

Poszukiwanie nowych przyczyn chorób neurodegeneracyjnych u noworodków i dzieci za pomocą technik sekwencjonowania następnej generacji

STRESZCZENIE

Wstęp: Rozprawa doktorska składa się z cyklu trzech publikacji, w których przedstawiono wyniki badań sekwencjonowania całoksomowego (whole-exome sequencing, WES) w trybie pilnym, przeprowadzonych u pacjentów pediatrycznych z podejrzeniem ciężkiej i postępującej choroby neurodegeneracyjnej.

Choroby neurodegeneracyjne to grupa wrodzonych lub nabytych chorób układu nerwowego, w których obserwuje się postępujące uszkodzenie komórek nerwowych. Stanowią one poważne wyzwanie zarówno kliniczne i naukowe, jak również społeczne i ekonomiczne, zwłaszcza w grupie pacjentów pediatrycznych. Do chorób neurodegeneracyjnych należą również choroby neurometaboliczne (zaliczane do wrodzonych wad metabolizmu). Pomimo rozwoju technik badawczych, nadal u ponad 50% pacjentów z postępującymi objawami neurologicznymi nieznana jest ich etiologia. Przypuszcza się, że główną rolę w patomechanizmie tych niezidentyfikowanych czynników pełnią czynniki genetyczne. Około 1600 fenotypów chorób człowieka opisanych w bazie OMIM ma nieokreśloną etiologię molekularną. Około 1500 znanych genów człowieka ma nieznaną funkcję i ich dysfunkcja nie jest skojarzona z żadną chorobą człowieka. Często choroby neurodegeneracyjne mają nagły początek i postępują gwałtownie prowadząc nierzadko do zgonu we wczesnym okresie niemowlęcym bez względu na zastosowane leczenie. Pomimo postępu medycyny znacząca większość chorób neurodegeneracyjnych pozostaje bez możliwości leczenia. Wraz z postępem medycyny pojawiają się innowacyjne opcje terapeutyczne, jednak zawsze najlepsze efekty leczenia uzyskuje się przy jego zastosowaniu jeszcze w okresie przedobjawowym lub skąpoobjawowym, co wymaga wczesnej diagnostyki.

Cele: Głównymi celami pracy doktorskiej były: 1) Identyfikacja nowych czynników genetycznych w etiologii gwałtownie postępujących chorób neurodegeneracyjnych przy wykorzystaniu technologii badań genomowych uwzględniających badanie sekwencjonowania całoksomowego (WES) w trybie pilnym (rapid-WES) oraz ewentualnie badanie mikromacierzy CGH (aCGH) u pacjentów z współistniejącymi wrodzonymi wadami rozwojowymi; 2) Próba określenia związku między wariantem pojedynczego nukleotydu a wynikiem klinicznym

(korelacja genotyp-fenotyp); 3) Opracowanie algorytmu diagnostycznego u noworodków i niemowląt z ciężkimi i szybko postępującymi zaburzeniami neurodegeneracyjnymi w Oddziałach Intensywnej Terapii z zastosowaniem badania rapid-WES.

Materiał i metody: Aby zrealizować założone cele w pracy doktorskiej pozyskano grant naukowy dla doktorantów (finansowany ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w Programie “Regionalna Inicjatywa Doskonałości” na podstawie umowy nr 016/RID/2018/19), którego kierownikiem był promotor niniejszej rozprawy doktorskiej – prof. dr hab. n. med. Robert Śmigiel.

Do badania zakwalifikowano 57 pacjentów z wybranych miast Polski (Wrocław, Opole, Gdańsk, Warszawa, Bydgoszcz). U pacjentów tych wystąpiło nagle pogorszenie stanu neurologicznego o postępującym przebiegu bez ustalonej przyczyny, i u których podejrzewano chorobę uwarunkowaną genetycznie oraz, którzy przebywali na oddziałach intensywnej terapii dla noworodków lub dzieci. Kwalifikowano pacjentów wg. kryteriów włączenia i wyłączenia przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej. U zakwalifikowanych pacjentów i ich rodziców została pobrana krew na EDTA, która była transportowana do Zakładu Genetyki Medycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, gdzie po izolacji DNA było wykonywane badanie WES.

Wyniki: W badanej populacji chłopcy stanowili 45,6% (26/57), średnia wieku w momencie włączenia do badania wynosiła 6,5 miesiąca, a mediana wieku wynosiła 80 dni. Najmłodszy pacjent był zakwalifikowany w pierwszej dobie życia, zaś najstarszy proband w wieku 3 lat i 7 miesięcy. Wskaźnik śmiertelności ww. grupie pacjentów wynosił 45,6% (26/57). Średni czas oczekiwania na wynik rapid-WES wynosił 14 dni (bez weryfikacji wariantów u rodziców).

Spośród ww. 57 pacjentów, u 41 (71,9%) postawiono diagnozę po wykonaniu badania WES. U pozostałych dzieci nie znaleziono wariantów patogennych bądź potencjalnie patogennych w eksomie, co z dużym prawdopodobieństwem wykluczyło podłoże monogenowe choroby. Zidentyfikowano mutacje w 35 genach. U pięciu pacjentów wykazano mutacje w genie *SCO2* oraz u dwóch pacjentów mutacje w genie *MTFMT*. 32 z 35 zidentyfikowanych wariantów zostało już wcześniej opisanych w literaturze jako warianty patogenne lub prawdopodobnie patogenne. U trójki dzieci zidentyfikowano warianty w genach, których funkcje były wcześniej znane, ale nie powiązано ich dotychczas z żadną chorobą u człowieka: *DCAF5*, *NARS1* i *NFASC*.

Sześć genów zasługuje na szczególną uwagę :

- 1) wariant c.2267G>A w genie *ATPIA3* powiązany z chorobą o nowym fenotypie niedostatecznie poznany
- 2) wariant w genie *ZNF699* będący przyczyną nowej choroby, opisanej po raz pierwszy w 2021 r.
- 3) homozygotyczny wariant w genie *NFASC*, jest pierwszym opisanym przykładem defektu genetycznego glejowych izoform *NFASC* u ludzi, czyli nową ciężką chorobą obwodowego i centralnego układu nerwowego
- 4) wariant w genie *DCAF1*, który ma zerową częstość występowania we bazach danych
- 5) warianty w genie *NARS1*, które mają zerową częstość występowania we bazach danych
- 6) dwa warianty w genie *TRMT10C* - uszkodzenie produktu tego genu zaburza proces fosforylacji oksydacyjnej, dotychczas opisano w literaturze jedynie 3 pacjentów z tą mutacją.

Wnioski: Rapid-WES jest skutecznym i skracającym czas diagnostyki badaniem u noworodków i dzieci przebywających na oddziałach intensywnej terapii, u których występują niejednorodne i ciężkie objawy choroby neurodegeneracyjnej. W tej specyficznej grupie pacjentów, w której brak diagnozy wpływa niekorzystnie na rokowanie, w której liczy się czas, a możliwości diagnostyczne są często ograniczone ze względu na wiek i ciężki stan pacjenta, należy rozważyć badanie rapid-WES jako badanie z wyboru. Szerokoprzepustowe badanie WES jest również narzędziem naukowym do identyfikowania nowych przyczyn molekularnych chorób neurodegeneracyjnych u człowieka.

Słowa kluczowe: choroby neurodegeneracyjne, wrodzone wady metabolizmu, sekwencjonowanie następnej generacji, sekwencjonowanie całego eksomu, oddział intensywnej terapii noworodków, oddział intensywnej terapii dzieci, diagnoza

Searching for new causes of neurodegenerative diseases in newborns and infants by application of next generation sequencing

SUMMARY

Introduction: The doctoral dissertation consists of a series of three publications presenting the results of whole-exome sequencing (WES) studies conducted in pediatric patients suspected of having a severe and progressing neurodegenerative disease.

Neurodegenerative disorders are a group of congenital or acquired diseases of the nervous system in which there is progressive damage of the nerve cells. They constitute a serious clinical, scientific as well as social and economic challenge, especially in the group of pediatric patients. Neurodegenerative diseases also include neurometabolic diseases (classified as congenital defects of metabolism). Despite the development of research techniques, etiology is still unknown in more than 50% of patients with progressive neurological symptoms. It is assumed that genetic factors play a major role in the pathomechanism of these unidentified disorders. About 1600 phenotypes described in OMIM database still have an unknown molecular basis. Moreover, over 1500 of human genes have unknown function and have not been associated with any human disease. Quite frequently, neurodegenerative diseases have a sudden onset and progress rapidly, often leading to death in early infancy, regardless of the provided treatment. Despite the progress of medicine, the vast majority of neurodegenerative diseases remain incurable. With the advancement of medicine, innovative therapeutic options appear, but the best treatment results are always obtained when it is used in the presymptomatic or oligosymptomatic period, which requires early diagnosis.

Aims: The main objectives of the doctoral dissertation have been: 1) Identification of new genetic causes in the etiology of severe and rapidly progressing neurodegenerative conditions using contemporary high-throughput technologies including whole exome sequencing – WES in its rapid mode (rapid-WES). Array comparative genomic hybridization (aCGH) was additionally performed for patients with coexisting congenital malformations; 2) Attempt at determining the relationship between a single gene variant and the clinical outcome (genotype-phenotype correlation); 3) Development of a diagnostic algorithm in newborns and infants with severe and

rapidly progressing neurodegenerative disorders in the Intensive Care Units with the application of rapid-WES;

Materials and methods: In order to achieve the assumed goals in the Doctoral Thesis, a research grant was obtained for doctoral students (financed from the funds granted by the Ministry of Science and Higher Education in the Regional Initiative of Excellence program for the years 2019–2022, project number 016/RID/2018/19), the supervisor of which was the promoter of this doctoral dissertation - prof. Robert Śmigiel, MD.

Fifty-seven patients from different parts of Poland (Wrocław, Opole, Gdańsk, Warsaw, Bydgoszcz) were enrolled in to the study. These were patients who experienced an acute and progressive deterioration of health for no apparent reason and/or where hospitalized in Newborn or Pediatric Intensive Care Units. Patients were qualified according to the inclusion and exclusion criteria presented in this Doctoral Thesis. The qualified patients and their parents had blood collected for EDTA, which was sent to the Department of Medical Genetics (Medical University of Warsaw), where rapid-WES was performed and interpreted.

Results: In the studied population, males constituted 45,6% (26/57), the mean age at study entry was 6.5 months, and the median age was 80 days. The youngest patient was qualified in the first day of life, and the oldest proband was enrolled at the age of 3 years and 7 months. The mortality rate was 45,6 (26/57). The average time for the rapid-WES result was 14 days.

Among the fifty-seven patients in total 41 (71.9%) received a diagnosis after performing rapid-WES. In the remaining children, pathogenic variants were not found in the exome, which most likely excludes the genetic basis of the disease in these children. Mutations in 35 genes were identified, five patients had mutations in the *SCO2* gene and two in the *MTFMT* gene. 32 out of 35 mutations have already been previously described as pathogenic or possibly pathogenic. Mutations in genes whose functions were previously known but not associated with any disease were identified in three children: *DCAF5*, *NARS1* and *NFASC*.

Six mutations deserve special attention:

- 1) c.2267G>A in the *ATPIA3* gene causing a disease with a new phenotype, still poorly described;
- 2) mutation in the *ZNF699* gene which causes a new described (April 2021) disease

3) the homozygous variant in the *NFASC* gene is the first described example of a genetic defect of the *NFASC* glial isoforms in humans, a new severe disease of the peripheral and central nervous system.

4) a variant in the *DCAF1* gene with a zero frequency of occurrence in databases

5) two variants in the *NARS1* gene, which have a zero frequency of occurrence in databases

6) two variants in the *TRMT10C* gene, damage of the gene product disrupts the process of oxidative phosphorylation, so far described in only 3 patients in the international literature

Conclusions: Rapid-WES is an effective and time-saving diagnostic tool for infants and children in ICUs who present heterogeneous and severe symptoms. In this specific group of patients, where there is no time to lose and the diagnostic options are often limited because of the patient's age and severe condition, rapid-WES should be considered even as a first-tier test. The wide-throughput WES study is also a scientific tool to identify new molecular causes of neurodegenerative diseases in humans.

Key words: neurodegenerative diseases, inborn errors of metabolism, next generation sequencing, whole exome sequencing, neonatal intensive care unit, pediatric intensive care unit, diagnosis