

Promotor pracy:  
prof. dr hab. n. med. Rafał Płoski

mgr Izabela Pacek

Zakład Genetyki Medycznej

## wprowadzenie

**Poronienie** to przedwczesna utrata ciąży w wyniku wydalenia obumarłego zarodka lub płodu. Szacuje się, że **nawet połowa wszystkich poczęć** może kończyć się poronieniem. Najczęstszą przyczynę poronień stanowią **zaburzenia genetyczne zarodka**. Należy jednak pamiętać, że zdrowie matki oraz ojca, a także czynniki środowiskowe, nie są obojętne dla prawidłowego rozwoju ciąży.

**WES** (sekwencjonowaniu całego eksomu) to metoda pozwalająca na identyfikację zmian dotyczących jednego nukleotydu (tzw. SNV) i wariantów inercyjno-delecyjnych (tzw. INDELS), które są niewykrywalne w innych badaniach. Umożliwia również ocenę wariantów typu CNV oraz zmian w mitochondrialnym DNA (mtDNA).

## cel pracy

Celem pracy było poszukiwanie genetycznych przyczyn poronień przy wykorzystaniu **sekwencjonowania całego eksomowego (WES)**, w próbkach materiału poronnego, w których obecność aberracji chromosomowych o typie aneuploidii została wykluczona w badaniu sekwencjonowania płytkiego genomu (sWGS).

## materiały i metody

W pracy przeanalizowano pod kątem występowania nieprawidłowości genetycznych **8 przypadków poronień samoistnych**. W 6 przypadkach badano wyłącznie materiał genetyczny pochodzący od poronionych zarodków lub płodów (tzw. analiza **MONO WES**), a w 2 pozostałych wykonano badanie **TRIO WES**, w którym ocenie podlegał zarówno materiał poronny jak i DNA uzyskane od obojga biologicznych rodziców.

**Procedura WES** obejmowała izolację DNA, stworzenie biblioteki DNA, wzbogacenie biblioteki DNA (tj. wyodrębnienie eksomu), sekwencjonowanie, analizę bioinformatyczną oraz analizę ekspercką (tj. interpretacja kliniczna wariantów).

## wyniki

Warianty wytypowane w analizie eksperckiej, jako mające potencjalne znaczenie w patogenezie poronień, przedstawiono w poniższej tabeli.

gen	wariant	fenotyp	fenotyp w kontekście poronień
<b>REC114</b>	zmiany sensu VUS (3 pkt)	zatrzymanie dojrzewania oocyty/ zygoty/ zarodka (AR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>gen bezpośrednio związany z poronieniami, niepowodzeniem implantacji, zaburzeniem rozwoju zarodkowego</li> <li>wpływa na poprawną segregację chromosomów podczas podziałów komórkowych</li> </ul>
<b>DBF4</b>	zmiany sensu VUS (4 pkt)	gen niepowiązany z chorobą człowieka	<ul style="list-style-type: none"> <li>umożliwia rozpoczęcie replikacji DNA (w fazie S cyklu komórkowego)</li> <li>wpływa na poprawną segregację chromosomów podczas podziałów komórkowych</li> </ul>
<b>SLAC7A11</b>	zmiany sensu LP (6 pkt)	gen niepowiązany z chorobą człowieka	<ul style="list-style-type: none"> <li>represja <i>SLC7A11</i> aktywuje szlak ferroptozy (tj. śmierci komórki przez stres)</li> <li>wpływa na poprawną decidualizację (tj. przygotowanie endometrium do implantacji zarodka)</li> <li>wpływa na poprawne działanie mitochondriów w męskich komórkach rozrodczych</li> </ul>
<b>MOV10</b>	zmiany sensu VUS (2 pkt)	gen niepowiązany z chorobą człowieka	<ul style="list-style-type: none"> <li>u myszy: utrata obu kopii <i>MOV10</i> jest letalna do zarodków</li> <li>u żaby: zablokowanie transkryptów mRNA powoduje zaburzenie gastrulacji i brak formowania cewy nerwowej</li> <li>obniżona ekspresja <i>MOV10</i> może negatywnie wpływać na komórki macierzyste plemników</li> </ul>
<b>RBM8A</b>	intronowy VUS (6 pkt)	zespół TAR (AR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>udokumentowano przypadek martwego urodzenia dziecka z podejrzeniem zespołu TAR</li> <li>zmniejszona ekspresja genu u <i>Danio rerio</i> powoduje wady rozwojowe i śmierci zarodków</li> <li>warianty punktowe w genie częściej występują u pacjentek z wadami anatomicznymi (np. macica przegrodowa)</li> </ul>
<b>AKT1</b>	synonimiczny LB (-1 pkt)	zespół Cowdena (AD)	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>AKT1</i> uczestniczy w angiogenezie</li> <li>u gryzoni: inaktywacja <i>AKT1</i> powoduje dysfunkcję trofoblastu, a w konsekwencji ograniczenia wzrostu łożyska i płodu, co prowadzi do poronień zarodków</li> </ul>
<b>RYR2</b>	zmiany sensu P (10 pkt)	arytmie komorowe spowodowane zespołem niedoboru uwalniania wapnia z receptora ryanodynowego w sercu (AD), katecholaminergiczna tachykardia komorowa (AD)	<ul style="list-style-type: none"> <li>u myszy: całkowita inaktywacja <i>RYR2</i> jest letalna na etapie embrionalnym</li> <li>ma znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania serca (zarówno w kontekście płodu jak i matki)</li> </ul>
<b>MED13</b>	zmiany sensu VUS (2 pkt)	zaburzenia rozwoju intelektualnego (AD)	<ul style="list-style-type: none"> <li>u myszy: <i>MED13</i> jest wczesnym regulatorem aktywacji genomu zygotycznego (proces niezbędny w embriogenezie)</li> </ul>
<b>CHD3</b>	nonsensowny (kodon stop) VUS (2 pkt)	zespół Snijders-Blok-Campeau (AD)	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>CHD3</i> wpływa na integralność genomu, przebieg cyklu komórkowego i różnicowanie komórek macierzystych zarodka</li> <li>u myszy: inaktywacja <i>CHD3</i> spowodowało śmierć na etapie embrionalnym (poważne defekty mózgu)</li> </ul>
<b>VPS13D</b>	2 warianty: zaburzający splicing VUS (4 pkt) i zmiany sensu VUS (3 pkt)	ataksja rdzeniowo-mózdkowa (AR)	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>VPS13D</i> odpowiada za homeostazę błon komórkowych</li> <li>u myszy i much: całkowita inaktywacja <i>VPS13D</i> prowadzi do śmierci zarodków</li> <li>udokumentowano pojedynczy przypadek homozygotycznego wariantu typu zmiany sensu w <i>VPS13D</i> w powiązaniu z obumarciem wewnątrzmacicznym płodu (możliwy nowy fenotyp)</li> </ul>
<b>AK2</b>	zmiany sensu VUS (4 pkt)	dysgeneza siateczkowa (AR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>wysoka śmiertelność noworodków w wyniku zakażeń (SCID)</li> <li>gen predysponujący do powodowania poronień (gen kandydujący, w trakcie badań)</li> </ul>
<b>ABCA4</b>	2 warianty: zmiany sensu P (10 pkt) LP (6 pkt)	choroba Stargardta (AR), dystrofia czopkowo-pręcikowa (AR), zwyrodnienie barwnikowe siatkówki (AD)	<ul style="list-style-type: none"> <li>w teście asocjacji rzadkich wariantów (SKAT-O) wytypowano <i>ABCA4</i> jako nowy gen mający związek z występowaniem nawracających wczesnych poronień</li> </ul>

## wnioski

- Genetyczne przyczyny poronień nie ograniczają się wyłącznie do aberracji chromosomowych. Przyczyną mogą być **mutacje punktowe**.
- WES** stanowi obiecujące narzędzie diagnostyczne w poszukiwaniu przyczyn poronień, szczególnie tych o niewyjaśnionej etiologii.
- Istnieje potrzeba prowadzenia dalszych badań nad molekularnymi przyczynami poronień, ustaleniem **korelacji między genotypem a fenotypem** embrionalnym oraz **identyfikacją genów kandydujących**, których mutacje mogą prowadzić do niepowodzeń reprodukcyjnych.

