



Universitatea Babeş-Bolyai Cluj-Napoca
Facultatea de Biologie și Geologie
Școala Doctorală de Biologie Integrativă



**Secvențializarea exomului dezvăluie defecte genetice
cunoscute și noi în familii israeliene cu retinopatii
moștenite**

Rezumatul tezei de doctorat

Coordonator Științific

Dr. rer. nat. Annette Damert, MA.

Doctorand

Lázár Csilla-Hanga

Cluj-Napoca

2016

Cuprins

Cuprins	i
Lista figurilor	ix
Lista tabelelor	xi
1 Introducere	1
1.1 Structura și funcția ochiului uman	2
1.2 Structura retinei	4
1.3 Descrierea structurală și funcțională a fotoreceptorilor	6
1.4 Transducția vizuală	11
1.5 Boli degenerative ale retinei	13
1.6 Tehnici de diagnosticare	19
1.7 Tehnici ale biologiei moleculare utilizate pentru identificarea cauzei bolii	28
1.8 Grupul de populație studiat	31
1.9 Afecțiuni ereditare legate de celulele cu conuri	33
2 Materiale și metode	36
2.1 Proiectul studiului	36
2.2 Subiecți	37
2.3 Evaluarea clinică	43
2.4 Prelevarea ADN-ului	43
2.5 Analiza genetică	44
2.5.1 Cartarea homozigității	44

2.5.2	Screening-ul genetic țintit	44
2.5.3	Tehnici de pregătire a bibliotecii exomului	47
2.5.4	Analiza datelor	55
2.6	Studiul expresiei DYSF în biopsia musculară a pacienților	62
2.7	Studiul matisării <i>CEP78</i>	62
2.8	Studiul expresiei <i>CEP78</i>	63
3	Rezultate	65
3.1	Familii autosomal dominante cu variante ale genei <i>GUCY2D</i>	70
3.2	Familia autosomal recesivă MOL0339 cu variante în genele <i>ALMS1</i> și <i>DYSF</i>	80
3.3	Familiiile autosomal recesive MOL0056 și MOL0858 cu variante ale genelor <i>CDHR1</i> și <i>C8orf37</i>	87
3.4	Familia autosomal recesivă MOL0107 cu variantele <i>CACNA1F</i> și <i>ALMS1</i>	88
3.5	Familia autosomal recesivă MOL0048	89
3.6	Rezultatele preliminare de la un set adițional de familii cu degenerescență retiniană	89
3.6.1	Familii cu variantele <i>CNGB3</i>	93
3.6.2	Familia MOL0474 cu varianta <i>CNGA3</i>	96
3.6.3	Familia MOL0584 cu variantele <i>ABCA4</i>	97
3.6.4	Familia MOL0499 cu variantele <i>CYP4V2</i> și <i>CNGB3</i>	97
3.6.5	Familia MOL0061 cu varianta <i>CACNA1F</i>	98
3.6.6	Familia MOL1124 cu varianta <i>RPGRIP1</i>	99
3.6.7	Familii autosomal recesive cu noile variante ale genei <i>CEP78</i>	99
3.6.8	Analiza studiilor de matisare și expresie a <i>CEP78</i>	101
4	Discuție	104
4.1	Mutațiile <i>GUCY2D</i>	105
4.2	Prezența simultană a mutațiilor în genele <i>ALMS1</i> și <i>DYSF</i>	107
4.3	Mutații în genele <i>CDHR1</i> și <i>C8orf37</i>	110
4.4	Prezența simultană a mutațiilor în genele <i>CACNA1F</i> și <i>ALMS1</i>	111
4.5	Mutație în gena <i>RPGRIP1</i>	113

4.6	Mutații în gena <i>ABCA4</i>	114
4.7	Mutații în gena <i>CNGB3</i>	114
4.8	Variantă genetică în gena <i>CNGA3</i>	115
4.9	Prezența simultană a variantelor genetice <i>CYP4V2</i> și <i>CNGB3</i> . .	116
4.10	Mutațiile <i>CEP78</i>	116
4.11	Concluzii	118
	Anexe	119
	Referințe bibliografice	130

Cuvinte cheie

Afecțiuni ale retinei

Genetică umană

Degenerarea fotoreceptorilor

Pierderea vederii

Secvențializarea întregului exom

GUCY2D

ALMS1

DYSF

CEP78

Introducere

Afecțiunile oculare compromit calitatea vieții pentru milioane de persoane din toată lumea. La oameni, degenerarea fotoreceptorilor este principala cauză a unui grup de deficiențe ereditare, numite boli degenerative ale retinei (retinal degenerative diseases -RDDs). Până acum, au fost identificate mutații în peste 200 de gene și peste 250 de loci genetici au fost asociați cu RDDs (RetNet, <https://sph.uth.edu/retnet/>) (Figura 1), afecțiuni care au o gamă largă de manifestări clinice. Distrofiile retiniene pot afecta unul sau ambele tipuri de fotoreceptori precum și alte țesuturi ale ochilor și pot face parte dintr-o boală sistemică mai complexă care afectează diverse țesuturi și organe la indivizii afectați.

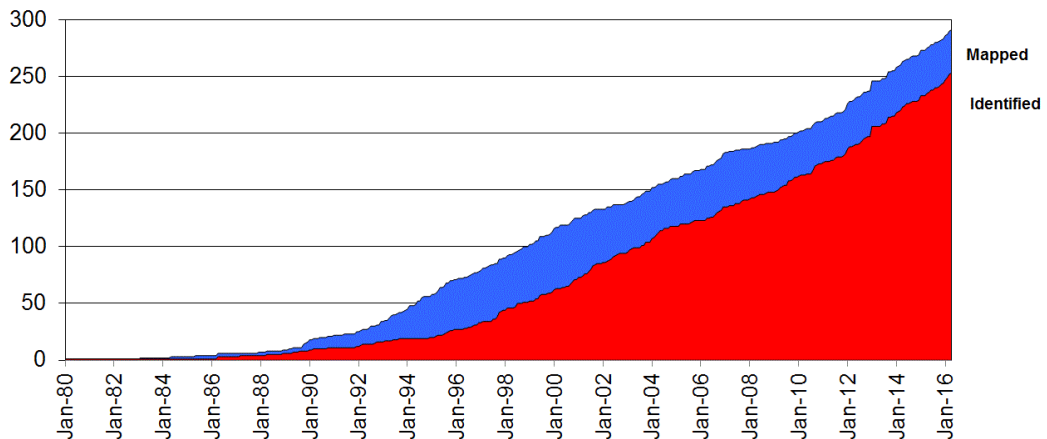


Figura 1: **Diagrama genelor cauzatoare de retinopatii, cartate și identificate.** Numărul genelor identificate (cu roșu) și al locilor genetici cartate (cu albastru) este reprezentat pe perioada 1980-2016 (RetNet, May 11, 2016).

RDDs sunt afecțiuni foarte eterogene din punct de vedere clinic și genetic, care pot afecta diverse aspecte ale funcției fotoreceptoare normale. Deși s-a dovedit că mutații într-un număr ridicat de gene cauzează boli ale retinei, acestea explică doar o mică parte dintre cazurile observate și există multe lacune în ceea ce se știe despre mecanismele moleculare care stau la baza acestora, opțiunile de trata-

ment disponibile fiind astfel limitate. În ultimele decenii, tehnici precum analiza în lanțuirii, cartarea homozigoției și secvențializarea țintită au fost aplicate cu succes pentru identificarea genei răspunzătoare pentru boală. Mai recent, tehnicile de secvențializare de nouă generație (NGS) au oferit posibilități din ce în ce mai mari pentru identificarea mai rapidă și mai eficientă a genei cauzatoare de boală, pentru descoperirea de noi asocieri genotip-fenotip și pentru identificarea factorilor genetici care afectează severitatea fenotipului și progresul bolii. Lu-crarea de față descrie aplicarea cu succes a metodelor genetice moleculare, NGS și bioinformatică în descoperirea formei defecte a genei pentru RDD cu mani-festări fenotipice diferite. Caracterizarea genetică, inclusiv identificarea de noi gene cauzatoare de boală sau de noi variante genetice la gene cunoscute, este o cerință importantă pentru intervenția terapeutică și poate servi ca bază pentru dezvoltarea de noi metode terapeutice.

Boli degenerative ale retinei (RDDs)

În linii mari, RDDs pot fi împărțite în afecțiuni monogenice și multifactoriale. Subtipurile monogenice sunt cauzate de mutații într-o singură genă, care urmează un model mendelian de transmitere și pot fi autosomal dominante (AD), autosomal recesive (AR) sau recesive legate de cromozomul X (X-lincat - XL). Retinita pigmentară (RP), nictalopia staționară congenitală (CSNB), distrofiile fotoreceptorilor cu conuri și cu conuri și bastonașe (CD și CRD), amauroza congenitală Leber (LCA) și degenerescenta maculară (MD) sunt câteva dintre subtipurile monogenice (Berger et al., 2010). Entitățile multifactoriale complexe rezultă din interacțiunea mai multor factori genetici și non-genetici (epigenetici sauși de mediu) și includ degenerescenta maculară corelată cu vârsta, retinopatia dia-betică și glaucomul (CookeBailey et al., 2013). Lu-crarea de față se concentrează pe distrofiile retiniene cauzate de mutații într-o singură genă.

Bolile retiniene monogenice afectează aproximativ 1 din 2000 de indivizi (Berger et al., 2010), manifestându-se prin disfuncții ușoare ale retinei, degenerare severă a retinei sau cecitate legală. Pentru majoritatea RDDs nu există opțiuni de trata-ment, iar diagnosticarea lor moleculară e îngreunată de eterogenitatea genetică și fenotipică extrem de ridicată. Din această cauză, o diagnostic genetic cert

este posibil numai pentru aproximativ jumătate dintre cei afectați (Berger et al., 2010).

RDDs pot fi împărțite în mai multe categorii în funcție de implicarea celulelor cu bastonașe *versus* conuri, degenerarea generalizată a fotoreceptorilor și a țesuturilor de susținere ale acestora, precum și implicarea altor țesuturi oculare. Pierderea inițială a fotoreceptorilor cu bastonașe este deseori urmată de disfuncția conurilor în cazul RP, însă un defect inițial la nivelul conurilor poate sau nu să fie însoțit de implicarea celulelor cu bastonașe. Atât celulele cu conuri cât și cele cu bastonașe sunt afectate în cazul CRD, dar numai fotoreceptorii cu conuri degenerază în cazul CD. MD atrage după sine o disfuncție mai generalizată a fotoreceptorilor și a țesuturilor de susținere a retinei din regiunea maculară, rezultând în pierderea vederii centrale. Distrofiile monogenice ale retinei pot fi la rândul lor clasificate în forme non-sindromice (când doar țesuturile oculare sunt afectate, de ex. RP, CD, CRD, LCA etc.) și sindromice ale bolii (când fenotipul ocular este asociat cu patologia multor altor țesuturi). Printre afecțiunile sindromice se numără sindromul Usher (o combinație între RP și deficiență auditivă), sindromul Bardet-Biedl (ale cărui caracteristici principale includ RP, polidactilie, obezitate, anomalii renale și genitale, întârzieri în dezvoltare, dificultăți de învățare), sindromul Alström (o distrofie progresivă a fotoreceptorilor cu conuri și bastonașe însoțită de numeroase manifestări sistemice precum pierderea senzorieală a auzului, obezitate, statură mică la maturitate, diabet de tip II, cardiomiopatie, disfuncție pulmonară, hepatică și renală progresivă) (Berger et al., 2010). Deseori corelații clare genotip-fenotip sunt greu de făcut din cauza suprapunerii genetice și clinice între diversele forme ale bolii (Figura 2) (Berger et al., 2010, Siemiakowska et al., 2014).

Caracteristici clinice multiple pot fi determinate de mutații ale aceleiași gene (de ex. mutațiile *ABCA4* și *RPE65* cauzează de obicei apariția MD și, respectiv, LCA, dar sunt deseori asociate unui fenotip asemănător RP). Mutații în cadrul aceleiași gene care urmează modele de transmitere ereditară diferite (de ex. mutații AD în gena *GUCY2D* cauzează CRD, în timp ce mutații AR cauzează LCA) sau cele care afectează regiuni funcționale diferite ale proteinei codificate pot rezulta, de asemenea, în forme fenotipice diferite ale bolii (de ex. mutații la capătul 3' al exonului alternativ ORF15 al genei *RPGR* tind să provoace CRD

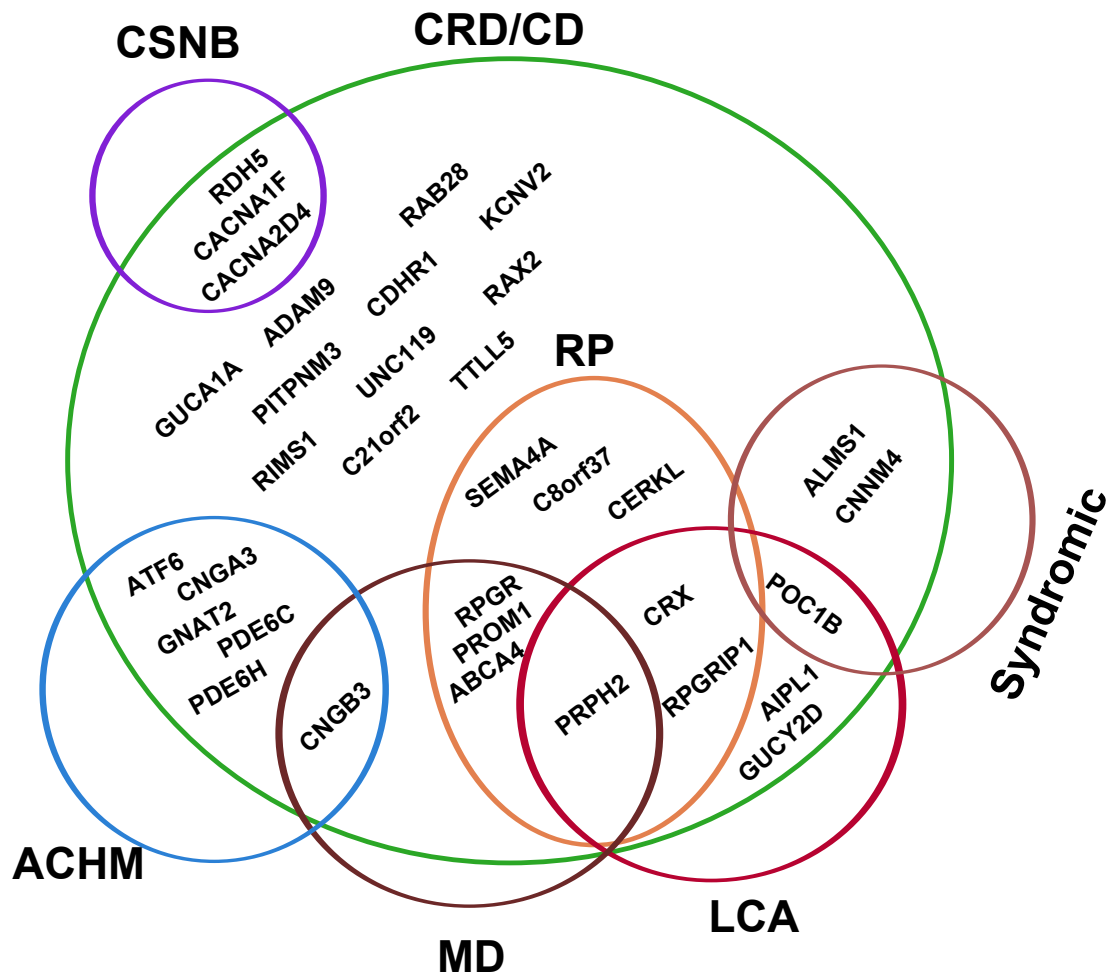


Figure 2: Suprapunerea genetică a genelor cauzatoare de distrofie a celulelor cu conuri și cu conuri și bastonașe cu alte forme de afecțiuni ale retinei. Simbolurile genelor care fac parte din zonele suprapuse arată că mutații ale aceleiași gene pot duce la manifestări fenotipice diferite. Cerculețele colorate indică forme diferite de degenerescență retiniană. CSNB, nictalopia staționară congenitală; CRD, distrofia celulelor cu conuri și bastonașe; CD, distrofia celulelor cu conuri; RP, retinita pigmentară; ACHM, acromatopsia; MD, degenerescența maculară; LCA, amauroza congenitală Leber și forme sindromice de retinopatii (modificat după Berger et al., 2010).

și nu RP) (Berger et al., 2010). Mai mult decât atât, mutațiile din genele asociate bolii sindromice pot și ele provoca afecțiunea retiniană non-sindromică (de ex. mutații în gena *CEP290* sunt asociate cu sindroamele Bardet-Biedl, Senior-Loken și Joubert, dar provoacă de asemenea LCA). Prin urmare, este important ca o descriere clinică minuțioasă a fenotipului precum și a descoperirilor adiționale, ca de pildă caracteristici sindromice, să fie disponibilă pentru o caracterizare moleculară optimă.

Tehnici ale biologiei moleculare utilizate pentru identificarea cauzei bolii

De-a lungul ultimelor decenii au fost dezvoltate mai multe strategii care au ajutat la îmbunătățirea șanselor de identificare a mutațiilor detrimentale în cazul afecțiunilor retinei (Neveling et al., 2013, Ratnapriya et al., 2013, Siemiatkowska et al., 2014).

Cunoașterea arborelui genealogic este un prim pas important în identificarea genei responsabile de boală, deoarece de multe ori oferă indicii esențiale cu privire la o potențială selecție a genelor care trebuie luate în considerare prima dată când se efectuează testarea genetică moleculară. O genealogie care se întinde de-a lungul mai multor generații împreună cu un istoric detaliat al cazurilor oferă informații despre relațiile de familie și despre posibilitatea de a prevedea modelul de ereditate urmat de o anumită trăsătură (caracter fenotipic). Cu toate acestea, uneori un individ diagnosticat cu o anumită afecțiune nu are alți membri ai familiei cu aceeași maladie de ex. ca urmare a unor mutații *de novo* (o mutație care apare pentru prima oară într-o familie). O anumită trăsătură poate manifesta grade variabile de penetrare, caz în care nu toți indivizii purtători ai unei anume mutații vor prezenta simptome clinice similare. De asemenea, factori de mediu sau factori genetici suplimentari prezenți în alți indivizi pot duce la semne mai ușoare ale manifestării bolii sau la o vârstă mai înaintată la care se declanșează boala.

Strategiile inițiale de screening folosite pentru descoperirea mutațiilor detrimentale implică adesea o analiză țintită a "zonelor fierbinți" ale mutațiilor (regiuni unde se observă cu frecvență mai ridicată mutații), a anumitor mutații fondatoare (mutații care au loc ca rezultat al pierderii variației genetice atunci când un număr

mic de indivizi pune bazele unei noi populații) sau o selecție a mutațiilor frecvent identificate în cazuri similare, urmate de secvențializarea altor exoni ai unei gene (Berger et al., 2010, Siemiatkowska et al., 2014). Secvențializarea Sanger este tehnica folosită cel mai des pentru analizarea țintită a mutațiilor specifice care apar într-un subgrup de gene sau pentru screening-ul țintit al genelor cu un număr limitat de exoni. Printre avantajele acesteia, se numără precizia, viteza și costul relativ scăzut, însă folosirea acestei metode pentru screening-uri la scară largă ar necesita o utilizare intensivă a forței de muncă. Dacă nu se identifică mutații cunoscute folosind secvențializarea țintită Sanger, mostrele pot fi analizate cu ajutorul strategiilor de screening la scară largă, precum mutațiile punctiforme (polimorfismul la nivelul unei singure nucleotide) (SNP) sau strategii NGS.

Strategiile NGS permit o analiză comprehensivă a întregului genom sau a anumitor părți din acesta și fac posibilă identificarea eficientă a mutațiilor și a unor noi gene cauzatoare de boală chiar și în familii mici cu un număr restrâns de membri afectați sau cu indivizi fără legături de rudenie (Metzker et al., 2010, Ng et al., 2010). Analizarea țintită a tuturor sau a unui anume subgrup de gene implicate anterior în afecțiuni ale retinei poate fi efectuată utilizându-se o abordare țintită NGS. Secvențializarea țintită este rentabilă, permite identificarea mutațiilor în gene cauzatoare de boală cunoscute deja și oferă flexibilitate în ceea ce privește diagnosticul clinic, ceea ce poate fi dificil de făcut având în vedere suprapunerea fenotipică între diversele forme ale afecțiunilor retiniene. Această abordare este folositoare și în cazuri izolate, când mutațiile de novo au loc doar la un membru al familiei (Siemiatkowska et al., 2014). Dacă abordarea țintită nu dezvăluie o posibilă variantă cauzatoare de boală, se ia în considerare de obicei secvențializarea exomului. Secvențializarea întregului exom (WES) este secvențializarea țintită a tuturor regiunilor care codifică proteine (exoni), ceea ce constituie ~1-2% din genomul uman (Ng et al., 2009) și care adăpostesc ~85% dintre mutațiile rare care afectează funcția proteică (Cooper1995). Secvențializarea exomului în scopul identificării de noi gene responsabile de boală sau de variante genetice care pot cauza boli în cadrul unor afecțiuni mendeliene rare se bucură de o largă recunoaștere (Ng et al., 2010, Bamshad et al., 2011, Gilissen et al., 2011). Secvențializarea exomului este adecvată pentru diagnosticarea moleculară a unor familii cu efectiv mic, afectate de boli eterogene din punct de vedere genetic și

fenotipic, precum RDDs. Rata de succes a WES crește în mod semnificativ atunci când se folosește în combinație cu informația pozițională obținută din analiza de înlănțuire sau HM cu mai multe exemple în RDD (Estrada-Cuzcano et al., 2012, Neveling et al., 2013, Roosing et al., 2013, Kohl et al., 2015). Cu toate acestea, analizarea datelor obținute prin WES poate fi o provocare din cauza numărului mare de variante identificate, ceea ce mărește probabilitatea descoperirilor incidentale (Neveling et al., 2013). Analizarea riguroasă a datelor și filtrarea atentă a variantelor sunt esențiale pentru identificarea precisă a variantelor genetice asociate bolii. Limitările secvențierii exomului se referă la imposibilitatea de a analiza regiuni genomice conservate sau cu rol reglator, din afara regiunii codificatoare și pot duce la o scădere sau la un dezechilibru în nivelurile de transcript. WES nu detectează variantele necodificatoare sau profund intronice, alterările genomice extinse și variantele structurale (inserțiile, delețiile, duplicările, variantele numărului de copii, inversiunile și translocările), deși inserții și deleții minore prezente în interiorul regiunii codificatoare pot fi uneori detectate cu succes (Ng et al., 2009, Bamshad et al., 2011, Ratnapriya et al., 2013, Siemiatkowska et al., 2014). În același timp, permite analizarea a de 20 de ori mai multe mostre decât secvențializarea întregului genom (WGS) și de aceea este soluția optimă pentru identificarea variantelor rare cu implicație medicală (Ng et al., 2009). WGS poate fi folosit pentru identificarea variantelor din exteriorul regiunilor codificatoare în cazurile în care alte metode nu dau rezultat (Audo et al., 2012, Nishiguchi et al., 2013). Pe măsură ce costurile legate de WGS scad, aceasta devine disponibilă pentru o gamă mai extinsă de laboratoare, însă limitările tehnologice legate de analizarea și gestionarea unor seturi mari de date sunt încă valabile (Ratnapriya et al., 2013, Siemiatkowska et al., 2014). Din cele ~ 3 milioane de variante detectate în fiecare genom individual, o potențială variantă cauzatoare de boală este dificil de identificat și, în plus, efectele variantelor cu rol reglator și intronice nu sunt clare, studii suplimentare fiind necesare pentru a înțelege implicația lor funcțională (Siemiatkowska et al., 2014).

Grupul de populație studiat

Populațiile israeliene și palestinieni includ un număr însemnat de subpopulații semi-izolate, în rândul cărora frecvența căsătoriilor intracomunitare este relativ ridicată (Cohen et al., 2004). Aceste grupuri etnice includ evrei de diverse origini, subpopulații arab-musulmane, arab-creștine, de beduini și druzi care diferă din punctul de vedere al religiei și al originii geografice/culturale (Vardi-Saliternic et al., 2002, Zlotogora et al., 2010, Lazar et al., 2015a). Drept consecință, căsătoriile consangvine sunt larg răspândite, ceea ce a dus la o alcătuire genetică unică (Vardi-Saliternic et al., 2002, Beryozkin et al., 2014). Rata de consangvinitate este printre cele mai ridicate la beduini, unde în jur de 70% dintre căsătorii au loc între veri de gradul al doilea sau mai apropiați (Zlotogora et al., 2010). În rândul musulmanilor arabi și al druzilor, mai mult de 25% dintre căsătorii au loc între veri primari, iar încă 20% dintre căsătorii sunt între soți înrudiți în alte moduri (Beryozkin et al., 2014). Drept comparație, mai puțin de 1% dintre căsătorii sunt consangvine în rândul populației nord-americe (Beryozkin et al., 2014).

Proporția relativ ridicată de consangvinitate are ca rezultat o frecvență mai mare a bolilor ereditare, în special a celor cu model de transmitere AR (Zlotogora et al., 2010). Acest lucru este de asemenea valabil pentru distrofiile retiniene în care mutațiile homozigote cauzatoare de boală sunt deseori identificate (Zelinger et al., 2010, Cohen et al., 2012, Beryozkin et al., 2015). De exemplu, s-a dovedit că 49% dintre cazurile de RP dintr-o cohortă de 183 de familii sunt AR ca urmare a consangvinității și a admixturii limitate în rândul diferitelor subpopulații (Sharon et al., 2015). În schimb, transmiterea ereditară AD a RP în rândul populațiilor israeliene și palestinieni nu este frecventă, cu doar 8% spre deosebire de 30% până la 40% la alte populații (Hartong et al., 2006, Sharon et al., 2015). Incidența ridicată a afecțiunii AR mărește posibilitatea descoperirii de noi gene și de noi mutații în gene cunoscute.

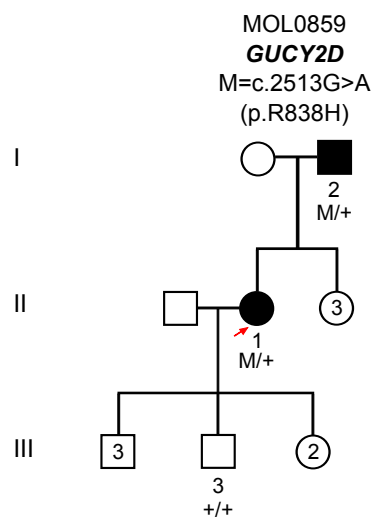
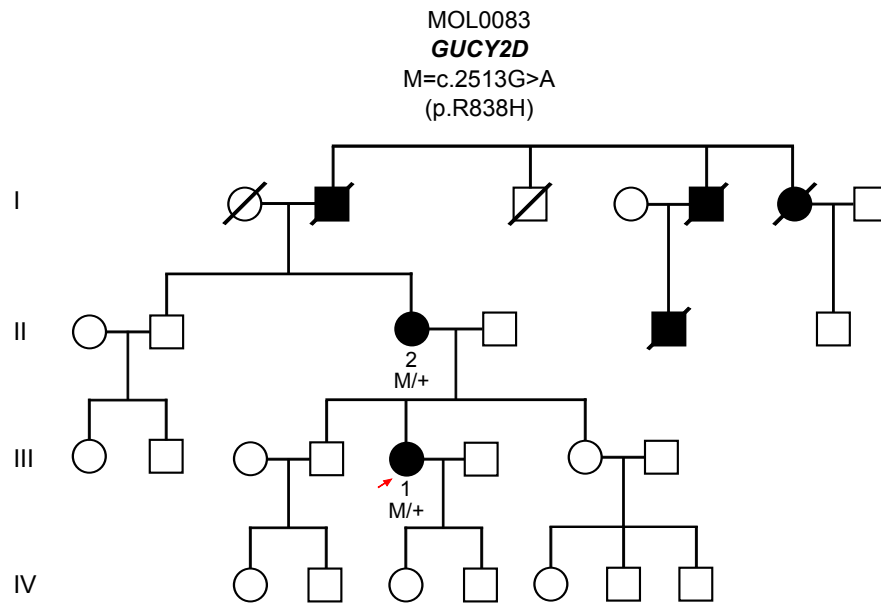
Astfel, modurile de transmitere ereditară și cauzele genetice ale bolilor în Israel diferă de cele întâlnite la populații europene și nord-americe, făcând ca populația israeliană să fie o sursă bogată de informație pentru noi descoperiri în domeniul geneticii.

Rezultate

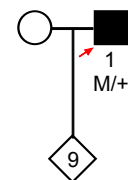
Analiza SNP a întregului genom urmată de WES a fost efectuată pe un set inițial de 27 de indivizi din 8 familii neînrudite cu fenotipuri retiniene dominate de celule cu conuri (Figura 3). Familiile MOL0490, MOL0859 și MOL1103 au prezentat un model ereditar aparent AD, familiile MOL0056, MOL0858 și MOL0339 erau consangvine cu ereditate AR și segregarea bolii sugera ereditate XL sau AR la familiile MOL0107 și MOL0048. Ca parte a unui efort continuu de a caracteriza afecțiunile retiniene la populația israeliană, un set suplimentar de 20 (Tabel 1.) de familii prezentând diverse forme de degenerescență retiniană au fost studiate ulterior.

Analiza moleculară genetică care a inclus screening-ul familiei pentru depistarea mutațiilor fondatoare printre familiile cu aceeași origine etnică nu a relevat mutații cauzale (Lazar et al., 2015a). Analiza SNP a întregului genom a relevat șase regiuni genomice homozigote la familia MOL0858 pe cromozomii 2, 8, 11, 16 și 21 și o singură regiune homozigotă la familia MOL0339 pe cromozomul 2 (Tabel 2). Analiza SNP a întregului genom a fost de asemenea efectuată pe unii membri a 5 dintre cele 20 de familii studiate adițional: MOL0360, MOL0364, MOL0474, MOL0679 și MOL0563 (Tabel 2).

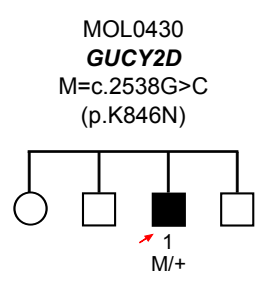
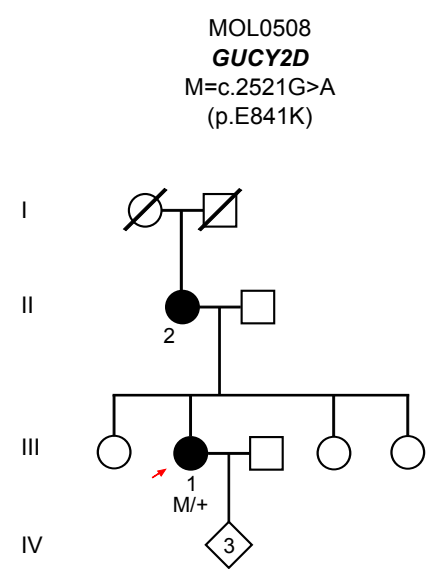
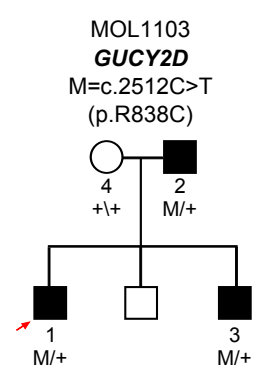
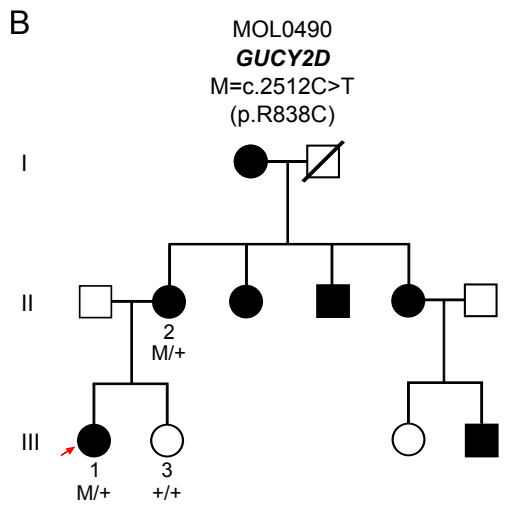
A



MOL0248
GUCY2D
M=c.2513G>A
(p.R838H)



B



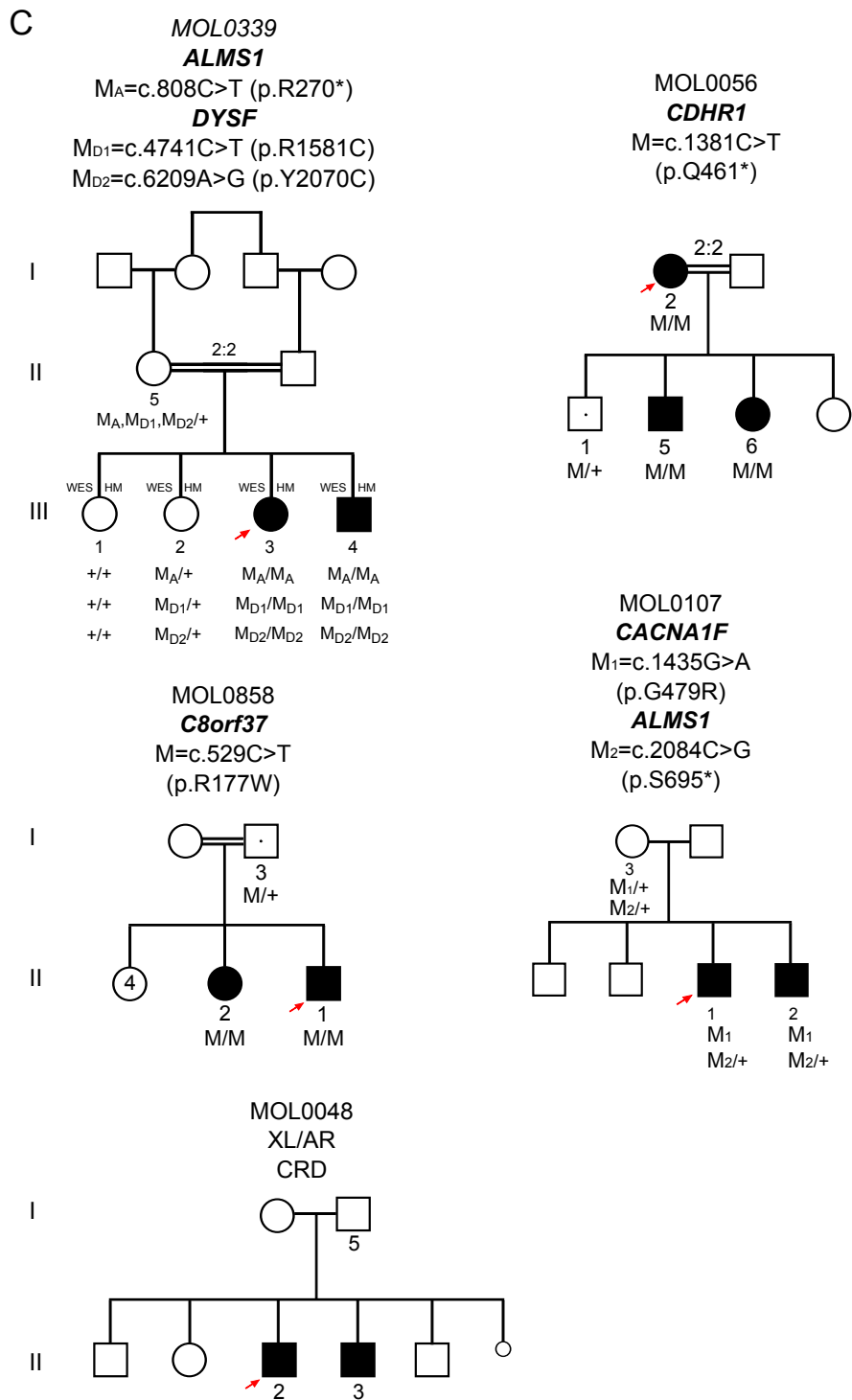


Figura 3: Structura pedigree-ului familiilor studiate. Se arată identificatorii

famiiliilor, numele genelor și modificările de codificare identificate. Segregarea din familii este indicată n felul următor: M/M, homozigotă pentru mutație; M/+, heterozigotă; +/+ homozigotă pentru alele de tip sălbatic. Simbolurile umplute reprezintă indivizi afectați, simbolurile goale reprezintă indivizi neafectați, cercurile și pătratele reprezintă persoane de sex feminin, respectiv masculin, romburile reprezintă indivizi de sex necunoscut, un cerculeț reprezintă un copil mort la naștere. Numerele din interiorul simbolurilor indică numărul de frați similari de același sex. Săgețile roșii reprezintă cazurile de referință. Căsătoriile consangvine sunt reprezentate de linii duble, iar relațiile ntre veri primari sunt marcate de 2:2. (A) Familii cu model ereditar dominantcu mutații p.R838H *GUCY2D*. (B) Familii cu model ereditar dominantal mutațiilor p.R838C, p.E841K și p.K846N *GUCY2D*. (C) Familii cu model ereditar recesiv cu mutații *ALMS1*, *CDHR1*, *C8orf37*, *CACNA1F* și familia nerezolvată MOL0048 (modificat după Lazar et al., 2015a).

Analizarea datelor WES a dus la identificarea a cinci mutații descoperite anterior și a patru noi variante potențial cauzatoare de boală (Tabel 3). S-a descoperit că familiile MOL0490, MOL0859 și MOL1103 erau purtătoare de mutații ale genei *GUCY2D*. La familiile MOL0056, MOL0107 și MOL0858 am identificat mutații cunoscute la genele *CDHR1*, *ALMS1* și, respectiv, *C8orf37*. O nouă variantă a genei *ALMS1* a fost identificată la familia MOL0339 și o a doua nouă variantă potențial asociată maladiei, în gena *CACNA1F* a fost identificată la familia MOL0107. Toate variantele au fost validate de secvențializarea Sanger și segregate cu fenotipul afecțiunii. O analiză complexă a variantelor identificate din datele exomului nu a relevat o potențială mutație cauzatoare care a arătat segregare cu boala la familia MOL0048 (Lazar et al., 2015a).

Tabel 1: Lista familiilor adiționale cu diverse forme de degenerescentă retiniană.

	Identificator al familiei	Tipul prezumptiv de transmitere ereditară	Fenotip	Cartarea homozigoției
1	MOL0061	XL/AR	CRD	NU
2	MOL0360	AR	CRD	DA
3	MOL0364	AR	CRD	DA
4	MOL0454	AR/XL	CRD	NU
5	MOL0474	AR	CRD+Surzire	DA
6	MOL0679	XL/AR	CRD/Sindrom Usher	DA
7	MOL1124	AR	CD/CRD/ACHM/LCA	NU
8	MOL1182	AR	CRD/CD	NU
9	MOL1190	XL	ACHM/CRD	NU
10	MOL0499	AR	Maculopatie	NU
11	MOL0563	AR	Maculopatie	DA
12	MOL0584	AD/AR	Maculopatie	NU
13	MOL1126	AR/AD	Maculopatie	NU
14	MOL1152	AR	Maculopatie	NU
15	MOL1154	AD	Maculopatie	NU
16	MOL0039	XL/AR	RP	NU
17	MOL0331	XL/AR	RP	NU
18	MOL0622	AD/XL	RP	NU
19	MOL0625	AD/XL	RP	NU
20	MOL0864	AR	RP	NU

CRD, distrofia celulelor cu conuri și bastonașe; CD, distrofia celulelor cu conuri; ACHM, acromatopsia; LCA, amauroza congenitală Leber, RP, retinita pigmentară; XL, X-lincat; AR, autosomal recesiv; AD, autosomal dominant. .

Tabel 2: Regiuni homozigote de segregare la familiile studiate.

Identificator al familiei	Fenotip	Regiuni homozigote de segregare
MOL0339	CRD	chr2: 49M-84.3M
MOL0360	CRD	chr1: 92M-109M, chr2: 180M-204M, chr3: 53M-68M și 95M-109M, chr4: 37M-58M, chr18: 8M-55M
MOL0364	CRD	chr2: 224M-238M, chr3: 153M-175M, chr21: 19M-39M
MOL0474	CRD+Surzire	chr7: 70M-78M, chr16: 17M-64M
MOL0563	Maculopatie/ACHM	chr8: 73M-95M
MOL0679	CRD/Sindrom Usher	chr9: 20M-85M, chr19: 15M-49M
MOL0858	CRD	chr2: 8M-15M și 224M-228M, chr8: 76M-103M, chr11: 110M-118M, chr16: 53M-59M, chr21: 23M-27M

CRD, distrofia celulelor cu conuri și bastonașe; ACHM, acromatopsia.

Tabel 3: Variante genetice identificate la familii israeliene cu implicare primară a celulelor cu conuri*.

Identificator al familiei	Diagnostic clinic	Mod prezumpțiv de transmitere	Origine / Grup etnic	Genă cauzatoare (exon)	Localizarea modificării nucleotidice (proteină)**	Referință
MOL0490	CD/CRD	AD	Evrei turci	GUCY2D (13)	c.2512C>T (p.R838C) heterozigotă	Kelsell et al., 1998
MOL0859	CD	AD	Evrei așkenazi	GUCY2D (13)	c.2513G>A (p.R838H) heterozigotă	Weigell-Weber et al., 2000
MOL1103	CD/CRD	AD	Arabi-musulmani	GUCY2D (13)	c.2512C>T (p.R838C) heterozigotă	Kelsell et al., 1998
MOL0083	CD	AD	Evrei așkenazi	GUCY2D (13)	c.2513G>A (p.R838H) heterozigotă	Weigell-Weber et al., 2000
MOL0248	CRD	Izolată	Evrei așkenazi	GUCY2D (13)	c.2513G>A (p.R838H) heterozigotă	Weigell-Weber et al., 2000
MOL0430	CRD	Izolată	Evrei nord-africani	GUCY2D (13)	c.2538G>C (p.K846N) heterozigotă	Nouă
MOL0508	Maculopatie + CD	AD cu penetrarea redusă	Evrei așkenazi	GUCY2D (13)	c.2521G>A (p.E841K) heterozigotă	Nouă
MOL0056	RD	AR	Arabi-musulmani	CDHR1 (13)	c.1381C>T (p.Q461*) homozigotă	Duncan et al., 2012
MOL0107	CRD	XL/AR	Evrei nord-africani așkenazi	CACNA1F (11)	c.1435G>A (p.G479R) hemizigotă	Nouă
MOL0107	CRD	XL/AR	Evrei nord-africani așkenazi	ALMS1 (8)	c.2084C>G (p.S695*) heterozigotă	Liang et al., 2013
MOL0339	CRD	AR	Arabi-musulmani	ALMS1 (5)	c.808C>T (p.R270*) homozigotă	Nouă††
MOL0339	LGMD2B	AR	Arabi-musulmani	DYSF (43)	c.4741C>T (p.R1581C)	Nouă††
MOL0339	LGMD2B	AR	Arabi-musulmani	DYSF (55)	c.6209A>G (p.Y2070C)	Nouă††
MOL0858	CRD	AR	Arabi-musulmani	C8orf37 (6)	c.529C>T (p.R177W) homozigotă	Estrada-Cuzcano et al., 2012
MOL0048	CRD	XL/AR	Arabi-musulmani	-	-	-

*Modificat după Lazar et al., 2015a. CD, distrofia celulelor cu conuri; CRD, distrofia celulelor cu conuri și bastonașe; RD, distrofie retiniană; LGMD2B, distrofia musculară a centurilor de tip 2B; AD, autosomal dominant; AR, autosomal recesiv; XL, X-lincat.

**Poziția nucleotidică a fiecărei variante genetice e bazată pe următoarele cADN-uri Gen-

Bank (număr de inventar): *GUCY2D* (NM_000180), *CDHR1* (NM_001171971), *CACNA1F* (NM_001256789), *ALMS1* (NM_015120), *DYSF* (NM_003494.3), *C8orf37* (NM_177965); Numărul nucleotidelor reflectă numerotarea cADN-ului cu +1 corespunzând A din codonul de inițiere a translației ATG în secvența de referință. Codonul de inițiere este codonul 1.

[†]Publicat de Lazar et al., 2015a.

^{††}Publicat de Lazar et al., 2015b.

Familii autosomal dominante cu variante ale genei

GUCY2D

Două mutații cu sens greșit ale genei *GUCY2D* care urmează un model ereditar dominant, au fost identificate la trei familii (Tabel 3) (Figura 3) (Lazar et al., 2015a). Familiile MOL0490 și MOL1103 au prezentat mutația c.2512C>T (p.R838

C) (Kelsell et al., 1998), iar familia MOL0859 mutația c.2513G>A (p.R838H) (Weigell-Weber et al., 2000) în exonul 13 al genei *GUCY2D*. Anterior, nu fusese descrise mutații ale genei *GUCY2D* la pacienții cu afecțiuni retiniene din populația israeliană. Pentru a găsi și alte familii cu mutația *GUCY2D*, am efectuat secvențializarea Sanger țintită a exonilor 13 și 14 la 106 alte cazuri de referință israeliene selectate din peste 1300 de familii cu afecțiune retiniană ereditară (Lazar et al., 2015a). Acest lucru a rezultat în identificarea altor patru familii cu mutație la nivelul genei *GUCY2D* (Tabel 3) (Figura 3). S-a descoperit că familia MOL0083, caracterizată cu boală dominată cu afecțiunea celulelor cu conuri, moștenită în mod autosomal dominant, și un caz izolat din familia MOL0248, erau purtători ai secvenței heterozigote modificate c.2512C>T (p.R838H), care fusese descrisă anterior. Două noi potențiale variante cauzatoare de boală au fost identificate la celelalte două familii: varianta c.2538G>C (p.K846N) la un caz izolat din familia MOL0430 și varianta c.2521G>A (p.E841K) la familia MOL0508, dominată de celule cu conuri, moștenite în mod autosomal dominant (Lazar et al., 2015a). Reziduurile de aminoacizi afectate sunt foarte conservate la nivelul tuturor speciilor și fac parte din domeniul de dimerizare al proteinei (Figura 4) (Lazar et al., 2015a).

Evaluarea clinică a indivizilor afectați de degenerescență retiniană din cele șapte familii a relevat caracteristici fenotipice asemănătoare celor prezentate an-

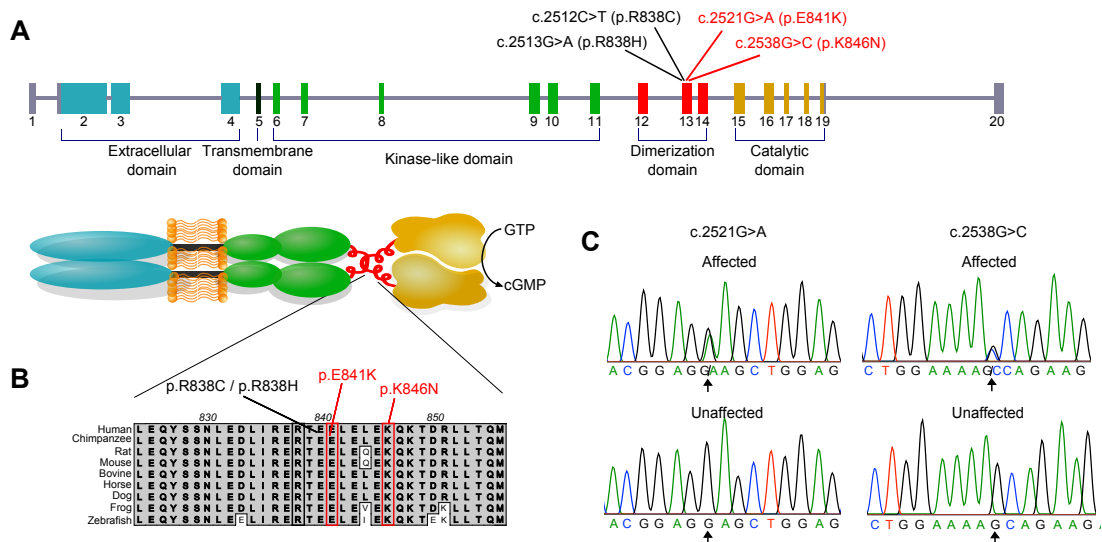


Figura 4: Reprezentare schematică a genei și a structurii proteice *GUCY2D*, conservarea inter-specii a reziduurilor de aminoacizi afectate și cromatogramele de secvențializare ale celor două noi variante descoperite.

(A) Gena *GUCY2D* este compusă din 20 de exoni care codifică 5 domenii proteice: un domeniu extracelular, un domeniu transmembranar, un domeniu asemănător kinazei, un domeniu de dimerizare și un domeniu catalitic. Exonii sunt colorați diferit în funcție de domeniile proteice codificate. Toate cele patru variante genetice identificate (cu roșu: noi, cu negru: descoperite anterior) sunt localizate pe exonul 13 al genei și se deduce că afectează proprietățile de dimerizare ale monomerilor proteici rezultați.

(B) Compararea între specii a fost generată folosind secvențele proteice GenBank (număr de inventar) de la om (NP_000171.1), cimpanzeu (XP_003315414.1), șobolan (NP_077356.1), șoarece (NP_032218.2), bovină (NP_776973.2), cal (XP_005597817.1), câine (NP_001003207.1), broască (XP_002942678.2), și pește-zebură (NP_001103165.1). Reziduurile de aminoacizi afectate de variantele genetice noi (chenare roșii) și deja cunoscute (chenare negre) sunt foarte conservate.

(C) Cromatogramele de secvențializare arată modificările heterozigoteni c.2521G > A și c.2538G > C (sus) și alelele de tip sălbatic (jos) la indivizii afectați și neafectați (săgeți) (Lazar et al., 2015a).

terior pentru afecțiunea asociată cu *GUCY2D*, transmisă în mod autosomal dominant (Gregory-Evans et al., 2000, Kitiratschky et al., 2008, Lazar et al., 2015a). Examenul de tip fund de ochi a relevat că degenerescența era limitată în principal la zona maculară, epiteliul pigmentar retinian (retinal pigment epithelium - RPE) a prezentat modificări de tip "sare și piper" care apar când pete mici de pigment închis la culoare se amestecă cu zone de depigmentare albicioase. La cazurile mai grave, o atrofiere clar delimitată era evidentă în zonele foveală și parafoveală (Figura 5 A, B) (Lazar et al., 2015a).

Imagistica FAF a relevat modificări atrofice care variau de la puncte hipofluorescente mici la pacienții tineri care prezentau o formă fenotipică ușoară, la zone hipofluorescente mari, bine delimitate, care erau înconjurate de un inel hipofluorescent la cazurile grave. Prezența afecțiunii dominate de celulele cu conuri a fost confirmată de examenul de câmp vizual care a relevat o implicare maculară semnificativă. Imagistica OCT a indicat un nivel similar al implicării RPE și a fotoreceptorilor maculari. O ușoară subțiere a stratului fotoreceptor a fost evidentă în fazele timpurii, cu "cavitații" ale complexului fotoreceptor segment intern-segment extern în zona foveală (Figura 5 A) (Lazar et al., 2015a). La cazurile grave, s-a înregistrat pierderea completă a stratului fotoreceptor și atrofiere cu radiație secundară coroidală (Figura 5. B) (Lazar et al., 2015a). Retina periferică prezenta în general parametrii în limitele normale, în afara unor modificări asociate cu miopia severă. Testarea de perimetrie și microperimetrie a relevat scotoame centrale parțiale și/sau absolute cu câmpuri periferice menținute (Figura 5. A, B) (Lazar et al., 2015a).

Familia autosomal recesivă MOL0339 cu variante în genele *ALMS1* și *DYSF*

Familia MOL0339 este o familie consangvină de două generații cu doi frați care prezintă fenotipuri severe de CRD autosomal recesiv și distrofie musculară, apărute timpurii (Figura 3) (Lazar et al., 2015b). Părinții celor doi frați afectați sunt veri de gradul I, prin urmare e probabil ca mutațiile cauzatoare de boală să facă parte din regiuni homozigote mari comune indivizilor afectați. Combinația de fenotip ocular dominat de celulele cu conuri și distrofie musculară nu a fost raportată an-

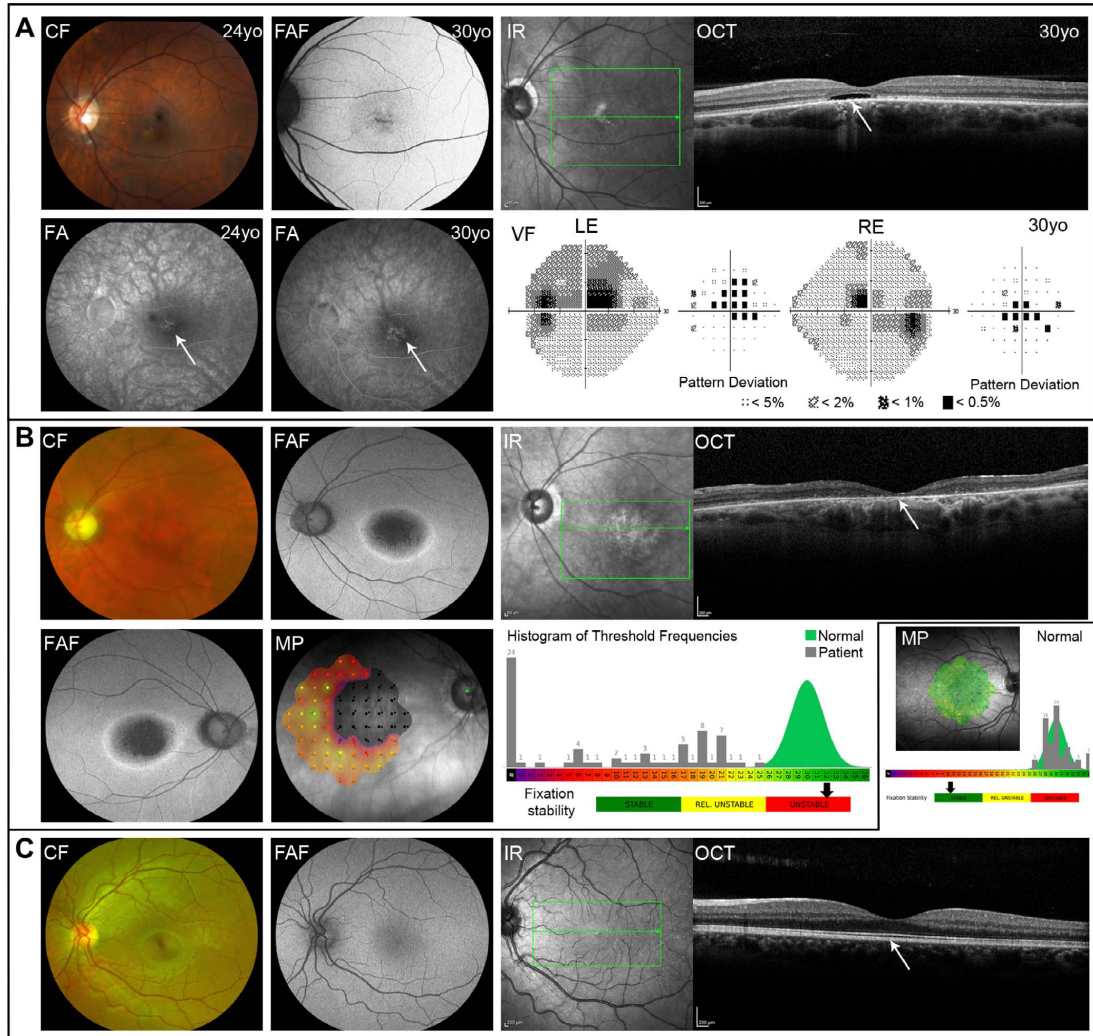


Figure 5: **Simptome oculare ale degenerescentei retiniene asociate *GUCY2D*.**(A) Imagistica și funcția retiniană la pacientul MOL0430 I:1, cu o manifestare relativ ușoară a afecțiunii. Fotografia color a fundului de ochi (CF) și angiografia cu fluoresceină (FA) efectuate la vârsta de 24 de ani relevă modificări locale RPE maculare cu pătare, care s-au amplificat până la vârsta de 30 de ani. Studiarea autofluorescenței fundului de ochi (FAF) la vârsta de 30 de ani arată zone mici de atrofie n regiunea foveală, iar ”cavitatația foveală” hipodensă este prezentă pe tomografia n coerență optică OCT (săgeată). Testarea perimetriei statice arată scotoame centrale la ambii ochi. LE (left eye), ochiul stâng; RE (right eye), ochiul drept. (B) Patologia oculară la pacientul MOL0248 I:1, care suferă de o afecțiune severă la vrsta de 59 de ani. Imagistica multicoloră, FAF și cu infraroșu (IR) a ochiului stng indică atrofie maculară centrală, cu pierderea stratului fotoreceptor în zona foveală pe OCT (săgeată). Simetria dintre ochiul stng și cel drept este exemplificată de imaginile FAF (a se observa zona hipofluorescentă nchisă și inelul hipofluorescent din jur). Examinarea microperimetriei ochiului drept relevă un scotom central absolut și sensibilitate redusă în spatele acestuia, cu fixare proastă. (C) Microperimetria și imagistica de la un individ neafectat n vârstă de 32 de ani sunt prezentate pentru comparație (Lazar et al., 2015a).

terior, deci am presupus că acestea pot face parte dintr-un sindrom nou, cauzat de o mutație la nivelul unei singure gene, sau că pot rezulta din mutații distincte la nivelul a două gene diferite. S-a efectuat analiza SNP a întregului genom, urmată de WES, pentru a determina cauza celor două fenotipuri. Cartarea homozigotiei a fost realizată la doi frați afectați (MOL0339 III:3; MOL0339 III:4) și la doi neafectați (MOL0339 III:1, MOL0339 III:2) iar analizarea datelor a relevat o singură regiune homozigotă pe cromozomul 2, întinzându-se pe o arie de 35.3 Mb (Lazar et al., 2015b). Niciuna dintre cele 263 de gene prezente în această regiune nu fusese anterior asociată cu CRD non-sindromic transmis în mod AR. Analiza WES a relevat trei noi variante genetice la două gene independente, *ALMS1* și *DYSF* (Tabel 3). Atât *ALMS1* cât și *DYSF* fac parte din regiunea homozigotă de 35.3Mb identificată de HM. Mutații la nivelul *ALMS1* provoacă sindromul Alström (Marshall et al., 2015) iar mutații la *DYSF* provoacă distrofia musculară a centurilor (limb-girdle muscular dystrophy-LGMD) sau distrofia musculară Miyoshi (Liu et al., 1998). O variantă nouă fără sens c.808C>T (p.R270*) a fost identificată pe exonul 5 al genei *ALMS1* și două noi variante cu sens greșit potențial cauzatoare de boli c.4741C>T (p.R1581C) și c.6209A>G (p.Y2070C) pe exonii 43 și 55 ai genei *DYSF* (Lazar et al., 2015b). S-a utilizat secvențializarea Sanger pentru validarea tuturor variantelor și pentru confirmarea co-segregării variantelor identificate cu fenotipul observat. În încercarea de a elimina posibilitatea prezenței variantelor asociate cu boala la nivelul genelor asociate anterior cu degenerescența fotoreceptorilor însoțită de o anumită formă de implicare musculară, am efectuat examinarea vizuală a fragmentelor secvențializate din datele WES. Nu s-au găsit variante codificatoare rare sau aberații genetice mari în niciuna dintre următoarele gene: *FLVCR1*, *DTHD1*, *OPA3*, *ELOVL4*, *ABHD12*, *PRPS1*, *MT-ATP6* (Lazar et al., 2015b) (RetNet, <https://sph.uth.edu/retnet/>). Un set de 87 de cazuri de referință prezentând degenerescență retiniană ereditară au fost verificate pentru a se depista modificarea c.808C>T la gena *ALMS1* pentru a se vedea dacă varianta exonului 5 este o mutație fondatoare la populația arab-musulmană (Lazar et al., 2015b). Nu a mai fost identificat nici un alt individ purtător al acestei mutații sau al altor variante potențial cauzatoare de boală la exonul 5.

Familiile autosomal recesive MOL0056 și MOL0858 cu variante ale genelor *CDHR1* și *C8orf37*

Variante genetice anterior publicate au fost identificate la două dintre familiile autosomal recesive studiate: MOL0056 și MOL0858 (Figura 3)(Tabel 3). WES urmat de analizarea datelor a relevat o mutație fără sens cunoscută deja, c.1381C>T (p.Q461*) (Duncan et al., 2012) la exonul 13 al genei *CDHR1* la familia MOL0056 și o mutație cu sens greșit anterior publicată, c.529C>T (p.R177W) (Estrada-Cuzcano et al., 2012) la exonul 6 al genei *C8orf37* la familia MOL0858 (Lazar et al., 2015a). Familia MOL0056 a fost diagnosticată clinic cu degenerescență retiniană instalată timpuriu în timp ce evaluarea clinică a familiei MOL0858 a relevat un fenotip CRD avansat cu o deficiență semnificativă a vederii cromatice. Genotiparea SNP a întregului genom în analiza anterioară WES a familiei MOL0858 a relevat șase mari regiuni homozigote de segregare: chr2, 8M-15M și 224M-228M; chr8, 76M-103M; chr11, 110M-118M; chr16, 53M-59M și chr21, 23M-27M (Tabel 2) (Lazar et al., 2015a). Varianta c.529C>T (p.R177W) a genei *C8orf37*, raportată anterior, face parte din zona homozigotă de 27Mb identificată între 76 și 103 Mb pe cromozomul 8.

Familia autosomal recesivă MOL0107 cu variantele *CACNA1F* și *ALMS1*

Frații afectați din familia MOL0107 au fost diagnosticați cu distrofia celulelor cu conuri și bastonașe, instalată timpuriu. WES urmat de analizarea datelor a relevat o nouă variantă potențial cauzatoare de boală c.1435G>A (p.G479R) pe exonul 11 al genei *CACNA1F* (Figura 3) (Tabel 3). În plus, toți cei 3 indivizi erau heterozigoți pentru o mutație fără sens cunoscută deja, c.2084C>G (p.S695*) (Liang et al., 2013) în exonul 8 al genei *ALMS1* (Tabel 3). Prezența ambelor variante a fost validată de secvențializarea Sanger. Diagnosticarea clinică a celor doi indivizi afectați a relevat un fenotip CRD avansat, instalat timpuriu.

Familia autosomal recesivă MOL0048

Familia MOL0048 a fost diagnosticată clinic cu degenerescentă retiniană dominată de celule cu conuri, ambii frați de sex masculin prezentând o disfuncție a celulelor cu conuri ușoară până la moderată (Figura 2.3)(Lazar et al., 2015a). Nu a existat niciun raport de consangvinitate în cadrul acestei familii, prin urmare am presupus că retinopatia a fost transmisă ereditar fie prin modelul XL, fie prin AR. Screening-ul genelor candidate și analiza secvențierii exomului efectuate pentru cei doi frați afectați (MOL0048 II:2 și MOL0048 II:3) și pentru tatăl lor neafectat (MOL0048 I:5) nu a relevat niciun potențial defect genetic asociat bolii. Se știe că mutații în exonul ORF15 (cadrul deschis de citire open reading frame 15) al genei *RPGR*, sunt răspunzătoare pentru o mare parte din cazurile de CRD transmise XL. Am eliminat implicarea acestei gene la familia MOL0048 prin examinarea variantelor genei *RPGR* identificate prin secvențializarea exomului la frații afectați și am descoperit că ei au moștenit alele materne diferite în această regiune (Lazar et al., 2015a).

Alte familii cu degenerescentă retiniană

S-a efectuat WES pe un total de 28 indivizi dintr-un set de 20 de familii (Tabel 1), inclusiv patru familii diagnosticate cu CRD, cinci familii cu o combinație de fenotipuri multiple, șase familii prezentând maculopatie și cinci familii cu RP. Analizarea și filtrarea variantelor relevate de WES a dus la identificarea a șapte noi variante genetice potențial cauzatoare de boli și patru mutații cauzatoare de boală deja cunoscute la 9 dintre familiile studiate (Tabel 4).

Tabel 4: Lista variantelor genetice identificate în setul adițional de familii cu degenerescență retiniană.

Identificator al familiei	Fenotip	Mod prezumptiv de transmitere	Origine/Grup etnic	Genă (exon)	Localizarea modificării nucleotidice (proteină)*	Validarea Sanger (segregare)	Referință
MOL0061	CRD	XL/AR	Evrei nord-africani	CACNA1F (35)	c.4051C>T (p.R1351*) hemizigotă	Da (Da)	Nouă
MOL0360	CRD	AR	Beduini	CNGB3 (6)	c.782A>G (p.D261G) homozigotă	Da (Da)	Nouă
MOL0364	CRD	AR	Arabi musulmani	-	-	-	-
MOL0454	CRD	AR/XL	Druzi	-	-	-	-
MOL0474	CRD+Surzire	AR	Arabi musulmani	CNGA3 (7)	c.931C>T (p.G311C) heterozigotă	Da (Da)	Nouă
MOL0679	CRD/ Sindrom Usher	XL/AR	Evrei orientali	CEP78 (7)	c.893-1C>A (p.D298Vfs*17) homozigotă	Da (Da)	Nouă**
MOL0773	CRD/ Sindrom Usher	AR	Evrei orientali	CEP78 (7)	c.893-1C>A (p.D298Vfs*17) homozigotă	Da (Da)	Nouă**
MOL1310	CRD/ Sindrom Usher	AR/XL	Evrei orientali	CEP78 (4)	c.534delT (p.K179Rfs*10) homozigotă	Da	Nouă**
TB279	CRD/ Sindrom Usher	AR/XL	Evrei orientali	CEP78 (4)	c.534delT (p.K179Rfs*10) homozigotă	Da	Nouă**
TB365	CRD/ Sindrom Usher	AR/XL	Evrei orientali	CEP78 (4,7)	c.534delT (p.K179Rfs*10) c.893-1C>A (p.D298Vfs*17) compus-heterozigotă	Da (Da)	Nouă**
MOL1124	CD/CRD/ ACHM/LCA	AR	Arabi-musulmani	RPGRIP1 (15)	c.2249A>G (p.Y750C) homozigotă	Da (Da)	Nouă
MOL1182	CRD/CD	AR	Evrei marocani/așkenazi	-	-	-	-

MOL1190	ACHM/CRD	XL/AR	Evrei așkenazi	CNGB3 (6,10)	c.819_826del (p.P273fs) c.1148delC (p.T383fs) compus-heterozigotă	Da (Da)	Kohl2000, Sundin2000
MOL0499	RD+ Maculopatie	AR	Arabi creștini	CYP4V2 (11)	c.1508G>A (p.G503E) homozigotă	-	Nouă
MOL0499	RD+ Maculopatie	AR	Arabi creștini	CNGB3 (4)	c.C467T (p.S156F) heterozigotă	-	Sundin2000
MOL0563	Maculopatie/ ACHM	AR	Arabi musulmani	CNGB3 (10)	c.1148delC (p.T383fs) homozigotă	Da (Da)	Kohl2000, Sundin2000
MOL0584	Maculopatie	AD/AR	Evrei sirieni/turci	ABCA4 (35,38)	c.4919G>A (p.R1640Q) c.5318C>T (p.A1773V) compus-heterozigotă	Da (Da)	Rozet1998, Chacon-Camacho2013
MOL1126	Maculopatie	AR/AD	Arabi musulmani	-	-	-	-
MOL1152	Maculopatie	AR	Arabi musulmani	-	-	-	-
MOL1154	Maculopatie	AD	Evrei georgieni	-	-	-	-
MOL0039	RP	XL/AR	Evrei turci/spanioli	-	-	-	-
MOL0331	RP	XL/AR	Evrei francezi	-	-	-	-
MOL0622	RP	AD/XL	Evrei yemeniți/irakieni	-	-	-	-
MOL0625	RP	AD/XL	Evrei bukharieni/egipteni	-	-	-	-
MOL0864	RP	AR	Arabi musulmani	-	-	-	-

CRD, distrofiacelulelor cu conuri-bastonage; CD, distrofiacelulelor cu conuri; RD, distrofiie retiniană; ACHM, acromatopsie; LCA, amauroză congenitală Leber; RP, retinită pigmentară; AR, autosomal recesiv; AD, autosomal dominant; XL, X-lincat.

* Poziția nucleotidică a fiecărei variante genetice e bazată pe următoarele cADN-uri GenBank (număr de inventar): *CACNA1F* (NM_001256789), *CNGB3* (NM_019098), *CNGA3* (NM_001079878), *CEP78* (NM_032171), *RPGRIP1* (NM_020366), *CYP4V2* (NM_207352), *ABCA4* (NM_000350). Numărul nucleotidelor reflectă numerotarea cADN-ului cu +1 corespunzând A din codonul de inițiere a translației ATG în secvența de referință. Codonul de inițiere este codonul 1.

** Publicat de Namburi et al 2016.

Analizarea datelor preliminare nu a relevat variante potențial cauzatoare de boală la celelalte 11 familii.

Au fost identificate mutații cauzatoare de boală deja cunoscute la nivelul genei *CNGB3* la familiile MOL1190 (o combinație între modificările c.1148delC (p.T383fs) și c.819_826del (p.P273fs) (Kohl et al., 2000, Sundin et al., 2000)) și MOL0563 (o variantă homozigotă c.1148delC (p.T383fs)) și la nivelul genei *ABCA4* la familia MOL0584 (o combinație dintre variantele c.4919G>A (p.R1640Q) (Rozet et al., 1998) și c.5318C>T (p.A1773V) (Chacon-Camacho et al., 2013)). Variante genetice noi au fost identificate la nivelul genei *CACNA1F* la familia MOL0061 (o variantă hemizigotă fără sens c.4051C>T (p.R1351*)), al genei *CNGB3* la familia MOL0360 (o variantă homozigotă c.782A>G (p.D261G)), al genei *CNGA3* (cyclic nucleotide gated channel alpha 3) la familia MOL0474 (o variantă heterozigotă c.931G>T (p.G311C) văzută anterior la o familie cu un fenotip retinian similar, dominat de celule cu conuri), al genei *RPGRIP1* la familia MOL1124 (o variantă homozigotă c.2249A>G (p.Y750C)), al genei *CYP4V2* la familia MOL0499 (varianta homozigotă c.1508G>A (p.G503E) în combinație cu varianta heterozigotă cunoscută deja c.C467T (p.S156F) (Sundin et al., 2000) a genei *CNGB3*) și al genei *CEP78* la familia MOL0679 (varianta homozigotă a situsului de matisare (c.893-1G>A) (Namburi et al., 2016)). Anterior, nu s-au raportat cazuri în care mutațiile genei *CEP78* să provoace retinopatie, iar membri ai familiei MOL0679 au fost diagnosticați cu o combinație unică de fenotipuri care includ CRD și pierderea senzorieală a auzului (Namburi et al., 2016). Screening-ul țintit al altor familii cu un fenotip similar cu cel observat la familia MOL0679 a dus la identificarea a patru alte familii (MOL0773 (homozigotă la varianta c.893-1G>A), MOL1310 și TB279 (o deleție homozigotă c.534delT), TB365 (heterozigotă compusă la variantele c.893-1G>A și c.534delT (p.Lys179Argfs*10)) care poartă variantele *CEP78* (Tabel 3.7, 3.8) (Namburi et al., 2016). Validarea și analiza co-segregării utilizând secvențializarea Sanger au

fost efectuate pentru majoritatea variantelor identificate (Tabel 4).

Discuție

Eterogenitatea genetică și fenotipică a RDDs ne limitează într-o mare măsură capacitatea de a identifica cu succes cauza bolii prin screening-ul sistematic al tuturor genelor cunoscute în acest moment. Instrumente precum matricele de detectare a mutației și cartarea homozigotității oferă posibilități limitate deoarece ele sunt eficiente mai ales în cadrul anumitor populații și structuri familiale. WES este o tehnică eficientă pentru analiza cu randament mare ("high throughput"), care implică un proces relativ simplu și rapid pentru analizarea unui set vast de gene candidate în cohorte mari de pacienți. De-a lungul ultimilor ani, WES a fost utilizat cu succes pentru identificarea de noi gene cauzatoare de retinopatii și de noi mutații ale unor gene deja cunoscute (Estrada-Cuzcano et al., 2012, Khateb et al., 2012, Roosing et al., 2013, Sergouniotis et al., 2014, Beryozkin et al., 2015, Kohl et al., 2015, Lazar et al., 2015a, Lazar et al., 2015b), deoarece permite evaluarea simultană a unui număr mare de modificări nucleotidice care afectează regiunile genetice codificatoare.

Ca parte a unui efort de a determina fenotipul și genotipul la pacienții israelieni cu RDD și a descoperi corelații între anumite origini etnice și mutații fondatoare, am identificat 11 noi variante genetice și 10 deja cunoscute la nivelul a 11 gene asociate cu afecțiuni retiniene. WES a dus la identificarea unei potențiale cauze genetice ale bolii la 16 dintre cele 28 de familii studiate. Mutații cauzatoare de boală au fost identificate la 8 alte familii cu ajutorul abordării screening-ului țintit. Studiile noastre au dus la identificarea a unei noi gene cauzatoare de boală *CEP78* identificată la familiile cu o combinație unică de fenotipuri incluzând degenerescență retiniană dominată de celule cu con și pierderea senzorieurală a auzului (Namburi et al., 2016). În plus, studiile noastre relevă că mutațiile genei *GUCY2D* reprezintă o cauză majoră a distrofiei celulelor cu conuri la populația israeliană (Lazar et al., 2015a), sugerează că gena *ALMS1* este asociată bolii în cazul CRD non-sindromic (Lazar et al., 2015b) spre deosebire de cercetări anterioare care asociau mutațiile de la nivelul *ALMS1* cu sindromul Alström (Marshall et al., 2015) și identifică mutațiile genei *DYSF* drept o cauză a fenotipurilor co-

incidente la o familie cu CRD și distrofie musculară ușoară (Lazar et al., 2015b).

Rezultatele prezentate sprijină utilizarea WES atât pentru identificarea cauzei genetice a bolii la anumite familii cât și pentru identificarea de variante genetice, noi și cunoscute deja, ca o sursă de informație pentru cercetări ulterioare prin screening-ul țintit al grupurilor populaționale studiate. WES este un instrument eficient pentru descoperirea de noi gene cauzatoare de boală chiar și la familii mici, prezentând doar cazuri izolate. Mai mult decât atât, WES permite identificarea și evaluarea variantelor modificatoare care pot influența progresia bolii și care au ca rezultat o variabilitate a fenotipului printre membrii aceleiași familii.

Limitările WES sunt date de incapacitatea de a identifica potențiale variante asociate cu boala la 12 dintre familiile studiate. E posibil ca o analiză adițională a datelor să releve potențiale variante cauzatoare de boală în noi gene responsabile de maladii la câteva dintre aceste familii. Cu toate acestea, din cauza limitărilor secvențierii exomului în ceea ce privește detectarea variantelor non-codificatoare sau profund intronice, a alterărilor genomice extinse sau a altor variante structurale, precum și din cauza posibilității acoperirii insuficiente a anumitor exoni, cauza bolii ar putea rămâne necunoscută în cazul unor familii studiate. WGS va oferi în curând posibilitatea efectuării unei analize mai temeinice atât a regiunilor genetice codificatoare, cât și a celor necodificatoare, furnizând astfel o sursă de informații suplimentare pentru familiile unde nu s-au putut identifica anterior variante genetice potențial cauzatoare de boală. Odată cu descoperirea de noi gene și defecte genetice, există o nevoie în continuă creștere pentru înțelegerea mecanismelor moleculare ale bolii, cu scopul de a dezvolta noi strategii de tratament (Veleri et al., 2015). Organismele-model și în special șoarecii-model care copiază boala umană din punct de vedere genetic și care produc caracteristici fenotipice similare sunt instrumentul cel mai des folosit pentru dobândirea de noi cunoștințe despre mecanismele bolii și despre dezvoltarea de tratamente (Veleri et al., 2015). În plus, sisteme experimentale precum celulele stem și tehnologia de inducere a celulelor stem pluripotente va contribui la studierea mecanismelor patogene, precum și la pașii inițiali ai dezvoltării terapeutice. Următorul pas important în afara descoperirilor genetice va fi descifrarea proprietăților funcționale ale proteinelor afectate în bolile de degenerescență retiniană.