

Porovnání genotypů a fenotypů pacientek s téměř identickým abnormálním microarray profilem a odlišnou konstitucí karyotypu



Slámová Z. ¹, Tajtlová J. ², Novotná D. ¹, Šulcová H. ², Trková M. ³, Hedvičáková P. ¹, Havlovicová M. ¹, Gregor V. ², Drábová J. ¹, Palánová M., Vosecká T., Sedláček Z. ¹

1. Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol, Praha
2. Oddělení lékařské genetiky, Thomayerova nemocnice, Praha
3. Gennet, s.r.o. Praha



Úvod

Proximální oblast dlouhých ramen chromozomu 15 (region 15q11-q13) je vzhledem k přítomnosti pěti rekurentních zlomových míst (BP1-BP5) tvořených segmentálními duplikacemi náchylná ke vzniku intrachromozomových přestavb (deleci, duplikací, triplikací a inverzí), případně k formování nadpočetných marker chromozomů. S oblastí 15q11.2-q13 jsou spojeny deleční syndromy Prader-Willi (PWS) a Angelman (AS) a duplikační syndrom 15q, jejichž konkrétní fenotypový projev a závažnost postižení jsou vlivem genového imprintingu variabilní v závislosti na rodičovském původu derivovaného chromozomu 15. Intersticiální triplikace 15q11-q13 zapříčiňující tetrazomii dané oblasti jsou vzácné a na rozdíl od duplikací jsou vždy doprovázeny závažným fenotypovým projevem. Podobně jako u intersticiálních triplikací lze parciální tetrazomii oblasti 15q11-q13 a tedy též tetrazomii kritického regionu pro PWS/AS syndrom pozorovat u pacientů nesoucích v karyotypu velký nadpočetný inv dup(15) marker chromozom.

Prezentujeme genotypové a fenotypové porovnání dvou pacientek s velice podobným patologickým microarray profilem (triplikace oblasti 15q11.2-q13.2 s navazující duplikací 15q13.2-q13.3) při odlišné konstituci karyotypu. Zatímco u pacientky A se jednalo o komplexní přestavbu oblasti 15q, u pacientky B byl zjištěn velký nadpočetný inv dup(15) marker chromozom. Obě přestavby měly *de novo* původ.

Klinický název

Pacientky A i B (v době vyšetření 4 a 2 roky) vykazovaly velmi podobný fenotyp:

- velmi mírný kraniofaciální dysmorfismus
- centrální hypotonie
- poruchu hrubé motoriky a koordinace s chůzí o široké bázi
- autistické rysy
- psychomotorickou retardaci s opožděním vývoje řeči
- u pacientky A byla diagnostikována středně těžká mentální retardace

Výsledky

Pacientka A

- Při karyotypování byl pozorován nadbytečný materiál v proximální oblasti 15q (obr. 1. a).
- Array CGH prokázala 7,98 Mb triplikaci 15q11.2-q13.2 (BP1-BP4), obsahující PWS/AS kritický region a navazující 2,18 Mb duplikaci 15q13.2-q13.3 (BP4-BP5) (obr. 1. b, c).
- Kombinací sond byl metodou FISH potvrzen a upřesněn komplexní charakter přestavby oblasti 15q11.2-q13.3 sestávající ze tří nestejných dlouhých segmentů (obr. 4. a, b1).
- Triplikované úseky 15q11.2-q13.2 jsou umístěny kontinuálně za sebou, přičemž oba krajní segmenty (BP1 – BP5) jsou prodlouženy o oblast duplikace 15q13.2-q13.3 (obr. 4. c1), prostřední segment (BP1 – BP4) tuto oblast nenese a je invertovaný (obr. 3. a, b).
- Metodou SNP array byl prokázán maternální původ všech nadpočetných kopií, čemuž odpovídá i metylační profil imprintovaných oblastí zjištěný metodou MS-MLPA.

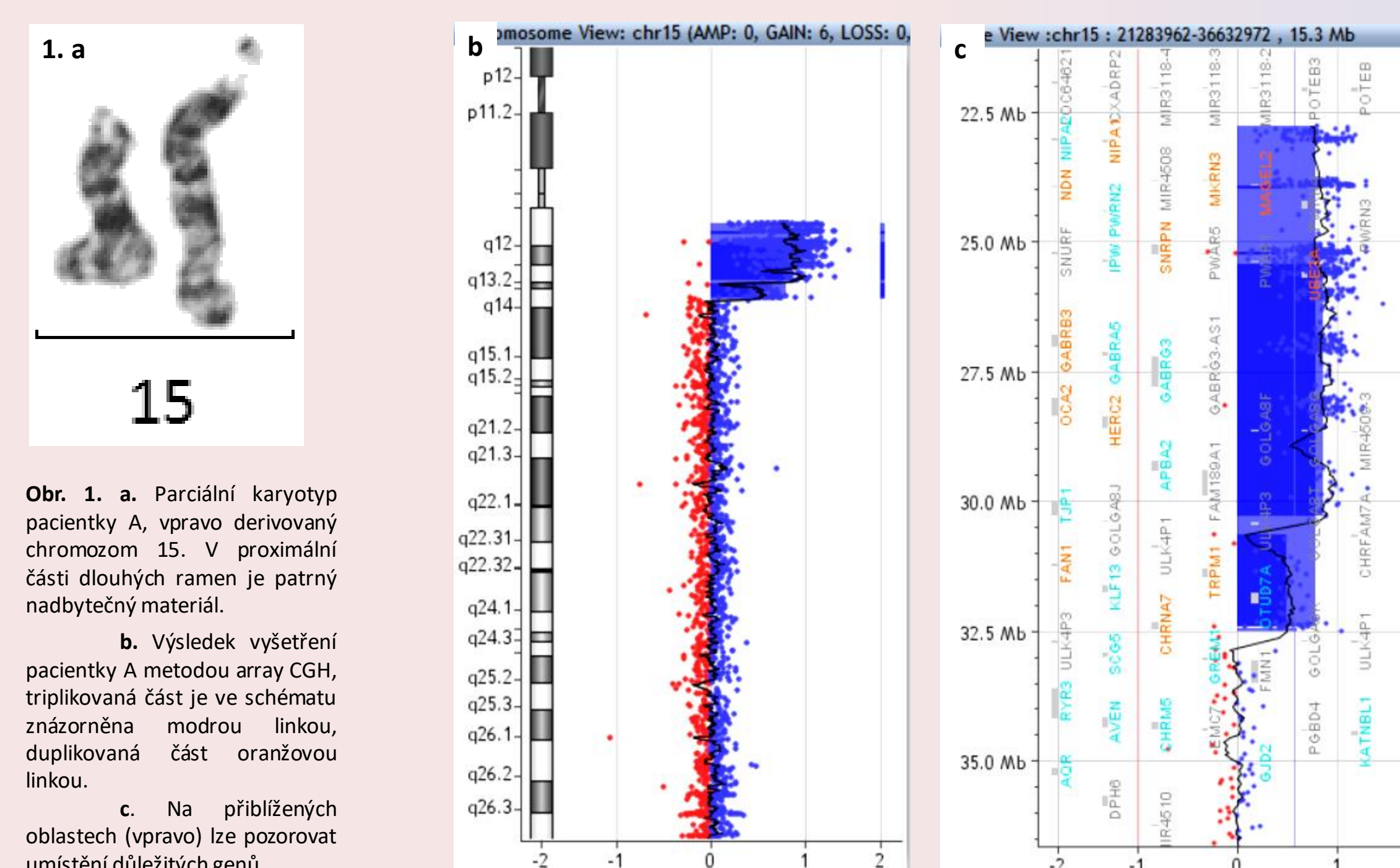
Materiál a metody

U obou pacientek byla provedena následující vyšetření:

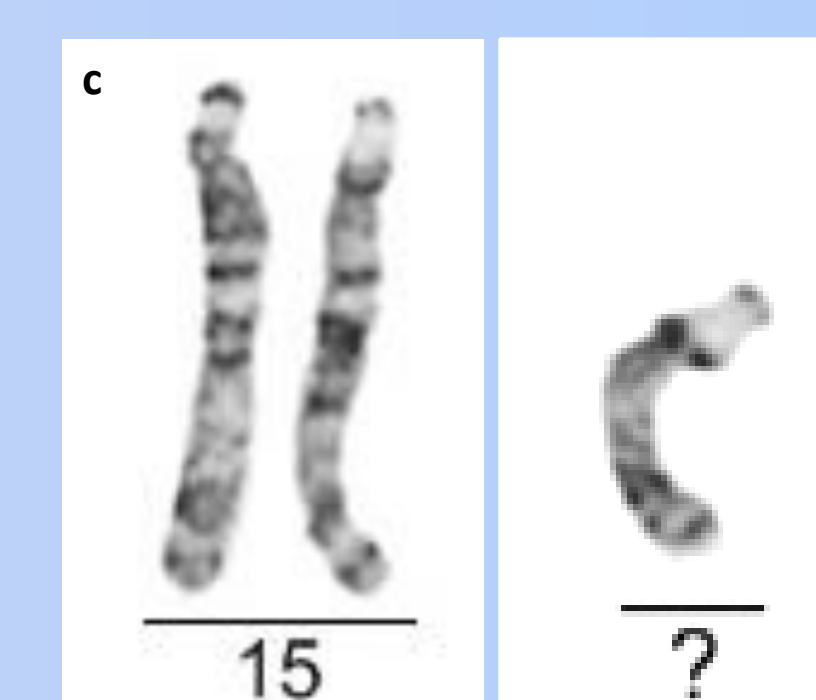
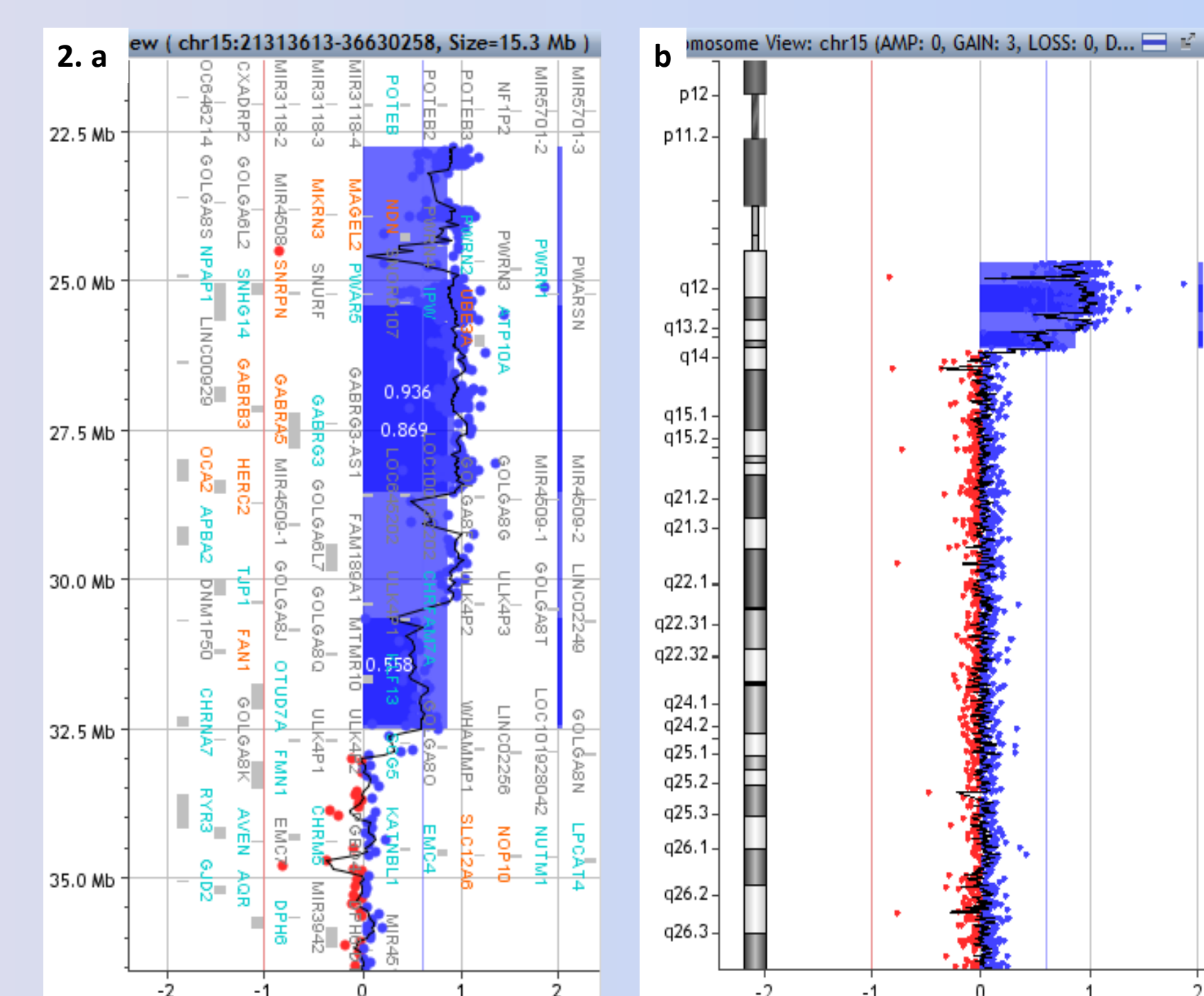
- karyotypování na kultivovaných lymfocytech z periferní krve u probandek a u jejich rodičů
- array CGH: SurePrint G3 ISCA V2 8x60K (Agilent) s využitím DNA z periferní krve probandek
- SNP array: HumanCytoSNP-12 v2.1 BeadChip (Illumina) s využitím DNA z periferní krve pacientek a jejich rodičů
- analýza imprintovaných oblastí 15q metodou MS-MLPA: SALSA MLPA ME028 (MRC-Holland) s využitím DNA z periferní krve probandek
- FISH za účelem ověření a upřesnění nálezů: Prader-Willi / Angelman - SNRPN, (Aquarius, CytoCell), BAC sondy RP11-145J24 a RP11-265I17 (BlueFISH, Illumina) na kultivovaných lymfocytech probandek

Pacientka B

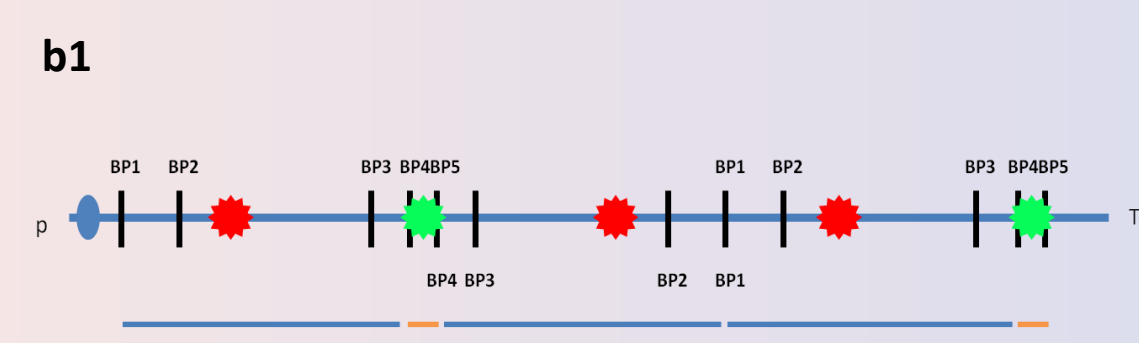
- Karyotypování odhalilo velký nadpočetný inv dup(15) marker chromozom (obr. 2. c).
- Array CGH prokázala 8 Mb triplikaci 15q11.2-q13.2 (BP1-BP4) a navazující 2,07 Mb duplikaci 15q13.2-q13.3 (BP4-BP5) (obr. 2. a, b).
- Pro potvrzení lokalizace nadpočetných kopií byly použity stejné směsi sond jako u pacientky A (obr. 4. a, b2).
- Dvě kopie oblastí BP1 – BP5 se nacházejí na normálních chromozomech 15. Další dvě kopie regionu BP1 – BP4 jsou pak v opačné orientaci umístěny na marker chromozomu, přičemž jedna z nich je prodloužena o oblast BP4 – BP5 (obr. 4. c2).
- Metodou SNP array a MS-MLPA byl i u pacientky B prokázán maternální původ nadpočetného markeru inv dup(15).



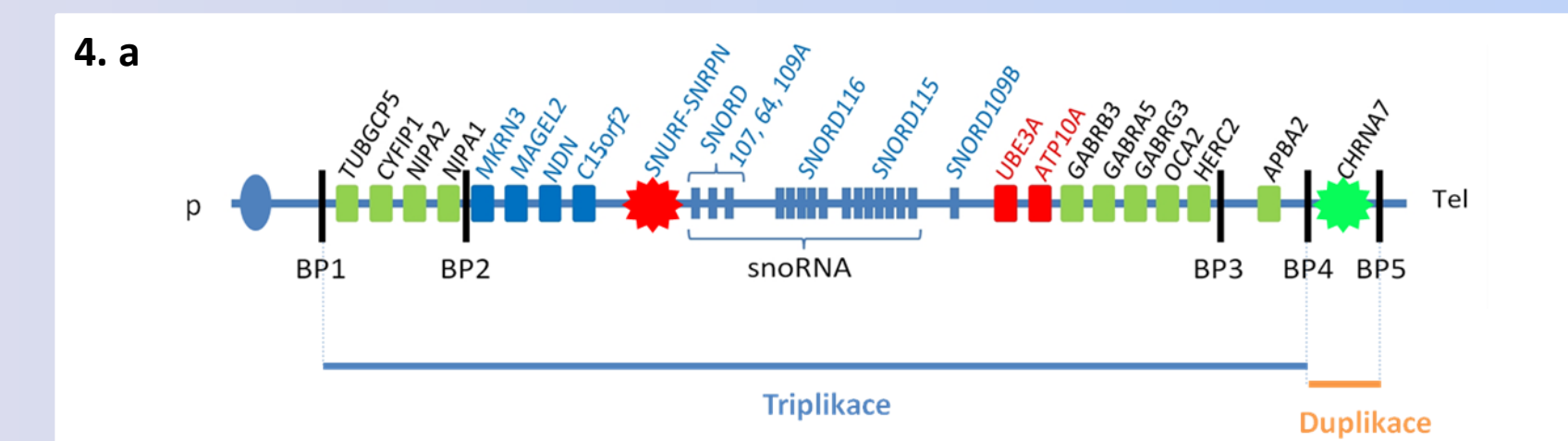
Obr. 1. a. Parciální karyotyp pacientky A, vpravo derivovaný chromozom 15. V proximální části dlouhých ramen je patrný nadbytečný materiál. b. Výsledek vyšetření pacientky A metodou array CGH, triplikovaná část je ve schématu znázorněna modrou linkou, duplikovaná část oranžovou linkou. c. Na přibližných oblastech (vpravo) lze pozorovat umístění důležitých genů.



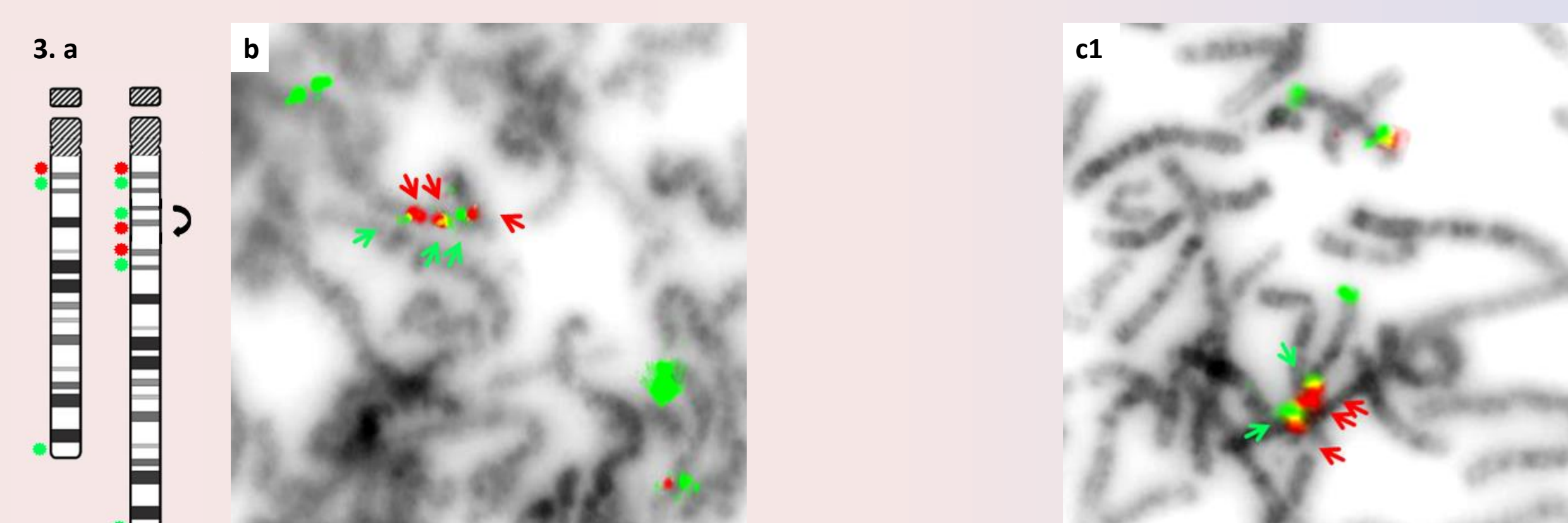
Obr. 2. a, b. Výsledek vyšetření pacientky B metodou array CGH. Výsledný profil vyšetření se jen minimálně odlišuje od profilu pacientky A, ačkoliv konstituce karyotypu je rozdílná, viz obrázek c. c. Parciální karyotyp pacientky B, vlevo normální chromozomový pár, vpravo nadpočetný inv dup(15) marker chromozom.



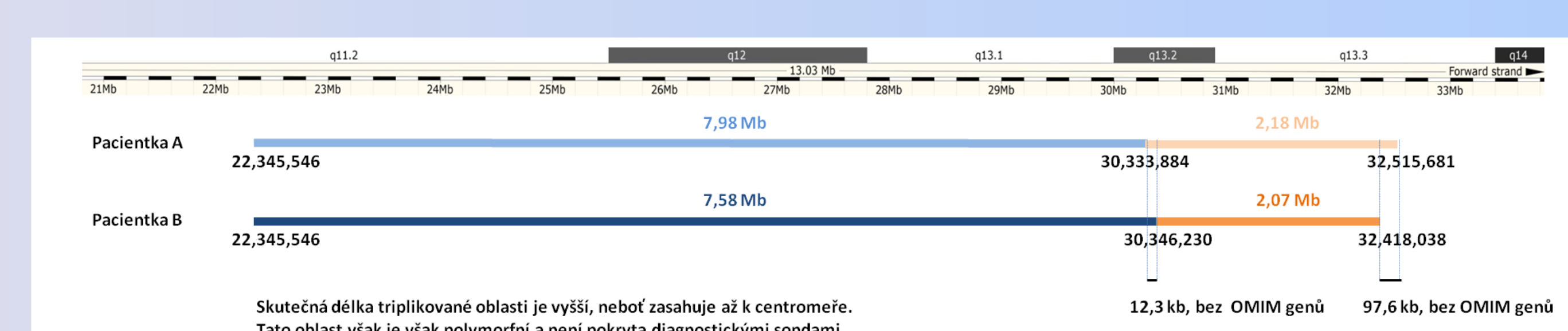
Obr. 3. a. Průkaz opačné orientace prostředního segmentu triplikace metodou FISH. Schéma uspořádání sond v normálního a derivovaného chromozomu 15. b. S použitím sond pro gen SNRPN v proximální části triplikovaného úseku (červená s kontrolní sondou pro 15qter – zelená) a BAC sondy RP-145J24 pro distální oblast triplikovaného úseku (zelená) byla potvrzena inverze prostředního segmentu triplikace.



Obr. 4. a. Znárodnění proximální oblasti 15q s vyznačením zlomových míst BP1 – BP5 a polohy míst hybridizace sond použitých k vyšetření metodou FISH. V oblasti triplikace byla použita sonda pro SNRPN gen (červená) s kontrolní sondou pro 15qter (zelená). V oblasti duplikace byla použita sonda RP-265I17 (zelená). b. Schéma znázorňující vzájemnou pozici triplikovaných a duplikovaných úseků a zároveň polohu signálů sond na derivovaném chromozomu 15 u pacientky A (b1) a na nadpočetném marker chromozomu u pacientky B (b2). c. FISH s použitím sond značených dvěma odlišnými fluorochromy pro ověření výsledků array CGH a objasnění vzájemné polohy segmentů. Na snímku c1 lze pozorovat tři červené signály pro oblast BP1-BP4, dva zelené signály pro oblast BP4-BP5 (viz šipky) na derivovaném chromozomu 15 u pacientky A. Prostřední triplikovaný segment tuto oblast nenese. Na obrázku c2 lze pozorovat dva červené a jeden zelený signál ve struktuře nadpočetného marker chromozomu u pacientky B.



Porovnáním obou patologických microarray profilů představovaných triplikací oblasti 15q11.2q13.2 (BP1-BP4) u obou dívek v minimálním rozsahu 7,88 Mb (pacientka A) a 8,0 Mb (pacientka B) s navazující duplikací oblasti 15q13.2q13.3 (BP4-BP5) v rozsahu 2,18 Mb (A) a 2,07 Mb (B) byly zjištěny pouze nevýznamné odchylky v délce jednotlivých segmentů, celkem ~ 12 kb u triplikace a ~ 110 kb u duplikace bez obsahu relevantních genů (obr. 5). Z hlediska genového obsahu lze tedy obě přestavby hodnotit jako rovnocenné.



Závěr

Chromozomové abnormality zasahující proximální oblast 15q se vyskytují v populaci relativně často, intersticiální triplikace 15q jsou však velmi vzácné a z dosud popsaných případů byly pouze dva ^{2,4} vyšetřeny pomocí metody array CGH. Parciální tetrazomie proximální oblasti 15q, projevující se charakteristickým fenotypem, bývá častěji spojena s přítomností nadpočetného marker chromozomu inv dup(15q) ^{1,3}. Obě pacientky pacientek s parciální tetrazomii 15q při odlišné konstituci karyotypu vykazují podobný fenotyp, tj. velmi mírný kraniofaciální dysmorfismus, centrální hypotonie, autistické rysy, psychomotorickou retardaci s opožděním vývoje řeči, středně těžká mentální retardace (diagnostikovaná vzhledem k věku zatím pouze u pacientky A). U obou pacientek byl podrobným vyšetřením zjištěn minimální rozdíl v rozsahu jednotlivých segmentů přestavby i v genovém obsahu. Lze se proto domnívat, že uspořádání jednotlivých kopií v karyotypu v tomto případě nehraje zásadní roli.

Literatura

1. Battaglia, 2008. The inv dup (15) or idic (15) syndrome (Tetrasomy 15q). Orphanet J Rare Dis. 3:30.
2. Castronovo et al., 2014. Complex de novo chromosomal rearrangement at 15q11-q13 involving an intrachromosomal triplication in a patient with a severe neuropsychological phenotype: Clinical report and review of the literature. Am J Med Genet Part A 9999:1-10.
3. Chen, et al. 2016. Molecular cytogenetic characterization of an inv dup(15) chromosome presenting as a small supernumerary marker chromosome associated with the inv dup(15) syndrome. Taiwan J Obstet Gynecol.;55(5):728-732.
4. Christofolini et al., 2012. Autistic Disorder Phenotype Associated to a Complex 15q Intrachromosomal Rearrangement. Am J Med Genet Part B.