

KRANIOSTOZA SINDROMIKE NGA RISTRUKTURIMI KOMPLEKS I KROMOZOMIT 5 DHE TREFISHIMIT TË GENIT MSX2

ANILA BABAMETO (LAKU), VAHE MOKIN, ANILA MITRE,
LAURA BENARDINI, RITA MINGARELLI, ANTONIO NOVELLI,
BRUNO DALLAPICCOLA, MICHAEL COHEN*

Summary

SYNDROMAL CRANIOSYNOSTOSIS DUE TO COMPLEX CHROMOSOME 5 REARRANGEMENT AND MSX2 GENE TRIPLICATION

Craniosynostosis is a common birth defect (~1/3,000 births) resulting from chromosome imbalances, gene mutations or unknown causes. We report on a 6-month-old female presenting multiple sutural synostosis together with prenatal-onset growth retardation, developmental delay, facial dysmorphisms, congenital heart defect and inguinal hernia. An integrated approach of standard cytogenetics, mBAND, locus-specific FISH, and 75 kb resolution array-CGH disclosed a complex chromosome 5 rearrangement, resulting in 3 paracentric inversions, 2 between-arm insertions, and partial duplication of 5q35. An extra copy of the *MSX2* gene, which maps within the duplicated segment and is mutated in non-syndromic Boston-type craniosynostosis, was confirmed by molecular cytogenetic studies. Our study confirms that the early fusion of cranial sutures, commonly observed in the dup (5q) syndrome, is caused by triplication of the *MSX2* gene and strongly supports the crucial role of this gene in the development of craniofacial structures.

Termi "kraniosinostozë" i referohet fuzionit të parakohshëm të suturave kraniale, të quajtura eventualisht "kraniostenozë" (4,5). Është një nga defektet më të shpeshta në lindje, me shpeshësi 1/3000 lindje (10). Kraniosinostozë mund të jetë e izoluar, ose, më rrallë, e shoqëruar me keqformime të tjera. Aktualisht, disa anomali kromozomike, të tilla si dup(3q), del(7p), del(9p) dhe del(11q), duke përfshirë genet *FGFR1-3*, *TWIST*, *MSX2*, *EFNB1*, *EFNA4*, *POR* dhe *ALPL*, janë identifikuar në format sindromike dhe josindromike të kraniosinostozës (2,4,5).

Në veçanti, një mutacion i vetëm missense (Pro 148His) i genit *MSX2*, që lokalizohet në 5q35, është identifikuar në kraniosinostozën e izoluar tip Boston, ndërsa trizomia parciale e kromozomit 5q, banda q35, është raportuar në 5 pacientë që paraqisnin kraniosinostozë sindromike (7,11,13,17,18,20). Interesant është fakti që në njërën nga këta pacientë, të cilët paraqisnin kraniosinostozë, anomali faciale, prapambetje të zhvillimit psikomotor, defekt septal atrial dhe patent ductus arteriosus, për shkak të translokacionit amtar të paekuilibruar t(5;13)(q33.3;q34), u vërtetua nga studimet citogenetike

* Dërguar në Redaksi në Qershor 2007, miratuar për botim Janar 2008.

Nga Departamenti i Gjenetikes, Fakulteti i Mjekesise, Tirane.
Adresa për letërkëmbim: Babameto A. Departamenti i Gjenetikes, Fakulteti i Mjekesise, Tirane.

molekulare prania e një kopje të tepërt të genit MSX2(17).

Po paraqesim një rast të ri me kraniosinostozë, prapambetje prenatale të zhvillimit, dismorfi kraniofaciale, defekt të lindur të zemrës, dhe hernie inguinale, të shoqëruar me ristrukturim kompleks të kromozomit 5 që rezultoi në një kopje të tepërt të genit MSX2.

Paraqitja e rastit

Rasti i paraqitur ishte fëmija i parë (seksi femër) i dy prindërve të shëndoshë pa bashkëgjakësi. Në anamnezën familjare nuk kishte asnjë të dhënë për sëmundje gjenetike. Kishte lindur nga një shtatzënësi normale (39 javë) me Apgar 5 e 6 në 1' e 5', respektivisht. Peshë në lindje ishte 2780gr, gjatësia 44cm dhe perimetri kranial 31,5cm. Në lindje u vu re hipotoni e theksuar, dismorfi kraniofaciale multiple, dhe zhurmë kardiake holosistlike 3/6. Shumë shpejt pas lindjes u transferua në reanimacionin e neonatologjisë për shkak të një dipneje me cianoze. Në ekzaminimin ekografik të zemrës rezultoi një defekt kompleks i lindur, që konsistonte në defekt interventrikular, valvul mitrale displastike dhe koarktacion i aortës me kavitetet e majta të dilatuara. Në ekzaminimin ekografik abdominal rezultoi splenomegali e moderuar, ndërsa ekzaminimi radiologjik i toraksit përjashtoi anomali të pjesës së sipërme të kolonës.

Në moshën 4 muaj, peshë e probandit ishte 4000gr, gjatësia 54 cm, dhe perimetri kranial 36 cm. Në ekzaminimin fizik u vu re oksicefali, temporalet të thelluara, ptozë palpebrale bilaterale dhe proptoze okulare e lehtë, hundë e vogël, filtrum i gjatë, gojë e vogël e hapur me hollim të buzës së sipërme, palatum ogival, dhe veshë të implantuar poshtë me rrotullim posterior (Figura nr.1a,b). Gjithashtu u vu re shkurtim rizomelik i lehtë i gjymtyrëve të sipërme, hernie inguinale e majtë dhe hipotoni aksiale.

Në ekzaminimin e fundit në moshën 6 muaj fëmija mbante kokën por nuk mund të rrinte ulur pa u mbështetur. Në EEG u vunë re anomali jospecifike të lobit frontal, ndërsa nga ekzaminimi radiologjik i traktit gastrointestinal me barium rezultoi refluks gastroezofageal i theksuar. Një vlerësim kardiologjik i mëtejshëm, duke përfshirë ekografinë kardiake dhe

angiografinë - CT, konfirmoi defektin e lindur të zemrës dhe stenozen e valvulës mitrale, valvulës aortale bikuspidale dhe hipertensionin pulmonar. CT e kokës tregoi kraniosinostozë komplekse, me mbyllje të parakohshme të suturave metopike, sagitale, lamboide, skuamoze dhe pjesës periferike të suturave koronale, sëbashku me zonat multiple të osifikimit defektoz parietal, sugjестive të kraniolakunave (luckenschadel; Figura nr.1,d). Defekti kardiak i lindur u korigjua me sukses. Pacientja bëri ekzitus një muaj më vonë si rezultat i insuficiencës kardiorespiratore gjatë ndërhyrjes kirurgjikale për të korigjuar kraniostenozën.

Studimet citogjenetike

Analiza kromozomike e pacientes dhe prindërve të saj u bë nga limfocitet e vëna në kulturë të gjakut periferik duke përdorur teknikat standarte dhe bandat G. Rezultoi ristrukturim i kromozomit 5 të probandit dhe kariotip normal i prindërve (Figura nr.2). Analiza FISH duke përdorur sondën e ngjyrosur për kromozomin 5 (Applied spektral imaging GmbH, Edingen Neckarhausen, Germany), sipas sugjerimeve të prodhuesit, nuk tregoi përfshirjen e kromozomeve të tjera, por një ristrukturim intrakromozomik. Kjo hipotezë u provua nga analiza CGH-array duke përdorur një instrument me rezolucion 75 kb (Agilent technologies, Palo Alto, CA). Shkurtimisht, 1 ig e DNA së pacientes dhe 1 ig e DNA reference, me digjestion të dyfishtë RsaI dhe AluI, u shënuan në mënyrë të ndryshme dhe u hibridizuan 40 orë në 65 gradë me rrotullim. Pas shplarjeve mbas hibridizimit, lamat u analizuan me skaner Agilent (Agilent technologies). Të dhënat e marra u analizuan duke përdorur Feature extraction V9.1 dhe profilet kromozomike u gjeneruan me CHG Analytics V3.4. 27 software (Agilent Technologies). Analiza identifikoi dyfishimin e kromozomit 5q35 (Figura nr.3a). Lokalizimi i segmentit të dyfishuar u përcaktua nga analiza mBAND (MetaSystems, Altsshein, Germany) (Figura nr.3b). Imazhet u përfatuan duke përdorur mikroskopin Axioplan 2 (Carl Zeiss GmbH, Jena, Germany), i pajisur me një llampë mërkuri HBO 100 e filtrat përkatës, dhe u analizuan duke përdorur sistemin Isis/mFISH (MetaSystems). Kjo analizë konfirmoi gjithashtu që derivati i kromozomit 5 kishte

një ristrukturim intrakromozomik kompleks, siç tregohet nga bandimi pseudo-kolor i alteruar, që u interpretua si rezultat i inversionit paracentrik p13p14, insercionit direkt q11q13, dhe insercionit të invertuar q23q31 në krahun e shkurtër. Banda e dyfishuar 5q35 lokalizohej nën centromer, dhe ishte në vazhdimësi të segmenteve të invertuara q14q21 dhe q32q34. Në segmentin distal ishin ruajtur bandat q34 dhe q35 (Figura nr.4). Ristrukturimi u konfirmua nga analiza FISH me klonet specifike BAC (BACPAC Resources ; <http://www.chori.org/bacpac>), ndërsa për informacionin e hartëzimit u përdor database publik (<http://genome.ucsc.edu>). DNA u ekstraktua nga Quantum Prep MiniPrep Kit (BioRad, Hercules, CA) dhe SpectrumGreen-dUTP ose SpectrumOrange-dUTP të shënuara duke përdorur kitin Nick Translation (Vysis Inc., Downers Grove, IL). FISH me sonda lokus-specifike u realizua siç u përshkrua më lart (2). Në veçanti, FISH i kryer me klonin RP11-54H12, që përmban genin MSX2, tregoi tre sinjale hibridizimi, dy nga të cilat të pritshme në pjesën distale të dy kromosomeve 5 dhe një pikërisht nën centromer në 5q (Figura nr.5).

Diskutim

Pacientja paraqiste dismorfji faciale, hernie inguinale, defekt të lindur të zemrës, prapambetje të zhvillimit psikomotor dhe sinostoza suturale multiple, që rezultuan në oksicefali. Kariotipi standart tregoi një ristrukturim kompleks të kromozomit 5, që u zgjidh me ekzaminime të tjera citogjenetike dhe citogjenetikën molekulare. Veçanërisht, mBAND, FISH lokus-specifik dhe CGH-array me rezolucion 75 kb zbuluan të paktën 9 pika thyerje, që çuan në 3 inversione paracentrike, 2 insercione ndërmjet krahëve dhe trizomi parciales të segmentit distal 5q (Figura nr.4). Përveç kompleksitetit të këtij ristrukturimi, duhet thënë që fenotipi përkatës ishte më tepër për shkak të dyfishimit 5q35, siç u sugjerua nga të dhënat klinike mjaft të ngjashme të pacientes sonë me ato pak trizomi për 5q distale të kromozomit 5 (6,9,12).

Interesant është fakti që 6 pacientë me dup (5q), duke përfshirë dhe rastin e paraqitur, kishin kraniosinostozë (7,13,17,18,20). Kohët e fundit është zbuluar që ky defekt lidhet me praninë e një kopje të tepërt të genit MSX2, që lokalizohet në 5q35.2 (17).

Studimet citogjenetike molekulare të pacientes sonë konfirmojnë që zhvillimi kraniofacial normal mund të jetë i ndjeshëm ndaj dozës së genit MSX2.

Kraniosinostoza jo-sindromike e tipit Boston shoqërohet me mutacionin MSX2 Pro148His, të lokalizuar në krahun N-terminal, një regjion i implikuar në ndërveprimet proteinë-proteinë (11). Studimet mbi shprehjen e këtij mutacioni në zhvillimin e kalvarias së minjve transgenikë kanë treguar që mutacioni Msx2 shkaktonte mbyllje të parakohshme të suturave (14). Më tej, studimet in-vitro kanë treguar që mutacioni Pro148His përforcon afinitetin DNA-lidhës të Msx2 për një grup të sekuecave të tij target, për shkak të një stabiliteti të kompleksit mutant Msx2-DNA (15). Së fundi, roli themelor i MSX2 në morfogenezën kraniale mbështetet nga shoqërimi i mutacioneve me humbje të funksionit me foramina parietalia me ose pa displazi kleidokraniale në qeniet njerëzore (8,19). Defekti i lindur i zemrës është një e dhënë tjetër që takohet të rasti i përshkruar dhe subjekte të tjera me dyfishim distal të 5q (17). Geni që ka një rol të rëndësishëm në zhvillimin kardial, lokalizohet në 5q32.1 (Lints et al., 1993), bandë e përfshirë në regjionin e dyfishuar. Ky gen kodon për një faktor transkriptimi specifik homeobox, mutacionet heterozigote të të cilit dihet që janë shkak i një spektrumi të gjerë të defekteve kardiake (3,16). Megjithatë, të dhënat sugjerojnë që mutacionet patogjenetike NKX2.5 kanë një efekt dominant-negativ apo me humbje të funksionit të qeniet njerëzore, disa evidenca nga modele të botës së kafshëve sugjerojnë që mbishprehja NKX2.5 gjithashtu mund të ketë një efekt të kundërt në zhvillimin e zemrës (1,3,16). Për këtë arsye, defektet kardiake të identifikuara në rastin e paraqitur mund të shpjegohen me trefishimin e NKX2.5.

Si konkluzion, rasti i paraqitur paraqet një fenotip të dallueshëm që rezulton nga dyfishimi i kromozomit 5q distal dhe konfirmon që doza e MSX2 është themelore në zhvillimin e strukturave kraniofaciale dhe një forme të dallueshme të kraniosinostozës. Të dhëna të tjera fenotipike të sindromit nga dup(5q) mund të shpjegohen nga mbishprehja e geneve të tjera të përfshira në segmentin e dyfishuar. Janë të nevojshme vëzhgime të mëtejshme për të konfirmuar këtë sugjerim.

Figura nr.1 (a,b) Dismorfitë kraniofaciale të probandit, që përfshijnë oksicefalinë, të thelluarat temporale, ptozën palpebrale bilaterale dhe proptozën e moderuar okulare, hundë e vogël, filtrum i gjatë, gojë e vogël e hapur me hollim të buzës së sipërme, veshë me implantim të ulur të rrotulluar mbrapa. (c,d) 3D CT scan i kokës tregoi mbyllje të parakohshme të suturave metopike, sagitale, lambdoide dhe porcionit periferik të suturave koronale, së bashku me *craniolacunae* multiple (*lückenschädel*) në kockat parietale.

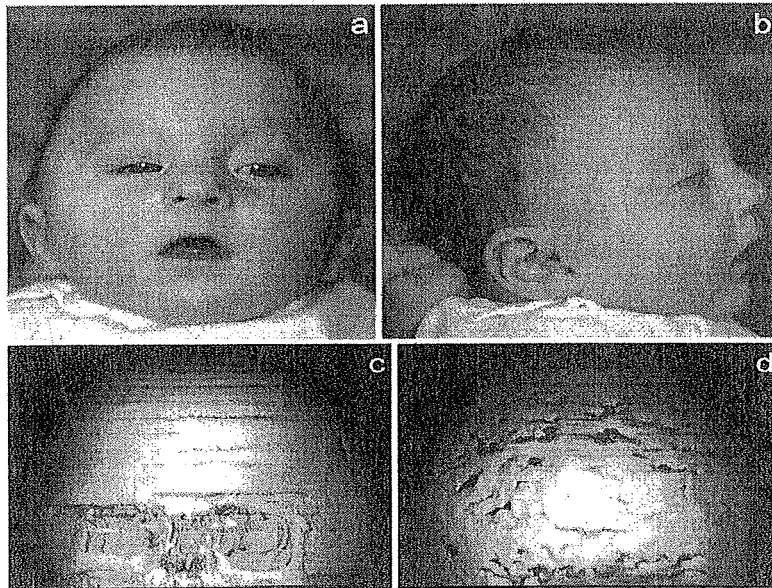
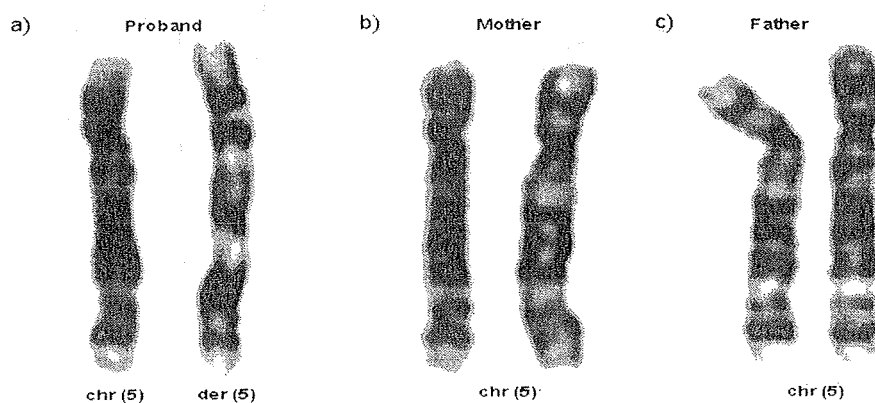
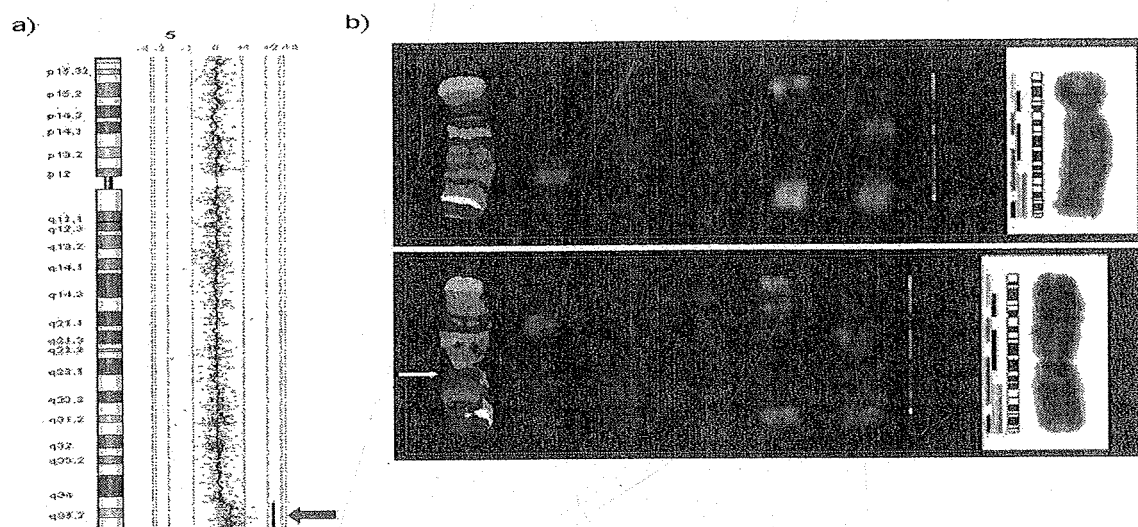


Figura nr.2 Çifti i kromozomit 5: probandi (a) tregon një kromozom 5 të ristrukturuar, ndërsa kromozomet prindërore (b,c) janë normal.



lokalizimin e segmentit të dyfishuar në kromozomin 5 të ristrukturuar (shigjeta).



paracentrike, dy insercione dhe trizomi të bandës 5q35.

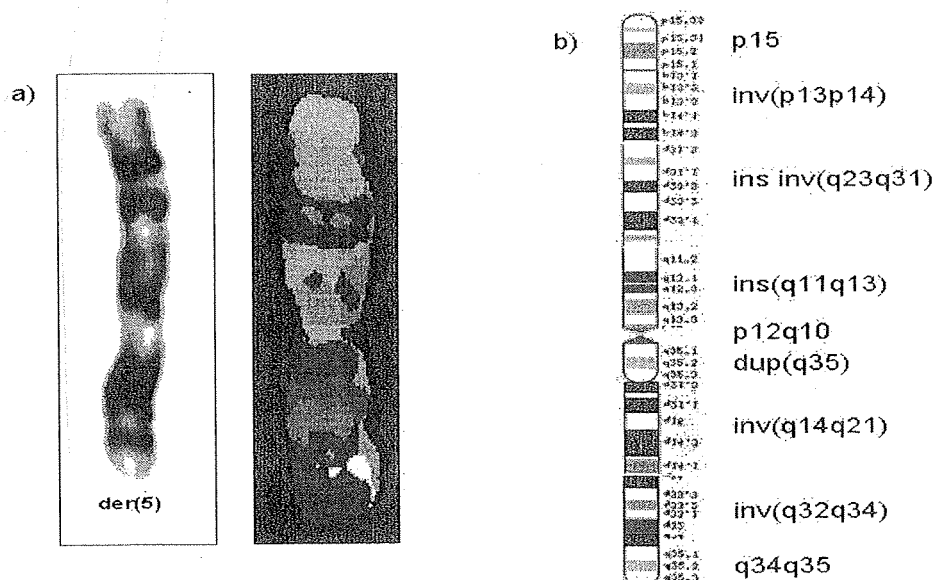
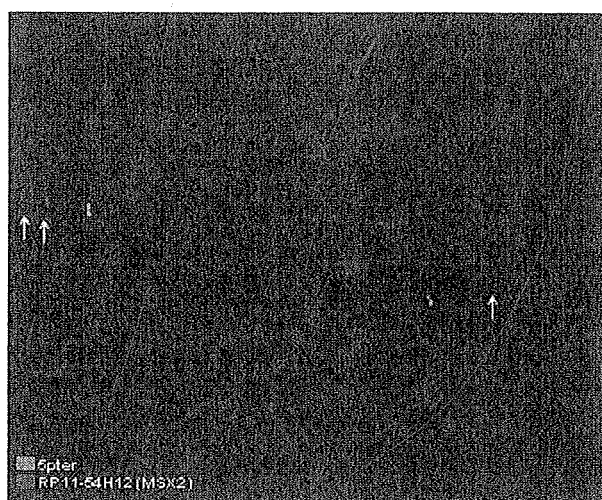


Figura nr.5 Dyfishimi i regjionit 5q35, që përmban genin *MSX*, e konfirmuar nga analiza FISH lokus-specifike FISH me klonin RP11-54H12 BAC (shigjeta).



BIBLIOGRAFIA

1. Akazawa H., Komuro I.: Cardiac transcription factor Csx/Nkx2-5: its role in cardiac development and diseases. *Pharmacol Ther* 107:252-268, 2005.
2. Battaglia A., Novelli A., Ceccarini C., Carey JC.: Familial complex 3q;10q rearrangement unraveled by subtelomeric FISH analysis. *Am J Med Genet A* 140:144-150, 2006.
3. Benson DW, Silberbach GM, Kavanaugh-McHugh A., Cottrill C., Zhang Y., Riggs S., Smalls O., Johnson MC, Watson MS, Seidman JG, Seidman CE, Plowden J., Kugler JD.: Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways. *J Clin Invest* 104:1567-1573, 1999.
4. Cohen MM Jr.: The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. *Am J Med Genet A* 140:2646-2706, 2006.
5. Cohen MM Jr, MacLean RE.: Craniosynostosis: diagnosis, evaluation, and management. 2nd edition. Oxford University Press, New York, USA, 2000.
6. Curry CJ, Loughman WD, Francke U., Hall BD, Golbus MS, Derstine J., Epstein CJ.: Partial trisomy for the distal long arm of chromosome 5 (region q34 leads to qter). A new clinically recognizable syndrome. *Clin Genet* 15:454-461, 1979.
7. Elias-Jones AC, Habibi P., Larcher VF, Spencer T., Butler LJ.: The trisomy (5)(q31-qter) syndrome: study of a family with a t(5:14) translocation. *Arch Dis Child* 63:427-431, 1988.
8. Garcia-Minaur S., Mavrogiannis LA, Rannan-Eliya SV, Hendry MA, Liston WA, Porteous ME, Wilkie AO.: Parietal foramina with cleidocranial dysplasia is caused by mutation in *MSX2*. *Eur J Hum Genet* 11:892-895, 2003.

9. **Gorlin RJ, Cohen MM Jr, Hennekam RCM.**: Syndromes of the Head and Neck. 4th Edition. 2001. Oxford University Press. New York, New York.
10. **Gripp KW, Zackai EH.**: Craniosynostosis syndromes. In: Management of genetic syndromes. 2nd edition. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, USA, 2005.
11. **Jabs EW, Muller U., Li X., Ma L., Luo W., Haworth IS, Klisak I, Sparkes R., Warman ML, Mulliken JB, Snead ML, Maxson R.**: A mutation in the homeodomain of the human MSX2 gene in a family affected with autosomal dominant craniosynostosis. *Cell* 75:443-450, 1993.
12. **Jones LA, Jordan DK, Taysi K., Strauss AW, Toth JK.**: Partial duplication of the long arm of chromosome 5: a case due to balanced paternal translocation and review of the literature. *Hum Genet* 51:37-42, 1979.
13. **Kumar D., Heath PR, Blank CE.**: Clinical manifestations of trisomy 5q. *J Med Genet* 24:180-184, 1987.
14. **Liu YH, Kundu R., Wu L., Luo W., Ignelzi MA Jr, Snead ML, Maxson RE Jr.**: Premature suture closure and ectopic cranial bone in mice expressing Msx2 transgenes in the developing skull. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6137-6141, 1995.
15. **Ma L., Golden S., Wu L., Maxson R.**: The molecular basis of Boston-type craniosynostosis: the Pro148^{His} mutation in the N-terminal arm of the MSX2 homeodomain stabilizes DNA binding without altering nucleotide sequence preferences. *Hum Mol Genet* 5:1915-1920, 1996.
16. **Schott JJ, Benson DW, Basson CT, Pease W., Silberbach GM, Moak JP, Maron BJ, Seidman CE, Seidman JG.**: Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. *Science* 281:108-111, 1998.
17. **Shiihara T., Kato M., Kimura T., Hayasaka K., Yamamori S., Ogata T.**: Craniosynostosis with extra copy of MSX2 in a patient with partial 5q-trisomy. *Am J Med Genet A*. 128:214-216, 2004.
18. **Van Der Burgt CJ, Merkx GF, Janssen AH, Mulder JC, Suijkerbuijk RF, Smeets DF.**: Partial trisomy for 5q and monosomy for 12p in a liveborn child as a result of a complex five breakpoint chromosome rearrangement in a parent. *J Med Genet* 29:739-741, 1992.
19. **Wilkie AO, Tang Z., Elanko N., Walsh S., Twigg SR, Hurst JA, Wall SA, Chrzanowska KH, Maxson RE Jr.**: Functional haploinsufficiency of the human homeobox gene MSX2 causes defects in skull ossification. *Nat Genet* 24:387-390, 2000.
20. **Wysocka B., Brozek I., Wierzba J., Kardas H, Wozniak A., Kowalczyk J., Balcerska A., Limon J.**: Partial trisomy of distal 5q and partial monosomy of Xp as a result of mating between two translocation carriers: a female with a balanced translocation t(X;5)(p11;q31) and a male with a der(13;14)(q10;q10): a case report and a family study. *Ann Génét* 45:143-146, 2002.