

STRESZCZENIE PRACY DOKTORSKIEJ:

**GENETYCZNE MODYFIKATORY FENOTYPU KARDIOLOGICZNEGO ZESPOŁU  
DELECJI 22q11**

**Autor: Anna Maria Błońska**

**Promotor: Prof. dr hab. n. med. Maria Małgorzata Sąsiadek**

Kierownik Katedry i Zakładu Genetyki Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

**Wprowadzenie:**

Zespół delecji 22q11.2 (z ang. 22q11 deletion syndrome, 22q11DS) charakteryzuje się zestawem ponad 180 możliwych opisanych wad wrodzonych i objawów klinicznych, z których najbardziej typowe to wrodzone wady serca, rozszczep podniebienia, zanik/niedorozwój grasicy, niedoczynność przytarczyc, opóźnienie uczenia się oraz cechy dysmorficzne twarzy. Zespół ten występuje z częstością 1 na 4000 żywych urodzeń na świecie. Jego przyczyną u zdecydowanej większości (ponad 90% pacjentów) jest obecność hemizygotycznej delecji wielkości 3 milionów par zasad (z ang. mega base pair, MB) na długim ramieniu chromosomu 22. U kilku procent pacjentów występuje delecja wielkości 1.5MB, a u bardzo niewielu nietypowe delecje wielkości między 1.5 a 3 MB lub pojedyncze mutacje w genie *TBX1*, zlokalizowanym w obszarze delecji i będącym w oparciu o dotychczasowe badania głównym genem kandydatem odpowiedzialnym za większość objawów klinicznych.

22q11DS cechuje się pełną penetracją, ale dużą zmiennością ekspresji, która jest niezależna od rozmiaru delecji. Zespół diagnozuje się na podstawie objawów klinicznych oraz w oparciu o badanie fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (z ang. fluorescence in situ hybridization, FISH) wykrywające obecność delecji za pomocą specyficznych dla tego rejonu sond N25 i

TUPLE1. Mimo wielu przeprowadzonych dotychczas badań i ujawnienia wielu aspektów molekularnych mechanizmów powstania zespołu, przyczyna tak dużej zmienności ekspresji wciąż nie jest znana.

Wady serca są jednymi z najcięższych objawów zespołu. Występują u 74% pacjentów z 22q11DS i przeważnie wymagają interwencji chirurgicznej wkrótce po urodzeniu. Wiadomo, że brak jednej kopii genu *TBX1* (haploinsuficjencja) w badaniach na myszach wiązał się obecnością nieprawidłowej anatomii serca i naczyń. U ludzi jednak, mimo, że w każdym przypadku 22q11DS mamy do czynienia z haploinsuficjencją genu *TBX1*, a mimo to istnieje duże zróżnicowanie fenotypu kardiologicznego, włącznie z brakiem wad serca u 26% pacjentów. W oparciu o dotychczasowe dane można postawić hipotezę, że istnieją inne niż rozmiar delecji i brak jednej kopii genu *TBX1* czynniki odpowiedzialne za zmienność ekspresji. Mogą one istnieć na drugiej kopii genu *TBX1* lub w innych częściach genomu. Czynniki te nazwano modyfikatorami genetycznymi fenotypu.

### **Cel projektu:**

Poszukiwanie modyfikatorów genetycznych fenotypu kardiologicznego u pacjentów z 22q11DS na drugiej kopii genu *TBX1* oraz w całym genomie.

### **Materiał i metody:**

Do badania włączono DNA 438 pacjentów rasy kaukaskiej z potwierdzoną uprzednio za pomocą badania FISH obecnością delecji.

Projekt przeprowadzono trój etapowo. W pierwszym etapie ustalono rozmiar delecji przy użyciu markerów mikrosatelitarnych (z ang. microsatellite markers lub short tandem repeats, STR) oraz metody MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). Do dalszych etapów wyselekcjonowano tylko DNA pacjentów z rozmiarem delecji 3 MB.

W drugim etapie przeprowadzono resekwencjonowanie drugiej kopii genu *TBX1* u 370 pacjentów i analizę powiązań otrzymanych polimorfizmów pojedynczych par nukleotydów (single nucleotide polymorphisms, SNP) z ich fenotypem kardiologicznym.

W trzecim etapie wykorzystano macierz Affymetrix Genome-Wide Human SNP Nsp/Sty 6.0 do analizy SNP w całym genomie. Przeprowadzono badanie assocjacyjne całego genomu (z ang. genome wide association study, GWAS) i analizowano powiązania znalezionych SNP w oparciu o dwa ekstrema fenotypu – u pacjentów z najcięższą wadą serca – tetralogią Falota (TOF) oraz u pacjentów bez wady serca.

### **Wyniki:**

W wyniku genotypowania pacjentów za pomocą obu metod STR i MLPA u ponad 90% (n = 407) pacjentów wykryto rozmiar delecji 3MB. U pozostałych pacjentów występowała delecja wielkości 1.5 MB, a u bardzo niewielkiej grupy między 1.5 a 3 MB.

Analiza polimorfizmów SNP na drugiej kopii genu *TBX1* początkowo wykazała powiązania 6 SNP z ubytkiem przegrody międzyprzedsionkowej (z ang. atrial septal defekt, ASD) i 2 SNP z ubytkiem przegrody międzykomorowej (z ang. ventricular septal defekt, VSD), jednak po korekcji dla wielokrotnych testów okazały się one nieistotne statystycznie.

Badanie GWAS na platformie Affy 6.0 wykryło interesujące powiązania między SNP obecnymi w genach mających wpływ na rozwój układu sercowo-naczyniowego, tj. VEGF, ANGPT2 i HAS2, a ekstremami fenotypu kardiologicznego podczas analizy na grupie 41 pacjentów.

Powiązania te jednak nie zostały potwierdzone na większej grupie (n=121) pacjentów, u której istotne statystycznie wyniki uzyskano dla 15 SNP na chromosomie 13. Polimorfizmy te jednak nie występowały w obszarze żadnych genów i w oparciu o dostępną literaturę nie znaleziono wytłumaczenia dla ich potencjalnej roli w rozwoju układu sercowo-naczyniowego.

**Wnioski:**

Uzyskane wyniki oraz dane z literatury świadczą, że poszukiwanie modyfikatorów genetycznych fenotypu, w tym fenotypu kardiologicznego 22q11DS jest procesem bardzo czasochłonnym, trudnym i złożonym. Wymaga ono bardzo licznej grupy pacjentów, bardzo dokładnych danych klinicznych, dużej ilości wysokiej jakości DNA. Z uwagi na to, że 22q11DS jest zespołem rzadkim – do spełnienia tych warunków niezbędna jest wielośrodkowa dobrze zorganizowana współpraca.

Ze względu na ogromną liczbę polimorfizmów SNP istnieje ryzyko pewnej ilości fałszywie pozytywnych wyników, dlatego też wyniki analizy statystycznej muszą zostać zweryfikowane za pomocą korekcji dla wielokrotnego testowania. Niezbędne jest także wykonanie tzw. biologicznej replikacji uzyskanych wyników na nowej grupie pacjentów, potwierdzającej lub wykluczającej uzyskane zależności.

Wyniki przedstawione w tej publikacji, jak i zaprezentowane w literaturze wskazują, że odpowiedź na pytanie o modyfikatory fenotypu (w tym fenotypu kardiologicznego) 22q11DS może być złożona i wymagać jednoczesnego uwzględnienia interakcji czynników genetycznych i środowiskowych.