

Duplicazione sul cromosoma 22q11.21 in una paziente con difetto cardiaco congenito

Carmen Munno^{1,2}, Francesco Verdesca^{1,2}, Andrea Vitale³, Barbara Lombardo^{1,2}, Lucio Pastore^{1,2}

¹CEINGE-Biotecnologie Avanzate scarl, Napoli

²Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università Federico II, Napoli

³Dipartimento di Scienze Motorie e del Benessere, Università "Parthenope", Napoli

ABSTRACT

Chromosome 22q11.21 duplication in a patient with congenital heart defect. The newly described 22q11.2 microduplication syndrome is an association of a broad clinical spectrum and up to now more than 50 unrelated cases have been reported. The clinical presentation of patients is extremely variable and shares features with 22q11.2 deletion syndromes (DG/VCFS), including heart defects, urogenital abnormalities, velopharyngeal insufficiency with or without cleft palate; it ranges from multiple defects to mild learning difficulties with some individuals being essentially normal. A high resolution array comparative genomic hybridization (a-CGH) 4x180K was performed on a patient with a congenital heart defect, a pulmonary valve stenosis, in order to identify potential mutations and to characterize the clinical phenotype at molecular level. Using a-CGH analysis, we identified a duplication in 22q11.21 region of approximately 2.5 Mbp containing several genes including TBX1. The obtained results demonstrate the relevance of a-CGH as a screening method to detect genomic rearrangements responsible for congenital heart defects.

CASO CLINICO

Oggetto del presente studio è una bambina giunta alla nostra attenzione all'età di 2 anni alla quale viene diagnosticata, a 2 mesi di vita, una stenosi della valvola polmonare in seguito al riscontro di un soffio cardiaco.

All'esame obiettivo la paziente presenta: un peso di 13,8 Kg (73° percentile), una lunghezza di 86 cm (57° percentile) e una circonferenza cranica pari a 47 cm (35° percentile). Altre caratteristiche riscontrate sono: normocefalia, esotropia bilaterale, naso insellato, narici anteverse, filtro lungo e labbra sottili. Il cavo orale risulta nella norma, il palato è intatto, non si palpano masse del collo, la forma del torace è normale, l'attività cardiaca è regolare e ritmica con presenza di un soffio sistolico 1/6 al mesocardio.

Al fine di valutare l'eventuale presenza di alterazioni genomiche, ad esempio microdelezioni o microduplicazioni che potessero essere responsabili del quadro clinico della paziente, è stata effettuata un'analisi di "array Comparative Genomic Hybridization" (a-CGH). La tecnica dell'a-CGH rappresenta una metodologia di screening in grado di identificare variazioni del numero di copie su tutto il genoma in un'unica seduta analitica,

sulla base della comparazione competitiva di uguali quantità di DNA genomico (il DNA da analizzare e un DNA di controllo marcati con fluorocromi differenti). Tale metodica offre la possibilità di superare il limite della citogenetica convenzionale grazie ad una maggiore specificità e ad un più elevato potere risolutivo.

Dopo aver ottenuto il consenso informato, la paziente è stata sottoposta a un prelievo ematico in EDTA. Il DNA è stato estratto utilizzando il kit Illustra Nucleon Genomic DNA Extraction kit (GE Healthcare, UK) secondo le istruzioni del produttore. Successivamente, 1 µg di DNA genomico della paziente e 1 µg di DNA genomico di un controllo umano di riferimento (Promega, Madison, WI) sono stati digeriti con AluI ed RsaI e successivamente marcati con Cy3 (DNA di controllo) e Cy5 (DNA campione) utilizzando il kit di etichettatura SureTag (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). I campioni, così differentemente marcati, sono stati poi uniti sulla base della concentrazione e del grado di incorporazione dei fluorocromi e ibridizzati sull'"array" per un periodo di incubazione di 24 ore in un fornetto rotatorio a 65 °C. La digestione del DNA, la marcatura e l'ibridazione sono state eseguite secondo le istruzioni del protocollo Agilent. Nel nostro studio è stata utilizzata una

Corrispondenza a: Carmen Munno, CEINGE-Biotecnologie Avanzate scarl, Via Gaetano Salvatore 486, 80145 Napoli. Tel. 0817373858, Fax 0813737808, E-mail munno@ceinge.unina.it

Ricevuto: 12.02.2015

Revisionato: 08.04.2015

Accettato: 24.04.2015

piattaforma Human Genome CGH Microarray kit 4X180K (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), che possiede una spaziatura media di 13 kb e garantisce una risoluzione spaziale di 25 kb. Il vetrino è stato poi analizzato utilizzando lo Scanner Agilent G2600D. Il file prodotto è stato poi estratto con il software Feature Extraction (V11.5.1.1) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) e i dati analizzati mediante il Software di analisi GenomicWork Bench (V7.0.4.0) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

DISCUSSIONE

L'analisi di a-CGH condotta sulla paziente, al fine di rilevare eventuali microdelezioni o microduplicazioni genomiche associate a difetti cardiaci congeniti, ha consentito di rilevare una duplicazione sul cromosoma

22 nella regione q11.21 di circa 2.56 Mbp (18,894,835-21,454,721) che coinvolge diversi geni "Online Mendelian Inheritance in Man" (OMIM) tra i quali riveste particolare interesse il gene "T-Box 1 Transcription Factor" (*TBX1*), che è considerato il gene più importante nella sindrome di DiGeorge/velo-cardio-facciale (Figura 1). Il ruolo dell'iperespressione di *TBX1* nella sindrome da duplicazione 22q11 è confermato dall'identificazione di mutazioni con guadagno di funzione di *TBX1*, che comportano quadri clinici simili a quelli causati dall'aploinsufficienza, dalle mutazioni con perdita di funzione o dalle delezioni (1).

La sindrome da microduplicazione 22q11.2 è una sindrome emergente caratterizzata da un quadro clinico variabile correlato alla duplicazione della stessa regione che risulta invece deleta nei pazienti affetti dalla sindrome di DiGeorge o velo-cardio-facciale (DG/VCFS) e, di fatto, rappresenta una sindrome complementare a quest'ultima (2). Ad oggi sono stati descritti più di 50 casi non correlati, molti dei quali sono duplicazioni familiari. Il quadro clinico è estremamente variabile e comprende segni condivisi anche dalla sindrome da delezione

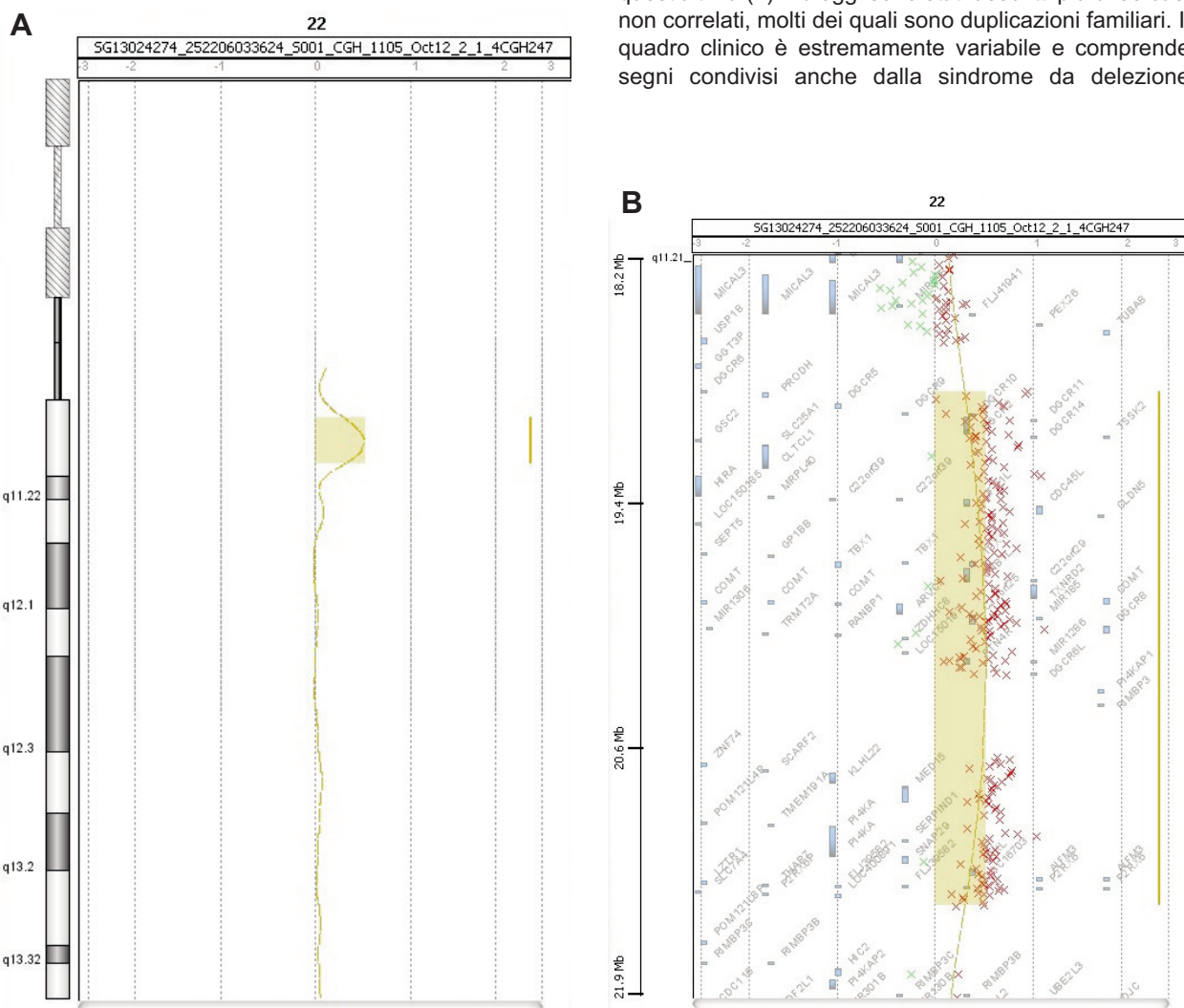


Figura 1
 Profilo a-CGH relativo al cromosoma 22, ottenuto utilizzando una piattaforma Agilent 4X180K (A). È evidente la presenza di una duplicazione di ~2.5 Mb sul cromosoma 22; tale alterazione comprende circa 60 geni tra i quali diversi geni OMIM (B). I risultati vengono interpretati come log2 del rapporto dell'intensità di fluorescenza del DNA del paziente rispetto al DNA controllo.

22q11.2 (DG/VCFS), come le cardiopatie, le anomalie urogenitali, l'insufficienza velofaringea con o senza palatoschisi e fenotipi variabili comprendenti difetti multipli o solo lievi difficoltà di apprendimento, mentre alcuni pazienti possono essere addirittura normali (3). La causa di questa eterogeneità clinica non è nota. Il motivo dell'alta frequenza di riarrangiamenti a carico della regione 22q11.2 risiede nella presenza di sequenze ripetute a basso numero di copie (LCR22) che predispongono a episodi di ricombinazione omologa non allelica (NAHR) responsabili dei riarrangiamenti.

La maggior parte dei pazienti presenta microduplicazioni di circa 3Mb, identificate mediante analisi basate sull'ibridazione fluorescente *in situ* (FISH) o altre tecniche molecolari, come l'a-CGH. Sono state descritte inoltre anche duplicazioni prossimali più piccole, di circa 1.5 Mb. Il trattamento della sindrome è sintomatico e multidisciplinare e può richiedere una presa in carico medica e/o chirurgica della cardiopatia. La prognosi è variabile. I pazienti affetti dalla sindrome da duplicazione 22q11.2 mostrano una significativa variabilità inter e intra-familiare. Alcuni pazienti che presentano gravi malformazioni cardiovascolari possono andare incontro a morte precoce.

La tecnica dell'a-CGH, utilizzata nel nostro studio, è una tecnica di biologia molecolare clinica che inizialmente è stata applicata allo studio di cellule tumorali, ma che si è poi rivelata di utile impiego nella diagnosi di aberrazioni cromosomiche costituzionali, sia in epoca postnatale che prenatale (4). La sua applicazione è in rapido incremento nello studio di malattie genetiche dal momento che è stato dimostrato che gli sbilanciamenti cromosomici possono essere la causa di diverse patologie quali, ad esempio, sindromi metaboliche, ritardo mentale, autismo ed epilessia (5, 6). Negli ultimi anni è stato dimostrato che circa il 15% di soggetti con ritardo mentale, dismorfismi e anomalie congenite, pur avendo un cariotipo normale, sono in realtà portatori di uno sbilanciamento cromosomico criptico responsabile della loro condizione (7). Ad oggi, è possibile avere queste informazioni, grazie al notevole aumento del potere risolutivo dell'a-CGH che consente

di evidenziare anomalie del DNA che non potrebbero essere rilevate con le tecniche convenzionali, incrementando quindi la possibilità di ottenere una diagnosi accurata e specifica.

Inoltre, l'a-CGH permette di definire con precisione la regione genomica alterata consentendo l'immediata correlazione tra l'eventuale alterazione e una precisa posizione nel genoma e quindi anche i geni in essa contenuti, migliorando la comprensione delle relazioni esistenti tra le anomalie del DNA e la patologia del paziente esaminato.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Torres-Juan L, Rosell J, Morla M, et al. Mutations in TBX1 genocopy the 22q11.2 deletion and duplication syndromes: a new susceptibility factor for mental retardation. *Eur J Hum Genet* 2007;15:658-63.
2. Ensenauer RE, Adeyinka A, Flynn HC, et al. Microduplication 22q11.2, an emerging syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular analysis of thirteen patients. *Am J Hum Genet* 2003;73:1027-40.
3. Ou Z, Berg JS, Yonath H, et al. Microduplications of 22q11.2 are frequently inherited and are associated with variable phenotypes. *Genet Med* 2008;10:267-77.
4. Lapierre JM, Cacheux V, Collot N, et al. Comparison of comparative genomic hybridization with conventional karyotype and classical fluorescence in situ hybridization for prenatal and postnatal diagnosis of unbalanced chromosome abnormalities. *Ann Genet* 1998;41:133-40.
5. Tarsitano M, Ceglia C, Novelli A, et al. Microduplications in 22q11.2 and 8q22.1 associated with mild mental retardation and generalized overgrowth. *Gene* 2014;536:213-6.
6. Lombardo B, Ceglia C, Tarsitano M, et al. Identification of a deletion in the NDUFS4 gene using array-comparative genomic hybridization in a patient with suspected mitochondrial respiratory disease. *Gene* 2014;535:376-9.
7. Di Stefano C, Lombardo B, Fabbriatore C, et al. Oculo-facio-cardio-dental (OFCD) syndrome: the first Italian case of BCOR and co-occurring OTC gene deletion. *Gene* 2015;559:203-6.