

RA Sopatnie – diagnostyka molekularna wrodzonych zaburzeń rozwojowych

Monika Gos

Zakład Genetyki Medycznej

Instytut Matki i Dziecka

Kurs: Choroby genetyczne wieku rozwojowego – możliwości diagnostyczne w erze badań genomowych.



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska



Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



edu-metgen.imid.med.pl

Wrodzone zaburzenia rozwojowe

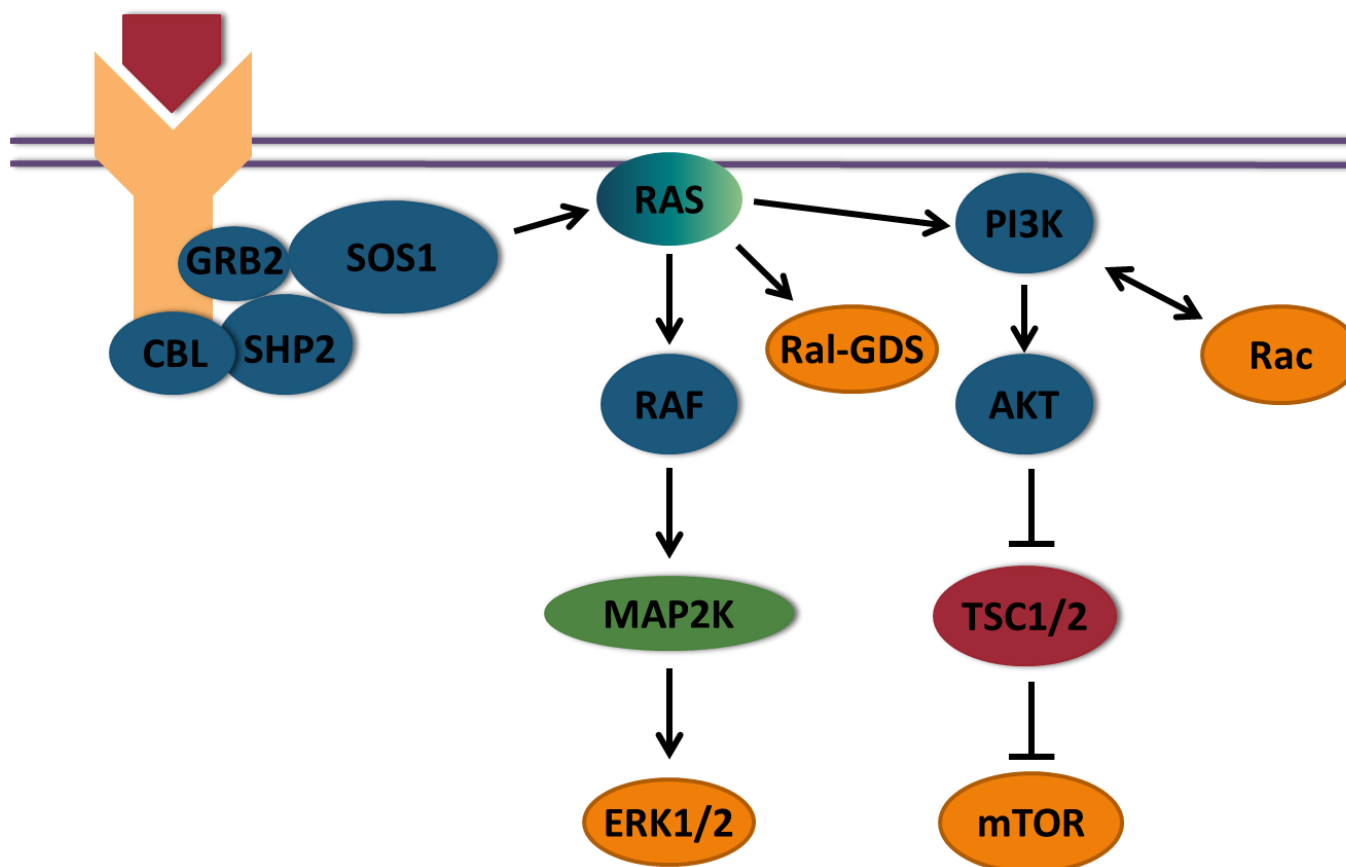
- wady wrodzone – zaburzenia prawidłowego rozwoju tkanki, narządu lub całego organizmu, zachodzące w trakcie rozwoju płodowego
- mechanizmy patogenetyczne: deformacje, przerwania, dysplazje i malformacje
- 10-15% samoistnych poronień (do 50% w późniejszym okresie ciąży)
- 20% zgonów niemowląt
- najczęstsza przyczyna wystąpienia niepełnosprawności u dzieci
- rozpoznanie w okresie postnatalnym
- konieczność wielospecjalistycznej opieki medycznej
- wady duże (również letalne) i małe (anomalie rozwojowe, cechy dysmorfii)
- wady izolowane i mnogie (zespoły wad wrodzonych)

Wrodzone zaburzenia rozwojowe

- Przyczyny występowania wad wrodzonych:
 - 50-60% - przyczyna nieznana
 - 20-25% - dziedziczenie wieloczynnikowe
 - 6-7% - aberracje chromosomowe
 - 7-8% - mutacje punktowe (zespoły monogenowe)
 - ? – zaburzenia regulacji epigenetycznej
 - 3% - wrodzona choroba matki
 - 2% - infekcja wewnątrzmaciczna
 - 1.5% - zewnętrzne czynniki fizyczne lub chemiczne

>1000 zespołów wad wrodzonych o znanym podłożu genetycznym

Szlak RAS/MAPK



Rola szlaku RAS/MAPK

Procesy komórkowe

Wzrost komórki
Progresja cyklu komórkowego
Migracja komórek
Różnicowanie komórek
Śmierć komórkowa (apoptoza)
Starzenie się komórek



Procesy rozwojowe

Wzrost ciała
Rozwój układu kostno-chrzęstnego
Rozwój twarzoczaszki
Rozwój układu nerwowego
Rozwój serca (zastawki)
Różnicowanie melanocytów

RASopatie jako przykład zaburzeń rozwojowych

zaburzenia aktywności szlaku RAS/MAPK



dysmorfia twarzoczaszki
niskorosłość
wady serca
opóźnienie rozwoju psychoruchowego
zaburzenia pigmentacji
wyższe ryzyko rozwoju nowotworów

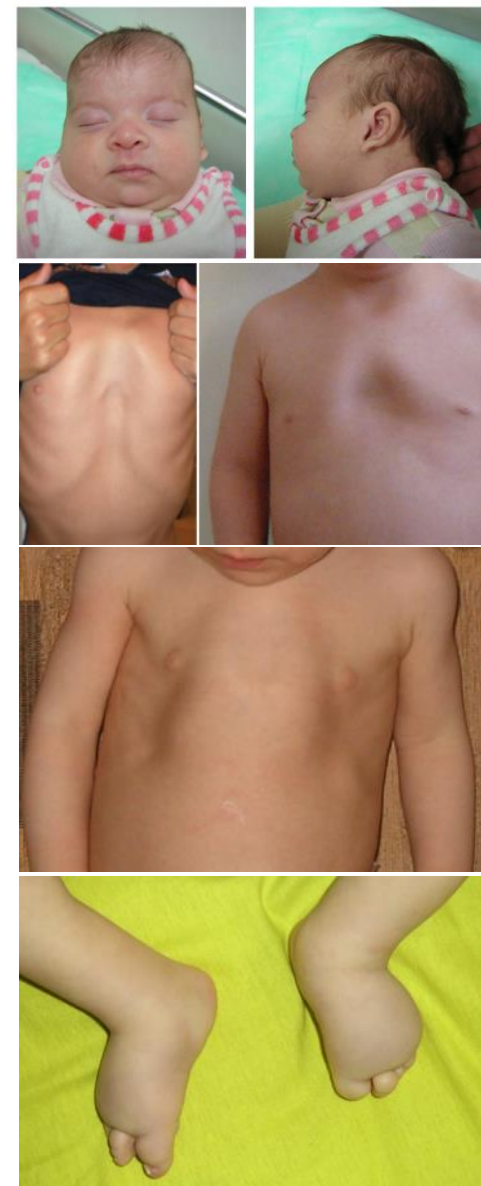


RASopatie

Zespół	Częstość występowania
Zespół Noonan (NS)	1/1000-2500
Zespół Noonan z plamami soczewicowatymi (LEOPARD)	?
Zespół Noonan z włosami anagenowymi (Mazzanti)	<1 / 1 000 000
Zespół sercowo-twarzowo-skórny (CFCS)	?
Zespół Costello	?
Nerwiakowłókniakowatość typu I	1/3500
Zespół Legiusa	?

Zespół Noonan - objawy

Objawy zespołu Noonan	%
dysmorfia twarzy	100
niskorosłość	50-70
wrodzone wady serca (PVS, ASD, VSD, HCM)	>80
opóźnienie rozwoju psychoruchowego	~50
krótka szyja/płetwistość szyi	50-90
deformacje klatki piersiowej	75-95
wnętrostwo	~80
cechy dysplazji limfatycznej	~20
zaburzenia krzepnięcia /skazy naczyniowe	30-65
trudności szkolne	10-40



Zespół Noonan - objawy

Cechy dysmorfii w ZN	%
hiperteloryzm	95
skośne ku dołowi ustawienie szpar powiekowych	95
opadające powieki	42
zmarszczki nakątne	45
nisko osadzone, odstające uszy	90
pogrubiały obrąbek ucha	90
szeroka, krótka szyja	55

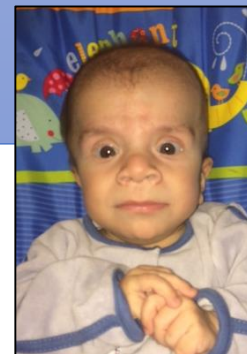


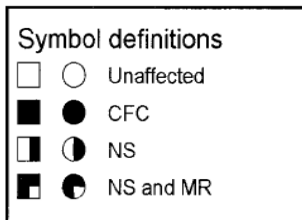
Kryteria diagnostyczne zespołu Noonan

Cechy	Objawy główne	Objawy uzupełniające
Twarzoczaszka	typowa dysmorfia twarzy	sugestywna dysmorfia twarzy
Serce	zwężenie zastawki tętnicy płucnej, kardiomiopatia przerostowa, i/lub ECG typowe dla NS	inne wady serca
Wzrost	poniżej 3 centyla	poniżej 10 centyla
Klatka piersiowa	kurza/szewska	szeroka (beczkowata)
Dziedziczenie	krewny pierwszego stopnia z pewnym rozpoznaniem NS	krewny pierwszego stopnia z podejrzeniem NS
Inne	wszystkie objawy u chłopców: niepełnosprawność intelektualna, wnetrostwo, dysplazja limfatyczna	jeden z 3 objawów u chłopców: niepełnosprawność intelektualna, wnetrostwo, dysplazja limfatyczna

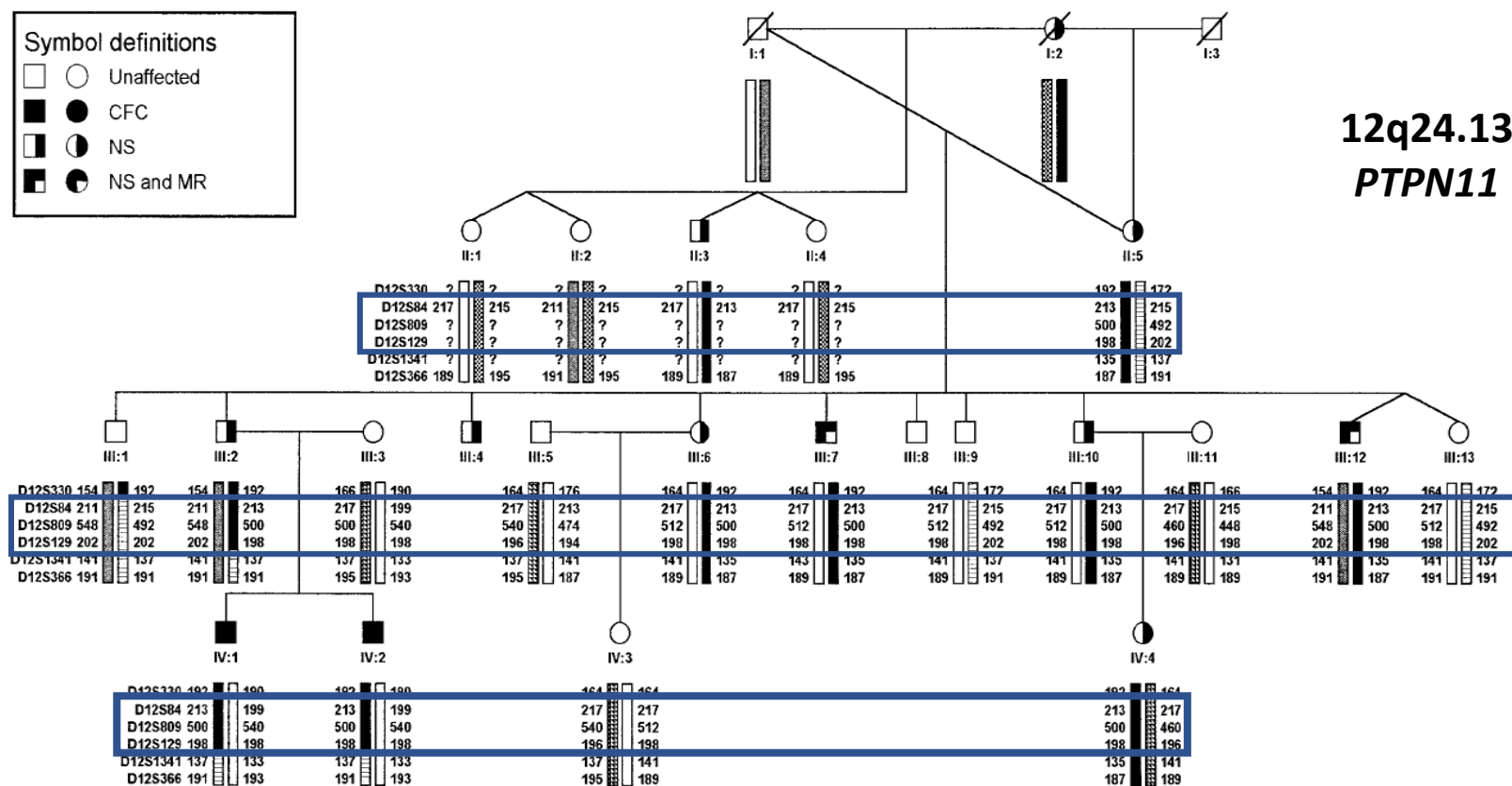
Cechy dysmorfii + 1 objaw główny lub 2 uzupełniające
 Słabo wyrażone cechy dysmorfii + 2 objawy główne lub 3 uzupełniające

Zespół genetyczny	Objawy różnicujące
Zespół LEOPARD	• zmiany skórne o charakterze plam soczewicowatych • częstsze występowanie niedosłuchu i kardiomiopatii przerostowej • zaburzenia rytmu serca
Zespół CFC	• niepełnosprawność intelektualna w stopniu umiarkowanym lub znacznym, • brak rzęs i brwi, • hiperkeratoza na twarzy, ramionach i nogach, • bruzdy na małżowinach usznych
Zespół Costello	• miękka, mięsista skóra dłoni i stóp, z charakterystycznym bruzdowaniem, • wiotkość stawowa, • włókniaki wokół ust i nosa (pojawiające się dopiero po okresie dzieciństwa), • ciemniejsze zabarwienie skóry, • rogowacenie ciemne (acanthosis nigricans), • hiperkeratoza dłoni i stóp, • częstsze występowanie niepełnosprawności w stopniu umiarkowanym/znacznym • zaburzenia rytmu pod postacią tachykardii przedsionkowej
Zespół NF-NS, NF1	• nerwiakowłókniaki • guzki Lischa • piegi w okolicy pach i pachwin • liczne plamy CAL

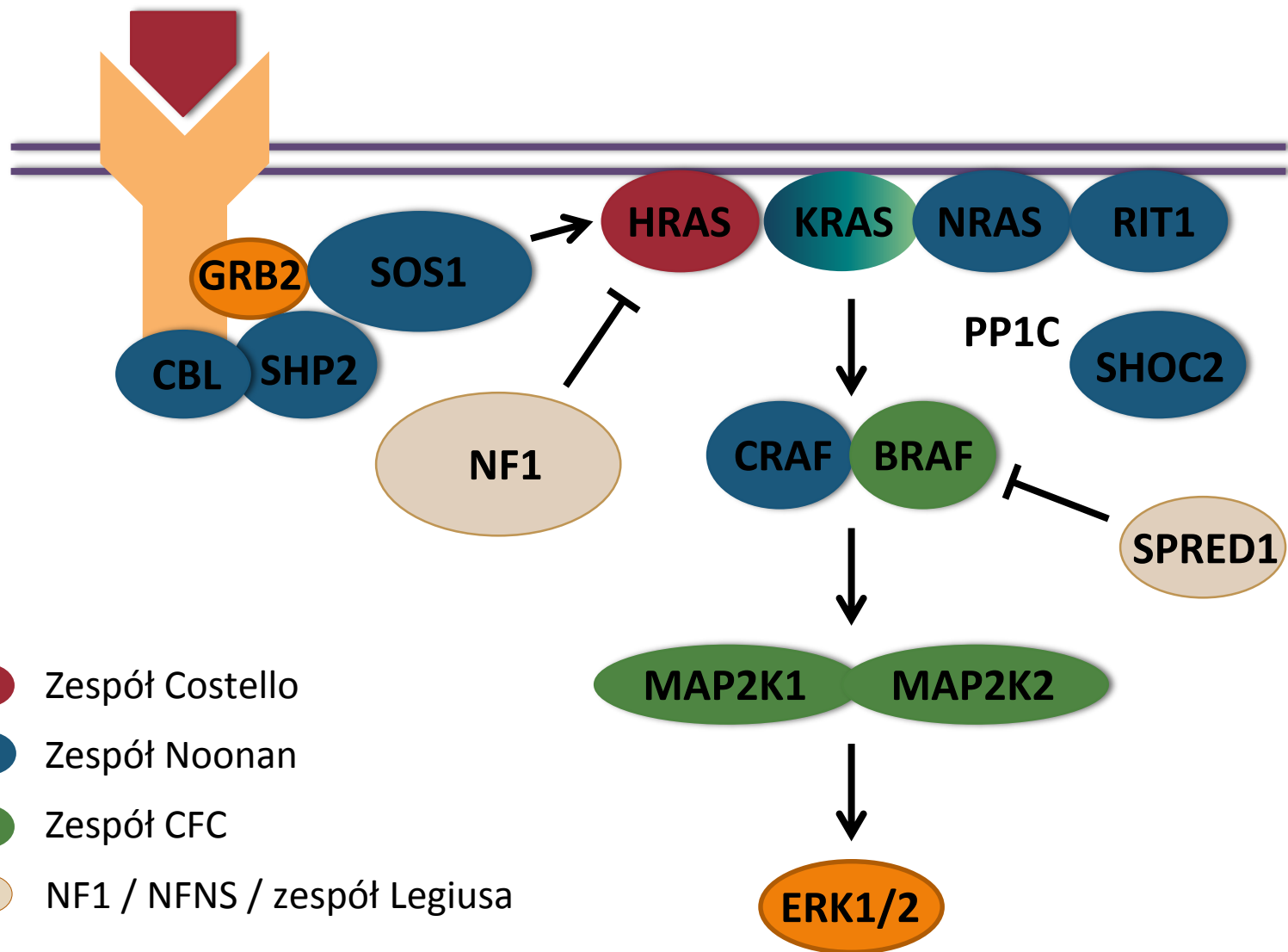




12q24.13 *PTPN11*



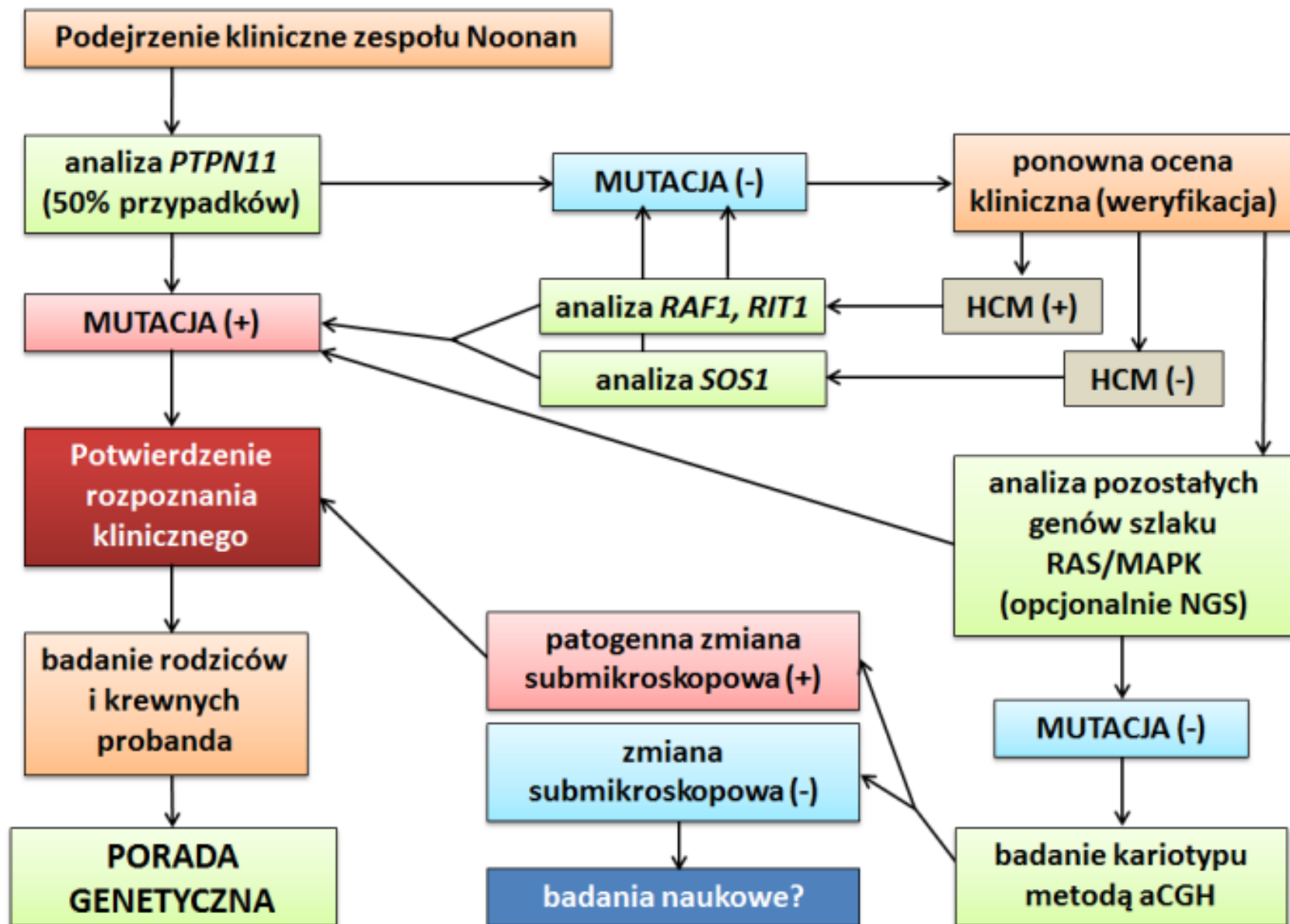
EJHG, 1998, 6, 32–37



Zespół	Gen	Częstość mutacji	Locus
	<i>PTPN11</i>	50%	12q24.13
	<i>SOS1</i>	10-13%	2p22.1
	<i>RAF1</i>	3-17%	3p25.1
	<i>KRAS</i>	<5%	12p12.1

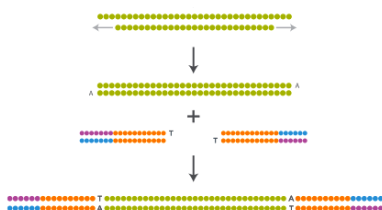
	Gen	Locus
Nowe geny w patogenezie zespołu Noonan	<i>RRAS</i>	19q13.33
	<i>SOS2</i>	14q21.3
	<i>LZTR1</i>	22q11.21
	<i>CDC42</i>	1p36.12
	<i>RASA2</i>	3q23
	<i>SPRY1</i>	4q28.1
	<i>MAP3K8</i>	10p11.23
	<i>MRAS</i>	3q22.3
	<i>RRAS2</i>	11p15.2
	<i>FBXW11</i>	5q35.1

Zespół CFC	<i>MAP2K1</i>	12%	15q22.31
	<i>MAP2K2</i>	12%	19p13.3
	<i>KRAS</i>	<2%	12p12.1

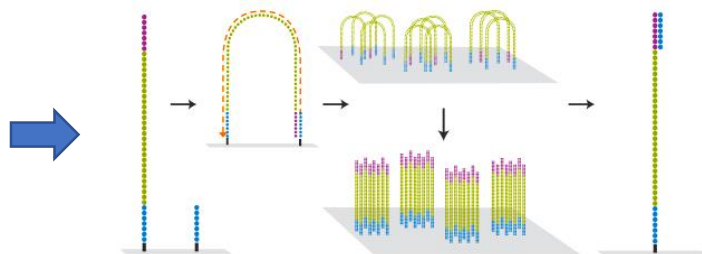


Sekwencjonowanie następnej generacji jako technika diagnostyczna w RASopatiach

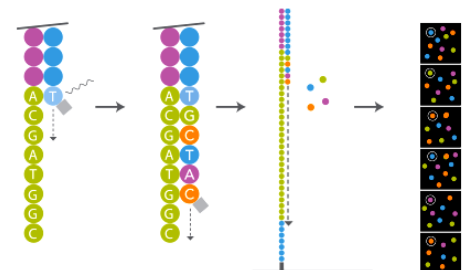
Przygotowanie biblioteki



Amplifikacja klastrowa (mostkowa)



Sekwencjonowanie



Wysokoprzepustowe sekwencjonowanie równoległe –
możliwość jednoczesnej analizy panelu genów związanych z RASopatiami

Potok przetwarzania danych (tzw. pipeline)

Odczyt sekwencji nukleotydowej dla poszczególnych fragmentów (*base calling*)

przepisanie sygnału wygenerowanego przez sekwenator na sekwencję nukleotydową (plik: **FASTQ**)



Przyrównanie / uliniowanie (*alignment, mapping*)

przyrównanie sekwencji nukleotydowych do sekwencji referencyjnej (plik: **SAM/BAM**)



Lista wariantów różniących badaną próbkę od sekwencji referencyjnej (*variant calling*)

różnice między sekwencją badaną a referencyjną (plik: **VCF**)



Adnotacja wariantów i filtrowanie

scharakteryzowanie wariantów na podstawie różnorodnych baz danych



Wybór wariantu patogennego

filtrowanie wariantów zgodnie z przyjętymi kryteriami



Adnotacja wariantów

Single nucleotide variant: 12-112915523-A-G (GRCh37)

missense

• **PTPN11**

• **ENST00000351677 ***

HGVSp: p.Asn308Asp

Polyphen: ● benign

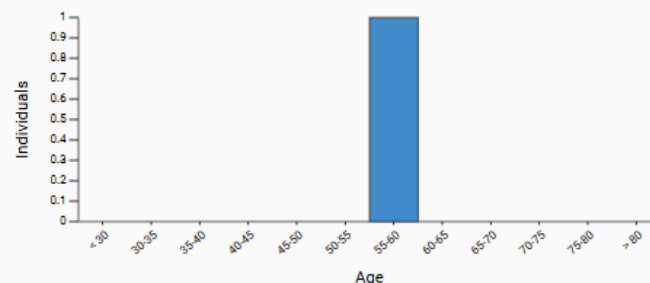
SIFT: ● deleterious

Population Frequencies

Population	Allele Count	Allele Number	Number of Homozygotes	Allele Frequency
Other	1	6136	0	0.0001630
European (Finnish)	1	21648	0	0.00004619
Latino	1	34592	0	0.00002891
African	0	16256	0	0.000
Ashkenazi Jewish	0	10078	0	0.000
East Asian	0	18394	0	0.000
European (non-Finnish)	0	113720	0	0.000
South Asian	0	30616	0	0.000
Male	2	135888	0	0.00001472
Female	1	115552	0	0.000008654
Total	3	251440	0	0.00001193

Include: ☒ Exomes ☐ Genomes

Age Distribution



Heterozygous Variant Carriers

Exomes Genomes

Adnotacja wariantów

Analiza występowania wariantu w bazach klinicznych

- ❖ ClinVar - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/> - wolnodostępna
- ❖ Human Gene Mutation Database (HGMD) - <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>
- ❖ Leiden Open Variation Database (LOVD) - <http://www.lovd.nl/>

Bazy zawierające informację o genach i powiązanych fenotypach

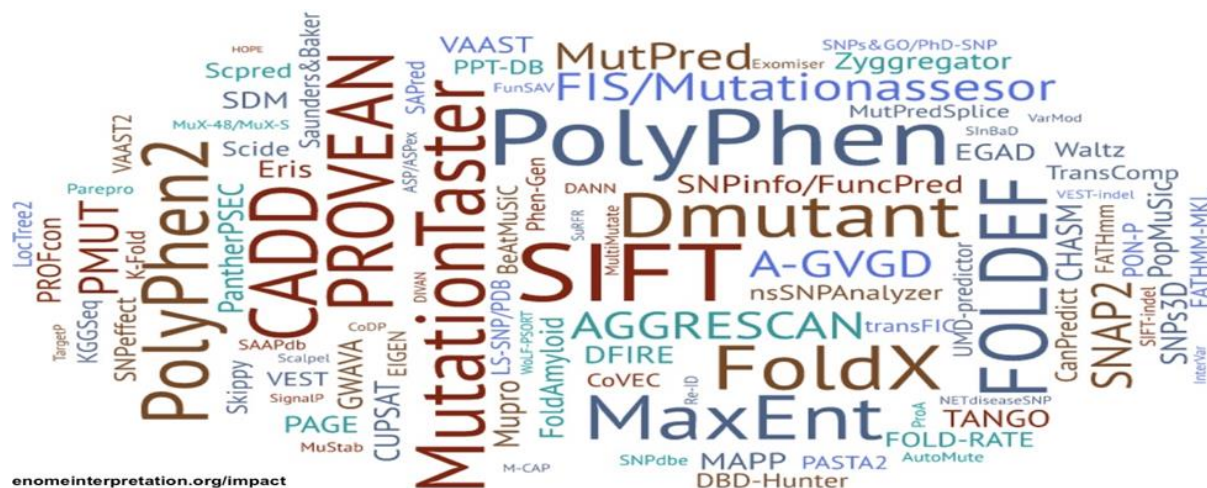
- ❖ Orphanet - <https://www.orpha.net>
- ❖ Online Mendelian Inheritance in Men (OMIM) - <https://www.omim.org/>

Bazy zawierające dane zebrane (populacyjne, kliniczne, ewolucyjne, funkcjonalne)

- ❖ Baza University of California, Santa Cruz (UCSC) - <https://genome.ucsc.edu/>
- ❖ Ensembl - https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index
- ❖ Genecards - <https://www.genecards.org/>

Adnotacja wariantów

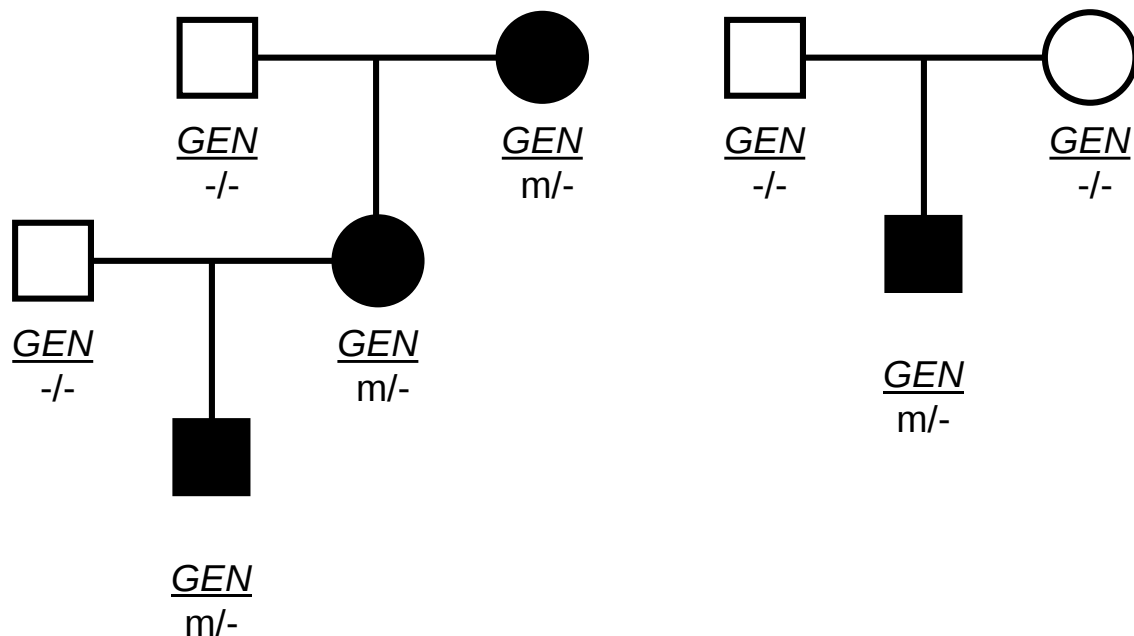
Analiza predykcyjna – analiza wpływu wariantu na funkcjonalność białka/RNA



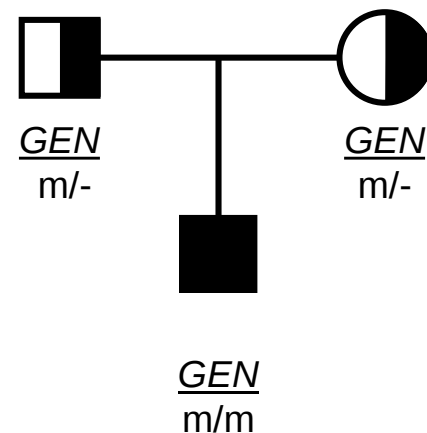
Wyniki analiz predykcyjnych nie zastąpią analizy funkcjonalnej !!!
Jednak nie jest ona możliwa do przeprowadzenia w warunkach diagnostycznych.

Najprostsza analiza funkcjonalna: analiza dziedziczenia wariantu w rodzinie

Dziedziczenie autosomalne dominujące



Dziedziczenie autosomalne recesywne



Podejrzenie RASopatii



I etap (opcjonalnie) – technika Sanger

Zespół Noonan – *PTPN11*

Zespół sercowo-twarzowo-skrórny – *BRAF*

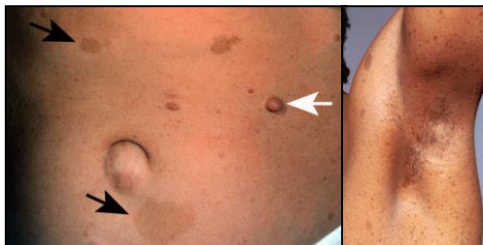
Zespół Costello - *HRAS*



Wynik negatywny – II etap – sekwencjonowanie panelowe

geny związane z patogenezą RASopatii oraz jednostek klinicznych, które powinny być brane pod uwagę w diagnostyce różnicowej (zespół Kabuki, zespół Aarskoga, zespół Coffina-Sirisa, zespół Baraitsera-Wintera, zespół Corneli de Lange, zespół Myhre, itp.)

Nerwiakowłókniakowatość typu I



Kryteria diagnostyczne – Paryż, 2018

Plamy w kolorze kawy z mlekiem (CAL) – ≥ 6

Obustronne piegowate nakrapianie pach / pachwin

Guzki Lischa (≥ 2) lub zmiany naczyniówki (≥ 2)

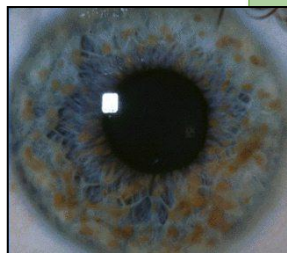
Glejak nerwu wzrokowego

Nerwiakowłókniaki skórne, podskórne, splotowe

Wady układu szkieletowego, głównie w obrębie kości długich

Rodzic I stopnia chory na NF1 (wykluczenie przypadków CMMRD)

Obecność patogenicznego wariantu w genie *NF1*



50% - 1r.ż.; 97% - 8r.ż.; 100% - 20r.ż.

Nerwiakowłókniakowatość typu I

homogenność genetyczna

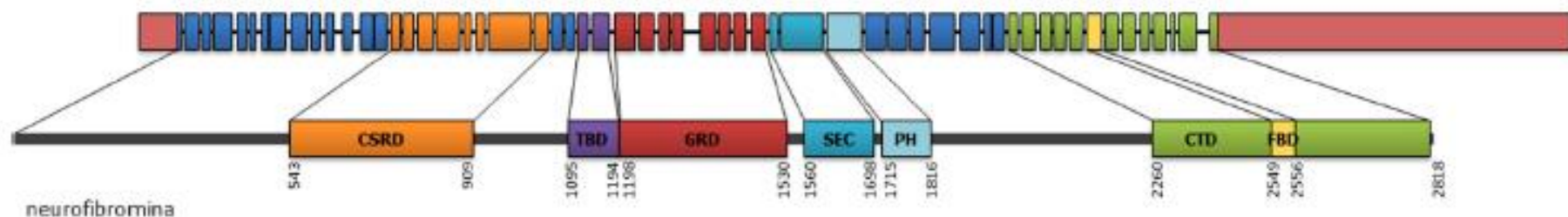
mutacje tylko w genie *NF1* (17q11.2)
dziedziczenie autosomalne dominujące /
mozaikowatość / postaci segmentalne
90% mutacje punktowe
(również głębokointronowe)
5-7% delecje w genie *NF1*

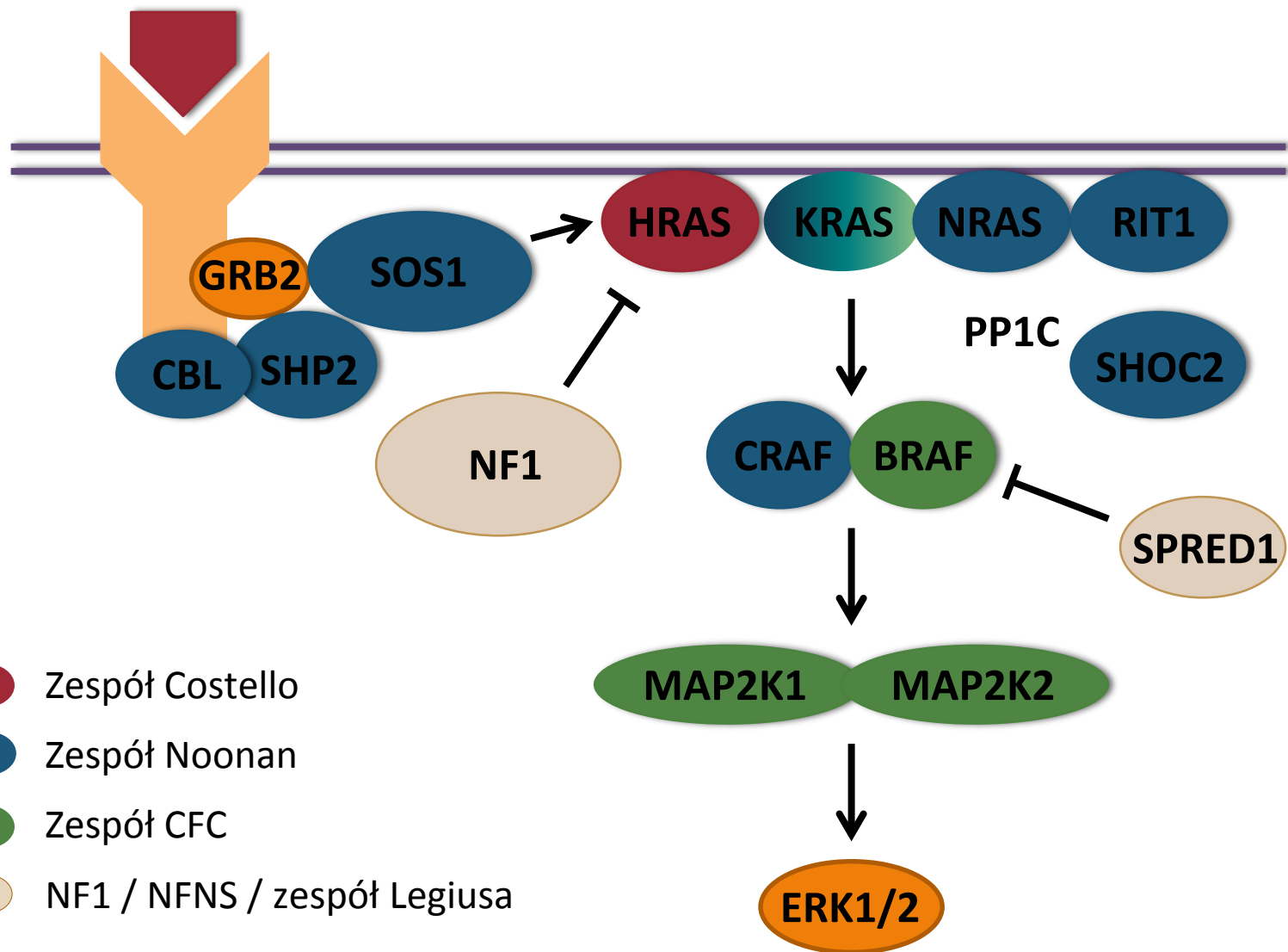
SKUTECZNOŚĆ:

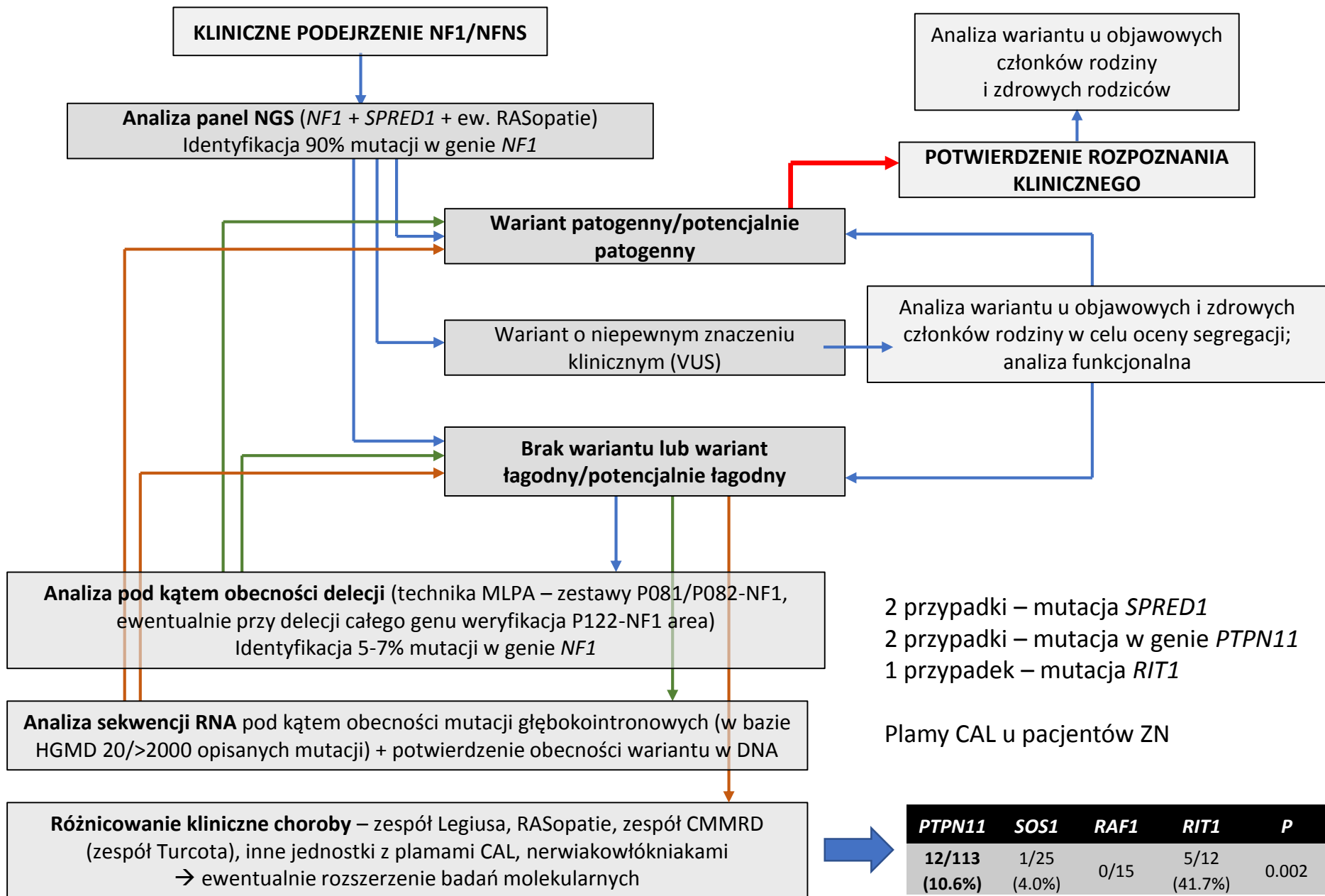
95-96% pacjentów spełniających
kliniczne kryteria kliniczne NIH
67% pacjentów ze zmianami
pigmentacyjnymi (głównie plamy CAL)

Evans DGR i wsp. Clin Cancer Res. 2017, 23(12):e46-e53

NF1 mRNA – izoforma I

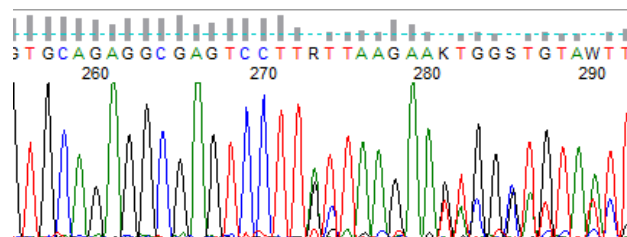




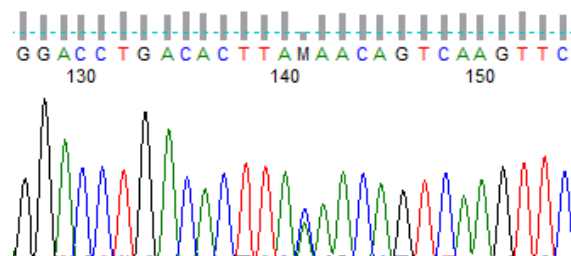


Techniki uzupełniające analizę NGS

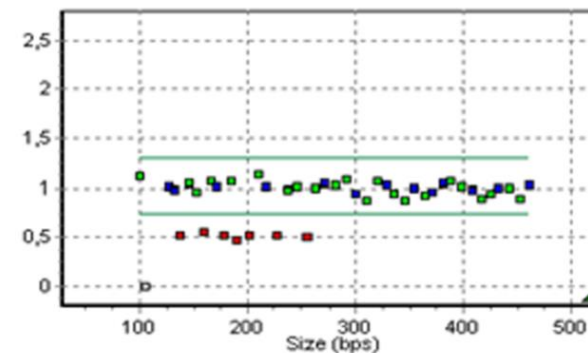
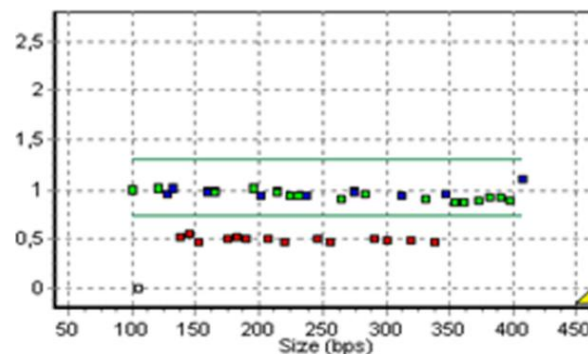
- Sekwencjonowanie RNA metodą Sanger (*NF1*) – technika bardziej wymagająca, dłuższa, ale dająca możliwość identyfikacji mutacji splicingowych
- Technika MLPA – identyfikacja delecji/duplikacji



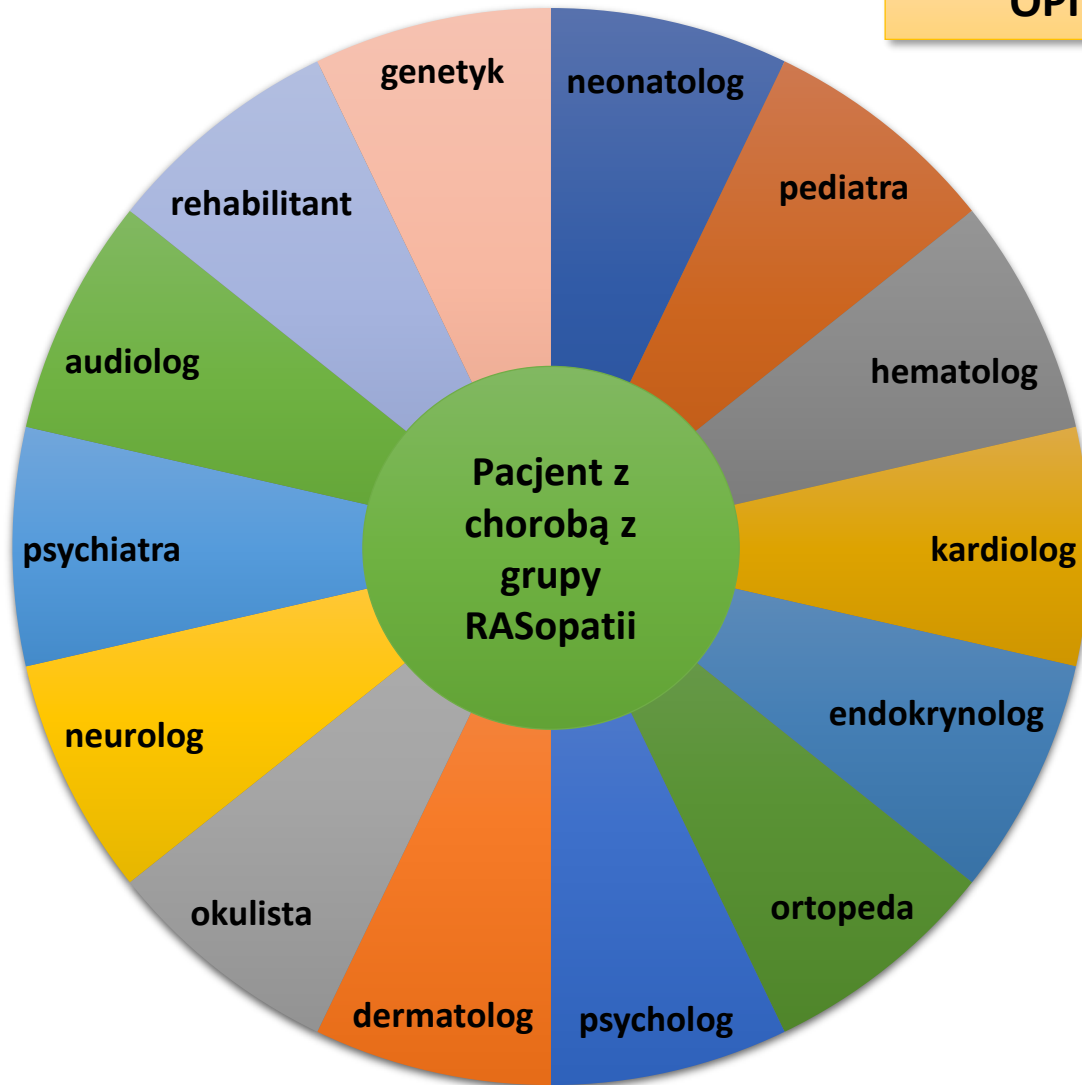
r. 6757_6858del



c.6792C>A; p.Tyr2264Ter



OPIEKA WIELODYSCIPLINARNA



leczenie objawowe

**profilaktyka
nowotworowa**

**poradnictwo
genetyczne**

**ROZPORZĄDZENIE
MINISTRA ZDROWIA ⁽¹⁾**

z dnia 15 czerwca 2020 r.

**w sprawie programu pilotażowego w zakresie
koordynowanej opieki medycznej nad chorymi z
neurofibromatozami oraz pokrewnymi im
rasopatiami**

- a) 636 Neurofibromatoza typu 1 wraz jej postaciami allelicznymi: segmentalną Neurofibromatozą typu 1 oraz rodzinną nerwiakowłókniakowatością kręgosłupową,
- b) 363700 Neurofibromatoza typu 1 spowodowana mutacją genu *NF1* lub delecją wewnątrzgenową,
- c) 637 Neurofibromatoza typu 2,
- d) 93921 Neurofibromatoza typu 3,
- e) 97685 Zespół mikrodelecji 17q11,
- f) 638 Neurofibromatoza - zespół Noonan,
- g) 137605 Zespół Legiusa

- 1) Instytut Matki i Dziecka w Warszawie;
- 2) Szpital Uniwersytecki Nr 1 im. dr Antoniego Jurasza w Bydgoszczy;
- 3) Uniwersyteckie Centrum Kliniczne w Gdańsku;
- 4) Uniwersyteckie Centrum Kliniczne Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Klinicznymi kryteriami kwalifikacji świadczeniobiorcy, o którym mowa w ust. 1, do objęcia programem pilotażowym są:

- 1) obecność co najmniej 6 plam skórnych "kawa z mlekiem" o średnicy >5 mm u dziecka w wieku do 2 lat lub co najmniej 10 plam u dzieci w 3. roku życia albo
- 2) obecność plam skórnych "kawa z mlekiem" o średnicy >5 mm, niezależnie od ich liczby, oraz stwierdzenie idiopatycznego niedosłuchu znacznego stopnia, zwłaszcza obustronnego lub guzów ośrodkowego układu nerwowego (OUN) o typie oponiaków, glejaków, obwodowych guzów o typie schwannoma lub zwapnień śródmózgowych lub podtorebkowego zmętnienia soczewki, albo
- 3) obecność plam skórnych "kawa z mlekiem" o średnicy >5 mm, niezależnie od ich liczby, oraz stwierdzenie potwierdzonych histopatologicznie guzów obwodowego układu nerwowego o typie schwannoma, albo
- 4) obecność plam skórnych "kawa z mlekiem" o średnicy >5 mm, niezależnie od ich liczby, oraz posiadanie krewnego pierwszego stopnia z rozpoznaniem Neurofibromatoza typu 2 lub Neurofibromatoza typu 3, albo
- 5) spełnienie co najmniej dwóch z następujących warunków: co najmniej 6 plam skórnych "kawa z mlekiem" o średnicy >5 mm u dziecka przed okresem pokwitania lub >15 mm u świadczeniobiorcy po okresie pokwitania, co najmniej 2 nerwiakowłókniaki jakiegokolwiek typu lub co najmniej jeden nerwiakowłókniak splotowaty, piegowate nakrapianie okolicy pach lub pachwin, glejaki nerwu wzrokowego, co najmniej dwa guzki Lischa w tęczęwce oka, dysplazja kości klinowej lub dysplazja kości długich kończyn powodująca ich deformację, w tym powikłaną tworzeniem stawów rzekomych, w szczególności kości piszczelowej, albo
- 6) spełnienie jednego z warunków, o których mowa w pkt 5, oraz posiadanie krewnego pierwszego stopnia z rozpoznaniem Neurofibromatoza typu 1.

Dziękuję za uwagę 😊
Pytania?

Monika Gos
monika.gos@imid.med.pl