



Caracterització molecular de la Discinèsia Ciliar Primària

gencat.cat/ics

Sandra Rovira Amigo

Secció Pneumologia Pediàtrica i Fibrosi Quística

Hospital Universitari Vall d'Hebron

Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR)

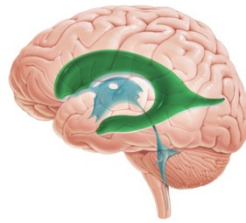
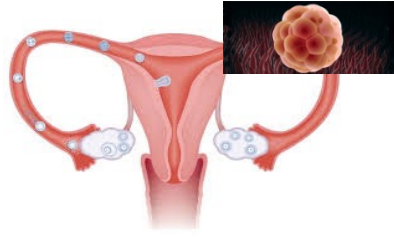
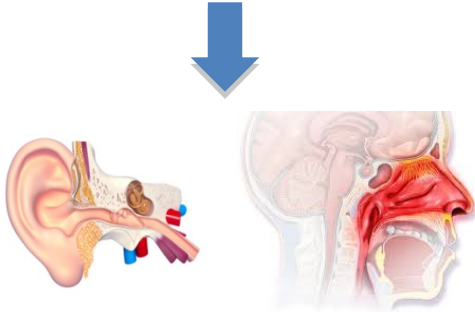
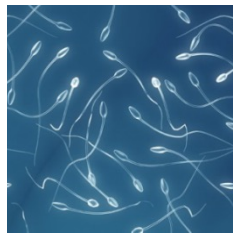
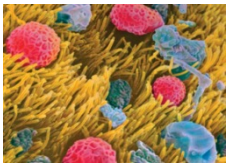
Barcelona

23 de maig de 2019 // // de 8.30 a 14.30 h

Centre Tarragonense "El Seminari"

Carrer de Sant Pau, 4

43003 Tarragona



Trastorn genètic



Alteració ultraestructura



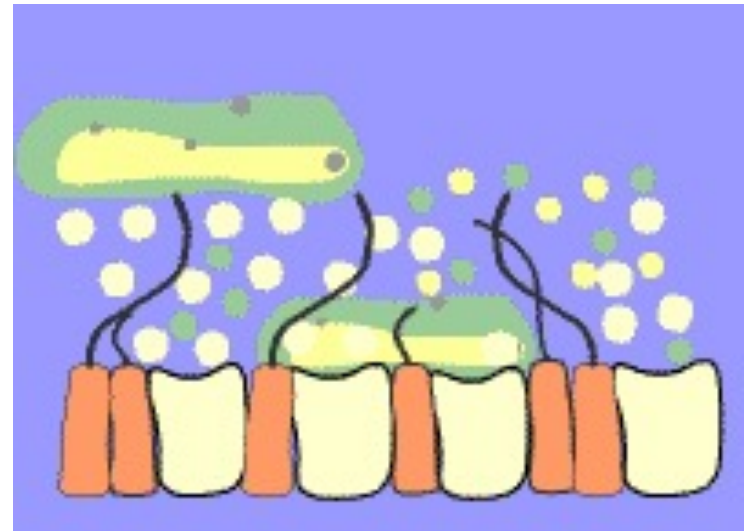
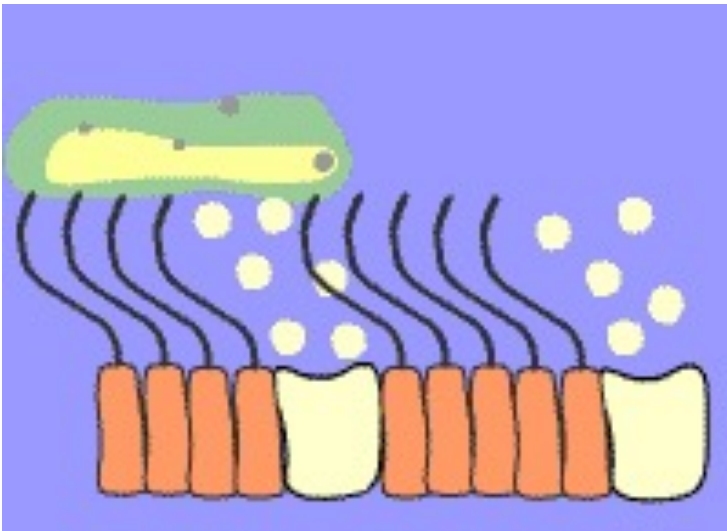
Alteració motilitat

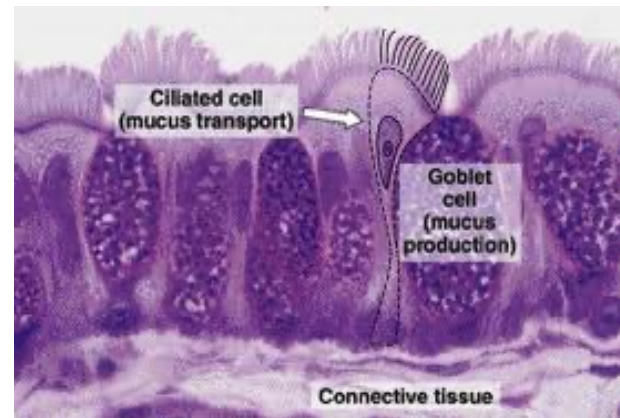
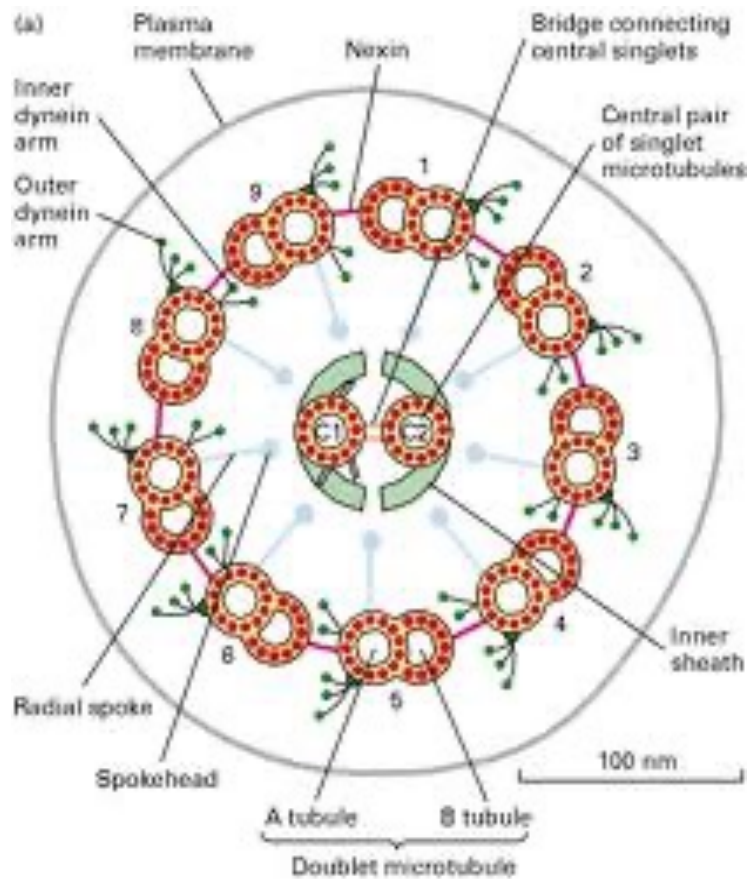


Alteració aclarament mucociliar



Clínica

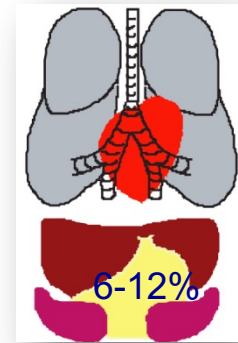
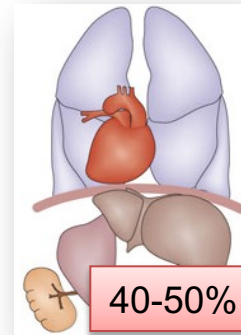




Primary ciliary dyskinesia: a consensus statement on diagnostic and treatment approaches in children

A. Barbato, T. Frischer, C.E. Kuehni, D. Snijders, I. Azevedo, G. Baktai, L. Bartoloni, E. Eber, A. Escribano, E. Haarman, B. Hesselmar, C. Hogg, M. Jorissen, J. Lucas, K.G. Nielsen, C. O'Callaghan, H. Omran, P. Pohunek, M-P.F. Strippoli and A. Bush

Prevalença
DCP:
1/16.000



Prenatal	Neonatal	Nens	Adolescents i adults
<ul style="list-style-type: none"> - Situs inversus o heterotàxia - Lleu ventriculomegàlia fetal cerebral 	<ul style="list-style-type: none"> - Distrès respiratori (atelèctasis) - Rinorrea contínua - Situs inversus o ambigu - Hidrocefàlia 	<ul style="list-style-type: none"> - Tos crònica diària - Atelèctasis recurrents o pneumònies - Asma atípica - Bronquièctasis - Rinitis diària - Sinusitis crònica - Otitis mitjana serosa - Sordesa 	<ul style="list-style-type: none"> - Mateixes que nens - Bronquièctasis més evidents (83%) - Expectoració mucopurulenta crònica - Acropàquies - Poliposi nasal - Infertilitat masculina (50%) - Subfertilitat, embaràs ectòpic (dones)

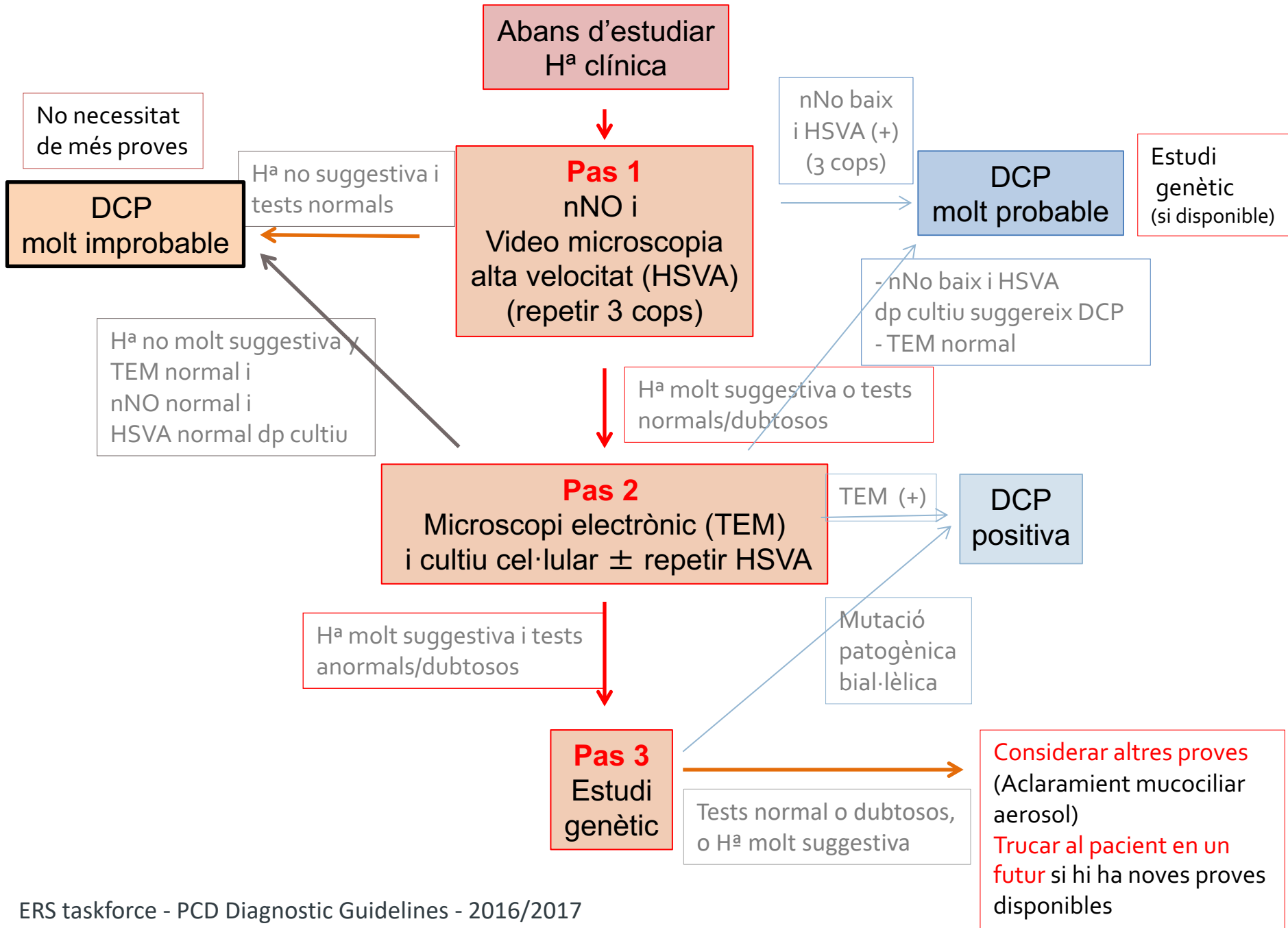


Diagnòstic

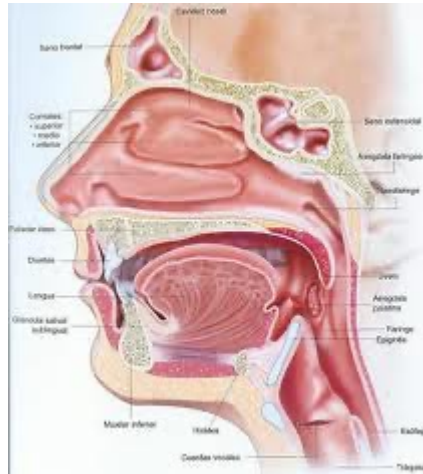
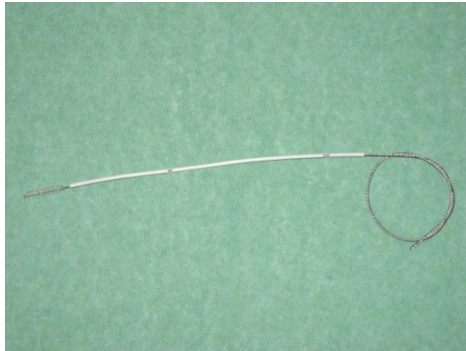
- Generalitats:
 - No existeix una prova diagnòstica “gold standard”
 - El diagnòstic depèn d’una combinació de tests
 - Estudis diagnòstics són complicats de realitzar i interpretar, són cars
 - Els tests diagnòstics no estan disponibles en tots els centres
 - En tots els centres és habitual trobar un nombre de pacients amb diagnòstic incert
- Proves diagnòstiques principals:
 - Òxid nítric nasal < 30 nL/min (S 0.91, E 0,96)
 - Microscopi electrònic. Normal 21% casos DCP (S 0,79, E 1)
 - Motilitat ciliar (microscopia òptica alta velocitat) (S 1, E 0,93)
 - Estudi genètic (detecta 70% gens associats amb DCP)

Lucas JS, Leigh M. Eur Respir J 2014; 44: 1418–22

Jackson C, et al. Eur Respir J 2016; 47: 837–848

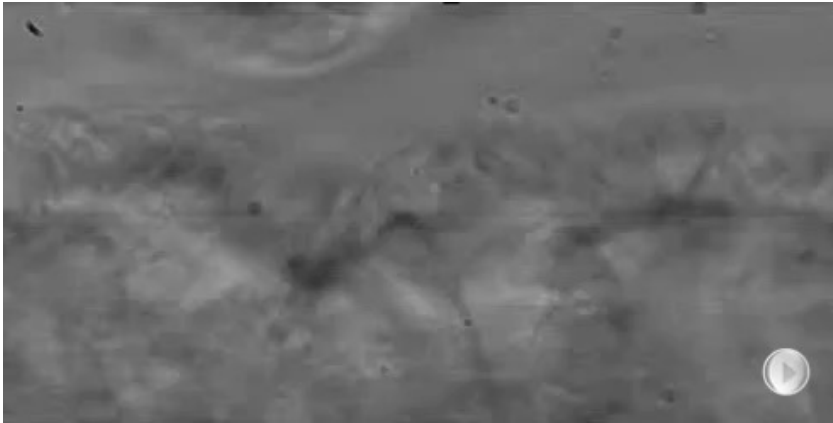


Mostra de raspallat nasal

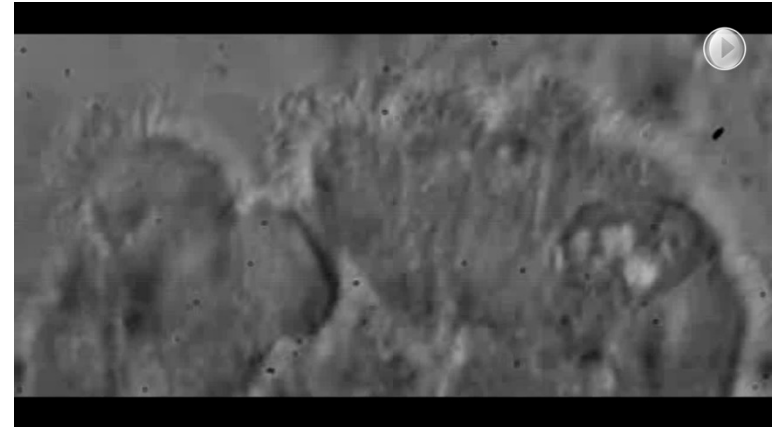


Estudi motilitat ciliar

Normal



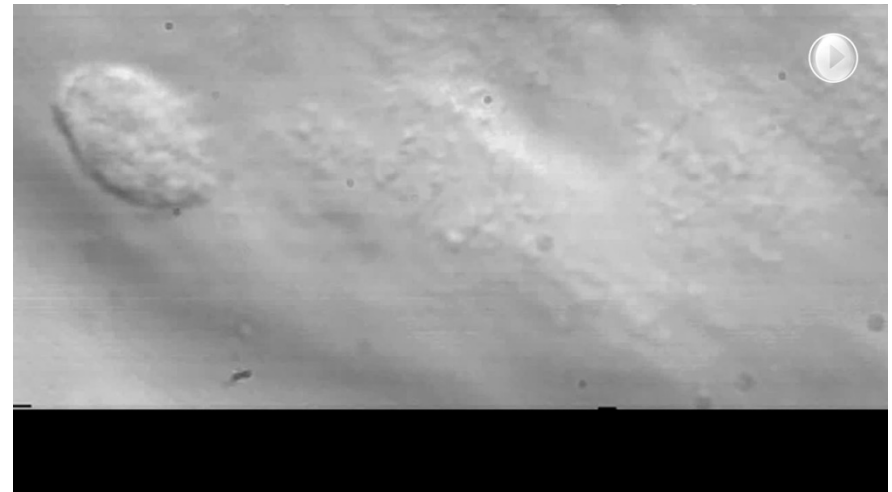
Estàtic (absència braços externs)



Rígid (absència BI, desorganització)



Rotatori (defectes parell central)





Absència de braços externs de dineïna

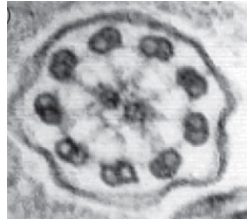
Proteïnes estructurals braç extern

DNAH5, DNAI1 (distal), DNAI2, DNAL1,, NME8 (TXNCD3)
ODA Docking protein

CCDC114, CCDC151, ARMC4 (distal), TTC25

Factor d'unió braç extern

CCD103



Absència d'ambdós braços de dineïna

Factors citoplàsmics pre-assembly

DNAAF1 (LRRC50), DNAAF2 (KTU), DNAAF3, DNAAF4 (DYX1C1)
DNAAF5 (HEATR2), LRRC6, C21orf59, c11orf 70, ZMYND10,
SPAG1, PIH1D3 (llogat al sexe), CFAP300



Absència de braços interns de dineïna i desorganització

Nexin-dinein regulatory complex (N-DRC)

CCD39, CCDC40

Proteïnes ponts de nexina

GAS8



Defectes del complex central

Proteïnes del parell central

HYDIN, STK36

Proteïnes del braç radial

RSPH4A, RSPH9, RSPH1,

RSPH3, DNAJB13



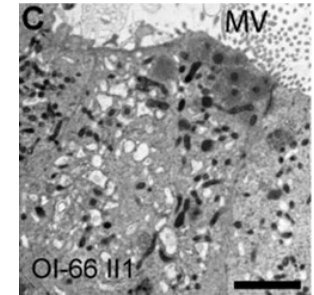
Microscopi electrònic normal o gairebé normal

Proteïnes estructurals ODA

DNAH11, DNAH9, DNAH1, GAS2L2, LRRC56

Proteïnes ponts de nexina

CCDC164 (DRC1), CCDC65 (DRC2), GAS8



Oligocília

Biogènesi cilis

CCNO, MCIDAS

Objectius

Beca SENP 2016



Beca FUCAP 2016



Proyecto FIS PI16/01233



- 1) Dissenyar (a través de seqüenciació de nova generació), validar i aplicar un panell mol·lecular de gens relacionats amb la discinèsia ciliar primària incloent els principals gens coneguts fins al moment actual
- 2) Caracteritzar les diferents alteracions genètiques associades a la discinèsia ciliar primària en el nostre medi
- 3) Realitzar estudis d'exoma en els casos sense mutacions caracteritzades, per a descobrir nous gens potencialment causals
- 4) Realitzar estudis funcionals d'expressió i localització dels elements de l'estructura ciliar, per analitzar l'efecte de les alteracions genètiques a nivell mol·lecular
- 5) Relacionar els fenotips clínics, de motilitat ciliar i ultraestructural, amb les alteracions genètiques trobades

Disseny de l'estudi

- Estudi multicèntric observacional de cohorts
- Pacients diagnosticats prèviament de DCP o durant l'estudi
- Dos centres de referència diagnòstica de DCP:
 - Hospital Vall d'Hebron
 - Grup de Discinèsia ciliar primària de València
- Unitats de Pneumologia pediàtrica de Catalunya i Andorra

Criteris d'inclusió

- Pacients diagnosticats de DCP en base a símptomes suggestius
- Troballes específiques de DCP en estudi de microscopia electrònica i/o videomicroscopia d'alta velocitat
- Adults sans voluntaris com a controls dels estudis funcionals (mostres de mucosa nasal)

Procediments de l'estudi

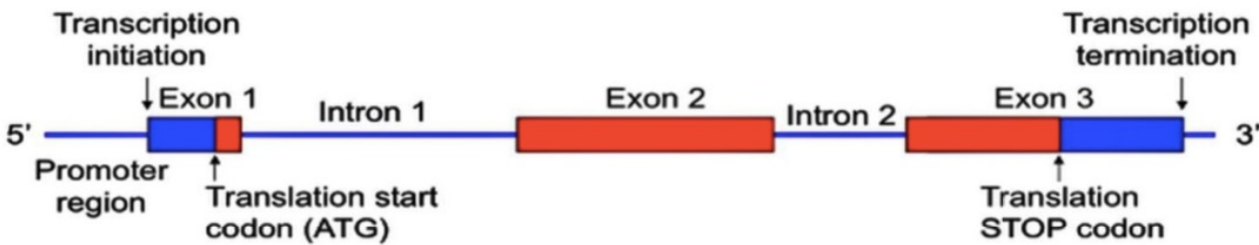
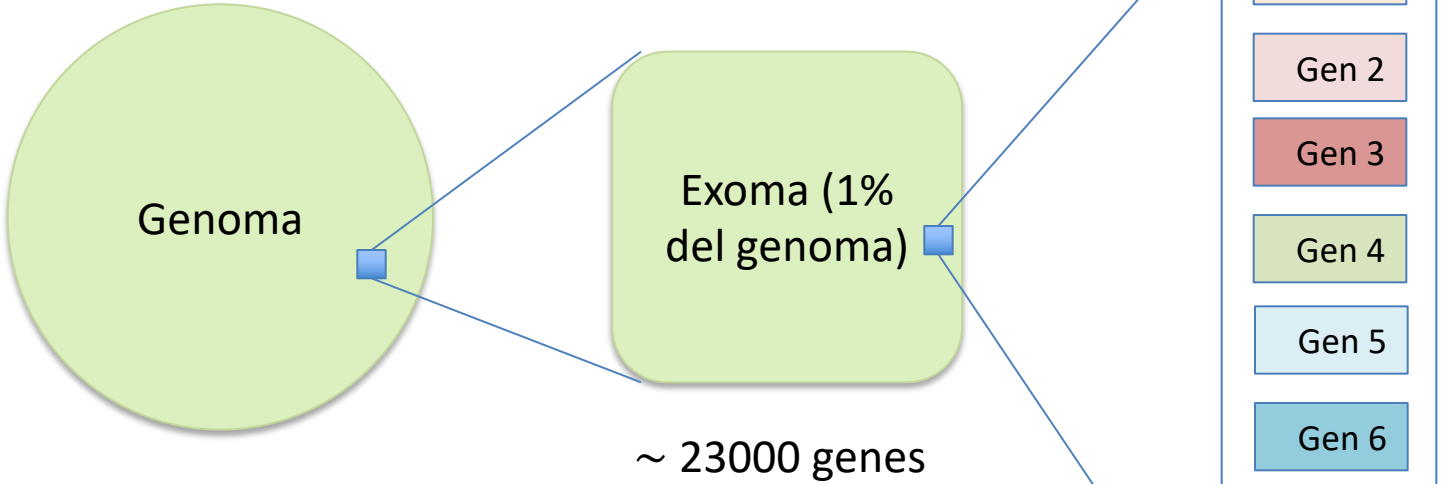
Disseny d'un panell de seqüenciació massiva de gens relacionats amb la discinèsia ciliar primària

Tecnologies de seqüenciació massiva (NGS)

1. Seqüenciació total del genoma (WGS)

2. Seqüenciació total de l'exoma (WES)

3. Panell de gens



Modificat de: Tenorio J, 13th PVRI Annual Congress 2019

Procediments de l'estudi

Disseny d'un panell de seqüenciació massiva de gens relacionats amb la discinèsia ciliar primària

- Selecció de gens candidats coneguts fins al disseny del panell (**40 gens**)
- Seqüenciació d'exons i regions intròniques adjacents
- Búsqueda de cobertura propera 100%
- Seqüenciador *MiSeq* (Illumina)
- Anotació de les variants detectades → programa ANNOVAR
- Estudis *in silico* i funcionals de la patogenicitat de les variants
- Confirmació de les variants patogèniques i estudi de familiars → Seqüenciació de Sanger

Procediments de l'estudi

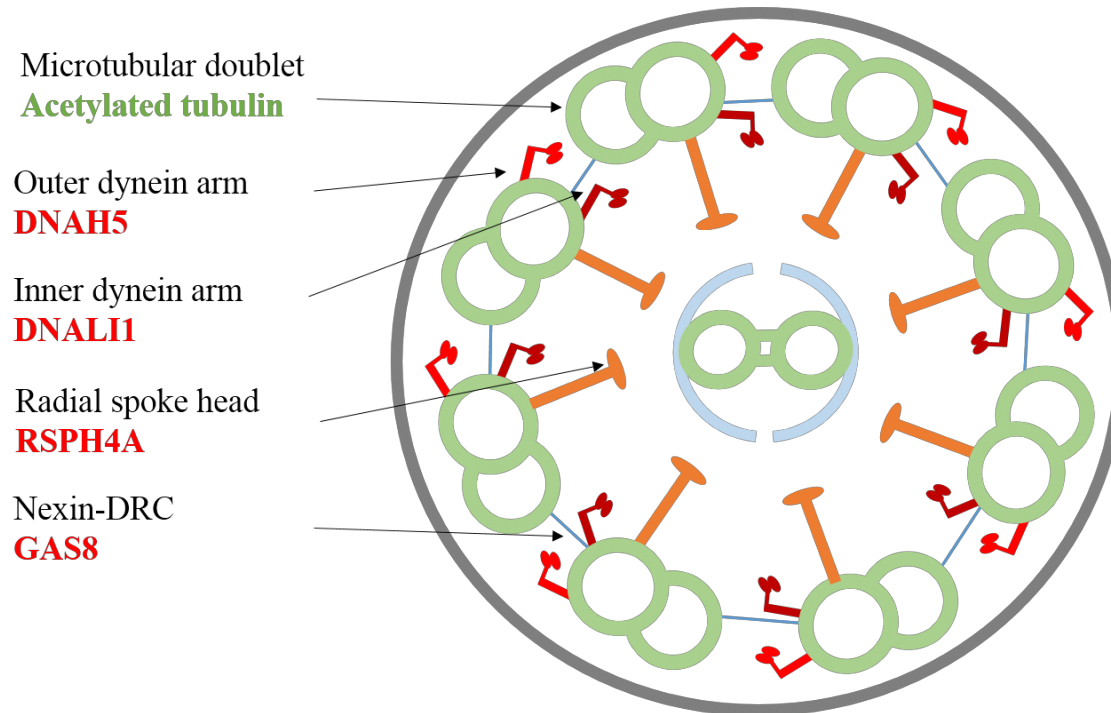
Estudis *in silico* – patogenicitat de les variants observades

- Anàlisi freqüències al·lèliques en la població general publicada en les bases de dades:
 - Genome Aggregation Database (gnomAD, <http://gnomad.broadinstitute.org>)
 - Exome Aggregation Consortium (ExAC, <http://exac.broadinstitute.org/>)
- Estudi comparatiu de la conservació en diferents espècies al llarg de l'escala evolutiva de l'aminoàcid afectat: GerpN
- Predicció de la patogenicitat *in silico*:
 - software Alamut v2.1 (Interactive Biosoftware)
 - Eines de predicció de patogenicitat: MutationTester, PolyPhen, Align GVGD, SIFT
 - Predicció dels patrons d'“splicing”: Gene Splicer, Human Splicing Finder, MaxEntScan, NNSPLICE i Splice site Finder-like
 - CADD V1.4 (<http://cadd.gs.washington.edu/>), VarSome website
- Comprovació addicional de mutacions conegudes patogèniques: *Human Gene Mutation Database (HGMD)*

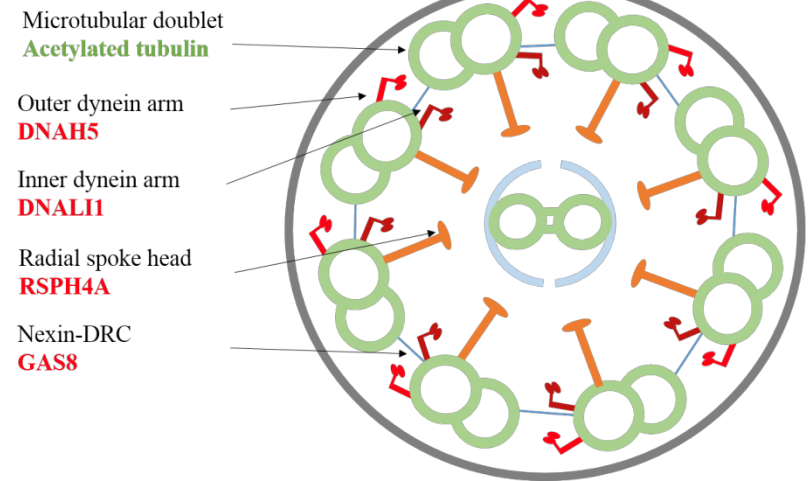
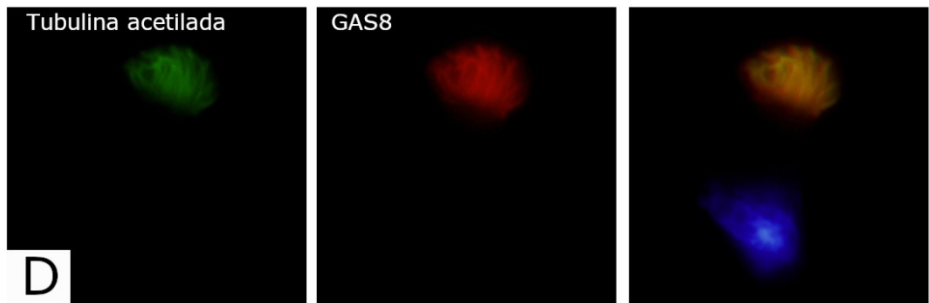
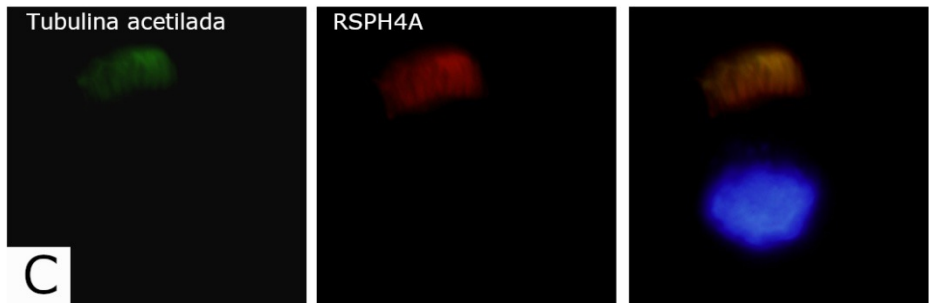
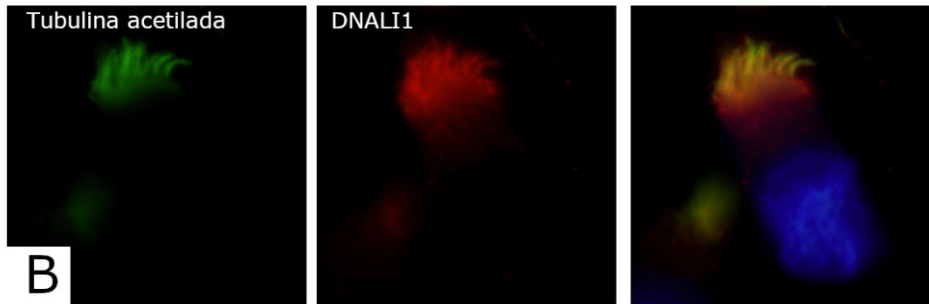
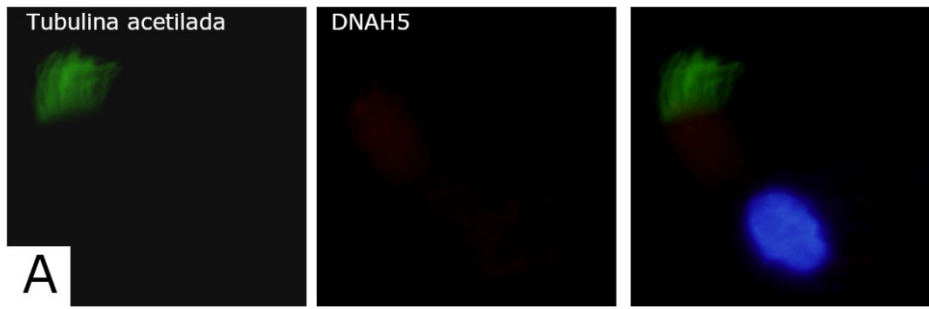
Procediments de l'estudi

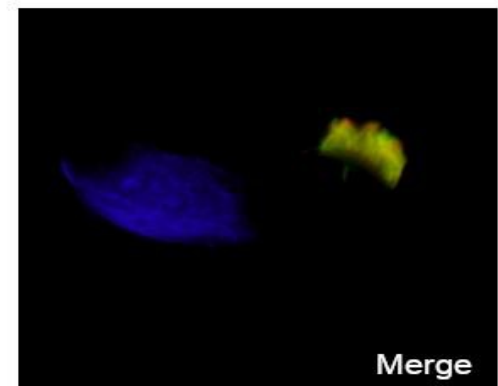
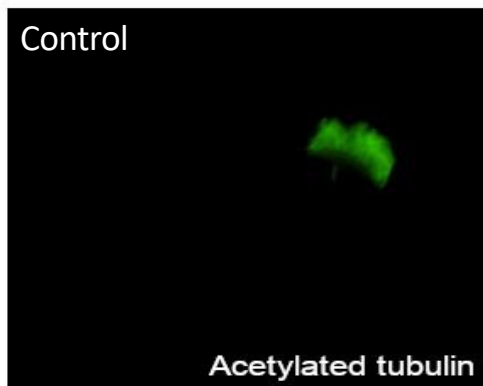
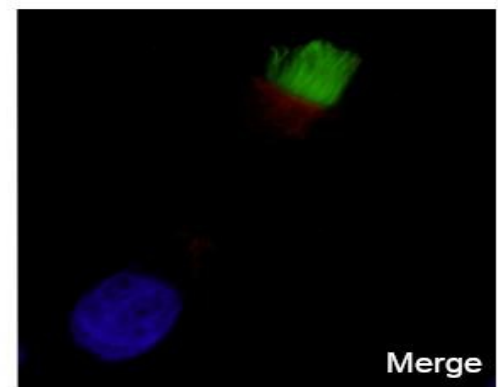
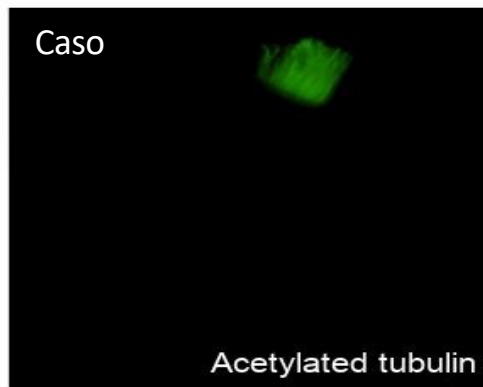
Estudis funcionals

- Immunofluorescència de les mostres d'epiteli nasal
 - Incubació de la mostra amb anticossos dirigits contra elements de l'ultraestructura ciliar: tubulina, DNAH5, DNALI1, RSPH4A, GAS8.



Anàlisi genètic: mutacions en heterozigosi composta al gen *DNAH5*: c.12706-2A>T i c.4625_4628delGAGA:p.(Arg1542ThrfsTer6)





Anàlisi genètic: variant patològica al gen *RSPH4A* (p.Arg486Stop) en homozigosi

Microtubular doublet

Acetylated tubulin

Outer dynein arm

DNAH5

Inner dynein arm

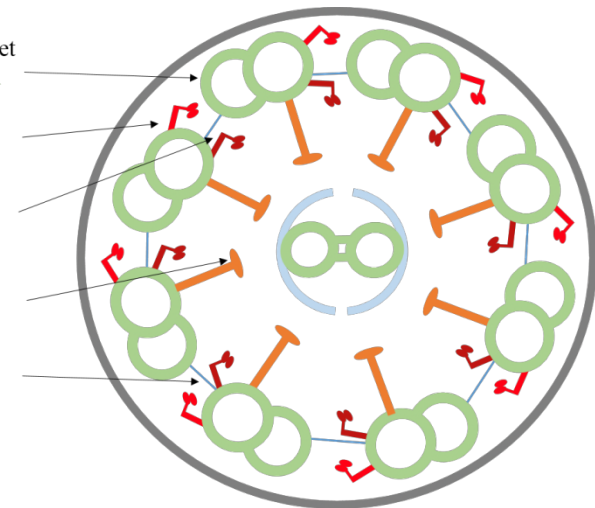
DNALI1

Radial spoke head

RSPH4A

Nexin-DRC

GAS8



Resultats

- Hospitals de procedència dels pacients

Hospitals	n	Pacients índex	Germans	Pendents analitzar
<i>Hospital Vall d'Hebron</i>	73	20	4	49
<i>Hospital Sant Joan de Déu</i>	16	5		11
<i>Hospital Clínic Valencia</i>	14	4		10
<i>Hospital Parc Taulí</i>	3	2		1
<i>Hospital del Mar</i>	2	1	1	-
<i>Hospital Miguel Servet</i>	4	2		2
<i>Hospital Germans Trias</i>	1	1		-
<i>Hospital Son Llàtzer</i>	1			1
Total	114	35	5	73

- 40 pacients
- Edat: 4 mesos – 49 anys
- 29 Catalunya i Espanya, 4 Paquistan, 5 Marroc, 2 Sud Amèrica
- 7 Consanguinitat

	Gen afectat	PICAD AR	nNO (nl/mi n)	Videomicroscopia alta velocitat	Immuno-fluorescència	Defecte ciliar
1*	<i>CCDC39</i>	7	-	-	-	-
2*	<i>CCDC39</i>	6	-	-	-	-
3*	<i>CCDC40</i>	8	1,65	7,35 Hz, rígids i immòbils	GAS8-, DNALI1	Desorganització MT, alt. nexina
4	<i>CCDC40</i>	7	-	5,47 Hz, rígids i immòbils	GAS8-, DNALI1	Desorganització MT, alt. nexina
5*	<i>DNAH5</i>	4	17,2	0.43 Hz, immòbils	DNAH5 -	Braços externs
6	<i>DNAH5</i>	4	15,2	1,81 Hz, immòbils	-	Braços externs
7*	<i>DNAH11</i>	11	15,01	11,8 Hz (hiperfreqüents) batec desorganitzat i rígid	Normal	Braços externs
8*	<i>DNAI2</i>	4	-	0 Hz, immòbils	DNAH5-, DNAI2-	Braços externs
9	<i>DNAI2</i>	6	14,2	0 Hz, immòbils	DNAH5-, DNAI2-	Braços externs
10*	<i>RSPH1</i>	4	67,3	8,54 Hz, moviment circular	-	Braç radial
11*	<i>RSPH4A</i>	3	-	8,68 Hz, moviment circular	RSPH4-	Braç radial
12	<i>RSPH4A</i>	8	-	8,31 Hz, moviment circular	-	Braç radial
13*	<i>RSPH9</i>	4	5,4	9,1 Hz, moviment circular	-	Braç radial
14*	<i>TTC25</i>	10	-	-	-	-

	Gen afectat	PICAD AR	nNO (nl/mi n)	Videomicroscopia alta velocitat	Immuno- fluorescència	Defecte ciliar
27*	<i>CCDC39</i>	8	67,7	9,22 Hz, rígid i disquinètic	DNAH5-, DNALI1-, GAS8-	Desorganització MT, alt. nexina
28*	<i>CCDC39</i>	10	34,9	16,69 Hz (hiperfreqüent), batec desorganitzat i rígid	-	Desorganització MT, alt. nexina
30*	<i>RSPH1</i>	4	15,9	9,53 Hz, moviment circular	-	Braç radial
31	<i>RSPH1</i>	6	47,8	8,59 Hz, moviment circular	-	Braç radial
32*	<i>TTC25</i>		2,3	0 Hz, immòbils	DNAH5-	Braç extern
36*	<i>CCDC39</i>	8	14,6	7,33 Hz, rígid i disquinètic	-	Desorganització MT, alt. nexina
37*	<i>DNAH9</i>	4		6,28 Hz, batec normal	proximal DNAH5	
40*	<i>DNAH5</i>	4	3,5	6.67 Hz (moviment residual), rígid i immòbil		Braç extern

Resultats

- 40 pacients → 35 casos índex i 5 germans
- 18/35 casos índex – variants candidates patogèniques
- 10 gens de discinèsia ciliar primària

	Analitzats	Gen candidat	No gen candidat
Pacients	40	23 (57,5%)	17 (42,5%)
Pacients índex	35	18 (51,4%)	17 (48,6%)
Germans afectes	5	5	0
Familiars	15	8	7
Total	55	30	26

- Estudi de discinèsia → malaltia poc probable en 7 pacients
- Freqüència casos DCP confirmada amb estudi genètic positiu 18/28 casos índex (64,2%) i 23/33 pacients (69,7%)

Resultats

- Gens candidats detectats

Braços externs – 8 (10)

Proteïnes estructurals

DNAH5 – 3 (4)

DNAI2 - 1 (2)

DNAH11 - 1

DNAH9 -1

Docking protein

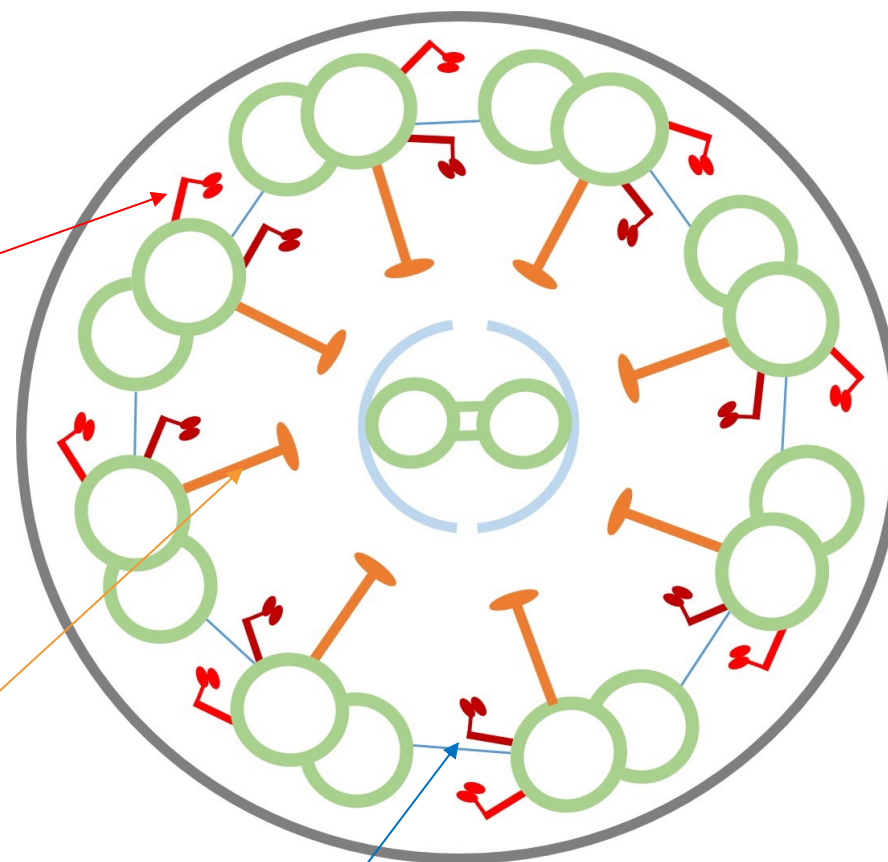
TTC25 - 2

Braç radial – 4 (6)

RSPH1 - 2 (3)

RSPH9 - 1

RSPH4A - 1 (2)



Nexin-dinein regulatory complex (N-DRC) – 6 (7)

CCDC39 - 5

CCDC40 – 1 (2)

Conclusions

- El nostre panell de gens per la discinèsia ciliar és útil per confirmar el diagnòstic
- 57,5% dels pacients estudiats presenten variants candidates
- El rendiment del panell en pacients amb malaltia demostrada és del 69,7% (64,2% per als casos índex)
- Els resultats es correlacionen amb l'ultraestructura ciliar i els anàlisis funcionals
- Estem incrementant el nombre de casos per completar la caracterització dels pacients del nostre medi
- Pendent completar estudis d'exoma i estudis funcionals
- L'estudi genètic no és un mètode d'screening eficaç quan la sospita de discinèsia és baixa
- L'estudi genètic no exclou el diagnòstic si és negatiu

Grup Creix. i Desenvolupament VHIR

Antonio Moreno
Sandra Rovira
Núria Camats
Mónica Fernández
Noelia Baz

Servei Anatomia Patològica HVH

Marta Garrido

Grup Discinèsia ciliar València

Amparo Escribano
Silvia Castillo
Miguel Armengot
Paco Dasí
Ana Reula

Hospital Miguel Servet

Carlos Martín

Hospital Parc Taulí

Oscar Asensio

Servei Andorrà de Salut

Gerardo Vizmanos

Servei Genètica HVH

María Antolin
Elena García Arumí
Eduardo Tizzano

Secció Pneumologia Pediàtrica HVH

Silvia Gartner
Inés Mir
Alba Torrent
Ignacio Iglesias

Hospital Sant Joan de Déu

Maria Cols

Hospital del Mar

Araceli Caballero

Hospital Germans Trias

Mar Martínez



Beca SENP 2016



Beca FUCAP 2016



Proyecto FIS PI16/01233



MOLTES GRÀCIES

ics.gencat.cat



Generalitat de Catalunya
Departament de Salut



Institut Català
de la Salut



IISPV
INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA
PERE VIRGILI