

RICARDO DI LAZZARO FILHO

**Estudo genético de pacientes com síndrome de Rothmund-  
Thomson**

**Genetic study of patients with Rothmund-Thomson syndrome**

Tese apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia da Universidade de São Paulo,  
para a obtenção do Título de Doutor em  
Ciências, na Área de Genética e Biologia  
Evolutiva

Orientadora: Dra. Débora Romeo Bertola

São Paulo

2023

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências da USP,  
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a) no formulário:  
'<https://biblioteca.ib.usp.br/ficha-catalografica/src/ficha.php>'

di Lazzaro Filho, Ricardo  
Estudo genético de pacientes com síndrome de  
Rothmund-Thomson / di Lazzaro Filho Ricardo ;  
orientador Romeo Bertola Débora -- São Paulo, 2023.  
80 p.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Biociências da  
Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Biológicas (Biologia Genética).

1. SÍNDROME DE ROTHMUND-THOMSON. 2. GENÉTICA  
MÉDICA. 3. GENÉTICA. 4. DNA. 5. SEQUENCIAMENTO  
GENÉTICO. I. Romeo Bertola, Débora, orient. Título.

Bibliotecária responsável pela catalogação:  
Elisabete da Cruz Neves - CRB - 8/6228

Nome: LAZZARO FILHO, Ricardo di

Título: Estudo genético de pacientes com síndrome de Rothmund-Thomson.

Tese apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia da Universidade de São Paulo,  
para a obtenção do Título de Doutor em  
Ciências.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Profa. Dra. \_\_\_\_\_

Orientadora

À dona do sorriso que me alegra em todas as manhãs.

*“The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not 'Eureka! ' but 'That's funny...’”*

Isaac Asimov

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, expresso minha gratidão aos pacientes atendidos e estudados durante esta pesquisa e às suas famílias, por permitirem que seus caracteres únicos contribuam para o progresso da ciência em nosso país. Espero que as descobertas deste estudo possam, em um futuro próximo, contribuir para mais saúde e conforto a todos.

Agradeço a Dra. Débora Romeo Bertola, cujo brilhantismo profissional, dedicação e atenção foram fonte de entusiasmo e orientação durante toda a minha jornada, desde o segundo ano da graduação em medicina até os dias atuais.

Com enorme apreço, reconheço todo o trabalho do amigo e colaborador além da academia, Guilherme Lopes Yamamoto, do Prof. Nicolas Carlos Hoch e de seu aluno Tiago Jose da Silva, e da Leticia Alves da Rocha, que desempenharam um papel crucial na realização de vários dos experimentos, e nas diversas discussões interessantíssimas, demonstrando a importância da colaboração e da visão multidisciplinar para o sucesso de um projeto de pesquisa.

À minha esposa, Andressa Almeida, e minha filha, Eva di Lazzaro, minhas fontes constantes de amor, alegria e encorajamento. Vocês são a razão pela qual acordo todos os dias querendo ser uma pessoa melhor.

Agradeço a toda a minha família, em especial à minha avó Dora Cotrim, por ser uma fonte inesgotável de inspiração, à minha mãe Claudia di Lazzaro, pelo imenso cuidado e dedicação de toda a vida, e à minha tia Luciana Cotrim, por seu incansável apoio e incentivo. Um agradecimento especial, também, aos meus irmãos Leonardo e Fernanda e ao meu pai, Ricardo.

A todos que fazem parte da Genera/Dasa, agradeço por permitir que o conhecimento que venho adquirindo na universidade seja aplicado e retornado à sociedade. Adicionalmente, pelo apoio financeiro e técnico na realização da genotipagem e de parte dos sequenciamentos genéticos realizados.

Aos professores e colaboradores do Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco e do Departamento de Genética do Instituto de Biociências, em especial, à Profa. Dra. Maria Rita Passos-Bueno e seu laboratório, por me receberem tão bem e por toda a prestatividade durante a pesquisa, e ao Prof. Michel Naslavsky, pelas ricas discussões e colaborações diversas nesses últimos anos.

Aos médicos e residentes da Unidade de Genética do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da FMUSP, em especial à Dra. Chong Ae Kim e à Dra. Rachel Honjo, Dr. Matheus Castro e Dra. Bianca Linnenkamp pelos atendimentos dos pacientes, pelas contribuições que deram ao trabalho e à publicação do artigo.

À Universidade de São Paulo (USP), agradeço por ter acreditado naquele garoto de 16 anos que sonhava em ser cientista. Não apenas uma vez, mas quatro, permitindo que eu permanecesse vinculado à instituição nos últimos 20 anos, por duas graduações, mestrado e doutorado.

Para a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, agradeço pelo apoio financeiro a esta pesquisa (FAPESP/CEPID - 2013/08028 / CNPq - 303375/2019) e a todo o desenvolvimento da ciência em nosso estado e país.

## NOTA DO AUTOR

Esta tese de doutorado compreende um trabalho inédito, desenvolvido entre os anos de 2019 e 2023, como continuidade do estudo realizado anteriormente durante o mestrado do autor.

O formato da tese será em capítulo/artigo, modelo aceito pelos programas de pós-graduação do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP). A obra inicia-se com uma introdução geral (capítulo 1), que compreende uma breve revisão sobre tema e os objetivos do trabalho, seguida pelo artigo científico publicado pelo autor e colaboradores (capítulo 2), a discussão geral e conclusões (capítulo 3), finalizando com o resumo/*abstract*. Com o intuito de preservar a identidade dos pacientes estudados, foram adicionadas tarjas em algumas das imagens originais, nesta publicação.

Com exceção do *abstract* e do artigo, redigido e publicado em inglês, todas as outras seções foram escritas em português, conforme especificado pelas normas do programa de pós-graduação. Artigos adicionais estão sendo redigidos a partir dos resultados desta pesquisa.



## ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	9
1.1	Doenças monogênicas e o diagnóstico molecular.....	10
1.2	Síndrome de Rothmund-Thomson.....	11
1.2.1	Aspectos clínicos.....	11
1.2.2	Aspectos moleculares.....	13
1.3	Diferenciais diagnósticos e síndromes correlatas.....	20
1.4	Objetivos gerais.....	22
1.5	Casuística.....	22
2	BIALLELIC VARIANTS IN DNA2 CAUSE POIKILODERMA WITH CONGENITAL CATARACTS AND SEVERE GROWTH FAILURE REMINISCENT OF ROTHMUND-THOMSON SYNDROME.....	31
3	DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES.....	65
3.1	Síndrome de Rothmund-Thomson e o gene <i>DNA2</i> .....	66
3.2	Conclusões.....	73
	RESUMO.....	77
	ABSTRACT.....	78
4	ANEXOS E APÊNDICES.....	79



## 1.1 Doenças monogênicas e o diagnóstico molecular

As doenças monogênicas, também conhecidas como doenças mendelianas, constituem um extenso grupo de condições genéticas, que são caracterizadas por um fenótipo resultante de variantes patogênicas/provavelmente patogênicas em um único gene (CHONG et al., 2015). Apesar de serem classificadas, em sua maioria, como doenças raras, com uma prevalência menor que 1:2.000 nascimentos (NGUENGANG WAKAP et al., 2020), estima-se que haja mais de 10.000 doenças monogênicas na espécie humana (OMIM, 2023). No catálogo *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM), em junho de 2023, estavam descritos 6.665 fenótipos com base molecular conhecida, e uma lista adicional de 4.367 fenótipos, ou de base molecular desconhecida (1.507) ou suspeita de etiologia monogênica (1.747).

Quando agrupadas, essas doenças correspondem a uma parcela significativa de anormalidades em nascidos vivos, com uma taxa entre 40 e 82 a cada 1.000 (JAMUAR et al., 2015), reforçando sua relevância em termos de saúde pública e, por conseguinte, as adequações recentemente realizadas pelos sistemas de saúde de vários países, incluindo o Brasil (BRASIL, 2014).

A revolução nas técnicas de sequenciamento de DNA nas últimas duas décadas resultou numa drástica redução de custos e no aumento da velocidade de sequenciamento (WETTERSTRAND, 2023). Isso facilitou o acesso a testes genéticos, como o sequenciamento de múltiplos genes em painéis gênicos, o sequenciamento completo do exoma e do genoma, ampliando significativamente o entendimento das bases moleculares das doenças mendelianas e a descoberta de novas variantes patogênicas (BOYCOTT et al., 2017).

No entanto, apesar dos avanços notáveis no campo da genômica, como observado pelas estatísticas apresentadas no OMIM, mais de metade das doenças raras permanecem ainda sem etiologia conhecida (FERREIRA, 2019).

O conhecimento das bases moleculares constitui o primeiro passo para a realização de um diagnóstico mais preciso de uma determinada doença

mendeliana, com possibilidade de avanços na pesquisa para o desenvolvimento de tratamentos direcionados.

## **1.2 Síndrome de Rothmund-Thomson**

A síndrome de Rothmund-Thomson (SRT), primeiramente identificada pelo oftalmologista alemão Auguste Rothmund em 1868, é uma doença rara, considerada uma genodermatose. Inicialmente, Rothmund documentou o caso de quatro pacientes, filhos de pais consanguíneos, apresentando alterações na pele e catarata juvenil. Posteriormente, o dermatologista inglês Sydney Thomson descreveu um quadro semelhante em três indivíduos, porém, estes apresentavam alteração óssea e ausência de catarata (VENNOS; COLLINS; JAMES, 1992).

Embora não existam dados epidemiológicos precisos, até o momento, menos de 500 casos de SRT foram descritos na literatura (WANG; PLON, 2020).

### **1.2.1 Aspectos clínicos**

A manifestação clínica da SRT é caracterizada primordialmente por evolução de lesões cutâneas no primeiro ano de vida, com incidência inicial na face e membros, progredindo para um aspecto chamado de poiquilodérmico. O aparecimento das lesões inicia-se entre três e seis meses de idade, frequentemente apresentando um quadro eritematoso facial que pode ser acompanhado por edema e formação de bolhas, com comprometimento subsequente da região glútea e das extremidades. No decorrer de meses a anos, essas lesões evoluem para uma poiquilodermia, condição marcada por manchas reticulares hipopigmentadas e hiperpigmentadas, combinadas com telangiectasias e áreas atróficas. Eventos sequenciais incluem o surgimento de alopecia progressiva e desenvolvimento precoce de catarata juvenil, observada em 70% dos casos antes dos seis anos de idade (MARQUES et al., 2008; WANG; PLON, 2020).

As manifestações clínicas se estendem para além da pele, com casos de baixa estatura, hipogonadismo e anormalidades dentárias, incluindo a ocorrência de dentes supranumerários ou hipodontia. Além disso, é documentada a presença de anormalidades esqueléticas em aproximadamente 75% dos pacientes, especialmente hipoplasia ou agenesia de ossos do eixo radial (polegar/rádio) e da patela, bem como osteopenia. Esses distúrbios esqueléticos frequentemente resultam em maior suscetibilidade a fraturas e consolidação mais lenta, devido à redução concomitante da densidade óssea (BECKMANN, 2015; LU; JIN; WANG, 2017).

Características clínicas adicionais podem abranger a presença de bossa frontal, prognatismo, microftalmia, microcórnea, estrabismo, glaucoma, disgenesia da íris, nariz curto, pâncreas anular, ânus anteriorizado, criptorquidia, mãos e pés pequenos, unhas distróficas, embranquecimento prematuro do cabelo e deficiência intelectual (WANG; PLON, 2020). Alguns dos principais sinais da SRT são ilustrados na Figura 1.

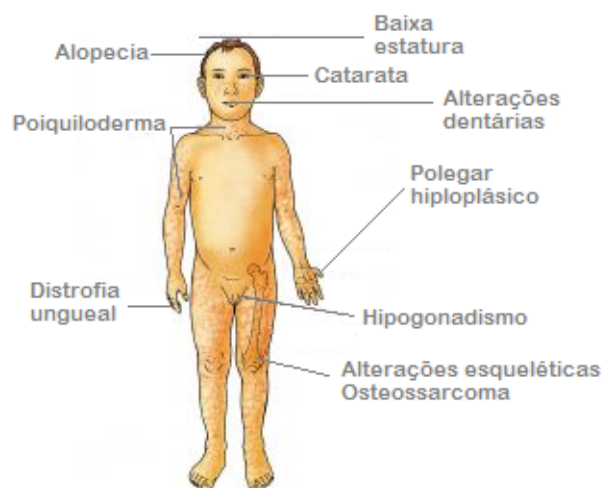


Figura 1 - Achados clínicos da síndrome de Rothmund-Thomson. Adaptado de CRAM (2010).

A SRT é frequentemente classificada como uma síndrome progeróide, ou de envelhecimento acelerado, devido à presença de características clínicas que imitam o envelhecimento prematuramente. Tais características incluem, principalmente, o envelhecimento precoce da pele, alopecia, catarata,

osteoporose e o risco aumentado de desenvolver determinados tipos de câncer, particularmente o osteossarcoma (OSHIMA et al., 2018).

### 1.2.2 Aspectos moleculares

A SRT apresenta heterogeneidade genética de loco. Inicialmente, esta síndrome havia sido associada a variantes bialélicas no gene *RECQL4*, conforme descrito por Kitao e colaboradores em 1999, sendo historicamente chamada de SRT tipo II. Entretanto, em um avanço recente no entendimento da condição Ajeawung e colaboradores (2019) revelaram que variantes bialélicas no gene *ANAPC1* podem causar a SRT historicamente definida como tipo I (WANG; PLON, 2020).

Essa diversidade gênica é paralelamente refletida em variações fenotípicas entre os pacientes com SRT. Foi observado que osteossarcoma e defeitos esqueléticos são mais frequentemente encontrados em indivíduos com SRT associada a variantes patogênicas do *RECQL4* (WANG et al., 2001; WANG et al., 2003; MEHOLLIN-RAY et al., 2008). Por outro lado, a presença de cataratas juvenis bilaterais está mais frequentemente associada às variantes patogênicas do *ANAPC1* (AJEAWUNG et al., 2019).

#### Gene *RECQL4*

O gene *RECQL4* está situado no final do braço longo do cromossomo 8, especificamente na região 8q24.3 (Figura 2). Ele integra a família RecQ de helicases de DNA, notavelmente conservada em diversas espécies, desde bactérias até seres humanos. As proteínas helicases desempenham papel fundamental na replicação do DNA, promovendo a separação da dupla hélice.

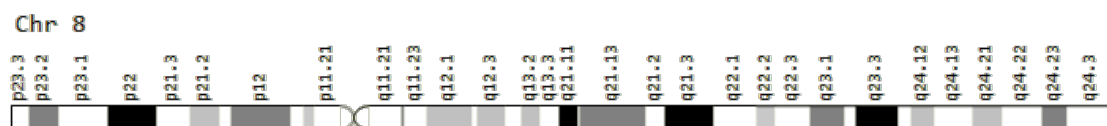


Figura 2 - Localização genômica do gene *RECQL4* no cromossomo 8. Retirado do site Genecards®

Em humanos, a família RecQ é constituída por cinco membros distintos: *RECQL1*, *RECQL2/WRN*, *RECQL3/BLM*, *RECQL4* e *RECQL5*. Em particular, as variantes patogênicas em *RECQL2/WRN*, *RECQL3/BLM* estão também correlacionadas com doenças progeróides, respectivamente, às síndromes de Werner e de Bloom (KAROW et al., 2000; LINDOR et al., 2000).

A proteína humana DNA helicase Q4 (RecQ protein-like 4) possui 133 kDa e é composta por 1.208 aminoácidos (SUTER et al., 2016). Esse gene apresenta uma estrutura genômica peculiar, com 21 éxons concentrados em apenas 6 Kb de DNA genômico, e íntrons relativamente curtos, com aproximadamente 80 pb, uma característica que tem sido associada a eventos de *splicing* ineficientes.

Até o momento, 96 variantes patogênicas associadas à SRT foram catalogadas no Human Gene Mutation Database (HGMD), compreendendo mutações *missense*, *nonsense* e *frameshift*, além de inserções e deleções distribuídas por todo o gene e variantes em sítios de *splicing*.

Tabela 1 - Variantes identificadas em *RECQL4* associadas à síndrome de Rothmund-Thomson tipo II reportadas na literatura (HGMD, 2023)

Alteração no DNA <i>RECQL4</i> :NM_004260.3	Alteração na proteína	Referência
<b>Variantes do tipo missense/nonsense</b>		
c.212A>G	p.(Glu71Gly)	Wang et al. (2003)
c.308C>T	p.(Pro103Leu)	Wang et al. (2003)
c.691G>A	p.(Gly231Ser)	Gui et al. (2018)
c.759G>T	p.(Gln253His)	Cabral et al. (2008)
c.792G>A	p.(Trp264*)	Powis et al. (2018)
c.910C>T	p.(Gln304*)	Wang et al. (2018)
c.1000G.T	p.(Glu334*)	Al-Shamsi et al. (2016)
c.1078C>T	p.(Gln408*)	Suter et al. (2016)
c.1089C>G	p.(Tyr363*)	Ceyhan-Birsoy et al. (2019)
c.1149G>A	p.(Trp383*)	Reix et al. (2007)
c.1222C>T	p.(Gln408*)	Suter et al. (2016)
c.1236G>A	p.(Trp412*)	Piard et al. (2015)
c.1397C>T	p.(Pro466Leu)	Jin et al. (2008)
c.1531T>C	p.(Cys511Arg)	Piard et al. (2015)

c.1564C>T	p.(Arg522Cys)	Wang et al. (2003)
c.1678A>T	p.(Lys560*)	Dang et al. (2009)
c.1697T>C	p.(Leu566Pro)	Suter et al. (2016)
c.1772C>T	p.(Pro591Leu)	Jin et al. (2008)
c.1913T>C	p.(Leu638Pro)	Sznajer et al. (2008)
c.2161C>T	p.(Arg721*)	Cao et al. (2017)
c.2221G>A	p.(Ala741Thr)	Cabral et al. (2008)
c.2263C>T	p.(Arg755Trp)	Grelet et al. (2019)
c.2269C>T	p.(Gln757*)	Kitao et al. (1999)
c.2272C>T	p.(Arg758*)	Colombo et al. (2014)
c.2395G>A	p.(Val799Met)	Wang et al. (2003)
c.2398C>T	p.(Gln800*)	Siitonen et al (2009)
c.2428C>T	p.(Gln810*)	Wang et al. (2003)
c.2461C>T	p.(Gln821*)	Siitonen et al (2009)
c.2476C>T	p.(Arg826*)	Wang et al. (2003)
c.2590C>T	p.(Gln864*)	Piard et al. (2015)
c.2662C>T	p.(Gln888*)	Jin et al. (2008)
c.2719C>T	p.(Gln907*)	Wang et al. (2018)
c.2780T>G	p.(Leu927Arg)	Cabral et al. (2008)
c.2802G>A	p.(Trp934*)	Piard et al. (2015)
c.3062G>A	p.(Arg1021Gln)	Wang et al. (2003)
c.3061C>T	p.(Arg1021Trp)	Kellermayer et al. (2005)
c.3313G>A	p.(Gly1105Ser)	Jin et al. (2008)
c.3509C>T	p.(Pro1170Leu)	Wang et al. (2003)
c.3523C>T	p.(Gln1175*)	Wang et al. (2003)
c.3573C>G	p.(Ser1191Arg)	Suter et al. (2016)
<b>Variantes de splicing</b>		
c.1132-2A>G	--	Yadav et al. (2019)
c.1391-1G>A	--	Lindor et al. (2000)
c.1704G>A	--	Wang et al. (2003)
c.1705-1G>A	--	Sznajer et al. (2008)
c.1704+1G>A	--	Simon et al. (2010)
c.1878+5G>A	--	Wang et al. (2003)
c.2059-1G>C	--	Beghini et al. (2003)
c.2059-1G>C	--	Kitao et al. (1999)
c.2464-1G>C	--	Wang et al. (2003)
c.2886-2A>T	--	Jin et al. (2008)
c.3054A>G	--	Colombo et al. (2018)
c.3236G>T	--	Colombo et al. (2018)



<b>Variantes do tipo deleções pequenas</b>		
c.84+6_84+21del16	--	Siitonen et al (2009)
c.1048_1049delAG	p.(Ag350Glyfs*21)	Wang et al. (2003)
c.1343_1347delCCACC	p.(Pro448Argfs*18)	Piard et al. (2015)
c.1568delG	p.(Ser523Thrfs*35)	Cabral et al. (2008)
c.1573delT	p.(Cys525Alafs*33)	Lindor et al. (2000)
c.1650_1656delGGCCTGC	p.(Ala551Tyrfs*5)	Kitao et al. (1999)
c.1718delA	p.Gln573Argfs*5)	Wang et al. (2003)
c.1724_1725delAC	p.(His575Argfs*7)	Gui et al. (2018)
c.1919_1941_TCACAG	p.(Leu640_Ala642delinsPro)	Simon et al. (2010)
c.2085delA	p.(Lys695Asnfs*148)	Suter et al. (2016)
c.2412_2420delGGCCGGGCG	p.(Ala805_Arg807del)	Colombo et al. (2018)
c.2492_2493delAT	p.(His831Argfs*52)	Kitao et al. (1999)
c.2547_2548delGT	p.(Phe850Profs*33)	Wang et al. (2003)
c.2552delC	p.(Pro879Leufs*69)	Wang et al. (2003)
c.2767_2768delTT	p.(Leu923Alafs * 53)	Fradin et al. (2013)
c.3008_3009delTG	p.(Val1003Alafs*29)	Suter et al. (2016)
c.3021_3022delCT	p.(Cys1008Profs*24)	Colombo et al. (2018)
c.3072_3073delAG	p.(Val1026Alafs*6)	Wang et al. (2003)
c.3270delG	p.(Glu1090Aspfs*60)	Siitonen et al (2009)
c.3277delG	p.(Asp1093Metfs*57)	Wang et al. (2003)
c.3501_3502delCG	p.(Ile116Metfs*59)	Wang et al. (2018)
c.3599_3600delCG	p.(Thr1200Argfs*26)	Siitonen et al (2009)
<b>Variantes do tipo inserções pequenas</b>		
c.156_160dupGGGCC	p.(Gln54Argfs*31)	Wang et al. (2018)
c.558_564dupAGATCCT	p.(Gly189Argfs*11)	Suter et al. (2016)
c.1015dupC	p.(Leu339Profs*11)	Jin et al. (2008)
c.1453dupC	p.(Gln485Profs*55)	Bhoyrul et al. (2017)
c.1930_1935dupGCCACA	p.(Ala644Thr645dup)	Suter et al. (2016)
c.2211dupC	p.(Lys738Glnfs*71)	Wang et al. (2003)
c.2277dupC	p.(Phe760Leufs*49)	Suter et al. (2016)
c.2415_2419dupCGGGC	p.(Arg807Profs*38)	Grelet et al. (2019)
c.2415_2419insCGGGG	p.(Arg807Profs*38)	Siitonen et al (2009)
c.2421dupT	p.Asp808*	Gui et al. (2018)
c.2569_2574dupTGCACC	p.(Cys857_thr858dup)	Suter et al. (2016)
c.2638dupC	p.Gln880Profs*4)	Jin et al. (2008)
c.3284_3287dupAGCG	p.(Ser1097Alafs*14)	Cao et al. (2017)
c.3330dupA	p.(Glu1111Argfs*116)	Suter et al. (2016)
<b>Variantes do tipo indels pequenas</b>		

c.978_979delTCinsG	p.(Ser326Argfs*33)	Yadav et al. (2019)
c.1568_1573delGCCCCTinsCCCC	p.(Ser523Thrfs*35)	Suter et al. (2016)
c.3283delGinsCC	p.(Glu1095Profs*15)	Zhang et al. (2015)
<b>Variantes do tipo deleções maiores</b>		
c.118+27del25	--	Jin et al. (2008)
c.1770_1807del38	--	Gui et al. (2018)
c.1878+32_1878+55del24	--	Wang et al. (2003)
c.2789_2812del24	--	Suter et al. (2016)
c.3502+44_3502+96del53	--	Cao et al. (2017)

--: não existente ou não disponível

Junto à SRT, mutações patogênicas em *RECQL4* estão associadas a síndrome de Baller-Gerold (SBG) e a síndrome de RAPADILINO (SR) (VAN MALDERGEM et al., 2006), duas condições raras caracterizadas por um espectro de manifestações clínicas que incluem envelhecimento precoce, instabilidade genômica, alterações esqueléticas e predisposição ao câncer. A SBG apresenta mais comumente craniossinostose e anomalias radiais, enquanto a SR caracteriza-se por aplasia/hipoplasia RAdial e da Patela, Diarreia crônica e luxações articulares (*Dislocated joints*), baixa estatura e anomalias de membros (*Little size, Limb malformations*, nariz alongado e inteligência normal (*slender NOse, NOrmal intelligence*), cujo acrônimo RAPADILINO foi proposto baseado nestas características.(SIITONEN et al., 2009). A complexidade e a sobreposição dos fenótipos associados a essas síndromes destacam a necessidade de uma melhor compreensão das funções do gene *RECQL4* e de suas variantes patogênicas.

### Gene *ANAPC1*

O gene *ANAPC1* está localizado no braço longo do cromossomo 2, na região 2q13 (Figura 3), e codifica a proteína *Anaphase Promoting Complex Subunit 1*, um componente do complexo anáfase-promotor (APC/C), composto por diversos subcomponentes, sendo esta proteína especificamente parte do complexo catalítico do APC/C, essencial para a atividade de ubiquitina ligase do complexo.

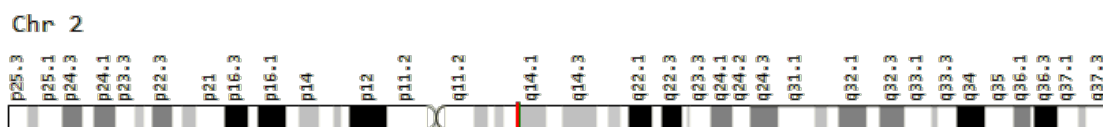


Figura 3 - Localização genômica do gene *ANAPC1* no cromossomo 2. Retirado do site Genecards®

O complexo APC/C desempenha um papel crucial na regulação do ciclo celular, direcionando a degradação de proteínas específicas para assegurar a progressão ordenada através das fases do ciclo celular (PINES, 2011).

Até o momento, foram reportados treze pacientes de SRT tipo I com alterações patogênicas identificadas em *ANAPC1*. Destes, sete eram homozigotos para a variante intrônica c.2705-198C>T, presente em todos os casos relatados e que gera uma perturbação no *splicing* do gene (Tabela 2).

Tabela 2 - Variantes patogênicas em *ANAPC1* associadas à síndrome de Rothmund-Thomson tipo I

Alteração no DNA <i>ANAPC1</i> :NM_022662.3	Alteração na proteína	Casos reportados	Referência
		10	AJEWUNG et al. (2019)
c.2705-198C>T	Alteração de <i>splicing</i>	1	ZIRN et al. (2021)
		2	SCHWIEGER-BRIEL et al. (2021)
c.4882_4883del	p.(Thr1628fs)	1	AJEWUNG et al. (2019)
c.1778dupA	p.(Asn593fs)	2	AJEWUNG et al. (2019)
c.4373+1G>A	Alteração de <i>splicing</i>	2	AJEWUNG et al. (2019)
2q13 Del	--	1	ZIRN et al. (2021)

--: não existente ou não disponível

Enquanto uma diversidade de fenótipos conhecidos está associada ao gene *RECQL4*, a SRT tipo I é a única condição clínica descrita causada por alteração do gene *ANAPC1* (OMIM, 2023).

Apesar de alterações patogênicas nos genes *RECQL4* e *ANAPC1* serem responsáveis por explicar a maioria dos casos, cerca de 30% dos pacientes com características clínicas de SRT não possuem alterações nesses genes (WANG; PLON, 2020).

### Gene *CRIPT*

Em 2023, Averdunk e colaboradores descreveram características semelhantes à SRT dois indivíduos com variantes bialélicas no gene *CRIPT* e reavaliaram as características clínicas de três outros indivíduos reportados previamente na literatura (SHAHEEN et al., 2014; LEDUC et al., 2016; AKALIN et al., 2023). Os sinais clínicos incluíam baixa estatura, dificuldades alimentares na lactância, poiquiloderma, cabelos, sobrancelhas e/ou cílios esparsos, dismorfismos faciais, anomalias esqueléticas e atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e epilepsia. Esse gene está localizado no final do braço curto do cromossomo 2, mais precisamente na região 2p21 (Figura 4) e codifica a proteína *CXXC Repeat Containing Interactor Of PDZ3 Domain*, um dos ligantes do domínio PDZ, desempenhando um papel crucial na sinalização e ancoragem celular, auxiliando, principalmente, na organização e regulação de complexos de proteínas nas membranas celulares.

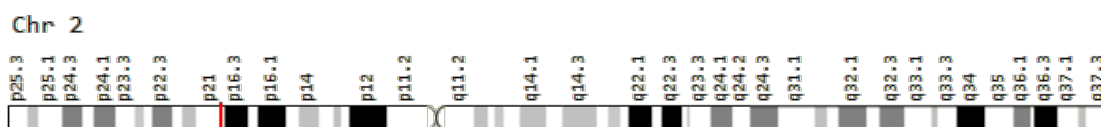


Figura 4 - Localização genômica do gene *CRIPT* no cromossomo 2. Retirado do site Genecards®

No nível celular, tanto as células deficientes em *RECQL4* quanto as deficientes em *CRIPT* exibiram um aumento da senescência, sugerindo mecanismos moleculares compartilhados que levam aos fenótipos clínicos observados.

Tabela 3 - Variantes patogênicas em *CRIPT* associadas à síndrome de Rothmund-Thomson e ao nanismo primordial com microcefalia

Alteração no DNA <i>CRIPT</i> :NM_014171.6	Alteração na proteína	Casos reportados	Referência
c.133_134insGG	p.(Ala45Glyfs*87)	1	SHAHEEN et al. (2014)
c.141delT	p.(Phe47Leufs*84)	1	SHAHEEN et al. (2014)
c.8G>A	p.(Cys3Tyr)	1	LEDUC et al. (2016)
Ex1 Del	--	1	LEDUC et al. (2016)
c.7_8del	p.(Cys3ArgfsTer4)	1	AKALIN et al. (2023)
c.132del	p.(Ala45Glyfs*82)	1	AVERDUNK et al. (2023)

---

c.227G>A	p.(Cys76Tyr)	1	AVERDUNK et al. (2023)
----------	--------------	---	------------------------

---

--: não existente ou não disponível

Anteriormente, variantes no gene *CRIP1* havia sido associado ao fenótipo de nanismo primordial (NP) com microcefalia (Tabela 3). Além da restrição de crescimento e do perímetro encefálico diminuído, os pacientes relatados apresentavam atrasos de desenvolvimento, fronte ampla, cabelo e sobrancelhas esparsos (SHAHEEN et al., 2014; LEDUC et al., 2016; AKALIN et al., 2023). Adicionalmente, outras manifestações em alguns casos incluíam alterações oculares, lesões hiper e hipopigmentadas em pele (principalmente em rosto, braços e pernas), e alterações esqueléticas incluindo falanges distais hipoplásicas e sindactilia dos dedos 4-5 bilateralmente. Muitos desses achados clínicos são semelhantes aos de pacientes com SRT e destacam a heterogeneidade genética e clínica de ambas as síndromes, e certa sobreposição entre elas.

Desse modo, a descoberta recente de dois novos genes causadores de SRT expande ainda mais o espectro de fenótipos associados à síndrome, e reforça a atual baixa compreensão dos mecanismos moleculares e da fisiopatologia de suas principais alterações clínicas.

### 1.3 Diferenciais diagnósticos e síndromes correlatas

Algumas síndromes genéticas podem cursar com sinais e sintomas semelhantes à SRT, sobretudo pela presença de poiquilodermia, podendo ser consideradas diagnósticos diferenciais da doença.

A poiquilodermia com neutropenia (PN) e a síndrome POIKTMP (sigla do inglês para *Hereditary fibrosing poikiloderma with tendon contractures, myopathy, and pulmonary fibrosis*) são condições genéticas distintas, diferenciando-se da SRT tanto em termos dos genes envolvidos quanto de manifestações clínicas.

A PN é causada por variantes bialélicas no gene *USB1* (*C16orf57*). Este gene codifica a enzima USB1 (*U6 SnRNA Biogenesis Phosphodiesterase 1*), uma exonuclease que desempenha um papel crucial no processamento dos snRNAs, que são essenciais para a formação de complexos ribonucleoproteicos envolvidos no processamento do pré-mRNA. Desregulações nesse processo podem afetar a produção adequada de proteínas. Clinicamente, a PN se manifesta com poiquilodermia associada à neutropenia, que pode levar a infecções recorrentes (VOLPI et al., 2010).

A síndrome POIKTMP é uma doença genética rara causada por variantes em heterozigose no gene *FAM111B*. A função exata da proteína codificada por este gene não é completamente compreendida, mas evidências sugerem que pode estar envolvida na regulação do ciclo celular e na resposta celular ao estresse replicativo do DNA. Clinicamente, além da poiquilodermia, os pacientes com Síndrome POIKTMP podem apresentar uma série de manifestações, incluindo contraturas tendinosas, miopatia e fibrose pulmonar (MERCIER et al., 2013).

O xeroderma pigmentoso (XP) é uma doença que também pode apresentar poiquilodermia, com lesões cutâneas, em geral, distintas das presentes na SRT. Os pacientes com XP apresentam alta sensibilidade à luz solar, o que leva ao desenvolvimento prematuro de câncer de pele (KRAEMER; LEE; SCOTTO, 1987). A condição pode ser causada por variantes patogênicas em diferentes genes envolvidos no reparo do DNA após danos causados por radiação ultravioleta, como o *XPA* a *XPG* (KRAEMER; DIGIOVANNA; TAMURA, 2022).

Já a disqueratose congênita (DC) é caracterizada pela tríade de poiquilodermia, leucoplasia oral e distrofia ungueal, e é geralmente associada a variantes em genes que desempenham papéis importantes na manutenção dos telômeros, como *DKC1*, *TERC*, *TERT*, entre outros (WALNE.; MARRONE; DOKAL, 2005).

Por fim, a síndrome de Kindler (SK) é caracterizada pela fragilidade da pele, com formação de bolhas, poiquilodermia e fotossensibilidade, e é causada

por variantes bialélicas no gene *FERMT1*, que é importante para a adesão celular e a integridade estrutural da pele (BURCH, 2006).

É importante destacar que a base molecular da poiquilodermia ainda não é totalmente compreendida. Muitos genes associados às doenças com a alteração cutânea estão envolvidos em funções como a replicação e reparo do DNA e a regulação do ciclo celular. Esse pode ser um indicativo de que a manutenção e estabilidade do genoma possam ser fatores críticos na manifestação clínica desse fenótipo.

#### 1.4 Objetivos gerais

- Identificar as bases moleculares em um subgrupo de indivíduos com a características clínicas da SRT tipo I e sem variantes em genes previamente associados à SRT
- Estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo
- Elucidar o mecanismo fisiopatológico da síndrome

#### 1.5 Casuística

O grupo de pesquisa reuniu 12 probandos brasileiros com diagnóstico clínico definitivo ou provável de SRT (WANG et al., 2001), acompanhados no ambulatório de Genética, da Unidade de Genética do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (ICr-HCFMUSP). Desses, seis apresentaram variantes bialélicas patogênicas em *RECQL4*, enquanto nos outros seis probandos não foi identificada nenhuma variante patogênica em ambos os genes, *RECQL4* e *ANAPC1*, definindo-se como a casuística inicial. Ao longo da pesquisa, um par de irmãos da Suíça também foi incluído neste estudo, sendo um deles um feto afetado, produto da interrupção da gravidez. Esse subgrupo de pacientes sem alterações moleculares em genes associados a formas sindrômicas de poiquiloderma, com quadro clínico provável

de SRT tipo I, com um fenótipo mais acentuado e bastante similar entre si, foi o foco de investigação deste trabalho.



**Referências:**

AJEWUNG, Norbert F. et al. Mutations in ANAPC1, Encoding a Scaffold Subunit of the Anaphase-Promoting Complex, Cause Rothmund-Thomson Syndrome Type 1. **Am J Hum Genet.**, v.105, n.3, p.625-630, 2019.

AKALIN, Akçahan et al. A novel biallelic CRIPT variant in a patient with short stature, microcephaly, and distinctive facial features. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 191, n. 4, p. 1119-1127, 2023.

AL-SHAMSI, Aisha et al. Whole exome sequencing diagnosis of inborn errors of metabolism and other disorders in United Arab Emirates. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2016.

AVERDUNK, Luisa et al. Biallelic variants in CRIPT cause a Rothmund-Thomson-like syndrome with increased cellular senescence. **Genetics in Medicine**, p. 100836, 2023.

BECKMANN N. Multiple Low Energy Long Bone Fractures in the Setting of Rothmund-Thomson Syndrome. **Case Reports in Medicine**, p. 1-8, 2015.

BEGHINI, Alessandro et al. RNA processing defects of the helicase gene RECQL4 in a compound heterozygous Rothmund–Thomson patient. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 120, n. 3, p. 395-399, 2003.

BHOYRUL, B. et al. Pili annulati in a case of Rothmund-Thomson syndrome with a novel frameshift mutation in RECQL4. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV**, v. 32, n. 6, p. e221-e223, 2017.

BOYCOTT, K. M. et al. International cooperation to enable the diagnosis of all rare genetic diseases. **Am J Hum Genet**, v. 100, n. 5, p. 695-705, 2017.

BURCH, Joanna M. et al. Kindler syndrome: a new mutation and new diagnostic possibilities. **Archives of dermatology**, v. 142, n. 5, p. 620-624, 2006.

CABRAL, Rosa Estela Caseira et al. Identification of new RECQL4 mutations in Caucasian Rothmund–Thomson patients and analysis of sensitivity to a wide range of genotoxic agents. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 643, n. 1, p. 41-47, 2008.

CAO, Felicia et al. Generalized metabolic bone disease and fracture risk in Rothmund-Thomson syndrome. **Human molecular genetics**, v. 26, n. 16, p. 3046-3055, 2017.

CEYHAN-BIRSOY, Ozge et al. Interpretation of genomic sequencing results in healthy and ill newborns: results from the BabySeq Project. **The American Journal of Human Genetics**, v. 104, n. 1, p. 76-93, 2019.

CHONG, Jessica X. et al. The genetic basis of Mendelian phenotypes: discoveries, challenges, and opportunities. **The American Journal of Human Genetics**, v. 97, n. 2, p. 199-215, 2015.

COLOMBO, Elisa A. et al. Rothmund-Thomson syndrome: insights from new patients on the genetic variability underpinning clinical presentation and cancer outcome. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, p. 1103, 2018.

COLOMBO, Elisa Adele et al. Novel physiological RECQL4 alternative transcript disclosed by molecular characterisation of Rothmund–Thomson Syndrome sibs with mild phenotype. **European Journal of Human Genetics**, v. 22, n. 11, p. 1298, 2014.

CRAM. Rothmund-Thomson Syndrome. 2010. Disponível em <<http://www.cram.com/flashcards/rothmund-thomson-syndrome-1445109>>. Acesso em 25 jun. 2023

DANG, Lin et al. Mutation analysis in RECQL4 gene in a patient with Rothmund-Thomson syndrome. **Chinese Journal of Dermatology**, v. 42, n. 1, p. 28-30, 2009.

FERREIRA, Carlos R. The burden of rare diseases. **American journal of medical genetics Part A**, v. 179, n. 6, p. 885-892, 2019.

FRADIN, M. et al. Long-term follow-up and molecular characterization of a patient with a RECQL4 mutation spectrum disorder. **Dermatology**, v. 226, n. 4, p. 353-357, 2013.

GRELET, Maude et al. Outcomes of 4 years of molecular genetic diagnosis on a panel of genes involved in premature aging syndromes, including laminopathies

and related disorders. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 14, n. 1, p. 1-16, 2019.

GUI, Baoheng et al. Novel pathogenic RECQL4 variants in Chinese patients with Rothmund-Thomson syndrome. **Gene**, v. 654, p. 110-115, 2018.

*Human Gene Mutation Database* (HGMD). Disponível em <<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>>. Acesso em 15 jul. 2023.

JAMUAR, Saumya Shekhar; TAN, Ene-Choo. Clinical application of next-generation sequencing for Mendelian diseases. **Human genomics**, v. 9, n. 1, p. 10, 2015.

JIN, Weidong et al. Sensitivity of RECQL4-deficient fibroblasts from Rothmund-Thomson syndrome patients to genotoxic agents. **Human genetics**, v. 123, p. 643-653, 2008. 9, n. 1, p. 118-120, 2008.

KAROW, Julia K.; WU, Leonard; HICKSON, Ian D. RecQ family helicases: roles in cancer and aging. **Current opinion in genetics & development**, v. 10, n. 1, p. 32-38, 2000.

KELLERMAYER, Richard et al. A patient with Rothmund-Thomson syndrome and all features of RAPADILINO. **Archives of dermatology**, v. 141, n. 5, p. 617-620, 2005.

KITAO, Saori et al. Mutations in RECQL4 cause a subset of cases of Rothmund-Thomson syndrome. **Nature genetics**, v. 22, n. 1, 1999.

KRAEMER, Kenneth H.; DIGIOVANNA, John J.; TAMURA Debora. Xeroderma Pigmentosum. 2003 Jun 20 [Updated 2022 Mar 24]. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2023. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1397/>>. Acesso em 22 jun. 2023.

KRAEMER, Kenneth H.; LEE, Myung M.; SCOTTO, Joseph. Xeroderma pigmentosum: cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases. **Archives of dermatology**, v. 123, n. 2, p. 241-250, 1987.

LEDUC, Magalie S. et al. CRIPT exonic deletion and a novel missense mutation in a female with short stature, dysmorphic features, microcephaly, and

pigmentary abnormalities. **American journal of medical genetics** Part A, v. 170, n. 8, p. 2206-2211, 2016.

LINDOR, Noralane M. et al. Rothmund-Thomson syndrome due to RECQ4 helicase mutations: report and clinical and molecular comparisons with Bloom syndrome and Werner syndrome. **American journal of medical genetics**, v. 90, n. 3, p. 223-228, 2000.

LU, Linchao; JIN, Weidong; WANG, Lisa L. Aging in Rothmund-Thomson syndrome and related RECQL4 genetic disorders. **Ageing research reviews**, v. 33, p. 30-35, 2017.

MARQUES, Silvio Alencar; PEREIRA, Fabíola de Paula; STOLF, Hamilton Ometto. Você conhece esta síndrome?. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, p. 476-479, 2008.

MEHOLLIN-RAY, Amy R. et al. Radiographic abnormalities in Rothmund-Thomson syndrome and genotype–phenotype correlation with RECQL4 mutation status. **American Journal of Roentgenology**, v. 191, n. 2, p. W62-W66, 2008.

MERCIER, Sandra et al. Mutations in FAM111B cause hereditary fibrosing poikiloderma with tendon contracture, myopathy, and pulmonary fibrosis. **The American Journal of Human Genetics**, v. 93, n. 6, p. 1100-1107, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. **Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2014.

NGUENGANG WAKAP, S. et al. Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database. **Eur J Hum Genet**, v. 28, p. 165-173, 2020.

ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN MAN (OMIM). McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University, 2022. Disponível em: <<https://omim.org/>>. Acesso em: 23 jun. 2023.

OSHIMA, Junko et al. RECQ helicase disease and related progeroid syndromes: RECQ2018 meeting. **Mechanisms of ageing and development**, v. 173, p. 80-83, 2018.

PIARD, J. et al. Search for RECQL4 mutations in 39 patients genotyped for suspected Rothmund–Thomson/Baller-Gerold syndromes. **Clinical genetics**, v. 87, n. 3, p. 244-251, 2015.

PINES, Jonathon. Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 12, n. 7, p. 427-438, 2011.

POWIS, Zöe et al. Exome sequencing in neonates: diagnostic rates, characteristics, and time to diagnosis. **Genetics in Medicine**, v. 20, n. 11, p. 1468-1471, 2018.

REIX, Philippe et al. Bronchiectasis in two pediatric patients with Rothmund–Thomson syndrome. **Pediatrics International**, v. 4

SCHWIEGER-BRIEL, Agnes et al. Rothmund-Thomson syndrome type 1—a particular and mild phenotype due to homozygous ANAPC1 gene mutations. Poster session at: 14<sup>th</sup> World Congress of Paediatric Dermatology; 22-25 September 2021; Edinburgh, UK.

SHAHEEN, Ranad et al. Genomic analysis of primordial dwarfism reveals novel disease genes. **Genome research**, v. 24, n. 2, p. 291-299, 2014.

SIITONEN, H. Annika et al. The mutation spectrum in RECQL4 diseases. **European journal of human genetics**, v. 17, n. 2, p. 151, 2009.

SIMON, T. et al. Multiple malignant diseases in a patient with Rothmund–Thomson syndrome with RECQL4 mutations: Case report and literature review. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 152, n. 6, p. 1575-1579, 2010.

SUTER, Aude-Annick et al. Rothmund–Thomson Syndrome: novel pathogenic mutations and frequencies of variants in the RECQL4 and USB1 (C16orf57) gene. **Molecular genetics & genomic medicine**, v. 4, n. 3, p. 359-366, 2016.

SZNAJER, Yves et al. Atypical Rothmund-Thomson syndrome in a patient with compound heterozygous mutations in RECQL4 gene and phenotypic features in RECQL4 syndromes. **European journal of pediatrics**, v. 167, n. 2, p. 175-181, 2008.

VAN MALDERGEM, Lionel. et al. Revisiting the craniosynostosis-radial ray hypoplasia association: Baller-Gerold syndrome caused by mutations in the RECQL4 gene. **J Med Genet.**, v.43, n.2, p. 148-152, 2006.

VENNOS, Elizabeth M.; COLLINS, Marlise; JAMES, William D. Rothmund-Thomson syndrome: review of the world literature. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 27, n. 5, p. 750-762, 1992.

VOLPI, Ludovica et al. Targeted next-generation sequencing appoints c16orf57 as clericuzio-type poikiloderma with neutropenia gene. **The American Journal of Human Genetics**, v. 86, n. 1, p. 72-76, 2010.

WALNE, Amanda J.; MARRONE, Anna; DOKAL, Inderjeet. Dyskeratosis congenita: a disorder of defective telomere maintenance?. **International journal of hematology**, v. 82, p. 184-189, 2005.

WANG, Lisa L. et al. Association between osteosarcoma and deleterious mutations in the RECQL4 gene in Rothmund–Thomson syndrome. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 95, n. 9, p. 669-674, 2003.

WANG, Lisa L. et al. Clinical manifestations in a cohort of 41 Rothmund-Thomson syndrome patients. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 102, n. 1, p. 11-17, 2001.

WANG, Lisa L.; PLON, Sharon E. Rothmund-Thomson Syndrome. 1999 Oct 6 [Updated 2020 Jun 4]. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2023. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1237/>>. Acesso em 22 jun. 2023.

WANG, Tingmei et al. Four novel RECQL4 mutations in four Chinese patients with Rothmund-Thomson syndrome and analysis of RECQL4 mRNA expression level in one typical patient. **Journal of Dermatological Science**, v. 91, n. 3, p. 335-337, 2018.

WETTERSTRAND; Kris A. DNA Sequencing Costs: Data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP), 2023. Disponível em <[www.genome.gov/sequencingcostsdata](http://www.genome.gov/sequencingcostsdata)>. Acesso em 23 jun. 2023.

YADAV, Sakshi et al. Report of Two Novel Mutations in Indian Patients with Rothmund–Thomson Syndrome. **Journal of Pediatric Genetics**, v. 8, n. 03, p. 163-167, 2019.

ZHANG, J. et al. A rare RECQL4 indel mutation in a Chinese patient with Rothmund-Thomson syndrome. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV**, v. 30, n. 11, p. e159-e161, 2015

ZIRN, Birgit et al. Rothmund–Thomson syndrome type 1 caused by biallelic ANAPC1 gene mutations. **Skin Health and Disease**, v. 1, n. 1, p. e12, 2021.

**2 BIALLELIC VARIANTS IN DNA2 CAUSE POIKILODERMA WITH  
CONGENITAL CATARACTS AND SEVERE GROWTH FAILURE  
REMINISCENT OF ROTHMUND-THOMSON SYNDROME**

---



Artigo publicado online em 13 de abril de 2023 no *Journal of Medical Genetics*.  
Londres, Reino Unido (doi: 10.1136/jmg-2022-109119).

**Biallelic variants in *DNA2* cause poikiloderma with congenital cataracts  
and severe growth failure reminiscent of Rothmund-Thomson syndrome**

Ricardo Di Lazzaro Filho<sup>1,2</sup>, Guilherme L. Yamamoto<sup>1,2,3</sup>, Tiago J. Silva<sup>4</sup>, Leticia A. Rocha<sup>1</sup>, Bianca D. W. Linnenkamp<sup>3</sup>; Matheus A. A. Castro<sup>3</sup>; Deborah Bartholdi<sup>5</sup>, Andre Schaller<sup>5</sup>, Tosso Leeb<sup>5</sup>, Samantha Kelmann<sup>3</sup>; Claudia Y. Utagawa<sup>6</sup>, Carlos E. Steiner<sup>7</sup>, Leandra Steinmetz<sup>8</sup>, Rachel S. Honjo<sup>3</sup>, Chong A. Kim<sup>3</sup>, Lisa L. Wang<sup>9</sup>, Raphaël Abourjaili-Bilodeau<sup>10</sup>, Philippe M. Campeau<sup>10</sup>, Matthew L. Warman<sup>11</sup>, Maria Rita Passos-Bueno<sup>1</sup>, Nicolas C. Hoch<sup>4</sup>, Debora R. Bertola<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 05508-090, Brazil

<sup>2</sup>DASA/Genera, São Paulo, SP, 04078-013, Brazil

<sup>3</sup>Clinical Genetics, Instituto da Criança, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 05403-000, Brazil

<sup>4</sup>Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 05508-900, Brazil

<sup>5</sup> Department of Human Genetics, Inselspital, Bern University Hospital, University of Bern, Switzerland

<sup>6</sup>Centro Universitário de Volta Redonda, Volta Redonda, RJ, 27240-560, Brazil

<sup>7</sup>Clinical Genetics, Hospital de Clínicas da Unicamp, Campinas, SP, 13083-888, Brazil

<sup>8</sup>Pediatric Endocrinology, Instituto da Criança, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 05403-000, Brazil

<sup>9</sup>Department of Pediatrics, Baylor College of Medicine, Houston, TX, 77030, United States

<sup>10</sup>CHU Sainte-Justine Research Center, University of Montreal, Montreal, QC, Canada

<sup>11</sup>Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, MA, 02115, United States

## Abstract

Rothmund-Thomson is a rare, heterogeneous autosomal recessive genodermatosis, with poikiloderma as its hallmark. It is classified into two types: Type 1, with biallelic variants in *ANAPC1* and juvenile cataracts; and type 2, with biallelic variants in *RECQL4*, increased cancer risk and no cataracts. We report on 6 Brazilian probands and two siblings of Swiss/Portuguese ancestry presenting severe short stature, widespread poikiloderma and congenital ocular anomalies. Genomic and functional analysis revealed compound heterozygosity for a deep intronic splicing variant in *trans* with loss of function variants in *DNA2*, with reduction of the protein levels and impaired DNA double-strand break repair. The intronic variant is shared by all patients, as well as the Portuguese father of the European siblings, indicating a probable founder effect. Biallelic variants in *DNA2* were previously associated with microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism. Although the individuals here reported present a similar growth pattern, the presence of poikiloderma and ocular anomalies is unique. Thus, we have broadened the phenotypic spectrum of *DNA2* mutations, incorporating clinical characteristics of Rothmund-Thomson syndrome. Although a clear genotype-phenotype correlation cannot be definitively established at this moment, we speculate that the residual activity of the splicing variant allele could be responsible for the distinct manifestations of *DNA2*-related syndromes.

## Main Text

Rothmund-Thomson syndrome (RTS – MIM # 618625 / # 268400) is a rare autosomal recessive genodermatosis, characterized by poikiloderma, sparse hair/eyebrows/eyelashes, nail dysplasia, short stature, juvenile cataracts, skeletal anomalies and increased cancer risk, particularly osteosarcoma (1-2). RTS is classified into two subgroups: type I, presenting ectodermal findings, including the characteristic poikiloderma and juvenile cataracts, recently associated with biallelic *ANAPC1* variants (3), and type II, characterized by poikiloderma and increased risk of osteosarcoma, associated with biallelic variants in *RECQL4* (4). Genetic heterogeneity is well established in RTS, caused by loss-of-function (LoF) variants in genes playing a role in DNA repair and/or cell cycle division. Some individuals with clinical diagnosis of RTS do not harbor variants in either of these genes, indicating that our knowledge about the etiology of RTS is incomplete (3).

We have evaluated 12 Brazilian probands in our outpatient Genetics Clinic, with a definitive or probable clinical diagnosis of RTS (1). Of those, six presented pathogenic, biallelic variants in *RECQL4*. We report on the clinical and molecular findings of the other six probands with probable clinical diagnosis of RTS, in which no pathogenic variant was identified in *RECQL4* or *ANAPC1*. A further pair of siblings from Switzerland was also included in this study, one of them an affected fetus, product of termination of pregnancy (TOP). These patients were included in a research project approved by the local Institutional Review Board, after obtaining informed consent forms from all participants.

The cohort is comprised of three females and five males, with a median age of 6 years and 9 months, six of them Brazilians and a pair of siblings of Swiss/Portuguese ancestry, the latter being the only one with familial recurrence, and none of them presenting parental consanguinity. The main clinical findings included severe growth failure, with some individuals with signs suggestive of growth/combined pituitary hormone deficiency; widespread poikiloderma; sparse hair/eyebrows/eyelashes; dystrophic nails; congenital cataracts and other ocular anomalies; craniofacial dysmorphisms and skeletal anomalies (osteopenia, platyspondyly, flared/irregular metaphysis and short metacarpals/phalanges). Considering the widespread poikiloderma distribution as an atypical pattern,

these individuals were classified with a possible clinical diagnosis of RTS (1) (Tables 1 and S1; Figure S1).

Table 1 Clinical and molecular findings of the probands

Clinical / Molecular Findings	F 1 F1.1	F2 F2.1	F3 F3.1	F4 F4.1	F5 F5.1	F6 F6.1	F7 F7.1	F7 F7.4 (brother)
Demographics								
Age/Sex	12-18y/M	7-12y/F	2-7y/F	7-12y/F	2-7y/M	1m-2y/M	2-7y/M	Fetus (TOP)/M
Origin	Brazilian	Brazilian	Brazilian	Brazilian	Brazilian	Brazilian	Swiss/ Portuguese	
Recurrence/ consanguinity	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	
Short stature (Z-score <-2) / (prenatal onset)	+ (N)	+ (Y)	+ (Y)	+ (Y)	+ (Y)	+ (Y)	+ (Y)	IUGR
GHD/replacement therapy (age of introduction)	+/+ (14y)	+/+ (2y7m)	+/+ (3y2m)	+/+ (3y6m)	+/-	NA/-	+/+ (3y1m)	
Craniofacial dysmorphisms	+	+	+	+	+	+	+	
Ophthalmologic anomalies	+	+	+	+	+	+	+	
Congenital cataracts (age of onset)	+ (1 <sup>st</sup> year)	+ (1 <sup>st</sup> months)	+ (11m)	+ (at birth)	NA	+ (1 <sup>st</sup> months)	+ (1y6m)	
Other anomalies	GL	GL, MI, CO	GL	MI, CO	GL, MI, CO, PA	CO	MI, CO, GL OA	
Ectodermal findings	+	+	+	+	+	+	+	
Sparse hair/eyebrows	+	+	+	+	+	+	+	
Poikiloderma (widespread) (age of onset)	+ (6m)	+ (3m)	+ (3m)	+ (3m)	+ (3m)	+ (3m)	+ (3-4 m)	
Photosensitivity/bullae	+/+	+/-	+/+	+/+	+/+	+/-	+/+	
Dystrophic nails	+	+	+	+	+	-	+	
Hypogonadism	+	-	-	-	+	+	+	
Skeletal findings	+	+	NA	+	NA	NA	+(hands)	
Osteopenia	+	-		+				
Metaphyseal flaring	+	+		+				
Short metacarpals/ Phalanges	+	+		+			+	
Platyspondyly	mild	NA		mild				
Radial ray anomalies	-	-	-	-	-	-	-	
Developmental delay / ID	-	-	-	+	+	-	-	
Cancer	-	-	-	-	-	-	-	
<i>DNA2</i> NM_001080449.3 Allele 1 (ACMG classification)	c.588-2214 A>G Pathogenic (PM2, PS3_sup, PM3_VS)	c.588-2214 A>G Pathogenic (PM2, PS3_sup, PM3_VS)	c.588-2214 A>G Pathogenic (PM2, PS3_sup, PM3_VS)	c.588-2214 A>G Pathogenic (PM2, PS3_sup, PM3_VS)	c.588-2214 A>G Pathogenic (PM2, PS3_sup, PM3_VS)	c.588-2214 A>G Pathogenic (PM2, PS3_sup, PM3_VS)	c.588-2214 A>G Pathogenic (PM2, PS3_sup, PM3_VS)	c.588-2214 A>G Pathogenic (PM2, PS3_sup, PM3_VS)
<i>DNA2</i> NM_001080449.3 Allele 2 (ACMG classification)	Deletion exon 18-21 [hg38] chr10: 68,413,754-68,420,303 Pathogenic (PM2, PVS1, PP1)	c.143T>C; p.(Leu48Pro) Likely Pathogenic (PM2, PP3, PM3, PP4)	Deletion exon 15 [hg38] chr10: 68,422,625-68,427,983 Pathogenic (PM2_sup, PVS1, PP1_mod)	Deletion exon 4 [hg38] chr10: 68,465,035-68,466,596 Pathogenic (PM2, PVS1, PP1_mod)	Deletion exon 4 [hg38] chr10: 68,465,035-68,466,596 Pathogenic (PM2, PVS1, PP1_mod)	Deletion exon 15 [hg38] chr10: 68,422,625-68,427,983 Pathogenic (PM2_sup, PVS1, PP1_mod)	c.1711dup; p.(Ile571Asnfs*27) Pathogenic (PM2, PVS1, PP1)	c.1711dup; p.(Ile571Asnfs*27) Pathogenic (PM2, PVS1, PP1)

TOP: termination of pregnancy; NA: not assessed; IUGR: intrauterine growth restriction; GHD: growth hormone deficiency; GL: glaucoma; MI: microphthalmia; CO: corneal opacity; PA: Peter's anomaly; OA: optic atrophy

Previous genetic analyses included targeted-next generation sequencing (NGS) for *RECQL4* (F1, F3) and whole-exome sequencing (WES) for three trios (F2-F4) and one mother-proband duo (F1), with no pathogenic variants identified in genes associated with Mendelian disorders. Considering the fact that the fathers of two probands originated from a small Brazilian city, we searched for a common haplotype among the first three probands from our cohort (F1-F3). SNP array (850K OmniExpress, Illumina, San Diego, USA) was performed, revealing a shared 9 Mb segment in chromosome 10q21.2q21.3 ([hg38] chr10:59933282-68905538), encompassing 30 protein coding genes. WES reanalysis did not identify pathogenic exonic/canonical splicing variants in this region shared by more than one individual. Subsequently, whole-genome sequencing (WGS) was performed in four probands (F1-F4), confirming the absence of pathogenic variants in *RECQL4*, *ANAPC1*, or genes associated with monogenic disorders presenting poikiloderma. A focused analysis of the chromosomal region 10q21.2q21.3 identified intragenic deletions in *DNA2* (NM\_001080449.3) in the three families, encompassing exon 4 ([hg38] chr10: 68,465,035-68,466,596) in F4, exon 15 ([hg38] chr10:68,422,625-68,427,983) in F3 and exons 18-21([hg38] chr10:68,413,754-68,420,303) in F1. Consequently, the search for other rare variants (allele frequency <0.01) in *DNA2* identified only a heterozygous missense variant [c.143T>C; p.(Leu48Pro)] in F2, along with an ultra-rare deep intronic heterozygous variant in intron 4 (c.588-2214A>G; [hg38] chr10:68,461,449T>C) shared by all probands (Table S2). No additional pathogenic variants were identified in other genes in the 10q21.2q21.3 interval (Table S3). WGS of F5.1, F7.1 and F7.4, as well as WES of F6 parents and Sanger sequencing in the F6.1 proband confirmed the presence of heterozygous LoF variants in *DNA2* — deletion of exon 4 in F5, deletion of exon 15 in F6 and a frameshift variant c.1711dup; p.(Ile571Asnfs\*27) in F7 — and the shared deep intronic variant in intron 4 (in all 4 affected). In F7, the intronic variant is inherited from the father of Portuguese ancestry, suggesting shared ancestry with the Brazilian cohort. All variants, classified as pathogenic or likely pathogenic by the ACMG criteria (5), were confirmed by Sanger sequencing on DNA/mRNA and were identified in heterozygous state in the probands' parents (with the exception of F1, in which DNA of the father was unavailable), confirming an autosomal recessive mode of inheritance (Tables 1 and S2; Figure 1A). The deletions

encompassing exons 4 and 18-21 were probably mediated by Alu elements (with >80% homology) present in their flanking regions. The missense variant alters a residue highly conserved in mammals, and is predicted by *in silico* tools to be damaging; protein modeling studies suggest that this change leads to several steric clashes in the interface of the nuclease domain, potentially affecting its function or causing protein instability (Figure S2). The IVS4 base change (c.588-2214A>G; [hg38] chr10:68,461,449T>C) is predicted by *in silico* analysis to create a novel donor splice site (NetGene2 and SpliceAI softwares). To confirm the novel splice site, cDNA sequencing from 6 individuals utilizing primers from exon 2 to exon 6 was performed, but revealed a single band in agarose gel in all individuals (data not shown), indicating that the wild type transcript prevails over any other isoform (at least in leukocytes). However, after designing specific intronic primers flanking the splicing variant, we detected a novel *DNA2* transcript that incorporated 73bp of IVS4, leading to frameshift and a premature stop codon at the beginning of exon 5. RNAseq, in fibroblasts from patient F1.1, with/without cycloheximide confirmed the alternate splicing isoform and that it underwent partial mRNA nonsense mediated decay (Figure S3). The 73bp sequence incorporated into mRNA originated from a novel donor splice site at [hg38] chr10:68,461,449 caused by the c.588-2214A>G variant and a cryptic acceptor site at [hg38] chr10:68,461,523 (also predicted by NetGene2 software) (Figure 1B and 1C). The results indicate that these alleles are pathogenic and that compound heterozygous variants in *DNA2* also cause a phenotype similar to RTS1.

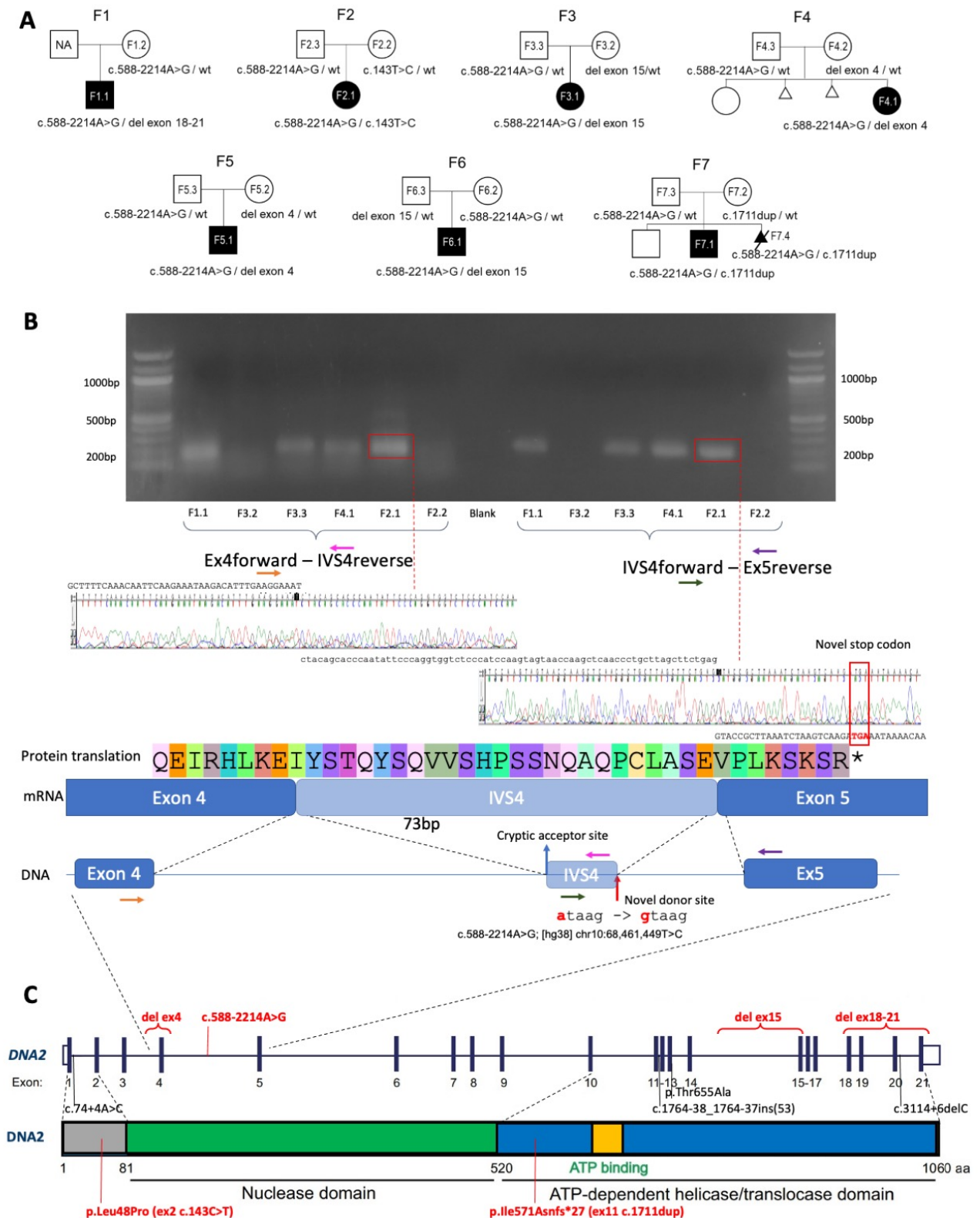


Figure 1. Pathogenic DNA2 variants associated with Rothmund-Thomson spectrum (A) Pedigrees of eight individuals from seven families with RTS-like presentation and DNA2 mutations. All individuals affected have the DNA2 intronic splicing variant with an additional loss-of-function compound-heterozygous mutation. (B) (top) Gel electrophoresis using cDNA extracted



from blood samples showing amplification fragments from two PCR assays (Ex4forward – IVS4reverse and IVS4forward – Ex5reverse), showing alternative splicing and insertion of part of the IVS4 in the cDNA between exons 4 and 5 of the *DNA2* gene. Band is present in all patients and allele carrier parents; and is absent in parents carrying only a loss-of-function allele. (mid) Sanger sequencing analysis of PCR products from the two assays of one proband, demonstrating the presence of a 73bp sequence of the IVS4 in the cDNA, between exons 4 and 5. (bottom) Schematic representation of the IVS inclusion caused by SNV A>G at position chr10:68461449 [hg38], which creates a novel donor site and consequently alters the translation phase and generates a premature stop codon at the ninth codon of exon 5. (C) Schematic representation of the *DNA2* gene and its protein product, indicating the pathogenic variants identified in this study (red) and previously identified variants associated with other disorders (black).

*DNA2* is a multifunctional conserved enzyme in eukaryotes, combining nuclease and helicase activities, that plays various roles in DNA replication and repair (6). To determine the impact of patient mutations on *DNA2* function, we first analyzed *DNA2* protein levels in epidermal fibroblasts derived from patient F1.1. After confirming the specificity of the anti-*DNA2* antibody using siRNA, we observed a severe reduction in *DNA2* protein levels in patient cells compared to healthy controls (Figure S4). However, given that this *DNA2* antibody is raised against the C-terminal portion of *DNA2*, we cannot rule out the possibility of residual truncated *DNA2* protein in these patient cells. To analyze the impact of patient mutations on *DNA2* activity during DNA repair, we employed an immunofluorescence-based assay to quantify end resection, which is an early step in double-strand break repair by homologous recombination that relies on *DNA2* (7, 8). First, human RPE1 cells were treated with camptothecin (CPT) to induce DNA repair by the homologous recombination pathway (9), and the amount of chromatin-bound replication protein A (RPA), a marker of DNA end resection, was determined (Figure S5 and Supplemental Information 1 for more details). As expected, CPT treatment induced end resection in control cells transfected with non-targeting siRNA (siNT), and depletion of the core end resection factor CtIP (CtBP-interacting protein) completely prevented this induction (Figure S6A). Confirming the known partial requirement for *DNA2* in this process, depletion of *DNA2* in RPE1 cells partially reduced end resection compared to siNT control cells (Figure S6A, Supplemental Information 1), and the same effect was also observed in fibroblast cell lines, validating our assay conditions (Figure S6B). Crucially, we observed a similar reduction in

camptothecin-induced end resection in F1.1 patient fibroblasts (Figure S6C), indicating that these cells are indeed DNA2-deficient.

Variants in *DNA2* have been reported to be responsible for two distinct disorders, a progressive external ophthalmoplegia with mitochondrial DNA deletions (MIM #615156), in individuals harboring single heterozygous missense variants (10,11); and microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism (MOPD – MIM #210710)/Seckel syndrome (MIM #615807), in individuals presenting microcephaly and stunted growth of prenatal onset and harboring biallelic variants. For the latter, six individuals from five families have been reported, all of them presenting marked growth compromise and microcephaly and one familial case with facial dysmorphisms reminiscent of Seckel syndrome (12,13).

None of the individuals included in our study, as well as the ones previously reported with MOPD, presented biallelic complete LoF variants in *DNA2*, in agreement with previous observations that *DNA2* is essential for viability, both in budding yeasts and humans (14,15). Among the variants identified in *DNA2* in our cohort, two out of three intragenic deletions are likely to have been caused by recombination between Alu elements, as previously observed as a recurrent CNV mechanism causing Mendelian disorders (16). Interestingly, the intronic variant in IVS4 identified in all affected individuals occurs within a shared haplotype. The Brazilian population is highly admixed, showing a predominance of European (mainly associated with the Portuguese colonization), followed by African and Native American ancestry (17). The chromosomal region 10q21.2q21.3 harboring the intronic variant in the Brazilian individuals has a European origin (data not shown). The fact that this variant was also present in the father of F7, of Portuguese ancestry, suggests that this variant shares a distant, common origin, configuring a founder effect. Since all probands in our cohort were compound heterozygotes, it remains to be determined if individuals harboring the recurrent IVS4 variant in a homozygous state could present a more attenuated phenotype, as previously suggested to occur in the individuals with RTS type I harboring variants in *ANAPC1* (17). The only missense variant detected in our cohort was present in an individual with a less

severe growth pattern, compared to the other individuals (Table S1), suggesting that this variant could be hypomorphic.

Although a clear genotype-phenotype correlation cannot be definitively drawn at this moment, our data corroborate the hypothesis that a simple gene dosage effect cannot explain the phenotypic differences between all disorders associated with *DNA2* (13). We speculate that the amount/type of residual gene product and/or different tissue thresholds for distinct alleles could be responsible for the phenotypic differences observed between MOPD and RTS -like presentation.

While microcephaly and marked short stature are common to the individuals with MOPD and the ones presented in our cohort, the uniqueness of marked ectodermal and ocular findings in our cohort allow establishing a clear distinction between these two groups. The phenotype in our cohort is homogeneous, lying within the spectrum of clinical findings of RTS (Table S1). Growth hormone replacement therapy failed to substantially improve growth velocity in our cohort, supporting previous findings of growth compromise in individuals with cell cycle defects. Nonetheless, there are some peculiarities in this group of individuals, such as congenital cataracts (instead of juvenile) and widespread poikiloderma, precluding a straightforward classification of these individuals as classical type I RTS (4). The fact that in our cohort congenital cataracts were frequently associated with other structural eye anomalies, and some of the individuals present hypoplastic pituitary/empty sella, suggests that *DNA2* may also interfere in their organogenesis during the embryonic development. Abnormal morphogenesis, probably related to inefficient DNA replication, has been reported in other eukaryotic organisms, such as in *Caenorhabditis elegans* with null variants in *DNA2* (18). Owing to these differences in clinical presentation, and the possibility of establishing a disease classification system that directly correlates with the underlying affected gene, we propose to name it *DNA2*-related RTS.

Altogether, we have broadened the phenotypic spectrum of *DNA2*-related disorders to encompass another congenital growth condition associated with

additional findings compatible with RTS, particularly the presence of poikiloderma and cataracts. How the roles of DNA2 overlap with functions of RECQL4 and ANAPC1 in DNA replication, DNA repair and/or cell cycle progression, potentially establishing a shared molecular pathology underlying clinical presentations of RTS, remains to be determined. As the individuals reported here are mostly in childhood, long-term follow-up of these individuals will shed light on medical concerns that could develop, particularly the possibility of an increased cancer risk driven by increased genomic instability.

**Accession numbers** Variants' accessions were requested to ClinVar (submission name: SUB12092047).

**Acknowledgments** We thank the families for their participation in this research, Victor Hugo C. Toledo for his contribution to RNA sequencing analysis and DASA/Genera for performing the WGS and the SNP array in the probands.

**Contributors** R-LF, GL-Y and DR-B designed the study. LL-W, PM-C and ML-W discussed the clinical and molecular results. GL-Y, R-LF, DR-B and T-L analysed the genomic data. GL-Y, LA-R, R-LF, A-S performed molecular sequencing. MAA-C, TJ-S and NC-H conducted protein functional and in silico studies. DR-B, GL-Y, BDW-L, D-B, CY-U, S-K, CE-S L-S, RS-H contributed to the acquisition of the clinical data. GL-Y, R-LF, DR-B, TJ-S and NC-H prepared the manuscript. CA-K, MR-PB and PM-C conducted writing editing.

**Funding** This study was supported by FAPESP/CEPID - 2013/08028-1(DRB) and CNPq - 303375/2019 (DRB), as well as FAPESP 2018/18007-5 and 2019/06039-2 (NCH). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

**Competing interests** None declared.

**Ethics Approval** This study involves human participants and was approved by the ethics committee of the Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (approval ethics number 0558/10). Written informed consents were obtained from the individuals or legal guardians.

### **Web resources**

OMIM, <https://omim.org>

gnomAD, <https://gnomad.broadinstitute.org/>

ABraOM, <https://abraom.ib.usp.br/>

NetGene2, <https://services.healthtech.dtu.dk/>

SpliceAI, <https://spliceailookup.broadinstitute.org>

### **References**

1. Wang LL, Levy ML, Lewis RA, et al. Clinical manifestations in a cohort of 41 Rothmund-Thomson syndrome patients. *Am J Med Genet* 2001;102:11-17. doi: 10.1002/1096-8628(20010722)102:1<11::aid-ajmg1413>3.0.co;2-a.
2. Larizza L, Roversi G, Volpi L. Rothmund-Thomson syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2010;5:2. doi: 10.1186/1750-1172-5-2.
3. Ajeawung NF, Nguyen TTM, Lu L, et al. Mutations in ANAPC1, Encoding a Scaffold Subunit of the Anaphase-Promoting Complex, Cause Rothmund-Thomson Syndrome Type 1. *Am J Hum Genet* 2019;105: 625-630. doi: 10.1016/j.ajhg.2019.06.011.

4. Wang LL, Gannavarapu A, Kozinetz CA, et al. Association between osteosarcoma and deleterious mutations in the RECQL4 gene in Rothmund-Thomson syndrome. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:669-674. doi: 10.1093/jnci/95.9.669.
5. Richards S, Aziz N, Bale S, et al.; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17:405-424. doi: 10.1038/gim.2015.30.
6. Zheng L, Meng Y, Campbell JL, et al. Multiple roles of DNA2 nuclease/helicase in DNA metabolism, genome stability and human diseases. *Nucleic Acids Res* 2020;48:16-35. doi: 10.1093/nar/gkz1101.
7. Cejka P, Symington LS. DNA End Resection: Mechanism and Control. *Annu Rev Genet* 2021;55:285-307. doi: 10.1146/annurev-genet-071719-020312.
8. Nimonkar AV, Genschel J, Kinoshita E, et al. BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes Dev* 2011;25:350-362. doi: 10.1101/gad.2003811.
9. Furuta T, Takemura H, Liao ZY, et al. Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J Biol Chem* 2003;278:20303-20312. doi: 10.1074/jbc.M300198200.
10. Ronchi D, Di Fonzo A, Lin W, et al. Mutations in DNA2 link progressive myopathy to mitochondrial DNA instability. *Am J Hum Genet* 2013;92:293-300. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.12.014.

11. Ronchi D, Liu C, Caporali L, et al. Novel mutations in DNA2 associated with myopathy and mtDNA instability. *Ann Clin Transl Neurol* 2019;6:1893-1899. doi: 10.1002/acn3.50888.
12. Shaheen R, Faqeih E, Ansari S, et al. Genomic analysis of primordial dwarfism reveals novel disease genes. *Genome Res* 2014;24:291-299. doi: 10.1101/gr.160572.113.
13. Tarnauskaitė Ž, Bicknell LS, Marsh JA, et al. Biallelic variants in DNA2 cause microcephalic primordial dwarfism. *Hum Mutat* 2019;40:1063-1070. doi: 10.1002/humu.23776.
14. Budd ME, Campbell JL. A yeast gene required for DNA replication encodes a protein with homology to DNA helicases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:7642-7646. doi: 10.1073/pnas.92.17.7642.
15. Karanja KK, Lee EH, Hendrickson EA, et al. Preventing over-resection by DNA2 helicase/nuclease suppresses repair defects in Fanconi anemia cells. *Cell Cycle* 2014;13:1540-1550. doi: 10.4161/cc.28476.
16. Kim S, Cho CS, Han K, et al. Structural Variation of Alu Element and Human Disease. *Genomics Inform* 2016;14:70-77. doi: 10.5808/GI.2016.14.3.70.
17. Souza AM, Resende SS, Sousa TN, et al. A systematic scoping review of the genetic ancestry of the Brazilian population. *Genet Mol Biol* 2019;42:495-508. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2018-0076.
18. Lee MH, Hollis SE, Yoo BH, et al. *Caenorhabditis elegans* DNA-2 helicase/endonuclease plays a vital role in maintaining genome stability, morphogenesis, and life span. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;407:495-500. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.03.045.

## Supplemental Material

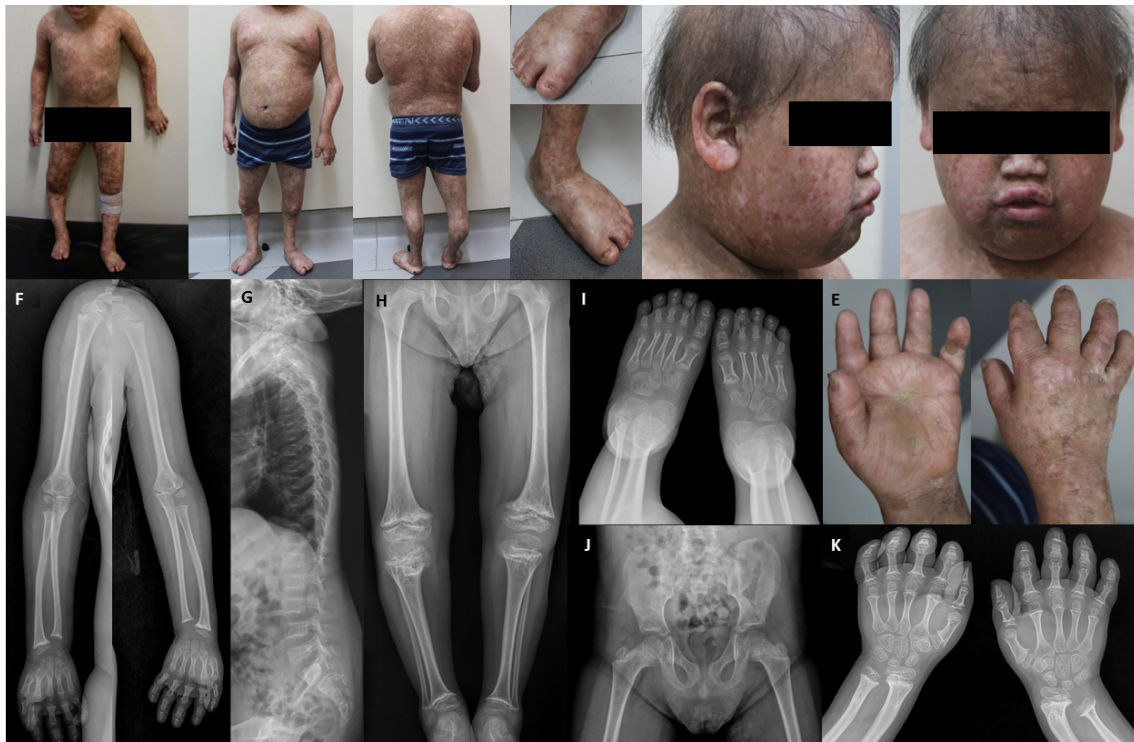


Figure S1. Photographs and X-ray images of F1. Photographs at the ages of 6yo (A) and 17yo (B): note the facial dysmorphisms, including sparse hair, eyebrows and eyelashes, frontal bossing, depressed nasal bridge, midface hypoplasia (D); widespread poikiloderma; short hands and feet with hypoplastic nails (C and E). Skeletal survey at 8y3mo showing osteopenia; mild platyspondyly; irregular and flared metaphyses, particularly pronounced in the knees (F, G, H, I and J). Hand X-ray at 12y11mo (K) demonstrating short metacarpal and phalanges, especially the distal ones, and delayed bone age.



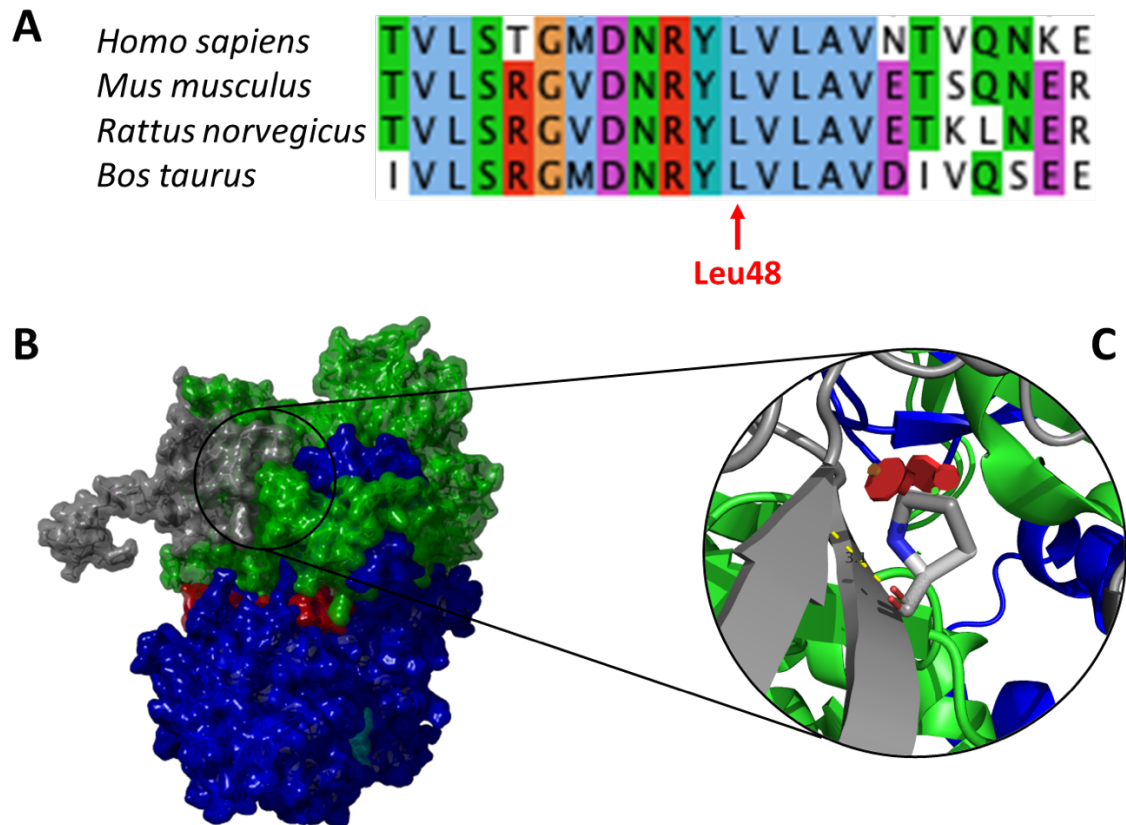


Figure S2. DNA2 conservation and protein structure.

(A) The DNA2 residue Leu48 is well conserved among several species of mammals, as are some of its neighboring residues.

(B) Homology model of DNA2, a protein with domains of nuclease (green) and helicase (blue) activity, interacting with DNA (red). The Leu48 residue is in the N-terminus region (gray), in a direct interface with the nuclease region. PDB ID: 5EAW.

(C) Tridimensional modeling of the variant Leu48Pro, predicted to cause steric clashes (represented by the red cylinders) at the interface with the nuclease domain suggesting damage/instability to the protein structure ( $\Delta\Delta G = +7.84$  kcal/mol. – FoldX)



49

Figure S3. BAM files visualization with IGV software of RNA sequencing of skin fibroblasts from F1.1, with and without cycloheximide (CHX) treatment to inhibit mRNA NMD, and a WT control (BAM files were produced with STAR v2.7.10 and bedtools v2.25.0 to keep only reads/pairs that overlap, partially or totally, with exonic regions): F1.1 with CHX shows WT transcript and alternative transcript with 73bp insertion from IVS4, F1.1 without CHX shows predominance of WT transcript, indicating NMD of the alternative isoform. *DNA2* total expression quantification was estimated at 521 transcripts per million (TPM) for F1.1 with CHX, 280 TPM for F1.1 without CHX and 675 TPM for WT with CHX (Salmon software v0.8.1 and R package tximport v1.24.0), indicating that *DNA2* expression in fibroblasts (without CHX) is less than 50% of the WT, which was expected because both ex18-21 deletion allele and the alternative isoform from IVS4 mutated allele are predicted to undergo mRNA NMD.

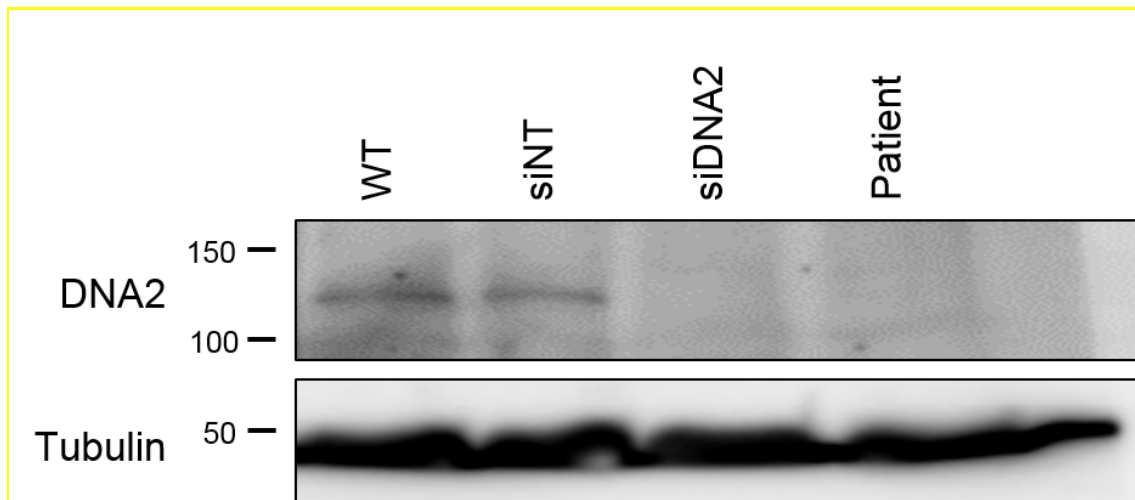


Figure S4. Patient fibroblasts are deficient in DNA2 protein.

Representative image of immunoblots for DNA2 protein (top) or tubulin loading control (bottom) in 1BR control fibroblasts (WT) transfected with non-targeting siRNA (siNT) or siRNA against DNA2 (siDNA2), as well as F1.1 patient fibroblasts (Patient).

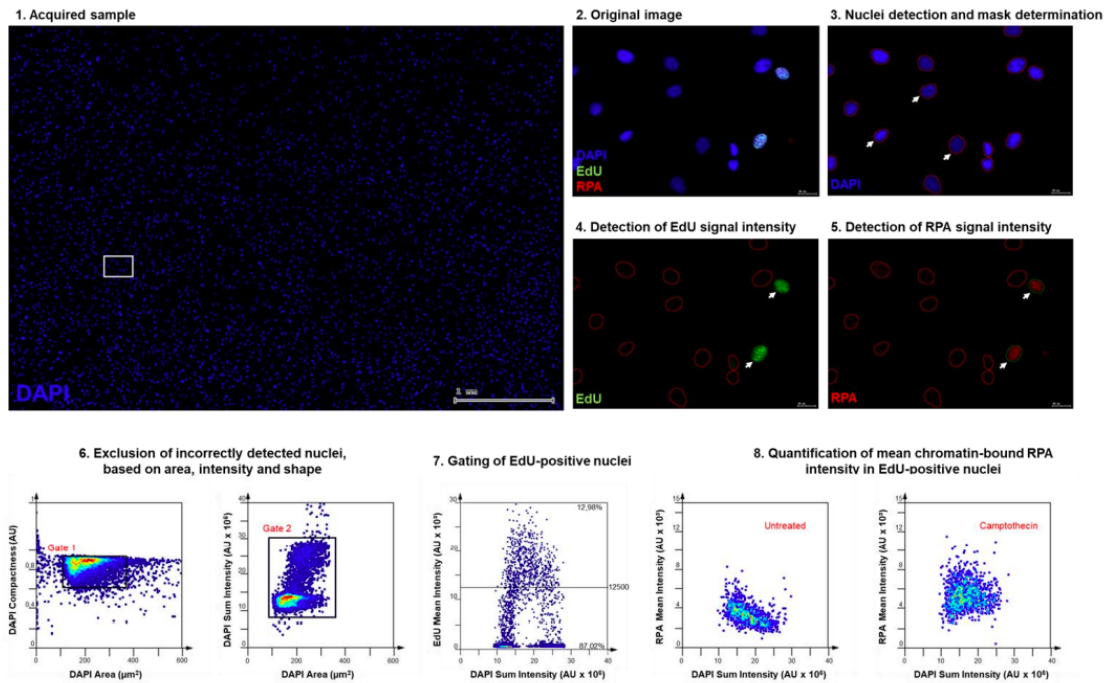


Figure S5. Establishment and validation of the RPA70-based DNA end-resection assay. Representative immunofluorescence images, scatterplots and gating strategies used for quantification of RPA70 signal. For each sample, 30-40 adjacent fields of view were acquired (steps 1 and 2), the nuclei were detected (step 3) and the nuclear EdU and RPA signal intensities quantified (Steps 4 and 5). Nuclei were gated according to nuclear area (DAPI area), shape (DAPI compactness) and signal intensity (DAPI sum intensity), as shown (step 6). Replicating (i.e., S-phase) cells were gated based on EdU signal intensity (step 7) and the mean RPA70 signal in this S-phase population was determined in untreated or camptothecin treated cells (step 8). See Supplementary Information 1 for additional details.

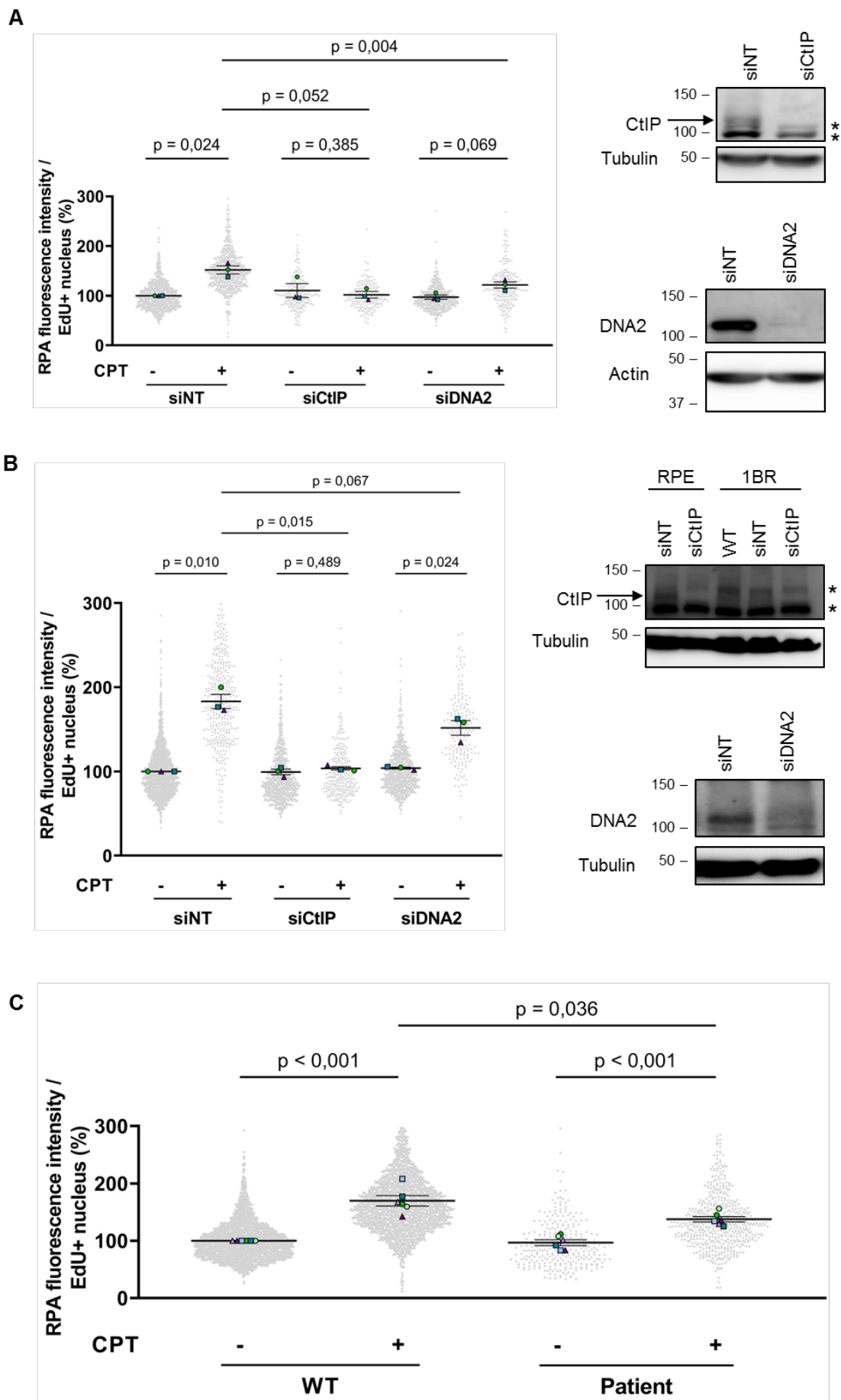


Figure S6 Functional characterization of DNA2 deficiency in patient fibroblasts. (A and B) (left) Quantification of chromatin-bound RPA immunofluorescence intensity in EdU-positive RPE1 cells (A) or 1BR fibroblasts (B) transfected with non-targeting control (siNT), or siRNAs against CtIP or DNA2, treated either with 10  $\mu$ M EdU only (CPT-) or EdU plus 10 $\mu$ M camptothecin (CPT+) for 1h. Mean (black line)  $\pm$  SEM, n=3. Mean signal intensity per sample (colored symbols for each replicate), and each analyzed nucleus (gray dots) are shown. Signals were normalized to the untreated siNT control. P values were determined by two-tailed, paired t-test between indicated samples. (right) Representative images of CtIP and DNA2 immunoblots and actin or tubulin loading controls depleted of CtIP and DNA2, confirming knockdown efficiency. Arrow denotes CtIP signal, based on the migration pattern of CtIP in RPE1 cells, and asterisks denote non-specific bands unaffected by the siRNA. Refer to Supplementary information 1 for additional technical details.

(C) Quantification of RPA fluorescence intensity in replicating (EdU-positive) 1BR control fibroblasts (WT) or F1.1 patient fibroblasts (Patient) treated either with 10  $\mu$ M EdU only (CPT-) or EdU plus 10 $\mu$ M camptothecin (CPT+) for 1h. Mean (black line)  $\pm$  SEM, n=6 independent replicates performed on three separate days. Mean signal intensity per sample (colored symbols for each replicate), and each analyzed nucleus (gray dots) are shown. Signals were normalized to the untreated siNT control. P values were determined by two-tailed, paired t-test between indicated samples. Refer to Supplementary information 1 for additional technical details.

## Supplemental Information 1 (related to Figures S5 and S6)

The methodology for determination of DNA2 functionality is based on the known role for DNA2 in the end resection process, which is an initial step in the repair of DNA double-strand breaks (DSBs) by the homologous recombination (HR) pathway (7).

We induced DSBs with camptothecin (CPT), which is a topoisomerase poison that causes DNA damage predominantly during DNA replication and that requires homologous recombination (and therefore DNA end resection) for repair (9). HR is initiated by controlled degradation of one of the DNA strands to generate a long region of single-stranded DNA that will be used to search for homologous sequences elsewhere in the genome. This end resection process proceeds in two steps: short-range and long-range end resection. Short-range end resection relies on the *Meiotic Recombination 11* (Mre11) nuclease and *CtBP-interacting protein* (CtIP) and generates a short region of single-stranded DNA, whereas long-range end resection extends this region to several kilobases of DNA and can proceed via two partially redundant pathways, one that relies on Exonuclease 1 (Exo1), and another pathway that involves the concerted activity of the Bloom helicase (BLM) and of the DNA2 helicase/nuclease (7,8). The single-stranded DNA exposed by this end resection process is covered with the single-stranded DNA binding complex *Replication protein A* (RPA), which is composed of three subunits, RPA70, RPA32 and RPA14. Therefore, assays that quantify the chromatin association of the RPA complex in response to DNA double-strand breaks are frequently used to determine the functionality of the end resection process. In our immunofluorescence-based assay, cells are subjected to a short pre-extraction prior to cell fixation, to remove RPA complexes that are not chromatin-bound, so that the remaining RPA signal (in our case using an anti-RPA70 antibody) is chromatin-associated. To mark the cells that are actively replicating during the camptothecin treatment, we also treated cells with the thymidine analogue 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) that is incorporated into DNA during DNA replication and can be fluorescently labelled using click-chemistry.

After immunofluorescence staining for these markers, large numbers of microscopy images were acquired and analysed (Figure S5, steps 1-2). The DAPI-stained nuclei were detected and gated to exclude incorrectly or incompletely detected objects (Steps 3 and 6). The EdU signal was quantified per nucleus and EdU-positive populations were selected (steps 4 and 7). Within this population of EdU+ nuclei, the mean chromatin-bound RPA70 signal per nucleus was determined (steps 4 and 8), demonstrating that EdU-positive cells have a basal amount of chromatin-bound RPA, likely due to single-stranded DNA generated during DNA replication, but that treatment with camptothecin indeed induces RPA chromatin association, as expected (step 8 left vs right panels). The RPA fluorescence intensity for each individual EdU+ nucleus is normalized to the mean RPA intensity of the untreated control sample, to correct for staining differences between replicate experiments. In all figures using this methodology (Figure S6), individual nuclei are plotted as gray dots, whereas the mean for each replicate is shown as colored symbols, whose color and shape reflects different replicate experiments.

Irrespective of the cell line used (RPE1-hTERT in Figure S6A or Fibroblasts in Figure S6B), we observed that camptothecin reproducibly induced RPA chromatin binding in EdU-positive cells, as expected. Importantly, the depletion of the core end resection factor CtIP completely prevented this effect in both cell types, strongly indicating that the detected signal is indeed due to end resection of DSBs. As discussed above, DNA2 acts downstream of CtIP, and is partially redundant with Exo1, so that DNA2 depletion only had a partial, but clear, effect on end resection in both cell types.



Table S1. Additional clinical findings.

Clinical Findings	F 1 F1.1	F2 F2.1	F3 F3.1	F4 F4.1	F5 F5.1	F6 F6.1	F7 F7.1	F7 F7.4 (brother)	Total 8 individuals/ 7 families
Demographics									
Age/Sex	12-18y/ M	7-12y/ F	2-7y/ F	7-12y/ F	2-7y/ M	1m-2y/ M	2-7y/ M	Fetus (TOP: 24w 5d) M	Median 6y9m 3F/5M
Origin	Brazilian	Brazilian	Brazilian	Brazilian	Brazilian	Brazilian	Swiss/ Portuguese		
Recurrence/ consanguinity	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-		Recurrence 1/7
Prenatal findings		Maternal use of levothyroxine/  IUGR and oligohydramnios	-	-	-	-	IUGR  Maternal use of levothyroxine	IUGR	
Neonatal findings (gestational age at birth)	36w	35w	37w	37w	37w	37w	38 6/7w	24 5/7	Preterm 2/7
Birth weight (g)/ Z-score	2270 (-1.06)	1925 (-1.07)	2170 (-1.58)	1755 (-2.74)	2025 (-3.16)	1640 (-3.14)	2130 (-2.85)	477 (-1.9)	BW < -2SD 4/8

Birth length (cm)/ Z-score	43 (-1.71)	40 (-2.02)	42 (-2.23)	38 (-3.83)	42 (-2.61)	35 (-5.52)	42.6 (-3.26)	27 (-2.36)	BL < -2SD 7/8
OFC (cm) Z-score	31 (-1.12)	31 (-0.32)	32 (-0.65)	30 (-2.03)	NA	31 (-1.58)	31 (-2.37)	19.5 (-2.3)	OFC < -2SD 3/7
Complications	jaundice	jaundice (phototherapy)	-	Jaundice (phototherapy)/ cataracts			hypoglycemia		
Growth									
Short stature	+	+	+	+	+	+	+		7/7
First evaluation	6y10m	2y4m	1y5m	2y	11m	7m	6 m		
Weight (Kg)/ Z-score	9.5 (-10.38)	8.75 (-3.86)	5.5 (-5.22)	5.4 (-6.77)	7.4 (-3.71)	-	3.35 (-7.32)		W < -2SD 6/6
Height (cm)/ Z-score	75 (-8.77)	68 (-5.64)	58.5 (-7.38)	61.5 (-7.68)	63 (-7.42)	-	53 (-6.65)		H < -2SD 6/6
OFC (cm)/ Z-score	46 (-4.4)	45.3 (-1.75)	43 (-2.19)	42.6 (-3.26)	43 (-3.44)	-	37.8 (-4.39)		OFC < -2SD 5/6
Last evaluation	14y9m	4y10m	3y4m	4y2m	2y2m	1y3m	6y8m		
Weight (Kg)/ Z-score	23.65 (-6.27)	12.5 (-3.16)	6.3 (-11.02)	6.9 (-11.17)	6.125 (-7.72)	5.34 (-5.91)	11.7 (-6.7)		W < -2SD 7/7
Height (cm) Z-score	102.7 (-6.55)	88.5 (-4.34)	67 (-7.98)	71.2 (-8.06)	67 (-6.41)	61.5cm (-7.00)	85.5 (-6.59)		H < -2SD 7/7



Poikiloderma widespread (age of onset)	+	+	+	+	+	+	+		7/7
	(6m)	(3m)	(3m)	(3m)	(3m)	(3m)	3-4m		
Photosensitivity	+	+	+	+	+	+	+		7/7
Bullae	+	-	+	+	+	-	+		5/7
Dystrophic nails	+	+	+	+	+	-	+		6/7
Abnormal teeth	+	-	-	-	+	Not erupted	-		2/7
Endocrinologic findings									
GH deficiency	+	+	+	+	+	NA	+		6/6
IGF-1 (ng/dL)	(7y2m) <25 ng/mL (RV:124-297)	(2y3m) 43 ng/mL (RV: 57-344)	(1y5m) 25 ng/mL (55-327)	(2y1m) <25 ng/mL (RV: 125-303)	(2 y) < 10 ng/mL (RV: 11- 187)		(2y6m) <15 (Z-score <-2)		
IGFBP-3 (mg/L)	7y2m: 1.6 mg/L (RV: 2,7-5,6)		1.9 mg/L (0.7-3.6)				2y6m: 0.67 (RV: 0.9 – 4.3)		
GH stimulation test with clonidine	No response to stimulation								
Growth hormone replacement therapy (age of introduction)	+	+	+	+	-	-	+		5/6
	(14y)	(2y7m)	(3y2m)	(3y6m)			(3y1m)		
Thyroid anomalies	Hypothyroidism (subclinical)	Hypothyroidism (transient)	Normal	Central hypothyroidism	Hypothyroidism	NA	Hypothyroidism		5/6
Adrenal anomalies				normal			normal		

Genital anomalies	Micropenis/ cryptorchidism	-	-	-	Micropenis/ cryptorchidism	Micropenis	Micropenis/ cryptorchidism		4/4 M
Skeletal findings									
Osteopenia	+	-		+			na		
Metaphyseal flaring	+	+		+			Phalanges		
Abnormal trabecular bone in metaphyses	+			+			na		
Genu varo	+						na		
Abnormal patella	-						na		
Short metacarpals/ Phalanges	+	+		+			+		
Delayed bone age	+	+		+			+		
Platyspondyly	mild			mild			na		
Radial ray anomalies	-	-	-	-	-	-	-		
Cranial MRI	Reduced pituitary volume	Hypoplastic corpus callosum	Hypoplastic corpus callosum/ dilated right ventricle	Mild dilated ventricle and empty sella		Hippocampal malrotation	Cavum velum interpositum		
Developmental delay	-	-	-	+	+	-	-		2/7
Cancer	-	-	-	-	-	-	-		0/7
Biochemistry									
Calcium metabolism	normal	normal			Normal		normal		

CPK levels	normal	normal	normal	normal			normal		
Cholesterol	(13y) Total: 286 mg/dL (RV: <170) LDL: 180 mg/dL (<130)	(2y) Total: 235 mg/dL (RV: <150) LDL: 154 mg/dL (RV<100)			(2y5m) Total: 25 5mg/dL (RV<170) LDL: 138 (RV<110)		(6m) Total: 3.55 mmmol/l (RV 1.9-4.6)		
Triglycerides	366 mg/dL (RV: <130)	66 mg/dL (RV: <100)			250 (RV: <100)		0.85 mmol/l (RV: <1)		

M: male; F: female; IUGR: intrauterine growth restriction; OFC: occipital head circumference; NA: not assessed; TOP: termination of pregnancy

Table S2. Additional information on identified *DNA2* variants including frequency in control populations, *in silico* prediction of protein damage/splice alteration and ACMG classification.

Genomic variant ( <i>DNA2</i> NM_001080449.3)	Alleles detected/ Total probands	gnomAD Ancestry (version)	1000 Genomes (Ancestry - phase)	ABraOM	REVEL	SIFT	PolyPhen-2	SpliceAI	NetGene2	NNSPLICE	Classification following ACMG criteria
c.588-2214 A>G	8/8	0	0	0	-	-	-	0.23	0.63	0.99	Pathogenic (PM2, PS3_sup, PM3_VS)
c.143T>C p.(Leu48Pro)	1/8	0	0	0	0.776	T	P	-	-	-	Likely Pathogenic (PM2, PP3, PM3, PP4)
c.1711dup <sup>†</sup> p.(Ile571Asnfs*27)	2/8	1 / 152188 1 / 41452 AFR (v3.1.2)	0	0	-	-	-	-	-	-	Pathogenic (PM2, PVS1, PP1)
Deletion exon 4 <sup>†</sup> [hg38] chr10: 68,465,035-68,466,596	2/8	0	1 / 5008 (1 AFR phase 3)	-	-	-	-	-	-	-	Pathogenic (PM2, PVS1, PP1_mod)
Deletion exon 15 <sup>†</sup> [hg38] chr10: 68,422,625-68,427,983	2/8	7 / 21694 6 / 9534 AFR 1 / 2416 EA (v2.1_SV)	1 / 5008 (1 AFR phase 3)	-	-	-	-	-	-	-	Pathogenic (PM2_sup, PVS1, PP1_mod)
Deletion exon 18-21 <sup>†</sup> [hg38] chr10: 68,413,754-68,420,303	1/8	1 / 20196 1 / 2042 EA (v2.1_SV)	0	-	-	-	-	-	-	-	Pathogenic (PM2, PVS1, PP1)

T: tolerated; P: possibly pathogenic; AFR: African; EA: East Asian. Deletions with > 99% of total overlap

<sup>†</sup> Predicted to undergo mRNA nonsense mediated decay

Table S3. Rare variants (allele frequency less than 1:1000) in haplotype block on chromosome 10

Chr	Start	End	Ref	Alt	Func.refGene	Gene.refGene	OMIM_disease	dbSNP150	SABE1171_AF	gnomAD3.1_AF	SpliceAI_highest	F7 haplotype	Brazilian haplotype
chr10	60229870	60229870	A	C	intronic	ANK3	Mental retardation, autosomal recessive, 37, 615493		0	6.57E-06	NA	0/0	0/1
chr10	60301939	60301939	A	T	intronic	ANK3	Mental retardation, autosomal recessive, 37, 615493		0	0	NA	0/0	0/1
chr10	60373115	60373115	C	T	intronic	ANK3	Mental retardation, autosomal recessive, 37, 615493		0	9.86E-05	NA	0/0	0/1
chr10	60907587	60907587	G	A	intronic	RHOBTB1		rs866513484	0	0.000249714	NA	0/0	0/1
chr10	61050265	61050265	A	T	intergenic	LINC00845;TMEM26		rs556839872	0	0.00032903	NA	0/0	0/1
chr10	61055660	61055660	C	T	intergenic	LINC00845;TMEM26		rs567694868	0	0.000440685	NA	0/0	0/1
chr10	61224600	61224600	G	C	intergenic	LINC00845;TMEM26			0	0	NA	0/0	0/1
chr10	61577066	61577066	A	G	intergenic	CABCOCO1;TMEM26-AS1		rs932966448	0	6.57E-06	NA	0/0	0/1
chr10	62113398	62113398	T	C	intergenic	ARID5B;RTKN2			0	0	NA	0/0	0/1
chr10	62212759	62212759	C	T	intronic	RTKN2		rs184702311	0	0.000210485	NA	0/0	0/1
chr10	62465371	62465371	G	T	intronic	ZNF365	{Nephrolithiasis, uric acid, susceptibility to}, 605990		0	0	NA	0/0	0/1
chr10	63548112	63548112	G	A	intronic	REEP3		rs965039009	0	2.63E-05	Donor Loss with 0.01(DS) and -21(DP)	0/0	0/1
chr10	64027590	64027590	T	A	intergenic	ANXA2P3;REEP3		rs905196189	0.000427	3.29E-05	NA	0/0	0/1
chr10	64137878	64137878	A	G	intergenic	ANXA2P3;REEP3		rs955605550	0.000427	1.97E-05	NA	0/0	0/1
chr10	64192134	64192134	A	G	intergenic	ANXA2P3;REEP3		rs912982535	0.000427	2.64E-05	NA	0/0	0/1
chr10	64419983	64419983	G	A	intergenic	ANXA2P3;REEP3		rs1033239675	0.000427	1.97E-05	NA	0/0	0/1
chr10	64516864	64516864	A	G	intergenic	ANXA2P3;REEP3		rs986909160	0.000427	2.63E-05	NA	0/0	0/1
chr10	65220934	65220934	G	A	intergenic	LINC01515;LINC02671		rs934068835	0.000854	6.58E-05	NA	0/0	0/1
chr10	65448322	65448325	TATG	-	intergenic	LINC01515;LINC02671			0.000427	2.03E-05	NA	0/0	0/1



chr10	65517401	65517401	T	C	intergenic	LINC01515;LINC02671		rs764639224	0.000854	5.92E-05	NA	0/0	0/1
chr10	66228690	66228690	T	C	intronic	CTNNA3	Arrhythmogenic right ventricular dysplasia, familial, 13, 615616 (3), Autosomal dominant		0	5.26E-05	NA	0/0	0/1
chr10	67259598	67259598	A	G	intronic	CTNNA3	Arrhythmogenic right ventricular dysplasia, familial, 13, 615616 (3), Autosomal dominant		0	0	NA	0/1	0/1
chr10	68094046	68094046	T	A	intergenic	HERC4;MYPN	Cardiomyopathy, 615248, 615248, 615248; NemaLine myopathy 11, autosomal recessive, 617336	rs1038675306	0	6.57E-06	NA	0/1	0/1
chr10	68461449	68461449	T	C	intronic	DNA2	?Seckel syndrome 8, 615807 (3), Autosomal recessive; Progressive external ophthalmoplegia with mitochondrial DNA deletions, autosomal dominant 6, 615156		0	0	Donor Gain with 0.23(DS) and 1(DP)	0/1	0/1
chr10	68516308	68516308	C	T	intronic	SLC25A16		rs149244743	0.000427	0.00063138	NA	0/1	0/1
chr10	68678897	68678897	C	T	intronic	TET1		rs971018710	0	7.90E-05	NA	0/1	0/1
chr10	68930765	68930765	C	T	intronic	DDX50			0	4.60E-05	NA	0/1	0/1
chr10	69049324	69049324	T	C	intergenic	KIF1BP;SRGN		rs1043657935	0	8.55E-05	NA	0/1	0/1

### **3 DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES**

---

### 3.1 Síndrome de Rothmund-Thomson e o gene *DNA2*

A SRT é uma síndrome genética rara do grupo das doenças genodermatose (LARIZZA et VOLPI, 2010), caracterizada por um conjunto de anomalias que afetam a pele e podem ter impacto em outros órgãos. É considerada também por alguns autores como uma síndrome progeróide, devido ao aparecimento precoce de alterações clínicas mais presentes no processo de envelhecimento (OSHIMA et al., 2018). A incidência dessa síndrome é considerada bastante baixa, sendo descritos cerca de 400 casos na literatura científica até o momento (WANG; PLON, 2020).

Desde as primeiras descrições da síndrome por Rothmund e Thomson, apesar da sobreposição de algumas características clínicas, a presença da catarata juvenil era um diferencial entre os grupos (WANG et al., 2001). Esta distinção foi comprovada pela descoberta da presença de variantes bialélicas em *RECQL4* apenas nos casos de RTS sem catarata (KITAO et al. 1999). Desta forma, a SRT é caracterizada por apresentar uma heterogeneidade de loco, podendo ser causada por variantes bialélicas nos genes *RECQL4*, *ANAPC1* e *CRIPT* – respectivamente associados à manutenção e reparo do DNA, à regulação do ciclo celular, e à sinalização e ancoragem das células em geral (LU; JIN; WANG, 2017; AJEAWUNG et al., 2019; AVERDUNK et al. 2023). Seu padrão de herança é autossômico recessivo em todos os genes descritos (WANG; PLON, 2020).

No presente trabalho, avaliamos um subgrupo de pacientes com diagnóstico clínico possível da SRT, assim classificados pela presença do poiquiloderma difuso, considerado assim, atípico (WANG et al., 2001) e sem alterações patogênicas em *RECQL4* e *ANAPC1*, genes previamente associados à doença. Entre os principais achados clínicos estão: deficiência acentuada de crescimento, em alguns pacientes com achados sugestivos de uma deficiência isolada ou combinada do hormônio de crescimento, poiquilodermia generalizada, cabelos/sobrancelhas/cílios esparsos, catarata congênita, dismorfismos craniofaciais e anomalias esqueléticas que se destacavam nesses pacientes em relação a outros indivíduos afetados pela SRT.

A investigação molecular foi iniciada pelo sequenciamento de um painel genético customizado de 85 genes, seguida pelo sequenciamento do exoma de três afetados. Ambas as análises, no entanto, falharam em identificar a causa genética da condição. Realizou-se, então, uma abordagem pouco utilizada de buscar haplótipos em comum entre pacientes com o uso da técnica de SNP-array, em que foi encontrada uma região com 30 genes compartilhada entre três pacientes sem história de consanguinidade. O detalhamento do histórico familiar foi de grande importância para definição dessa estratégia de investigação, uma vez que dois dos pacientes possuíam família de uma mesma região no interior do estado do Paraná, indicando um provável parentesco distante e um possível efeito fundador.

Por fim, a realização do sequenciamento do genoma completo e a análise aprofundada dos principais genes candidatos na região pré-determinada permitiram a identificação das variantes patogênicas no *DNA2* (DI LAZZARO FILHO et al. 2023).

Essa foi a primeira publicação a associar o gene *DNA2* à SRT e seu espectro clínico, sendo, deste modo, proposto no artigo o nome em inglês de *DNA2-related Rothmund-Thomson syndrome* para a doença (ou SRT relacionado ao *DNA2*, traduzido para o português). Além disso, duas das seis variantes encontradas nas famílias estudadas não estavam presentes em nenhuma base de dados genômicos consultada, sendo descritas pela primeira vez no trabalho (especificamente, c.588-2214 A>G e c.143T>C). Essas descobertas demonstram o ineditismo da pesquisa e seu papel na expansão do conhecimento sobre as síndromes genéticas e novas variantes patogênicas.

O gene *DNA2* está localizado no braço longo do cromossomo 10, precisamente na região 10q21.3 (Figura 5). Ele faz parte da família de helicases *DNA2/NAM7*.

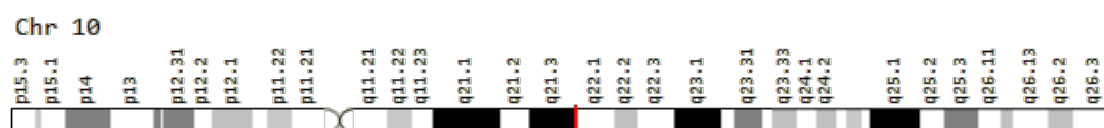


Figura 5 - Localização genômica do gene *DNA2* no cromossomo 10. Retirado do site Genecards®

A DNA2 é uma proteína com domínios helicase e nuclease conservados, crucial para a replicação e reparo do DNA no núcleo e mitocôndria, com papel em diversas vias, incluindo o processamento de fragmentos de Okazaki, a excisão de nucleotídeos e a recombinação homóloga. A proteína está envolvida na ressecção da extremidade 5' do DNA durante o reparo do rompimento de fita dupla, sendo recrutada por BLM (RECQL3) e atuando na clivagem de fita simples (ZHENG et al. 2020). A atividade de helicase é fraca e sua função permanece em grande parte incerta, tendo um provável papel auxiliar à função ressecção do DNA (BALAKRISHNAN et al. 2010).

O ensaio utilizado para determinar a perda da funcionalidade da DNA2 envolveu a indução de quebras de dupla fita do DNA com camptotecina, um inibidor da topoisomerase, induzindo o processo de recombinação homóloga. Nesse processo, é necessária a ressecção da extremidade 5' do DNA para reparo. As observações constataram que a depleção de DNA2 teve um efeito parcial na ressecção do DNA nas células testadas, devido a essa função ser compartilhada com a proteína Exonuclease 1 (EXO1).

De maneira similar ao *DNA2*, o *RECQL4*, primeiro gene a ser caracterizado na SRT e o mais frequentemente alterado, está envolvido na manutenção da integridade do genoma, desempenhando papéis significativos na replicação e reparo do DNA. Apesar de ambas as proteínas serem cruciais para a estabilidade do genoma, elas desempenham funções distintas e, de certo modo, complementares durante a recombinação homóloga, em que a *RECQL4* realiza o desenrolamento das extremidades do DNA promovendo uma ressecção inicial seguindo o processo com o recrutamento de BLM/DNA2 e EXO1 que realizam uma ressecção extensa para poder iniciar a nova síntese (Figura 6) (LU et al. 2016). Há ainda a necessidade de maior investigação para o completo entendimento de como o prejuízo dessas proteínas e de outras associadas a quadro clínicos de mesmo espectro, como ANAPC1 e CRIPT, causam os fenótipos observados e suas diferentes apresentações.

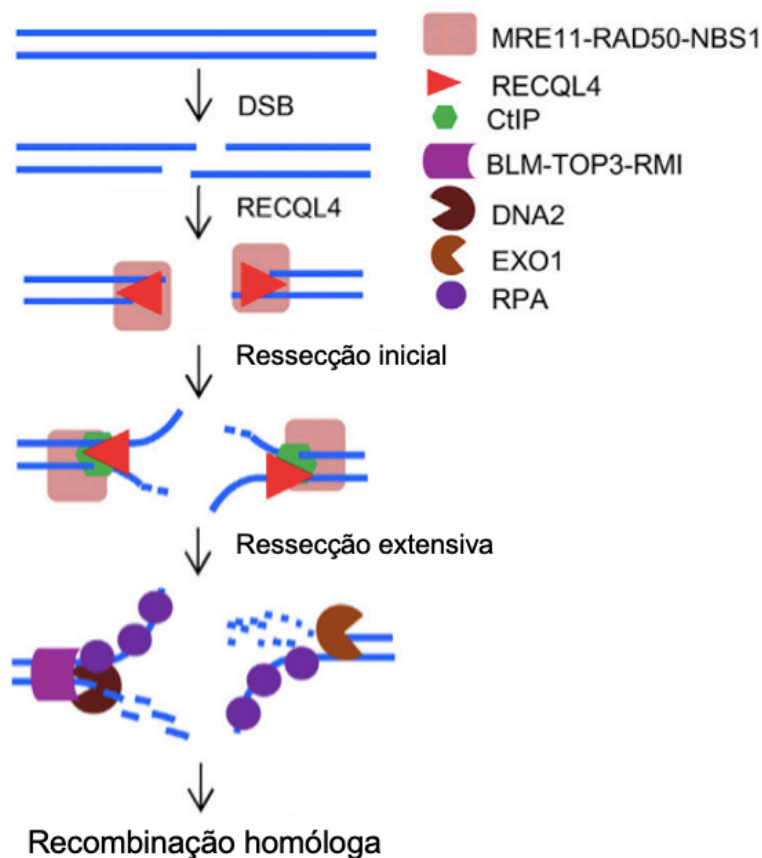


Figura 6 – Função das proteínas RECQL4, BLM, DNA2 e EXO1 na recombinação homóloga. Adaptado de LU et al. (2016).

Variantes patogênicas no gene *DNA2* haviam sido previamente relatadas como responsáveis por dois distúrbios distintos, a oftalmoplegia externa progressiva com deleções de DNA mitocondrial (MIM #615156), com padrão de herança dominante, e o nanismo primordial osteodisplásico microcefálico (NPOM - MIM #210710)/Síndrome de Seckel (MIM #615807), em indivíduos portando variantes bialélicas e apresentando microcefalia e crescimento comprometido de início pré-natal.

O estudo de Shaheen e colaboradores (2014) identificou variantes patogênicas no gene *DNA2* em indivíduos afetados por NPOM. Essas mutações resultam em deficiências na função do DNA2, interrompendo a replicação do DNA e levando à instabilidade genômica. Isto, por sua vez, causa um espectro de anormalidades no desenvolvimento, com destaque para o nanismo e a microcefalia. Por outro lado, Tarnauskaitė e colaboradores (2019) revelaram uma ligação específica entre a DNA2 e a via de reparo do DNA por excisão de

nucleotídeos (NER), sugerindo que as disfunções neste processo podem contribuir para a manifestação do NPOM. Além disso, o estudo enfatiza a importância da função da subunidade helicase da proteína DNA2, estrutura que desenrola a dupla hélice do DNA, no processo de reparo. Assim, as mutações no gene *DNA2* e a subsequente perda de função da helicase do DNA2 poderiam levar à instabilidade do genoma e, conseqüentemente, a fenótipos como o NPOM.

É notável a sobreposição clínica entre o NPOM associado ao *DNA2* e os diferentes tipos de SRT, relacionados aos genes *RECQL4*, *ANAPC1*, *CRIP1* e *DNA2* (Tabela 4). Algumas semelhanças entre os fenótipos incluem baixa estatura, evidenciada em todas as condições, e microcefalia, comum na SRT relacionada ao *CRIP1* e *DNA2* e em NPOM, sendo esses fenótipos mais acentuados nos casos com alteração em *DNA2*. As alterações ectodérmicas e esqueléticas também são consistentes entre os grupos, em diferentes níveis. A poiquilodermia é um achado pouco descrito nos pacientes com NPOM, mesmo que costumem apresentar cabelos e sobrancelhas esparsas e alterações ungueais.

Em contrapartida, é possível observar achados clínicos distintos entre as condições. As alterações oculares, como a catarata, são frequentes na SRT associada ao gene *ANAPC1* e *DNA2*, enquanto raras ou inexistentes nas condições causadas por mutações no *RECQL4* e *CRIP1*, e no NPOM. Particularmente, a catarata congênita, é mais característica no subgrupo reportado neste trabalho.

Surpreendentemente, apesar do *DNA2* ter um papel importante na manutenção da estabilidade genômica, a ocorrência de câncer, comum em nos casos de SRT relacionado ao *RECQL4*, não foi reportada em nenhum paciente com alteração no *DNA2*. Esse fato pode estar relacionado à idade dos pacientes estudados (majoritariamente crianças, sendo o mais velho da nossa casuística um adolescente de 16 anos) ou ao próprio mecanismo molecular das doenças, que apesar de prejudicar a replicação e reparo do DNA, não induz a formação células cancerígenas. Por fim, o pequeno número de pacientes já reportados com variantes patogênicas em *DNA2*, pode não ser suficiente para se observar um aumento de risco relativo. Um acompanhamento desses indivíduos, assim

como a descrição de novos casos, irá permitir avaliar com maior precisão se há ou não um risco aumentado para o desenvolvimento de câncer e, se houver, qual(is) tipo(s) de neoplasias.

Tabela 4 – Comparação dos achados clínicos entre pacientes diagnosticados com SRT com variantes bialélicas identificadas nos genes *RECQL4*, *ANAPC1*, *CRIP1* ou *DNA2* e com NPOM com variantes bialélicas identificadas no gene *DNA2*.

<b>Achados clínicos</b>	Síndrome de Rothmund-Thomson - <i>RECQL4</i> (6 indivíduos / 6 famílias)	Síndrome de Rothmund-Thomson - <i>ANAPC1</i> (11 indivíduos / 8 famílias) Ajeawung et al., (2019); Zirn et al., (2021)	Síndrome de Rothmund-Thomson - <i>CRIP1</i> (6 indivíduos / 6 famílias) Shaheen et al., (2014); Leduc et al., 2016; Akalin et al., (2023); Averdunk et al. (2023)	Nanismo primordial microcefálico - <i>DNA2</i> (6 indivíduos / 5 famílias) Shaheen et al., (2014); Tarnauskaitė et al., (2019)	Síndrome de Rothmund-Thomson - <i>DNA2</i> (8 indivíduos / 7 famílias)
<b>Crescimento</b>					
Baixa estatura (pré-natal) Z-score	3/6 (4/5) -0,66 a -7,1	7/11 (0/1)	6/6 -3,11 a -5,3	6/6 (6/6) - 4,6 a -11,1 SD	7/7 (6/7) -5,64 a -8,77
Microcefalia Faixa Z-score	1/6 -3.41		5/6	6/6 - 5.7 to – 9.6 SD	6/7 -1.75 to – 5.49 ( $p=0,029$ vs <i>RECQL4</i> )
<b>Alterações Oculares</b>					
Catarata	0/6	10/10 (juvenil) ( $p=0,0001$ vs <i>RECQL4</i> , $p=0,0014$ vs <i>CRIP1</i> )	1/6		7/7 (6 congênicas; 1 juvenil) ( $p=0,005$ vs <i>CRIP1</i> ; $p=0,0006$ vs <i>ANAPC1</i> ; [congênita] $p=0,0006$ vs <i>RECQL4</i> )
<b>Alterações Ectodérmicas</b>					
Poiquilodermia (generalizado)	6/6 (1/6) ( $p=0,0022$ vs NPOM)	11/11 ( $p=0,0001$ vs NPOM)	4/4 ( $p=0,0048$ NPOM)	0/6	7/7 (7/7) ( $p=0,0006$ vs NPOM; [generalizado] $p=0,0047$ vs <i>RECQL4</i> );
Cabelos/sobrancelhas esparsas	5/6	10/11 ( $p=0,0276$ vs NPOM)	5/5	2/6	7/7 ( $p=0,021$ vs NPOM)
Unhas displásicas/finas	0/6	5/11	2/3		6/7 ( $p=0,005$ vs <i>RECQL4</i> )
<b>Alterações genitais</b>					
Criptorquia	0/4	5/5 ( $p=0,0476$ vs <i>CRIP1</i> , $p= 0.0079$ vs <i>RECQL4</i> )	1/4	1/2	3/4
Micropênis	0/4	1/5			4/4 ( $p=0,048$ vs <i>ANAPC1</i> , $p= 0.0286$ vs <i>RECQL4</i> )
<b>Achados esqueléticos</b>					
Osteopenia/trabculado grossoiro	2/4	1/5	6/6 ( $p=0.015$ vs <i>ANAPC1</i> )		2/3
Anomalias metafisárias	1/4	2/5			3/3



Metacarpos/ falanges curta	3/4 (encurtamento de 2º e 5ª falanges médias)	2/5	5/6		4/4
Idade óssea atrasada					2/4
Anomalias de eixo radial	4/6 ( $p=0,021$ vs <i>DNA2</i> )		1/6		0/7
Curvaturas anormais da coluna	NA		6/6	2/6	
<b>Sistema endócrino</b>					
Deficiência de hormônio do crescimento (terapia de reposição)	0/6	5/10			6/6 (5) ( $p=0,002$ vs <i>RECQL4</i> )
Hipotireoidismo		2/10			5/6 ( $p=0,035$ vs <i>RECQL4</i> )
Atraso no desenvolvimento/deficiência intelectual	3/6	2/10	6/6 ( $p=0,021$ vs <i>DNA2</i> ; $p=0,007$ vs <i>ANAPC1</i> )		2/7
Câncer	1/6 (osteossarcoma)	0/10	0/6	0/6	0/7

Valores de significância estatística calculados pelo teste exato de Fisher. vs: versus. M: sexo masculino.

Assim, a comparação dos perfis fenotípicos revela uma sobreposição clínica considerável, contudo diferenças importantes entre as condições analisadas também foram observadas, sugerindo que as proteínas codificadas pelos genes em questão podem ter funções tanto compartilhadas quanto distintas na manutenção e desenvolvimento normais do organismo.

São evidentes os significativos avanços recentes na compreensão da SRT. Nos últimos cinco anos, três novos genes foram associados ao espectro da doença e novas variantes patogênicas descritas (AJEAWUNG et al. 2019; AVERDUNK et al. 2023; DI LAZZARO FILHO et al., 2023), permitindo um diagnóstico laboratorial mais amplo de afetados e portadores. Apesar disso, estima-se que até 30% dos pacientes com diagnóstico clínico de SRT continuam sem um diagnóstico molecular confirmatório (WANG; PLON, 2020). É possível inferir que novos genes ou diferentes mecanismos genéticos possam estar envolvidos na fisiopatologia da doença.

Além disso, uma compreensão mais profunda dos mecanismos moleculares subjacentes a todos os subtipos da SRT pode levar ao desenvolvimento de tratamentos mais eficazes. No momento, o manejo da doença é principalmente sintomático e de suporte, com ênfase na prevenção de complicações previamente descritas (WANG; PLON, 2020). Com a maior

compreensão de como as alterações moleculares causam os variados sintomas e manifestações clínicas, será possível o desenvolvimento de tratamentos que visam estes mecanismos específicos, proporcionando maior alívio e, possivelmente, até prevenindo algumas das complicações da doença.

A terapia genética, que atualmente está em seus estágios iniciais de desenvolvimento e aplicação, pode representar uma esperança real para pacientes com SRT no futuro (BRAGA; CONTE FILHO; MOTA, 2022). Podemos citar como exemplo o trabalho de Kim e colaboradores (2019), no desenvolvimento pioneiro do medicamento Milasen. Essa terapia personalizada de oligonucleotídeos antisense (ASO) foi projetada para uma paciente específica que possuía uma variante única causadora de um distúrbio neurodegenerativo raro chamado de doença de Batten. Inicialmente, os pesquisadores identificaram a variante genética causadora da doença utilizando sequenciamento do genoma completo. Uma inserção intrônica no gene *MFSD8* gerava um novo *acceptor site*, levando a um erro de *splicing* e à produção de uma proteína truncada não funcional – impacto muito semelhante à da variante c.588-2214A>G encontrada no *DNA2* descrita no presente trabalho. Em seguida, usaram uma abordagem *in vitro* para testar uma biblioteca de ASOs e encontrar aqueles que poderiam corrigir eficientemente o erro de *splicing*. Após identificar uma molécula promissora, denominada Milasen, os testes pré-clínicos foram conduzidos em um modelo murino personalizado criado através de edição genética. A terapia de Milasen foi posteriormente administrada à paciente após receber aprovação regulatória para uso compassivo. Este estudo demonstra o potencial de novas tecnologias terapêuticas no desenvolvimento de tratamentos ultra personalizados (BULAKLAK; GERSBACH, 2020) Enquanto estamos apenas começando a explorar essa possibilidade, o futuro certamente trará avanços emocionantes nesta área.

### 3.2 Conclusões

Em conclusão, este estudo atingiu os objetivos propostos, contribuindo para uma maior compreensão da SRT e do espectro clínico associado ao gene

*DNA2*, levantando, ainda, novas questões que poderão ser abordadas em pesquisas futuras.

- Foram diagnosticados sete pacientes de famílias distintas, sendo identificadas variantes patogênicas em heterozigose composta, sendo uma variante de *splicing* intrônica profunda em *trans* com uma variante de perda de função no gene *DNA2*. A variante intrônica, compartilhada por todos os pacientes, indica um possível efeito fundador na população estudada, incluindo o pai de origem portuguesa de uma das famílias avaliadas. O aconselhamento genético foi realizado em todos os pacientes atendidos pelo grupo de pesquisadores.
- Ampliamos o espectro fenotípico de SRT, reportando um subgrupo de pacientes de manifestação clínica única que inclui poiquilodermia mais disseminado, catarata congênita, juntamente com baixa estatura, em alguns deles com achados sugestivos de uma deficiência isolada ou combinada de hormônio de crescimento, e microcefalia mais acentuadas. Concomitantemente, ampliou-se, também, o espectro fenotípico das doenças associadas ao *DNA2*, englobando características clínicas da SRT. Especula-se que uma atividade residual do alelo com a variante de *splicing* poderia ser responsável pelas manifestações distintas de outros fenótipos relacionados ao *DNA2*, sendo esse um espaço para investigações futuras.
- Embora o mecanismo fisiopatológico completo não possa ser definitivamente estabelecido, foi comprovado o prejuízo da atividade da proteína *DNA2* no reparo de DNA em células de um probando, em decorrência das alterações genéticas. Este prejuízo presumivelmente contribui para parte do fenótipo observado. Adicionalmente, novos estudos poderão ajudar a correlacionar os impactos moleculares e funcionais com cada manifestação clínica existente na doença e as respectivas associações ao *DNA2*.

**Referências:**

AJEAWUNG, Norbert F. et al. Mutations in ANAPC1, Encoding a Scaffold Subunit of the Anaphase-Promoting Complex, Cause Rothmund-Thomson Syndrome Type 1. **Am J Hum Genet.**, v.105, n.3, p.625-630, 2019.

AKALIN, Akçahan et al. A novel biallelic CRIPT variant in a patient with short stature, microcephaly, and distinctive facial features. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 191, n. 4, p. 1119-1127, 2023.

AVERDUNK, Luisa et al. Biallelic variants in CRIPT cause a Rothmund-Thomson-like syndrome with increased cellular senescence. **Genetics in Medicine**, p. 100836, 2023.

BALAKRISHNAN, Lata et al. Dna2 exhibits a unique strand end-dependent helicase function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 50, p. 38861-38868, 2010.

BRAGA, Luiza Amara Maciel; CONTE FILHO, Carlos Gilbert; MOTA, Fabio Batista. Future of genetic therapies for rare genetic diseases: what to expect for the next 15 years?. **Therapeutic Advances in Rare Disease**, v. 3, p. 26330040221100840, 2022.

BULAKLAK, Karen; GERSBACH, Charles A. The once and future gene therapy. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 5820, 2020.

DI LAZZARO FILHO, Ricardo et al. Biallelic variants in DNA2 cause poikiloderma with congenital cataracts and severe growth failure reminiscent of Rothmund-Thomson syndrome. **Journal of medical genetics**, 2023.

KIM, Jinkuk et al. Patient-customized oligonucleotide therapy for a rare genetic disease. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 17, p. 1644-1652, 2019.

KITAO, Saori et al. Mutations in RECQL4 cause a subset of cases of Rothmund-Thomson syndrome. **Nature genetics**, v. 22, n. 1, 1999.

LARIZZA, Lidia; ROVERSI, Gaia; VOLPI, Ludovica. Rothmund-thomson syndrome. **Orphanet journal of rare diseases**, v. 5, p. 1-16, 2010.

LEDUC, Magalie S. et al. CRIPT exonic deletion and a novel missense mutation in a female with short stature, dysmorphic features, microcephaly, and pigmentary abnormalities. **American journal of medical genetics Part A**, v. 170, n. 8, p. 2206-2211, 2016.

LU, Huiming et al. RECQL4 promotes DNA end resection in repair of DNA double-strand breaks. **Cell reports**, v. 16, n. 1, p. 161-173, 2016.

LU, Linchao; JIN, Weidong; WANG, Lisa L. Aging in Rothmund-Thomson syndrome and related RECQL4 genetic disorders. **Ageing research reviews**, v. 33, p. 30-35, 2017.

OSHIMA, Junko et al. RECQ helicase disease and related progeroid syndromes: RECQ2018 meeting. **Mechanisms of ageing and development**, v. 173, p. 80-83, 2018.

SHAHEEN, Ranad et al. Genomic analysis of primordial dwarfism reveals novel disease genes. **Genome research**, v. 24, n. 2, p. 291-299, 2014.

TARNAUSKAITĖ, Žygimantė et al. Biallelic variants in DNA2 cause microcephalic primordial dwarfism. **Human mutation**, v. 40, n. 8, p. 1063-1070, 2019.

WANG, Lisa L. et al. Clinical manifestations in a cohort of 41 Rothmund-Thomson syndrome patients. **American journal of medical genetics**, v. 102, n. 1, p. 11-17, 2001.

WANG, Lisa L.; PLON, Sharon E. Rothmund-Thomson Syndrome. 1999 Oct 6 [Updated 2020 Jun 4]. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2023. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1237/>>. Acesso em 22 jun. 2023.

ZHENG, Li et al. Multiple roles of DNA2 nuclease/helicase in DNA metabolism, genome stability and human diseases. **Nucleic acids research**, v. 48, n. 1, p. 16-35, 2020.

ZIRN, Birgit et al. Rothmund–Thomson syndrome type 1 caused by biallelic ANAPC1 gene mutations. **Skin Health and Disease**, v. 1, n. 1, p. e12, 2021.

## RESUMO

A síndrome de Rothmund-Thomson é uma genodermatose rara, caracterizada por lesões cutâneas que surgem nos primeiros meses de vida, frequentemente com evolução para poiquilodermia, a ocorrência de cabelos e sobrancelhas esparsos, catarata e anormalidades esqueléticas. Além disso, a doença possui sinais que se assemelham a um envelhecimento prematuro. Inicialmente, a síndrome esteve associada a variantes bialélicas nos genes *RECQL4* e *ANAPC1*. Recentemente, o gene *CRIP1* também foi associado ao espectro da síndrome, destacando a complexidade e heterogeneidade da doença. Foram estudados 14 probandos com diagnóstico clínico de síndrome de Rothmund-Thomson, sendo que seis apresentaram variantes patogênicas em *RECQL4*. O trabalho focou nos oito probandos adicionais (incluindo um feto afetado), que apresentavam um fenótipo mais acentuado e bastante similar entre si, e ausência de variantes patogênicas em *RECQL4* e *ANAPC1*. Análises genômicas revelaram variantes em heterozigose composta no gene *DNA2*, sendo uma variante intrônica profunda de *splicing* (c.588-2214A>G) em trans com variantes de perda de função. A variante intrônica é compartilhada por todos os pacientes, indicando um provável efeito fundador. Ensaio funcionais indicaram uma redução dos níveis da proteína com prejuízo no reparo de quebras de fita dupla de DNA em células de um afetado. A proteína *DNA2* é essencial para a replicação e reparo do DNA, incluindo na recombinação homóloga, analogamente à *RECQL4*, embora suas funções sejam distintas. Variantes bialélicas no *DNA2* já haviam sido previamente associadas ao nanismo primordial osteodisplásico microcefálico. Apesar dos indivíduos reportados apresentarem um padrão de crescimento semelhante, a presença de poiquilodermia e anomalias oculares é única. Outros achados clínicos como microcefalia, catarata congênita e alterações endócrinas distinguem este subgrupo daqueles com alterações em *RECQL4*, *ANAPC1* e *CRIP1*. Deste modo, o trabalho ampliou o espectro fenotípico das alterações associadas do *DNA2*, incorporando características clínicas da síndrome de Rothmund-Thomson e a heterogeneidade genética da própria doença. Embora o mecanismo fisiopatológico completo e uma clara correlação genótipo-fenótipo não possam ser definitivamente estabelecidos neste momento, especula-se que um prejuízo parcial no reparo e manutenção do DNA com uma atividade residual do alelo com a variante de *splicing* poderia ser responsável por parte das manifestações clínicas e suas diferenças em relação a outros fenótipos relacionados.

**Palavras-chave:** Síndrome de Rothmund-Thomson. *DNA2*. *RECQL4*. Poiquilodermia. Catarata congênita. Reparo de DNA. Efeito fundador.

## ABSTRACT

The Rothmund-Thomson syndrome is a rare genodermatosis characterized by skin lesions that appear in the first months of life, often progressing to poikiloderma. Features also include sparse hair and eyebrows, cataract, and skeletal abnormalities. Moreover, the condition presents signs similar to premature aging. Initially, the syndrome was linked to biallelic variants in the *RECQL4* and *ANAPC1* genes. Recently, the *CRIP1* gene has also been associated with the syndrome's spectrum, underscoring the disease's complexity and heterogeneity. Fourteen probands with a clinical diagnosis of Rothmund-Thomson syndrome were studied, with six displaying pathogenic variants in *RECQL4*. This research focused on the eight additional probands (including one affected fetus) who exhibited a more pronounced and similar phenotype among them, and lacked pathogenic variants in *RECQL4* and *ANAPC1*. Genomic analyses identified compound heterozygous variants in the *DNA2* gene, one being a deep intronic splicing variant (c.588-2214A>G) in trans with loss-of-function variants. This intronic variant is shared by all patients, suggesting a likely founder effect. Functional assays showed a reduction in protein levels, affecting the repair of DNA double-strand breaks in cells from an affected individual. The *DNA2* protein is vital for DNA replication and repair, including homologous recombination, similar to *RECQL4*, though their roles differ. Biallelic variants in *DNA2* had previously been linked to microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism. Although the reported individuals show a similar growth pattern, the presence of poikiloderma and ocular anomalies is unique. Other clinical findings, such as microcephaly, congenital cataract and endocrine changes distinguish this subgroup from those with mutations in *RECQL4*, *ANAPC1* and *CRIP1*. Thus, this study broadened the phenotypic spectrum of *DNA2*-related changes, incorporating clinical features of Rothmund-Thomson syndrome and the disease's genetic heterogeneity. Although the complete pathophysiological mechanism and a clear genotype-phenotype correlation cannot be definitively established at this time, it is speculated that a partial impairment in DNA repair and maintenance with residual activity of the allele with the splicing variant might account for part of the clinical manifestations and their differences compared to other related phenotypes.

**Keywords:** Rothmund-Thomson Syndrome. *DNA2*. *RECQL4*. Poikiloderma. Congenital cataract. DNA repair. Founder effect.







Hospital das Clínicas da FMUSP  
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa  
CAPPesq

Ao

Departamento de Pediatria

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa-CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU** na sessão de 05.04.17 a execução do subprojeto intitulado "**Estudo Genético-Clinico de pacientes com Síndrome de Rothmund-Thomson**", que será dissertação de mestrado do aluno **Ricardo di Lazzaro filho**, sob orientação da **Profa. Dra. Débora Romeo Bertola**.

O referido projeto faz parte do **Protocolo de Pesquisa nº 0558/11**, intitulado "**ESTUDO GENÉTICO-CLÍNICO DAS DISPLASIAS ESQUELÉTICAS**", aprovado por esta CAPPesq em 08.12.2010.

**Pesquisador responsável: Profa. Dra. Débora Romeo Bertola**

CAPPesq, 08 de Março de 2016

Prof. Dr. Alfredo José Mansur  
Coordenador

Comissão de Ética para Análise de  
Projetos de Pesquisa - CAPPesq