

Mgr Magdalena Pele

**Identyfikacja mutacji w genach szlaku sygnałowego Ras/MAPK
i analiza ich korelacji z fenotypem zespołów:
Noonan, sercowo-twarzowo-skórnego oraz Costello**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Małgorzata Krajewska-Walasek

Promotor pomocniczy: dr n. med. Elżbieta Ciara

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Genetyki Medycznej
Instytutu „Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa, 2021

STRESZCZENIE

RASopatie, określane jako zespoły nerwowo-sercowo-twarzowo-skórne, charakteryzują się zmienną ekspresją objawów klinicznych oraz heterogennym podłożem genetycznym. Należą do nich m. in. zespoły: Noonan (NS), sercowo-twarzowo-skórny (CFCS), Costello (CS), neurofibromatoza typu 1 (NF1) oraz tzw. zespoły „pokrewne”. Przyczyną ww. chorób są defekty w genach kodujących białka należące do tej samej ścieżki przekazywania sygnału na szlaku kinaz białkowych aktywowanych mitogenami (szlak Ras/MAPK). Obecnie znane są defekty w 24 genach ze szlaku Ras/MAPK, związane z etiologią RASopatii. W około 20-30% przypadków nie udaje się ustalić podłoża molekularnego choroby, co sugeruje udział nowych czynników genetycznych w etiologii tych zespołów, w identyfikowaniu których zastosowanie znajdują wielkoskalowe metody molekularne. Z uwagi na stosunkowo wysoką częstość występowania niektórych RASopatii, podwyższone ryzyko odziedziczenia zmiany oraz wieloukładowe konsekwencje kliniczne, stanowią one istotny problem kliniczny i społeczny.

Celem pracy było ustalenie podłoża molekularnego u polskich pacjentów z klinicznym podejrzeniem RASopatii, w tym szczegółowa analiza profilu molekularnego i klinicznego zespołów NS, CFCS, CS i pokrewnych oraz próba określenia zależności pomiędzy genotypem a fenotypem, w porównaniu do danych literaturowych. Praca zakładała również modyfikację schematu postępowania diagnostycznego dla chorób z grupy RASopatii, ze szczególnym uwzględnieniem nowoczesnych metod diagnostyki molekularnej.

Grupa badana oraz stosowana metodyka:

Badaniami objęto grupę 149 niespokrewnionych pacjentów z podejrzeniem RASopatii oraz grupę 207 członków ich rodzin. Materiał biologiczny do badań stanowiły próbki krwi obwodowej, z których wyizolowano preparaty genomowego DNA. Do badań wykorzystano następujące techniki molekularne: 1/ metody jakościowe: sekwencjonowanie metodą według Sangera i sekwencjonowanie nowej generacji (NGS; w tym analiza celowanych paneli genów lub całego eksomu - WES) oraz 2/ metody ilościowe: analizę mikromacierzy całogenomowych (aCGH) i multipleksową amplifikację sond zależną od ligacji (MLPA; do oceny zmian w mtDNA lub weryfikacji wyników aCGH).

Przeprowadzono dokładną analizę profilu molekularnego 128 badanych pacjentów (w tym 121 przypadków RASopatii), u których udało się określić podłoże choroby. Wyodrębniono 91 probantów (i 27 objawowych członków ich rodzin) ze spektrum fenotypowego Noonan i Noonan-like, w tym 81 dzieci z NS (gdzie u jednego z badanych probantów zidentyfikowano zespół Noonan o autosomalnym recesywnym trybie dziedziczenia, związany z biallelicznym defektem genu *LZTR1*), 9 z NS z licznymi

plamami soczewicowatymi (NSML) i 1 z NS z luźnymi włosami zatrzymanymi w anagenowej fazie rozwoju włosa (NSLH), 18 probantów z CFCS (i 1 rodzica), 8 dzieci z CS, a także 3 probantów (i 1 rodzica) z zespołem neurofibromatoza-Noonan (NFNS) oraz 1 chorego z zespołem malformacji naczyń kapilarnych – malformacji tętniczo-żylniej (CMAVM). U kolejnych 7 pacjentów analiza molekularna i diagnostyka różnicowa pozwoliły na identyfikację innego zespołu uwarunkowanego genetycznie, którego fenotyp może przypominać zespół z grupy RASopatii.

Analiza molekularna:

Zidentyfikowano w sumie 74 różne zmiany o patogennym lub prawdopodobnie patogennym charakterze w 13 genach związanych ze szlakiem Ras/MAPK: *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, *RIT1*, *KRAS*, *BRAF*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, *HRAS*, *NF1*, *SHOC2*, *LZTR1*, *RASA1*. Warianty typu zmiany sensu kodowanego aminokwasu stanowiły około 99% wszystkich zidentyfikowanych zmian. W pracy scharakteryzowano 6 nowych wariantów molekularnych w genach: *HRAS*, *LZTR1*, *NF1*, *RAF1*, *RASA1* i *SOS1*.

Udziały (procentowe) poszczególnych genów ze szlaku Ras/MAPK w etiologii badanych chorób były w znacznej mierze zgodne z danymi literaturowymi. U pacjentów z fenotypem ze spektrum zespołu Noonan zidentyfikowano zmiany w genach *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, *RIT1*, *KRAS*, *BRAF*, *NF1*, *SHOC2* i *LZTR1*. Głównym genem zaangażowanym w etiopatogenezę NS u polskich pacjentów był *PTPN11*, w którym zmiany zidentyfikowano w 62% przypadków, drugim co do częstości występowania był *SOS1* (18%), a trzecim *RIT1* (u 10% badanych). Warianty w *PTPN11* i *SOS1* były wykrywane nieco częściej (o około 8-12%), a w *RIT1* dwukrotnie częściej niż dotąd raportowano. Dla produktu białkowego genu *PTPN11* zaobserwowano występowanie mutacji typu „hotspot” w pozycji p.Asn308, zlokalizowanej w domenie fosfatazy tyrozynowej, które stanowiły około 29% wszystkich patogennych wariantów w tym genie (najczęstsza substytucja p.Asn308Asp) oraz odpowiadały za około 18% wszystkich przypadków NS, co nie odbiega znacznie od dotychczasowych raportów (około 25%). Najczęściej zmienianą pozycją w genie *SOS1* był kodon p.Arg552, pośrednio związany z funkcją katalityczną białka *SOS1* (około 38% wszystkich patogennych wariantów w *SOS1* u chorych z NS), a najczęstszą zmianą p.Arg552Gly.

Za występowanie NSML w badanej grupie NS odpowiedzialne były zmiany w genach *PTPN11* i *RAF1*. Zgodnie z danymi literaturowymi, defekty genu *PTPN11* odpowiadały za większość wykrytych przypadków NSML (8/9 vs 90% raportowanych). Objawy NSLH warunkowała jedyna scharakteryzowana dla tego zespołu substytucja w genie *SHOC2* (p.Ser2Gly), natomiast zmiany zidentyfikowane w genie *NF1* były zaangażowane w podłoże molekularne zespołu NFNS.

Za występowanie CFCS u polskich pacjentów odpowiadały zmiany w genie *BRAF* oraz w *MAP2K1* i *MAP2K2*, kodujących kinazy MEK. Defekty *BRAF* stanowiły, zgodnie z danymi literaturowymi, główny czynnik etiologiczny, odpowiadając za około 78% przypadków choroby. U czterech probantów wykryto zmiany w kinazach MEK (22%), przy czym 3/4 przypadki dotyczyły genu *MAP2K2*, w przeciwieństwie do raportów wskazujących na dwukrotnie częstszy udział zmian w *MAP2K1*.

U wszystkich polskich pacjentów z zespołem Costello, podobnie jak w literaturze, obecny był wariant patogeny w domenie efektorowej białka HRAS. Zgodnie z dotychczasową wiedzą, zaobserwowano obecność mutacji typu „hotspot” dla kodonu p.Gly12, w którym zmiany występowały u około 88% (7/8) badanych. Warianty te były typowymi i najczęściej wykrywanymi zmianami u chorych z CS: c.34G>A (p.Gly12Ser) i c.35G>C (p.Gly12Ala) (w eksonie 2 *HRAS*), obecnymi u 50% i 37% badanych dzieci (vs odpowiednio 75-81% i 7-9% w literaturze).

Rodzinne występowanie choroby (o dziedziczeniu autosomalnym dominującym) stwierdzono w 32% badanych przypadków NS (w genach *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1* i *RIT1*) oraz w jednym przypadku CFCS, który był uwarunkowany wystąpieniem wariantu p.Arg231Leu w segmencie aktywowującym domeny kinazowej genu *MAP2K2*. W zespole Costello wszystkie zidentyfikowane warianty powstały *de novo*. Zgodnie z dotychczasowymi doniesieniami, częściej obserwowano dziedziczenie odmatczyne niż odojcowskie. Wystąpienie w jednej rodzinie z NS wariantów na obu allelach genu *LZTR1* potwierdza niedawne odkrycie autosomalnego recesywnego trybu dziedziczenia NS.

W celu weryfikacji hipotezy o udziale rozległych delecji lub duplikacji w patogenezie zespołów Ras/MAPK, w grupie 24 pacjentów z podejrzeniem RASopatii o nieustalonej etiologii i prawidłowym wynikiem badania przesiewowego za pomocą metody wg Sangera, wykonano **analizę mikromacierzy całogenomowych**. U 3 probantów z niepełnym spektrum objawów RASopatii stwierdzono obecność dużych rearanżacji genomowych, w formie heterozygotycznej, zaangażowanych w etiopatogenezę innej choroby genetycznej: delecje *de novo* 8p23.3-p23.1 i 8p23.1, 12q12-q13.11 oraz duplikację 22q11.21-q11.23, powstałą w wyniku matczynej translokacji zrównoważonej. U pozostałych probantów nie zidentyfikowano potencjalnie patogennych, niezrównoważonych zmian dawki genomu, większych niż 100 kbp, natomiast u 11 z nich udało się za pomocą sekwencjonowania NGS zidentyfikować warianty patogenne w genach ze szlaku Ras/MAPK (w *LZTR1*, *NF1*, *RAF1*, *RASA1*, *RIT1*, *SOS1*) lub w innych genach (*MYH3* i *PDGFRB*). Uzyskane wyniki nie potwierdziły udziału rozległych delecji/duplikacji w etiologii RASopatii u polskich pacjentów, zwracają jednak uwagę na problem przenikania się niektórych fenotypów

chromosomowych z wybranym zakresem cech RASopatii i uzasadniają analizę wariantów liczby kopii w przypadku prawidłowego wyniku badania znanych genów kaskady Ras/MAPK.

W wyniku klinicznej analizy różnicowej i bioinformatycznej analizy rozszerzonej danych NGS, przeprowadzonej u 18 pacjentów z podejrzeniem RASopatii o nieustalonej etiologii, u 4 z nich wytypowano znane i nowe czynniki genetyczne oraz związane z nimi choroby, które powinny zostać rozważone w procesie diagnostyki różnicowej zespołów związanych z kaskadą Ras/MAPK: zespół Kosaki (gen *PDGFRB*), KBG (*ANKRD11*), *cutis laxa* (*ALDH18A1*), artrogrypoza i (lub) zespół mnogich pletwistości (*MYH3*). U pozostałych 14 pacjentów (około 29%) nie udało się za pomocą metody NGS zidentyfikować wariantu patogennego jednoznacznie korelującego z chorobą.

W celu weryfikacji hipotezy o współwystępowaniu u pacjentów z RASopatią objawów choroby mitochondrialnej, uwarunkowanych defektami mitochondrialnego DNA (mtDNA), w grupie wszystkich 121 probantów z wariantem molekularnym w genie ze szlaku Ras/MAPK przeprowadzono analizę mtDNA. U 104 chorych wykonano za pomocą MLPA skrining najczęstszych mutacji mtDNA, a u 23 pacjentów (w tym u 6 z prawidłowym wynikiem skriningu) genom mtDNA poddano analizie NGS. Uzyskane wyniki nie potwierdziły hipotezy o istnieniu zależności pomiędzy prezentowanym przez niektórych pacjentów z RASopatią spektrum objawów a współwystępowaniem defektów mtDNA oraz wykluczyły ich udział w modyfikacji fenotypu RASopatii.

Analiza kliniczna i porównania genotypowo-fenotypowe:

W pracy przeprowadzono szczegółową analizę i porównanie cech klinicznych oraz korelacji genotypowo-fenotypowych, prezentowanych przez polskich pacjentów z objawami NS (n=117), CFCS (n=19) i CS (n=8), a otrzymane wyniki porównano z danymi literaturowymi, pochodzącymi z badań innych populacji. Szczegółowy profil kliniczny opracowano dla: (i) 91 probantów z rozpoznaniem zespołu Noonan lub pokrewnego (NSML i NSLH), (ii) 18 z zespołem CFC oraz (iii) 8 z zespołem Costello. Do analizy włączono również chorych członków rodzin, w liczbie 28 osób. Profil kliniczny pacjentów z NSML porównano z klasycznym fenotypem NS. W obrębie grupy NS przeprowadzono analizę zależności pomiędzy obserwowanym spektrum objawów a zmianą w jednym z czterech najczęściej identyfikowanych genów: *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, *RIT1*, a w CFCS pomiędzy klinicznymi skutkami defektów w kinazie BRAF lub MEK. Przeprowadzone po raz pierwszy, u tak dużej grupy polskich pacjentów z RASopatią, szczegółowe porównanie profilu klinicznego z innymi, scharakteryzowanymi pod tym względem grupami pacjentów na świecie, wykazało szereg podobieństw i rozbieżności (część istotnych statystycznie) w rozkładzie poszczególnych cech fenotypowych. Uzyskane wyniki mogą przyczynić się do uściślenia kryteriów kwalifikacji i różnicowania zespołów NS, CFCS oraz CS.

Wykrywalność i modyfikacja algorytmu postępowania diagnostycznego:

Zgodnie z założeniami pracy, dane uzyskane w wyniku analizy klinicznej i badań korelacji genotypowo-fenotypowych przyczyniły się do poszerzenia wiedzy w zakresie symptomatologii, przebiegu i historii naturalnej poszczególnych chorób z grupy RASopatii, a wykorzystanie zróżnicowanych metod biologii molekularnej, do pełniejszego scharakteryzowania ich etiopatogenezy. Umożliwiło to wczesne rozpoznanie i potwierdzenie diagnozy klinicznej, udzielenie porady genetycznej w rodzinach obciążonych RASopatią (ryzyko odziedziczenia zmiany) oraz podjęcie odpowiedniego postępowania profilaktycznego i (lub) terapeutycznego, przeciwdziałającego zagrożeniom wynikającym z defektu molekularnego.

Wykrywalność podłoża molekularnego choroby w całej badanej grupie pacjentów (niezależnie od zastosowanej metodyki i rozpoznania końcowego) wyniosła około 86%, natomiast u pacjentów z RASopatią i zmianą w genie ze szlaku Ras/MAPK około 81% i jest zgodna z wynikami ogólnoswiatowymi. Poziom wykrywalności zmian dla poszczególnych zespołów z grupy RASopatii wyniósł: około 76% dla NS, 90% dla CFCS i 89% dla CS oraz ~2,5% dla NFNS.

Wykorzystanie do badań wielkoskalowych technik molekularnych umożliwiło identyfikację rzadkich i nowych wariantów, wykazujących istotny związek z występowaniem RASopatii i definiujących nowe fenotypy tych chorób oraz dostarczyło informacji na temat molekularnego podłoża w wielu dotychczas niepotwierdzonych przypadkach. Uzyskane wyniki jednoznacznie potwierdzają zasadność wykorzystania NGS jako podstawowego testu genetycznego w procesie weryfikacji (lub różnicowania) podejrzenia klinicznego RASopatii, który pozwala uniknąć wieloletniej „odysei diagnostycznej”, towarzyszącej klasycznemu schematowi postępowania. Chociaż wyniki analizy aCGH nie potwierdziły udziału dużych rearanżacji genomowych w etiologii RASopatii, badanie okazało się skutecznym narzędziem diagnostyki różnicowej z zespołami wrażliwymi na dawkę genów, o podobnym spektrum objawów klinicznych i powinno być włączone do algorytmu postępowania różnicowego u pacjentów z prawidłowym wynikiem analizy NGS.

Doświadczenie i wnioski z prowadzonych badań zaowocowały opracowaniem dla RASopatii **zmodyfikowanego algorytmu postępowania diagnostycznego**, który wykorzystuje takie techniki jak NGS i aCGH oraz w chorobach o dużej heterogenności klinicznej i molekularnej priorytetyzuje nowy model diagnostyki genetycznej, od genotypu do fenotypu, gdzie u pacjentów spełniających ogólne kryteria kliniczne RASopatii, korelację z określonym zespołem i genem przeprowadza się dopiero po analizie panelu wszystkich znanych genów związanych z etiologią tych chorób, zależnie od uzyskanego wyniku.

Podpis Kandydata do stopnia doktora: *Magdalena Peli*

Podpis Promotora: *Magdalena Krajewska-MAUSZEL*

Podpis Promotora pomocniczego: *Elżbieta Ciońca*