

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ, FARMACIE, ȘTIINȚE ȘI TEHNOLOGIE
„GEORGE EMIL PALADE” DIN TÂRGU MUREȘ

ȘCOALA DE STUDII DOCTORALE

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Studiul mutațiilor genetice la pacienții cu dizabilitate intelectuală și anomalii congenitale multiple

Doctorand **Alina Bogliș**

Conducător de doctorat **Prof. dr. Claudia Violeta Bănescu**

TÂRGU MUREȘ 2023



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ,
FARMACIE, ȘTIINȚE ȘI TEHNOLOGIE
„GEORGE EMIL PALADE”
DIN TÂRGU MUREȘ

Introducere

Dizabilitățile intelectuale sunt un grup de tulburări de neurodezvoltare, eterogen, caracterizate prin deficitul funcției intelectuale și al comportamentului adaptativ, debutul având loc în perioada de dezvoltare. Întrucât, factorii genetici reprezintă cauza principală a tulburărilor de neurodezvoltare sunt necesare ghiduri și strategii de screening eficiente cu ajutorul tehnicilor de genetică moleculară pentru pacienții din România diagnosticați cu dizabilitate intelectuală (DI) sau tulburare globală de dezvoltare și anomalii congenitale multiple (ACM). Odată cu dezvoltarea noilor tehnici moleculare, precum hibridizarea fluorescență in situ (FISH), tehnica de tip multiplex cu amplificare dependentă de probă (MLPA) și hibridizarea genomică comparativă (CGH), a fost posibilă identificarea mutațiilor genetice de tipul variațiilor numărului de copii (CNV-uri) care a dus la înțelegerea mecanismelor de producere a tulburărilor de neurodezvoltare, însă analiza de secvențiere de nouă generație (NGS) ne oferă mai multe informații privind variantele genice. Aceste CNV-uri reprezintă principala cauză a multor sindroame cu microdeleții și microduplicații recurente și reprezintă factorul de risc pentru alte tulburări de neurodezvoltare, cum ar fi tulburările din spectrul autist, schizofrenia, deficitul de atenție și hiperactivitate, și altele.

Obiective generale

Obiectivul principal al tezei este analiza și estimarea frecvenței mutațiilor genetice de tipul CNV-urilor la pacienții pediatrici cu DI/tulburare globală de dezvoltare asociată cu ACM folosind tehnica MLPA, respectiv caracterizarea CNV-urilor. Totodată, ne-am propus să confirmăm cazurile pozitive folosind alte kit-uri MLPA de „follow-up”, specifice pentru regiunile cu CNV-uri detectate, respectiv testarea părinților. De asemenea, ne-am propus să evaluăm utilitatea clinică a tehnicii MLPA în vederea identificării etiologiei DI într-un laborator mediu dotat din România, respectiv de optimizare a diagnosticului molecular și propunerea unui algoritm de testare pentru acești pacienți. Un alt obiectiv a fost să evaluăm caracteristicile citogenetice, moleculare și fenotipice în diagnosticul DI și ACM asociate prin studii de caz mai deosebite/exceptionale, respectiv revizuirea literaturii.

Studiul 1. Studiul CNV-urilor prin tehnica MLPA la copii cu dizabilitate intelectuală sau tulburare globală de dezvoltare și anomalii congenitale multiple

Tehnica MLPA și analiza CNV-urilor au fost efectuate la 142 de pacienți incluși în studiu cu DI/tulburare globală de dezvoltare și ACM (cariotip normal și cei cu cromozom marker, heteromorfisme cromozomiale, fiind excluse sindroamele Prader-Willi, DiGeorge, Williams), utilizându-se unul dintre kit-urile SALSA® MLPA® P064 și P245 (de la MRC Holland) pentru sindroame cu microdeleție/microduplicație specifice, iar cazurile pozitive au fost confirmate cu kit-uri MLPA „follow-up”, în funcție de modificarea detectată. De asemenea, a fost posibilă și caracterizarea unor anomalii cromozomiale (de exemplu, cromozomii marker). Rata de detecție inițială a CNV-urilor pentru sindroamele „clasice” de microdeleție/microduplicație în studiul nostru este 9,85% (14/142 pacienți), respectiv 7,74% după confirmarea a 11 din CNV-urile evidențiate. Dintre acestea, amintim sindromul Phelan-McDermid, sindromul Miller-Dieker, Koolen-de-Vries, sindroamele de microduplicație 15q11.2q13.1, 3q29, 1p36.32 și sindromul Emanuel. Analiza statistică a evidențiat o corelare semnificativ statistică între prezența CNV-urilor și epilepsie, fără alte corelații între CNV-uri și celelalte caracteristici clinice evaluate. Testarea părinților a fost posibilă în șase cazuri cu CNV-uri având rezultate normale, CNV-uri interpretate ca fiind *de novo*.

Studiul 2. Studiul rearanjamentelor subtelomerice prin tehnica MLPA la pacienții cu DI sau tulburare de dezvoltare globală idiopatică și analiza literaturii

În acest studiu au fost incluși 142 de pacienți cu DI/tulburare de dezvoltare globală idiopatică cu/fără ACM (pacienții cu rezultat negativ la primul studiu, cariotip normal, prezența cromozomilor marker, heteromorfisme cromozomiale). Pentru identificarea rearanjamentelor subtelomerice am utilizat tehnica MLPA folosind kit-uri specifice pentru regiunile subtelomerice, iar confirmarea cazurilor cu CNV-uri identificate s-a realizat cu kit-uri MLPA „follow-up” disponibile de la MRC Holland. Rata de detecție a CNV-urilor la pacienții incluși în studiu folosind combinația de kit-uri MLPA P036 și P070 este 13,38% (19 cazuri), dintre acestea 68,42% fiind microdeleții, respectiv 9,85% cazuri confirmate (14 cazuri), astfel, tehnica MLPA fiind o abordare potrivită pentru diagnosticul de primă etapă a pacienților cu DI/tulburare globală de dezvoltare idiopatică cu/fără ACM, cu randament ridicat și cost redus. În ceea ce privește evaluarea vârstei, sexului și a fenotipului pacienților incluși în lot în funcție de prezența CNV-urilor nu am găsit o corelare statistică ($p < 0.05$). După efectuarea analizei

parentale, într-un caz s-a stabilit originea maternă a CNV-ului, restul CNV-urilor au fost interpretate *de novo*.

Studiul 3. Caracteristicile citogenetice, moleculare și fenotipice ale pacienților cu DI și ACM: studii de caz

În acest studiu am evaluat caracteristicilor citogenetice, moleculare și fenotipice a cinci cazuri cu tulburare în dezvoltarea globală sau DI cu/fără ACM și compararea acestora cu rezultate similare din literatură, cu ajutorul unor combinații de teste genetice. Pentru cazul 1 am caracterizat cromozomul marker supranumerar (sSMC) derivat din cromozomul 22 evidențiat prin cariotip ce caracterizează sindromul Emanuel la un pacient cu DI și anomalie cardiacă congenitală, utilizând doar combinații de kit-uri MLPA. Pentru cazul 2, prin utilizarea analizei convenționale în combinație cu analiza aCGH, am reușit să identificăm duplicația 2q11.2q14.3 în mozaicism, în stare heterozigotă, *de novo*, derivată dintr-un sSMC. În cel de-al treilea caz cu craniosinostoză și DI asociată cu ajutorul tehnicii MLPA și analiza de secvențiere Sanger am identificat mutația c.749C>G a genei *FGFR3*, mutație specifică sindromului Muenke. Pentru ultimele două cazuri, prin utilizarea tehnicilor MLPA, aCGH și analiza NGS am identificat și caracterizat modificările responsabile de apariția sindromului Pitt-Hopkins, respectiv sindromul OPHN1 la o familie cu DI și tulburări de comportament.

Concluzii generale

Prin aplicarea criteriilor de selecție mai stricte și utilizarea de kit-uri MLPA combinate (P245, P064, P036, P070) am obținut o rată de diagnostic cumulată a CNV-urilor de 17,34% (30/173) a cazurilor cu DI sau tulburare globală de dezvoltare și ACM. De asemenea, utilizarea mai multor kit-uri MLPA „follow-up” permite identificarea și validarea rearanjamente cromozomiale rare. Cele mai frecvente CNV-uri detectate interesează regiunea cromozomială 22q13, urmată de regiunile 17p13.3p13.3, 1p36.3, 15q11.2, 10q26.2q26.3 și 11q24.3q25. Nu există corelații semnificativ statistice între prezența CNV-urilor detectate și caracteristicile demografice și trăsăturile clinice, cu excepția epilepsiei. Am diagnosticat primul caz de microduplicație 3q29 la un copil din România. De asemenea, pentru prima dată în literatură am descris cazul unui pacient cu sindrom Phelan-McDermid cu hiperparatiroidism primar, precum și un caz rar de microdeleție 18q21.2q22.1 (sindrom Pitt-Hopkins), diagnosticat prin tehnica MLPA în asociere cu tehnici moleculare avansate (aCGH, NGS). Analiza citogenetică nu trebuie neglijată în diagnosticul dizabilității intelectuale cu/fără anomalii congenitale asociate, care poate detecta anomalii cromozomiale structurale ce nu pot fi evidențiate prin tehnologii avansate bazate pe microrețele (aCGH, SNP-array) sau NGS, însă pot determina dimensiunea precisă și caracterizarea anomaliei implicate. Aplicarea de teste combinate citogenetice și moleculare contribuie nu doar la creșterea ratei de diagnostic în rândul pacienților cu DI și ACM, ci și la o gestionare corespunzătoare a cazurilor, respectiv prevenirea apariției de noi cazuri printr-un sfat genetic corect acordat. În lipsa tehnologiilor bazate pe microrețele (aCGH, SNP-array), tehnica MLPA este o tehnică de „încredere” și ieftină, ușor de aplicat și interpretat, care ar putea fi utilizată de primă intenție pentru pacienții cu DI și tulburare globală de dezvoltare cu/fără ACM.

Originalitatea tezei

Ținând cont de numărul limitat de studii efectuate în România referitor la analiza modificărilor genetice de tipul CNV-urilor la pacienții cu DI și ACM prin tehnica MLPA, teza de doctorat are o notă crescută de originalitate prin utilizarea mai multor combinații de kit-uri MLPA (P064, P245, P036, P070) și de „follow-up” pentru o mai bună caracterizare moleculară a CNV-urilor detectate, selecția mai strictă a pacienților în loturile studiate și prin efectuarea analizei parentale. Un alt aspect original este reprezentat de includerea unor studii de caz cu mutații genetice rare fiind singurele cazuri publicate la nivel național folosind tehnica MLPA, cum este cazul sindromului Emanuel. Aplicarea unor investigații genetice complementare (NGS) a permis identificarea variantei cu semnificație incertă în gena *NEDD4L* prezentă în cazul sindromului Pitt-Hopkins, posibil responsabilă de tabloul clinic complex la acest pacient. Pentru prima dată în literatură am descris cazul unui pacient cu sindrom Phelan-McDermid cu hiperparatiroidism primar, dar și diagnosticarea sindromului de microduplicație 3q29 fiind printre puținele cazuri descrise în literatură și primul descris în România la un copil. Totodată, lucrarea de față a făcut posibil stabilirea unui diagnostic genetic clar pentru cazurile cu mutații genetice identificate, dar și ca familiile acestora să beneficieze de un sfat genetic corect. Drept urmare, în lipsa tehnicilor bazate pe microrețele și a limitărilor financiare, s-a dorit evaluarea utilității tehnicii MLPA și propunerea unui algoritm de testare a pacienților cu tulburări de neurodezvoltare și anomalii congenitale asociate folosind combinații de kit-uri MLPA, respectiv analiza citogenetică pentru excluderea anomaliilor cromozomiale structurale și mozaicismelor care rămâne nelipsită în diagnosticul acestor pacienți.