной перестройки. Современные высокотехнологичные молекулярные методы исследования позволяют значительно расширить диагностические возможности выявления геномного дисбаланса, но при этом не позволяют установить, в каком именно месте генома располагается дополнительный материал. FISH-анализ помогает не только подтвердить наличие дуплицированного участка, но и идентифицировать его локализацию. Только комплексный подход, заключающийся в сочетании стандартного цитогенетического исследования кариотипа с использованием молекулярно-генетических и молекулярно-цитогенетических методов, позволяет установить природу хромосомной перестройки, повысить качество медико-генетического консультирования семьи для оценки прогноза потомства и определить тактику пренатальной или предимплантационной диагностики.

Ключевые слова: интрахромосомные инсерции, интерхромосомные инсерции, стандартное цитогенетическое исследование, хромосомный микроматричный анализ, флуоресцентная *in situ* гибридизация.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Interchromosomal and intrachromosomal insertions involving a chromosome 2

Minzhenkova M.E., Markova Z.G., Dadali E.L., Shilova N.V.

Federal State budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics»
E-mail: maramin@mail.ru

We report two familial cases of insertional translocations with chromosome 2. Both abnormalities were derived from fathers having a balanced insertion. In case 1 patient was referred for evaluation because of developmental delay, seizures of unknown etiology and slight dysmorphic features showed a normal karyotype. Complex approach to diagnosis of the proband's and his family allowed to determine karyotype as 46,XY,der(2)ins(2;7)(q35;q31.33q34)pat. In case 2 patient with neonatal seizures was referred for evaluation. Combined with the conventional cytogenetic studies and FISH analyses proband's karyotype was determined as 46,XY,rec(2)dup(2q)inv ins(2)(p11.2q23.3q31)pat. In both this cases only complex approach such as CMA, FISH and conventional cytogenetics allows to perform a complete quality diagnosis.

Key words: interchromosomal insertional translocations, intrachromosomal insertional translocations, conventional cytogenetic studies, chromosomal microarray, fluorescence *in situ* hybridization.

Введение

Инсерции являются достаточно редкой хромосомной патологией в цитогенетической практике. Так как при формировании инсерции может быть, по крайней мере, три точки разрывов, частота их возникновения гораздо ниже, чем других структурных хромосомных аномалий с одной или двумя точками разрывов. В последние годы приблизительно в 20 раз увеличилась оценка частоты встречаемости этой группы перестроек [1]. Если раньше она составляла 1:10 000 [2], то в некоторых

источниках последних лет эта частота достигает 1:500 [1]. Очевидно, это связано с внедрением современных молекулярно-генетических технологий, таких, как хромосомный микроматричный анализ (ХМА) и секвенирование ДНК, что позволило значительно расширить возможности выявления хромосомного дисбаланса у пациентов. Однако не только диагностика геномного дисбаланса, но и определение его происхождения является значимым для прогноза потомства. Носительство инсерций характеризуется высоким репродуктивным риском. Вероятность иметь потомство с несбалансирован-

ным хромосомным набором в среднем составляет 32% для мужчин и 36% для женщин-носителей инсерций [3], причем этот риск увеличивается, если инсертированный фрагмент небольшого размера (<1% гаплоидной длины аутосом; HAL), и снижается при размере фрагмента >1,5% HAL. Идентифицировать сбалансированные инсерции кроме стандартного цитогенетического метода позволяет флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH).

Инсерции образуются в результате разрывов хромосом в трех точках: две точки разрыва с формированием интерстициального сегмента в одной хромосоме, и одна точка разрыва в районе хромосомы, куда инсертируется этот сегмент. В зависимости от ориентации инсертированного фрагмента к центромере перестроенной хромосомы различают прямые инсерции, когда хромосомный фрагмент встраивается в той же ориентации, или инвертированные, когда вставка имеет обратное расположение.

Сбалансированные *интерхромосомные инсерции* образуются в результате вставки хромосомного материала из одной хромосомы в другую негомологичную хромосому, то есть они характеризуются интерстициальной делецией в одной хромосоме и интерстициальной вставкой этого материала в другую негомологичную хромосому. Это наиболее часто встречающийся вид инсерций [2]. Так как сегменты, участвующие в образовании интерхромосомной инсерции, не являются реципрокными, геномный дисбаланс, образующийся в результате сегрегации, может быть обусловлен сегментными моносомиями или трисомиями, соответственно.

Интрахромосомные инсерции, так называемые «центромерные сдвиги» («centromere shifts»), возникают в пределах одной хромосомы и могут быть внутриплечевыми или межплечевыми, прямыми или инвертированными. В популяции человека этот вид хромосомной перестройки встречается крайне редко: в литературе представлено около 40 публикаций со случаями интрахромосомных инсерций [4, 5]. Особые сложности вызывает цитогенетическая диагностика этого типа хромосомных перестроек, поскольку зачастую они интерпретируются как парацентрические инверсии [6].

Материалы и методы

Анализ кариотипа пациентов и их родственников был выполнен на хромосомных препаратах из культуры лимфоцитов периферической крови. Дифференциальное GTG-окрашивание метафазных хромосом проводили по стандартным протоколам. FISH-анализ выполняли по протоколам, предложенным фирмой-производителем целых хромосомных ДНК-зондов XCP 2, XCP 7, (MetaSystems, Германия). Многоцветную FISH проводили с набором mBAND (XCyte) для соответствующих хромосом 2, 7 (MetaSystems, Германия) по протоколам фирмы-производителя. Денатурацию и гибридизацию проводили с использованием гибридизационной системы ThermoBrite (Abbott Molecular, США). Для контрок-

рашивания хромосом использовали флуоресцентный краситель DAPI. Молекулярно-цитогенетический анализ проводился на флуоресцентном микроскопе AxioImager M.1 (Zeiss) с соответствующим набором светофильтров и с использованием компьютерной программы обработки FISH-изображения (Isis, MetaSystems, Германия). ХМА проводили на платформе «Affymetrix» с использованием олигонуклеотидных микроматриц высокой плотности Cytoscan™ HD (Affymetrix®, США), содержащих 2696550 маркеров (1953246 непалиморфных маркеров и 749157 SNPs) (Applied Biosystems). Все стадии лабораторного этапа анализа выполняли в соответствии с протоколом производителя Applied Biosystems. Анализ полученных данных осуществляли с использованием программы Chromosome Analysis Suite (ChAS) (версия 2.0). Оценка патогенности обнаруженного дисбаланса проводилась с использованием баз данных



Рис. 1. Результат FISH с целых хромосомных ДНК-зондов на хромосому 7.

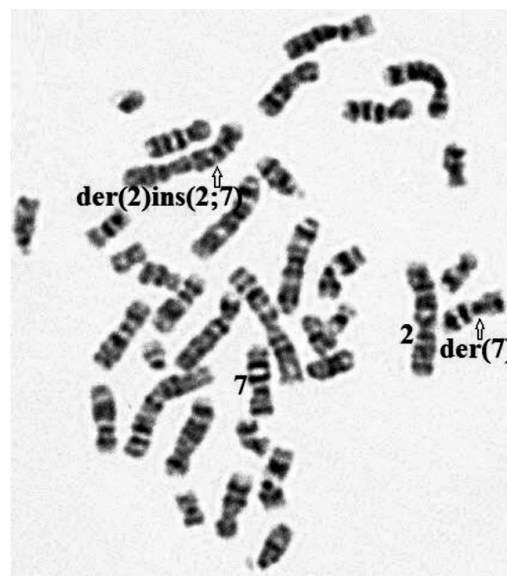


Рис. 2. Метафазная пластинка интерстициальной инсерцией ins(2;7).

OMIM, ISCA, DECIPHER и DGV. Кариотип указан в соответствии с международной цитогенетической номенклатурой ISCN 2013 [7].

Результаты

Представлено два семейных случая инсерций с участием хромосомы 2.

Случай 1. Пациент, 1,5 лет, обследован по поводу задержки темпов психомоторного развития, судорог неизвестной этиологии, синдрома дисплазии соединительной ткани, врожденного нистагма, утолщенных пальцев стоп. При стандартном цитогенетическом исследовании определен кариотип пациента — 46,XY. ХМА показал дупликацию участка длинного плеча хромосомы 7 с позиции 124,533,538 до позиции 140,719,797, захватывающую рай-

оны 7q31.33q34. FISH-анализ с использованием цельнохромосомного ДНК-зонда на хромосому 7 (ХСР 7) позволил определить вставку дублированного участка в хромосому 2 (рис. 1). Размер инсерции составил 0,56% HAL.

Было проведено стандартное цитогенетическое исследование родителей пациента. У отца обнаружена сбалансированная инсерция материала хромосомы 7 (q31.33q34) в районе q35 длинного плеча хромосомы 2 (рис. 2). mBAND 7 позволил охарактеризовать инсерцию как прямую. В сочетании с этими данными кариотип пробанда: 46,XY,der(2)ins(2;7)(q35;q31.33q34)pat. Кроме того, было проведено обследование родственников пациента. В возрасте 6 лет тете пробанда в связи с наличием умственной отсталости легкой степени, низким ростом, короткой шеей, вальгусной деформацией голени провели стандартное цитогенетическое исследование. Кариотип был определен как нормальный. В настоящий момент (возраст 38 лет) при ХМА определен тот же геномный дисбаланс, что и у племянника. FISH-исследование с использованием цельнохромосомных ДНК-зондов подтвердило несбалансированную интерхромосомную инсерцию. Бабушка пациента по отцовской линии также является носителем сбалансированной интерхромосомной инсерции: 46,XX,ins(2;7)(q35;q31.33q34), что было обнаружено при исследовании ее кариотипа. Таким образом, два члена этой семьи имеют дупликацию захватывающую районы 7q31.33q34, вследствие мейотической сегрегации инсерции у носителей в двух поколениях (рис. 3).

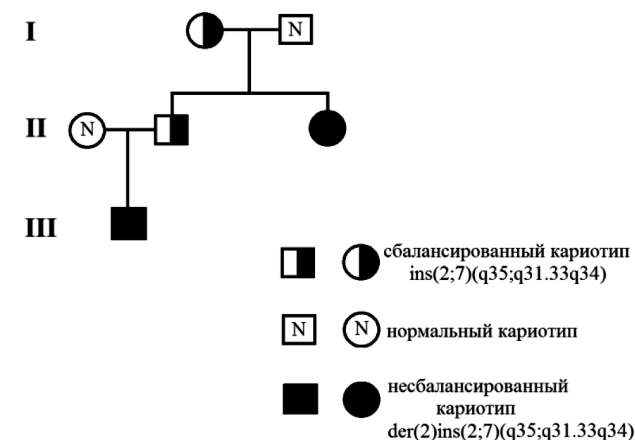


Рис. 3. Родословная пациента с семейной инсерцией ins(2;7).

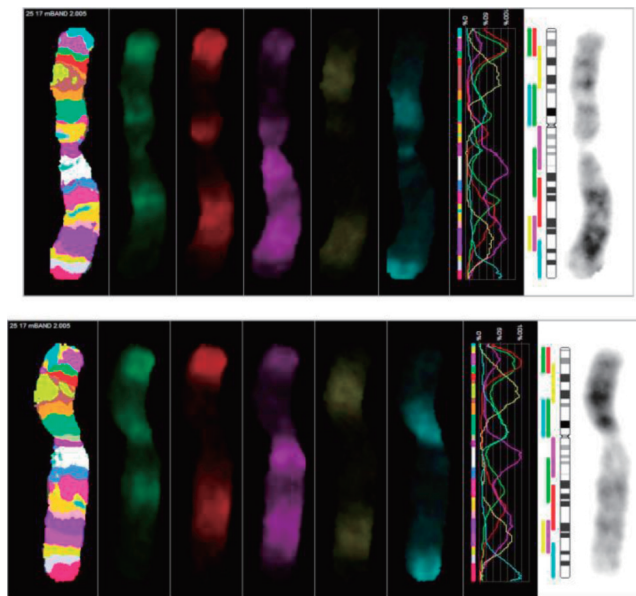


Рис. 4. Результат молекулярно-цитогенетического анализа с использованием mBAND 2.

Случай 2. Пациент, 1,6 года, с неонатальными судорогами обследован методом секвенирования ДНК (панель «Наследственные эпилепсии»). По итогам анализа покрытия (избыточности прочтения) секвенированных генов получены данные в пользу наличия дупликации сегмента хромосомы 2 с приблизительными границами 152,955,143—177,017,680, захватывающей районы 2q23.3q31.1. FISH-исследование пробанда и его родителей с использованием цельнохромосомного ДНК-зонда на хромосому 2 не выявило межхромосомных инсерций и транслокаций. При стандартном цитогенетическом исследовании родителей пациента у отца обнаружена сбалансированная интрахромосомная инсерция сегмента длинного плеча хромосомы 2 (q23.3q31) в короткое плечо хромосомы 2 (p11.2). mBAND 2 позволил охарактеризовать инсерцию, как инвертированную (рис. 4).

В соответствии с происхождением рекомбинантной хромосомы 2 вследствие мейотической сегрегации внутрихромосомной инсерции хромосомы 2 отца, кариотип пациента определен: 46,XY,rec(2)dup(2q)inv ins(2)(p11.2q23.3q31)pat.

Обсуждение

Поведение хромосом с инсерцией в мейозе в большей степени зависит от размера инсертированного сегмента и определяется конъюгацией гомологичных хро-

мосом в биваленте (рис. 5) при вставках маленького размера либо формированием квадрилентов при значительных инсерциях.

В случае 1 механизмом образования несбалансированной интерхромосомной инсерции у пациента является независимый синапсис гомологичных пар в период мейотического деления I, когда в стадии пахитены гомологи независимо конъюгируют с формированием бивалента. Гомологи могут конъюгировать по всей их длине, что приведет к некоторому несовпадению сегментов, находящихся рядом друг с другом (гетеросинапсис) [3]. Этот механизм независимого синапсиса наиболее вероятно реализуется при инсерциях небольшого размера ($HAL < 1\%$). Независимая 2:2 сегрегация этих двух бивалентов может приводить к образованию четырех возможных типов гамет в соотношении 1:1:1:1. Два из них сбалансированы по количеству генетического материала и приводят к формированию нормальных и сбалансированных зигот. Два других имеют геномный дисбаланс, и из них формируются зиготы с сегментными анеусомиями, вследствие дупликации или делеции по инсертированному фрагменту.

В случае инсерций довольно крупного размера ($HAL > 1,5\%$) образуется квадрилент, который содержит инсерционную петлю и обеспечивает полную конъюгацию хромосом, вовлеченных в перестройку. Если в инсерционной петле кроссинговер не происходит, то сегрегация хромосом проходит как в биваленте. Но когда кроссинговер происходит в инсерционной петле, мейотическая сегрегация квадрилента приводит к образованию рекомбинантных хромосом с различными сегментными анеусомиями [3].

Жизнеспособность зигот или вероятность повторного рождения больного ребенка, зависит от вида и размера анеусомии. Теоретически, рассчитать эмпирический риск рождения больного ребенка в семье носителя инсерции можно при использовании клинко-генеалогического метода, а именно, при анализе родословной и определении соотношения типов сегрегации. Но, к сожалению, проведение такого исследования не всегда возможно в силу малочисленности семьи или отсутствия информации о генетическом статусе родственников в предыдущих поколениях. Теоретический риск рождения ребенка с несбалансированным хромосомным набором составляет 50% [8].

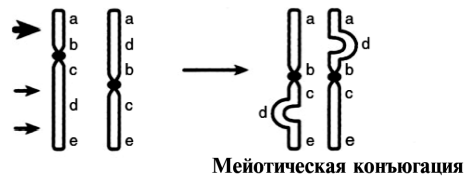
Так, в случае 1 небольшой фрагмент из длинного плеча хромосомы 7 (7q31.33-q34) инсертировался в участок длинного плеча хромосомы 2. Размер инсерции составил 0,56% HAL, что определяет механизм образования инсерции — независимый синапсис гомологичных пар. Образование несбалансированных гамет может приводить к формированию зигот с сегментной дупликацией 7q31.33-q34 и с делецией этого хромосомного участка. Однако в семье наблюдались только случаи с дупликацией инсертированного сегмента. Учитывая, что у пациентов с несбалансированной инсерцией,

представленной сегментной дупликацией, отмечены незначительные аномалии фенотипа и легкая степень умственной отсталости, можно предположить, что жизнеспособностью обладают только зиготы с сегментной дупликацией 7q31.33-q34, а зиготы с моносомией по этому участку хромосомы являются эмбриолеталями. Анализ сегрегации в данной семье выявил соотношение 0:1:2:0 следующих типов гамет — нормальный : сбалансированный : сегментная дупликация : сегментная делеция. Таким образом, в данной семье эмпирический риск рождения больного ребенка высчитывается по формуле $1/0+1+2+0$, и составляет 33%. Расхождение между теоретическим и наблюдаемым риском обусловлено эмбриональной летальностью зигот при некоторых типах геномного дисбаланса. Можно предположить, что коэффициент выживаемости всегда будет увеличиваться с уменьшением размера инсерции и наличия геномного дисбаланса в виде сегментной дупликации.

В случаях интрахромосомных инсерций при мейотической конъюгации инсертированный сегмент и комплементарный ему район на нормальном гомологе могут образовывать петлю, что способствует синапсису или конъюгации неперестроенной части хромосомы (рис. 5) [3]. Кроссинговер в паре с интерстициальным сегментом такого бивалента будет приводить к формированию рекомбинантных хромосом либо с дупликацией, либо с делецией по инсертированному сегменту (рис. 6).

В случаях с инсерциями значительного размера, полная конъюгация между гомологом с инсерцией и нормальным гомологом в мейозе может происходить путем формирования двойной петли. Кроссинговер или рекомбинация этих полностью конъюгировавшихся хромосом приводит к образованию хромосом с дупликацией и/или делецией. По данным, представленным в статье Melotte с соавт., при сегрегации таких инсерций возможно формирование 26 сегрегационных вариантов [9].

Интрахромосомная инсерция



Интерхромосомная инсерция

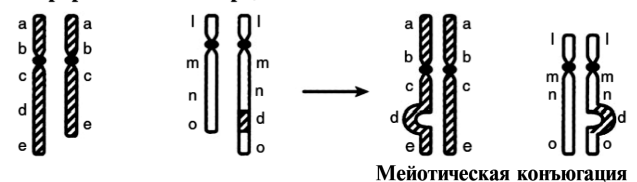


Рис. 5. Схема мейотической конъюгации между хромосомой с инсерцией и нормальным гомологом.

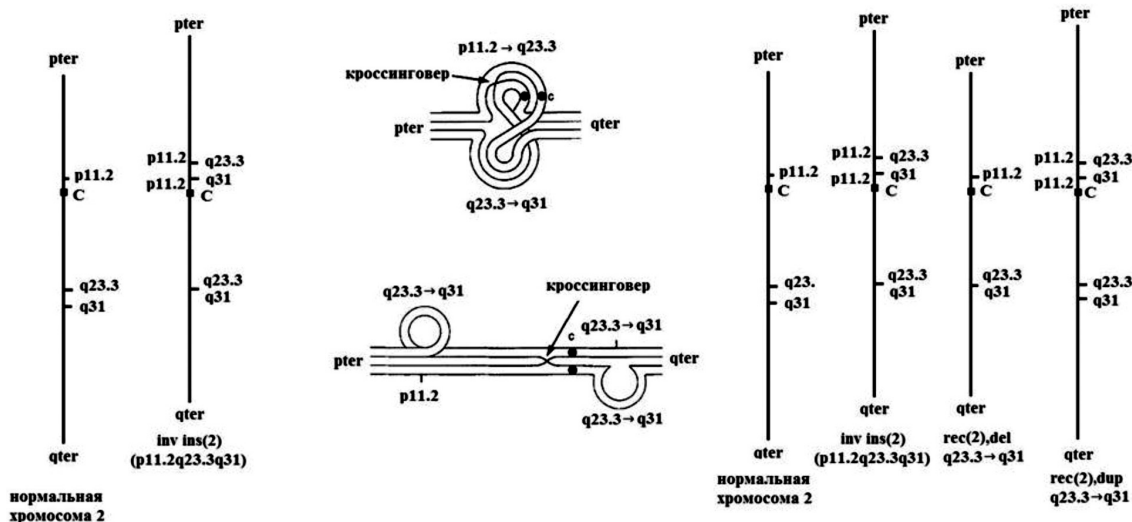


Рис. 6. Механизм образования рекомбинантной хромосомы 2 — $rec(2)dup(2q)inv\ ins(2)(p11.2q23.3q31)pat$

В обзоре Madan и Menko представлен анализ мейотической сегрегации 27 случаев интрахромосомных инсерций [4]. Определено, что в семье носителей инсерции с зарегистрированными случаями рождения ребенка с несбалансированным кариотипом, повторный риск составляет 15%. Теоретически, этот риск может значительно отличаться для каждого случая инсерции, в зависимости от размера инсертированного сегмента и жизнеспособности зигот с сегментными анеусомиями в аномальных рекомбинантных хромосомах.

Для носителей межплечевых, так называемых перичентрических инсерций вероятность иметь ребенка с аномальной рекомбинантной хромосомой достаточно высокая и варьирует в пределах 15%–50% [4, 10]. Тем не менее, межплечевая интрахромосомная инсерция хромосомы 2 встречается экстремально редко, в литературе описано только 4 таких случая [10–13].

При сбалансированных инсерциях не происходит изменения числа копий перестроенных участков хромосом, что не должно приводить к аномальному фенотипу. Однако в некоторых случаях фенотипический эффект может наблюдаться вследствие перемещения блока структурных генов из одного хромосомного окружения в другое, что связано с эффектом положения. Механизм формирования варибельного аномального фенотипа может быть следующим:

- 1) инсертированный сегмент может содержать один или несколько активно транскрибируемых генов, что непосредственно приводит к функциональной анеусомии по дозозависимым генам;
- 2) вставка дополнительного хромосомного материала может нарушить последовательность генов и привести к потере или усилению их функции;
- 3) делеция или дупликация во фланкирующей области гена может привести к аномальной экспрессии генов из-за эффекта положения [1].

В обоих представленных случаях дублицированные сегменты содержат около 100 различных генов (в соответствии с электронным ресурсом UCSC Genome Browser), функции большинства которых до сих пор не известны. Поэтому не представляется возможным проследить четкую корреляцию «генотип-фенотип» у этих пациентов.

Инсерции довольно редко диагностируют при проведении стандартного цитогенетического исследования. По немногочисленным сообщениям частота инсерций среди новорожденных, установленных рутинным методом анализа, составляет 1:10 000 [2, 8]. Использование комбинации ХМА и FISH-анализа позволило значительно повысить уровень детекции как семейных случаев, так и инсерций, возникших *de novo*. В работе Kang и соавт. приводятся данные, что при повторном анализе методом ХМА 18 000 образцов ДНК пациентов с ранее установленным нормальным кариотипом, было выявлено 40 случаев инсерций, что составляет 1:500 и свидетельствует о 160-кратном увеличении частоты встречаемости инсерций [1].

Интерстициальные несбалансированные инсерции, представленные дубликациями, у пациентов с аномалиями фенотипа, должны быть обязательно идентифицированы. Определение структуры хромосомной аномалии необходимо для установления возможного механизма формирования перестройки и подсчета генетического риска, который, как известно, выше у носителей инсерций, чем у носителей других структурных хромосомных аномалий [3]. Особое внимание стоит уделить родителям пациентов с несбалансированными инсерциями для выявления семейных случаев, так как при этом меняется алгоритм медико-генетического консультирования и определяется необходимость пренатальной диагностики.

Выводы

Несмотря на то, что инсерции являются достаточно редким типом структурных хромосомных аномалий, высокий риск повторного рождения детей с несбалансированным хромосомным набором заставляет относиться к таким случаям с предельной настороженностью. Несомненно, современные, высокотехнологичные молекулярные методы исследования позволяют значительно расширить диагностические возможности выявления геномного дисбаланса, но при этом не позволяют установить, в каком именно месте генома располагается дополнительный материал. FISH-анализ помогает не только подтвердить наличие дуплицированного участка, но и идентифицировать его локализацию. Только комплексный подход, заключающийся в сочетании стандартного цитогенетического исследования кариотипа с использованием молекулярно-генетических и молекулярно-цитогенетических методов, позволяет установить природу хромосомной перестройки, повысить качество медико-генетического консультирования семьи для оценки прогноза потомства и определить тактику пренатальной или предимплантационной диагностики.

Список литературы

1. Kang SHL, Show C. Insertional translocation detected using FISH confirmation of array-comparative genomic hybridization (aCGH) results. *Am J Med Genet.* 2010;(152A):1111-1126.
2. Van Hemel JO, Eussen HJ. Interchromosomal insertions. Identification of five cases and a review. *Hum Genet.* 2000;(107):415-432.
3. Gardner RJM, Sutherland GR. Chromosome abnormalities and genetic counseling 4th ed. 2012.
4. Madan K., Menko F.H. Intrachromosomal insertions: a case report and a review. *Hum Genet.* 1992;(89):1-9.
5. Ardalán A, Prieur M, Choiset A, et al. Intrachromosomal insertion mimicking a pericentric inversion: molecular cytogenetic characterization of a three break rearrangement of chromosome 20. *Am J Med Genet.* 2005;(138A):288-293.
6. Madan K, Nieuwint AWM. Reproductive risks for paracentric inversion heterozygotes: inversion or insertion? That is the question. *Am J Med Genet.* 2002;(107):340-343.
7. Shaffer L. An international system for human cytogenetic nomenclature (ISCN). *Int. Karger.* 2013.
8. Nowakowska BA, de Leeuw N, Ruivenkamp CAL et al. Parental insertional balanced translocations are an important cause of apparently de novo CNVs in patients with developmental anomalies. *Eur J Hum Genet.* 2012;(20):166-170.
9. Melotte C, Debrock S, D'Hooghe T, et al. Preimplantation genetic diagnosis for an insertional translocation carrier. *Hum Reprod.* 2004;(19):2777-2783.
10. Friedrich U, Houman M. Microdissection of chromosome 2-between-arm intrachromosomal insertion. *Eur J Hum Genet.* 2000;(8):393-395.
11. Therkelsen AJ, Hultén M, Jonasson J, et al. Presumptive direct insertion within chromosome 2 in man. *Ann Hum Genet.* 1973;(36):367-373.
12. Pai GS, Rogers JF, Sommer A. Identical multiple congenital anomalies/mental retardation (MCA/MR) syndrome due to del(2)(q32) in two sisters with intrachromosomal insertional translocation in their father. *Am J Med Genet.* 1983;(14):189-195.
13. Manolakos E, Vetro A, Papadopoulou E. Partial trisomy 2p and partial monosomy 2q arising from a paternal intrachromosomal 2q-into-2p between-arm insertion and paracentric inversion: molecular cytogenetic characterization of a four-break rearrangement. *Cytogenet Genome Res.* 2013;(140):12-20.