

Семейная сложная хромосомная перестройка с участием хромосом 2, 3, 18: фенотипические эффекты и значимость комплексного молекулярно-цитогенетического исследования

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

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

Представлен семейный случай комплексной хромосомной перестройки, ранее идентифицированной как сбалансированная транслокация. Пациент, 5 лет, обследован по поводу врожденных пороков развития, задержки физического и психоречевого развития. При стандартном цитогенетическом исследовании определен кариотип 46,XY,t(2;18)(q32;q23)mat. FISH исследование хромосомных препаратов пациента и его матери позволило установить, что перестройка, изначально установленная как реципрокная транслокация, на самом деле являлась комплексной, и затрагивала еще одну хромосому. Мать оказалась носительницей транслокации t(2;3;18)(q31;q29;q21), что не было определено при стандартном цитогенетическом исследовании. Соответственно, ребенок унаследовал две дериватные хромосомы der(2) и der(18) вследствие мейотической сегрегации комплексной транслокации у матери. Врожденные аномалии развития у пациента связаны с хромосомным дисбалансом — частичной трисомией по хромосоме 3 (q29→qter) и частичной моносомией по хромосоме 18 (q21→qter). Идентификация структуры и происхождения комплексных хромосомных перестроек играет важную роль в цитогенетической диагностике, особенно в случае с семейным носительством, так как позволяет оценить повторный риск рождения ребенка с хромосомным дисбалансом, который у носителей сбалансированных перестроек повышен. В последние годы диагностика комплексных хромосомных перестроек значительно улучшилась благодаря внедрению современных молекулярно-цитогенетических методов. Использование разнообразных технологий FISH иногда является необходимым в цитогенетической практике для полной и качественной диагностики комплексных хромосомных аномалий.

Ключевые слова: комплексные хромосомные перестройки, дериватные хромосомы, мейотическая сегрегация, FISH-анализ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

A familial complex chromosomal rearrangement involving chromosomes 2, 3, 18: phenotypic effects and the importance of a complex molecular cytogenetics study

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

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

We report on a molecular cytogenetic diagnosis of familial complex chromosomal rearrangement. A 5-year-old child with developmental delay and his mother were referred for genetic evaluation. The chromosome analysis of a child revealed a reciprocal translocation t(2;18)(q32;q23)mat. FISH analyses showed that it was not a balanced translocation. A patient had a two derivative chromosomes — der(2), der(18), due to unbalanced segregation of the three-way exchange t(2;3;18) from mother. Hereby the abnormal phenotype of patient can be explained by partial trisomy 2q and partial monosomy 18q. Initially, chromosomal rearrangement described here was interpreted as balanced translocation. However, FISH analysis revealed that the rearrangement was far more complex than originally proposed involving a larger number of chromosomes. Only a combination of several different approaches was sufficient to resolve the nature of this complex chromosomal rearrangement which had an unexpected level of complexity.

Key words: Complex chromosomal rearrangements, derivative chromosome, meiotic segregation, FISH-analysis.

Введение

Абсолютное большинство случаев носительства сбалансированных транслокаций не ассоциируются с аномалиями фенотипа и интеллектуальными нарушениями. Однако в цитогенетической практике нередко встречаются пациенты с аномальным фенотипом и сбалансированным кариотипом. Одним из объяснений фенотипических отклонений при сбалансированном состоянии кариотипа является наличие «скрытого» геномного дисбаланса и более сложных комплексных перестроек хро-

мосом [1, 2]. Диагностика таких случаев является необходимым условием для адекватного медико-генетического консультирования и определения прогноза потомства.

Комплексные хромосомные перестройки (КХП) являются структурными аномалиями с участием двух и более хромосом и наличием более чем двух точек разрывов. Сбалансированные КХП могут быть образованы как путем взаимного трехэтапного обмена между тремя хромосомами, так и вследствие сложных комплексных транслокаций, вовлекающих четыре или пять хромосом

со множеством точек разрывов, инверсий и инсерций. Подавляющее большинство КХП представлено комбинациями транслокаций [3].

Согласно литературным данным примерно 70% КХП обнаружены у фенотипически нормальных индивидуумов, 20–25% у пациентов с различными врожденными пороками развития и/или умственной отсталостью и 5–10% случаев диагностированы пренатально [4]. Основную долю КХП составляют *de novo* возникшие перестройки. Семейные КХП являются редким событием и наблюдаются примерно в 30% случаев [2, 5]. Обычно сбалансированные КХП диагностируются у женщин, имеющих в анамнезе повторные спонтанные аборт или рождение ребенка с хромосомным дисбалансом, аномалиями фенотипа и/или умственной отсталостью. У мужчин сбалансированные КХП обнаруживают при обследовании по поводу репродуктивных проблем или бесплодия.

При стандартном цитогенетическом исследовании кариотипа КХП выявляются довольно редко. На сегодняшний день описано не более 300 случаев [4, 6]. Несмотря на относительно редкую частоту встречаемости КХП, число публикаций по этой теме постоянно растет, что может быть связано с активным использованием для диагностики хромосомной патологии таких молекулярно-цитогенетических методов, как FISH и хромосомный микроматричный анализ (ХМА), которые позволяют идентифицировать скрытый геномный дисбаланс [2, 7, 8, 9]. Идентификация структуры и происхождения КХП позволяет оценить повторный риск рождения ребенка с хромосомным дисбалансом, который у носителей сбалансированных КХП повышен.

Материалы и методы

Анализ кариотипа пациента и его родителей был выполнен на хромосомных препаратах из культуры лимфоцитов периферической крови. Дифференциальное GTG-окрашивание метафазных хромосом проводили по стандартным протоколам. FISH-анализ с использованием центромерного ДНК-зонда на хромосому 18 (SE 18 — D18Z1), и субтеломерных ДНК-зондов на хромосомы 2, 3, 18 (Sub Telomere 2, 3, 18 pter/qter) осуществляли по протоколам, предложенным фирмой-производителем (Kreatech, Нидерланды). Многоцветную FISH выполняли с набором mFISH (24XСyte) (MetaSystems, Германия) по протоколу фирмы-производителя. Денатурацию и гибридизацию проводили с использованием гибридационной системы ThermoBrite (Abbott Molecular, США). Для контрокрасивания хромосом использовали флуоресцентный краситель DAPI. Молекулярно-цитогенетический анализ проводили на флуоресцентном микроскопе AxioImager M.1 (Zeiss) с соответствующим набором светофильтров и с использованием компьютерной программы обработки FISH-изображения (Isis, MetaSystems, Германия). Кариотип указан в соответствии с международной цитогенетической номенклатурой ISCN, 2016.

Результаты

Пациент, 5 лет, обследован по поводу задержки темпов физического и психоречевого развития. Из анамнеза известно, что ребенок от третьей беременности (1 неразвивающаяся беременность, 1 здоровый ребенок в семье). Состояние при рождении тяжелое: гипорефлексия, поза «лягушки», расщелина твердого и мягкого неба, вальгусная деформация стоп, врожденный порок сердца, двустворчатый клапан аорты, недостаточность аортального клапана I степени, открытое овальное окно, гипотрофия II–III степени, пупочная грыжа больших размеров, головчатая форма гипоспадии, крипторхизм справа. Раннее психомоторное развитие с задержкой: сидит с 2,5 лет, встает и стоит с поддержкой с 3 лет 8 месяцев, не ходит, речь слоговая, навыки опрятности не сформированы. Задержка физического развития. Фенотип пациента на момент осмотра в возрасте 5 лет: рост — 99 см (3–10 центилей), вес — 11,7 кг (<3 центилей), окружность головы — 47 см (<3 центилей), выступающий метопический шов, высокий округлый лоб, антимонголоидный разрез глаз, острый подбородок, низко посаженные ушные раковины.

При стандартном цитогенетическом исследовании по месту жительства определен кариотип 46,XY,t(2;18)(q32;q23). При исследовании кариотипа родителей пациента, у матери обнаружена такая же сбалансированная транслокация. Для уточнения цитогенетического диагноза семья обратилась в МГНЦ.

FISH-анализ хромосомного препарата пробанда с использованием центромерного ДНК-зонда на хромосому 18 и субтеломерных ДНК-зондов на хромосомы 2, 18 позволил определить, что субтеломерный район длинного плеча хромосомы 2 присутствует на длинном плече дериватной хромосомы 18. Однако на дериватной хромосоме 2 какой-либо гибридационный сигнал отсутствовал (рис. 1 а,б). Аналогичное FISH-исследование, проведенное матери пробанда, помогло установить, что субтеломерный район длинного плеча хромосомы 18 присутствует на длинном плече дериватной хромосомы 3 (рис. 2а).

mFISH позволил полностью идентифицировать у матери только дериватные хромосомы 3 и 18, однако на дериватной хромосоме 2 гибридационный сигнал, свидетельствующий о присутствии на ней материала хромосомы 3, не обнаружен (рис. 2б), что можно объяснить размером транслоцированного сегмента менее 5 млн п.н. FISH-анализ хромосомного препарата матери пробанда с использованием ДНК-зондов на субтеломерные районы хромосомы 3 подтвердил наличие транслокации t(2;3;18). Следовательно, мать пробанда является носительницей сбалансированной транслокации. Использование электронной базы данных UCSC (<http://genome.ucsc.edu>) совместно с результатами стандартного цитогенетического исследования и FISH-анализа позволило уточнить точки разрывов для каждой

хромосомы — 2, 3, 18, вовлеченной в перестройку — q31, q29, q21 соответственно.

FISH-анализ метафазных хромосом пробанда с использованием субтеломерного ДНК-зонда на хромосому 3 также подтвердил происхождение дериватной хромосомы 2, вследствие транслокации t(2;3), о чем свидетельствует наличие гибридационного сигнала субтеломерного района длинного плеча хромосомы 3 на длинном плече дериватной хромосомы 2 (рис. 3).

В результате проведенного комплексного исследования у пробанда определили наличие двух дериватных хромосом — der(2)t(2;3;18), der(18)t(2;3;18), образовавшихся вследствие несбалансированной транслокации материнского происхождения. Таким образом, хромосомный дисбаланс у пробанда определялся частичной трисомией по хромосоме 3 (q29→qter) и частичной моносомией по хромосоме 18 (q21→qter).

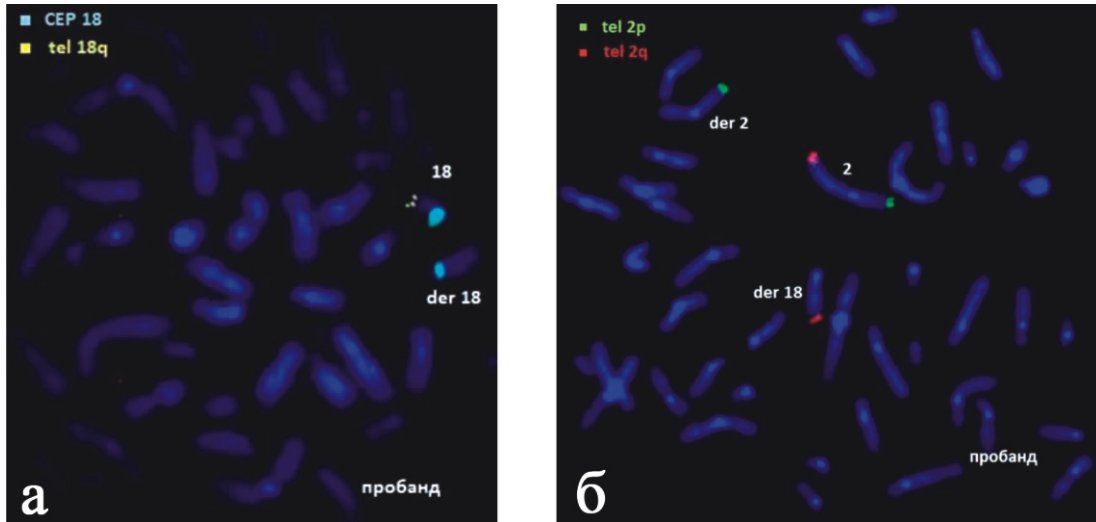


Рис. 1. Результат FISH с ДНК-зондами на центромерный и субтеломерный районы длинного плеча хромосомы 18 (а), субтеломерные районы короткого и длинного плеча хромосомы 2.

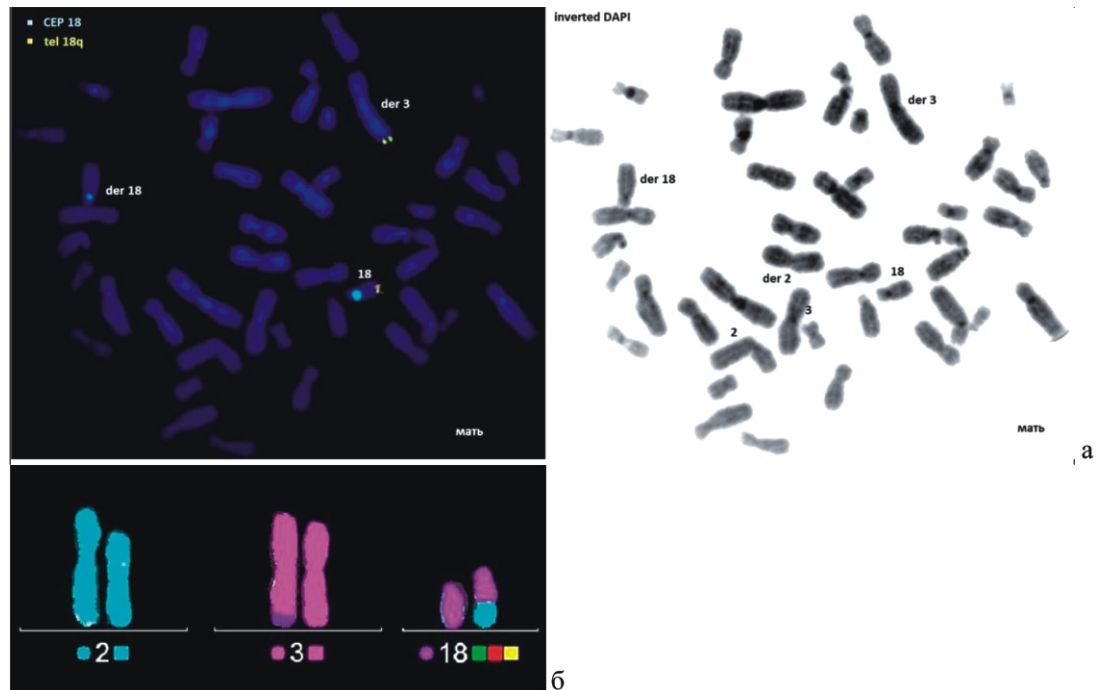


Рис. 2. Результат FISH с ДНК-зондами на центромерный и субтеломерный районы длинного плеча хромосомы 18, и инвертированное изображение метафазной пластинки (а), результат mFISH (б).

Обсуждение

Определение сбалансированной хромосомной перестройки у пациента с аномалиями фенотипа и/или наличием интеллектуальных нарушений при стандартном исследовании кариотипа требует от цитогенетиков дальнейшей диагностики с использованием различных методов. Нередко причиной аномального фенотипа может быть геномный дисбаланс вследствие КХП. Представленный семейный случай, изначально установленный как сбалансированная транслокация, в действительности оказался КХП, которую удалось идентифицировать только FISH-методом. В последние десятилетия идентификация КХП значительно улучшилась благодаря внедрению молекулярно-цитогенетических (FISH) и молекулярных (ХМА) методов исследования. Все большее число сообщений демонстрируют, что КХП могут быть более сложными и распространенными, чем первоначально предполагалось, что требует от цитогенетиков значительного внимания к определению их точной структуры и происхождения [1,10].

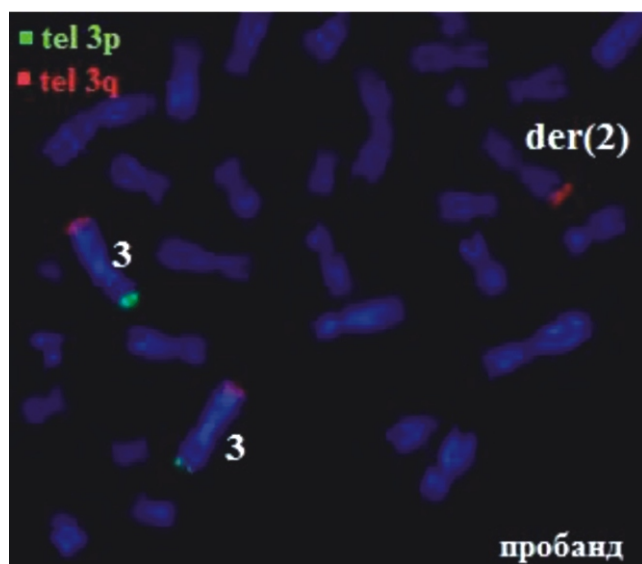


Рис. 3. Результат FISH с ДНК-зондами на субтеломерные районы хромосомы 3.

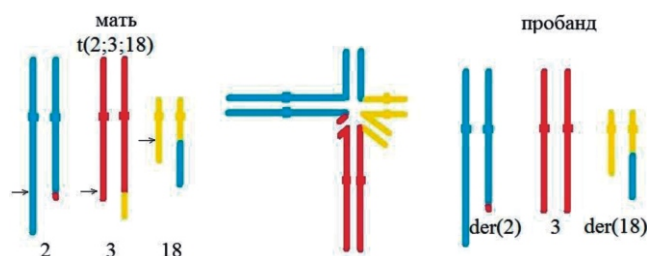


Рис. 4. Хромосомы и пахитенная диаграмма КХП с участием трех хромосом и трех точек разрывов. Мейотический гексавалент при $t(2;3;18)(q31;q29;q21)$, с последующим образованием гамет с хромосомным дисбалансом.

Как и в случаях с реципрокными транслокациями, вовлекающими две хромосомы, носители сбалансированных КХП имеют повышенный риск рождения ребенка с хромосомным дисбалансом, спонтанного прерывания беременности и бесплодия вследствие мейотической сегрегации и образования дериватных или рекомбинантных хромосом. Представленный в данном исследовании тип КХП, так называемый трехэтапный обмен (three-way exchange), является наиболее распространенным. В обзоре Madan K. представлена классификация КХП, в соответствии с которой исследуемая в работе хромосомная перестройка может быть отнесена к типу I (количество разрывов = количеству дериватных хромосом) [3]. Для таких КХП применяются те же правила определения типа патологической сегрегации и оценки жизнеспособности плодов и новорожденных, что и при аутомных реципрокных транслокациях. Риски формирования зигот с хромосомным дисбалансом у носителей КХП значительно варьируют от транслокации к транслокации. Эти риски зависят от наиболее вероятного для каждой конкретной транслокации типа патологической сегрегации, приводящей к формированию несбалансированных гамет и вероятной жизнеспособности несбалансированных зигот, эмбрионов, плодов или новорожденных. В свою очередь, эти вероятности зависят от хромосом, вовлеченных в транслокацию, и размеров центрического и транслоцированного сегментов [11].

При оценке повторного риска рождения жизнеспособного ребенка с хромосомным дисбалансом у носителя КХП необходимо учитывать пахитенную конфигурацию гексавалента, относительный размер хромосомного дисбаланса и потенциальную жизнеспособность зигот (рис. 4).

Для КХП типа I возможны следующие теоретические варианты патологической мейотической сегрегации: 3:3, 4:2, 5:1 и 6:0, приводящие к формированию гамет (зигот) с хромосомным дисбалансом [5]. В представленном случае у пробанда наблюдается 3:3 совместный-1 тип сегрегации. В нескольких работах при исследовании семей с аналогичными транслокациями отмечается, что хромосомный дисбаланс у новорожденных наблюдался преимущественно вследствие 3:3 совместного-1 типа сегрегации [12,13]. Известно также, что вовлечение в перестройку хромосом из групп А, В или С и относительно длинный транслоцированный сегмент приводят к продукции нежизнеспособных зигот, что возможно имело место в представленной семье (неразвивающаяся беременность у матери).

Хромосомный дисбаланс у пробанда ассоциирован с двумя дериватными хромосомами, и определяется как частичная моносомия по хромосоме 18 ($q21 \rightarrow qter$), и частичная трисомия участка длинного плеча хромосомы 3 ($q29 \rightarrow qter$), что обуславливает «фенотипический гибрид», характеризующийся комплексом клинических проявлений дисбаланса.

По данным литературы, примерно 1/40.000 новорожденных имеют делецию 18q (Unique, The Rare Chromosome Disorder Support Group, <http://www.rarechromo.org>). Фенотипические проявления довольно вариабельны и зависят от размера делетированного региона. При использовании электронных баз данных UCSC (<http://genome.ucsc.edu>) и OMIM (<http://www.omim.org/>) мы определили, что участок представленной делеции хромосомы 18(q21→qter) достаточно протяженный (примерно 30 млн п.н) и содержит более 100 различных генов, что не позволяет проследить четкую корреляцию «генотип-фенотип» у пациента. Однако критическим регионом для типичных проявлений моносомии 18q считается район между 18q22.3-q23, размером 4,3 млн п.н. [14]. Характерными признаками синдрома 18q- являются: невысокий рост, гипотония, лицевые дизморфии, врожденные пороки развития сердечно-сосудистой системы, деформации стоп и потеря слуха. В нашем случае у пробанда также отмечены невысокий рост, вальгусная деформация стоп, врожденный порок сердца, двустворчатый клапан аорты, недостаточность аортального клапана I степени. В работе Cody с соавт. представлены клинические результаты обследования группы пациентов с терминальной делецией 18q, более половины из которых имели врожденные пороки развития сердечно-сосудистой системы, задержку роста, деформацию стоп, гипоспадию, проксимально расположенные большие пальцы рук, конические пальцы, уплощенное лицо, расщелину неба, атрезию и стеноз наружного слухового прохода [15]. Когнитивные функции варьируют от нормального интеллекта до умственной отсталости (OMIM 601808). Степень тяжести умственной отсталости зависит от района делеции, и может быть легкой у пациентов с делециями дистальнее района 18q21.33 и тяжелой у пациентов с делециями проксимальнее 18q21.31 [16]. В нашем случае у пробанда наблюдалась задержка психомоторного и речевого развития средней степени, что ограничивает область делеции районом 18q21.33. Таким образом, степень выраженности клинических симптомов может определяться размером и позицией делетированного региона длинного плеча хромосомы 18.

Не менее важное влияние на фенотип пробанда оказывает присутствие в кариотипе микродупликации длинного плеча хромосомы 3. Район 3q29 является областью кластеризации сегментных дупликаций генома, представленных крупными блоками низкокопийных повторов ДНК, и являющихся «субстратом» для структурных хромосомных перестроек [17]. Синдром микродупликации 3q29 возникает вследствие частичной трисомии длинного плеча хромосомы 3 размером 1,6 млн п.н. (OMIM 611936). Goobie с соавт. в своей работе описали молекулярную и клиническую характеристику четырех случаев микродупликации 3q29 [18]. Несмотря на то, что фенотип представленных пациентов отличается вариабельной экспрессивностью и неполной пенетрантностью признаков, авторами были определе-

ны следующие основные фенотипические характеристики, ассоциированные с синдромом микродупликации 3q29: микроцефалия, низкопосаженные ушные раковины, опущенные уголки рта, аномалии развития сердечно-сосудистой системы, аномалии развития глаз, гипотония, задержка психомоторного и речевого развития. У одного пациента, как и в клиническом описании представленного пробанда, отмечалось наличие пупочной грыжи. В целом, фенотип нашего пациента соответствует клиническим проявлениям синдрома микродупликации 3q29.

Принято считать, что гаплоидная длина аутосомы (haploid autosomal length — HAL) отражает частоту возникновения разрывов, то есть, чем выше процент HAL, тем большее количество точек разрывов может быть на хромосоме. Однако некоторые исследования опровергают данное утверждение. В работе Giardino с соавт. показано, что число хромосомных разрывов не имеет прямой пропорциональной зависимости от размера самой хромосомы, и зачастую в комплексных перестройках хромосомы 16, 18, 20, 21 и 22 участвуют даже чаще, чем некоторые крупные хромосомы (1, 6, 12, X) [19]. Тем не менее, некоторые исследования хромосом, вовлеченных и не вовлеченных в КХП, показывают, что хромосомы 2, 3, 4, 7, 11 более часто участвуют в КХП, чем ожидалось [6]. Вероятно также, что некоторые хромосомные районы могут являться «горячими точками» для разрывов и формирования КХП в целом. В частности, установлено, что в районе 18q21 были локализованы точки разрывов в 11 из 14 случаев КХП с участием хромосомы 18 [20]. Battisti с соавторами подтвердил наличие «горячих точек» в районе 18q21, что предполагает существование кластеров разрыва в определенных бэндах хромосом [10]. Однако важно отметить, что даже если некоторые хромосомы или специфические хромосомные районы, по-видимому, преимущественно участвуют в КХП, большинство КХП не затрагивает конкретные точки или хромосомы.

Список литературы

1. Patsalis PC, Evangelidou P, Charalambous S, Sismani C. Fluorescence in situ hybridization characterization of apparently balanced translocation reveals cryptic complex chromosomal rearrangements with unexpected level of complexity. *Eur J Hum Genet.* 2004;(12):647-653.
2. Schluth-Bolard C, Delobel B, Sanlaville D, et al. Cryptic genomic imbalances in de novo and inherited apparently balanced chromosomal rearrangements: array CGH study of 47 unrelated cases. *Eur J Med Genet.* 2009;52(5):291-296.
3. Madan K. Balanced complex chromosome rearrangements: Reproductive aspects. A review. *Am J Med Genet.* 2012;Part A(158A):947-963.
4. Madan K, Nieuwint AW, van Bever Y. Recombination in a balanced complex translocation of a mother leading to a balanced reciprocal translocation in the child. Review of 60 cases of balanced complex translocations. *Hum Genet.* 1997;99:806-815.

5. Pellestor F, Anahory T, Lefort G, et al. Complex chromosomal rearrangements: Origin and meiotic behaviour. *Hum Reprod Update*. 2011;(17):476-494.
6. Zhang F, Carvalho CMB, Lupski JR. Complex human chromosomal and genomic rearrangements. *Trends Genet*. 2009a;25:298-307.
7. De Gregori M, Ciccone R, Magini P, et al. Cryptic deletions are a common finding in «balanced» reciprocal and complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients. *J Med Genet*. 2007;44(12):750-762.
8. Feenstra I, Hanemaaijer N, Sikkema-Raddatz B, et al. Balanced into array: Genome-wide array analysis in 54 patients with an apparently balanced de novo chromosome rearrangement and a meta-analysis. *Eur J Hum Genet*. 2011;(19):1152-1160.
9. Poot M, Haaf T. Mechanisms of origin, phenotypic effects and diagnostic implications of complex chromosome rearrangements. *Mol Syndromol*. 2015;6:110-134
10. Battisti C, Bonaglia MC, Giglio S, et al. De novo double translocation 3;13 and 4;8;18 in a patient with mental retardation and skeletal abnormalities. *Am J Med Genet*. 2003;117:27-211.
11. Шилова Н.В. Аутосомные реципрокные транслокации: пренатальная селекция, сегрегация и оценка эмпирического риска рождения жизнеспособного ребенка с хромосомным дисбалансом при семейном носительстве. *Медицинская генетика*. 2018;(187):41-49.
12. Batista DAS, Pai GS, Stetten G. Molecular analysis of a complex chromosomal rearrangement and a review of familial cases. *Am J Med Genet*. 1994;53:255-263.
13. Lespinasse J, North MO, Paravy C, et al. A balanced complex chromosomal rearrangement (BCCR) in a family with reproductive failure. *Hum Reprod*. 2003;18:2058-2066.
14. Kontodiou M, Daskalakis G, Vetro A, et al. Complex Rearrangement Involving Three Chromosomes, Four Breakpoints and a 2.7-Mb Deletion in the 18q Segment Observed in a Girl with Mild Learning Difficulties. *Cytogenet Genome Res*. 2015;147(2-3):118-23.
15. Cody JD, Hasi M, Soileau B, et al. Establishing a reference group for distal 18q-: clinical description and molecular basis. *Hum Genet*. 2014;133: 199-209.
16. Feenstra I, Vissers LE, Orsel M, et al. Genotype-phenotype mapping of chromosome 18q deletions by high resolution array CGH: an update of the phenotypic map. *Am J Med Genet*. 2007;143A:1858-1867.
17. Lupski JR, Stankiewicz P. Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoSgen*. 2005;1:e49.
18. Goobie S, Knijnenburg f D, FitzPatrick H. et al. Molecular and clinical characterization of de novo and familial cases with microduplication 3q29: guidelines for copy number variation case reporting. *Cytogenet Genome Res*. 2008;123:65-78.
19. Giardino D, Corti C, Ballarati L, et al. De novo balanced chromosome rearrangements in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn*. 2009;29:257-265.
20. Batanian JR, Eswara MS. De novo apparently balanced complex chromosomes rearrangement (CCR) involving chromosome 4, 18, and 21 in a girl with mental retardation: report and review. *Am J Med Genet*. 1998;78:44-51.