

УДК 577.217.34:575.117.2:616-056.3

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-243–253

Для цитирования: Колесникова И.С., Тулупов А.А., Дольский А.А., Лемская Н.А., Савелов А.А., Петровский Е.Д., Антонов А.А., Максимова Ю.В., Шорина А.Р., Сергеева И.Г., Телешева А.С., Графодатский А.С., Юдкин Д.В. Повышенная экспрессия рРНК у пациента с интеллектуальной недостаточностью и семейным случаем хромосомы 13p+. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (1): 243–253.

## Повышенная экспрессия рРНК у пациента с интеллектуальной недостаточностью и семейным случаем хромосомы 13p+

Колесникова И.С.<sup>1</sup>, Тулупов А.А.<sup>2,3</sup>, Дольский А.А.<sup>1,3</sup>, Лемская Н.А.<sup>1</sup>, Савелов А.А.<sup>2</sup>, Петровский Е.Д.<sup>2</sup>, Антонов А.А.<sup>3</sup>, Максимова Ю.В.<sup>4,5</sup>, Шорина А.Р.<sup>5</sup>, Сергеева И.Г.<sup>3</sup>, Телешева А.С.<sup>1,3</sup>, Графодатский А.С.<sup>1</sup>, Юдкин Д.В.<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup>Институт молекулярной и клеточной биологии (ИМКБ) Сибирского отделения (СО) Российской академии наук (РАН) Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 8/2

<sup>2</sup>Международный томографический центр (МТЦ) СО РАН Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Институтская, 3а

<sup>3</sup>Новосибирский национальный исследовательский государственный университет (ННИГУ) Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

<sup>4</sup>Новосибирский государственный медицинский университет (НГМУ) Россия, 630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52

<sup>5</sup>Городская клиническая больница № 1 Россия, 630047, г. Новосибирск, ул. Залесского, 6

### РЕЗЮМЕ

Данное молекулярно-цитогенетическое исследование пациента с интеллектуальной недостаточностью и признаками аутизма выявило наличие у него аномальной хромосомы 13 с увеличенным р-плечом, амплификацией рибосомной ДНК (рДНК) и очень активным ядрышкообразующим районом. Методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени обнаружен повышенный в шесть раз уровень 18S, 28S и 5.8S рибосомной РНК (рРНК) в образцах крови пациента. Также с помощью функциональной магнитно-резонансной томографии показаны функциональные изменения в головном мозге, в частности в структуре крючковидных пучков. Отец пациента, носитель аналогичной хромосомы с амплифицированной рДНК, здоров и имеет нормальный уровень экспрессии рРНК.

**Ключевые слова:** интеллектуальная недостаточность, рибосомная ДНК (рДНК), рибосомная РНК (рРНК); ядрышкообразующий район (ЯОР), функциональная МРТ, тракты головного мозга.

### ВВЕДЕНИЕ

Интеллектуальная недостаточность у людей может быть вызвана различными факторами окружающей среды и генетическими причина-

ми, и их идентификация является важной проблемой медицинской генетики. Интеллектуальная недостаточность широко распространена и диагностируется приблизительно у 1% популяции. Генетические причины данной патологии могут быть связаны с изменением количества хромосом, структурными хромосомными

✉ Юдкин Дмитрий Владимирович, e-mail: dim@mcb.nsc.ru.

перестройками и мутациями более чем в 700 генах [1].

Полиморфизм и гетероморфизм длины р-плечей акроцентрических хромосом, содержащих ядрышкообразующие районы (ЯОР), были описаны ранее. О семейном случае гетероморфизма 13p+ сообщалось в 1976 г. [2]. Четыре члена описываемой семьи имели хромосому 13p+, при этом у двух наблюдалась интеллектуальная недостаточность. Увеличенные р-плечи хромосом 13 и 15 описаны еще в нескольких работах, что может сопровождаться задержкой умственного развития или никак не проявляться [3]. В атласе хромосом человека при этом сказано, что некоторый гетероморфизм р-плеч хромосом 13, 14, 15, 21 и 22 является нормой [4].

Гены рибосомной РНК (рРНК) располагаются в р-плечах акроцентрических хромосом человека (хромосомы 13–15, 21 и 22). Они представляют собой tandemные повторы, количество единиц в которых значительно варьирует между индивидуумами. Кроме того, по данным секвенирования, даже соотношение количества 18S, 28S и 5.8S рРНК может отличаться между собой, несмотря на то что они являются одной транскрипционной единицей [5]. Случаи существенной амплификации этих генов редки, хотя повышенная экспрессия рРНК и усиленный биогенез рибосом встречаются во многих случаях и часто наблюдаются при различных онкологических патологиях [6–8].

В данной статье описывается сверхэкспрессия рРНК у пациента с интеллектуальной недостаточностью и признаками аутизма, у которого обнаружен гетероморфизм хромосомы 13. Одна из его хромосом 13 имеет большой блок гетерохроматина и амплификацию рибосомной ДНК (рДНК) на коротком плече.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Клинические исследования и магнитно-резонансная томография (МРТ).* Клинические исследования включали в себя консультации специалистов-медиков, в частности клинического психолога, невролога и логопеда. Все МРТ-исследования проводились на аппарате 1.5T Philips Achieva Nova Dual (Япония). Функциональная МРТ была сделана с помощью последовательности эхо-планарной визуализации на матрице 64 × 64, 35 аксиальных срезов, 4 × 4 × 4 мм<sup>3</sup> изотропный воксель и TR/TE=3500/50 мс. Процедуры сканирования проводили с использованием 16-канальной нейроваскулярной катушки. Сеансы длились 7 мин, во время которых записывали 120

объемов, после чего их обрабатывали оффлайн с использованием ПО DPARSFA (<http://rfmri.org/DPARSF>). Проводили стандартные процедуры предварительной обработки данных, включавшие коррекцию движения, пространственное сглаживание с помощью Гауссовой функции при ПШПВ 8 мм, временную фильтрацию с порогом отсечения 100 с и удаление посторонних сигналов. Параметры уравнений регрессии для устранения шумовых сигналов включали параметры движения и их производные, временные серии интенсивности белого вещества и ликвора и линейные тенденции. Корреляции спонтанной активности были посчитаны для каждой пары областей, как это определено в атласе ААМ мозга [9].

*Приготовление и окрашивание препаратов метафазных хромосом.* Клетки крови культивировали в среде RPMI-1640 (Gibco, США) с 20% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота (Gibco, США) в течение 72 ч. Затем в течение 3 ч их инкубировали в присутствии 0,03%-го раствора колцемида КагуоМах (Gibco) и 2,5 мкг/мл бромистого этидия, после чего проводили гипотоническую обработку с течением 25 мин и фиксацию в смеси метанола и уксусной кислоты (3 : 1). Препараты готовили путем раскапывания суспензии клеток на предметные стекла.

Для G-окрашивания [10] препараты обрабатывали 0,25%-м раствором трипсина в течение 1 мин и окрашивали красителем Романовского – Гимза в течение 1–2 мин.

Окрашивание раствором нитрата серебра проводили по методу, описанному ранее [11]. Препараты обрабатывали смесью 2%-го желатина и 1%-й муравьиной кислоты и 50%-м раствором нитрата серебра (AgNO<sub>3</sub>) в течение 10 мин при 65 °С.

Анализ препаратов осуществляли на микроскопе Olympus VX-53 (Япония) при общем увеличении ×1 000. Для получения и анализа изображений использовали программное обеспечение ВидеоТест Карио 3.1. В каждом случае анализировали не менее 80 метафазных пластинок.

*Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH).* Плазмиду рHr13, содержащую гены 18S, 28S и 5,8S рРНК [12], метили с помощью системы ник-трансляции BioNick (Thermo Fisher Scientific, США). Перед постановкой FISH препараты предварительно обрабатывали 100 мкг/мл раствором РНКазы в течение 1 ч при 40 °С и 0,005%-м раствором пепсина в 10 мМ соляной кислоте в течение 10 мин при 37 °С. FISH проводили с 0,06 нг меченного зонда в 50%-м формамиде при 40 °С в течение ночи. Детекцию осуществляли с помощью конъюгата

Алекса-555-стрептавидин. Окрашивание хромосом проводили с помощью DAPI (0,08 мкг/мл).

Препараты анализировали на микроскопе Olympus BX-53 при общем увеличении  $\times 1\ 000$ . Для получения и анализа изображений использовали программное обеспечение ВидеоТест FISH 2.0.

*Выделение РНК, получение комплементарной ДНК (кДНК) и количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени.* Тотальную РНК выделяли из цельной крови или из плазмы крови с использованием набора Aurum Total RNA Mini Kit (BioRad, США), затем проводили обратную транскрипцию с помощью набора для синтеза кДНК iScript Select (BioRad). ПЦР в реальном времени проводили с использованием смеси SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (BioRad) в амплификаторе C1000 Touch Thermal Cycler с системой CFX 96 (BioRad).

Праймеры для ПЦР в реальном времени подбирали с использованием *ref. seq* NR\_003286.2, NR\_003287.2 и NR\_003285.2 для 18S, 28S и 5,8S рРНК соответственно. Для нормализации в качестве гена домашнего хозяйства использовали  $\beta$ -актин (*ref.seq.* NM\_001101.3 для подбора праймеров). Последовательности использованных праймеров приведены в табл. 1. В качестве контроля для оценки уровня рРНК служил материал, полученный от здорового донора мужского пола с нормальным кариотипом (CPG57 в базе данных ИМКБ СО РАН). Для каждого варианта реакции делали три технических повтора и подсчитывали среднее значение со стандартной ошибкой среднего. Статистическую оценку и сравнение результатов количественной ПЦР в реальном времени проводили методом  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  с использованием программного обеспечения GraphPad (t-критерий Стьюдента). Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

Таблица 1

Праймеры, использованные при оценке уровней рРНК с помощью количественной ПЦР в реальном времени		
Мишень	Прямой праймер	Обратный праймер
18S рРНК	5'- GAGAAACGGCTACCACATCCAA -3'	5'- CCAATTACAGGGCCTCGAAAGA -3'
28S рРНК	5'- GGGTGGTAAACTCCATCTAAGG -3'	5'- GCCCTCTTGAACCTCTCTCTTC -3'
5,8S рРНК	5'- GGTGGATCACTCGGCTCGT -3'	5'- CCGCAAGTGCCTTCGAAGTG -3'
$\beta$ -актин	5'- CACGGCATCGTCACCAACTG -3'	5'- GCAACGTACATGGCTGGGG -3'

## РЕЗУЛЬТАТЫ

*Результаты клинических и психологических исследований.* Пациент мужского пола (CPG22 в базе данных ИМКБ СО РАН) является первым ребенком; родился в 2010 г. после 39 нед беременности. Оба родителя были здоровы и не имели каких-либо установленных наследственных моногенных заболеваний и не состояли в близком кровном родстве. Беременность была осложнена угрозой невынашивания в I (11 нед) и III (30 нед) триместре. Пациент был выписан из роддома с диагнозами: доношенность, зрелость, 3-кратное обвитие пуповины вокруг шеи и церебральная ишемия 1-й степени. На момент исследования пациенту было 4 года, его отцу (CPG72 в базе данных ИМКБ СО РАН) – 31 год, матери (CPG73 в базе данных ИМКБ СО РАН) – 31 год.

У пациента наблюдается высокий, широкий лоб, эпикант, клинодактилия мизинцев наряду с интеллектуальной недостаточностью легкой степени (F70.1 согласно МКБ-10), значительной задержкой речевого развития и аутичным поведением с крайней расторможенностью, отсутствием

фразовой речи (до 10 простых слов). Пациент не идет на контакт и не всегда понимает обращенную к нему речь. Физиологическое развитие средне гармоничное, развитие моторики не нарушено.

*Магнитно-резонансная томография.* Для участия в исследовании были приглашены контрольная группа (шесть здоровых участников), возраст ( $24 \pm 2$ ) года; пациент (CPG22) и его отец (CPG72). Рассмотрены функциональные корреляции (ФК) между верхними (ППЛ 83, 84), средними (ППЛ 87, 88) и поперечными извилинами, фронтальными/затылочными и верхними/нижними/средними извилинами в пределах одного полушария, результаты представлены в табл. 2.

В то время как средние коэффициенты ФК для контрольной группы были выше 0,5 для всех пар упомянутых регионов, наблюдалось существенное сокращение топологии нейронов (коннективности) у пациента CPG22 и в некоторых случаях у его отца, включая изменение направленности корреляции.

С помощью диффузионно-тензорной трактографии исследовали морфологическую структуру трактов белого вещества, которая может соответ-

ствовать генетическим нарушениям и способствовать развитию врожденных патологий. У СРG22 обнаружены значительные изменения структуры обоих крючковидных пучков, особенно в левом тракте (рис. 1). Большая часть левого крючковидного тракта переломлена в точке вхождения во фронтальную долю. Правый крючковидный тракт

менее изменен, но часть его не достигает фронтальной доли (см. рис. 1). Хотя изменения в крючковидных пучках наиболее заметны, наблюдаются изменения в других регионах белого вещества; большинство из них имеют асимметричные тракты, добавочные проводящие пути волокон белого вещества и нарушение структуры трактов.

Т а б л и ц а 2

Междольные корреляции фМРТ в состоянии покоя у пациентов с хромосомой 13p+				
Связь	СРG72 лев.	СРG72 прав.	СРG22 лев.	СРG22 прав.
Верхняя височная – верхняя передняя	R*	R***	R*	R**
Средняя височная – средняя передняя	N	N	R*	R***
Средняя височная – нижняя передняя	N	N	R**	R***
Средняя височная – нижняя затылочная	R***	R***	R***	N
Средняя височная – средняя затылочная	N	R*	R***	R***
Средняя височная – верхняя затылочная	N	N	R***	R***
Верхняя височная – средняя затылочная	N	N	R***	R***
Верхняя височная – верхняя затылочная	R***	R*	R***	R***

П р и м е ч а н и е. N – статистически достоверные различия по сравнению с контрольной группой отсутствуют. R\* – сниженная функциональная связность,  $p < 0,054$ ; R\*\* – сниженная функциональная связность,  $p < 0,001$ ; R\*\*\* – коэффициент корреляции близок к 0 или отрицательный.

**Кариотипирование.** У пациента описан кариотип 46, XY, 13p+. G-окрашивание выявило у него гетероморфизм пары хромосом 13, одна из которых имела увеличенное p-плечо (рис. 2, a, b). Увеличение произошло за счет удлинения сегмента p12 и крупного блока гетерохроматина в сегменте p13. Обнаруженный гетероморфизм присутствовал в 100% клеток. Анализ хромосом родителей пациента выявил нормальный кариотип (46, XX) у матери (рис. 2, c), а у отца – 46, XY, 13p+ (рис. 2, d). Таким образом, у отца была обнаружена аналогичная гетероморфная пара хромосом 13, и это означает, что пробанд унаследовал аномальную хромосому от отца. У здорового контрольного донора был выявлен нормальный кариотип 46, XY.

**FISH и исследование ЯОР.** Хромосомный район 13p12 несет ядрышковый организатор, в котором расположены tandemные повторы рибосомной ДНК. Каждая повторяющаяся единица содержит гены 18S, 5,8S и 28S рРНК [12]. Чтобы проверить, как изменения размера p-плеча повлияли на кластер рДНК, провели FISH и локализовали плазмиду рHr13, содержащую полную

последовательность гена трех рРНК: 18S, 28S и 5,8S [9] на хромосомах обоих носителей аномальной хромосомы 13p+ (отца СРG72 и сына СРG22). В обоих случаях сигналы, локализовавшиеся в районе 13p12, на аномальных хромосомах были значительно крупнее, чем сигналы на других акроцентрических хромосомах с ЯОР и гомологах (рис. 3, a, c, e). Это указывает на амплификацию последовательностей рДНК на аномальной хромосоме 13 как отца, так и сына.

Для оценки активности ЯОР у обоих носителей 13p+ проводили окрашивание нитратом серебра тех же метафазных пластинок СРG22 и СРG72, на которых определяли локализацию рHr13 (рис. 3, b, d, e). На аномальной хромосоме 13 СРG22 обнаружена повышенная активность ЯОР по сравнению с нормальными акроцентрическими хромосомами на обеих хроматидах по всей длине увеличенного p-плеча (включая гетерохроматиновый регион в p13). Интересно, что данный активный ЯОР представлял собой, по-видимому, единый целостный регион, в то время как более ранние сообщения описывали до четыре окраши-

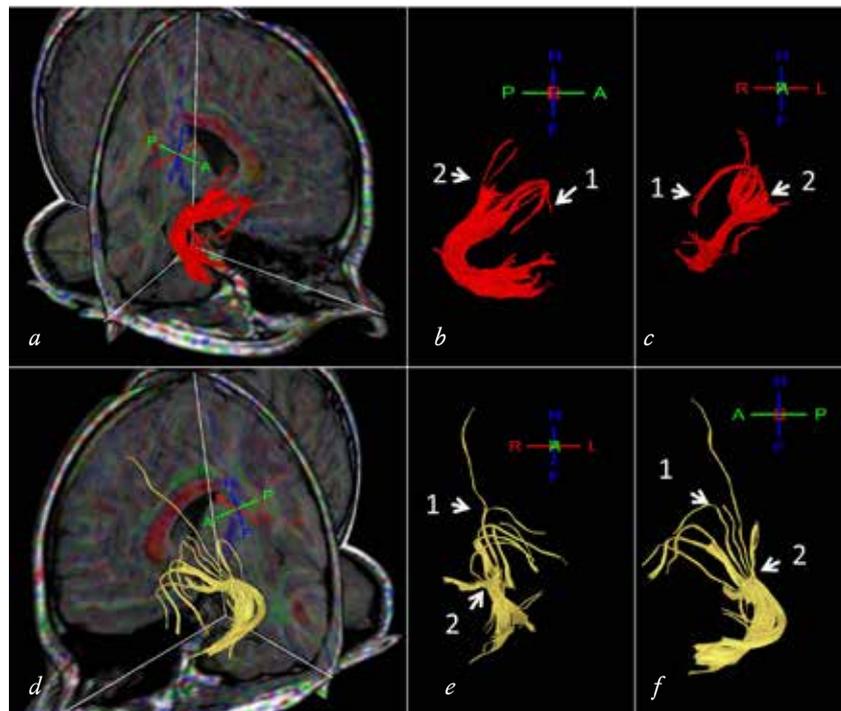


Рис. 1. Морфологические изменения левого и правого крючковидных пучков белого вещества у пациента CPG22 при диффузионно-тензорной трактографии: *a* – общий снимок правого крючковидного пучка; *b* – латеральный снимок правого крючковидного пучка; *c* – фронтальный снимок правого крючковидного пучка; *d* – общий снимок левого крючковидного пучка; *e* – латеральный снимок левого крючковидного пучка; *f* – фронтальный снимок левого крючковидного пучка. Стрелками, отмеченными 1, указаны изменения направления волокон в тракте. Стрелками, отмеченными 2, указаны разрывы трактов

Fig. 1. Morphological changes in the left and right hook-shaped beams of white matter in the patient CPG22 for diffuse-tensor tractography: *a* – the general picture of the right hook-shaped fascicle; *b* – lateral image of the right hook-shaped fascicle; *c* – front image of the right hook-shaped fascicle; *d* – general picture of the left hook-shaped fascicle; *e* – lateral image of the left hook-shaped fascicle; *f* – a front image of the left hook-shaped fascicle. The arrows marked with 1 indicate the changes in the direction of the fibers in the tract. The arrows marked with 2 indicate discontinuities of the paths

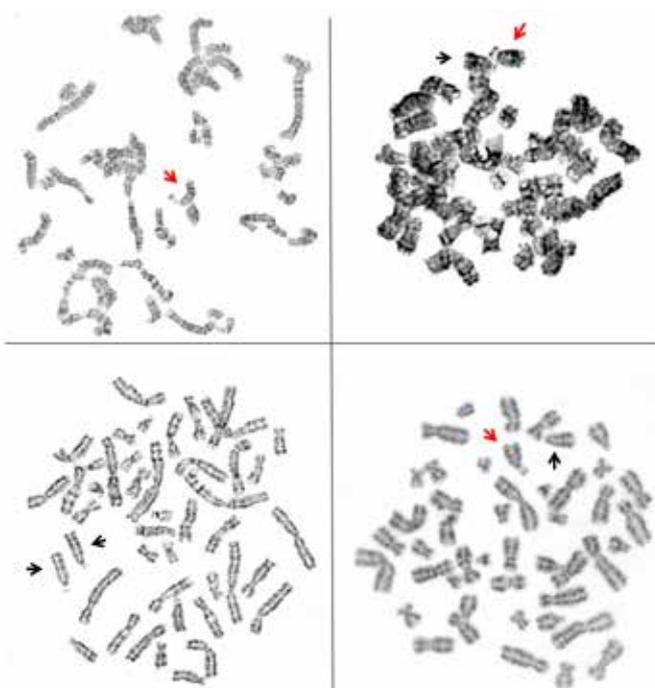


Рис. 2. G-окрашивание хромосом пациента CPG22 (*a*, *b*), его матери CPG73 (*c*) и отца CPG72 (*d*). Красные стрелки показывают аномальную хромосому 13, черные стрелки – нормальную хромосому 13

Fig. 2. G-chromosome staining of patient CPG22 (*a*, *b*), his mother CPG73 (*c*) and father CPG72 (*d*). Red arrows show an abnormal chromosome 13, black arrows indicate a normal chromosome 13

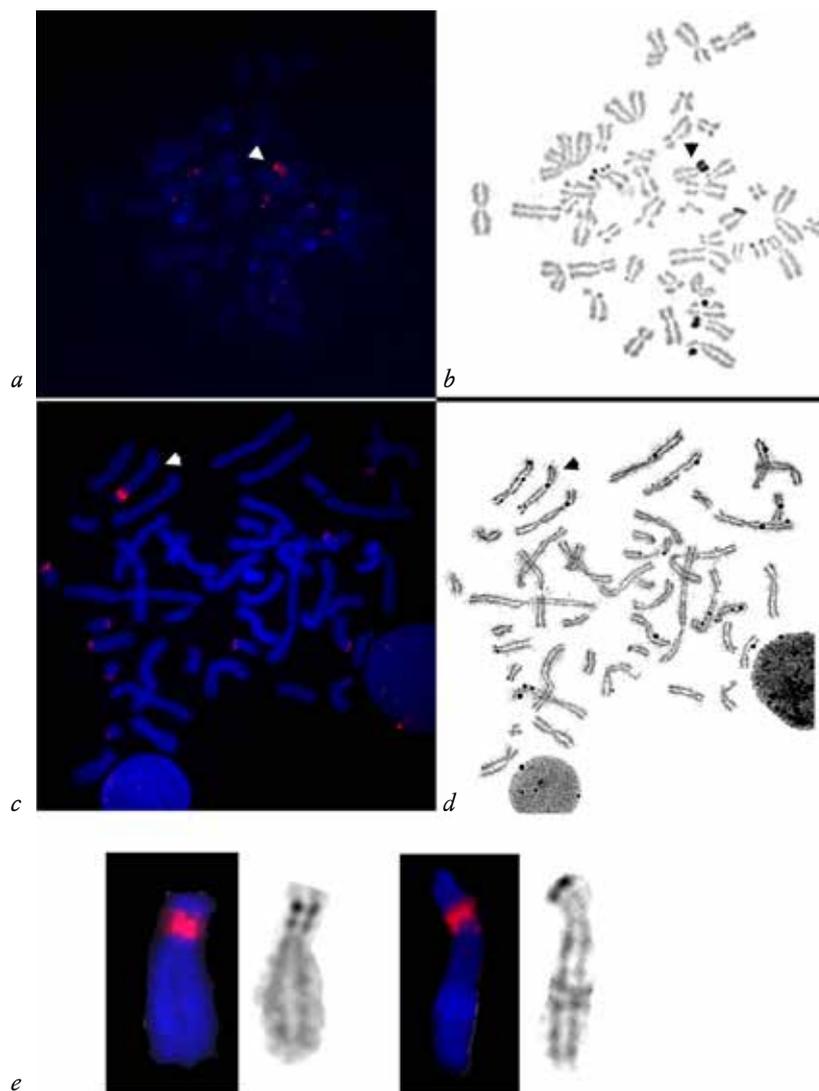


Рис. 3. Исследование ЯОР хромосом пациента CPG22 (*a, b*) и его отца CPG72 (*c, d, e*). Локализация рДНК (*a, c*) и окрашивание нитратом серебра (*b, d*). Сравнение двух типов окрашивания нитратом серебра на аномальных хромосомах 13 CPG72 (*e*). Стрелки указывают аномальную хромосому 13p+

Fig. 3. Study of the chromosome nucleolus organizer region of patient CPG22 (*a, b*) and his father CPG72 (*c, d, e*). Localization of rDNA (*a, c*) and staining with silver nitrate (*b, d*). Comparison of two types of staining with silver nitrate on abnormal chromosomes 13 CPG72 (*e*). The arrows indicate an abnormal 13p+ chromosome

ваемых серебром ЯОР на увеличенных р-плечах акроцентрических хромосом [13–15].

В отличие от этого у CPG72 наблюдали один активный ЯОР на аномальной хромосоме 13, сравнимый по размеру с ЯОР на нормальных акроцентрических хромосомах в 57% клеток. В остальных 43% клеток на аномальной хромосоме 13 выявлены два различных ЯОР, из которых дистальный окрашивался ярче, т. е. был более активным (рис. 3, *e*).

**Определение уровней рРНК.** Яркое окрашивание серебром короткого плеча аномальной хромосомы 13 пациента с интеллектуальной недостаточностью указывало на высокую активность

ЯОР на этой хромосоме, в то время как у его отца картина была совершенно другая. Поэтому измерялись уровни экспрессии рРНК у всех обследованных членов семьи. FISH с зондами, содержащими последовательности 18S, 28S и 5,8S рРНК, выявил амплификацию, по крайней мере, некоторых из этих последовательностей. Высокая активность ЯОР по всей длине амплифицированной рДНК у пациента с интеллектуальной недостаточностью могла указывать на высокий уровень экспрессии генов рРНК.

С помощью ПЦР в режиме реального времени проведена оценка количества этих трех рРНК. Для нормализации использовали мате-

риал от здорового контрольного донора с нормальным кариотипом. Было обнаружено, что у обоих здоровых родителей пациента уровни всех трех рРНК сопоставимы с нормальным контролем, за исключением уровня 18S рРНК у матери, который был достоверно ниже (рис. 4). Эти результаты согласуются с картиной, полученной при окрашивании нитратом серебра. Напротив, у их сына с интеллектуальной недостаточностью уровни экспрессии всех трех рРНК были приблизительно в шесть раз выше, чем у контрольного донора (см. рис. 4), что также согласуется с результатами окрашивания нитратом серебра.

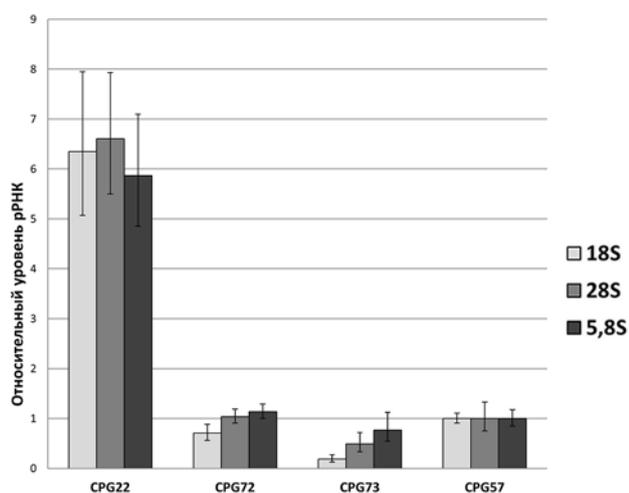


Рис. 4. Уровни экспрессии рРНК у пациента (CPG22), его родителей (CPG72 и CPG73) и здорового контрольного донора (CPG57). Результаты нормализованы относительно уровня экспрессии  $\beta$ -актина и уровней рРНК CPG57

Fig. 4. Levels of rRNA expression in the patient (CPG22), its parents (CPG72 and CPG73) and healthy control donor (CPG57). The results are normalized relatively to the level of  $\beta$ -actin expression and CPG57 rRNA levels

Отмечено, что у отца и сына присутствует одинаковая аномальная хромосома 13 с амплифицированными генами рРНК, но различается уровень их активности.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Случай, описываемый в данной статье, очень похож на семейный случай, описанный ранее. С. Stoll и соавт. сообщали о четырех членах семьи (отец и три сына) – носителях аномальной хромосомы 13p+, при этом у двух сыновей наблюдались интеллектуальная недостаточность и дисморфизм, в то время как третий сын и их отец были здоровы. К сожалению, в этой работе не были проведены окрашивание нитратом серебра

и исследование рДНК, равно как и оценка уровня экспрессии рРНК [2].

В представленном исследовании FISH позволила выявить амплификацию рДНК у обоих носителей хромосомы 13p+. Чтобы изучить функциональный эффект обнаруженной амплификации, был проведен анализ уровней экспрессии рРНК в образцах крови всех членов семьи. У родителей не наблюдалось существенной разницы по сравнению с нормальным контролем (за исключением сниженного уровня 5,8S рРНК у матери), в то время как у ребенка отмечалось значительное увеличение уровня экспрессии всех трех рРНК. И отец, и сын являются носителями одинаковой хромосомы 13p+ с амплифицированной рДНК, но только у сына была обнаружена сверхэкспрессия рРНК, и она сопровождалась интеллектуальной недостаточностью и изменениями в проводящих трактах головного мозга. Однако механизм развития интеллектуальной недостаточности в данном случае не ясен.

Некоторые публикации описывали случаи аномального увеличения р-плеч акроцентрических хромосом, которые не являлись результатами транслокаций, но многие из таких случаев почти не сопровождалось нарушением здоровья [3, 13–15]. Например, D. Soudek в 1979 г. описал аномальную хромосому 13 при G-окраске, очень похожую на выявленную в представленной работе, но имевшую нормальный размер ЯОР после окрашивания нитратом серебра, такой же, как показан у CPG72 [15]. Эта аномальная хромосома передавалась по женской линии в течение трех поколений без каких-либо негативных проявлений. К сожалению, окраску серебром хромосом матери и бабушки, носительниц той же хромосомы, не проводили, равно как и исследования рДНК и экспрессии рРНК [15]. М. Schmid и соавт. сообщали о маркерной хромосоме 14p+ с амплификацией генов 18S и 28S рРНК на коротком плече. Как и у CPG72, окрашивание серебром в этом случае выявило функциональный мозаицизм маркерной хромосомы 14p+, 59% клеток имели на ней один ЯОР, 41% два ЯОР, при этом во втором случае дистальные ЯОР были более активны, как у CPG72. У носителя данной хромосомы наблюдались минорные врожденные нарушения, в то время как его отец и бабушка, носители такой же хромосомы, были здоровы [16].

D.A. Miller и соавт. ранее описали похожую хромосому 14p+ с функциональным мозаицизмом и более активными дистальными ЯОР при окрашивании серебром, которая присутствовала в трех поколениях нормальных здоровых инди-

видуумов [14]. К сожалению, большинство работ, касающихся гетероморфных пар акроцентрических хромосом, были опубликованы более 30 лет назад, и исследования описанных случаев неполные. Многие из таких работ не содержат анализа возможной амплификации рДНК, и ни одно из ранее опубликованных сообщений не включало в себя измерение экспрессии рРНК. Однако в экспериментах было показано, что правильное функционирование рибосомного аппарата, в частности сборка рибосом, крайне важно для нормального развития нервной системы [17]. Судя по результатам исследования, описываемого в данной статье, связь между амплификацией рДНК и развитием интеллектуальной недостаточности может заключаться в сверхэкспрессии рРНК с амплифицированного участка из-за возможных нарушений регуляции. Данное предположение согласуется с наличием изменений активности рибосомного аппарата при заболеваниях, связанных с нейродегенерацией, например при болезни Паркинсона [18, 19] или наследственных полиглутаминовых заболеваниях [20, 21]. Кроме того, в нестимулированных лимфоцитах периферической крови детей с синдромом Дауна также была показана повышенная активность ядрышек по сравнению со здоровым контролем [22].

Таким образом, аномальные акроцентрические хромосомы с увеличенными р-плечами могут вызывать задержку умственного развития либо не иметь каких-либо проявлений, и сложно определить, от чего это зависит. Данная статья является первым исследованием, показавшим повышенную экспрессию рРНК у пациента с интеллектуальной недостаточностью. Отмечена возможная связь между кариотипом, функционированием рДНК, функциональными изменениями в головном мозге и интеллектуальной недостаточностью.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данной работы показано, что наличие гетероморфизма р-плеч акроцентрических хромосом приводит к амплификации генов рРНК и само по себе не имеет фенотипического проявления. Тем не менее активация дополнительных копий генов рРНК и их оверэкспрессия могут быть связаны с интеллектуальной недостаточностью.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

## ВКЛАД АВТОРОВ

Колесникова И.С. – проведение всех молекулярно-генетических работ, анализ результатов. Тулупов А.А. – анализ данных МРТ. Дольский А.А. – дизайн экспериментов с применением ПЦР в реальном времени, подбор праймеров. Лемская Н.А. – дизайн и проведение части цитогенетических работ. Савелов А.А., Петровский Е.Д., Антонов А.А. – непосредственное проведение МРТ, настройка томографа, статистическая обработка результатов МРТ. Максимова Ю.В., Шорина А.Р., Сергеева И.Г. – непосредственное клиническое обследование пациентов. Телешева А.С. – подготовка контрольных образцов. Графодатский А.С. – автор концепции о связи нарушений в рибосомном аппарате с интеллектуальной недостаточностью, дизайн всей работы. Юдкин Д.В. – общее руководство проектом, написание рукописи.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 15-15-10001.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Vissers L.E., Gilissen C., Veltman J.A. Genetic studies in intellectual disability and related disorders. *Nature Reviews Genetics*. 2016; 17 (1): 9–18. DOI: 10.1038/nrg3999.
2. Stoll C., Rohmer A., Korn R., Heumann G. Familial 13p+ chromosome with mental retardation and dysmorphic features of two children. *Human Genetics*. 1976; 34 (1): 81–84. DOI: 10.1007/bf00284441.
3. Starke H., Mrasek K., Liehr T. Three cases with enlarged acrocentric p-arms and two cases with cryptic partial trisomies. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2005; 53 (3): 359–360. DOI: 10.1369/jhc.4B6407.2005.
4. Wyandt H.E., Tonk V.S. Atlas of human chromosome heteromorphisms. Springer Science + Business Media Dordrecht; 2011: 216.
5. Gibbons J.G., Branco A.T., Yu S., Lemos B. Ribosomal DNA copy number is coupled with gene expression variation and mitochondrial abundance in humans. *Nat. Commun.* 2014; 5: 4850. DOI: 10.1038/ncomms5850.
6. Uemura M., Zheng Q., Koh C.M., Nelson W.G., Yegnabramanian S., De Marzo A.M. Overexpression of ribosomal RNA in prostate cancer is common but not linked to rDNA promoter hypomethylation. *Oncogene*. 2012; 31 (10): 1254–1263. DOI: 10.1038/onc.2011.319.
7. Zhou H., Wang Y., Lv Q., Zhang J., Wang Q., Gao F., Hou H., Zhang H., Zhang W., Li L. Overexpression of ribosomal RNA in the development of human cervical cancer is associated with rDNA promoter hypomethylation. *PLoS One*. 2016; 11 (10): e0163340. DOI: 10.1371/journal.pone.0163340.
8. Nguyen le X.T., Raval A., Garcia J.S., Mitchell B.S. Regulation of ribosomal gene expression in cancer. *J. Cell Physiol.* 2015; 230: 1181–1188. DOI: 10.1002/jcp.24854.
9. Tzourio-Mazoyer N., Landeau B., Papathanassiou D., Crivello F., Etard O., Delcroix N., Mazoyer B., Joliot M.

- Automated anatomical labeling of activations in SPM using a macroscopic anatomical parcellation of the MNI MRI single-subject brain. *NeuroImage*. 2002; 15 (1): 273–289. DOI: 10.1006/nimg.2001.0978.
10. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*. 1971; 2 (7731): 971–972. DOI: 10.1016/s0140-6736(71)90287-x.
  11. Howell W.M., Black D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*. 1980; 36 (8): 1014–1015. DOI: 10.1007/bf01953855.
  12. Maden B.E., Dent C.L., Farrell T.E., Garde J., McCallum F.S., Wakeman J.A. Clones of human ribosomal DNA containing the complete 18S-rRNA and 28S-rRNA genes. Characterization, a detailed map of the human ribosomal transcription unit and diversity among clones. *Biochem. J.* 1987; 246 (2): 519–527. DOI: 10.1042/bj2460519.
  13. Lau Y.F., Wertelecki W., Pfeiffer R.A., Arrighi F.E. Cytological analyses of a 14p+ variant by means of N-banding and combinations of silver staining and chromosome bandings. *Human Genetics*. 1979; 46 (1): 75–82. DOI: 10.1007/bf00278904.
  14. Miller D.A., Breg W.R., Warburton D., Dev V.G., Miller O.J. Regulation of rRNA gene expression in a human familial 14p+ marker chromosome. *Human Genetics*. 1978; 43 (3): 289–297. DOI: 10.1007/bf00278836.
  15. Soudek D. Prenatal diagnosis of a 13p+ karyotype. *Human Genetics*. 1979; 51 (3): 339–341. DOI: 10.1007/bf00283406.
  16. Schmid M., Nanda I., Steinlein C., Epplen J.T. Amplification of (GACA)<sub>n</sub> simple repeats in an exceptional 14p+ marker chromosome. *Human Genetics*. 1994; 93 (4): 375–382. DOI: 10.1007/bf00201661.
  17. Slomnicki L.P., Pietrzak M., Vashishta A., Jones J., Lynch N., Elliot S., Poulos E., Malicote D., Morris B.E., Hallgren J., Hetman M. Requirement of neuronal ribosome synthesis for growth and maintenance of the dendritic tree. *J. Biol. Chem.* 2016; 291 (11): 5721–5739. DOI: 10.1074/jbc.M115.682161.
  18. Hetmann M., Pietrzak M. Emerging roles of neuronal nucleolus. *Trends Neurosci.* 2012; 35 (5): 305–314. DOI: 10.1016/j.tins.2012.01.002.
  19. Parlato R., Liss B. How Parkinson's disease meets nucleolar stress. *Biochemica et Biophysica Acta*. 2014; 1842 (6): 791–797. DOI: 10.1016/j.bbdis.2013.12.014.
  20. Tsio H., Lau T. C.-K., Tsang S.-Y., Lau K.-F., Chan H.Y.E. CAG expansion induces nucleolar stress in polyglutamine diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012; 109 (33): 13428–13433. DOI: 10.1073/pnas.1204089109.
  21. Tsoi H., Chan H.Y. Expression of expanded CAG transcripts triggers nucleolar stress in Huntington's disease. *Cerebellum*. 2013; 12 (3): 310–312. DOI: 10.1007/s12311-012-0447-6.
  22. Imamoglu N., Eroz R., Canatan H., Demitras H., Saatci C. Nuclear AgNOR enhancement in nucleoplasm of peripheral blood lymphocytes of babies/children with Down Syndrome. *Microsc. Res. Tech.* 2016. 79 (3): 133–139. DOI: 10.1002/jemt.22613.

Поступила в редакцию 28.07.2017

Утверждена к печати 06.02.2018

Колесникова Ирина Станиславовна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, сектор хромосомных патологий, ИМКБ СО РАН, г. Новосибирск.

Тулупов Андрей Александрович, д-р мед. наук, профессор РАН, зав. лабораторией МРТ технологии, МТЦ СО РАН; ННИГУ, г. Новосибирск.

Дольский Александр Алексеевич, мл. науч. сотрудник, сектор хромосомных патологий, ИМКБ СО РАН, г. Новосибирск.

Лемская Наталья Анатольевна, канд. биол. наук, науч. сотрудник, сектор хромосомных патологий, ИМКБ СО РАН, г. Новосибирск.

Савелов Андрей Александрович, канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотрудник, лаб. МРТ технологии, МТЦ СО РАН, г. Новосибирск.

Петровский Евгений Дмитриевич, лаборант, лаборатория магнитно-резонансной микротомографии, МТЦ СО РАН, г. Новосибирск.

Антонов Александр Алексеевич, студент, ННИГУ, г. Новосибирск.

Максимова Юлия Владимировна, д-р мед. наук, зав. кафедрой медицинской генетики и биологии, НГМУ; Городская клиническая больница № 1, г. Новосибирск.

Шорина Асия Ринатовна, врач-генетик, ГКБ № 1, г. Новосибирск.

Сергеева Ирина Геннадьевна, д-р мед. наук, ННИГУ, г. Новосибирск.

Телепова Алена Сергеевна, ст. лаборант, сектор хромосомных патологий, ИМКБ СО РАН, г. Новосибирск.

Графодатский Александр Сергеевич, д-р биол. наук, зав. отделом разнообразия и эволюции геномов, ИМКБ СО РАН, г. Новосибирск.

Юдкин Дмитрий Владимирович, канд. биол. наук, зав. сектором хромосомных патологий, ИМКБ СО РАН; ННИГУ, г. Новосибирск.

(✉) Юдкин Дмитрий Владимирович, e-mail: dim@mcb.nsc.ru.

УДК 577.217.34:575.117.2:616-056.3

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-243-253

For citation: Kolesnikova I.S., Tulupov A.A., Dolskiy A.A., Lemskaya N.A., Savelov A.A., Petrovsky E.D., Antonov A.A., Maksimova Yu.V., Shorina A.R., Sergeeva I.G., Telepova A.S., Graphodatsky A.S., Yudkin D.V. Overexpression of rRNA genes in a patient with intellectual disability and familial 13p+ chromosome. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (1): 243–253.

## Overexpression of rRNA genes in a patient with intellectual disability and familial 13p+ chromosome

Kolesnikova I.S.<sup>1</sup>, Tulupov A.A.<sup>2,3</sup>, Dolskiy A.A.<sup>1,3</sup>, Lemskaya N.A.<sup>1</sup>, Savelov A.A.<sup>2</sup>, Petrovsky E.D.<sup>2</sup>, Antonov A.A.<sup>3</sup>, Maksimova Yu.V.<sup>4,5</sup>, Shorina A.R.<sup>5</sup>, Sergeeva I.G.<sup>3</sup>, Telepova A.S.<sup>1,3</sup>, Graphodatsky A.S.<sup>1</sup>, Yudkin D.V.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Molecular and Cellular Biology (IMCB) SB RAS  
8/2, Lavrentieva Av., Novosibirsk, 630090, Russian Federation

<sup>2</sup> International Tomography Center (ITC) SB RAS  
3a, Institutskaya Str., Novosibirsk, 630090, Russian Federation

<sup>3</sup> Novosibirsk State University  
2, Pirogov Str., Novosibirsk, 630090, Russian Federation

<sup>4</sup> Novosibirsk State Medical University  
52, Krasny Str., Novosibirsk, 630091, Russian Federation

<sup>5</sup> Novosibirsk City Clinical Hospital No 1  
6, Zalesskiy Str., Novosibirsk, 630047, Russian Federation

### ABSTRACT

A study of a child with intellectual disability revealed an enlarged p-arm in chromosome 13 and amplified rDNA. qRT-PCR showed an approximately 6-fold increased level of rRNA in the patient's blood samples. fMRI study revealed changes in uncinate fasciculus. His father is a carrier of the same chromosome, healthy and has a normal level of rRNA.

**Key words:** intellectual disability, ribosomal DNA – rDNA, ribosomal RNA – rRNA, nucleolus organizer region – NOR; chromosome 13, fMRI, brain tracts.

### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

### SOURCE OF FINANCING

The work is supported by a grant from the Russian Science Foundation No. 15-15-10001.

Received 28.07.2017

Accepted 06.02.2018

Kolesnikova Irina S., PhD, Senior Researcher, Chromosome Pathology Group, IMCB SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation.

Tulupov Andrey A., DM, Professor, Head of the MRI Technology Laboratory, ITC SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation.

Dolskiy Alexander A., Junior Researcher, Chromosome Pathology Group, IMCB SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation.

Lemskaya Natalya A., PhD, Researcher, Chromosome Pathology Group, IMCB SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation.

Savelov Andrey A., PhD, Senior Researcher, MRI Technology Laboratory, ITC SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation.

Petrovsky Evgeniy D., Technician, Laboratory of Microtomography, ITC SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation.

**Antonov Alexander A.**, Student, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation.

**Maksimova Yulia V.**, DM, Head of the Department of Medical Genetics and Biology, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation.

**Shorina Asia R.**, Clinical Geneticist, Novosibirsk City Clinical Hospital No 1, Novosibirsk, Russian Federation.

**Sergeeva Irina G.**, DM, Director of Center of Medical Postgraduate Education, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation.

**Telepova Alena S.**, Technician, Chromosome Pathology Group, IMCB SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation.

**Graphodatsky Alexander S.**, DBSc, Head of the Department of the Diversity and Evolution of Genomes, IMCB SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation.

**Yudkin Dmitry V.**, PhD, Head of the Chromosome Pathology Group, IMCB SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation.

(✉) **Yudkin Dmitry V.**, e-mail: dim@mcb.nsc.ru.