
ORIGINEA PARENTALĂ A CROMOZOMULUI X ÎN SINDROMUL TURNER

DIANA MICLEA, JEAN-CLAUDE CAREL, PAULA GRIGORESCU-SIDO,
IOAN VICTOR POP

Catedra de Genetică Medicală, UMF "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca

Rezumat

Introducere. Imprintarea cromozomului X se presupune că ar fi responsabilă de variabilitatea fenotipică din sindromul Turner, precum și de anumite diferențe fenotipice dintre cele două sexe (talie, cogniția socială, metabolismul lipidic). Pacientele cu sindrom Turner au doar un X, matern (XM) sau patern (XP), reprezentând astfel un model clinic unic în care se poate observa influența fenotipică a genelor de pe X în funcție de originea parentală.

Obiectiv. Identificarea originii parentale a cromozomului X la pacientele cu sindrom Turner, în scopul corelării acestora cu fenotipul.

Material și metodă. Au fost incluse în studiu 42 paciente (și mamele lor) diagnosticate cu cariotip 45,X omogen. Prin analiza FISH, au fost excluse din lot pacientele cu mozaicisme nedetectabile prin tehnicile clasice de cariotipare. Originea parentală a cromozomului X a fost determinată prin studiul a 9 microsateliți, prin compararea taliei alelelor mamă-fică.

Rezultate. Din 42 cupluri mamă-fică analizate, s-a stabilit originea parentală a cromozomului X la 38 cupluri, astfel: 26 (68%) paciente prezentau XM și 12 (32%) XP.

Concluzii. În acest studiu am folosit analiza microsateliților pentru a determina originea parentală a cromozomului X. Această distribuție de 2:1 a genotipurilor care conțin X matern sau X patern ar putea fi explicată prin faptul că mama are doi cromozomi X pentru a contribui la constituția cromozomială a descendentului, în timp ce tatăl are doar un cromozom X. Pornind de la această constatare vom analiza corelațiile cu fenotipul, încercând astfel stabilirea unei semnificații clinice a imprintării cromozomului X.

Cuvinte cheie: sindrom Turner, cromozom X, imprintare parentală, microsateliți.

PARENTAL ORIGIN OF X CHROMOSOME IN TURNER SYNDROME

Abstract

Introduction. X chromosome imprinting is presumed to explain the phenotypic variability in Turner syndrome and also some phenotypic features, specifics for each sex. The patients with Turner syndrome have only one X, maternal (XM) or paternal (XP), thus representing a unique clinical model in which may be observed the phenotypic influence of X genes, related to the parental origin.

Aim. Determination of the parental origin of X chromosome at patients with homogeneous X monosomy, with the purpose to correlate this with the phenotype.

Patients and method. 42 patients (and their mothers), diagnosed with homogeneous 45,X karyotype, were included in the study. By FISH analysis, the patients with undetected mosaics by classical karyotype have been excluded from the group. The parental origin of X was determined by the study of 9 microsatellites, by comparing the length of the mother-daughter alleles.

Results. From 42 couples mother-daughter analyzed, the parental origin of X

was established in 38 couples, thus: 26 (68%) patients presented XM and 12 (32%) XP.

Conclusions. In this study it was used the microsatellites analysis to establish the parental origin of the X chromosome. The 2:1 distribution of the genotypes which have maternal or paternal X is presumed to be that the mother has two X chromosomes to contribute in chromosomal constitution of the descendent and the father has only one X chromosome. From this observation, it will be further analyzed the correlation with the phenotype, thus trying to explain a clinical signification for the X chromosome imprinting.

Keywords: Turner syndrome, X chromosome, parental imprinting, microsatellites.

Introducere

Sindromul Turner este caracterizat printr-o mare variabilitate fenotipică, fiind în unele cazuri nediagnosticat datorită unui tablou clinic necaracteristic. Această heterogenitate clinică este explicată uneori prin prezența mozaicismelor sau a anomaliilor structurale ale cromozomului X, dar cel mai adesea nu este motivată prin aceste modificări cariotipice. Studiile recente, efectuate la om și la șoarece, au sugerat faptul că imprimarea cromozomului X ar putea fi responsabilă de spectrul fenotipic larg din sindromul Turner [1,2].

Imprimarea genomică se referă la marcajul epigenetic al unor gene specifice sau al unor regiuni cromozomiale din linia germinală maternă sau paternă, astfel încât să inhibe expresia aceluși locus atunci când este transmis de la acel părinte. Markerii moleculari epigenetici includ în principal metilarea ADN-ului și acetilarea histonelor, modificări care sunt resetate în timpul gametogenezei următoarei generații. Procesul de inactivare a cromozomului X și cel de imprimare genomică sunt foarte similare din punct de vedere patogenetic și se presupune că au evoluat împreună [3,4].

Se cunosc puține lucruri deocamdată despre posibilitatea imprimării a genelor X linkate la om.

Efectele imprimării cromozomului X se presupune că ar explica un fenotip complex, specific sexului, deoarece bărbații exprimă doar XM în toate celulele, iar femeile exprimă atât XM, cât și XP. Procesul de inactivare aleatoare a unui cromozom X la sexul feminin semnifică faptul că țesuturile sunt compuse din aproximativ 50% celule cu XM activ și din 50% celule cu XP activ.

Pacientele cu sindrom Turner (45,X) au doar un cromozom X, de origine maternă sau paternă, reprezentând astfel un model clinic unic în care se poate observa influența genelor cromozomului X în funcție de originea lor parentală [3].

Studiile anterioare au sugerat o posibilă legătură între originea parentală a cromozomului X în sindromul Turner și variabilitatea fenotipică, în special în ceea ce privește: creșterea staturală, răspunsul la hormonul de

creștere și adaptarea socială. Astfel, pacientele cu XM au o talie mai mare și un răspuns la tratamentul cu hormon de creștere mai bun, comparativ cu cele care rețin XP și care nu răspund aproape deloc la tratamentul cu hormon de creștere. Această observație este similară cu cea privitoare la diferențele dintre sexe, astfel: sexul masculin, care este monosomic pentru XM (46,XMY), are o talie medie mai mare comparativ cu sexul feminin, care are un procentaj aproximativ egal de celule cu XM activ și cu XP activ (46,XXMP) [5,6,7]. Referitor la adaptarea socială, s-a observat că fetele cu sindrom Turner cu XP au o cogniție socială și un coeficient de inteligență verbal mai bune decât cele cu XM, care au în schimb o orientare spațială mai bună. Aceste observații pot fi din nou suprapuse peste cele observate între cele două sexe, în sensul că la sexul feminin, asemănător cu fetele cu sindrom Turner care rețin XP, s-a constatat o adaptare socială mai bună, față de sexul masculin, care prezintă în plus o orientare în spațiu mai bună [8,9,10].

Obiectivul acestui studiu este de a determina originea parentală a cromozomului X la un lot de paciente cu monosomie X omogenă, pentru a determina ulterior influența acestora pe componentele fenotipice ale sindromului Turner.

Material și metodă

Au fost luate în studiu 42 de paciente cu sindrom Turner, diagnosticate în Franța și luate în evidența bazei de date naționale pentru monitorizarea pacientelor tratate cu hormon de creștere. Au fost incluse în lotul de studiu doar paciente cu monosomie X omogenă, diagnosticul stabilindu-se prin cariotip standard. S-au exclus mozaicismele de nivel redus prin aplicarea tehnicii FISH. Pentru fiecare pacientă a fost inclus în studiu și un părinte (cel mai adesea mama, dar și tatăl în situațiile în care mama nu a fost disponibilă).

Pacientele au fost investigate fenotipic prin evaluarea taliei finale, câștigului statural indus prin hormonul de creștere, adaptării sociale (completarea unui chestionar), sindromului dismorfic, malformațiilor cardiace și renale, afectării ORL și modalității de instalare a pubertății (spontane sau farmacologice).

Tehnici de biologie moleculară

Determinarea originii parentale a cromozomului X s-a făcut prin compararea genotipului mamă (sau tată) - fiică, utilizând o combinație de 9 microsateliți, localizați pe întreaga lungime a cromozomului X (Fig. 1).

Cromozomul X



Fig. 1. Localizarea pe cromozomul X a celor 9 microsateliți analizați.

1. Extracția ADN

S-a utilizat sânge periferic, pentru fetele cu sindrom Turner și celule ale mucoasei bucale pentru mame (kit Qiagen), după obținerea unui consimțământ informat.

2. Amplificarea ADN

Cuplurile de primeri descrise în tabelul I au permis amplificarea prin tehnica PCR (polymerase chain reaction) a microsateliților (Tabel I).

Tabel I. Caracteristicile primerilor utilizați pentru amplificarea prin PCR a microsateliților.

Numele primerilor	Număr primer	Talia fragmentelor PCR (pb)	Fluorocrom
DXS1223	PR1	139-161	Albastru
DXS1039	PR2	177-201	Albastru
DXS8045	PR3	215-227	Albastru
DXS7108	PR4	236-258	Albastru
DXS1196	PR5	212-232	Verde
DXS1062	PR6	89-115	Galben
DXS8077	PR7	179-199	Galben
DXS8064	PR8	214-230	Galben
DXS1216	PR9	242-256	Galben

Mixul de reacție a fost compus din: 2,5μl tampon sigma; 1μl dNTP; 1μl primeri cu concentrația de 20 pmol / μl; 0,1 μl Taq sigma; 2 μl de ADN și apă până la un total de 25 μl. Numărul de cicluri PCR a fost de 35, iar un ciclu a constat în denaturare la 95°C timp de 5 minute, hibridizare la 55°C și replicare la 72°C timp de 30 secunde.

Cuplurile de primeri 1 și 5 au funcționat bine cu protocolul inițial. Pentru primerii 3 și 6, temperatura de hibridizare a fost scăzută la 52°C. Pentru primerii 2 și 4, a fost utilizat Taq Gold, s-a crescut concentrația de magneziu (până la o concentrație finală de 2,5 mM) și s-a scăzut temperatura de hibridizare la 50°C. După fiecare PCR s-a efectuat o electroforeză de control pentru a ne asigura de reușita amplificării, înainte de măsurarea taliei fragmentelor cu aparatul ABI PRISM.

3. Analiza taliei fragmentelor cu ABI PRISM Linkage Mapping Sets v 2.5

Fiecare placă a fost preparată cu 18μl de marker de talie (Liz 500: 980 μl formamidă și 20 μl de Liz) și 1 μl de produs PCR. A fost efectuată denaturarea plăcii la 95°C timp de 3 minute, apoi placa a fost răcită la congelator timp de 4 minute înainte de trecerea pe ABI PRISM. Analiza rezultatelor și determinarea taliei fragmentelor s-a efectuat cu programul GeneMapper.

Rezultate

Originea parentală a cromozomului X a fost determinată comparând talia alelelor mamă-fiică (Fig. 2).

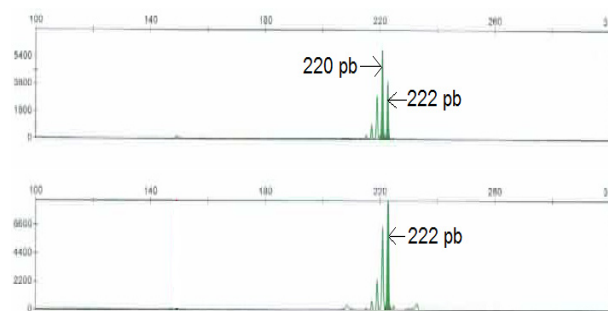


Fig. 2. Compararea taliei alelelor mamă-fiică pentru microsatelitul desemnat de primerul 5 - DXS1196. Se observă 2 alele diferite la mamă, una cu o lungime de 220 pb, cealaltă cu o lungime de 222 pb (sus). La fiică există o singură alelă, cu o lungime de 222 pb (jos) și este similară ca lungime cu alela mamei. Pentru a stabili originea maternă a cromozomului X, toți cei 9 microsateliți trebuie să fie similari ca talie pentru cuplul mamă-fiică.

S-a stabilit originea paternă a cromozomului X dacă au fost observați 2 markeri cu alele de talie diferită pentru un cuplu mamă (sau tată) - fiică.

Originea maternă a fost stabilită dacă toate alelele erau identice între mamă și fiică, fiind apoi calculată puterea discriminantă pentru a confirma acest lucru.

Puterea discriminantă a fost calculată prin multiplicarea frecvențelor alelice ale fiecărui marker în populația mamei. Astfel, dacă o pacientă prezenta alelele

A1, B1, C1 în locii A, B, C și dacă fA1, fB1 și fC1 era frecvența acestor alele în populația mamelor, atunci putea discrimina pentru o pacientă a fost calculată prin produsul fA1xfB1xfC1. O putere discriminantă de 0,001 a fost estimată ca suficientă pentru a confirma originea maternă a cromozomului X.

Din 42 cupluri mamă (sau tată) - fiică analizate, s-a stabilit originea parentală a cromozomului X la 38 cupluri.

S-a efectuat un calcul al puterii discriminante pentru a confirma originea maternă la 26 cazuri (68%). Originea paternă a fost stabilită pentru 12 cazuri (32%).

Discuții

Prin obținerea acestor rezultate am evidențiat cum se poate determina originea parentală a cromozomului X prin studiul microsateliților de pe cromozomul X. La acest lot de studiu, alcătuit din paciente cu monosomie X omogenă, la care s-a exclus prin tehnica FISH prezența de mozaicisme de grad redus, s-a observat la 68% din cazuri cromozomul X de origine maternă și la restul de 32% cromozomul X de origine paternă. Motivul pentru această distribuție de 2:1 a genotipurilor cu X matern și X patern ar putea fi explicat prin faptul că mama (46,XX) are doi cromozomi X pentru a contribui la constituția cromozomială a descendentului, în timp ce tatăl (46,XY) are doar unul (monosomia Y nefiind viabilă) [3]. Pe de altă parte, s-a dovedit că monosomia X este mult mai frecventă în momentul concepției (1-2%) decât postnatal (1:2500), peste 99% din produșii de concepție suferind un avort spontan [11]. Motivul pentru această rată mare de avorturi spontane nu se cunoaște foarte bine, dar acestea ar putea fi consecința imprimării cromozomului X (în plus față de prezența mozaicismelor) și, prin urmare, produșii de concepție cu monosomie X cu cromozom de origine paternă ar fi preponderent avortați.

Pierderea preferențială a cromozomului X de origine paternă la pacientele cu sindrom Turner și procentajul mare de X patern la fetoșii cu sindrom Turner avortați, conduc la ipoteza că pierderea cromozomului X matern ar avea un impact fenotipic mai puternic.

Rezultate similare acestui studiu au fost observate și de alți autori [12,13,14,15,16,5,17]. În studiul prezentat de Loughlin et al., toate pacientele prezentau cromozomul X de origine maternă, deși în cazurile raportate de Tsezou et al., cromozomul X avea origine maternă în 50% din cazuri [18,19]. În majoritatea studiilor raportate, au fost efectuate mai multe tehnici laborioase și mai puțin sensibile, cum ar fi Southern blott sau RFLP (restriction fragment length polymorphism). Mai recent, Monroy et al. și Sagi et al. au folosit analiza microsateliților pentru a detecta originea parentală a cromozomului X [16,5]. Kochi et al. a studiat originea parentală a cromozomului X prin caracterizarea polimorfismului genei receptorului pentru angiotensină [17].

Studiul pacientelor cu monosomie X omogenă

(45,X) va putea permite investigarea potențialei imprimări parentale a locilor de pe cromozomul X. Studiul de față a întâmpinat dificultăți în ceea ce privește corelarea originii parentale a cromozomului X cu fenotipul, datorită numărului mic de subiecți XP. De asemenea, în acest studiu au fost incluse doar paciente cu monosomie X omogenă, eliminând astfel peste 50% din pacientele cu sindrom Turner disponibile. Numărul mic de paciente luate în studiu a fost datorat și lipsei disponibilității de ADN parental. Aceste limitări vor putea fi înlăturate prin continuarea studiului și astfel prin includerea în lot și a altor paciente cu sindrom Turner, urmând ca apoi să se stabilească corelația între originea parentală a cromozomului X și fenotip.

Bibliografie

1. Okamoto I, Arnaud D, Le Baccon P, et al. Evidence for de novo imprinted X-chromosome inactivation independent of meiotic inactivation in mice. *Nature* 2005;438(7066):369-73.
2. Raefski AS, O'Neill MJ. Identification of a cluster of X-linked imprinted genes in mice. *Nat Genet* 2005;37(6):620-4.
3. Bondy CA. Genomic imprinting in Turner syndrome. *International Congress Series* 2006;1298:21-25.
4. Bondy CA. Turner's Syndrome and X Chromosome-Based Differences in Disease Susceptibility. *Gend Med* 2006;3:18-30.
5. Sagi L, Zuckerman-Levin N, Gawlik A, et al. Clinical Significance of the Parental Origin of the X chromosome in Turner Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;10:158-62.
6. Chu CE, Donaldson MD, Kelnar CJ, et al. Possible role of imprinting in the Turner phenotype. *J Med Genet* 1994;31(11):840-2.
7. Hamelin C, Anglin G, Quigley CA, Deal CL. Genomic imprinting effect on GH response and on risk of sensorineural hearing loss in Turner syndrome. *Horm Res* 2004;62S2:32.
8. Skuse DH, James RS, Bishop DV, et al. Evidence from Turner's syndrome of an imprinted X-linked locus affecting cognitive function. *Nature* 1997;387:705-8.
9. Skuse DH. X-linked genes and mental functioning. *Hum Mol Genet* 2005;14 Spec No 1:R27-32.
10. Lawrence K, Kuntsi J, Coleman M, et al. Face and emotion recognition deficits in Turner syndrome: a possible role for X-linked genes in amygdala development. *Neuropsychology* 2003;17(1):39-49.
11. Hook EB, Warburton D. The distribution of chromosomal genotypes associated with Turner's syndrome: livebirth prevalence rates and evidence for diminished fetal mortality and severity in genotypes associated with structural X abnormalities or mosaicism. *Hum Genet* 1983;64(1):24-7.
12. Hassold T, Kumlin E, Takaesu N, Leppert M. Determination of the Parental Origin of Sex-Chromosome Monosomy Using Restriction Fragment Length Polymorphism. *Am J Hum Genet* 1985;37:965-72.
13. Mathur A, Stekol L, Schatz D, et al. The parental origin of the single X chromosome in Turner syndrome: lack of correlation with parental age or clinical phenotype. *Am. J. Hum. Genet* 1991;48:682-6.
14. Lorda-Sanchez I, Binkert F, Maechler M and Schinzel A. Molecular study of 45,X conceptuses: correlation with clinical findings. *Am. J. Med. Gene* 1992;42:487-90.
15. Chu CE, Donaldson MD, Kelnar CJ, et al. Possible role of

imprinting in the Turner phenotype. J. Med. Genet 1994;31:840-2.

16. Monroy N, Lopez M, Cervantes A, et al. **Microsatellite** analysis in Turner syndrome: Parental origin of X chromosomes and possible mechanism of formation of abnormal chromosomes. Am J Med Genet 2001;107(3):181-9.

17. Kochi C, Longui CA, Lemos-Marini SHV, et al. **The influence** of parental origin of X chromosome genes on the stature of patients

with 45 X Turner syndrome. Genet Mol Res 2007;6(1):1-7.

18. Loughlin SA, Redha A, McIver J, et al. **Analysis of the origin** of Turner's syndrome using polymorphic DNA probes. J Med Genet 1991;28:156-8.

19. Tsezou A, Hadjiathanasiou C, Gourgiotis D, et al. **Molecular** genetics of Turner syndrome: correlation with clinical phenotype and response to growth hormone therapy. Clin Genet 1991;56:441-446.