Streszczenie pracy doktorskiej lek. Anny Kurzyńskiej

Promotor: dr hab. Elwira Przybylik-Mazurek

Temat pracy doktorskiej: *„Genetic testing in selected rare endocrine disorders"*

***(„Wykorzystanie badań genetycznych w wybranych rzadkich chorobach endokrynologicznych")* – cykl publikacji**

Wstęp

Badania molekularne stanowią jedną z kluczowych i niezwykle dynamicznie rozwijających się metod diagnostycznych współczesnej endokrynologii. Poszukiwanie zmian genetycznych pozwala nie tylko na ustalenie prawidłowego rozpoznania czy przewidywanie przebiegu klinicznego danej jednostki chorobowej, ale może również stwarzać możliwości terapii, zwłaszcza w dobie medycyny spersonalizowanej.

Założeniem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie zagadnień związanych z wykorzystaniem badań genetycznych w kilku wybranych rzadkich zaburzeniach endokrynologicznych: klasycznej postaci wrodzonego przerostu nadnerczy, guzach neuroendokrynnych oraz przyzwojakach.

Cele pracy

1. Określenie korelacji pomiędzy genotypem a fenotypem u pacjentów z klasyczną postacią wrodzonego przerostu nadnerczy, wywołaną niedoborem 21-hydroksylazy.
2. Ocena wpływu wybranych wariantów genetycznych pojedynczych nukleotydów na ryzyko zachorowania oraz przebieg kliniczny guzów neuroendokrynnych.
3. Powiązanie rzadkiego przypadku agresywnego, dziedzicznego paraganglioma z patogennym wariantem w genie *SDHD*.

Materiały i metody

Do pierwszego badania, dotyczącego podłoża genetycznego wrodzonego przerostu nadnerczy i korelacji genotyp-fenotyp, włączono 48 pacjentów (30 kobiet i 18 mężczyzn z klasyczną postacią WPN (38 z utratą soli i 10 z wirylizacją prostą). U wszystkich pacjentów została przeprowadzona analiza molekularna genu *CYP21A2* metodą MLPA, przy negatywnym wyniku MLPA diagnostykę była uzupełniona o sekwencjonowanie. Otrzymane genotypy podzielono w zależności od aktywności resztkowej 21-hydroksylazy, a następnie porównano z fenotypem klinicznym.

Do drugiego badania analizującego wybrane polimorfizmy pojedynczych nukleotydów w nowotworach neuroendokrynnych włączono 185 pacjentów. W pierwszym etapie pracy analizowano częstość wybranych wariantów molekularnych: rs8005354 (*DAD1*, NM_001344 substytucja intronowa T/C), rs2069762 (substytucja T/G w regionie promotora *IL2* NM_000586), rs3731198 (*CDKN2A*, NM_000077 substytucja intronowa A/G) oraz rs1800872 (substytucja C/A w regionie promotora *IL10* NM_000572) w grupie badanej, obejmującej 49 pacjentów z NET o różnych punktach wyjścia oraz w grupie kontrolnej, liczącej 58 osób.

W kolejnej części te same warianty analizowano w kontekście danych klinicznych w grupie 127 pacjentów z NET (punkt wyjścia guza neuroendokrynnego, stężenie chromograniny A i występowanie przerzutów).

W trzeciej pracy, będącej opisem przypadku, przedstawiono przypadek pacjentki z wariantami w obydwu allelach genu *SDHD* i agresywnym przebiegiem klinicznym.

Wyniki

W pierwszym badaniu, dotyczącym WPN, zmiany molekularne w genie *CYP21A2* wykazano w 100% analizowanych alleli. Najczęstszym wykrytym wariantem był I2G (c.293-13A/C>G) stwierdzony w 38,63% wszystkich przebadanych alleli. Duże delecje dotyczyły 32,95% alleli, a wariant I172N (p.Ile173Asn) 12,5%. Badanie wykazało dobrą korelację pomiędzy genotypem a oczekiwanym fenotypem w grupach z zerową aktywnością 21-hydroksylazy (*null*) i grupie z aktywnością wynoszącą 0–1% (A), PPV odpowiednio 100% i 90,5%. Korelacja była znacznie niższa w grupie z aktywnością 1–2% (grupa B) – 66,7%. U dziewięciu pacjentów stwierdzono niezgodność genotyp-fenotyp. W badanej grupie zidentyfikowano jeden nowy patogenny wariant *CYP21A2* c.[878G>T] (p.Gly293Val), dotychczas nieopisywany w literaturze.

W drugim badaniu analiza homozygot udowodniła większą częstość występowania homozygot TT wariantu rs3731198 w grupie kontrolnej (p = 0,0209). U pacjentów z NET stwierdzono wyższą częstość występowania homozygot GG wariantu rs1800872 (p = 0,003). Ponadto wykazano istotną statystycznie korelację pomiędzy wariantem rs3731198 a przerzutami do węzłów chłonnych (p = 0,0038).

W trzeciej pracy scharakteryzowano warianty genu *SDHD* na podstawie przypadku klinicznego. W obrębie jednego allelu wykryto wariant w postaci rozległej delecji genu (eksonów 1–3), na drugim allelu zidentyfikowano rzadki wariant, c.34G>A (p.Gly12Ser).

Wnioski

1. Przeprowadzone badania pozwoliły na scharakteryzowanie genotypów klasycznej postaci WPN pacjentów z Polski południowej. Udowodniono wysoką korelację genotyp-fenotyp w grupach z zerową aktywnością 21-hydroksylazy oraz z aktywnością wynoszącą 0–1%. Zidentyfikowano i scharakteryzowano nowy patogenny wariant genu *CYP21A2.*
2. Wykazano, że homozygoty GG wariantu rs1800872 występują częściej u pacjentów z NET, a homozygoty TT wariantu rs3731198 są w tej grupie rzadsze. Wariant rs3731198 może się wiązać z ryzykiem wystąpienia przerzutów do węzłów chłonnych.
3. Opis przypadku zwrócił uwagę na rzadki przypadek agresywnego przebiegu paraganglioma związanego a patogennym wariantem *SDHD*.

Streszczenie pracy w języku angielskim

Introduction

Molecular testing is one of the key and rapidly developing diagnostic methods in modern endocrinology. Searching for genetic alterations not only makes it possible to establish the proper diagnosis or predict the clinical course of a given disease entity, but can also provide opportunities for therapy, especially in the era of personalized medicine.

The purpose of this dissertation was to address issues related to genetic testing in selected rare endocrine disorders: the classical form of congenital adrenal hyperplasia, neuroendocrine tumors, and paragangliomas.

Objects of the study

1. Determine the correlation between genotype and phenotype in patients with the classical form of congenital adrenal hyperplasia caused by 21-hydroxylase deficiency.
2. Assess the significance of selected single nucleotide genetic variants in the susceptibility and clinical course of neuroendocrine tumors.
3. Linking a rare case of aggressive hereditary paraganglioma with a pathogenic variant in the *SDHD* gene.

Materials and Methods

Forty-eight patients (30 females and 18 males) with the classical form of CAH (38 with salt wasting and 10 with simple virilization) were included in the first study, on the genetic basis of CAH and genotype-phenotype correlations. Molecular analysis of the *CYP21A2* gene using MLPA was performed in all patients; in cases with a negative MLPA result, the diagnosis was complemented by sequencing. The obtained genotypes were classified according to the residual 21-hydroxylase activity and then compared with the clinical phenotype.

For the second study, which analyzed selected single nucleotide polymorphisms in neuroendocrine tumors, 185 patients were included. In the first stage of the study, the prevalence of selected molecular variants, rs8005354 (*DAD1*, NM_001344 intronic T/C substitution), rs2069762 (T/G substitution in *IL2* promoter region NM_000586), rs3731198 (*CDKN2A*, NM_000077 intronic A/G substitution), and rs1800872 (C/A substitution in *IL10* promoter region NM_000572) was analysed in a study group of 49 NET patients and a control group of 58 subjects. In the next part, the same variants were analyzed in the context of clinical data on an extended group of 127 NET patients (primary site, serum chromogranin A concentration and metastasis).

The third paper, which is a case report, presents the case of a patient with variants in both alleles of the *SDHD* gene and an aggressive clinical course.

Results

In the first study on classical CAH, molecular alterations in the *CYP21A2* gene were identified in 100% of the alleles analyzed. The most common variant detected was I2G (c.293-13A/C>G) - 38.63% of all alleles tested. Large deletions affected 32.95% of alleles and the I172N variant (p.Ile173Asn)

affected 12.5%. The study showed a good correlation between genotype and expected phenotype in the groups with zero 21-hydroxylase activity (*null*) and the group with activity of 0-1% (A), PPV 100% and 90.5%, respectively. The correlation was much lower in the group with 1-2% activity (group B) - 66.7%. Nine patients had non-concordance of genotype and phenotype. In the study group, a new pathogenic variant of *CYP21A2* c.[878G>T] variant (p.Gly293Val), previously not reported in the literature, was identified and characterized.

In the second study, homozygote analysis proved a higher frequency of TT homozygotes of the rs3731198 variant in the control group (p = 0.0209). NET patients showed a higher frequency of GG homozygotes of the rs1800872 variant (p = 0.003). There was a statistically significant correlation between the rs3731198 variant and lymph node metastasis (p = 0.0038).

In the third study, variants of the *SDHD* gene were characterized based on a clinical case. Within one allele, a variant was detected in the form of extensive deletion of the gene (exons 1–3), and a rare variant, c.34G>A (p.Gly12Ser), was identified in the other allele.

Conclusions

1. The study allowed us to characterize the genotypes of the classical CAH in patients from southern Poland. A high genotype-phenotype correlation was shown in groups with zero 21-hydroxylase activity and with 0-1% activity. A new variant of the *CYP21A2* gene has been identified and characterized by means of bioinformatic tools.
2. The study showed that GG homozygotes of the rs1800872 variant are more common in NET patients, while TT homozygotes of the rs3731198 variant are less common in this group. The rs3731198 variant may be associated with a risk of lymph node metastasis.
3. The case report highlighted a rare case of aggressive paraganglioma associated with a pathogenic variant of *SDHD*.