

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ



TEZĂ DE DOCTORAT
REZUMAT

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
PROF. UNIV. DR. FRANCISC MIXICH

STUDENT-DOCTORAND:
IOANA STREAȚĂ

CRAIOVA
2016

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ



EVALUAREA MOLECULARĂ A TULBURĂRILOR GLOBALE DE
DEZVOLTARE ȘI A DEFICITULUI INTELECTUAL

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
PROF. UNIV. DR. FRANCISC MIXICH

STUDENT-DOCTORAND:
IOANA STREAȚĂ

CRAIOVA
2016

CUPRINS

INTRODUCERE.....	1
PARTEA I - STUDIUL LITERATURII.....	3
CAPITOLUL I - TULBURAREA GLOBALĂ DE DEZVOLTARE. DEFICITUL INTELECTUAL.....	3
1.1 Premise	3
1.2 Tulburarea globală de dezvoltare. Deficitul intelectual.....	4
1.2.1 Etiologie	5
1.3 Diagnosticul etiologic al tulburării globale de dezvoltare și DI.....	8
1.3.1 Istoricul medical și familial	9
1.3.2 Evaluarea dismorfoloică.....	9
1.3.3 Examenul neurologic.....	10
1.3.4 Evaluarea neuroimagică.....	10
1.3.5 Testele metabolice.....	11
1.3.6 Testarea genetică	11
1.3.7 Alte investigații	12
CAPITOLUL II - EVALUAREA GENETICĂ ÎN TULBURĂRILE GLOBALE DE DEZVOLTARE ȘI DEFICITUL INTELECTUAL.....	14
2.1 Substratul genetic al tulburărilor de dezvoltare și DI.....	14
2.1.1 Aberațiile cromozomiale de număr și structură.....	14
2.1.2 Modificări genetice cu transmitere legată de cromozomul X.....	15
2.1.3 Modificări genetice cu transmitere autozomală.....	16
2.2 Evaluarea genetică clinică și recomandarea testării genetice.....	16
2.3 Tehnici de investigare a genomului uman și aplicațiilor lor în diagnosticul tulburărilor de dezvoltare și DI	17
2.3.1 Citogenetica clasică.....	19
2.3.2 Citogenetică moleculară	19
a. Hibridizarea Fluorescentă in Situ (FISH).....	19
b. Hibridizarea genomică comparativă (CGH).....	20
2.3.3 Genetică moleculară	20
2.3.4 Secvențierea Sanger. Secvențierea de nouă generație (NGS)	22
2.3.5 Tehnologia MIPs (Molecular inverted probes)	23

CAPITOLUL III - UTILIZAREA ARRAY CGH ÎN DIAGNOSTICUL GENETIC AL TULBURĂRILOR DE DEZVOLTARE ȘI DEFICITULUI INTELECTUAL	24
3.1 Premise	24
3.2 Sindroame de microdeleție și microduplicație	25
3.3 aCGH – test de primă intenție în diagnosticul genetic al tulburărilor globale de dezvoltare și deficitului intelectual.....	27
3.4 Consilierea și sfatul genetic în tulburările globale de dezvoltare și DI	29
PARTEA a II-a - CONTRIBUȚII PROPRII.....	31
Capitolul IV - MOTIVAȚIA, SCOPUL ȘI DESIGN-ul STUDIULUI.....	31
Capitolul V - MATERIALE ȘI METODE.....	33
5.1 Lotul de studiu.....	33
5.2 Analiza genomică prin aCGH	34
5.2.1 Recoltarea și depozitarea probelor biologice.....	34
5.2.3 Izolarea și purificarea ADN-ului genomic	35
5.2.4 Evaluarea cantitativă și calitativă a ADN genomic	35
5.2.4 Hibridizarea genomică comparativă pe microarray.....	36
Capitolul VI - REZULTATE	52
Capitolul VII – DISCUȚII	90
Capitolul VIII - CONCLUZII ȘI PERSPECTIVE.....	104
ABREVIERI.....	106
BIBLIOGRAFIE	107
ANEXE	118

INTRODUCERE

La momentul elaborării acestui proiect, la nivel mondial, diagnosticul genetic este necunoscut la peste 60% din pacienții cu tulburare globală de dezvoltare și deficit intelectual. Această situație este datorată rezoluției limitate a tehnicilor de citogenetică convențională care nu reușesc să identifice anomaliile cromozomiale submicroscopice (mai mici de 5-10 Mb) asociate cu numeroase sindroame bine definite, impunându-se astfel recurgerea la tehnici mai avansate precum FISH (hibridizarea fluorescență in situ), tehnici bazate pe PCR, Real Time PCR sau array CGH.

Identificarea etiologiei genetice a sindroamelor caracterizate prin întârziere în dezvoltarea globală și deficit intelectual are un impact economic și social major, explicarea patogenezei oferind detalii cu privire la recurență, management clinic și prognostic. Acest lucru orientează modalitatea de consiliere genetică a familiei determinând o gestionare clinică eficientă a pacienților.

Proiectul de față vizează de asemenea continuarea dezvoltării specialității de Genetică Medicală în Oltenia prin asigurarea accesului pacienților cu tulburări globale de dezvoltare și deficit intelectual la diagnostic molecular și consiliere genetică adecvate.

Obiectivele specifice ale acestui proiect sunt:

1. Determinarea modificărilor genetice de tipul CNVs (copy number variations - segmente de ADN de dimensiuni diferite, începând de la câteva kb (kilobaze) până la Mb (megabaze), prezente într-un număr variabil de exemplare în comparație cu un genom de referință) implicate în etiologia sindroamelor genetice caracterizate prin tulburare globală de dezvoltare și deficit intelectual, precum și a frecvenței acestora în rândul populației din Oltenia.
2. Identificarea și caracterizarea clinică și genetică a subiecților din lotul de studiu care prezintă tulburări globale de dezvoltare și deficit intelectual.
3. Creșterea accesului pacienților cu patologie genetică la tehnicile moderne de diagnostic molecular prin încheierea și consolidarea parteneriatelor între Centrul Regional de Genetică Medicală Dolj din cadrul Spitalului Clinic Județean de Urgență Craiova, Universitatea de Medicină și Farmacie din Craiova și instituțiile de asistență socială din Oltenia.
4. Dezvoltarea actualei bioarhive ADN din cadrul Laboratorului de Genomică Umană care va putea fi folosită în cercetarea medicală viitoare.
5. Crearea unui registru al persoanelor cu patologie genetică din Oltenia care poate constitui punctul de plecare pentru viitoarele anchete de epidemiologie genetică.

Cuvinte cheie: deficit intelectual; tulburare globală de dezvoltare; microdeleție; microduplicație; aCGH

I. STUDIUL LITERATURII

Capitolul I., intitulat “*Tulburarea globală de dezvoltare. Deficitul intelectual*” prezintă incidența și etiologia tulburărilor globale de dezvoltare și a deficitului intelectual, precum și etapele diagnosticului etiologic al acestor patologii.

Capitolul II., intitulat “*Evaluarea genetică în tulburările globale de dezvoltare și deficitul intelectual*” descrie principalele modificări genetice responsabile de apariția tulburărilor globale de dezvoltare și deficitului intelectual, precum și tehnicile disponibile pentru identificarea acestora.

În cadrul **capitolului III.**, intitulat “*Utilizarea array CGH în diagnosticul genetic al tulburărilor de dezvoltare și deficitului intelectual*” este prezentat impactul introducerii metodei aCGH în diagnosticul genetic al tulburărilor de dezvoltare și deficitului intelectual.

II. CONTRIBUȚII PROPRII

Capitolul IV. Motivația, scopul și design-ul studiului

Prin acest proiect ne-am propus identificarea substratului genetic al patologiei caracterizate prin întârziere în dezvoltarea globală și DI, diagnosticate la pacienții evaluați în Laboratorul de Genomică Umană (LGU-UMFCV) din cadrul Centrului Regional de Genetică Medicală Dolj (CRGM Dolj).

Capitolul V. Materiale și metode

Pentru realizarea acestui studiu am efectuat testarea prin tehnologia aCGH a unui grup de 36 de pacienți diagnosticați în cadrul Centrului Regional de Genetică Medicală Dolj cu întârziere în dezvoltarea globală și DI de etiologie neidentificată. Proba biologică utilizată pentru obținerea ADN-ului genomic a fost sângele venos periferic recoltat pe EDTA.

Testarea a fost efectuată prin utilizarea lamelor microarray Roche Nimblegen cu 720,000 (3x720K) și 135,000 (12x135K) de sonde (Roche NimbleGen, Madison, WI, USA), respectiv Agilent cu 180,000 (4x180K) și 60000 (8x60K) sonde (Agilent Technologies Inc., US) pe suprafața lamei. Analiza datelor generate s-a efectuat cu software-ul Nexus 6.1 (Nexus BioDiscovery, El Segundo, CA), respectiv Agilent Cytogenomics 3.0 (Agilent Technologies Inc., US).

Capitolul VI. Rezultate

Lotul de studiu a fost constituit din 36 de pacienți cu întârziere în dezvoltare și/sau DI asociate cu alte semne și simptome clinice precum tulburări de neuro-dezvoltare sau comportament, tulburări neurologice, anomalii de creștere și dezvoltare, malformații congenitale, trăsături dismorfice, afectare metabolică sau endocrină, leziuni cutanate sau anomalii de dezvoltare a scheletului (Tabel 6.1).

În urma efectuării analizei genetice prin aCGH, la 10 dintre pacienții testați rezultatele au fost normale, pentru 6 dintre ei a fost posibilă stabilirea exactă a etiologiei genetice, în timp ce pentru 20 dintre pacienți nu s-a putut realiza cu exactitate corelarea genotip-fenotip (Figura 6.1).

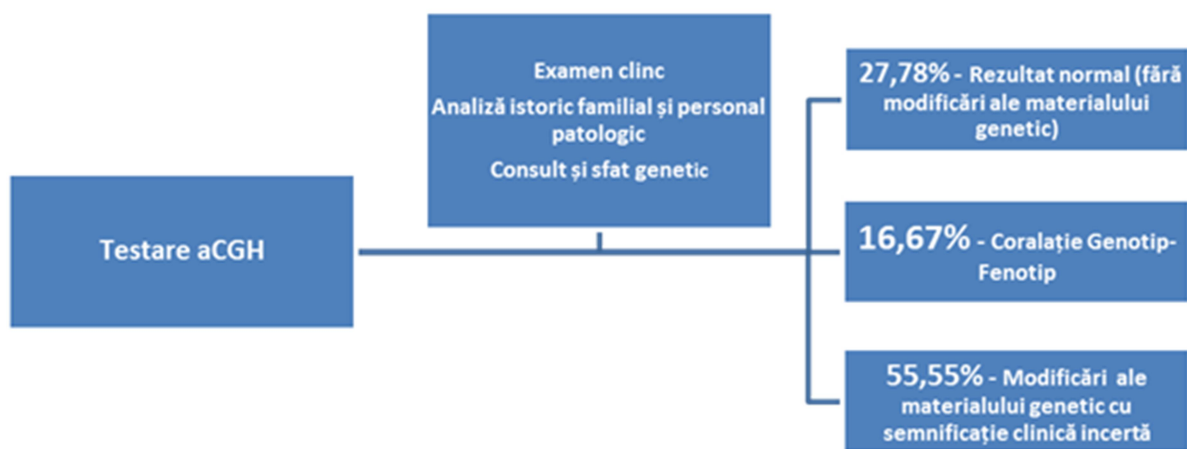


Figura 6.1 Rezultatele testării prin aCGH a pacienților incluși în lotul de studiu

Analiza aCGH a celor 36 de pacienți incluși în lotul de studiu a reușit să identifice 54 de CNVs la 26 dintre aceștia. Prin analiza atentă a literaturii de specialitate și încercarea de corelare a rezultatelor obținute cu fenotipul pacienților, am clasificat aceste CNVs în patru grupuri:

- Patogene (Tabel 6.2);
- cu potențial patogen (Tabel 6.3);
- variante cu semnificație clinică necunoscută;
- CNVs fără legătură cu fenotipul pacientului investigat.

Manifestări clinice identificate la pacienții analizați prin aCGH		Pacienți afectați	
Întârziere în dezvoltare		30/36	
DI	Ușor (IQ 50-69, pentru adulți vârstă mentală 9-12 ani)	10/36	
	Moderat (IQ 35-49, pentru adulți vârstă mentală 6-9 ani)	10/36	
	Sever (IQ 20-34, pentru adulți vârstă mentală 3-6 ani)	14/36	
	Profund (IQ <20, pentru adulți vârstă mentală <3 ani)	2/36	
Tulburare de dezvoltare specifică	Tulburare a vorbirii / limbajului	20/36	
	Tulburare de învățare a cititului	10/36	
	Tulburare de învățare a calculului matematic	15/36	
	Tulburare neuro- motorie	36/36	
Tulburări de neuro-dezvoltare	Tulburări din spectrul autist	3/36	
	ADHD	4/36	
	Stereotipii	7/36	
	Tulburări de somn	3/36	
	Tulburări de alimentație	5/36	
	Psihoză	1/36	
	Alte tulburări de comportament	15/36	
Tulburări neurologice	Afectare Vedere	3/36	
	Afectare Auz	2/36	
	Mișcări involuntare anormale	5/36	
	Leziuni cerebrale	1/36	
	Paralizie cerebrală	5/36	
Tulburări de creștere	La naștere	mic pentru vârsta gestațională (< percentila 10)	1/36
		mare pentru vârsta gestațională (> percentila 90)	1/36
	Actual	Nanism (înălțime < percentila 5)	1/36
		Macrocefalie (> percentila 95)	2/36
		Microcefalie (< percentila 5)	3/36
Malformații congenitale	Defecte cardiace (Defect de sept atrial/ventricular)	3/36	
	Malformații renale și urogenitale	1/36	
	Cheiloschizis/ Palatoschizis	1/36	
	Micrognație	1/36	
	Anomalii ale membrilor (membre scurte sau alungite)	2/36	
Dismorfism cranio-facial		30/36	
Tulburări de metabolism și afectare endocrină		5/36	
Semne cutanate / Leziuni ale pielii		1/36	
Anomalii ale părului, unghiilor și dinților		5/36	
Anomalii ale scheletului (ex: scolioză)		5/36	
Alte anomalii / tulburări identificate		25/36	

Tabel 6.1 Caracterizarea clinică a pacienților din lotul de studiu

Pacient	Sex	Vârsta	Locus / Mecanism de producere	Lungime modificare identificată	MIM/Gene	Platformă aCGH utilizată
Pacient 2	F	34	Dup 3q29	1,65 Mb	611936	Roche NimbleGen
Pacient 11	M	5	Del 7q11.23	1,35Mb	194050	Roche NimbleGen
Pacient 19	M	4	Dup Xq28	0,17 Mb		Agilent
Pacient 20	M	24	Dup Xq27.1-q27.3	6,451 Mb		Agilent
			Del 2q33.1-q33.2	1,596 Mb		
Pacient 21	M	4	Del 14q21.3-q22.1	1,928 Mb		Agilent
			Dup 3q26.1	4,521 Mb		
Pacient 23	M	4	Dup 14q12	3,949 Mb	613454	Agilent

Tabel 6.2 CNVs patogene (Cazurile unde a fost posibilă realizarea corelației genotip-fenotip)

Pacient	Sex	Vârsta	Locus/Mecanism de producere	Lungime modificare identificată	MIM/Gene	Platformă aCGH utilizată
Pacient 1	F	8	Dup 6q27	0,255 Mb		Roche NimbleGen
Pacient 4	F	14	Dup 5p15.33	0,127 Mb		Roche NimbleGen
Pacient 5	M	11	Del 1q44	0,150 Mb		Roche NimbleGen
			Dup Xq28	0,117 Mb		
Pacient 6	M	10	Del 2q37.3	0,443 Mb		Roche NimbleGen
Pacient 8	M	15	Dup 17p12	1,010 Mb		
Pacient 12	M	5	Del 6p25.3	0,231 Mb		Agilent
			Del 8p23.1	0,925 Mb		
			Del 10q11.22	0,706 Mb		
Pacient 13	M	9	Dup 19p13.3	2,488 Mb		Roche NimbleGen
Pacient 14	M	10	Del 2q37.3	0,488 Mb		Roche NimbleGen
			Dup 21q22.12	0,369 Mb		
Pacient 15	F	8	Del 5q13.2	0,167		Roche NimbleGen
Pacient 22	M	40	Del2p16.3	61 kb		Agilent
Pacient 24	M	3	Del6p25.3	0,435 Mb		Agilent
			Del8p23.1	0,583 Mb		
Pacient 25	M	5	Del8p23.1	0,91 Mb		Agilent
			Del10q11.22	0,706 Mb		

Tabel 6.3 CNVs posibil patogene

Capitolul VII. Discuții

Introducerea tehnologiei microarray în evaluarea și analiza substratului genetic al pacienților cu tulburare globală de dezvoltare, DI și dismorfism cranio-facial a permis detectarea modificărilor de mici dimensiuni de la nivelul materialului genetic - CNVs – și localizarea precisă a punctelor de ruptură [1,2]. Acest fapt a permis identificarea și descrierea a numeroase sindroame de microduplicație și microdeleție localizate în diferite segmente cromozomiale [2,3].

Utilizarea aCGH în acest studiu a oferit posibilitatea realizării unei caracterizării moleculare exacte și a unei corelații genotip-fenotip mai bune pentru CNVs identificate la pacienții testați. Lotul analizat în acest studiu prin aCGH a fost constituit din pacienți diagnosticați cu tulburare globală de dezvoltare și / sau DI, iar într-un procent semnificativ de cazuri a fost posibilă identificarea unor modificări cu caracter patogen ale anumitor gene sau localizate în diferite regiuni ale genomului.

În vederea determinării rolului patogen al CNVs identificate la pacienții testați, am luat în considerare tipul modificării identificate (deleție sau duplicație) și dimensiunea sa, genele localizate la nivelul regiunii afectate, istoricul familial al pacienților și datele disponibile în literatura de specialitate și bazele de date internaționale. Pe baza acestor criterii, CNVs identificate în rândul pacienților din lotul de studiu au fost clasificate în CNVs patogene (Tabel 6.2), potențial patogene (Tabel 6.3), cu semnificație clinică incertă / necunoscută și CNVs fără legătură cu fenotipul pacientului analizat.

În urma analizei rezultatelor aCGH obținute, au fost identificate CNVs la 26 dintre cei 36 de pacienți testați (72%). În ceea ce privește identificarea unor modificări cert patogene pentru tulburarea globală de dezvoltare și / sau DI, aceasta a fost posibilă pentru 6 din pacienții evaluați, ceea ce înseamnă o rată de detecție de aproximativ 17%, valoare care se corelează cu datele existente la ora actuală în literatură [4-6]. În cadrul acestui grup se găsesc 5 CNVs implicate în producerea unor sindroame de microdeleții / microduplicații cunoscute sau recent identificate și descrise.

La unul dintre cazurile analizate (pacientul 2) a fost identificată microduplicația 3q29. Sindromul de microduplicație interstițială 3q29 (OMIM 611936). Sindromul de microduplicație 3q29 a fost descris recent de Lisi et al, iar regiunea genomică afectată are o lungime de 1,6Mb și se pare că este produsul duplicației reciproce microdeleției 3q29 caracterizată printr-un fenotip variabil care cuprinde DI, întârziere în dezvoltare și vorbire, esofagită cronică recurentă cu *Candida*, trăsături dismorfice fine, malformații oculare, renale, cardiace sau ale palatului [7-9]. Această microduplicație se poate produce de novo sau poate fi moștenită fie pe linie maternă, fie pe linie paternă [7].

Comparând acest caz cu cele zece cazuri de microduplicație 3q29 publicate anterior, putem observa că la pacienta din lotul nostru de studiu duplicația 3q29 este localizată în aceeași regiune și are o dimensiune similară cu microdeleția 3q29 raportată până la acest moment în literatură [7-11]. La nivelul acestei regiuni sunt localizate 29 de gene, printre care *PAK2*, *DLG1*, *BDHI*, *FBXO45*, *TFRC*, *ZDHHC19*, *PIGX* și *RNF168*.

Studii anterioare au demonstrat că genele *PAK2*, *DLG1*, *FBXO45*, *BDHI* și *ZDHHC19* dețin un rol important în dezvoltarea sistemului nervos central și periferic și în maturarea neuro-sinaptică [12,13]. Pe lângă aceste două roluri, *PAK2* și *DLG1* sunt omologii autozomali ai genelor *PAK3* și *DLG3*, implicate în etiopatogenia DI cu transmitere legată de cromozomul X [14-16]. Astfel, acest caz clinic susține ipoteza ridicată de Fernandez-Jaen et al conform căreia *PAK2* și *DLG1* ar putea fi gene candidate responsabile de producerea DI identificat la pacienții cu sindrom de microduplicație 3q29.

Gena *RNF168* codifică ligaza E3 RING finger 168 și este implicată în procesul de adiție a ubiquitinei la substratul proteic și în controlul răspunsului 53BP1 la rupturile dublu-helixului de ADN [17,18]. Prin utilizarea tehnologiei de secvențiere a întregului exom, s-a demonstrat că defectele localizate la nivelul acestei gene sunt responsabile de producerea sindroamelor de imunodeficiență [19]. Persoanele la care s-au identificat mutații la nivelul acestei gene prezentau din punct de vedere clinic sensibilitate crescută la radiații, imunodeficiență primară, trăsături dismorfice și dificultăți de învățare [18,19]. Din istoricul medical al pacientei noastre a reieșit faptul că aceasta a suferit de esofagită candidozică cronică, care ar putea fi legată de o imunodeficiență primară apărută ca urmare a afectării structurii și funcției genei *RNF168* sau altor gene localizate la nivelul regiunii afectate de duplicație. Până la acest moment nu am reușit să efectuăm testări funcționale suplimentare pentru evaluarea deficitului imun, însă efectuarea acestora este necesară și urmează să fie realizată.

Acesta este un caz de microduplicație 3q29 tipică cu tablou clinic sever. Până la acest moment, nu au mai fost descrise în literatură sau în bazele de date internaționale cazuri de sindrom de microduplicație 3q29 cu atrofie corticală progresivă și infecții recurente cu *Candida albicans*, cazul nostru contribuind astfel la lărgirea spectrului clinic destul de heterogen al acestei patologii genetice. De asemenea, acest caz dovedește importanța testării genetice de rezoluție mare la cazurile cu DI sever asociat cu anomalii cerebrale identificate prin rezonanță magnetică (RMN) și infecții fungice recurente.

În lotul analizat în acest studiu, am identificat la unul dintre pacienți, un băiat de 4 ani cu tulburare globală de dezvoltare, dismorfism facial, afectare neuro-motorie și istoric de infecții respiratorii recurente, prezența a două duplicații localizate la nivelul brațului lung al cromozomului X: arrXq27.1-q27.3(139283418 - 145734190)x3, respectiv arrXq28(153002622 – 153172603)x3.

În cazul pacientului nostru, genele localizate în regiunea Xq28 afectată de duplicație sunt, conform raportului aCGH: *ABCD1*, *L1CAM*, *AVPR2*, *IDH3G*, *PLXNB3* și *PDZD*. Așa cum s-a putut observa, în urma analizei rezultatelor obținute, această duplicație este foarte aproape de zona în care este localizată gena *MECP2* ale cărei mutații sunt responsabile de 80% din cazurile de sindrom Rett clasic în rândul fetelor și de apariția DI sindromic sau non-sindromic asociat cu convulsii rezistente la tratament și infecții recurente răspunzătoare de decesul prematur în cazul pacienților de sex masculin [20,21].

În literatura de specialitate sunt raportate cazuri de DI cu transmitere legată de cromozomul X asociate cu hipotonie axială și spasticitate a membrilor unde s-a identificat prezența duplicației genelor *L1CAM* și *MECP2* cunoscute a fi implicate în dezvoltarea și funcționarea sistemului nervos central [22]. La nivelul regiunii duplicate în cazul pacientului nostru sunt localizate șase gene, printre care și gena *L1CAM*, fapt care ar putea explica parțial etiopatogeneza întârzierii în dezvoltare și a tulburării neuromotorii caracterizate prin spasticitate severă a membrilor.

Tehnologia de hibridizare genomică comparativă (aCGH) poate detecta anomalii citogenetice cu o rezoluție imposibil de realizat prin folosirea tehnicilor convenționale. Astfel, a fost posibilă identificarea de noi sindroame genetice și elucidarea mecanismelor moleculare care stau la baza producerii sindroamelor caracterizate și recunoscute clinic. Aceste lucruri au contribuit esențial la schimbarea modului de diagnosticare a multor boli genetice moștenite și dobândite, precum tulburările globale de dezvoltare, DI, malformațiile congenitale sau cancerul, aCGH devenind în cazul acestor patologii testarea diagnostică de primă linie. Datele obținute în cadrul acestui studiu se corelează foarte bine cu datele existente până acum în literatură și susțin

utilitatea și necesitatea implementării testării aCGH ca primă opțiune de diagnostic genetic pentru persoanele cu tulburări globale de dezvoltare și / sau DI din România.

Capitolul VIII. Concluzii și perspective

Studiul realizat a permis identificarea unor modificări patogene sau potențial patogene ale materialului genetic în rândul unor pacienți cu fenotip complex, arătând astfel importanța tehnologiei aCGH în clarificarea substratului molecular implicat în astfel de cazuri.

Astfel a fost posibilă caracterizarea substratului molecular implicat în producerea tulburărilor globale de dezvoltare și / sau DI la șase din pacienții incluși în acest studiu:

- Am identificat primul caz de microduplicație 3q29 din România la o pacientă în vârstă de 34 ani cu întârziere psihomotorie severă, dificultăți de învățare, tulburări de comportament (psihoză), afectarea vorbirii, disfagie, infecții fungice recurente și atrofie cerebrală progresivă.
- Confirmarea genetică a diagnosticului clinic de sindrom Williams-Beuren prin identificarea prezenței microdeleției în regiunea 7q11.23 și a genelor afectate de această modificare: *ELN*, *LIMK1*, *FZDS*, *WBSCR22*, *WBSCR27*, *WBSCR28*, *STX1A*, *CLDN3*, *CLDN4*, *LAT2*, *ABHD11* și *EIF4H*.
- Identificarea prezenței a două duplicații patogene pentru tulburările globale de dezvoltare și / sau DI la nivelul brațului lung al cromozomului X: Xq27.1-q27.3 și Xq28 la un pacient cu întârziere în dezvoltarea globală, hipotonie axială severă, spasticitate a membrelor, trăsături dismorfice, tulburări de alimentație și infecții respiratorii recurente.
- Detectarea microdelețiilor 2q33.1 – q33.2 și 14q21.3 - q22.2 la un pacient cu DI moderat, anomalii cardiace și trăsături dismorfice.
- Stabilirea unei posibile corelații genotip-fenotip la un pacient în vârstă de 4 ani cu întârziere în dezvoltarea globală, nanism și dismorfism cranio-facial (facies elfin, frunte lată, urechi jos implantate), unde evaluarea aCGH a identificat prezența unei microduplicații de 4,52 Mb în regiunea 3q26.1.
- Identificarea unui nou caz de sindrom de microduplicație 14q12 cu afectarea genei *FOXG1* (până în prezent sunt descrise în literatură doar opt cazuri) la un pacient cu întârziere globală în dezvoltare, istoric de convulsii afebrile, microcefalie și trăsături dismorfice.

În cazul a 12 dintre pacienții analizați am reușit să identificăm prezența unor CNVs cu potențial patogen pentru fenotipul prezentat de aceștia. În vederea confirmării sau infirmării acestor rezultate urmează să fie efectuate suplimentar testări moleculare țintite atât a pacienților, cât și a părinților acestora pentru stabilirea cu exactitate a genelor a căror funcție și structură au fost afectate de rearanjamentul genetic identificat și a mecanismului de producere al acestuia (de novo sau moștenit).

De asemenea, acest studiu a făcut posibil ca mai multe familii să primească în cele din urmă un diagnostic definitiv și un risc de recurență corect pentru modificările identificate prin aCGH.

În continuarea acestui studiu ne propunem să consultăm literatura de specialitate și bazele de date internaționale în vederea identificării de noi gene candidate patogene pentru patologii analizate, precum și a unor noi sindroame emergente cu penetranță scăzută. De asemenea, urmează să reevaluăm modificările identificate în lotul nostru pentru a putea oferi pacienților noștri un management clinic adecvat și corect. În plus, vom continua să reanalizăm lotul constituit, acordând o atenție specială CNVs cu semnificație clinică necunoscută sau incertă și luând în considerare posibilitatea existenței în acele regiuni a unor gene cu potențial de modificare a expresiei altor gene din apropiere sau din aceeași cale de semnalizare.

Bibliografie Selectivă

1. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, et al. (2010) Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet* 86: 749-764.
2. Nevado J, Mergener R, Palomares-Bralo M, Souza KR, Vallespin E, et al. (2014) New microdeletion and microduplication syndromes: A comprehensive review. *Genet Mol Biol* 37: 210-219.
3. Watson CT, Marques-Bonet T, Sharp AJ, Mefford HC (2014) The genetics of microdeletion and microduplication syndromes: an update. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 15: 215-244.
4. Jaillard S, Drunat S, Bendavid C, Aboura A, Etcheverry A, et al. (2010) Identification of gene copy number variations in patients with mental retardation using array-CGH: Novel syndromes in a large French series. *Eur J Med Genet* 53: 66-75.
5. Ahn JW, Bint S, Bergbaum A, Mann K, Hall RP, et al. (2013) Array CGH as a first line diagnostic test in place of karyotyping for postnatal referrals - results from four years' clinical application for over 8,700 patients. *Mol Cytogenet* 6: 16.
6. Park SJ, Jung EH, Ryu RS, Kang HW, Ko JM, et al. (2011) Clinical implementation of whole-genome array CGH as a first-tier test in 5080 pre and postnatal cases. *Mol Cytogenet* 4: 12.
7. Lisi EC, Hamosh A, Doheny KF, Squibb E, Jackson B, et al. (2008) 3q29 interstitial microduplication: a new syndrome in a three-generation family. *Am J Med Genet A* 146a: 601-609.
8. Willatt L, Cox J, Barber J, Cabanas ED, Collins A, et al. (2005) 3q29 microdeletion syndrome: clinical and molecular characterization of a new syndrome. *Am J Hum Genet* 77: 154-160.
9. Ballif BC, Theisen A, Coppinger J, Gowans GC, Hersh JH, et al. (2008) Expanding the clinical phenotype of the 3q29 microdeletion syndrome and characterization of the reciprocal microduplication. *Mol Cytogenet* 1: 8.
10. Goobie S, Knijnenburg J, Fitzpatrick D, Sharkey FH, Lionel AC, et al. (2008) Molecular and clinical characterization of de novo and familial cases with microduplication 3q29: guidelines for copy number variation case reporting. *Cytogenet Genome Res* 123: 65-78.
11. Aleixandre Blanquer F, Manchon Trives I, Fornies Arnau MJ, Alcaraz Mas LA, Pico Alfonso N, et al. (2011) [3q29 microduplication syndrome]. *An Pediatr (Barc)* 75: 409-412.
12. Chung FZ, Sahasrabudde AA, Ma K, Chen X, Basur V, et al. (2014) Fbxo45 inhibits calcium-sensitive proteolysis of N-cadherin and promotes neuronal differentiation. *J Biol Chem* 289: 28448-28459.
13. Phee H, Au-Yeung BB, Pryshchep O, O'Hagan KL, Fairbairn SG, et al. (2014) Pak2 is required for actin cytoskeleton remodeling, TCR signaling, and normal thymocyte development and maturation. *Elife* 3: e02270.
14. Fernandez-Jaen A, Castellanos Mdel C, Fernandez-Perrone AL, Fernandez-Mayoralas DM, de la Vega AG, et al. (2014) Cerebral palsy, epilepsy, and severe intellectual disability in a patient with 3q29 microduplication syndrome. *Am J Med Genet A* 164a: 2043-2047.
15. Dubos A, Combeau G, Bernardinelli Y, Barnier JV, Hartley O, et al. (2012) Alteration of synaptic network dynamics by the intellectual disability protein PAK3. *J Neurosci* 32: 519-527.
16. Tarpey P, Parnau J, Blow M, Woffendin H, Bignell G, et al. (2004) Mutations in the DLG3 gene cause nonsyndromic X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* 75: 318-324.
17. Li T, Guan J, Huang Z, Hu X, Zheng X (2014) RNF168-mediated H2A neddylation antagonizes ubiquitylation of H2A and regulates DNA damage repair. *J Cell Sci* 127: 2238-2248.
18. Moens LN, Falk-Sorqvist E, Asplund AC, Bernatowska E, Smith CI, et al. (2014) Diagnostics of primary immunodeficiency diseases: a sequencing capture approach. *PLoS One* 9: e114901.
19. Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, Conley ME, et al. (2014) Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Front Immunol* 5: 162.
20. Friez MJ, Jones JR, Clarkson K, Lubs H, Abuelo D, et al. (2006) Recurrent infections, hypotonia, and mental retardation caused by duplication of MECP2 and adjacent region in Xq28. *Pediatrics* 118: e1687-1695.
21. Yamamoto T, Shimojima K, Shimada S, Yokochi K, Yoshitomi S, et al. (2014) Clinical impacts of genomic copy number gains at Xq28. *Human Genome Variation* 1.
22. Van Esch H, Bauters M, Ignatius J, Jansen M, Raynaud M, et al. (2005) Duplication of the MECP2 region is a frequent cause of severe mental retardation and progressive neurological symptoms in males. *Am J Hum Genet* 77: 442-453.

CURRICULUM VITAE

Date personale:

Nume și prenume: Streață Ioana

Data și locul nașterii: 25.12.1987, Craiova, Dolj

Cetățenia: română

E-mail: ioana.streata@yahoo.com

Studii:

- 2002-2006, Colegiul Național "Nicolae Titulescu", Craiova

- 2006-2012, Facultatea de Medicină, Universitatea de Medicină și Farmacie din Craiova

Activitate profesională:

01.2013 - prezent - medic rezident Genetică Medicală – Spitalul Clinic Județean de Urgență Craiova

Activitate didactică și științifică:

- 10.2012 – prezent – Doctorand la Universitatea de Medicină și Farmacie din Craiova, Disciplina de Biologie Celulară și Moleculară.

- 04.2013 – prezent – asistent de cercetare, membru al echipei de cercetare din cadrul proiectului FP7 – TANDEM (Concurrent Tuberculosis and Diabetes Mellitus; unravelling the causal link, and improving care).

Cursuri:

• Curs "Citogenetică moleculară, Institutul „Victor Babeș”, București, Mai – Septembrie 2013.

• Next Generation Leaders in Biology of Ageing, Intensive Programme for Master and PhD students, Rimini, Italy, Iunie 2014

• Curs Dismorfologie Clinică, Centrul de Genetică Nowgen, Universitatea din Manchester, Marea Britanie, 1 – 3 Aprilie 2014

• Curs Flow-Citometrie, Universitatea de Medicină și Farmacie din Iași, România, 23 – 28 Septembrie 2013

• 29th Course in Medical Genetics, Bertinoro, Italia, 8 – 12 May, 2016 – Bursă ESHG

Publicații:

- Prenatal and postnatal findings in a 10.6 Mb interstitial deletion at 10p11.22-p12.31. Sosoi S, Streață I, Tudorache S, Burada F, Siminel M, Cernea N, Ioana M, Iliescu DG, Mixich F. *J Hum Genet.* 2015 Apr; 60(4):183-5.
- Streață I, Burada F, Sosoi S, Iliescu D. G., Ioana M., Cara M., ... & Tudorache, S. (2013). Microarray-Based Prenatal Diagnosis in Developing Countries. *Global Journal of Human Genetics & Gene Therapy*, 1(1), 8-11.
- Burada F., Ciurea, M. E., Nicoli, R., Streață I., Vilcea, I. D., Rogoveanu, I., & Ioana, M. (2015). ATG16L1 T300A Polymorphism is Correlated with Gastric Cancer Susceptibility. *Pathology & Oncology Research*, 1-6.
- Nicoli, E. R., Dumitrescu, Th., Uscatu, C. D., Popescu, F. D., Streață I., Serban Sosoi, S., & Lungulescu, D. (2014). Determination of autophagy gene ATG16L1 polymorphism in human colorectal cancer. *Rom J Morphol Embryol*, 55(1), 57-62
- Cucu, M. G., Riza, A. L., Cimpoeu, A. L., Streață I., Sosoi, S. S., Ciontea, M. S., ... & Mixich, F. Implication of TLR2 polymorphism in pulmonary tuberculosis.
- Stefan, E., Streață I., Gherghina, F., Cimpoeu, A., Cucu, M., Petrescu, F., ... & Burada, F. (2013). IL-1B-511C> T polymorphism is not correlated with osteoarthritis susceptibility. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 18(1), 182.
- Nicoli, E. R., Ivanov, P., Cucu, M. G., Al Eisa, N., Dumitrescu, T., Serban Sosoi, S., Cimpoeu, A., Streață I., & Popescu, F. (2013). Experimental animal models for intestinal inflammation. *Current Health science journal* vol. 39, suppl. 5, 12-15.
- Ivanov P, Nicoli E-R., Lungulescu D., Streață I., Cucu M. G., Dumitrescu T., Smarandache C. & Popescu F. (2013). Pharmacogenetics of chemotherapeutic agents in colorectal cancer, *Current Health Science Journal*.
- Cimpoeu A., Streață I., Cucu M., Nicoli E. R., Șerban -Șoșoi S., Marchian S., Verdeș D. & Cruce M. (2013). Polymorphisms in Cytokines and Toll-Like Receptor Genes and Susceptibility to Tuberculosis. *Current Health Science Journal*.
- C.D. Uscatu, Elena-Raluca Nicoli, T. Dumitrescu, Ioana Streață, Simona Serban-Sosoi, M. Cucu, A. Barbalan, I. Munteanu, Amelia Dobrescu, F. Mixich (2014). Autophagy and colorectal cancer, *Current Health science journal* vol. 40, suppl. 1, 13-19
- M. Georgescu, D. Enescu-Bieru, D. Georgescu, C. Bogdan, V. Sfredel, I.(O.) Streață, V. Nestianu, M. Iancau (2011). Using the edge frequency index of the cerebral frequencies spectrum in evaluating the development of skills; *CLIN NEUROPHYSIOL* 01/2011; 122. DOI:10.1016/S1388-2457(11)60579-8

Stagii și specializări:

- Stagiu de pregătire în Genetică Clinică și Imunogenetică - Department of Human Genetics, Radboud University Medical Nijmegen Center, Nijmegen, The Netherlands, 15 Iunie – 15 Septembrie 2015, Coordonatori: Wendy van Zelst-Stams, M.D., Coordinator of Clinical Genetics Department, Alexander Hoischen, PhD, Assistant Professor Developmental Genomics & Genomic Disorders, M. G. Netea, M. D. Professor of Experimental Medicine
- Stagiu de cercetare în Imunologie – Department of Immunology, Max Planck Institute for Infection Biology, Berlin, Germania, 7 January -8 Mai 2015, Coordonatori: Stefan H.E. Kaufmann, Professor for Microbiology and Immunology - Charité University Clinics Berlin, Managing Director Department of Immunology, Max Planck Institute for Infection Biology, Dr. Anca Dorhoi, Minerva Group Leader, Max Planck Institute for Infection Biology Department of Immunology