

Strokovni prispevek/Professional article

SUBTELOMERNE KROMOSOMSKE PREUREDITVE – EDEN OD VZROKOV ZA IDIOPATSKO MENTALNO RETARDACIJO

SUBTELOMERIC CHROMOSOMAL ABBERATIONS – ONE OF THE REASONS FOR IDIOPATHIC MENTAL RETARDATION

Alenka Erjavec-Škerget, Boris Zagradišnik, Nadja Kokalj-Vokač

Splošna bolnišnica Maribor, Laboratorij za medicinsko genetiko, Ljubljanska 5, 2000 Maribor

Prispelo 2002-09-17, sprejeto 2003-04-09; ZDRAV VESTN 2003; 72: 359-65

Ključne besede: *submikroskopske kromosomske preureditve; subtelomere; idiopatska mentalna retardacija; fluorescenčna »in situ« hibridizacija (FISH)*

Izvleček – Izhodišča. Kromosomske napake so lahko eden od vzrokov za idiopatsko mentalno retardacijo (IMR) in dismorfologijo. V prispevku poročamo o vpeljavi simultane metode fluorescenčne hibridizacije »in situ« (FISH) za odkrivanje subtelomernih kromosomskih preureditev. Ugotavljamo, da je metoda lahko uporabna za rutinsko citogenetsko diagnostiko IMR, kongenitalnih anomalij in razreševanje kompleksnejših kariotipov. Pilotsko študijo smo izvedli pri 56 bolnikih, otrocih iz severovzhodne Slovenije, ki so bili napoteni v citogenetski laboratorij z diagnozo mentalne retardacije in/ali displastičnih znakov.

Metode. Vsem bolnikom smo odvzeli 5 ml periferne krvi in jih kariotipizirali. Za odkrivanje kromosomskih sprememb v terminalnih regijah kromosomov smo uporabili metodo FISH z uporabo kompleta Multiprobe T-System (Cytocell) ter posamezne lokusno specifične DNK sonde.

Rezultati. Subtelomerne spremembe smo našli pri 5,4% bolnikov. Od tega so pri 3,6% bolnikov subtelomerne aberacije nastale »de novo«. 2q subtelomerna delecija: *del(2)(qtel)*, ki smo jo našli pri dveh bolnikih, pa se je izkazala kot dedovani polimorfizem. Subtelomerne aberacije smo potrdili pri enem pacientu z delecijo terminalnega dela kratkega kraka kromosoma X: *del(X)(ptel)* in pri drugem z delecijo terminalnega dela dolgega kraka 13: *del(13)(qtel)* in parcialno trisomijo dela dolgega kraka kromosoma 10.

Zaključki. S prikazano študijo ugotavljamo, da je metoda FISH z multiplimi subtelomernimi DNK-sondami uporabno diagnostično orodje za odkrivanje enega od vzrokov IMR pri bolnikih z displastičnimi znaki ali brez teh znakov s sicer normalnim kariotipom.

Key words: *submicroscopic chromosomal rearrangements; subtelomere; idiopathic mental retardation; fluorescent »in situ« hybridization (FISH)*

Abstract – Background. Cryptic subtelomeric chromosome anomalies have been recognised as a significant cause of idiopathic mental retardation (IMR) and/or dysmorphology. This study presents an innovative simultaneous fluorescence in situ hybridisation (FISH) technique for detection of subtelomeric rearrangements that was introduced to the laboratory. It was found out that this method is a very useful diagnostic tool with application in the field of idiopathic mental retardation, for detection of congenital abnormalities and in resolving complex karyotypes. This study was done on 56 mentally retarded and/or dysmorphic children from the north-eastern part of Slovenia.

Methods. All patients were karyotyped using 5 ml peripheral blood samples. FISH testing using the Cytocell Multiprobe T-System and some locus specific DNA-probes was performed for detection of subtelomeric chromosomal rearrangements.

Results. Subtelomeric alterations were detected in 5.4% patients. Clinical significant »de novo« subtelomeric aberrations were detected in 3.6% of patients while deletion of the 2q subtelomeric region *del(2)(qtel)* appeared to be a common variant and inheritive in both of our cases. Two subtelomeric aberrations such as *del(X)(ptel)* and monosomy of (13)(*qtel*), and partial trisomy of chromosome 10 in (10)(*qtel*) region were found among the patients during this screening.

Conclusions. Furthermore, fluorescence in situ hybridisation (FISH) technique using the multiprobe subtelomeric DNA system proved to be a useful diagnostic tool for screening the patients with or without dysmorphic feature and normal karyotype.

Uvod

Mentalna retardacija (MR), ki je definirana z $IQ < 70$, se pojavlja pri 2 do 3% celotne populacije (25). V Veliki Britaniji ocenjujejo, da je okoli 50% oseb s takšno diagnozo vključenih v šole s prilagojenim programom (27). Ko je etiologija MR neznan, govorimo o idiopatski mentalni retardaciji (IMR). Pri lažji obliki MR ($50 < IQ < 70$) je etiologija nepojasnjena v 80% primerov, pri zmerni do težji obliki MR ($IQ < 50$) pa je nepojasnjenih 34% primerov (37).

Kljub temu da naj bi kromosomske abnormalnosti bile vzrok za MR pri vsaj 1/3 do 1/2 primerov, jih zaradi omejene ločljivosti svetlobnega mikroskopa nekaj ostaja neopaženih. S klasično citogenetsko analizo namreč lahko opazimo le večje spremembe na kromosomih, to je do velikosti 5 Mbp. Spremljanje manjših kromosomskih abnormalnosti, kot so t. i. submikroskopske spremembe, omogoča metoda fluorescenčne hibridizacije »in situ« (FISH) (11). S FISH lahko ciljano iščemo kromosomske spremembe, velike do nekaj kbp.

Pri pregledovanju objav (28, 29), ki povezujejo kromosomske nepravilnosti z mentalno retardacijo, smo opazili, da so preureditve na določenih predelih kromosomov, to je na telomerah, pogosto povezane s pojavom IMR. Telomere so, skupaj s spodaj ležečimi subtelomernimi regijami, terminalne kromosomske regije s specifično strukturo in funkcijo. Spremembe, ki jih vključujejo (delecije, amplifikacije, translokacije), imajo lahko poseben pomen za fenotipsko sliko pri bolniku in pri pojasnjevanju IMR. Do danes je sicer znanih že nekaj t. i. mikrodelecijskih sindromov, ki vključujejo preureditve na terminalnih kromosomskih regijah, za katere je poleg drugih fenotipskih znakov značilna še MR. Gre za večje delecije, ki so pogosto vidne že s klasično analizo terminalnih kromosomskih regij: 4p- (Wolf-Hirschorn), 5p- (Cri du chat), 13q-, 17p- in 18p-sindrom. S ciljanim preiskovanjem samo subtelomernih regij pa so nekatere pogostejše opažene spremembe že povezali s tipičnim fenotipom: del(1p36.3) (30–32) in del(22q ter) (33–35). Za večino drugih subtelomernih preureditev pa so fenotipi neznani oz. so manj karakteristični, zato sta njihovo odkrivanje in natančen opis zelo pomembna.

Prva študija (28), ki je začela s preučevanjem subtelomernih kromosomskih regij, je nakazala, da se napake na njih pojavljajo pri 6% bolnikov s težjo IMR. Pozneje so našli subtelomerne preureditve pri 7,4% bolnikov s težjo obliko IMR in pri 0,5% bolnikov z lažjo obliko IMR (29). Na osnovi teh rezultatov lahko subtelomerne kromosomske preureditve uvrstimo med kromosomskimi nepravilnostmi, ki so vzrok za MR (na prvem mestu je Downov sindrom), na drugo mesto.

V prispevku predstavljamo metodo preverjanja subtelomernih regij s FISH, ki smo jo kot rutinsko preiskavo uvedli v naš laboratorij, in poročamo o rezultatih aplikativne raziskovalne naloge, v katero smo vključili otroke iz severovzhodne Slovenije z IMR in/ali displastičnimi znaki, ki so bili napoteni v naš laboratorij na kariotipizacijo in so imeli normalen kariotip.

Struktura in funkcija telomer

Telomere so končni deli evkariontskih kromosomov. Telomere nastajajo oz. se ohranjajo s pomočjo delovanja specifičnega encima telomeraze, ki tudi pogojuje njihovo dokaj homogeno (glede na različne kromosome) strukturo.

Znano je, da se pri večini somatskih celic telomere po vsaki celični delitvi krajšajo. Učinkovitost telomeraze pa ostaja nezmanjšana pri zarodnih, fetalnih in hematopoetskih celicah ter celicah bazalnega epidermisa. Aktivnost telomeraze je genetsko pogojena, je torej variabilna med osebki, odvisna pa je tudi od starosti osebkov.

Tudi za tumorske celične linije je značilna nesmrtnost. Pri 90% človeških primarnih tumorjih se aktivnost telomeraze po celičnih delitvah ne zmanjšuje. Zato je vzdrževanje telomerazne

aktivnosti in s tem ohranjanje telomerne dolžine eden ključnih procesov v kancerogenezi.

Glede na sekvenčno organizacijo telomerne in subtelomerne regije razlikujemo štiri telomerna območja (15, 16):

Skrajni konec telomer sestavljajo zaporedja (TTAGGG)_n, ki se ponavljajo različno (n-krat). Število ponovitev je lahko od nekaj sto do nekaj tisoč. Povprečna dolžina DNK te regije je od 2 do 15 kbp.

Pred njimi so distalne subtelomerne sekvence. Gre za kompleks repetitivnih DNK, ki so skupne večini kromosomov in so zato nespecifične za posamezen kromosom. Ta zaporedja so dolga nekaj 100 kbp.

Intersticijska degenerativna sekvenca (TTAGGG)_n je območje, ki se pojavlja naslednje v smeri proti centromeri. To zaporedje je funkcionalno pomembno pri kompartmentalizaciji subtelomerne domene v jedru.

Proksimalne subtelomerne sekvence so daljše v primerjavi z distalnimi in so tudi bolj specifične za kromosom. So najbolj centromerni predel subtelomerne regije in vanje segajo različno dolge, za posamezen kromosom specifične regije. Ta področja so tudi mesta, kamor segajo kodirajoča zaporedja funkcionalnih genov.

Na molekularni ravni je subtelomerna sekvenca enega kromosoma 95% identična sekvenci drugih kromosomov. Visoka stopnja podobnosti je lahko vzrok za kromosomske preureditve med subtelomerami, ki so pogosto rezultat rekombinacijskih procesov (8).

Dolžina telomer pri posamezniku je različna, različna pa je tudi glede na kromosome. Za kromosom 17 je znano, da je telomera na krajšem kraku p krajša od povprečne telomerne dolžine. Predvidevajo, da je to vzrok za pogosto izgubo alela p53, ki kodira tumorje zaviralni protein, katerega delecija je pogosta pri različnih vrstah tumorjev.

Telomere imajo v celici pomembno vlogo pri ohranjanju njene vitalnosti, so nekakšna zaščita dednih informacij, ki so na kromosomih. Pomembne so predvsem za popolno replikacijo DNK. Kromosomi brez telomer so nestabilni in težijo k zlepljanju. Lahko rečemo, da telomere omogočajo celovitost kromosomov in ščitijo spodaj ležeče gene. Znani so tudi primeri, ko je informacija za nekatere funkcionalne gene zapisana prav v subtelomernih regijah: v subtelomernem območju 4p so tako našli nekaj eksonov za enega od proteinov s cinkovimi prsti (drugi eksoni za isti protein so še na 13p, 15p, 21p in 22p kromosomskem območju) (17); prav tako je subtelomerno območje Xp oz. Yp mesto zapisa za receptor interleukina 9 (18).

Na podlagi opisane strukture in funkcije telomer torej lahko sklepamo, zakaj so preureditve tukaj razmeroma pogoste in fenotipsko pomembne. Kromosomsko parjenje in proces iskanja homologije med kromosomi se začneta na telomerah (3, 5). Ker so subtelomerne regije bogate s psevdogeni in repetitivnimi sekvencami, je posledica tega lahko napačno parjenje kromosomov v zgodnji mejotski profazi (7, 4, 13).

Na telomernih področjih so opazili tudi večjo rekombinacijsko stopnjo (1, 6). Da pride do prekrivanja in izmenjave kromatid v procesu rekombinacije (angl. crossing-over), je veliko manj verjetno v območju okoli centromere kot distalno od nje. Najpogosteje se crossing-over pojavlja prav v telomernih območjih, kar je tudi vzrok za povečano lomljivost kromosomov, ki lahko vodi v kromosomske aberacije.

Izbor bolnikov in dosedanje metode dela

Zaradi stroškov preiskave in zaradi tehnične zapletenosti metode je smotrno narediti dober klinični izbor bolnikov. Bolniki s terminalnimi kromosomskimi abnormalnostmi se pogosto pojavljajo v družinah s familiarno kromosomsko mentalno retardacijo (28). Ti otroci zaostajajo v rasti že v prenatalnem obdobju. Izdelali smo kontrolni seznam (razpr. 1), v ka-

terem so zbrani različni fenotipski znaki, ki so ustrezno točkovani (9). Na podlagi števila točk, ki ga po seznamu zbere bolnik, lahko sklepamo, s kakšno verjetnostjo bomo pri njem našli subteloмерно spremembo. Kot prag za napotitev bolnika predlagajo tako vsaj pet zbranih točk. Na osnovi takšnega predhodnega izbora se zmanjša število preiskovancev za 20%, ne da bi pri tem kakšnega s subteloмерно spremembo zapustili.

Razpr. 1. *Kontrolni seznam za napotitev bolnikov na testiranje subteloernih regij; tisti, pri katerih na podlagi opaženih fenotipskih znakov zberemo vsaj pet točk, so primerni za preverjanje (9).*

Table 1. *Checklist for patients with submicroscopic subtelomeric rearrangements (9).*

Fenotipsko opaženi klinični znaki Items	Vrednost (točke) Score
Pojav MR v družini Family history of mental retardation	
- skladno z Mendlovim dedovanjem compatible with Mendelian inheritance	1
- inkompatibilno z Mendlovim dedovanjem incompatible with Mendelian inheritance	2
Prenatalni vzrok zaostanka v rasti Prenatal onset growth retardation	2
Postnatalne rastne nepravilnosti Postnatal growth abnormalities	
mikrocefalija (1), nizka rast (1), makrocefalija (1), visoka rast (1) microcephaly (1), short stature (1), macrocephaly (1), tall stature (1)	max 2
Dvo- ali večobrazna dismorfizma 2 or more facial dysmorphic features	
hipertelorizem, anomalije nosa, ušes hypertelorism, nasal anomalies, ear anomalies	2
Drugi dismorfizmi in kongenitalne nepravilnosti Non-facial dysmorphism and congenital abnormalities	
anomalije rok (1), anomalije srca (1), hipospadija ± nespušчени testisi (1) hand anomaly (1), heart anomaly (1), hypospadias ± undescended testis (1)	max 2

Za odkrivanje terminalnih kromosomskih preureditev sta danes na voljo dve metodi. Ena je molekularno genetska metoda – analiza genetske vezanosti (angl. linkage analysis), ki temelji na odkrivanju odklona od Mendlovega križanja alelov (dedovanje polimorfnihih lokusov blizu telomeram) (19, 28). Drug pristop vključuje molekularno-citogenetsko metodo FISH, pri kateri uporabljamo teloмерно specifične DNK-sonde, ki jih simultano hibridiziramo na metafazne kromosome preiskovanca (14). Prednost analize genetske vezanosti je, da lahko odkrijemo izodisomijo, omejena pa je s stopnjo polimorfnosti uporabljenega markerja. S FISH izodisomije sicer ne moremo zaslediti, omogoča pa nam takojšnje odkritje uravnoteženih in neuravnoteženih translokacij.

Preiskovanci, materiali in metode dela

Bolniki

V študijo smo vključili 56 bolnikov, ki so bili napoteni v naš laboratorij z diagnozami: Stygmata dysplastica (20 bolnikov), mentalna retardacija (21 bolnikov), dismorfni znaki (sedem bolnikov), sum na kromosomsko anomalijo (navzočnost kromosomopatij v družini, fra [X], sum na Downov sindrom) (šest bolnikov) ali sum na mikrodelecijski sindrom (dva bolnika). Bolnike smo razdelili po starostnih skupinah: predšolski otroci (0–6 let) (30 bolnikov), šoloobvezni oz. vključeni v prilagojene programe (6–20 let) (25 bolnikov) in odrasli (nad 21 let) (en bolnik). Medtem ko je 18 od 30 predšolskih otrok (60%)

imelo napotno diagnozo Stygmata dysplastica, je 76% (19 od 25) šoloobveznih bilo napoteno zaradi idiopatske mentalne retardacije.

Drug pomemben podatek za vključitev v raziskavo je bil normalni kariotip, ki smo ga analizirali pri resoluciji 400–500 prog na haploidni genom, in obenem tudi ovržen sum na drugo obliko kromosomskih sprememb (fraX, drugi mikrodelecijski sindromi). V enem primeru bolnika, ko izvora dodatnega materiala (delne trisomije kromosoma) nismo mogli določiti na podlagi kariotipa, smo tega določili s subtelomernimi DNK sondami.

Klasična citogenetska analiza

Iz krvne kulture perifernih limfocitov, ki so bili stimulirani s fitohemaglutininom, smo po standardnih metodah (GTG, RBG, RHG) pripravili preparate z metafaznimi kromosomi (47). Pri vsakem bolniku smo pregledali po 30 metafaz.

FISH z uporabo večsondnega kompleta za analizo telomer: Multiprobe T-System (Cytocell)

Z našo raziskavo smo v Laboratoriju za medicinsko genetiko Splošne bolnišnice Maribor uvedli simultano tehniko FISH za pregledovanje subteloernih področij (14). Uporabili smo komplet Multiprobe T-System (Cytocell), ki vsebuje drugo, izboljšano generacijo sond (42). Ta nam omogoča hkratno preiskovanje 41 telomer; izjema so 13p, 14p, 15p, 21p, 22p telomere, za katere sonde še niso izdelane. Tako lahko pri enem bolniku na enem objektu stekelcu z metafaznimi kromosomi pregledamo vseh 41 telomer hkrati. Objektu steklo, na katerem pripravimo preparat s kromosomi preiskovanca, je razdeljeno na 24 polj (3×8). DNK-sonde pa so nanesene na posebnem tipu krovne stekelca, ki je prav tako razdeljeno v 3 × 8 področij. Vsako področje se prekriva s po enim poljem objektne stekelca. Na vsakem področju sta naneseni po dve specifični DNK-sondi za po en kromosom (razen pri kromosomih 13–15, 21 in 22, kjer je nanesena po ena DNK-sonda): s FITC (zelelo) so označene subteloerne probe, specifične za krajši (p) krak kromosoma; s »Texas red« (rdeče) pa subteloerne sonde, specifične za daljši (q) krak kromosoma.

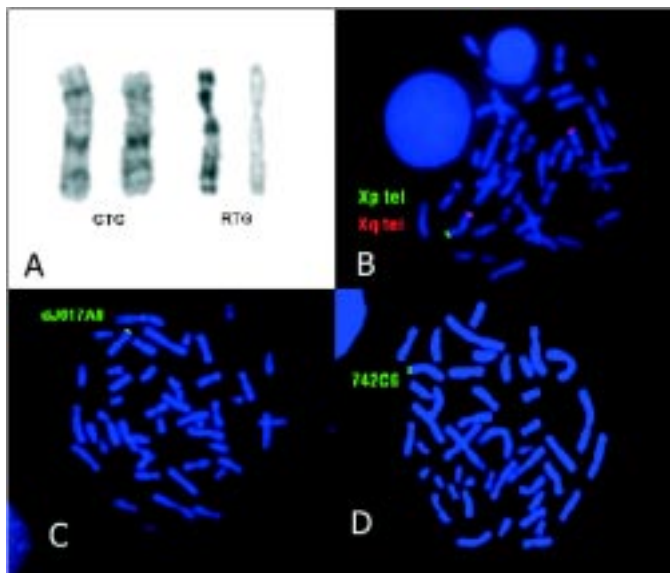
Pri izvajanju preiskave smo sledili navodilom proizvajalca. Pri vsakem bolniku smo pregledali 5 do 10 metafaz na posameznem polju. Če smo zasledili kakršnokoli anomalijo, smo pregledali vse metafaze na tistem polju (20–40). V takšnem primeru smo testirali tudi starše.

FISH z YAC-i, BAC-i in PAC-i

V primeru, da smo pri simultani hibridizaciji naleteli na kromosomsko spremembo, smo naredili še dodatne teste z lokus-specifičnimi preizkusi za kromosomski predel, na katerem smo anomalijo zasledili. V ta namen smo uporabili DNK-sonde, ki smo jih pripravili iz YAC-ov, BAC-ov ali PAC-ov: 762G3 (2q37.3), 742C6 (Xp 22.3–AFMB290XG5) in DJ619A9 (Xp22.3–AC005295). Prijazno nam jih je odstopil prof. dr. M. Rocchi (Univerza Bari).

Iz kulture kvasovk (*S. cerevisiae*) ali bakterij (*E. coli*) smo izolirali DNK. V primeru kvasovk smo DNK-sondo očistili s metodo Alu-PCR. Za njeno označevanje smo uporabili biotin iz kompleta BioNick Translation Kit (Gibco) ali digoksigenin iz kompleta Nick Translation Kit (Roche) ter postopek izvedli po navodilih proizvajalcev.

Hibridizacijo smo izvedli po klasični metodi (11): preparate smo očistili s pepsinom, metafazne kromosome denaturirali 3 minute v 70% formamidu pri 70 °C, sonde DNK pa 10 minut pri 70 °C. Hibridizirali smo čez noč v vlažni komori pri 37 °C. Posthibridizacijsko spiranje: 45 °C, dvakrat v 50% formamidu (po 10 minut) in enkrat v 2XSSC (10 minut). Kromosome oz. interfazna jedra smo barvali z DAPI (Vysis).



Sl. 1. Primer 2: A) Izsek iz mitoze obeh kromosomov X (obdelanih po GTG in RTG načinu); B) FISH z uporabo sistema Multiprobe T-System (Cytocell) kaže navzočnost samo enega signala za Xp1tel na enem od kromosomov X; C) Rezultat FISH z lokusno specifično sondo dJ617A9 (Xp22.3-AC005295); D) Rezultat FISH z lokusno specifično sondo 742C6 (Xp22.3-AFMB290XG5).

Figure 1. Case 2: A) Idiogram of two X chromosomes (using GTG and RTG techniques); B) FISH using Multiprobe T-System (Cytocell) demonstrating presence of one signal for Xp1tel on only one X chromosome; C) FISH results using dJ617A9 (Xp22.3-AC005295) locus specific probe; D) FISH results using 742C6 (Xp22.3-AFMB290XG5) locus specific probe.

Rezultati

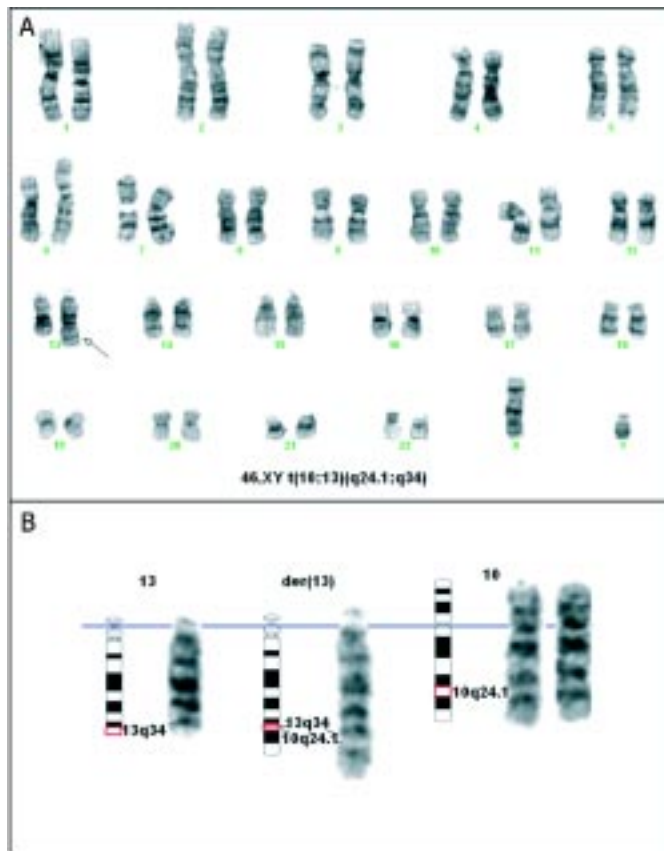
Frekvenca

Subtelomerne spremembe, ki smo jih ugotavljali z uporabo kompleta Multiprobe T-System (Cytocell), smo zasledili pri treh od 56 (5,4%) bolnikov. Med njimi sta bila dva s terminalno delecijo na kromosomu 2q (3,6%), eden od teh pa je poleg te imel še delecijo terminalne regije na kromosomu Xp (1,8%), tretji bolnik je imel delecijo telomerne regije na kromosomu 13q in parcialno trisomijo kromosoma 10q. Pri nobenem bolniku nismo potrdili delecije 2qter z lokusno specifičnimi sondami za 2q-telomero (ime klona: 762G3; Rocchi). Poleg tega je bila delecija, ki jo je pokazal Multiprobe T-System (Cytocell), dedovana v enem primeru maternalno, v drugem pa paternalno, s tem da se pri nobenem od staršev ni fenotipsko izražala. Torej gre za polimorfizem, ki ne nosi patoloških posledic in spada med normalne kromosomske variabilnosti. Če primerov z del(2qter) ne upoštevamo, je bila najdena frekvenca subtelermerne aberacij 3,6% (dva bolnika od 56). Tako smo pri enem bolniku potrdili monosomijo »de novo« nastale kromosomske regije Xpter in pri drugem monosomijo 13qter in trisomijo 10qter.

Kromosomske aberacije

Primer 1

46,XY ish del (2) (qter), delecija lokusa D2S2986 (Multiprobe T-System Cytocell). Napotna diagnoza je bila mentalna retardacija. Gre za 15-letnega fanta z diagnozo IMR, ki obiskuje šolo s prilagojenim programom. Delecijo 2qter, ki smo jo našli s sistemom Multiprobe T-System (Cytocell), smo dodatno preverjali še z lokusno specifično sondo iz YAC-a (ime klona 762G3), vendar s to delecije nismo potrdili. Pregleda-



Sl. 2. A) Kariotip bolnika – primer 3; B) Ideogram kromosomov 10, 13 in der(13) skupaj z istimi kromosomi pri bolniku – primer 3.

Figure 2. A) Karyotype of the patient – Case No.3; B) Idiogram of chromosomes 10, 13 and der(13) with the same chromosomal changes the patient – Case No.3.

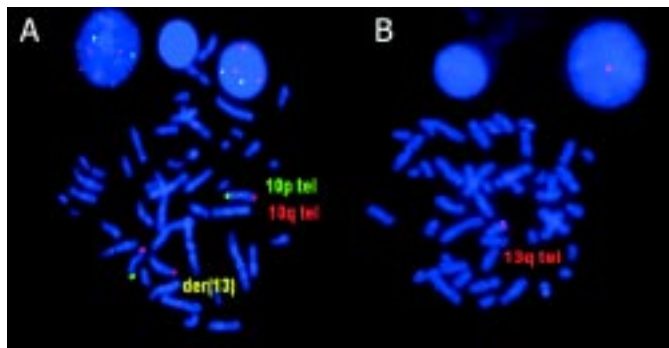
li smo tudi kariotipa obeh staršev in s sistemom Multiprobe T-System (Cytocell) preverili njune subtelermerne regije. Oba starša sta imela normalen kariotip (46,XX in 46,XY) in normalen fenotip. S sistemom Multiprobe T-System (Cytocell) pa smo dokazali, da je enako delecijo 2qter imela mati.

Primer 2

46,XX ish del (X) (ptel), del (2) (qter) (sl. 1), delecija lokusov DXYS129 in D2S2986 (Multiprobe T-System, Cytocell). Napotna diagnoza enoletne deklice z več dismornimi znaki je bila Stygmata dysplastica. Deleciji 2qter in Xpter, najdeni s sistemom Multiprobe T-System (Cytocell), smo preverjali še z lokusno specifičnimi probami iz YAC-ov in BAC-ov: 762G3 (2q37.3), 742C6 (Xp 22.3-AFMB290XG5) in dJ619A9 (Xp22.3-AC005295). Delecije 2q37.3 pri bolnici nismo potrdili, potrjena pa je bila monosomija Xpter (sl. 1c, d). Pregledali smo kariotipa obeh staršev. Oba sta bila citogenetsko normalna: 46,XX in 46,XY. Z uporabo sistema Multiprobe T-System (Cytocell) pri starših smo ugotovili delecijo telomerne regije 2qter pri očetu in potrdili dedovano paternalno monosomijo 2qter. Oče je sicer fenotipsko normalen.

Primer 3

46,XY der(13) (sl. 2a). Napotna diagnoza novorojenčka je bila Stygmata dysplastica. S sistemom Multiprobe T-System (Cytocell) smo dokazali izvor dodatnega materiala na derivativnem kromosomu 13: der(13), ki je pripadal kromosomu 10. V tem primeru lahko govorimo o parcialni trisomiji kromosoma 10. Telomerne probe (Cytocell) kromosoma 10 so pokazale naslednji rezultat (sl. 3a): signala za subtelermerno regijo 10p (lokus D10S2488) sta dva, in sicer na obeh normalnih kromosomih 10; signali za terminalno regijo 10q (lokus D10S2490) pa so trije: na obeh normalnih kromosomih 10 in še terminalno na deriva-



Sl. 3. (A) Primer 3: FISH z Multiprobe T-System (Cytocell) prikazuje trisomijo 10qtel regije: signali so na obeh kromosomih 10 in na der(13) kromosomu; (B) Primer 3: FISH z Multiprobe T-System (Cytocell) prikazuje monosomijo 13qtel regije na normalnem kromosomu 13.

Figure 3. (A) case 3: FISH with Multiprobe T-System (Cytocell) presents trisomy of 10qtel region: signals are on both chromosomes; (B) Case 3: FISH with Multiprobe T-System (Cytocell) presents monosomy, of 13qtel region on normal chromosome 13.

ktivnem kromosomu 13. Telomerno sondo za regijo 13q (lokus D13S1825) najdemo samo na normalnem kromosomu 13 (sl. 3b). Pregledali smo kariotipa staršev, ki sta bila normalna: 46,XX in 46,XY. S sistemom Multiprobe T-System (Cytocell) smo potrdili »de novo« nastalo monosomijo 13qter in trisomijo dela dolgega kraka kromosoma 10. Po dodatnih preverjanjih je bil kariotip novorojenca določen kot: 46,XY, der(13)t(10;13)(q24.1;q34) (sl. 2b). S tem smo potrdili parcialno trisomijo dolgega kraka kromosoma 10, kot klinično dobro poznan, vendar redek sindrom.

Razpravljanje

Wilkie (19) je prvi opozoril na praktično pomembnost odkrivanja submikroskopskih in drugih preureditev, ki vključujejo telomerne regije in jih iz dveh razlogov ne moremo zaznati s klasičnim kromosomskim proganjem: zaradi premajhnih velikosti kromosomskih regij, ki so udeležene pri izmenjavi kromosomskih segmentov; ali pa zaradi podobnega vzorca pri proganju med izmenjajočimi se segmenti. Telomere imajo namreč zelo podoben vzorec proganja pri vseh kromosomih, zato majhne translokacije težje odkrijemo.

Ker predvidevajo, da naj bi bile aberacije na terminalnih kromosomskih segmentih najpomembnejše pri pojasnjevanju vzrokov za IMR, je bilo veliko dela opravljenega pri razvoju metode za iskanje subtelomernih preureditev (19, 43, 44). Kot najuspešnejša se je v zadnjem času izkazala simultana metoda FISH (14) z DNK-sondami, ki so v prvi generaciji izšle leta 1997 (43) in v drugi generaciji leta 2000 (37).

Prvo študijo z bolniki z nepojasnjeno MR je opravila J. Flint s sodelavci (28), in sicer z analizo polimorfizmov VNTR. Njen zaključek je bil, da je pri 6% preiskovancev našla subtelomerne aberacije. V nadaljnjih študijah so odkrivali različno prevalenco subtelomernih aberacij: od 0,5 do 23% med bolniki z IMR in/ali dimorfnimi znaki (10, 21–24, 39, 40, 42). Kot razlog za razmeroma veliko variabilnost v deležih navajajo variabilnost v velikosti populacije in različne kriterije za izbor bolnikov, ki so bili vključeni v preiskave (37).

Izmed opravljenih raziskav naj omenimo tiste, ki izstopajo s tem, da vključujejo večje število bolnikov: Knight s sod. (29) je preučila 284 bolnikov z zmerno do težjo MR, frekvenca najdenih aberacij v tej skupini je bila 7,4%; pri 182 bolnikih z lažjo MR je bila frekvenca aberacij 0,5%. Vorsanova s sod. (23) je našla subtelomerne anomalije pri osmih od 209 bolnikov

(3,8%), in sicer pri bolnikih z zmerno do težjo MR in kongenitalnimi anomalijami. Ballif s sod. (38) pa poroča o 2,6% najdenih primerih z zmerno do težjo MR. Fan s sod. (10) v skupini 150 bolnikov je našel 4% subtelomernih aberacij. V skupini 254 bolnikov so v švicarski skupini raziskovalcev (2) našli 13 (5,1%) neuravnoteženih kriptičnih preureditev in kot najpomembnejši selekcijski kriterij za vključitev bolnika v tovrstno preiskovanje navedli navzočnost vsaj dveh mentalno prizadetih članov v družini. Baker s sod. (12) poroča o 1,9% incidenci subtelomernih aberacij med 53 bolniki, ki so izkazali samo IMR, in o 4,1% incidenci med 197 bolniki, ki so imeli IMR skupaj še z drugimi dimorfnimi znaki in malformacijami. Veliko študij (2, 10, 12, 23, 29, 38) vključuje bolnike, ki niso bili izbrani samo zaradi iskanja vzrokov MR, temveč so med njimi tudi primeri, kjer so bolnike vključili v raziskave iz kliničnih razlogov.

V naši nalogi smo subtelomerne aberacije zasledili pri 5,4% bolnikov z lažjo MR in/ali kongenitalnimi anomalijami. Če izključimo del(2qter), ki se pogosto pojavlja kot polimorfizem (36) brez patološkega učinka, je frekvenca subtelomernih aberacij v naši skupini 3,6% (2 od 56), kar se ujema s poprej objavljenimi rezultati (10). Naši rezultati skupaj z novejšimi objavljenimi študijami (10, 12, 23, 38) kažejo, da so klinično značilne subtelomerne aberacije navzoče pri 3 do 5% bolnikov z nepojasnjeno MR in/ali dimorfnimi znaki, kar je nižja frekvenca kot pri Knightovi (29) v zgodnjih študijah. Poudariti pa moramo, da sta bila oba bolnika, pri katerih smo odkrili subtelomerne spremembe, napotena na kariotipizacijo zaradi mentalne retardacije in dimorfnih znakov.

Polimorfizem 2q telomer je prvi opisal Macino s sod. (36). Pri populacijskih študijah se delecija 2qter pojavlja pri 1,5 do 8,2% populacije (19, 20, 24, 39, 40). Pri upoštevanju vseh do sedaj objavljenih rezultatov je povprečna prevalenca delecije 2qter približno 5% (10). V naših primerih je bila del(2qter) dedovana (maternalno ali paternalno) od fenotipsko normalnih staršev. Tako potrjujemo, da je delecija lokusa D2S2986 v regiji 2qtel, ki jo zasledimo s sistemom Multiprobe T-System (Cytocell), dokaj pogosta variacija brez patološkega učinka, zato je treba takšno delecijo preverjati še z drugo sondo in obvežno citogenetsko pregledati tudi bližnje sorodnike. Brez nadaljnjih preiskav lahko delecijo 2qter napačno interpretiramo. Obstaja namreč objavljena študija, pri kateri so avtistične otroke testirali s sistemom Multiprobe T-System (Cytocell). Pri enem od 10 bolnikov so našli del(2qter), ki so jo potrdili še z drugimi, za ta predel lokusno specifičnimi sondami. Tako je možno, da so geni, navzoči na tem kromosomskem delu, povezani s pojavom omenjene nevrodegenerativne bolezni; raziskave glede tega so šele na začetku (41).

V naši študiji smo pri dveh bolnikih potrdili subtelomerne aberacije. Delecijo terminalnega dela kratkega kraka kromosoma X (del [X] [ptel]) smo potrdili pri enoletni deklici (primer 2) še z lokusno specifičnimi sondami: 742C6 (Xp 22.3–AFMB290XG5) in dJ619A9 (Xp22.3–AC005295). Poleg mentalne retardacije so pri deklici opazili tudi že prenatalni zastoj rasti v osmem mesecu nosečnosti in po porodu našli tudi več dimorfnih znakov: hipertelorizem, sedlast nos, izbočeno čelo, visoko nebo, rahlo priraščen jezik, majhno bradico in več deformacij urinarnega trakta. Delecija Xpter, ki jo ugotovljamo s sistemom Multiprobe T-System (Cytocell), je opisana kot polimorfizem brez patoloških variacij (38). Pri naši bolnici so poleg omenjenega lokusa (DXYS129) manjkali še drugi, bolj proksimalni lokusi (AFMB290XG5 in AC005295). Tako potrjujemo delecijo, ki ima tudi fenotipske posledice, ki ustrezajo nekaterim znakom Turnerjevega sindroma (45, XO) v milejši obliki. Podobnih primerov z enako delecijo v literaturi nismo zasledili.

Novorojenček (primer 3) z displastičnimi znaki je nosilec del(13)(qtel) (D13S1825) in parcialne trisomije 10q24.1–10qter. Otrok je bil rojen v 35. tednu gestacijske starosti, s porodno

težo 1550 g in dolžino 42 cm. Pri njem so opazili dismorfne znake na obrazu: majhen nos s široko bazo, majhne nosnice, široko razmaknjene oči, več kolobomov, nizko narastišče ušes, ribja usta, majhno spodnjo čeljust, visoko nebo, hipoplazija desnega ušesa; poleg tega je imel otrok še ledvične anomalije, odprt foramen ovale na srcu, anomalije spolnih organov (mikropenis, nespuščeni testisi) in anomalije spodnjih okončin: drugi in tretji prst sta delno zrasla, peti prst je na obeh nogah prekrižan čez četrtega. Glede na velikost potrjene regije kromosoma 10 se tudi nekateri fenotipski znaki pri bolniku ujemajo z znaki, značilnimi za »distalni 10q sindrom«: psihomotorna retardacija, zastoj v prenatalni in postnatalni rasti in razvoju, multiple kongenitalne anomalije in dismorfni znaki (45). Poleg parcialne trisomije 10 ima bolnik še delecijo 13q terminalne regije, ki jo glede na fenotipske podobnosti med že odkritimi pacienti uvrščajo med mikrodelecijske sindrome (46). Zanj so značilni pre- in postnatalna retardacija, psihomotorna retardacija, mikrocefalija, hipotonija, anogenitalne deformacije in karakterističen ploščat obraz z visokim čelom (46). Ker je za obe kromosomski spremembi, ki smo ju zasledili pri otroku, značilna psihomotorna retardacija, je težko oceniti prispevek delecije 13qter na fenotip otroka. Izkazalo se je, da je veliko subteleromernih aberacij podedovanih in so posledica družinskih kriptičnih translokacij (29, 38). V našem primeru sta bili obe deleciji 2qter dedovani. Ostale najdene subteleromerne anomalije pa so nastale »de novo«, torej niso posledica družinskih translokacij. Tudi pri preverjanju subteleromernih regij pri parih s pogostimi spontanimi splavi so našli kriptične subteleromerne preureditve, ki bi lahko bile vzrok za splav nebalansiranega embria (26). V takih družinah je nujno odkriti starša prenašalca in jim v bodoče omogočiti prenatalno testiranje. Vse dosedanje študije, skupaj z našo, so pokazale, da je FISH z multiplimi subteleromernimi preizkusi zelo uporabna metoda za diagnosticiranje bolnikov, ki ostajajo kljub mnogim drugim vrstam kliničnih in genetskih testiranj brez odgovorov na njihove težave. Pri subteleromernem preverjanju, z uporabo druge generacije preizkusov (37) s sistemom Multiprobe T-System (Cytocell) pa še vedno obstajajo nekatere težave z določenimi lokusi, kjer so potrebna dodatna testiranja: 2qtel (D2S2986), Xptel (DXYS129), Xqtel (DXYS61) (38). Te lahko pojasnujemo z navzočnostjo polimorfne lokusa v regiji ali s pravo mikrodelecijo, ki vključuje kromosomski segment, vendar je brez fenotipskega učinka.

Zaključki

S prikazano študijo, ki je bila subvencionirana s strani MŠZŠ (št. L3-2145), smo v laboratorij uvedli metodo testiranja subteleromernih regij. Menimo, da je FISH z multiplimi subteleromernimi DNK-sondami uporabno diagnostično orodje, ki se lahko in naj bi se vpeljalo v vse citogenetske laboratorije. Metoda je uporabna tako za odkrivanje vzrokov IMR pri bolnikih, ki ostajajo kljub težavam nediagnosticirani, kot tudi za karakterizacijo težje določljivih anomalij, za prenatalno diagnostiko in za preiskovanje kromosomov ter razreševanje kompleksnejših kariotipov na drugih področjih citogenetskih analiz (rakaste spremembe).

Literatura

- Laurie DA, Hulten MA. Further studies on bivalent chiasma frequency in human males with normal karyotypes. *Ann Hum Genet* 1985; 49: 189-201.
- Riegel M, Baumer A, Jamar M, Dalbecque K, Herens C, Verloes A, Schinzel A. Submicroscopic terminal deletions and duplications in retarded patients with unclassified malformation syndromes. *Hum Genet* 2001; 109: 286-94.
- Schertan H, Weich S, Schwegler H, Heyting C et al. Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *Cell Biol* 1996; 134: 1109-25.

- Wilkie AOM, Higgs DR, Rack KA, Buckle VJ et al. Stable length polymorphism of up to 260 kb at the tip of the short arm of human chromosome 16. *Cell* 1991; 64: 595-606.
- Barlow AL, Hulten MA. Combined immunocytogenetic and molecular cytogenetic analysis of meiosis I human spermatocytes. *Chromosome Res* 1996; 4: 562-73.
- Blouin JL, Christie DH, Gos A, Lynn A et al. A new dinucleotide repeat polymorphism at the telomere of chromosome 21q reveals a significant difference between male and female rates of recombination. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 388-94.
- Brown WR, Mackinnon PJ, Villasante A, Spurr N et al. Structure and polymorphism of human telomere-associated DNA. *Cell* 1990; 63: 119-32.
- Flint J, Rochette J, Craddock CF, Dode C et al. Chromosomal stabilisation by a subteleromeric rearrangement involving two closely related Alu elements. *Hum Mol Genet* 1997; 5: 1163-9.
- De Vries BBA, White SM, Knight SJL, Regan R et al. Clinical studies on submicroscopic subteleromeric rearrangements: a checklist. *J Med Genet* 2001; 38: 145-50.
- Fan YS, Zhang Y, Speevak M, Farrel S, Jung JH, Siu VM. Detection of submicroscopic aberrations in patients with unexplained mental retardation by fluorescence »in situ« hybridization using multiple subteleromeric probes. *Genet Med* 2001; 3: 416-21.
- Pinkel D, Straume T, Graye JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence »in situ« hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 89: 2934-8.
- Baker E, Hinton L, Callen DF, Altree M et al. Study of 250 children with idiopathic mental retardation reveals nine cryptic and diverse subteleromeric chromosome anomalies. *Am J Med Genet* 2002; 107: 285-93.
- Youngman S, Bates GP, Williams S, McClatchey AI et al. The telomeric 60 kb of chromosome 4p is homologous to telomeric regions on 13p, 15p, 21p and 22p. *Genomics* 1992; 14: 350-6.
- Knight S, Horsley SW, Regan R et al. Development and clinical application of an innovative fluorescence »in situ« hybridization technique which detects submicroscopic rearrangements involving telomeres. *Eur J Hum Genet* 1997; 5: 1-8.
- Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 6622-6.
- Allshire RC, Dempster M, Hastie ND. Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distribution non-randomly. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 4611-27.
- Flint J, Thomas K, Micklem G et al. The relationship between chromosome structure and function at a human telomeric region. *Nat Genet* 1997; 15: 252-7.
- Kermouni A, Van Roost E, Arden KC et al. The IL-9 receptor gene (IL9R); genomic structure, chromosomal localization in the pseudoautosomal region of the long arm of the sex chromosomes, and identification of IL9R pseudogenes at 9qter, 10pter, 16pter and 18pter. *Genomics* 1995; 29: 371-82.
- Wilkie AOM. Detection of cryptic chromosomal abnormalities in unexplained mental retardation: a general strategy using hypervariable subteleromeric DNA polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1993; 53: 688-701.
- Anderlid B, Anneren G, Biennow E, Nordenskjöld M. Subteleromeric rearrangements detected by FISH in patient with idiopathic mental retardation. *Am J Hum Genet* 1999; 65: Suppl: A67-A67.
- Joyce CA, Hart HH, Fisher AM, Browne CE. Use of subteleromeric FISH probes to detect abnormalities in patients with idiopathic mental retardation and characterise rearrangements at the limit of cytogenetic resolution. *J Med Genet* 1999; 36: Suppl: S16-S16.
- Lamb AN, Lytle CH, Alsworth AS et al. Low proportion of subteleromeric rearrangements in a population of patients with mental retardation and dismorphic features. *Am J Hum Genet* 1999; Suppl: 65: A169-A169.
- Vorsanova SG, Koloti D, Sharonin VO, Soloviev V, Yurov YB. FISH analysis of microaberrations at telomeric and subteleromeric regions in chromosomes of children with mental retardation. *Am J Hum Genet* 1998; 65: Suppl: A154-A154.
- Vior G, Gosset P, Fert S et al. Cryptic subteleromeric rearrangements detected by FISH in mentally retarded and dysmorphic patients. *Am J Hum Genet* 1998; 63: Suppl: A10-A10.
- Roeleveld N, Zielhuis GA, Gabreels F. The prevalence of mental retardation: a critical view of recent literature. *Dev Med Child Neurol* 1997; 39: 125-32.
- Yakut S, Berker-Karaüzüm S, Şimşek M, Zorlu G et al. Telomere-specific fluorescence »in situ« hybridization analysis of couples with five or more recurrent miscarriages. *Clin Genet* 2002; 61: 26-31.
- De Vries BB, Van den Ouweland AM, Mohkamsing S, Duivenvoorden HJ et al. Screening and diagnosis for the fragile X syndrome among the mentally retarded: an epidemiological and psychological survey. Collaborative Fragile X Study Group. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 660-7.
- Flint J, Wilkie AOM, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, McDermid HE. The detection of subteleromeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet* 1995; 9: 132-40.
- Knight SJL, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, Winter RM, Bolton P, Flint J. Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet* 1999; 354: 1676-81.

30. Riegel M, Castellan C, Balmer D, Brecevic L, Schinzel A. Terminal deletion, del(1)(p36.3), detected through screening for terminal deletions in patients with unclassified malformation syndromes. *Am J Med Genet* 1999; 82: 249–53.
31. Slavotinek A, Shaffer LG, Shapira SK. Monosomy 1p36. *J Med Genet* 1999; 36: 657–63.
32. Faivre L, Morichon N, Viot G, Martinovic J et al. Prenatal diagnosis of a chromosome 1p36 deletion. *Eur J Hum Genet* 1998; 6: Suppl 1: 99–9.
33. De Vries BBA, Knight SJL, Homfray T, Smithson SF, Flint J, Winter RM. Submicroscopic subtelomeric 1qter deletions: a recognisable phenotype? *Med Genet* 2001; 38: 175–8.
34. Precht KS, Lese CM, Spiro RP, Huttenlocher P et al. Two 22q telomere deletion serendipitously detected by FISH. *J Med Genet* 1998; 35: 939–42.
35. Doheny KF, McDermid HE, Harum K, Thomas GH et al. Cryptic terminal rearrangements of chromosome 22q13.32 detected by FISH in two unrelated patients. *J Med Genet* 1997; 34: 640–4.
36. Macina RA, Negorev DG, Spais C, Ruthig LA et al. Sequence organisation of the human chromosome 2q telomere. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1847–53.
37. Knight SJL, Flint J. Perfect endings: A review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J Med Genet* 2000; 37: 401–9.
38. Ballif BC, Kashork CD, Shaffer LG. The promise and pitfalls of telomere region-specific probes. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 1356–9.
39. Huang XL, Wyandt HE, Milansky JM. Subtelomeric testing for cryptic chromosomal rearrangements in 68 patients with idiopathic mental retardation and dysmorphism. *Am J Hum Genet* 2000; 67: Suppl: A853–A853.
40. Jalal SM, Harwood A, Anderson M, Lorentz C, Law M et al. Screening for subtelomeric structural anomalies by use of subtelomere specific FISH probe set. *Am J Hum Genet* 2000; 67: Suppl: A770–A770.
41. Wolff DJ, Clifton K, Karr C, Charles J. Pilot assessment of the subtelomeric regions of the children with autism: Detection of a 2q deletion. *Genet Med* 2002; 4: 10–4.
42. Knight SJL, Lese CM, Precht KS, Kuc J et al. An optimised set of human clones for studying telomere integrity and architecture. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 320–32.
43. Ning Y, Roschke A, Smith AC et al. A complete set of human telomeric probes and their clinical applications. *Nat Genet* 1996; 14: 86–9.
44. Shapira SK, McCaskill C, Northrup H, Spikes AS, Elder FFB et al. Chromosome 1p36 deletion: the clinical phenotype and molecular characterisation of a common newly delineated syndrome. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 642–50.
45. Taysi K, Yang V, Monaghan N, Beraha N. Partial trisomy 10q in three unrelated patients. *Ann Genet* 1983; 26 (2): 79–85.
46. Kuhnle U, Bartsch O, Werner W, Schuster T. Penoscrotal inversion, hypospadias, imperforate anus, facial anomalies, and developmental delay: definition of a new clinical syndrome. *Pediatr Surg Int* 2000; 168 (5–6): 396–9.
47. Dutrillaux B, Couturier J. La pratique de l'analyse chromosomique. Paris: Masson, 1981.

ERRATA CORRIGE

Na 4. strani ovitka majske, pomurske številke Zdravniškega vestnika se vsebina pravilno prične:

LEADING ARTICLE

Prevention of cardiovascular diseases,

J. Maučec-Zakotnik, M. Lainščak 261

PROFESSIONAL ARTICLES

Use of drugs and patient's quality of life in heart

failure clinic, M. Lainščak, B. Korošec 265

V seznamu sodelavcev v isti številki na str. 296 je pravilni naziv avtorja asist. mag. Mitja Lainščak, dr. med., specializant interne medicine.

Za neljube napake se uredništvo opravičuje avtorjem in bralcem.

ERRATA CORRIGE

V Zdravniškem vestniku številka 2 letošnjega leta je na str. 99–100 (Zdrav Vestn 2003; 72: 99–100) v seznamu recenzentov Zdravniškega vestnika v letu 2002 pravilni strokovni naziv prof. dr. Katje Breskvar in prof. dr. Rada Komelja, **univ. dipl. ing. kem.** Za neljubo napako se opravičujemo recenzentoma in bralcem.