

MODIFICARI CROMOZOMIALE DE NUMAR INTR-O FAMILIE CU SINDROM AXENFELD-RIEGER

Zorica-Ileana Hertzog¹, R.Hertzog², Mirela Preda³

¹UMF Craiova, Departamentul de Genetic[medical]; ² CCMM Bucure]ti,

³UMF Craiova, Clinica de Oftalmologie,

Rezumat

Sindromul Axenfeld-Rieger (ARS) este o boal[de morfogenez[cu transmitere autozomal-dominant[. ARS este legat genetic la locii 4q25, 6p25]i 13q14. Lucrarea noastr[a efectuat un studiu citogenetic la trei surori]i la mama acestora, diagnosticate clinic cu ARS,]i a procedat la analiza genealogic[a familiei pe 5 genera]ii. Examenul citogenetic a eviden]iat trisomia 6]i 16, monosomia 13, un cromozom marker mic, care au etalat frecven]e diferite la pacientele investigate. Aceste abera]ii cromozomiale numerice implic[muta]ii genice corespunz[toare care conduc la diferite manifest[ri clinice ce caracterizeaz[ARS. Trisomia 6 observat[la toate cele trei surori, poate fi considerat[r]spunz[toare de glaucomul congenital, iar @mpreun[cu celelalte modific[ri cromozomiale contribuie la eterogenitatea sindromului. De asemenea, propor]iile diferite ale modific[rilor cromozomiale pot fi r]spunz[toare de penetran]a incomplet[a transmiterii autozomal-dominante pe care am constatat-o la aceast[familie.

Cuvinte cheie: glaucom congenital, cromozom marker, trisomia 6, monosomia 13

INTRODUCERE

Sindromul Axenfeld - Rieger (SAR) este o tulburare de morfogenez[cu transmitere autozomal-dominant[. SAR are o heterogenitate fenotipic[, caracterizat[prin malforma]ii ale ochilor, din]ilor]i ombilicului. Caracteristica cea mai important[a SAR este glaucomul care se dezvolt[la aproximativ 50% dintre indivizii afecta]i. De asemenea, hipoplazia irisului, corectopia]i policoria apar frecvent @n acest sindrom (1, 3, 7).

SAR este, de asemenea, heterogen[genetic fiind legat[la locii 4q25, 6p25]i 13q14. Locusul 4q25 codific[un factor de transcrip]ie cu homeodomeniu PITX2, iar cele mai multe muta]ii apar @n homeodomeniul genei (3, 10). Locusul 6p25 codific[factorul de transcrip]ie FOXC1 , iar muta]iile lui au fost g]site @n anomalia Axenfeld-Rieger care are fenotipul ARS dar f[r] factorii sindromici (7, 9). 13q14 este un alt locus afectat pentru sindromul Rieger, dar produsul celular al acestei gene nu a fost @nc[identificat. Un al patrulea locus pentru sindromul Rieger a fost recent identificat pe cromozomul 11. Acesta codific[PAX6, un alt factor de transcrip]ie care are domenii pereche (10).

Gena PITX2 se exprim[foarte timpuriu @n dezvoltarea din]ilor. Expresia PITX2 se men]ine specific[la nivelul epiteliului oral, cu limitare progresiv[@n placodele dentare, urmat[de o expresie puternic[@n lamina dentar[]i @n nodul de smal] din primordiile embrionare ale din]ilor (1, 6, 10).

Identificarea genelor implicate @n anomaliiile umane poate stipula informa]ii importante despre procesele de dezvoltare]i sugera oportunit[]i pentru sfatul genetic]i, de asemenea, poate permite formularea unor strategii terapeutice (11).

Lucrarea noastră @]i propune să realizeze o investigație citogenetică la o familie cu sindrom Axenfeld-Rieger @n scopul detectării unor modificări cromozomiale care să se coreleze cu mutațiile genelor r[spunzătoare de manifestările clinice ale acestui sindrom.

MATERIAL ȘI METODE

Obiectul studiului nostru l-au constituit trei surori și mama acestora. Examenul oftalmologic a fost extins la @ncă jase membri ai familiei pe cinci generații, fapt ce a permis alcătuirea arborelui genealogic (fig.1).

Examenul oftalmologic a relevat SAR la toate cele trei surori, anomalie Axenfeld la 2-IV, cecitate de la vârsta de 30 de ani la 2-I, 3-I și 4-I și scăderea vederii asociată cu o anomalie oculară la 2-II.

Pentru analiza cromozomilor au fost efectuate culturi de leucocite care au fost crescute @n mediu MEM cu 10% ser de vitel @n prezență de PHA-M și antibiotice. Prepararea cromozomilor a cuprins blocarea metafazelor cu colcemid, hipotonia cu KCl 0,075 M, fixarea cu un amestec de metanol și acid acetic glacial (3:1). Colorarea lamelor a fost făcută prin bandare G (5). Microscopic au fost analizate, pentru fiecare caz, 50 de metafaze și au fost cariotipate 5 metafaze.

REZULTATE

Prezentarea cazurilor investigate

Cazul 1-V, @n vârstă de 5 ani, a prezentat glaucom congenital, nistagmus orizontal, pupilă mare deformată, ovalară @n plan orizontal, iris atrofic (fig.2). Cazul 2-V, @n vârstă de 4 ani, a prezentat glaucom congenital, linie Schwalbe, iris atrofic și pupilă @n excavație. Cazul 3-V, @m vârstă de 10 luni, a prezentat glaucom congenital, buftalmie, linie Schwalbe, pupilă deformată și iris atrofic. Cazul 2-IV, @n vârstă de 26 de ani, a prezentat numai anomalie Axenfeld, asociată cu glaucom congenital apărut mai târziu, linie Schwalbe la care au fost atașate bride iriene și, de asemenea, pupilă @n excavație.

Analiza cariotipului

Analiza cromozomilor mitotici și a cariotipurilor obținute de la 2-IV au relevat cariotipuri normale 46,XX cu o rată de 86% și cariotipuri patologice de 14%. Cu o frecvență de 7% a apărut un cromozom marker, 47,XX,+mar (fig.3), iar @n 7% din metafaze, cromozomul +mar a fost @nsoțit de trisomia 16.

Analiza citogenetică la 1-V a evidențiat, de asemenea, cariotipuri normale (82%) și patologice (18%). 8% din metafaze au etalat un cromozom marker, 6% trisomia 6, 47,XX,+6 (fig.4) și 4% monosomia 13 care a fost asociată cu un cromozom marker, (46,XX,-13,+mar) (fig. 5).

La cazul 2-V, examenul citogenetic a evidențiat, de asemenea, cariotipuri normale și patologice @ntr-o proporție de 84%, respectiv 16%. Cariotipurile patologice au inclus cromozom marker (8%), trisomia 6 (47,XX,+6) (4%) și trisomia 16 (47,XX,+16) (4%).

La cazul 3-V am identificat trisomia 6 (47,XX,+16) @n 10% din metafazele examinate și cromozom marker @n 8%.

Rieger a sugerat heterogenitatea sindromului Rieger prin identificarea diferitelor aberații cromozomiale care implică deleții/translocările ce afectează cromozomii 4q, 6p, 13q, asociate ocazional cu trisomia/monosomia 9, 16, 18, 20 și 21. Caracteristicile clinice ale sindromului au fost asociate cu anomalii ale

cromozomilor 4, 6, 10, 13, 16 și 22 (2). Locusul cel mai comun pentru aberațiile cromozomiale asociate cu sindromul Rieger este 4q25. Pacienții cu glaucom congenital primar au aberații cromozomiale ce implică cromozomul 6p25 (2). Câteva studii au arătat legătura anormalităților segmentului anterior al ochilor la aceeași regiune a cromozomului 6. Aceste anormalități includ anomalia Axenfeld, anomalia Rieger, iridogoniodisgenezie și iridogoniodisplazie cu glaucom familial.

Studiul punctelor de ruptură a relevat mutații în gena pentru factorul de transcripție "forkhead" (FOXC1) la doi pacienți cu glaucom congenital primar și, de asemenea, la pacienți cu anomalie Axenfeld, anomalie Rieger și hipoplazia irisului (2).

Este clar acum că mutațiile aceleși gene pot rezulta în diferite fenotipuri. Un mod interesant, mutațiile care cresc transactivarea de către PITX2 par să producă disgenezii severe, iar o duplicație care implică FOXC1 se asociază cu glaucom sever într-o familie (4). Astfel, trisomia 6, observată de noi la cele trei surori, poate fi răspunzătoare de glaucom cu disgenezia segmentului anterior, gena FOXC1 exprimându-se în perioada embrionară sub formă trisomică. De asemenea, există posibilitatea existenței altor gene care interacționează cu gena mutantă cunoscută pentru a modifica fenotipul și care au diferite alele la diferiți pacienți. Trisomia 16 este un exemplu în acest sens. Pe cromozomul 16 se află mai multe gene care sunt active în stadiile embrionare de dezvoltare; astfel, este gena CBP (16p13.3) care joacă un rol în reglarea creșterii și diferențierea celulară (8).

Deși analizele moleculare au adus informații importante cu privire la originea, tipul mutațiilor genice răspunzătoare de manifestările clinice și la modelul lor de transmitere, analiza citogenetică rămâne esențială. Deși sindromul Axenfeld-Rieger este bine studiat la nivel molecular, analiza citogenetică, efectuată de noi, evidențiază pentru prima dată un cromozom marker de mărime mică, prezent atât la mamă cât și la fiice. Este foarte probabil ca acest marker să reprezinte o restructurare a unor fragmente cromozomiale scurte, rezultate din microleziuni.

Trisomiile 6 și 16 și monosomia 13, prezente în procente relativ scăzute în cariotipurile cazurilor investigate, reprezintă erori de disjuncție a cromozomilor în mitoză, într-un anumit stadiu de dezvoltare embrionară.

Analiza genealogică a defectelor segmentului anterior și a glaucomului arată o condiție autozomal-dominantă cu penetranță incompletă. Deși uneori s-a considerat a fi o simplă condiție recesivă, atât cazurile de non-penetranță cât și cele de expresivitate variabilă au subliniat faptul că glaucomul congenital primar (PCG) este o trăsătură multifactorială, iar genele PCG pot cauza în mod evident disgenezii ale segmentului anterior.

Studiul modelelor de joareci cu mutații în genele implicate în dezvoltarea segmentului anterior arată că glaucoamele asociate cu malformații ale segmentului anterior al ochiului sunt trăsături complexe multifactoriale (4).

Așadar, glaucomul congenital și alte anomalii ale segmentului anterior al ochiului sunt cauzate de interacțiuni multigenice, frecvent asociate cu aberații cromozomiale de număr.

Prezența cromozomului marker (mar?) la mamă și la fiice sugerează, pe de o parte, ereditatea lui, iar, pe de altă parte, posibila existență în structura lui a unor mutații genice răspunzătoare de dezvoltarea segmentului anterior al ochilor.

BIBLIOGRAFIE

1. Amendt B.A., Sutherland L.B., Semina E.V., Russo A.F., (1998) The molecular basis of Rieger syndrome - Analysis of PITX2 homeodomain protein activities, *J Biol Chem.*, 273, 32, 20066-20072.
2. Amendt B.A., Semina E.V., Alward L.M., (2000), Rieger syndrome: A clinical, molecular, and biochemical analysis, *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, 57: 1652-1666.
3. Espinoza H.M., Cox C.J., Semina V., Amendt B.A., (2002), A molecular basis for differential developmental anomalies in Axenfeld-Rieger syndrome, *Hum. Mol. Genet.*, 11, 7: 743-753.
4. Gould D.B., John S.W.M., (2002) Anterior segment dysgenesis and the developmental glaucomas are complex traits, *Hum. Mol. Genet.*, 11, 10: 1185-1193.
5. Hertzog Z.I., (1998) Genetic[uman[- Principii [i metode. Ed. Sitech Craiova.
6. Hjalt T.A., Semina E.V., Amendt B.A., Murray J.C., (2000), The PITX2 protein in mouse development, *Developmental dynamics*, 218: 195-200.
7. Kozlowski K. and Walter M.A. (2000) Variation in residual PITX2 activity underlies the phenotypic spectrum of anterior segment developmental disorders. *Hum Mol Genet* 2000; 9, 14: 2131-2139
8. Lacombe D., (2000), Maladies des gènes du développement, *Médecine/Sciences*, 16, 3: 354-362.
9. Ozeki H., Shirai Sh., Ikeda K., Ogura Y., (1999), Anomalies associated with Axenfeld-Rieger syndrome, *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.*, 237: 730-734.
10. Saadi I., Semina E.V., Amendt B.A., Harris D.J., Murphy K.P., Murray J.C., Russo A.F., (2001), Identification of a dominant negative homeodomain mutation in Rieger syndrome, *J Biol Chem.*, 276, 25: 23034-23041.
11. Semina E.V., Reiter R., Leysens N.J., Alward W.L.M., Small K.W., Datson N.A., et al., (1996), Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome, *Nat. Genet.*, 14, 392-399.

Adresa pentru coresponden\[:
 Prof. univ. Zorica Ileana Hertzog
 Univ. de Medicin[]i Farmacie Craiova
 Str. Petru Rare] nr.4
 1100- Craiova, Dolj
 E-mail: zhertzog@yahoo.com

LISTA FIGURILOR

- Fig. 1 Pedigriul familiei investigate.
- Fig. 2 Imagine biomicroscopică (Cazul 1-V).
- Fig. 3 Cariotip 47,XX, +mar(?) (cazul 2-IV).
- Fig. 4 Cariotip 47, XX, +6 (cazul 1-V).
- Fig. 5 Cariotip 46,XX,-13,+mar (cazul 1-V).

NUMERICAL CHROMOSOMAL ABNORMALITIES IN FAMILY WITH AXENFELD-RIEGER SYNDROME

Zorica-Ileana Hertzog¹, R.Hertzog², Mirela Preda³

¹UMF Craiova, Department of Medical Genetics; ²CCMM Bucharest, ³UMF Craiova, Clinic of Ophthalmology, Romania

Address for correspondence and reprints: e-mail:zhertzog @yahoo.com / Prof. Zorica Hertzog, University of Medicine and Pharmacy Craiova, str. P. Rares Nr. 4 Craiova - 1100 Romania

This study was supported by University of Medicine and Pharmacy Craiova - Romania

Abstract

Axenfeld-Rieger syndrome (ARS) is an autosomal dominant disorder of morphogenesis. ARS has been genetically linked to loci at chromosomes 4q25, 6p25 and 13q14. Our work has performed a cytogenetic study on three sisters and their mother, clinically diagnosed with ARS, and made the genealogical analysis of the family on 5 generations. The cytogenetic examination emphasized trisomy 6 and 16, monosomy 13, a small marker chromosome that exhibited different frequencies at the investigated patients. These numerical aberrations involve genic mutations that lead to clinical different manifestations of ARS. Trisomy 6 observed on all three sisters can be considered responsible for congenital glaucoma and together with the other chromosomal abnormalities contribute to ARS heterogeneity. Also, the different proportions of chromosomal abnormalities can be responsible for the incomplete penetrance of the autosomal dominant transmission that we have established in this family.

Key words: congenital glaucoma, marker chromosome, trisomy 6, monosomy 13

INTRODUCTION

Axenfeld-Rieger syndrome is an autosomal dominant disorder of morphogenesis. ARS is a phenotypically heterogeneous disorder characterized by malformations of the eyes, teeth and umbilicus. The most important ocular feature of the Axenfeld-Rieger syndrome is glaucoma which develops in ~ 50% of affected individuals. The iris hypoplasia, corectopia and polycoria also occur frequently in this syndrome [1,3,7].

ARS has been genetically linked to loci at chromosomes 4q25, 6p25, 13q14. The locus 4q25 encodes the homeodomain transcription factor PITX2 and the most mutations, that are substitutions, occur in the gene homeodomain [3, 10]. The chromosomal locus 6p25 encodes a forkhead-like transcription factor FOX-C1 and its mutations have also been found in Axenfeld-Rieger anomaly which has the ocular phenotype of ARS but without the syndromic feature [7,9]. 13q14 is another affected locus for Rieger syndrome, but the cellular product of this gene has not been identified yet. A fourth locus for the Rieger syndrome has recently been

identified on chromosome 11. This locus encodes the paired-like transcription factor PAX6 [10].

The Pitx2 gene is expressed very early during tooth development in the tooth bud epithelium. The Pitx2 expression remains specific to the oral epithelium with a progressive restriction to the dental placodes, followed by a high level expression in the dental lamina and enamel knot in the embryonic tooth promordia [1, 6, 10].

The identification of genes involved in human anomalies can provide important information about the basic developmental processes and suggest opportunities for genetic counseling and therapeutic strategies. There have also been identified a number of genes that play a role in both normal and abnormal human facial development and these provide the first clues to how these genes and environmental factors act in concert to create the human face [11]. Our work aims to perform a cytogenetic investigation on a family with Axenfeld-Rieger syndrome in order to detect certain chromosomal changes which correlates with the mutations of the genes responsible for the clinical manifestations of this syndrome.

MATERIAL AND METHODS

The object of our study consists of three sisters and their mother. The ophthalmologic examination has been extended at other six members of the family during five generations permitting the analysis of the pedigree of ARS in this family (fig. 1).

The ophthalmologic examination has emphasized that 2-IV presented Axenfeld anomaly and 2-I, 3-I, 4-I presented cecity since 30 years old. On the other hand, 2-II manifested an ocular affection accompanied by an essential sight diminishing.

To analyse the chromosomes we have performed lymphocyte cultures that have been grown for 3 days in an MEM culture medium with 10% fetal calf serum, PHA-M, penicillin (5000 IU/ml) and streptomycin (5000 µg/ml).

The chromosomal preparations and G banding have been made according to the methods described by Hertzog [5].

RESULTS

Presentation of cases

The case 1-V, 5 years old, presented congenital glaucoma, horizontal nistagmus, a large deformed pupil, iris hypoplasia (fig.2). The case 2-V, 4 years old, presented congenital glaucoma, Schwalbe's line anteriorly displaced, iris hypoplasia, and pupil in excavation. The case 3-V, 10 months old, showed congenital glaucoma, buffalmy, Scwalbe's line, iris hypoplasia and deformed pupil. The case 2-IV, 26 years old, presented only Axenfeld anomaly associated with congenital glaucoma appeared later, Schwalbe's line to which straps of iris and pupil in excavation were added.

The Karyotype Analysis

The analysis of chromosomes and karyotypes obtained from the case 2-IV emphasized normal and abnormal karyotypes that occurred at rates of 86%, and 14% respectively. With a frequency of 7% a marker chromosome appeared, 47,XX,+mar (fig.3). In 7% of metaphases, the marker chromosome was accompanied by the trisomy 16.

The cytogenetic analysis in the case 1-V exhibited normal (82%) and abnormal karyotypes (18%). 8% of the examined metaphases showed a marker chromosome, 6% trisomy 6 (47,XX,+6)(fig.5).

In the case 2-V, the cytogenetic examination also revealed normal and abnormal karyotypes in a proportion of 84% and 16%, respectively. The abnormal karyotypes included a marker chromosome (8%), the trisomy 6 (47,XX+6) (4%) and trisomy 16 (47,XX,+16) (4%).

In the case 3-V, we identified a marker chromosome (8%) and the trisomy 6 (47,XX,+6) (10%)

DISCUSSION

Rieger has suggested the heterogeneity of the Rieger syndrome by identifying the various chromosomal abnormalities which imply deletions that affect chromosomes 4q, 6p, 13q, occasionally associated with trisomy / monosomy 9, 16, 18, 20 and 21. The clinical features of the syndrome are linked with abnormalities of chromosomes 4, 6, 10, 13, 16 and 22 (2). The most locus for the chromosomal abnormalities associated with the Rieger syndrome is 4q25. The patients with primary congenital glaucoma have chromosomal abnormalities involving chromosome 6p25 [2]. Several studies have shown linkage of anterior segment abnormalities to the same region of chromosome 6. These abnormalities include Axenfeld anomaly, Rieger anomaly, iridogoniodysgenesis anomaly, and familial glaucoma iridogoniodysplasia.

The breakpoint study revealed mutations in the forkhead transcription factor (FOXC1) gene in the two patients with primary congenital glaucoma and also patients with Axenfeld anomaly, Rieger anomaly and iris hypoplasia [2].

Now it is clear that mutations in the same gene can result in different phenotypes. Interestingly, the mutations that increase transactivation by PITX2 seem to cause severe dysgenesis and a duplication involving FOXC1 associated with severe glaucoma in one family [4]. Thus, trisomy 6, observed at the three sisters, can be responsible for glaucoma with the anterior segment dysgenesis. Also, there is the possibility that other genes interact with the known mutant gene to modify the phenotype and that different patients have different alleles of these modified genes. Trisomy 16 is an example in this case. Trisomy 16 was singular or associated with other chromosomal aberrations. On 16 chromosome there are many genes that are active in the embryonic development stages, such as CBP gene (16p13.3) that play a role in the growth regulation and in cellular differentiation [8].

Although the molecular analyses supplied important informations regarding the origin and type of the gene mutations responsible for these clinical features and their transmission model, the cytogenetic analysis remains essential. The results of our cytogenetic study emphasize, for the first time, the presence of a small marker chromosome at mother and daughters, although the Axenfeld-Rieger syndrome is well studied.

The genealogical analysis of the anterior segment flows and of glaucoma in our family shows an autosomal dominant condition with an incomplete penetrance. Although sometimes the congenital glaucoma was considered a simple recessive condition, cases of both non-penetrance and variable expressivity emphasized that primary congenital glaucoma (PCG) is multifactorial, and PCG genes can cause obviously anterior segment dysgenesis.

The study of mouse models with mutations in the development of anterior segment genes shows that the glaucoma and the abnormalities of the anterior segment of the eye are multifactorial complex features (4).

Consequently, the congenital glaucoma and the other abnormalities of the anterior segment of the eye are frequently associated with chromosome numerical abnormalities.

Presence of this marker chromosome at mother and daughters suggests, on one hand, its heredity and, on the other hand, the existence of some gene mutations in its structure responsible for the development of the the anterior segment of the eye.

REFERENCES

1. Amendt B.A., Sutherland L.B., Semina E.V., Russo A.F. (1998), The molecular basis of Rieger syndrome - Analysis of PITX2 homeodomain protein activities, *J Biol Chem.*, 273, 32, 20066-20072.
2. Amendt B.A., Semina E.V., Alward L.M., (2000), Rieger syndrome: A clinical, molecular, and biochemical analysis, *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, 57: 1652-1666.
3. Espinoza H.M., Cox C.J., Semina V., Amendt B.A., (2002), A molecular basis for differential developmental anomalies in Axenfeld-Rieger syndrome, *Hum. Mol. Genet.*, 11, 7: 743-753.
4. Gould D.B., John S.W.M., (2002) Anterior segment dysgenesis and the developmental glaucomas are complex traits, *Hum. Mol. Genet.*, 11, 10: 1185-1193.
5. Hertzog Z.I., (1998) Genetic[uman[- Principii]i metode. Ed. Sitech Craiova.
6. Hjalt T.A., Semina E.V., Amendt B.A., Murray J.C., (2000), The PITX2 protein in mouse development, *Developmental dynamics*, 218: 195-200.
7. Kozlowski K. and Walter M.A. (2000) Variation in residual PITX2 activity underlies the phenotypic spectrum of anterior segment developmental disorders. *Hum Mol Genet* 2000; 9, 14: 2131-2139
8. Lacombe D., (2000), Maladies des gènes du développement, *Médecine/Sciences*, 16, 3: 354-362.
9. Ozeki H., Shirai Sh., Ikeda K., Ogura Y., (1999), Anomalies associated with Axenfeld-Rieger syndrome, *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.*, 237: 730-734.
10. Saadi I., Semina E.V., Amendt B.A., Harris D.J., Murphy K.P., Murray J.C., Russo A.F., (2001), Identification of a dominant negative homeodomain mutation in Rieger syndrome, *J Biol Chem.*, 276, 25: 23034-23041.
11. Semina E.V., Reiter R., Leysens N.J., Alward W.L.M., Small K.W., Datson N.A., et al., (1996), Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome, *Nat. Genet.*, 14, 392-399.

Axenfeld-Rieger syndrome and congenital glaucoma
Axenfeld anomaly
Ocular affection and cecity
Ocular affection with essential sight diminishing

THE LIST OF FIGURES

- Fig. 1 The pedigree of the investigated family.
Fig. 2 The biomicroscopie image (the case 1-V).
Fig. 3 Karyotype 47,XX,+mar (?) (the case 2-IV).
Fig. 4 Karyotype 47,XX,+6 (the case 1-V).
Fig. 5 Karyotype 46,XX,-13,+mar (?) (the case 1-V).