

## Chromosom Y w zespole Turnera

Y chromosome in Turner syndrome

<sup>1</sup>Aleksandra Rojek, <sup>2</sup>Karolina Kwasiuk, <sup>1</sup>Monika Obara-Moszyńska, <sup>1</sup>Zofia Kolesińska,  
<sup>1</sup>Marek Niedziela

<sup>1</sup>Klinika Endokrynologii i Reumatologii Dziecięcej, II Katedra Pediatrii, Wydział Lekarski I, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu <sup>2</sup>Studentka kierunku Biotechnologia Kosmetyków i Wybranych Farmaceutyków, Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej, Wydział Przyrodniczo-Techniczny, Uniwersytet Opolski

<sup>1</sup>Department of Pediatric Endocrinology and Rheumatology, 2nd Chair of Pediatrics, Medical Faculty I, Poznan University of Medical Sciences, Poland <sup>2</sup>Student of Biotechnology in Cosmetology, Chair of Biotechnology and Molecular Biology, Faculty of Natural Sciences and Technology, University of Opole

### Streszczenie

Zespół Turnera (ZT, ang. *Turner's syndrome; TS*) jest wrodzoną chorobą genetyczną, spowodowaną aberracjami ilościowymi i/lub strukturalnymi chromosomu X, występuje z częstością 1:1200–1:2500 wśród żywo urodzonych dziewczynek. Do najczęściej spotykanych kariotypów należy monosomia chromosomu X (45,X) (około 50–60% przypadków). U około 5–6% pacjentek może występować nieprawidłowy chromosom Y lub mozaicyzm – obecność linii komórek 45,X współistniejących z linią komórek, w których występuje cały lub część chromosomu Y. U pacjentek z ZT, u których stwierdzono cały lub fragmentaryczny materiał genetyczny pochodzący z chromosomu Y, istnieje istotne ryzyko rozwoju zmian nowotworowych w dysgenetycznych gonadach. Niniejsza praca przeglądowa dotyczy stanu wiedzy na temat materiału genetycznego pochodzącego z chromosomu Y w ZT, w szczególności w aspekcie ryzyka rozwoju zmian nowotworowych typu gonadoblastoma i dysgerminoma.

### Słowa kluczowe

zespół Turnera, mozaicyzm, chromosom Y

### Abstract

Turner syndrome (TS) is an inherited genetic disorder caused by numerical and/or structural chromosome X aberrations occurring at a frequency of 1:1200–1:2500 live-born girls. The most common karyotype is X chromosome monosomy (45,X) (approximately 50–60% of cases). Approximately 5–6% of patients may have abnormal Y chromosome or mosaicism characterized by the coexistence of 45,X cell line with cell line in which all or part of chromosome Y is present. In patients with TS who have all or fragmented genetic material from chromosome Y there is a substantial risk of cancerous lesions in these dysgenetic gonads. This paper stands for the review of the current knowledge on the genetic material of the Y chromosome in TS, especially in view of the risk of developing malignancies such as gonadoblastoma and dysgerminoma.

### Key words

Turner syndrome, mosaicism, Y chromosome

Praca finansowana w ramach Grantu Naukowego dla Młodych Naukowców Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu [nr 502-14-01104118-09627] (dr A. Rojek). Autorzy oświadczają, iż nie korzystali z pomocy innych osób przy pisaniu tego artykułu.

## Wstęp

Dotychczasowe badania sugerują, że występowanie czyścgo kariotypu 45,X może być rzadsze niż wcześniej przypuszczano, ponieważ dzięki zastosowaniu badań molekularnych wykrywane są przypadki posiadające w nawet w niewielkim stopniu sekwencje pochodzące z chromosomu Y [1].

Na prawidłowe określenie dokładnego kariotypu w zespole Turnera oraz możliwość detekcji tzw. mozaicyzmu ukrytego wpływ mogą mieć takie czynniki, jak: rodzaj tkanki, rodzaj i liczba analizowanych komórek czy rodzaj i czułość zastosowanej metody badania, np. FISH [2]. Przykładowo częstość występowania klasycznej monosomii chromosomu X (45,X), przy wykorzystaniu metod cytogenetyki klasycznej, szacuje się na 50–60%. Jednakże dodatkowe wykorzystanie techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* – FISH (ang. *fluorescent in situ hybridization*) redukuje ten odsetek do poziomu 15–20% [3].

## Chromosom Y w zespole Turnera a ryzyko rozwoju zmian nowotworowych

Chromosom Y stwierdza się u około 3–13% pacjentek z ZT. Chore posiadające materiał pochodzący z chromosomu Y są bardziej narażone na wystąpienie cech wirylicacji i rozwoju gonadoblastoma (10–30%) [4–6]. W większości przypadków gonadoblastoma stanowi łagodny nowotwór występujący w dysgenetycznych gonadach, składający się z dwóch lub trzech rodzajów komórek (komórek zarodkowych, ziarnistych oraz z mniejszych komórek nabłonkowych, podobnych do niedojrzałych komórek Sertoliego), które dzielą się w sposób nieprawidłowy i tworzą najczęściej łatwe do wykrycia masy. U ok. 66% pacjentek poszczególne elementy składowe gonadoblastoma są trudne do odróżnienia od komórek Leydiga, pochodzących z męskich gonad, lub też mogą przypominać komórki luteinowe występujące w podścielisku jajnika (ang. *luteinized cells of ovarian stroma*). Leczenie polega na usunięciu chirurgicznym całej gonady ze względu na ryzyko transformacji gonadoblastoma w złośliwą formę guza komórek rozrodczych, najczęściej w nowotwór germinalny (dysgerminoma). Ryzyko tej transformacji u kobiet z dysgenetycznymi gonadami, u których stwierdzono obecność sekwencji pochodzących z chromosomu Y, wynosi około 30% [7].

Ryzyko rozwoju gonadoblastoma rośnie wraz z wiekiem – nowotwór ten rozwija się głównie w drugiej dekadzie życia, aczkolwiek obserwowano rozwój nowotworu również u młodszych dzieci [8]. Zmiany nowotworowe pojawiają się najczęściej w jednej gonadzie, częstość występowania w obu gonadach szacowana jest na 7–10% przypadków [9].

Gravholt i wsp. dowodzą, że częstość rozwoju gonadoblastoma u pacjentek z ZT, u których stwierdzono obecność chromosomu Y, nie jest tak wysoka, jak wcześniej zakładano. U 14 ze 114 pacjentek przebadanych metodą PCR wykryto obecność chromosomu Y, podczas gdy w klasycznym badaniu kariotypu nie stwierdzono obecności tego chromosomu. Siedem pacjentek zostało poddanych zabiegowi profilaktycz-

nej owariektomii przed wykonaniem badań genetycznych, natomiast trzy pacjentki były operowane po otrzymaniu wyników analiz DNA. Badania histopatologiczne wykazały obecność gonadoblastoma u 1 z 10 pacjentek, które zostały poddane temu zabiegowi. Według autorów badań częstość występowania materiału pochodzącego z chromosomu Y u pacjentek z zespołem Turnera jest wysoka (12,2%), aczkolwiek ryzyko rozwoju gonadoblastoma u tych osób jest stosunkowo niskie (7–10%) [10].

Rzeczywiście gonadoblastoma wiąże się z obecnością locus **GBY** (ang. *gonadoblastoma locus on the Y chromosome*; OMIM: 424500) leżącego w obszarze niewielkiego regionu krótkiego ramienia chromosomu Y, w pobliżu regionu centromerowego [1, 9, 11]. Znajdujący się w jego obrębie gen **TSPY** (*Testis-Specific Protein, Y-Linked, 1; TSPY1*) (Yp11.2, OMIM 480100) odpowiada za rozwój gonadoblastoma w gonadach dysgenetycznych, raka jąder i prostaty [12–14]. Jego wysoką ekspresję zaobserwowano u pacjentek z ZT, u których rozwinął się gonadoblastoma [15]. Gen ten występuje w postaci powtarzającego się tandemu rodziny genów [16]. Nie do końca znany jest sposób jego działania, ale na podstawie analizy profilu ekspresji w somatycznych komórkach nowotworowych jak również w guzach zarodkowych wnioskuje się, że jego ekotopowa ekspresja wpływa na komórki w sposób proliferacyjny [17]. Kluczowym czynnikiem odgrywającym decydującą rolę w patogenezie rozwoju gonadoblastoma może być między innymi proliferacja komórek macierzystych oraz inne czynniki, takie jak deregulacja cyklu komórkowego czy ekspresja specyficznych mikroRNA biorących udział w kontroli cyklu komórkowego [17, 18].

Obecność materiału pochodzącego z chromosomu Y może również w istotny sposób modyfikować cechy fenotypowe pacjentek z ZT. Wykładniki kliniczne mogą być więc zróżnicowane: poza nadmiernym owłosieniem i innymi cechami wirylicacji obserwować można różnorodne zaburzenia rozwoju płci (DSD, *disorders of sex development*). W przypadku obecności nadmiernego owłosienia u pacjentki ZT zaleca się sprawdzenie obecności chromosomu Y lub chromosomu markerowego zawierającego fragment pochodzący z chromosomu Y z zastosowaniem technik cytogenetyki molekularnej (FISH) [3].

## Metody wykrywania chromosomu Y

### *Badanie kariotypu metodami cytogenetyki klasycznej*

Metody cytogenetyki klasycznej są standardowo wykorzystywane przy diagnostyce zespołu Turnera i polegają na ocenie 30–50 (czasami 100) metafaz. W badaniu tym najczęściej wykorzystuje się limfocyty krwi obwodowej, jednakże istnieje ryzyko, że linie komórkowe występujące w małym procencie zostaną przeoczone, ponieważ analiza ta wymaga dużej ilości komórek. Badanie kariotypu pozwala na detekcję około 10% przypadków mozaicyzmu oraz materiału z chromosomu Y u 6% chorych z zespołem Turnera [19]. Jeżeli zachodzi duże prawdopodobieństwo wystąpienia mozaiki, pobiera się dodatkowo niewielki fragment skóry pacjentki. Dzięki anali-

zie kariotypu komórek pochodzących z tych dwóch różnych tkanek można jednoznacznie określić obecność mozaicyzmu lub jego brak.

#### Badania molekularne

Do głównych metod służących detekcji materiału z chromosomu Y należą badania molekularne wykorzystujące technikę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* – FISH (ang. *fluorescent in situ hybridization*) oraz reakcję łańcuchową polimerazy – PCR (ang. *polymerase chain reaction*). Są to metody najdokładniejsze, zdecydowanie zwiększające możliwość wykrycia chromosomu Y u pacjentek z ZT [20]. Ponadto niewątpliwą zaletą badań molekularnych jest brak konieczności posiadania dużej ilości materiału wyjściowego do analiz [21]. Dogodnym materiałem do badań molekularnych, poza limfocytami krwi obwodowej, są również inne tkanki organizmu. Ze względu na ryzyko niewykrycia mozaicyzmu w komórkach krwi istnieje możliwość detekcji w komórkach tkanek pochodzących z innych listków zarodkowych, np. z ektodermalnych komórek nabłonka jamy ustnej [19, 22]. Mozaicyzm stwierdza się u 25% pacjentek z ZT [23], natomiast chromosom Y występuje u około 40% z nich. Z kolei według badań López i wsp. problem z porównaniem częstości występowania sekwencji specyficznych dla chromosomu Y u pacjentek z ZT wynika głównie z różnic w liczbie przebadanych pacjentów, częstości mozaicyzmu z prawidłowym lub nieprawidłowym chromosomem X, liczbie przypadków z chromosomem markerowym, rodzaju zastosowanej metody badań (FISH, PCR, metody cytogenetyki klasycznej) u poszczególnych pacjentek oraz z różnic w badanych sekwencjach specyficznych dla chromosomu Y. Wykorzystując metody cytogenetyki klasycznej w połączeniu z badaniami molekularnymi w grupie 50 pacjentek z ZT, autorzy stwierdzili, że częstość sekwencji specyficznych dla chromosomu Y wynosiła 12%, podczas gdy we wcześniejszych badaniach z wykorzystaniem jedynie metod cytogenetyki klasycznej – 2%.

#### Wykrywanie sekwencji specyficznych dla chromosomu Y metodą FISH

FISH to metoda hybrydyzacji *in situ* bezpośrednio na preparacie mikroskopowym, służąca wykryciu określonych sekwencji w obszarze chromosomu, pojedynczej komórki jak również w preparatach histologicznych czy wybranych fragmentach tkanek [24]. W zespole Turnera metoda ta jest wykorzystywana do określenia pochodzenia chromosomu markerowego. Analizy metodą FISH z wykorzystaniem sondy specyficznej dla chromosomu Y wykazały, że odsetek pacjentek z czystą monosomią X jest niższy niż w przypadku klasycznej analizy cytogenetycznej.

#### Wykrywanie sekwencji specyficznych dla chromosomu Y metodą PCR

Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) ma na celu szybką i specyficzną amplifikację (powielenie) wybranego fragmentu DNA. Wysoka czułość, niewielka ilość wyjściowego DNA matrycowego wymagana do reakcji, specyficzność i krótki czas

do uzyskania wyniku – to zalety techniki PCR nad innymi metodami. Uważa się, że reakcja PCR stanowi czulszą metodę wykrywania obecności chromosomu Y w porównaniu do metody FISH. Dzięki wykorzystaniu PCR możliwe jest jego wykrycie aż w 60% przypadków [4]. Chu i wsp. również wykazali, że wykorzystanie reakcji PCR jest zdecydowanie bardziej czułą techniką pod kątem detekcji mozaicyzmu ukrytego w stosunku do klasycznej analizy cytogenetycznej. Z kolei badania Guedes i wsp. wykazały, że u pacjentek z ZT rozmieszczenie materiału genetycznego chromosomu Y może znacząco różnić się w poszczególnych tkankach.

#### Wykrywanie sekwencji zlokalizowanych w ramieniu krótkim chromosomu Y

Do wykrycia sekwencji zlokalizowanych w ramieniu krótkim chromosomu Y (Yp) wykorzystuje się kilka markerów (ryc. 1).

**Locus PAR1 (PABY)** (ang. *pseudoautosomal border of Y*) stanowi region pseudoautosomalny o wysokim podobieństwie do regionu PABX (ang. *pseudoautosomal border of X*) zlokalizowanego na chromosomie X. W jego obrębie znajduje się insercja o długości 170 pz, której brak w regionie PABX. Tę różnicę w długości dwóch *loci* wykorzystuje się w reakcji PCR [25].

**Gen SRY** (ang. *sex determining region of the Y chromosome*) (OMIM 480000), zlokalizowany w krótkim ramieniu chromosomu Y w *locus* Yp11.31, koduje białko pełniące funkcję czynnika transkrypcyjnego, biorącego udział w determinacji płci męskiej. Mutacje w genie SRY wiążą się z wystąpieniem zespołu objawów czystej dysgenезji gonad z męskim kariotypem XY i żeńskim fenotypem (zespół Swyera, ang. *Swyer syndrome, gonadal dysgenesis, XY female type, GDXY*) [26]. U pacjentek, u których stwierdza się jego obecność, konieczne jest jego sekwencjonowanie w celu potwierdzenia lub wykluczenia obecności mutacji.

**Gen AMGL**, kodujący białko amelogeninę, zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu X, a jego homolog znajduje się w pobliżu centromeru na chromosomie Y. Sekwencje obu genów różnią się długością 177pz w zależności od płci, co wykorzystywane jest w reakcji PCR [27].

**Gen ZFY** (ang. *zinc finger chromosome Y*), leżący w *locus* Yp11.31, ulega wysokiej ekspresji u mężczyzn i koduje białko pełniące funkcję czynnika transkrypcyjnego (OMIM ID: 490000) [28]. Funkcję tego genu upatruje się w procesach nowotworowych – jego ekspresję stwierdza się w raku prostaty [29].

#### Wykrywanie sekwencji zlokalizowanych w regionie pericentromerowym chromosomu Y

Do wykrycia sekwencji zlokalizowanych w regionie pericentromerowym chromosomu Y wykorzystuje się kilka sekwencji należących do rodziny sekwencji powtarzających się, takich jak **locus DYZ3** stanowiące powtarzający się monomer o długość 171 pz lub **locus DYS139**.

### Wykrywanie sekwencji zlokalizowanych w ramieniu długim chromosomu Y

Wykrywanie sekwencji zlokalizowanych w ramieniu długim chromosomu Y może objąć sekwencję repetytywną **DYS132** lub **DYZ1**. Są to sekwencje powtarzające się, których specyficzność, ze względu na repetytywny charakter, jest obecnie kwestią dyskusyjną. Sekwencja **DYZ1** zlokalizowana jest w regionie heterochromatyny i może być również wykrywana metodami hybrydyzacyjnymi. Dokładana rola **DYZ1** nie została jeszcze określona, ale wiadomo, że zmiana liczby kopii tego locus (CNV; ang. *copy number variation*) zaburza prawidłową integralność strukturalną i funkcjonalną długiego ramienia chromosomu [30].

### Piśmiennictwo

- Kocova M, Siegel SF, Wenger SL et al. *Detection of Y chromosome sequences in Turner's syndrome by Southern blot analysis of amplified DNA*. Lancet. 1993;342:140-143.
- Procter SE, Watt JL, Lloyd DJ et al. *Problems of detecting mosaicism in skin. A case of trisomy 8 mosaicism illustrating the advantages of in situ tissue culture*. Clin Genet. 1984;25(3):273-277.
- Wojda A, Kołowska J, Łącka K et al. *Aberracje chromosomów płci i mozaikowość komórkowa w zespole Turnera – badania z zastosowaniem FISH*. Gin Pol. 1997;68(2):56-65.
- Mancilla EE, Poggi H, Repetto G et al. *Y chromosome sequences in Turner's syndrome: association with virilization and gonadoblastoma*. J Pediatr Endocrinol Metab. 2003;16(8):1157-1163.
- Słowikowska-Hilczner J. *Patogeneza zmian nowotworowych z komórek płciowych w aspekcie rozwojowym*. Pediatri Endocrinol Diabetes Metab. 2007;13(1):37-42.
- Page DCY. *Chromosome sequences in Turner's syndrome and risk of gonadoblastoma or virilisation*. Lancet. 1994;334:240-248.
- Verp MS, Simpson JL. *Abnormal sexual differentiation and neoplasia*. Cancer Genet Cytogenet. 1987;25:191-218.
- Manuel M, Katayama PK, Jones HW Jr. *The age of occurrence of gonadal tumors in intersex patients with a Y chromosome*. Am J Obstet Gynecol. 1976;124:293-300.
- Bianco B, Lipay M, Guedes A et al. *SRY gene increases the risk of developing gonadoblastoma and/or nontumoral gonadal lesions in Turner syndrome*. Int J Gynecol Pathol. 2009;28:197-202.
- Gravholt CH, Fedder J, Naeraa RW et al. *Occurrence of gonadoblastoma in females with Turner syndrome and Y chromosome material: a population study*. J Clin Endocrinol Metab. 2000;85:3199-3202.
- Tsuchiya K, Reijo R, Page DC et al. *Gonadoblastoma: molecular definition of the susceptibility region on the Y chromosome*. Am J Hum Genet. 1995;57(6):1400-1407.
- Salo P, Kääriäinen H, Petrovic V et al. *Molecular mapping of the putative gonadoblastoma locus on the Y chromosome*. Genes Chromosomes Cancer. 1995;14(3):210-214.
- Arnemann J, Epplen JT, Cooke HJ et al. *A human Y-chromosomal DNA sequence expressed in testicular tissue*. Nucleic Acids Res. 1987;15:8713-8724.
- Zhang JS, Yang-Feng TL, Muller U et al. *Molecular isolation and characterization of an expressed gene from the human Y-chromosome*. Hum Molec Genet. 1992;1:717-726.
- Hildenbrand R, Schröder W, Brude E et al. *Detection of TSPY protein in a unilateral microscopic gonadoblastoma of a Turner mosaic patient with a Y-derived marker chromosome*. J Pathol. 1999;189(4):623-626.
- Schnieders F, Dork T, Arnemann J et al. *Testis-specific protein, Y-encoded (TSPY) expression in testicular tissues*. Hum Mol Genet. 1996;5:1801-1807.
- Li Y, Tabatabai ZL, Lee TL et al. *The Y-encoded TSPY protein: a significant marker potentially plays a role in the pathogenesis of testicular germ cell tumors*. Hum Pathol. 2007;38(10):1470-1481.
- Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M et al. *A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors*. Cell. 2006;124:1169-1181.
- Quilter CR, Taylor K, Conway GS et al. *Cytogenetic and molecular investigations of Y chromosome sequences and their role in Turner syndrome*. Ann Hum Genet. 1998;62(Pt 2):99-106.
- Fisher EM, Beer-Romero P, Brown LG et al. *Homologous ribosomal protein genes on the human X and Y chromosomes: escape from X inactivation and possible implications for Turner syndrome*. Cell. 1990;63(6):1205-1218.
- Nishi MY, Domenice S, Medeiros MA et al. *Detection of Y-specific sequences in 122 patients with Turner syndrome: nested PCR is not a reliable method*. Am J Med Genet. 2002;107(4):299-305.
- Hanson L, Bryman I, Jason PO et al. *Fluorescence in situ hybridization analysis and ovarian histology of women with Turner syndrome presenting with Y-chromosomal material: a correlation between oral epithelial cells, lymphocytes and ovarian tissue*. Hereditas. 2002;137(1):1-6.

### Podsumowanie

Podstawowym badaniem w zespole Turnera jest analiza kariotypu. Duży nacisk kładzie się również na badania nad występowaniem materiału pochodzącego z chromosomu Y u tych pacjentek, m.in. ze względu na związek między jego obecnością a ryzykiem rozwoju zmian nowotworowych. Badania molekularne, w tym wykorzystujące najbardziej nowoczesne technologie, mogą w istotny sposób przyczynić się do szybszej diagnostyki tego zespołu. W aspekcie wspomnianego ryzyka rozwoju nowotworu gonadoblastoma jak również cech hiperandrogenizmu należy rozważyć celowość wykonywania badań molekularnych w kierunku wykrycia obecności chromosomu Y jako części rutynowego procesu diagnostycznego w zespole Turnera.

23. Mendes JR, Strufaldi MW, Delcelo R et al. *Y-chromosome identification by PCR and gonadal histopathology in Turner's syndrome without overt Y-mosaicism*. Clin Endocrinol (Oxf). 1999;50(1):19-26.
24. Wellinghausen N., Wirth B., Poppert S. *Fluorescence in Situ Hybridization for Rapid Identification of Achromobacter xylosoxidans and Alcaligenes faecalis Recovered from Cystic Fibrosis Patients*. J Clin Microbiol. 2006;44(9):3415-3417.
25. Mangs H, Morris BJ. *The Human Pseudoautosomal Region (PAR): Origin, Function and Future*. Current Genomics. 2007;8(2):129-136.
26. Behzadian MA, Tho SP, McDonough PG. *The presence of the testicular determining sequence, SRY, in 46,XY females with gonadal dysgenesis (Swyer syndrome)*. Am J Obstet Gynecol. 1991;165(6 Pt 1):1887-1890.
27. Lattanzi W, Di Giacomo MC, Lenato GM et al. *A large interstitial deletion encompassing the amelogenin gene on the short arm of the Y chromosome*. Hum Genet. 2005;116:395-401.
28. Decarpentrie F, Vernet N, Mahadevaiash SK et al. *Human and mouse ZFY genes produce a conserved testis-specific transcript encoding a zinc finger protein with a short acidic domain and modified transactivation potential*. Hum Mol Genet. 2012;21(12):2631-2645.
29. Tricoli JV, Bracken RB. *ZFY gene expression and retention in human prostate adenocarcinoma*. Genes Chromosomes Cancer. 1993;6(2):65-72.
30. Manz E, Alkan M, Buhler E et al. *Arrangement of DYZ1 and DYZ2 repeats on the human Y-chromosome: a case with presence of DYZ1 and absence of DYZ2*. Mol Cell Probes. 1992;6:257-259.