

Митотическая нестабильность кольцевой хромосомы 3

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

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

Актуальность. Кольцевая хромосома 3 – редкая хромосомная аномалия, характеризующаяся выраженной вариабельностью фенотипических отклонений. Наиболее характерными проявлениями присутствия в кариотипе кольцевой хромосомы 3 являются пре- и постнатальная задержка роста, задержка психомоторного развития, микроцефалия и другие аномалии развития. Кольцевая структура может приводить к нарушению нормального расхождения хромосом при клеточном делении и вызывает митотическую нестабильность, приводящую к динамическому мозаицизму. В данном сообщении представлен случай митотической нестабильности кольцевой хромосомы 3 у ребенка с множественными пороками и аномалиями развития, демонстрирующий влияние вторичного хромосомного дисбаланса на степень выраженности фенотипических аномалий.

Цель: исследование митотической нестабильности кольцевой хромосомы 3.

Методы: FISH с ДНК-зондами на хромосому 3.

Результаты. При стандартном цитогенетическом исследовании определен кариотип 46,XX,r(3)(p26q29). При FISH-анализе обнаружено наличие нескольких клонов клеток, содержащих различные варианты аномальных по структуре производных кольцевой хромосомы 3.

Выводы. Присутствие кольцевых хромосом в геноме является причиной митотической нестабильности, что приводит к формированию соматического динамического мозаицизма. Соматический динамический мозаицизм, вследствие которого образуются клоны клеток с различным хромосомным дисбалансом, вносит существенный вклад в формирование аномального фенотипа.

Ключевые слова: кольцевая хромосома, митотическая нестабильность, динамический мозаицизм, FISH

Для цитирования: Шилова Н.В., Миньженкова М.Е., Маркова Ж.Г., Тарлычева А.А., Юрченко Д.А. Митотическая нестабильность кольцевой хромосомы 3. Медицинская генетика 2019; 18(9):40-45

DOI: 10.25557/2073-7998.2019.09.40-45

Автор для корреспонденции: Шилова Надежда Владимировна, e-mail: nvsh05@mail.ru

Финансирование: Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования России на выполнение НИР.

Конфликт интересов: Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Поступила: 30.09.2019

Ring chromosome 3 instability at mitosis

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

Research Centre for Medical Genetics
Moskvorechie str., 1, Moscow 115522, Russia

Ring chromosome 3 is a rare chromosomal abnormality with a highly variable phenotype principally characterized by pre- and post-natal growth retardation, developmental delay, mild to severe intellectual disability, microcephaly and mild dysmorphic features. The presence of a ring chromosome causes mitotic instability and often results in dynamic mosaicism with cells showing chromosomal or segmental aneuploidies and leading to various phenotypic consequences. We present a case of mitotic instability of ring chromosome 3 in a child with multiple malformations and developmental abnormalities.

Aim: The investigation of ring chromosome 3 instability at mitosis.

Methods: FISH with DNA probe on chromosome 3.

Results: The karyotype of a child – 46,XX,r(3)(p26q29). FISH analysis revealed a mosaic clones derived from ring chromosome 3.

Conclusions: The ring chromosomes are unstable at mitosis and lead to the formation of somatic dynamic mosaicism. Mitotic instability of ring chromosome 3 demonstrates the influence of secondary genetic imbalance on severity of symptoms in our patient.

Keywords: ring chromosome, mitotic instability, dynamic mosaicism, FISH.

For citation: Shilova N.V., Minzhenskova M.E., Markova Zh.G., Tarlycheva A.A., Yurchenko D.A. Ring chromosome 3 instability at mitosis. *Medical genetics* 2019; 18(9): 40-45 [In Rus]

DOI: 10.25557/2073-7998.2019.09.40-45

Corresponding author: Shilova Nadezda; e-mail: nvsh05@mail.ru

Funding. The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

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

Accepted: 30.09.2019

Введение

Конституциональные кольцевые хромосомы (КХ) — циркулярные молекулы ДНК, которые являются крайне редкой хромосомной аномалией и встречаются в среднем с частотой 1:50 000 новорожденных. В подавляющем большинстве случаев (99%) кольцевые хромосомы возникают спорадически. В кариотипе кольцевые хромосомы могут присутствовать либо замещая один из нормальных гомологов — 46,(r), либо в виде сверхчисленной хромосомы — 47,+(r).

Степень клинических проявлений у носителей КХ варьируется от практически нормального фенотипа до тяжелой задержки психомоторного и физического развития. Описаны универсальные фенотипические проявления КХ, такие как экстремальная задержка роста, отсутствие пороков развития, минорные аномалии развития и легкая/средняя степень умственной отсталости, что позволяет выделить «синдром кольцевой хромосомы» в самостоятельный хромосомный синдром [1,2].

Молекула ДНК эукариот представлена линейной структурой с двумя сестринскими хроматидами, которые симметрично сегрегируют при делении клетки. Любые изменения топологии хромосом, в том числе формирование кольцевой структуры, могут приводить к митотической нестабильности вследствие нарушения нормального расхождения таких хромосом при каждом постзиготическом митотическом клеточном делении. Наличие сестринских хроматидных обменов в кольцевой хромосоме приводит к формированию вторичных хромосомных перестроек в виде дицентрических и разорванных (открытых) колец, увеличению количества кольцевых хромосом в одной и той же клетке, а также отдельных хромосомных фрагментов. Следствием такой митотической нестабильности является частичная или полная анеуплоидия (трисомия или моносомия) по соответствующей изначально кольцевой хромосоме — так называемый динамический мозаицизм. Этот процесс может приводить либо к гибели дочерних клеток, либо к их выживанию в мозаичном статусе, что может оказывать непосредственное влияние на степень выраженности аномалий фенотипа.

Кольцевая хромосома 3 — r(3) встречается среди кольцевых хромосом редко. С момента описания Mukerjee D. и Burdette W. первого случая кольцевой хромосомы 3 у пациента со множественными врожденными аномалиями в 1966 г. известно не более чем о 13 пациентах с r(3) [3]. Клиническая манифестация синдрома очень гетерогенна, при этом серьезные дефекты внутренних органов не характерны. Наиболее часто у пациентов с кольцевой хромосо-

мой 3 наблюдаются задержка роста и психомоторного развития, микроцефалия, лицевые аномалии, такие как треугольная форма лица, антимонголоидный разрез глаз, эпикант, нос с широкой переносицей и утолщенным кончиком, длинный фильтр, опущенные уголки губ, микро/ретрогнатия, диспластичные уши. Кроме того, у таких пациентов отмечаются гипотония, тугоухость, аномалии пальцев рук (клинодактилия, брахидактилия), пятна цвета «кофе с молоком» и гипоспадия [4-6]. В данном сообщении мы представляем случай молекулярно-цитогенетической диагностики кольцевой хромосомы 3 у ребенка с кариотипом 46,XX,r(3)(p26q29), демонстрирующий митотическую нестабильность кольцевой хромосомы 3, приводящую к довольно тяжелым фенотипическим проявлениям.

Методы

Девочка в возрасте 3-х месяцев направлена на исследование кариотипа по поводу наличия множественных пороков и аномалий развития: атрезии тонкой кишки, признаков псевдокисты правого сосудистого сплетения и арахноидальной кисты при нейросонографии головного мозга, незрелости и ангиопатии сетчатки. Объективно: голову держит плохо, дистония, широкая носовая перегородка, углы рта опущены вниз, микроцефалия (окружность головы 35 см — меньше 3 перцентиля на возраст; на вес — 3–10 перцентиль), выступающие лобные бугры, обратный эпикант, тонкая нижняя губа, длинный фильтр, микроретрогнатия, низко посаженные уши, двухсторонняя клинодактилия мизинцев, «сандалевидные» щели на ногах. При стандартном цитогенетическом исследовании определен кариотип 46,XX,r(3)(p26q29).

Молекулярно-цитогенетическую диагностику на препаратах из культуры лимфоцитов периферической крови проводили методом FISH с использованием многоцветных технологий (многоцветный бэндинг хромосомы 3 — mBAND 3, XCyte3, MetaSystems, Germany), локус-специфичных ДНК-зондов на субтеломерные районы короткого (D3S4558) и длинного (D3S4168) плеч хромосомы 3, меченых различными флуорохромами (Sub-Telomere 3pter; Sub-Telomere 3qter Kretech, Нидерланды), ДНК-зонда на центромерный район хромосомы 3 (D3Z1) (SE 3, Kretech, Нидерланды), зонда на теломерные повторы (Telomere PNA FISH Kit/FITC, Dako, США) по протоколам фирм-производителей. Денатурацию и гибридизацию проводили с использованием гибридизационной системы «ThermoBrite» (StatSpin, США) по протоколам фирмы-производителя. Анализ проводили на эпифлуо-

ресцентном микроскопе «AxioImager M.1» (Carl Zeiss, Германия) с соответствующим набором светофильтров и использованием компьютерной программы обработки цифровых изображений «Isis» (MetaSystems, Германия).

Результат и обсуждение

При стандартном цитогенетическом исследовании у ребенка со множественными пороками и аномалиями развития обнаружено присутствие в кариотипе кольцевой хромосомы 3 — 46,XX,r(3)(p26q29).

Молекулярно-цитогенетическое исследование с субтеломерными ДНК-зондами на короткое и длинное плечо хромосомы 3, а также пантеломерными зондами позволило установить, что на кольцевой хромосоме отсутствует субтеломерный район короткого плеча, присутствуют субтеломерный и теломерный районы длинного плеча, т.е. на q-плече точка разрыва локализована в области теломерных повторов (рис. 1).

Таким образом, по результатам стандартного цитогенетического и молекулярно-цитогенетического исследования установлено, что в r(3) имеет место только терминальная делеция короткого плеча.

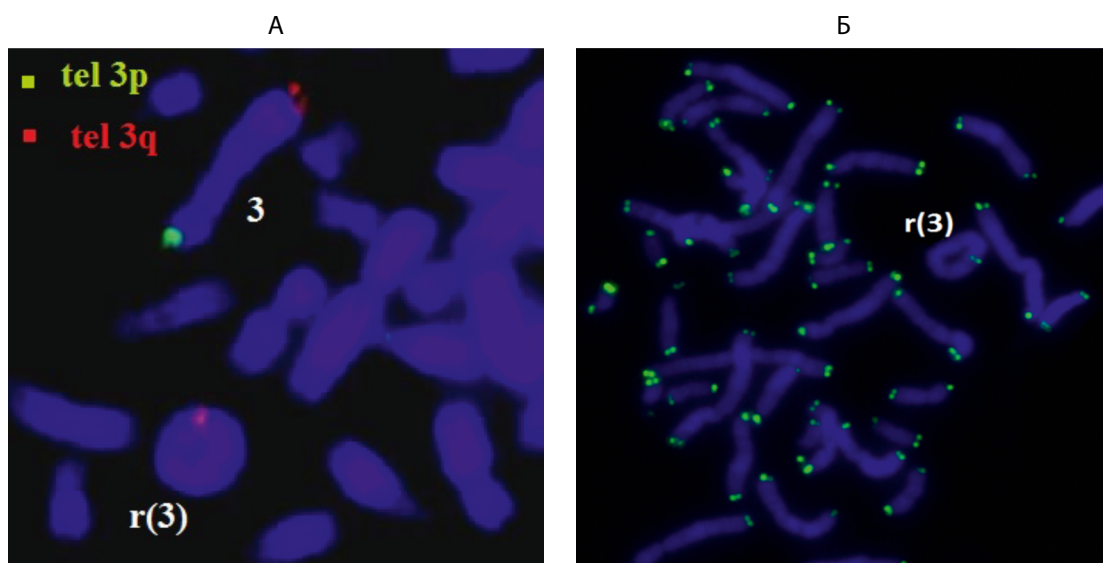


Рис. 1. Результат гибридизации с ДНК-зондами на субтеломерные районы хромосомы 3 (А) и теломерные повторы (Б).

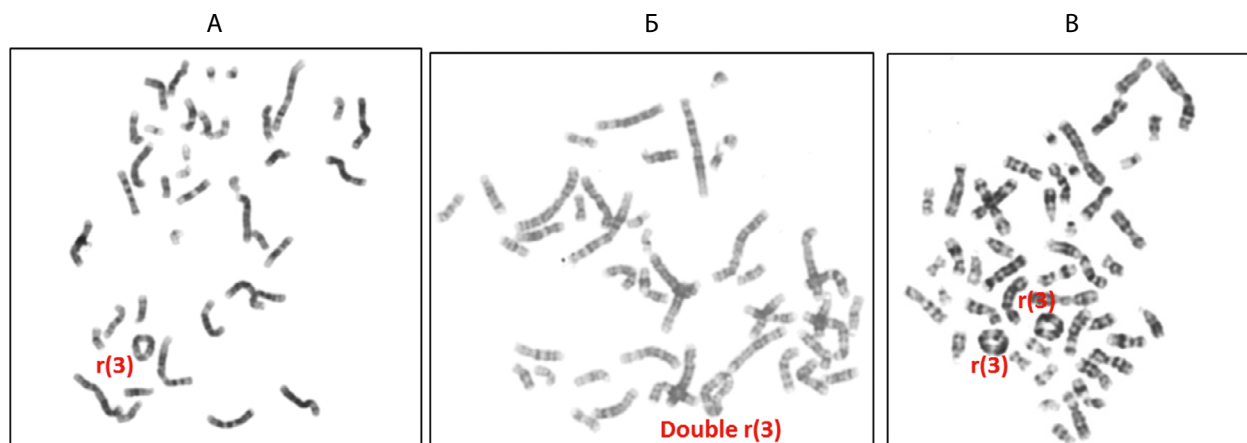


Рис. 2. Метафазные пластинки: А - с кольцевой хромосомой 3; Б - с двойным кольцом – double r(3), В - двумя кольцевыми хромосомами 3 – r(3)+r(3).

В литературе имеются сведения о 42 пациентах с *de novo* дистальной делецией 3p [7]. Некоторые фенотипические признаки, характерные для этой хромосомной аномалии, а именно микроцефалия, широкая переносица, микрогнатия, длинный фильтр, опущенные уголки губ, диспластичные уши, клинодактилия, имеются у пробанда.

Однако, присутствие в кариотипе кольцевой хромосомы 3 с терминальной точкой разрыва на коротком плече не позволяло объяснить наличие других, довольно тяжелых, фенотипических проявлений у больного ребенка, таких как пороки и аномалии развития кишечника, глаз и головного мозга.

При анализе многоцветного бэндинга хромосомы 3 и гибридизации с ДНК-зондом на центромерный район хромосомы 3, а также ревизии кариотипа было обнаружено несколько клонов клеток, содержащих различные варианты аномальных по структуре производных кольцевой хромосомы 3 (рис. 2–4).

Таким образом, у пациента выявлен динамический мозаицизм с наличием в кариотипе, помимо мажорного клона клеток с $r(3)$, клонов клеток с моносомией по хромосоме 3 и с практически полной трисомией по хромосоме 3 (наличие двух $r(3)$, открытой и неразомкнутой $r(3)$ в одной клетке). Частота различных кло-

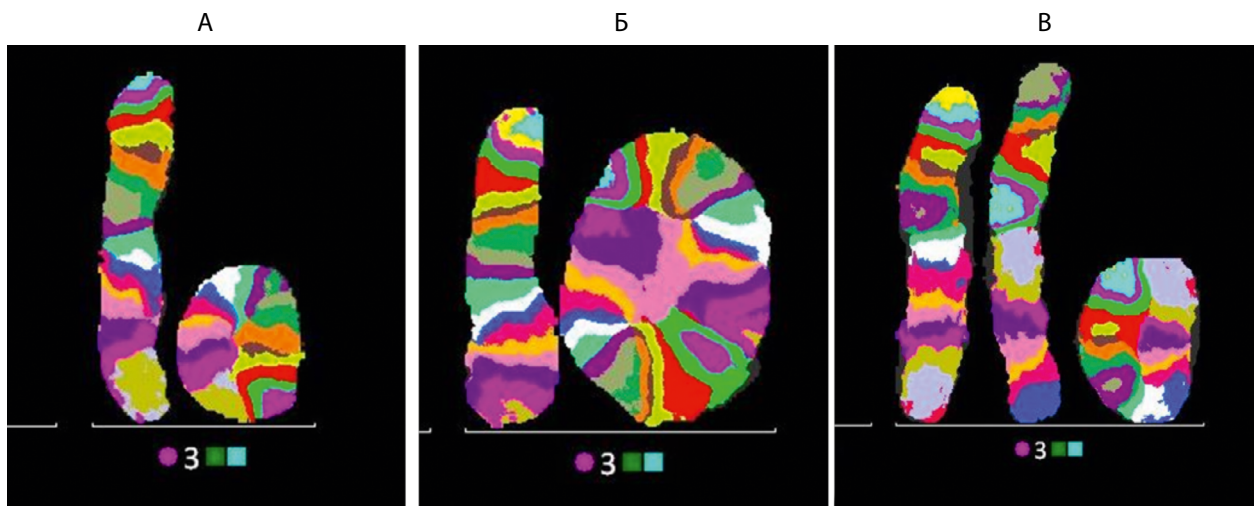


Рис. 3. Многоцветный бэндинг хромосомы 3: А – кольцевая хромосома 3; Б – двойная кольцевая хромосома 3; В – кольцевая хромосома 3 и разомкнутая кольцевая хромосома 3.

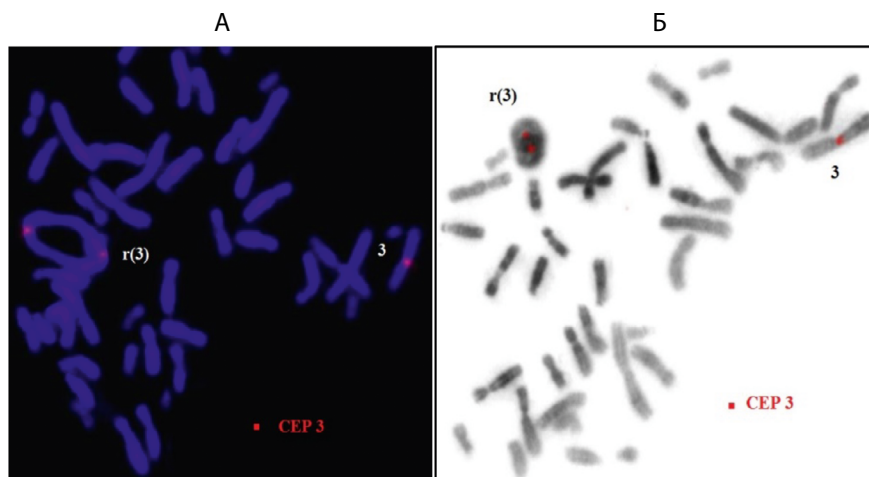


Рис. 4. Результаты FISH с ДНК-зондом на центромерный район хромосомы 3:

А – двойное кольцо, содержащее два центромерных района хромосомы 3; Б – двойное кольцо (инвертированное DAPI изображение).

Динамический мозаицизм вследствие митотической нестабильности г(3)

	г(3)	г(3) отсутствует	Вторичные перестройки г(3) (двойное кольцо, два кольца в одной клетке, дополнительное разорванное кольцо)	Всего клеток с вторичными хромосомными аномалиями
Количество интерфазных ядер/метафазных пластинок - абс. (%)	86 (86 %)	4 (4%)	10(10%)	14 (14%)

нов вследствие динамического мозаицизма г(3) представлена в **таблице**.

Как видно из представленных в таблице данных, суммарная частота клеток с вторичными хромосомными аномалиями составила 14%, что позволяет считать уровень нестабильности г(3) у пациента высоким [1,8].

Присутствие КХ в геноме является причиной митотической нестабильности, что приводит к формированию соматического динамического мозаицизма. В отличие от интактных линейных хромосом судьба КХ в клеточном цикле зависит от сестринских хроматидных обменов (СХО) во время S-фазы митоза. Как правило, может происходить 5-6 СХО на клеточный цикл [9]. Если СХО не происходят, КХ остается интактной, сегрегирует в анафазе симметрично и проходит через клеточный цикл, сохраняя свою морфологию. Четное количество СХО приведет к формированию сцепленных колец. Нечетное количество СХО будет способствовать трансформации двух параллельных хроматид в одну протяженную кольцевую структуру, состоящую из оригинальной кольцевой хромосомы двойного размера. Такие производные кольцевых хромосом являются нестабильными структурами. При движении гомологичных центромер к противоположным клеточным полюсам в этих аномальных хромосомах формируются анафазные мосты, которые подвергаются разрывам, что приводит, в свою очередь, к образованию дочерних клеток как с различными вторичными структурными хромосомными перестройками в виде дицентрических КХ, двух или трех моноцентрических или дицентрических КХ в одной клетке, открытых колец, хромосомных фрагментов, так и клеток с моносомией по соответствующей хромосоме. В большинстве случаев в клетках с моносомией или структурными хромосомными aberrациями происходит остановка клеточного цикла и апоптоз [10]. Однако было показано, что популяция aberrантных

клеток может размножаться и выживать *in vivo*, приводя к формированию динамического мозаицизма и, как следствие, к фенотипической вариабельности у пациентов с КХ [11].

Таким образом, наличие вторичных хромосомных аномалий с вовлечением хромосомы 3 в виде мозаичной сегментной или полной трисомии/ моносомии позволяет объяснить формирование достаточно тяжелых клинических и фенотипических проявлений у нашей пациентки.

Заключение

Топология хромосом играет важную роль в клеточном цикле. Репликация ДНК нормальных линейных хромосом приводит к образованию двух сестринских хроматид, ориентированных в параллельной конфигурации, что позволяет им симметрично сегрегировать при метафазно-анафазном переходе. Однако изменение топологии из линейной в кольцевую может существенным образом нарушить такую последовательность событий, приводя к структурной нестабильности кольцевой хромосомы и формированию динамического мозаицизма.

Данный случай наглядно демонстрирует универсальность комплексного подхода в диагностике и изучении механизмов формирования кольцевых хромосом. Показано, что формирование кольцевых хромосом может проходить с сохранением субтеломерных регионов и теломерных повторов одного плеча. Большой спектр симптомов и тяжесть их проявления у пациентов с кольцевыми хромосомами может быть обусловлена вкладом дополнительных факторов. Так, помимо делеции на одном или обоих плечах хромосомы, приводящей к формированию кольцевой структуры, вторичный хромосомный (геномный) дисбаланс вследствие их митотической нестабильности и динамического мозаицизма должен также учитываться при оценке генетических последствий присутствия в геноме кольцевой хромосомы.

Список литературы/References

1. Kosztolanyi G. Does “ring syndrome” exist? An analysis of 207 case reports on patients with a ring autosome. *HumGenet* 1987a; 75: 174-179.
2. Kosztolanyi G. The genetics and clinical characteristics of constitutional ring chromosomes. *J Assoc Genet Technol* 2009; 35(2): 44-48.
3. Mukerjee D., Burdette W.J. Multiple congenital anomalies associated with a ring 3 chromosome and translocated 3/X chromosome. *Nature* 1966; 212: 153–155.
4. Wilson G.N., Pooley J., Parker J. The phenotype of ring chromosome 3. *J Med Genet* 1982; 19: 471-473.
5. McKinley M., Colley A., Sinclair P. et al. De novo ring chromosome 3: A new case with a mild phenotype. *J Med Genet* 1991; 28: 536-538.
6. Schinzel A. Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man, 2nd ed. 2001: Berlin, Germany.
7. Cargile C.B., Goh D.L., Goodman B.K. et al. Molecular cytogenetic characterization of a subtle interstitial del(3)(p25.3p26.2) in a patient with deletion 3p syndrome. *Am J Med Genet* 2002; 109: 133-138.
8. Hu O., Chai H., Shu W., Li P. Human ring chromosome registry for cases in the Chinese population: re-emphasizing cytogenomic and clinical heterogeneity and reviewing diagnostic and treatment strategies. *Molecular Cytogenetics* 2019; 11: 19.
<https://doi.org/10.1186/s13039-018-0367-3>
9. vanWietmarschen N, Lansdorp PM. Bromodeoxyuridine does not contribute to sister chromatid exchange events in normal or Bloom-syndrome cells. *Nucleic Acids Res* 2016; 44: 6787–6793.
10. Gisselsson D. Ring chromosomes: vicious circles at the end, beginning of life. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 2002; 6(1): 62-69.
11. Sodré CP, Guilherme RS, Meloni V. et al. Ring chromosome instability evaluation in six patients with autosomal rings. *Genetics and Molecular Research* 2010; 9(1): 134-143.