

VICTORIA SACARĂ, IULIA COLIBAN, DOINA SECU, VICTORIA BOICIUC, CH. BOICIUC, AL. DORIF

REALIZĂRILE ÎN DOMENIUL DIAGNOSTICULUI MOLECULAR-GENETIC PE PARCURSUL A 40 DE ANI ÎN CADRUL INSTITUTULUI MAMEI ȘI COPILULUI

IMSP Institutul Mamei și Copilului

SUMMARY

ACHIEVEMENTS IN THE FIELD OF MOLECULAR-GENETIC DIAGNOSTICS OVER 40 YEARS AT THE INSTITUTE OF MOTHER AND CHILD

Keywords: molecular genetic diagnostics, rare diseases, gene, allele

The first group of specialists in molecular genetics was created in frame of the department for hereditary pathologies of the Scientific Research Institute of Mother and Child healthcare in 1989-1990. First molecular genetics tests in Moldova (since 1992) were realized to detect mutations in monogenic pathologies – Duchenne myodystrophy and hemophilia A and B, phenylketonuria and cystic fibrosis, spinal muscular atrophy. In frame of the National Center of Reproductive Health and Medical Genetics, the laboratory of Human Molecular Genetics appeared in 2009. From 2010, there started the development of candidate genes allelic variants detection methods. Hereditary predisposition to frequent chronic diseases is determined by various genes, target ones being: MTHFR, MTRR, MTR, CBS, FV, FII, FXIII, VKORCI, GpIIIaL33P, PAI-1, GSTM, GSTT, GSTP, ACE, eNOS, ApoB, ApoE, HLA DQA1 and DQB1. Currently, the laboratory can perform molecular diagnosis for the following diseases: PKU (Phenylketonuria), CFTR (Cystic Fibrosis), AZF (azospermia), GALT (galactosemia), MECP2 (Rett Syndrome), ALDOB (fructosemia), WD (The Wilson), AKU (Alkaptonuria), DMD (Duchenne Muscular Dystrophy), Celiac Disease, mitochondrial diseases (MELAS, Leigh, LHON, NARP and MERRF Syndromes), SMA (Spinal muscular atrophy), CLCN1 (Thomsen mytonia), SCA (Friedreich's ataxia), FMR1 (Fragile X syndrome), AFF2 (X-efra syndrome), PMP22 (CharcoMarie Youth 1a), AZF (azospermia).

Research investigations were supported through the governmental grants, provided through ASM [SCRENGEN, Cipher: 20.800009.8007.22, Contract 22-PS, 03.01.2022] , and international grants provided by MRDA, BMBF, DAAD and other funds. This support contributed to the skill development and experience gain in leading laboratories in Europe and USA.

РЕЗЮМЕ

ДОСТИЖЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ В ИНСТИТУТЕ МАТЕРИ И РЕБЕНКА ЗА 40 ЛЕТ

Ключевые слова: молекулярно-генетическая диагностика, редкие заболевания, ген, аллель.

Первая молекулярно-генетическая группа в рамках научного отдела наследственных патологий НИИ Охраны Здоровья Матери и Ребёнка была создана в 1998-1990 гг. Первые молекулярно-генетические анализы (1992г.), проводимые в Молдове, были направлены на идентификацию мутаций частых моногенных патологиях – миодистрофии Дюшенна и гемофилии А и Б, фенилкетонурии и муковисцидоза, спинальной мышечной атрофии. В 2009 году была организована научная лаборатория Молекулярной Генетики Человека как самостоятельная единица в рамках Национального Центра Репродуктивного Здоровья и Медицинской Генетики. С 2010 года в лаборатории начаты разработки ДНК методов по определению аллельных вариантов генов-кандидатов, ответственных за наследственную предрасположенность человека к частым хроническим заболеваниям: MTHFR, MTRR, MTR, CBS, FV, FII, FXIII, VKORCI, GpI-

PaL33P, PAI-1, GSTM, GSTT, GSTP, ACE, eNOS, ApoB, ApoE, HLA DQA1 și DQB1. На данный момент в лаборатории возможно проведение молекулярно-генетической диагностики на следующие патологии: фенилкетонурия, муковисцидоз, галактоземия, фруктоземия, алкаптонурия, Синдром Ретта, болезнь Вильсона, Миодистрофия Дюшенна, спинальная амиотрофия, миотония Томсона, ряд СЦА, Синдром Мартена-Белла, Синдром ДиДжоржа, синдром Вистота-Олдрижа, митохондриальные болезни (Синдром MELAS, Ли, Лебера, NARP, MERRF).

Научные исследования лаборатории поддержаны государственными контрактами [SCREENGEN, Cipher: 20.800009.8007.22, Contract 22-PS, 03.01.2022] и грантами международных фондов MRDA, BMBF, DAAD и др., что позволило сотрудникам проходить стажировки и работать в ведущих лабораториях Америки и Европы.

INTRODUCERE

Crearea laboratorului de diagnostic ADN în Republica Moldova a coincis în timp cu inițierea cercetărilor de amploare la nivel mondial – proiectul Genomul Uman – în 1990 cu scopul decodificării informației genetice. În 1991, în cadrul secției de patologii ereditare a IȘ OSMȘC a fost creată prima echipă ce-și propunea inițierea studiilor molecular-genetice. Astfel, programul internațional Genomul Uman a servit drept fundal benefic pentru dezvoltarea activității științifico-practice a echipei molecular-genetice în direcția elaborării și implementării metodelor noi de diagnostic al patologiilor ereditare [1].

Primele testări molecular-genetice, efectuate în 1992, au avut drept scop identificarea mutațiilor și particularităților populaționale a două patologii monogenice frecvente – miodistrofia Duchenne și hemofiliile A și B [1]. În anii 1994-1996, se realiza deja diagnosticul pentru identificarea mutațiilor frecvente în cazul fenilcetonuriei și fibrozei chistice atrofia musculară spinală (boala Verding-Hoffman)

Ca rezultat, în 2009 a fost posibil de a organiza Laboratorul Științific de Genetică Moleculară Umană, ca unitate independentă în cadrul Centrului Național de Sănătate Reproductivă și Genetică Medicală. Actualmente, în cadrul Laboratorului activează șase cercetători științifici – Chiril Boiciuc, Victoria Hlistun, Iulia Coliban, Doina Secu și Alexandr Dorif.

Pe parcursul activității, membrii Laboratorului i-au sporit capacitățile prin accesarea proiectelor finanțate de la buget prin Academia de Științe din Moldova, dar și a granturilor internaționale precum MRDA, BMBF, DAAD, fapt ce a permis stagierea colaboratorilor Laboratorului în centrele de performanță din SUA și Europa și participarea la diferite școli de vară precum: “CBM Summer School 2010, Personalized Medicine – Nutrition and Health, University of Trieste, IRCCS Burlo Garofolo Hospital and CBM, (Trieste, Italy); ”International School on Molecular Genetics for Young Scientists “Cell biology” (Zvenigorod, Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences); TATAA biocenter (Göteborg, Suedia), dar și cursuri „The next generation sequencing” (Bertinoro, Italia), “Modern Molecular-biochemical Markers in Clinical and Experimental Medicine” (Prague, Czech Republic), „Tehnici moleculare în

diagnosticul și screening-ul genetic, de la nucleotid la genom” (Craiova, România), „Semne evocatoare în genetica clinică” (Gura Humorului, România); Radbound University, Nijmegen (the Netherlands).

La baza Laboratorului au fost îndeplinite și susținute cu succes mai mult de 40 teze de licență și master, 4 teze de doctor în științe medicale și biologie și o teza de doctor habilitat. Actualmente toți colaboratorii științifici sunt la Școala doctorală în domeniul științelor medicale a USMF “Nicolae Testemițanu” și Școala doctorală a USM.

REZULTATELE ȘTIINȚIFICO-PRACTICE PRINCIPALE

Din momentul implementării tehnicii PCR și până în prezent, activitatea practică a Laboratorului s-a desfășurat în colaborare strânsă cu departamentul de genetică clinică. Eforturile comune ale acestor două componente ale geneticii medicale, celei academice (laboratorul de cercetări) și celei practice (departamentul clinic), reprezintă baza serviciului de diagnostic prenatal din Republică, asigurând continuitatea cercetărilor și dezvoltarea acestui domeniu. Datorită activității prodigioase a grupului de specialiști moleculari, a fost inițiat diagnosticul postnatal molecular pentru maladiile: PKU (Fenilcetonurie), CFTR (Fibroza chistică), AZF (azospermie), GALT (galactozemie), MECP2 (Sindromul Rett), ALDOB (fructozemie), WD (Boala Wilson), AKU (alcaptonuria), DMD (Distrofia Musculară Duchenne), Boala Celiacă, MELAS (Encefalomiopatia mitocondrială, acidoză lactică și episoade asemănătoare accidentelor vasculare cerebrale), sindromul Leigh, LHON (Neuropatia optică ereditară Leber), MERRF (Epilepsia mioclonică cu fibre roșii rugoase), NARP (Neuropatie, ataxie și retinită pigmentară), SMA (Atrofia musculară spinală), CLCN1 (Thomsen mytonia), SCA (Ataxia Friedreich), FMR1 (sindrom X-fragil), AFF2 (X-efra sindrom), PMP22 (CharcoMarie Touth 1a), AZF (azospermie).

Astfel, pe parcursul anilor de activitate, au fost efectuate peste 150 de diagnosticări prenatale, pentru 6 maladii monogenice grave. În 25% de cazuri, diagnosticul a fost confirmat, pe când în restul familiilor cu risc înalt femeile au născut copii sănătoși.

Din anul 2010, au fost pornite cercetări de determinare a variantelor alelice ale genelor candidate, implicate în

predispoziția genetică a omului către cele mai frecvente boli cronice umane. Se studiază în continuare rolul factorilor cercetați prin analiza frecvenței polimorfismelor genelor MTHFR, MTRR, MTR, FV, FII, PAI-1, GSTM, GSTT, GSTP, ACE, ApoB, ApoE și ale sistemului HLA la cuplurile cu pierderi reproductive [2,3].

Laboratorul de Genetică Moleculară Umană dispune în prezent de echipamentul de bază necesar pentru diagnosticul unor boli și cercetări molecular-genetice. Datorită suportului Ministerului Sănătății (2014-2015), în urma realizării grantului japonez de suport tehnic JICA, Laboratorul a primit în dotație un secvențiator de 8 canale Genetic Analyzer 3500Dx și un amplificator în timp real RealTime PCR 7500 (Applied Biosystems, SUA), ceea ce ne permite astăzi să extindem considerabil setul de metode și tehnici aplicative. Astfel, noi utilizăm:

1. tehnica de PCR cantitativ pentru identificarea mutațiilor;
2. metoda amplificării multiplexe a sondei dependentă de ligatură (Multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA);
3. metoda secvențierii după Sanger, care ne permite identificarea mutațiilor în genele de interes asociate cu diverse patologii;
4. metoda analizei fragmentelor multiple de ADN.

Diagnosticul molecular genetic pentru maladia SMA este efectuat prin intermediul tehnicii PCR-RFLP, dar mai precisă și considerată fiind standardul de aur este tehnica MLPA. În acest sens, diagnosticul poate fi pus cât mai curând posibil, de exemplu, încă din perioada prenatală pentru familiile în care s-au născut deja copii cu SMA, dar și pentru nou-născuții din familii prezumtiv sănătoase (screening-ul nou-născutului), precum și în procesul de planificare familială (screening al purtătorilor) [4].

Pacienții suspecti la fenilcetonurie se testează pentru cele mai frecvent întâlnite 6 mutații în gena PAH (p.R408W, p.P281L, p.L48S, p.R158Q, p.R252W, p.R261Q) prin metoda PCR/RFLP. Analiza suplimentară prin tehnica de secvențiere Sanger a permis detectarea genotipului complet, determinând mutații de tip splicing (IVS7+4A>G, IVS11+7T>C, IVS12+1G>A), missense (p.A342T) și nonsense (p.R111*) [5].

Pacienții cu fenotip caracteristic maladiilor mitocondriale sunt examinați pentru cele mai frecvente mutații la nivelul ADN-ului mitocondrial prin intermediul tehnicii ARMS-qPCR [6], dar și tehnica HRM, grație căreia pot fi identificați pacienți cu sindroamele MELAS (Encefalomiopatia mitocondrială, acidoză lactică și episoade asemănătoare accidentelor vasculare cerebrale), Leigh [7], LHON (Neuropatia optică ereditară Leber), MERRF (Epilepsia mioclonică cu fibre roșii rugoase) și NARP (Neuropatie, ataxie și retinită pigmentară) [8]. În mod similar, putem realiza secvențierea întregului genom mitocondrial, fapt care ne va permite sporirea ratei de diagnosticare a acestor pacienți.

În cadrul IMSP Institutul Mamei și Copilului, în Laboratorul de genetică moleculară umană, cercetările privind imunodeficiențele primare au început în anul 2015. Au fost cuantificate concentrațiile medii de TREC (6565.2354 pentru 100.000 de celule) și KREC (8173.212 pentru 100.000 de celule) pentru nou-născuții prezumtiv sănătoși din Republica Moldova [9]. A fost dezvoltat un test propriu TREC/KREC pentru screening-ul nou-născuților. A fost efectuată o analiză detaliată a profilurilor clinice, investigațiilor biochimice și molecular-genetice, precum și prognosticul celor 3 copii diagnosticați în cadrul laboratorului cu sindromul Wiskott-Aldrich în perioada 2016-2019 [10, 11]. În timpul screening-ului selectiv au fost identificați 9 pacienți cu sindromul DiGeorge tip I [12] și un caz de febră mediteraneană familială (confirmate prin NGS și secvențierea Sanger).

Pe lângă cele menționate, au fost obținute date noi despre particularitățile molecular-genetice ale DMD/B, SMA și NSME 1A, pe un eșantion de pacienți din Republica Moldova. Baza de date a mutațiilor DMD-LOVD versiunea v3.0 [www.dmd.nl] a fost completată cu variante de mutații detectate la pacienții din Republica Moldova [13].

În perioada anilor 2006-2007, în cadrul Laboratorului a fost realizat proiectul "Hemofilia A și B: screening mutațional și biochimic" finanțat de MRDA. Proiectul moldo-german în anul 2010 "Studierea funcțională a transporterului de cupru ATP7B în hepatocite și neuroni pentru terapia direcționată a maladii Wilson" în colaborare cu "Klinische und Experimentelle Transplantationshepatologie", Universitätsklinikum Münster, Germany a permis implementarea tehnicii SSCP ca metodă de screening prin estimarea mobilității electroforetice anormale a diferitor exoni ai genei ATP7B [1]. În cadrul proiectului pentru tineri cercetători "Asocierea mutațiilor frecvente în genele trombofilice cu pierderile de sarcină în populația Republicii Moldova" (2012-2013), s-a implementat metoda PCR-RFLP pentru depistarea mutațiilor trombofilice în gena β-Fibrinogen - 455G>A, GPIIIa L33P, FV Leiden, FV H1299R, Prothrombin G20210A, FXIII V34L [1].

În cadrul proiectului pentru tineri cercetători "Lărgirea spectrului mutațional în gena fenilalaninhidroxilazei (PAH) la pacienții cu fenilcetonurie din Republica Moldova" (2014-2015), finanțat de către AȘM, a fost realizată cercetarea lărgirii spectrului de mutații ale genei PAH, ce a permis elaborarea unei strategii de screening molecular al fenilcetonuriei. În urma inițierii unei colaborări cu „The Department of Metabolic Diseases” condus de Profesor Beat Tony din Elveția (Kinderspital Zurich – Eleonorenstiftung, Elveția), specializat în diagnosticul molecular al erorilor de metabolism, a fost posibilă secvențierea genei PAH la 40 de pacienți PKU din R. Moldova, cu genotipul nedefinitivat. Datele de la secvențierea genei PAH au permis ridicarea ratei de detecție a mutațiilor din gena PAH la 97% [1].

Din 2015, echipa de cercetare realizează proiectul MOL-GENEX-ERIC "Stimularea dezvoltării tehnologiilor inovatoare în cercetarea Geneticii Umane și promovarea participării active în proiecte prin conectarea la Infrastructura Cercetării Europene". În același an a fost creat Centrul Genetic de Excelență (GEC) și continuăm favorizarea participării active a cercetătorilor moldoveni în apelurile și proiectele de cercetare ale UE prin adăugarea la infrastructurile de cercetare europene (TREAT-N-MD, Metab-L etc.). Proiectul MOLGENEX-ERIC a valorificat colaborarea internațională în cadrul diferitor activități, avându-se în vedere o abordare pe două direcții: pe de o parte, inițiativele științifice specifice care au crescut sensibilizarea cu privire la implementarea tehnologiilor în domeniul geneticii moleculare și spori- rirea cunoștințele despre funcțiile genomului pentru diferite boli ereditare; iar pe de altă parte, au întreprins eforturi de îmbunătățire a nivelului de expertiză privind diagnosticul molecular în baza fondurilor UE și disemi- narea cunoștințelor atât la nivel de MGEC cât și în rân- durile cercetătorilor științifici moldoveni.

CONCLUZII

Metodele menționate vor permite lărgirea spectrului de diagnostic ADN pentru un număr mai mare de pato- logii. Astfel, succesele studiilor molecular-genetice ale Laboratorului în cercetarea fundamentală vor include datele noi obținute referitoare la specificul calitativ și cantitativ al mutațiilor, defectele responsabile pentru patologii ereditare frecvente, la predispoziția genetică pentru diverse manifestări clinice etc. Noile rezultate vor fi utilizate în elaborarea programelor de screening, în urma cărora va deveni posibil de a identifica purtăto- rii formelor nefavorabile ale genelor, respectiv de a es- tima riscurile asociate cu apariția patologiilor în cadrul populației țării.

Totodată, Laboratorul promovează consolidarea capa- cităților de infrastructură și potențial uman în Repu- blica Moldova, pentru dezvoltarea serviciilor noi de diagnostic molecular-genetic.

Funding. This initiative is funded by research project „Medicina Genomică și Metabolomică în serviciul profilaxiei maladiilor genetice pentru generații Sănă- toase în Republica Moldova” [SCREENGEN, Cipher: 20.800009.8007.22, Contract 22-PS, 03.01.2022].

BIBLIOGRAFIE

1. V. Sacară, A. Levițchi, St. Groppa, "Diagnosticul Mo- lecular-Genetic În Republica Moldova: istoria și per- spective", Buletin de Perinatologie, 2016, nr.1, p. 20-26.
2. K. Boiciuc, D. Badicean, V. Scurtu, E. Plîngau, N. Ușurelu, V.Sacără, „Trombofilia ereditară ca una din cauzele problemelor reproductive la femei”, Buletin de Perinatologie, 2015, nr. 1(65). p.61-68.

3. V. Hlistun, N. Șirocova, N. Ușurelu, V. Egorov, A. Parii, A. Muntean, V. Racilă, V. Sacară „Genele de faza a II-a (GSTM1, GSTT1, GSTP1) a detoxifica- rii xenobioticelor la femei cu pierderi reproductive din Republica Moldova”, Buletin de Perinatologie, 1(61), 2014, p. 47-51.
4. I.Coliban, N Revenco, D.Țurcan, V Egorov, N. Ușu- elu, V.Sacără, “Spinal Muscular Atrophy: news and perspectives”, Buletin de Perinatologie, 2020, 1(86) pag 38-42. ISSN: 1810-5289.
5. M. Scurtul, C. Boiciuc, D. Blăniță, V. Sacară, N.Ușu- relu, “Phenotype prediction in Phenylketonuria pa- tients from Moldova based on genotype data”, Bule- tin de Perinatologie, 2020, 1(86) pag 33-37.
6. D. Țurcan, D. Blăniță, N. Ușurelu, V. Sacară, “Me- thodological approaches in the molecular genetic analysis of mitochondrial DNA in patients with common clinical features of mitochondrial disease”, Buletin de Perinatologie. 2020, 1(86) pag 28-32.
7. D. Țurcan, N. Ușurelu, D. Blăniță, V. Sacară. „A rare mitochondrial disorder: leigh syndrome – a case re- port”, Buletin de Perinatologie. 2021, 1(90) pag 81- 85.
8. D. Blăniță, D. Țurcan, S. Garaeva, G. Postolati, V. Sacară, R. Wevers, R. Rodenburg, N. Ușurelu. „Mul- tisystem affection in child: NARP syndrome – mi- tochondrial disease (case presentation)”, Buletin de Perinatologie. 2021, 1(90) pag 86-91.
9. A. Dorif, L. Andries, V. Sacara, M. Filipenco, “Uti- lization of TREC and KREC quantification for im- mune deficiencies research in Moldova”, Biological markers in fundamental and clinical medicine, 2019, Vol.3, N1, p 20.
10. D. Turcan, L. Andries, A. Dorif, V. Sacara, “Clini- cal and molecular characteristics of 3 moldavian children with Wiskott-Aldrich Syndrome”. Biologi- cal markers in fundamental and clinical medicine, 2019, Vol.3, N1, p.108.
11. D. Turcan, L. Andries, A. Dorif, V. Sacara, “Analysis of clinical and molecular genetic characteristics of Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked throm- bocytopenia”. OH&RM, 2021, Vol.2 (3), p.66-71.
12. A. Dorif, V. Sakara , I. Palii, I. Rodoman, I. Opalco, S. Gladun, “Velo-cardio-facial syndrome diagnos- tics in Moldova by comparative expression qPCR”. International Congress of Geneticists and Breeders from the Republic of Moldova. Ediția 11, 15-16 iu- nie 2021, Chișinău, Republica Moldova: Centrul Editorial-Poligrafic al Universității de Stat din Mol- dova, 2021, p. 47. ISBN 978-9975-933-56-8.
13. V. Sacară “Particularitățile molecular-genetice ale patologiilor neuromusculare frecvent întâlnite în Republica Moldova” Autoreferatul tezei de doctor habilitat în științe biologice, Universitatea de stat “Dimitrie Cantemir” C.Z.U: 577.2:611.73(478), Chișinău, 2019.