

GENETYKA
dla NIE-GENETYKÓW
„OMIKA” - NOWA DZIEDZINA DIAGNOSTYCZNA
Nie tylko choroby rzadkie.

**NIEODPŁATNE
KURSY**
dla lekarzy, diagnostów
i innych specjalistów

edu-metgen.imid.med.pl



Interpretacja wyników badań molekularnych na przykładzie genetycznie uwarunkowanych chorób skóry

Katarzyna Wertheim-Tysarowska
Zakład Genetyki Medycznej
Instytut Matki i Dziecka

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

GENODERMATOZY

- **Genetycznie uwarunkowane zaburzenia budowy i funkcji skóry**
- Podstawowe objawy dotyczą skóry i jej przydatków (paznokcie, włosy, gruczoły potowe i łojowe)
- Szerokie spektrum objawów klinicznych (objawy ze strony innych narządów i układów)
- Pierwsze objawy w różnych okresach życia, ale głównie w okresie wczesnodziecięcym
- Opisano ponad 400 jednostek chorobowych
- Głównie choroby rzadkie ($< 1/2000$ żywych urodzeń)

GENODERMATOZY

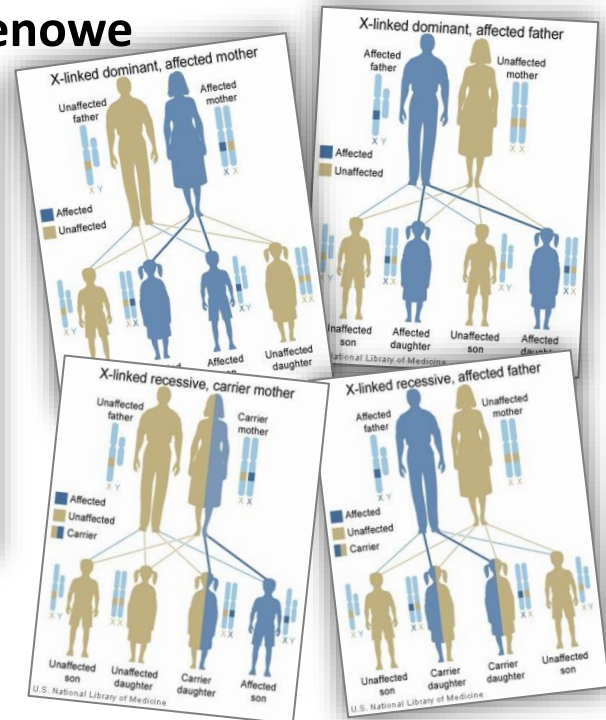
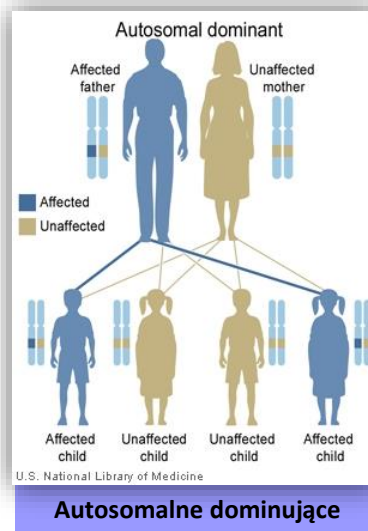
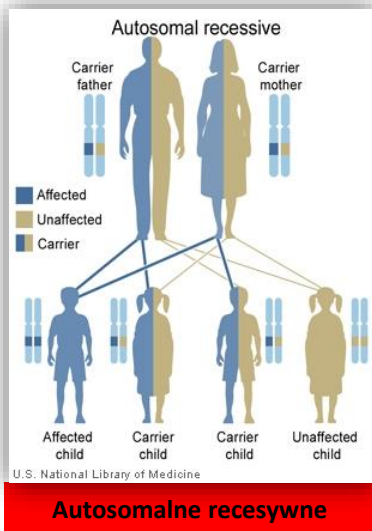
- Dostępne jest tylko leczenie objawowe
- Pacjenci wymagają wielospecjalistycznej opieki



- Genodermatozy mają duży wpływ na jakość życia pacjentów i ich rodziny (wykluczenie społeczne, niepełnosprawność etc.)

DZIEDZICZENIE GENODERMATOZ

- W większości choroby jednogenowe



**Srężone z
chromosomem X**

- Zespoły chromosomowe
- Dziedziczenie wieloczynnikowe

GŁÓWNE GRUPY GENODERMATOZ



choroby pęcherzowe skóry



choroby z zaburzeniami
rogowacenia



genodermatozy naczyniowe



genodermatozy
pochodzenia
ektodermalnego



choroby z zaburzeniami
barwy skóry



genodermatozy związane z
tkanką łączną



genodermatozy ze zwiększoną
predyspozycją do
nowotworów

DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA

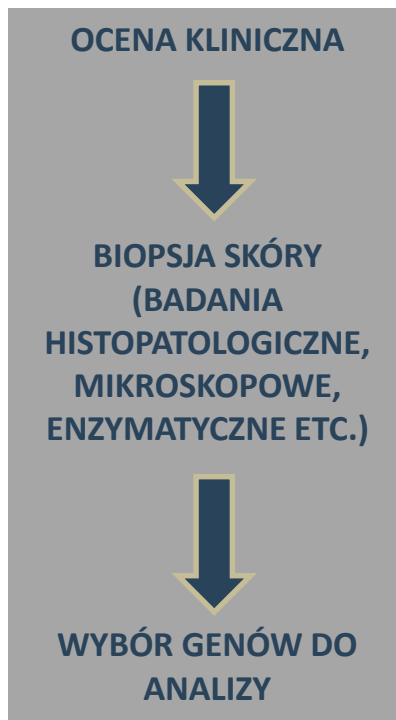
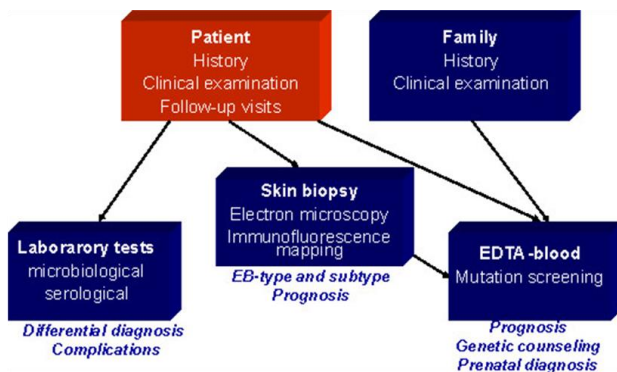


CEL: IDENTYFIKACJA MUTACJI

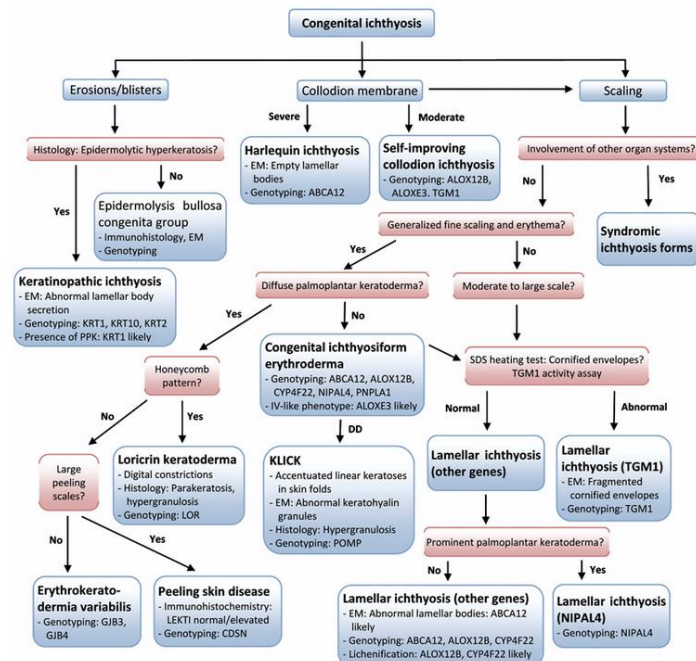
- **WERYFIKACJA ROZPOZNANIA KLINICZNEGO**
- **DLA CELÓW PORADNICTWA GENETYCZNEGO:**
 - OKREŚLENIE RYZYKA POWTÓRZENIA SIĘ CHOROBY W RODZINIE
 - MOŻLIWOŚĆ USTALENIA STATUSU NOSICIELSTWA KREWNYCH
 - MOŻLIWOŚĆ DIAGNOSTYKI PRENATALNEJ / PREIMPLANTACYJNEJ
- **PRZEWIDYWANIE PRZEBIEGU KLINICZNEGO CHOROBY**
- **KWALIFIKACJA DO PROGRAMÓW TERAPEUTYCZNYCH**

ALGORYTMY DIAGNOSTYCZNE

EPIDERMOLYSIS BULLOSA



ICHTHYOSIS

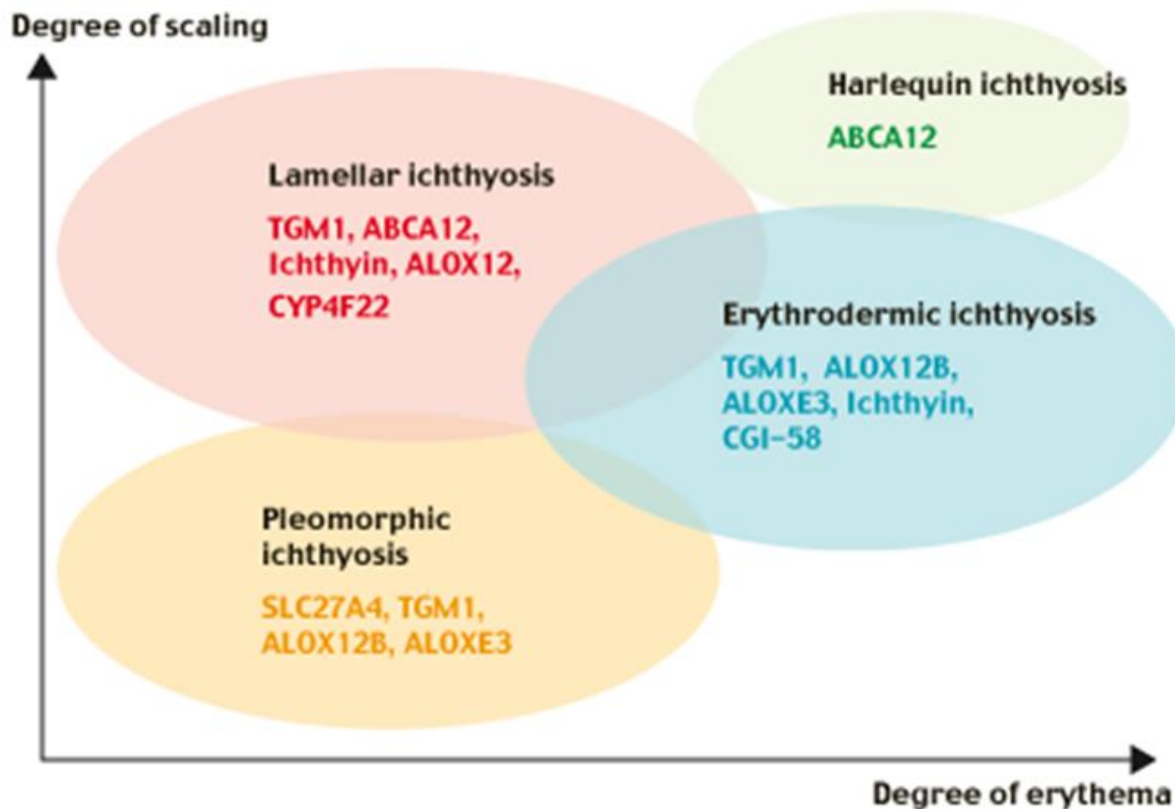


European Journal of Human Genetics (2013) 21, 123–133, *J Am Acad Dermatol.* 2010 Oct;63(4):607-41.

Wyzwania diagnostyczne

- ☐ Duża liczba chorób i ich podtypów
- ☐ Przestarzała i niespójna terminologia (np. opisowe nazwy, eponimy i synonimy)
- ☐ Wiele złożonych i zróżnicowanych systemów klasyfikacyjnych
- ☐ Szerokie spektrum objawów (w tym nietypowe przypadki, mozaiki itp)
- ☐ Najważniejsze cechy diagnostyczne rozwijają się z czasem
- ☐ Podobny fenotyp innym tle genetycznym
- ☐ Niespecyficzny fenotyp (nawet jeśli występują mutacje tego samego genu)
- ☐ W większości duże geny

Wyzwania diagnostyczne



<https://www.socialstyrelsen.se/stod-i-arbetet/ovanliga-diagnoser/kongenital-iktyos/>

JEDNA CHOROBA, JEDEN GEN - RÓŻNY FENOTYP

Table VI. Dystrophic epidermolysis bullosa clinical subtypes

DEB, major subtypes	All subtypes	Targeted protein(s)
DDEB	DDEB, generalized (DDEB-gen)	Collagen VII
	DDEB, acral (DDEB-ac)*	
	DDEB, pretibial (DDEB-pt)*	
	DDEB, pruriginosa (DDEB-pr)*	
	DDEB, nails only (DDEB-na)*	
	DDEB, bullous dermolysis of the newborn (DDEB-BDN)*	
RDEB	RDEB, generalized severe (RDEB-gen sev)	Collagen VII
	RDEB, generalized intermediate (RDEB-gen intermed)	Collagen VII
	RDEB, inversa (RDEB-inv; RDEB-I)	
	RDEB, localized (RDEB-loc)*	
	RDEB, pretibial (RDEB-pt)*	
	RDEB, pruriginosa (RDEB-pr)*	
	RDEB, centripetalis (RDEB-ce)*	
	RDEB, bullous dermolysis of the newborn (RDEB-BDN)*	

DDEB, Dominant dystrophic epidermolysis bullosa; DEB, dystrophic epidermolysis bullosa; RDEB, recessive dystrophic epidermolysis bullosa.

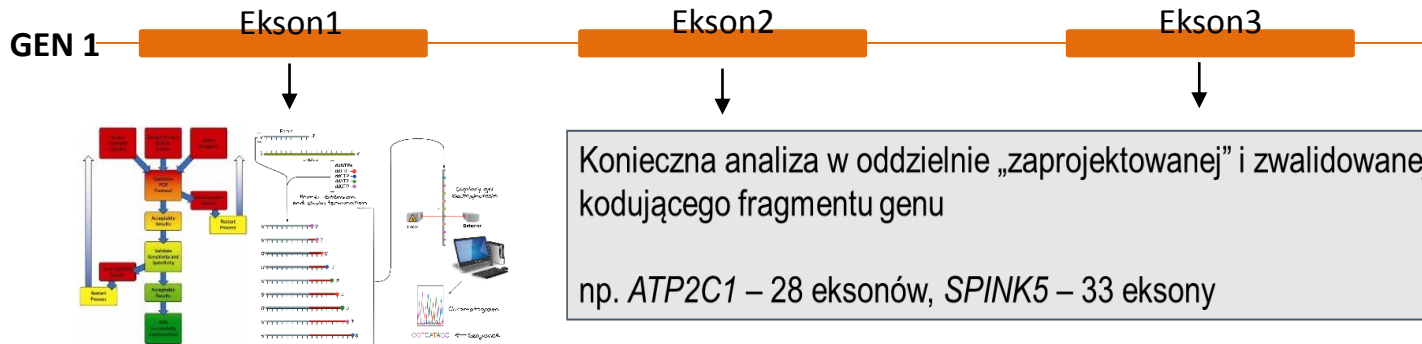
*Rare variants.



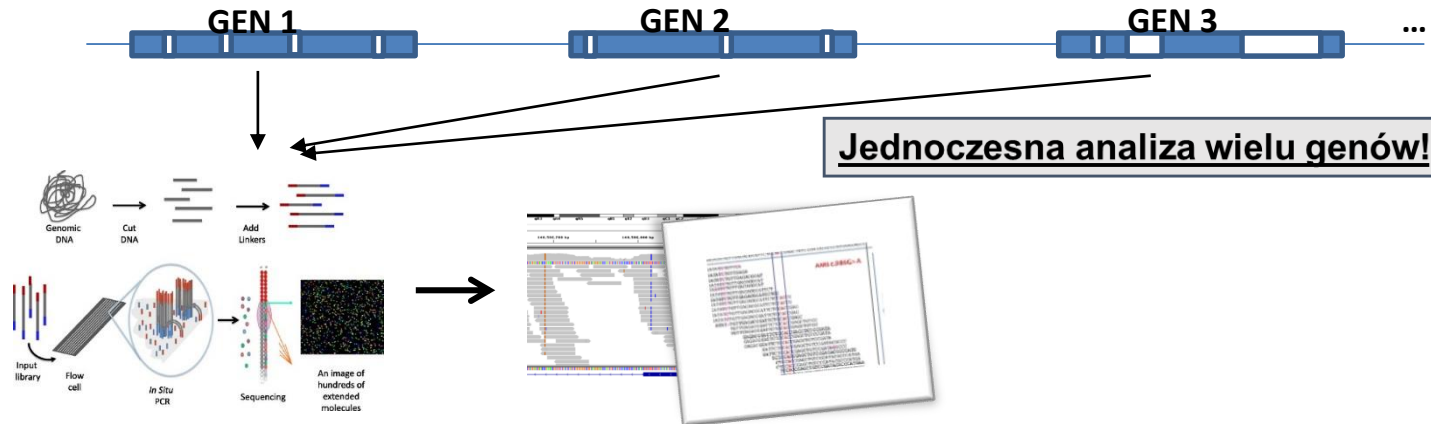
J Am Acad Dermatol. 2014 Jun;70(6):1103-26. Inherited epidermolysis bullosa: updated recommendations on diagnosis and classification.

Metody

- **Sekwencjonowanie metodą Sanger**

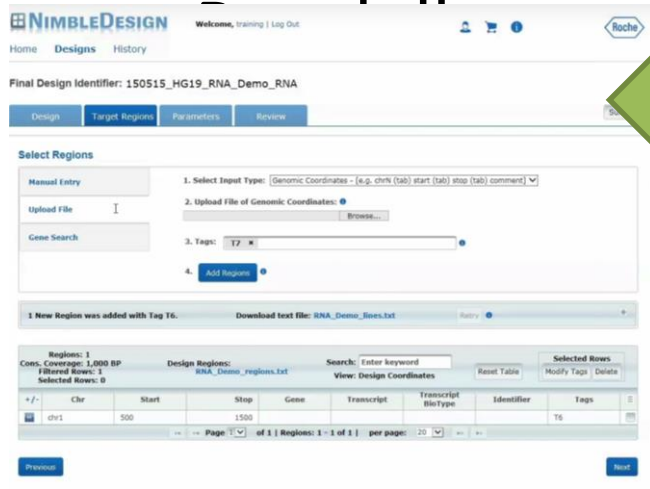


- **Sekwencjonowanie następnej generacji (NGS)**



Metody

- Sekwencjonowanie metodą Sanger
- Sekwencjonowanie następnej generacji (NGS)
 - Panel komercyjny (TrueSight One: genów)



Order – projekt

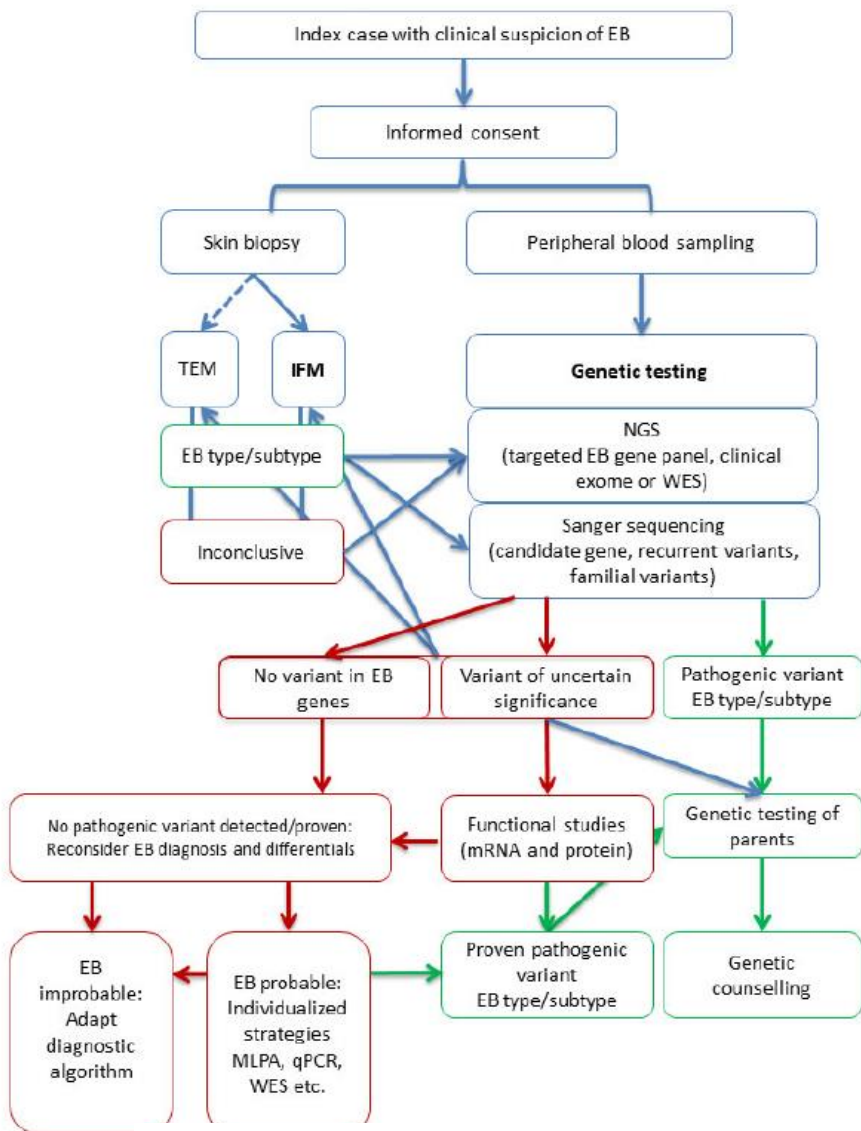
Wyselekcjonowane geny

Wyższe pokrycie (?)

Niższe koszty



➤ Diagnostic flow chart



- If EB is suspected, laboratory diagnosis is always indicated, after informed consent. If available and affordable, both genetic (DNA) testing and analysis of a skin sample (by immunofluorescence mapping, IFM) should be performed to allow complete diagnosis.
- However, this is not always possible. Prioritisation can shorten the time to diagnosis and save resources but requires expertise.
- For example, in new-born, analysis of a skin sample should be the first diagnostic step since it delivers the results within a few days. In parallel, genetic testing should always be performed.
- If the EB type can be clinically recognized or the disease is mild, genetic testing by next-generation sequencing is recommended.
- If the genetic defect is detected in one affected person, parents and other family members can be tested for



Guidelines | [Open Access](#) | [CC](#) [BY](#) [NC](#) [ND](#)

Clinical practice guidelines for laboratory diagnosis of epidermolysis bullosa

C. Has, L. Liu, M.C. Bolling, A.V. Charlesworth, M. El Hachem, M.J. Escámez, I. Fuentes, S. Büchel, R. Hiremagalore, G. Pohla-Gubo, P.C. van den Akker, K. Wertheim-Tysarowska, G. Zambruno

First published: 15 May 2019 | <https://doi.org/10.1111/bjd.18128>

Funding sources Dystrophic Epidermolysis Bullosa Research Association Austria.

Conflicts of interest None to declare.

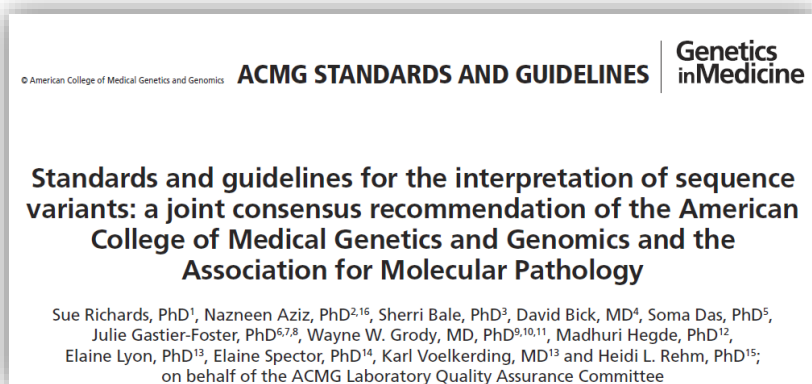
C.H., M.C.B., M.E.H. and G.Z. represent ERN-Skin (<http://ern-skin.eu/about-the-ern-skin>)

SECTIONS

[PDF](#) [TOOLS](#) [SHARE](#)



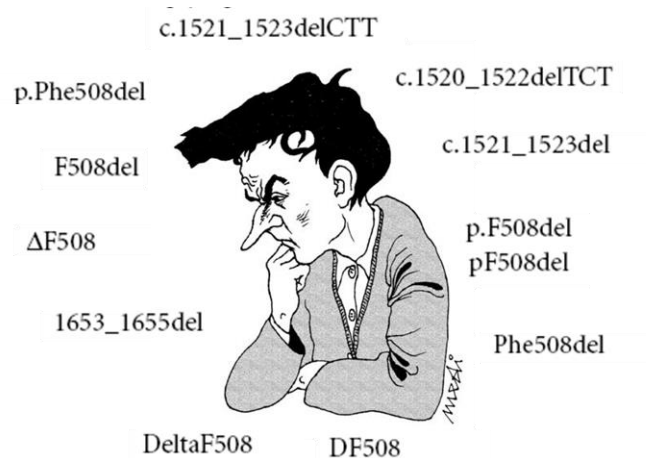
- Prawidłowe nazwanie mutacji
-
- Ocena znaczenia klinicznego zidentyfikowanej mutacji



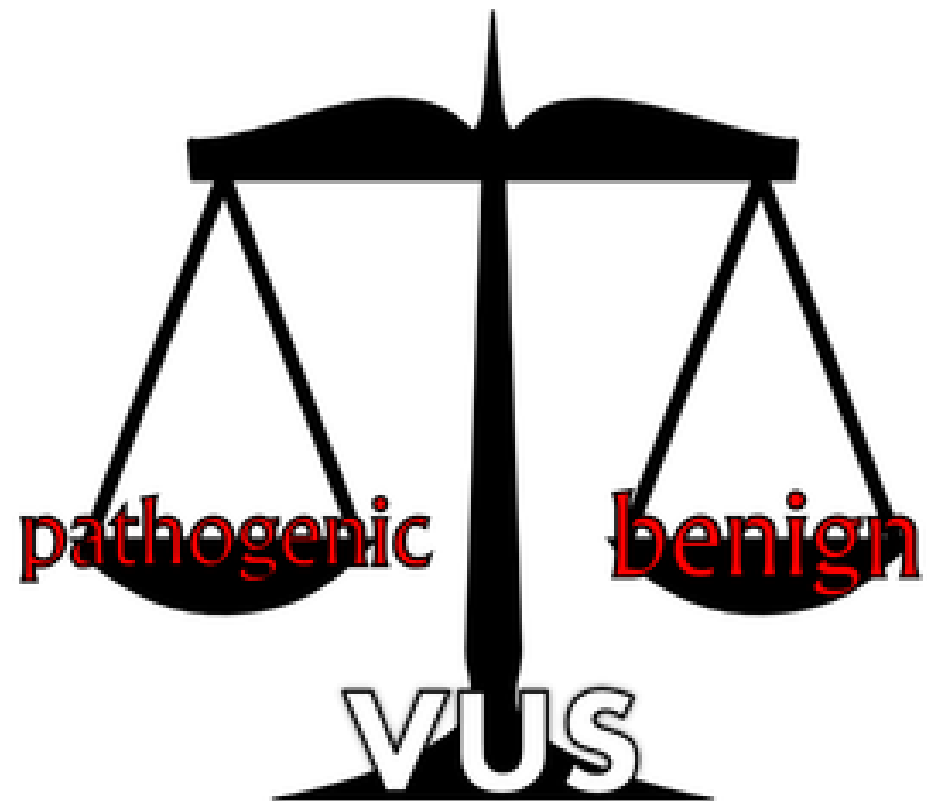
Genetics in Medicine (2015) 17, 405–423

NAZEWNICTWO

- **MUSI UMOŻLIWIAĆ JEDNOZNACZNĄ IDENTYFIKACJĘ WARIANTU!!!!!!**



<http://varnomen.hgvs.org/>



PODSTAWOWE POJĘCIA

- **MUTACJA** – UTRWALONA ZMIANA W SEKWENCJI NUKLEOTYDOWEJ
- **POLIMORFIZM** – WARIANT O CZĘSTOŚCI >1%



WARIANT

SŁOWO WARIANT JEST NEUTRALNE, W PRZECIWIENSTWIE DO MUTACJI I POLIMORFIZMU, KTÓRE POTOCZNIE (BŁĘDNIE) ROZUMIANE SĄ JAKO SYNONIMY ZMIANY PATOGENNEJ I NIEPATOGENNEJ

PIĘCIOSTOPNIOWA SKALA PATOGENNOŚCI UŻYWANA PRZY OPISIE WARIANTÓW

- Pathogenic variant
- Likely pathogenic variant
- Variant of uncertain significance (VUS)
- Likely benign variant
- Benign variant

Likely = >90% pewność, że dany wariant jest patogeny lub łagodny (bez znaczenia klinicznego)

© American College of Medical Genetics and Genomics **ACMG STANDARDS AND GUIDELINES** | Genetics in Medicine

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

Sue Richards, PhD¹, Nazneen Aziz, PhD^{2,16}, Sherri Bale, PhD¹, David Bick, MD⁴, Soma Das, PhD⁵, Julie Gastier-Foster, PhD^{6,7,8}, Wayne W. Grody, MD, PhD^{9,10,11}, Madhuri Hegde, PhD¹², Elaine Lyon, PhD¹³, Elaine Spector, PhD¹⁴, Karl Voelkerding, MD¹³ and Heidi L. Rehm, PhD¹⁵, on behalf of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee

KLASYFIKACJA WARIANTÓW – WG ACMG

- SŁUŻY DO OCENY ZNACZENIA KLINICZNEGO WARIANTÓW:
 - WYKRYTYCH U PACJENTÓW CHORYCH NA CHOROBY UWARUNKOWANE GENETYCZNIE (PRZEDE WSZYSTKIM O DZIEDZICZENIU MENDLOWSKIM)
 - WYKRYTYCH PRZEDE WSZYSTKIM W GENACH PRZYCZYNOWO ZWIĄZANYCH Z FENOTYPEM*
- **ACZKOLWIEK MOŻLIWE JEST ZASTOSOWANIE TEJ KLASYFIKACJI RÓWNIEŻ DO OCENY WARIANTÓW ZIDENTYFIKOWANYCH U OSÓB ZDROWYCH LUB JAKO „SECONDARY FINDINGS” U OSÓB CHORYCH – W TYCH PRZYPADKACH NALEŻY ZACHOWAC SZCZEGÓLNĄ ROZWAGĘ W INTERPRETACJI m.in. ZE WZGLĘDU NA RELATYWNIE NISKIE PRAWDOPODOBIENSTWO WYSTĘPOWANIA PATOGENNYCH WARIANTÓW W GENACH NIEZWIĄZANYCH Z FENOYTYPEM.*

OCENA ZNACZENIA KLINICZNEGO WARIANTÓW POWINNA BYĆ OPARTA NA RÓŻNYCH DANYCH UZYSKANYCH PRZY ANALIZIE MOLEKULARNEJ RÓŻNYCH PACJENTÓW!

Appendix: Examples of How to Describe Evidence for Variant Classification on Clinical Reports

A. Example of a table to report the structured elements of a variant

Gene Transcript	Location	Variant	Zygosity	Classification	Disease	Inheritance	Parental Origin
YY NM_12345.6	Exon X/Intron X/Promoter/UTR	c.XXX (p.XXX)	(Apparently) homozygous/ Heterozygous/ Hemizygous/ Heteroplasmic/ Homoplasmic/ Mosaic/Somatic	Pathogenic/ Likely pathogenic/ Uncertain significance	Disease Z	Autosomal recessive/ Autosomal dominant/ X- linked/Mitochondrial	Paternal/ Maternal/ De novo/ Unknown

B. Example of a Pathogenic Variant

The p.XXX pathogenic variant in the YY gene has been reported previously in patients with Disease Z (ref1, ref2, ref3). Eight affected individuals (between the 3 publications) were homozygous for the variant in two families. In one family, this variant was found in *trans* with another previously established pathogenic variant in this gene. A well-established enzyme assay performed on the patient's blood sample showed decreased enzyme activity. The NHLBI Exome Sequencing Project and the 1000 Genomes Project each report that p.XXX was observed in 5/8598 and 3/2100 alleles, respectively, a carrier frequency consistent with the frequency of Disease Z. Multiple lines of computational evidence predict this variant is probably damaging to the protein structure, function, or protein-protein interaction. In particular, the p.XXX variant is a non-conservative amino acid substitution at a position that is conserved in all members of the YY protein family and conserved down to lower species (zebrafish) and is located near the hinge region between the YY N-terminal domain and the catalytic domain. In addition, this individual has a collection of clinical features that are highly specific for Disease Z and for which pathogenic variants in the YY gene are the only known cause, providing a higher probability that any variant identified would be pathogenic. In summary, this collective evidence supports p.XXX as a recessive pathogenic variant for Disease Z.

C. Example of a Likely Pathogenic Variant

The p.XXX variant in the YY gene has not been published to our knowledge but was observed as a *de novo* occurrence in this individual whose phenotype matches Disease Z described for this gene. p.XXX was not observed in approximately 6,500 individuals of European and African American ancestry in the NHLBI Exome Sequencing Project. The p.XXX variant is a conservative amino acid substitution, which occurs at a position that is conserved across species, though in silico analysis tools are inconsistent in predicting whether or not the variant may damage protein function. Many missense pathogenic variants in nearby residues in the YY gene have been reported in association with disease Z (ref1), supporting the

functional importance of this region of the protein. p.XXX is therefore interpreted to be likely pathogenic for disease Z and act in a dominant manner.

D. Example of a Variant of Uncertain Significance

The maternally-inherited p.XXX variant in the YY gene has not been published, to our knowledge. p.XXX is a conservative amino acid substitution that occurs at a residue that is conserved in mammalian species. In silico analysis predicts this variant is probably damaging to the protein structure/function. The p.XXX variant was not observed in approximately 6,500 individuals of European and African American ancestry in the NHLBI Exome Sequencing Project. We interpret p.XXX in YY gene as a variant of uncertain significance with respect to disease Z.

E. Example of a Likely Benign Variant

The p.XXX variant in the YY gene has been observed in 9/2100 alleles in the 1000 Genomes database. This allele frequency would be higher than that expected, based on the prevalence of disease Z in the population. In silico analysis predicts a benign impact on the resultant protein. Missense changes are relatively rare in gene YY, as most variants result in loss of function. In addition, an alternate cause of disease was identified that is likely the cause of disease in this individual. Based on this information, the variant is likely benign with respect to disease Z.

F. Example of a Benign Variant

The p.XXX variant found in the proband with disease Z has been observed in the 1000 Genomes database at a frequency of 2.3%. The similarly-affected brother of the proband was found to not have the p.XXX variant. In silico analysis predicts a benign impact on the resultant protein. The p.XXX is interpreted to be a benign variant with respect to the disease Z.

© American College of Medical Genetics and Genomics

ACMG STANDARDS AND GUIDELINES

Genetics
in Medicine

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

Sue Richards, PhD¹, Nazneen Aziz, PhD^{2,16}, Sherri Bale, PhD³, David Bick, MD⁴, Soma Das, PhD⁵, Julie Gastier-Foster, PhD^{6,7,8}, Wayne W. Grody, MD, PhD^{9,10,11}, Madhuri Hegde, PhD¹², Elaine Lyon, PhD¹³, Elaine Spector, PhD¹⁴, Karl Voelkerding, MD¹³ and Heidi L. Rehm, PhD¹⁵; on behalf of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee

Przed wykonaniem badań molekularnych	Po badaniu molekularnym i ponownej ocenie klinicznej
EB simplex	EB dystroficzny (łagodny)
EB łączący	EB dystroficzny
EB dystroficzny	EB łączący
Zespół Nethertona	Zespół KID
Zespół Nethertona	nonbullous congenital ichthyosiform erythroderma (NBCIE)
Undefined ichthyosis	Zespół Nethertona
Proteinoza lipidowa	AZS, celiakia, astma
EB simplex	APSS

Dziewczynka, 17l., z rozpoznaniem rybiej łuski: ABCA12: p.Asn2034Asp/p.Asn1380Ser , FLG: p.Arg2447Ter/-

Chłopiec 21m., z rozpoznaniem Zespołu Nethertona: ALOX12B: p.Ser698Arg/p.Tyr521Cys, FLG: p.Ser761CysfsTer36/-

