

Породична парацентрична инверзија кратког крака хромозома X (*Xp21.2p11.23*) и веза с аутистичним поремећајима

Милица Пејовић Милованчевић^{1,2}, Марија Веших², Марко Јелисавчић², Снежана Никшић², Гордана Радивојевић Пилић², Вања Мандић Маравић²

¹Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија;

²Институт за ментално здравље, Београд, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Спектар аутистичних поремећаја (енгл. *autism spectrum disorders – ASD*) чини група развојних поремећаја који се одликују поремећајима у друштвеним интеракцијама, говору и понашању. Аутизам у највећем броју случајева узрокује комбинација генетских и фактора ризика из окружења. Код 10–20% оболелих од *ASD* показано је да је узрок у генима.

Приказ болесника Описујемо случај двогодишњег дечака који је упућен у генетичко саветовалиште због застоја у говору и одређених елемената аутистичног понашања. Цитогенетичком анализом је добијен кариотип 46, *inv(X),Y*. Дечак је био носилац парацентричне инверзије кратког крака хромозома X. Након цитогенетичке анализе крви родитеља утврђено је да је мајка носилац исте аберације. Методом флуоресцентне хибридизације *in situ* добијене су прецизне тачке прекида (*p21.2p11.23*). Мајка и син су били носиоци идентичних X-хромозома.

Закључак Тачке прекида се налазе у регионима који су већ доведени у везу с аутизмом, што указује на то да је позициони ефекат гена могући узрок фенотипа болесника. Осим позиционих ефеката, у бољем сагледавању етиологије аутизма увек треба сагледати и остале генетске, односно факторе средине.

Кључне речи: парацентрична инверзија; кратки крак хромозома X; спектар аутистичних поремећаја

УВОД

Спектар аутистичних поремећаја (енгл. *autism spectrum disorders – ASD*) јесте група развојних поремећаја који се одликују поремећајима у три основне сфере функционисања: 1) друштвене интеракције; 2) језик, комуникација и имагинарна игра; и 3) опсег интересовања и активности [1].

У последњим деценијама преваленција *ASD* се веома повећава (нпр. само у периоду 1991–1997. године за 556% [2], односно 8,4 на 1.000 за *ASD* и 4,1 на 1.000 за аутизам [3]). Процењује се да је преваленција *ASD* у општој популацији 2,64%, а однос мушког пола према женском је 2,5–5,1:1. Студије на општој популацији јасно показују да су *ASD* и даље недовољно препознати и дијагностиковани, те истичу да је неопходна боља едукованост стручњака који раде са децом са *ASD*, јер истраживања показују да се преваленција аутизма годишње повећа за 10–17% [4, 5].

ASD највероватније узрокује комбинација генетских фактора ризика и фактора ризика из окружења [6]. Подаци показују да 10–20% особа оболелих од *ASD* има јасне генетске етиолошке факторе [7]. Утврђено је неколико гена одговорних за подложност аутизму, што значи да је вероватније да ће се код појединца развити аутизам уколико

има одређену варијанту тог гена или ретку мутацију гена [8]. Данас су многа истраживања усмерена на утврђивање начина на који генетски и фактори ризика из окружења доприносе настанку аутизма.

Бројне когнитивне манифестације су уочене код деце са *ASD*; варијетети су од дубоке менталне ретардације и склоности ка самоповређивању до високофункционалних болесника с *IQ* изнад просека упркос неодговарајућој употреби језика у сврху комуникације, односно неодговарајућим социјалним вештинама [8, 9]. Ментална ретардација због тога није критеријум за *ASD*, али се сматра да су, у поређењу са здравом децом, код деце са *ASD* вредности *IQ* просечно ниже (код 50–70% болесника бележи се недовољна интелигенција).

ПРИКАЗ БОЛЕСНИКА

Дечак је рођен из високоризичне трудноће као прво и једино дете мајке. Код мајке је две године пре трудноће дијагностикована ендометриоза, због чега је била на хормонској терапији. Више од годину дана по завршетку терапије спонтано је остала у другом стању. Током трудноће имала је хипертензију, због које је од шестог месеца гестације узимала метилдопу. Порођај у 38. недељи завршен је

Correspondence to:

Milica PEJOVIĆ MILOVANČEVIĆ
Institut za mentalno zdravlje
Palmotićeва 37, 11000 Beograd
Srbija
mpejovic@eunet.rs

царским резом због знакова интраутерине трпње плода. На рођењу телесна маса детета била је 3.050 грама, телесна дужина 50 центиметара, а Апгар скор 9.

У породилишту је приликом ултразвучног прегледа мозга утврђено да постоји проширење можданих комора, што је даље клинички праћено до навршеног 12. месеца живота детета. У узрасту од две године, према препоруци педијатра, урађена је магнетна резонанција главе и налаз је био нормалан.

Између 15. и 16. месеца родитељи су приметили да је дете престало да изговара слоге које је дотад користило. У исто време је престало да се одазива на позиве и ниједан налог није извршавао. Своје жеље и потребе је исказивао вођењем других за руку и показивањем, без координације погледа и покрета. Хиперактивност се појачала, а родитељи су понашање дечака описали „као да је у свом свету“. Приликом контакта с вршњацима, али и нешто старијом децом, деловао је незаинтересовано и дистанцирано. Бирао је необичне игре и занимације, као што је играње с чеповима за флаше, новцем, папиром, музичким играчкама. Према речима родитеља, показивао је фасцинацију рекламама на телевизији.

До 23. месеца дечак није успоставио контролу сфинктера и активно је одбијао да то увежбава. Остале радње самозбрињавања делимично је изводио: знао је да се сам храни рукама, није користио прибор за јело, није знао да се сам обуче, нити је био свестан употребне вредности одеће и обуће.

Родитељи су негирали болести у својим примарним породицама које су биле значајне за наслеђе.

У узрасту од 23 месеца дечак је примљен на болничко лечење у Институт за ментално здравље у Београду због неразвијеног говора, слабе комуникације с људима из околине и хиперкинетског понашања. Током боравка у болници обављена су следећа допунска испитивања: лабораторијски преглед крви, психијатријска и дефектолошка процена, генетичко саветовање и анализа, неурофизиолошко испитивање (нормалан ЕЕГ налаз) и психолошко тестирање. Утврђен је успорен психомоторни развој с поремећајем највише израженим у развоју експресивног говора, а уочена стереотипна понашања и недовољно развијене радње самозбрињавања доведене су у везу с неогдговарајућим ставовима васпитања. Нова процена заказана је у узрасту од две и по године због примене дијагностичког инструмента за процену постојања аутизма.

Током периода између две хоспитализације дечак је редовно долазио на дефектолошки третман, а према извештају дефектолога, постојале су тешкоће у усмеравању пажње и описана је сиромашна игра (скривања, расипања, скупљања). Показивао је заинтересованост за пасивне игре (тобоган, струњаче) и остваривао површне контакте с малим бројем вршњака.

Током другог боравка у болници дечак није иницирао контакте, али је прихватао телесни контакт, док је контакт очима ретко успостављао. Утврђене су хиперактивност и повремено загледавање. Комуникација је била искључиво гестовна; дечак је чуо говор и повремено се одазивао на име, али није имао потребу да

прилази другима, нити да им се обраћа. Није показивао предмете из околине на захтев терапеута, а на осујећења је бурно реаговао, викао и плакао. Груба моторика је била одговарајућа за узраст, док је уочен застој у развоју fine моторике. Посебно је био упадљив застој у развоју говора (изговарао је свега неколико речи). Дечак није био самосталан у исхрани, облачењу и свлачењу и у радњама основне личне хигијене; није био заинтересован за вршњаке, није имао организовану игру и није контролисао рад сфинктера. Закључак је био да је реч о дечаку с успореним психомоторним развојем, уз постојање аутистичних елемената у понашању.

На Вајнленд адаптивној скали (*Vineland Adaptive Behavior Scales*) добијени су следећи скорови: укупан скор адаптивног понашања 63, домен комуникације 59, домен вештина свакодневног живота 71, домен социјализације 68 и домен моторних вештина 67. Применом дијагностичког упитника за процену аутизма (*Autism Diagnostic Interview, Revised – ADI-R*) постављена је дијагноза ASD (установљени квалитативни поремећаји у реципрочной друштвеној интеракцији, квалитативни поремећаји у комуникацији, као и рестриктивни, репетитивни и стереотипни обрасци понашања уз знаке проблема развоја пре навршеног 36. месеца).

Цитогенетичка анализа

Цитогенетичка анализа је извршена на метафазним хромозомима добијеним култивацијом лимфоцита периферне крви стандардном методом Мурхеда (*Moorhead*) и сарадника из 1960. године [10]. Трака G је добијена трипсин-гимза бојењем.

Флуоресцентна хибридикација *in situ*

FISH (енгл. *fluorescence in situ hybridization*) је обављена у Институту за хуману генетику и антропологију у Јени, у Немачкој. Коришћене су следеће пробе: *MCB* (енгл. *multicolor banding*) за хромозом X (*7pcp*) [11], *RP6-27C10* (за регион *Xp21.31*) и *RP11-1409* (за регион *Xp11.3*) са *wcpX* (енгл. *whole chromosome painting*), *RP11-430F3* (за регион *Xp21*) и *RP13-46M24* (за регион *Xp21.1*) са *wcpX*, *RP11-793K24* (за регион *Xp11.3*) са *DMD* ген-специфичним испитивањем са *wcpX*. Пробе су произведене у *Abbott Laboratories* (САД), *Kreatech* (Шпанија) и у самосталној производњи Лабораторије за молекуларну цитогенетику Института за хуману генетику и антропологију у Јени. Анализирано је 5–10 метафаза за сваки сет проба.

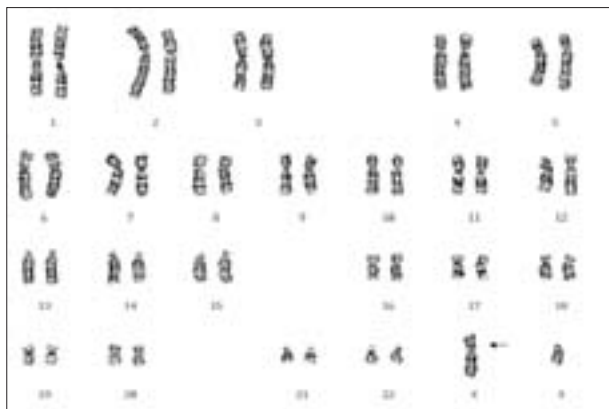
Array CGH

Array CGH (компаративна геномска хибридикација – молекуларна кариотипизација) такође је обављена у Институту за хуману генетику и антропологију у Јени. Ова метода се заснива на симултаном хибридикацији

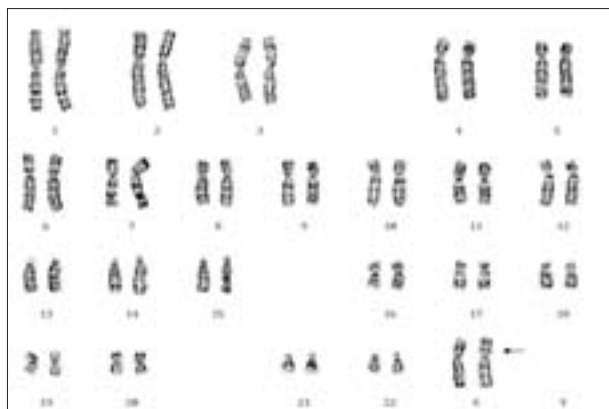
болесникове ДНК и геномски референтне ДНК (комерцијална људска мушко-женска ДНК, произвођач *Promega*, САД). Ова хибридизација се вршила на чипу са 170.334 специфичне олигонуклеотидне секвенце (*Agilent Human Genome CGH Microarray*, платформа 180к, Канада). Пробе које се налазе на чипу су пробе за олигосеквенце које су међусобно удаљене 17.655 kb, што значи да ова платформа може да открије промене на геному мање од 100 kb. Да би се постигла максимална статистичка тачност, анализирају се само промене које се десе на пет редова (делеција 88.3 kb) или на десет редова (амплификација 176.6 kb). Ако се утврде промене – варијације у броју копија, њихов значај се одређује на основу базе података геномских варијанти.

ДИСКУСИЈА

Цитогенетичком анализом кариотипа утврђена је парацентрична инверзија кратког крака хромозома X код болесника и његове мајке (Слике 1 и 2). Осим код родитеља болесника, анализа није рађена на другим сродницима. Стопа побачаја или рођеног неуравнотеженог потомства није била значајно већа у две посматране генерације. *FISH* анализе су дале тачне тачке прекида, тако да је коначан кариотип 46, X, *inv(X)(p21.2p11.23)*. *Array CGH* није показао дупликације или делеције осим већ познатих варијација у броју копија.



Слика 1. Кариотип болесника
Figure 1. The karyotype of the patient



Слика 2. Кариотип мајке
Figure 2. The karyotype of the mother

Показано је да је код дечака носилаца четири тандем-поновка на промоторском региону гена *MAOA* два пута већи ризик за развој ASD. Овај ген се налази на *Xp11.3* [12]. Поред повезаности са ASD, регион *Xp11.4-Xp21* је и у вези с настанком поремећаја недостатка пажње и хиперактивности (енгл. *attention deficit/hyperactivity disorder – ADHD*), што је чест коморбидитет са ASD [13]. Тачке прекида инверзије која је утврђена код приказаног болесника налазе се управо у том, према генском садржају, изузетно занимљивом региону, који се доводи у везу с аутизмом.

Број особа код којих је клинички утврђен ASD свакодневно се повећава. С изузетком Ретовог синдрома, где су узроци код већине дијагностикованих болесника мутације *de novo* или микроделеције гена који кодира метил-*CpG*-везаном протеину 2 (*MeCP2*) или *Xq28*, и даље не постоје јасни докази везе ASD и одређених генетских, односно негенетских поремећаја [1, 14]. Неколико гена на X-хромозому доведено је у везу с аутизмом: *NLGN3 (Xq13)*, *NLGN4 (Xp22)*, *MeCP2 (Xq28)*, *MAO A (Xp11.23)* и *FMR1 (Xq27.3)* [15]. Гени одговорни за аутизам нису утврђени само на X-хромозому, већ на још неколико региона на другим хромозомима: *2q37*, *5p15*, *11q25*, *16q22.3*, *17p11.2*, *18q21.1*, *18q23*, *22q11.2*, *22q13.3* [16].

Без обзира на велики број студија које су се бавиле утврђивањем специфичних узрока ASD, резултати су и даље нејасни и неконзистентни због генетске хетерогености аутистичног фенотипа, могућности интеракције неколико гена различитих експресивности, као и укључености различитих епигенетских механизма (тзв. импринтинг и неједнака инактивација X-хромозома). Такође, с обзиром на то да је експресија многих гена под утицајем специфичног регулаторног региона који се налази релативно далеко, некада чак на другом хромозому, изолација гена који би могао бити одговоран за аутизам често је немогућа [17]. Код 3% особа с аутизмом узрок је структурна хромозомска аберација: делеција, дупликација, инверзија или транслокација.

Узрочна улога гена у ASD фенотипу поткрепљена је монозиготном близаначком конкорданцијом између 60% и 90% и дизиготном конкорданцијом приближно око 5% [18]. Утврђена медицинска стања (нпр. пренагналне инфекције), цитогенетски поремећаји (нпр. дупликације *15q*) и оштећења једног (сингл) гена (нпр. *RELN* и *UBE3A*) забележена су код мање од 10% особа с ASD.

Чешћа појава ASD код дечака указује на могућу повезаност с X-хромозомом. У овом раду описан је досад трећи пријављени случај породичне парацентричне инверзије *X(p21.2p11.23)* која је у вези с благим, неспецифичним аутистичним поремећајем. Парацентричне инверзије дугог крака хромозома X су ретко описане у литератури [19, 20, 21], а пријављена су само два случаја парацентричне инверзије кратког крака хромозома [18, 22].

Након примене методе *FISH* ради добијања тачних тачака прекида применом горенаведених проба, показано је да је реаранжман молекуларно-цитогенетички

уравнотежен. Ипак, и након оваквих резултата увек постоји могућност да и даље постоје субмикроскопске дупликације, односно делеције које могу бити последица неједнаког „кросинг овера“ (енгл. *crossing over*) инвертованог и неинвертованог хомолог хромозома. *Array CGH* је примењен да би се искључиле могуће дупликације, односно делеције, нарочито у региону *Xp11.2-Xp11.3*, у којем се налазе гени који се доводе у везу с аутизмом или менталном ретардацијом. Међутим, није показано да је болесников хромозом *X* на било који начин другачији од мајчиног. С обзиром на све примењене методе и њихове резултате, једино што је остало као могуће објашњене фенотипа болесника јесте позициони ефекат гена у регионима где је дошло до прекида, што се може утврдити анализом инактивације *X*-хромозома мајке.

Упркос томе што су многи гени и протеини доведени у везу с аутизмом као његови могући узроци, и даље се мало зна о њиховом функционисању и улози у развоју мозга. Бројне студије показују да су оштећења на једном гену ретка чак и у студијама близанаца, односно породица, што се бележи и у многим другим сложеним поремећајима, као што су гојазност, дијабетес мелитус и сл. Развој мозга и комплексна понашања су вишеструко детерминисана, а гени одређују покретање или заустављање каскада протеинских реакција уз међусобне утицаје. Специфичне мутације, делеције или јединствени скупови генетског полиморфизма могу одредити склоност ка развоју *ASD*, као што и

фактори средине могу узроковати и модификовати фенотипску експресију поремећаја.

Неки докази већ постоје да генетски утицај *X*-хромозома може имати кључну улогу у вишој осетљивости дечака за појави *ASD* [18]. Већ раније је доказана веза гена зависних од *X*-хромозома у појавама сличним аутизму: анеуплоидије (Тарнеров и Клинефелтеров синдром), фрагилно *X*, односно нуклеотидне мутације (Ретов синдром и др.). Лезије у овим поремећајима говоре у прилог томе да је разумевање концепта *ASD*, пре свега, шири проблем од једноставне клиничке манифестације, а да је улога епигенетских фактора, као што је веза с хромозомом *X*, једно од могућих појашњења компликоване етиолошке теорије настанка *ASD*.

НАПОМЕНА

Овај рад урађен је у оквиру пројекта бр. ОН175013 Министарства просвете и науке Републике Србије.

ЗАХВАЛНИЦА

Захваљујемо др Томасу Лиру (*Thomas Liehr*), шефу групе за молекуларну цитогенетику Института за хуману генетику и антропологију у Јени, што нам је омогућило да се у његовој лабораторији обаве испитивања применом метода *FISH* и *array CGH*.

ЛИТЕРАТУРА

- Muhle R, Trentacoste SV, Rapin I. The genetics of autism. *Pediatrics*. 2004; 113:472-86.
- Fombonne E. The prevalence of autism. *JAMA*. 2003; 289:87-9.
- Mattila ML, Kielinen M, Linna SL, Jussila K, Ebeling H, Bloigu R, et al. Autism spectrum disorders according to DSM-IV-TR and comparison with DSM-5 draft criteria: an epidemiological study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2011; 50(6):583-92.
- Kim YS, Leventhal BL, Koh YJ, Fombonne E, Laska E, Lim EC, et al. Prevalence of autism spectrum disorders in a total population sample. *Am J Psychiatry*. 2011; 168(9):904-12.
- Cheslack-Postava K, Jordan-Young RM. Autism spectrum disorders: toward a gendered embodiment model. *Soc Sci Med*. 2011; 74(11):1667-74.
- Stokstad E. Development. New hints into the biological basis of autism. *Science*. 2001; 294:34-7.
- Schiff M, Benoist JF, Aïssaoui S, Boepsflug-Tanguy O, Mouren MC, Ogier de Baulny H, et al. Should metabolic diseases be systematically screened in nonsyndromic autism spectrum disorders? *PLoS One*. 2011; 6(7):e21932.
- Milačić Vidojević I. Autizam – dijagnoza i tretman. Beograd: Fakultet za specijalnu edukaciju i rehabilitaciju, Univezitet u Beogradu; 2008.
- Rutter M. Genetic studies of autism: from the 1970s into the millennium. *J Abnor Child Psychol*. 2000; 28:3-14.
- Moorhead PS, Nowell PC, Mellmam WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Expi Cell Res*. 1960; 20:613-6.
- Weise A, Mrasek K, Fickelscher I, Claussen U, Cheung SW, Cai WW, et al. Molecular definition of high-resolution multicolor banding probes: first within the human DNA sequence anchored *FISH* banding probe set. *J Histochem Cytochem*. 2008; 56(5):487-93.
- Tassone F, Qi L, Zhang W, Hansen RL, Pessah IN, Hertz-Picciotto I. *MAOA*, *DBH*, and *SLC6A4* variants in *CHARGE*: a case-control study of autism spectrum disorders. *Autism Res*. 2011; 4(4): 250-61.
- Jiang SD, He M, Qian YP, Wang DX, Zhang Y, Li F, et al. Genome-wide search for linkage to attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) on the X chromosome. *Yi Chuan*. 2006; 28(1):26-30.
- Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked *MECP2*, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Gen*. 1999; 23:185-8.
- Freitag CM. The genetics of autistic disorders and its clinical relevance: a review of the literature. *Mol Psychiatry*. 2007; 12:2-22.
- Vorstman JA, Staal WG, van Daalen E, van Engeland H, Hochstenbach PF, Franke L. Identification of novel autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic abnormalities associated with autism. *Mol Psychiatry*. 2006; 11(1):18-28.
- Qiao Y, Liu X, Harvard C, Hildebrand MJ, Rajcan-Separovic E, Holden JJ, et al. Autism associated familial microdeletion of *Xp11.22*. *Clin Genet*. 2008; 74:134-44.
- Marco EJ, Skuse DH. Autism-lessons from the X chromosome. *SCAN*. 2006; 1:183-93.
- Herr HM, Horton SJ, Scott CI. De novo paracentric inversion of an X chromosome. *J Med Genet*. 1985; 22:140-2.
- Villard L, Briault S, Lossi AM, Paringaux C, Beloungue J, Colleaux L, et al. Two unrelated patients with inversions of the X chromosomes and non specific mental retardation: physical and transcriptional mapping of their common breakpoint region in *Xq13.1*. *Med Genet*. 1999; 36:754-8.
- Sloan-Béna F, Philippe C, LeHeup B, Wuilque F, Levy ER, Chéry M, et al. Characterization of an inverted X chromosome (p11.2q21.3) associated with mental retardation using *FISH*. *J Med Genet*. 1998; 35:146-50.
- Dahoun S. A second case of the *de novo* paracentric inversion of the short arm of the X chromosome. *Ann Genet*. 1990; 33(1):52-5.

Family Paracentric Inversion of the Short Arm of Chromosome X (Xp21.2p11.23) and Connection with Autism Spectrum Disorders

Milica Pejović Milovančević^{1,2}, Marija Vešić², Marko Jelisavčić², Snežana Nikšić², Gordana Radivojević Pilić², Vanja Mandić Maravić²

¹School of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia;

²Institute of Mental Health, Belgrade, Serbia

SUMMARY

Introduction Autism spectrum disorders (ASDs) are a group of complex pervasive developmental disorders characterized by impairments in communication, social interaction and behavior. In most cases autism is caused by a combination of genetic factors and environmental risk factors. In 10% to 20% of cases it has been shown that the cause of ASD is genetic.

Case Outline We are describing a 2-year-old boy who was referred to genetic counseling because of speech delay and certain autism-like behavior. By cytogenetic analysis the karyotype 46, inv(X),Y was obtained. The boy was a carrier of a paracentric inversion of the short arm of the chromosome X. After cytogenetic analysis of parental blood, it was detected that

mother was a carrier of identical aberration, but had no clinical signs. The method of fluorescent in situ hybridization (FISH) yielded the precise breakpoint in the region (p21.2p11.23). Mother and son were carriers of identical X chromosome.

Conclusion Breakpoints are located in the regions that have already been linked to autism, which indicates that the positional effect of the gene could have been a possible cause of the patient's genotype. In addition to positional effects, in order to better understand the etiology of autism other genetic and environmental factors should be always taken into consideration.

Keywords: paracentric inversion; short arm of chromosome X; autism spectrum disorders

Примљен • Received: 11/10/2011

Ревизија • Revision: 19/01/2012

Прихваћен • Accepted: 27/02/2012