

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



Badania molekularne w diagnostyce galaktozemii

Katarzyna Wertheim-Tysarowska

Zakład Genetyki Medycznej
Instytut Matki i Dziecka

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



Galaktozemia

=

galaktoza we krwi



Fundusze
Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska



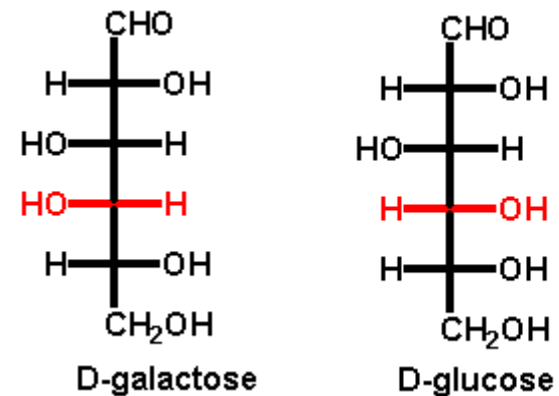
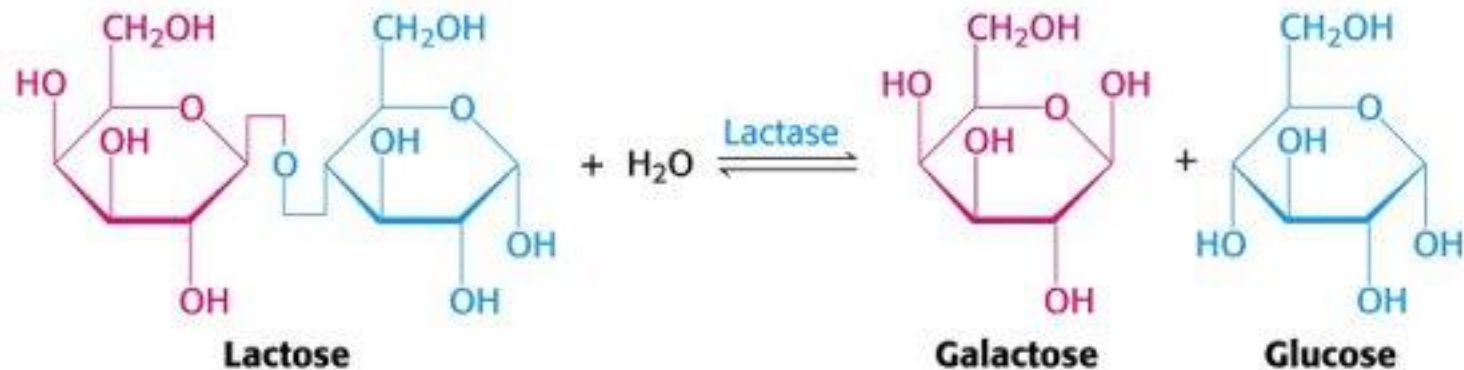
Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



edu-metgen.imid.med.pl

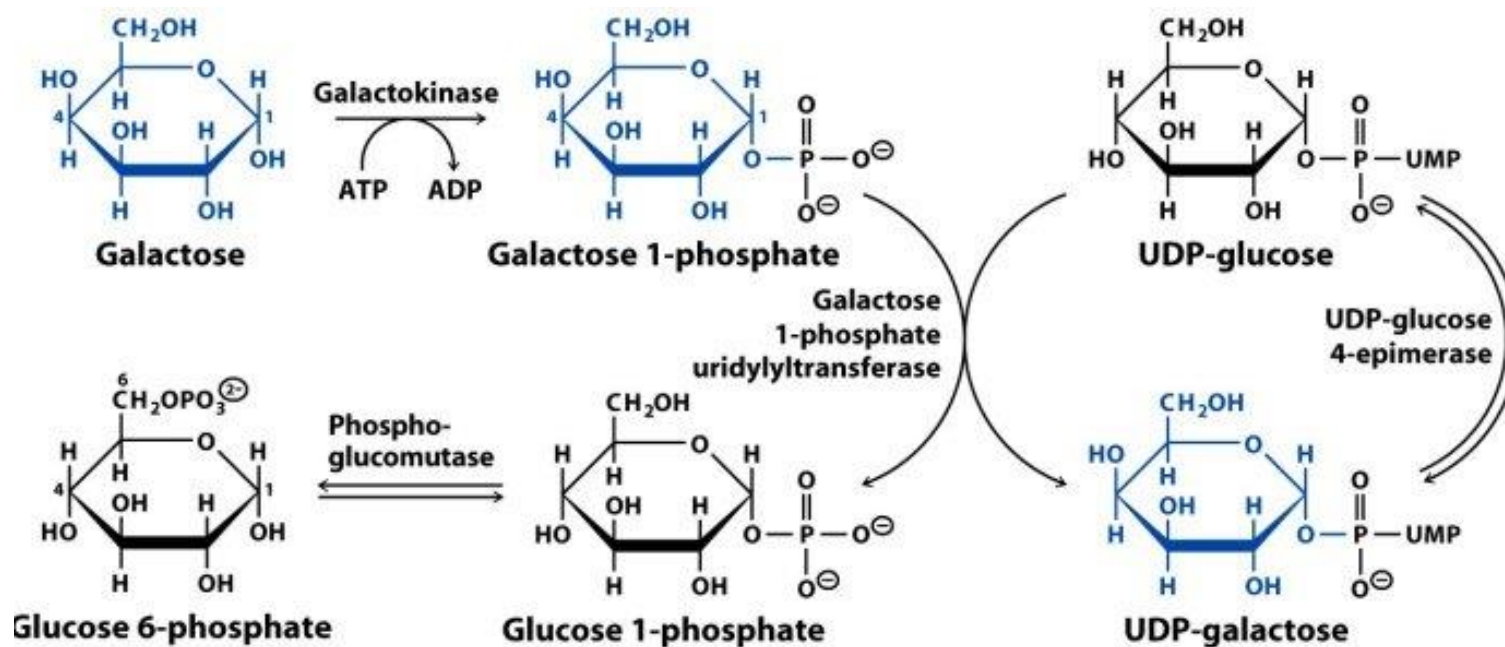
Laktoza = galaktoza + glukoza



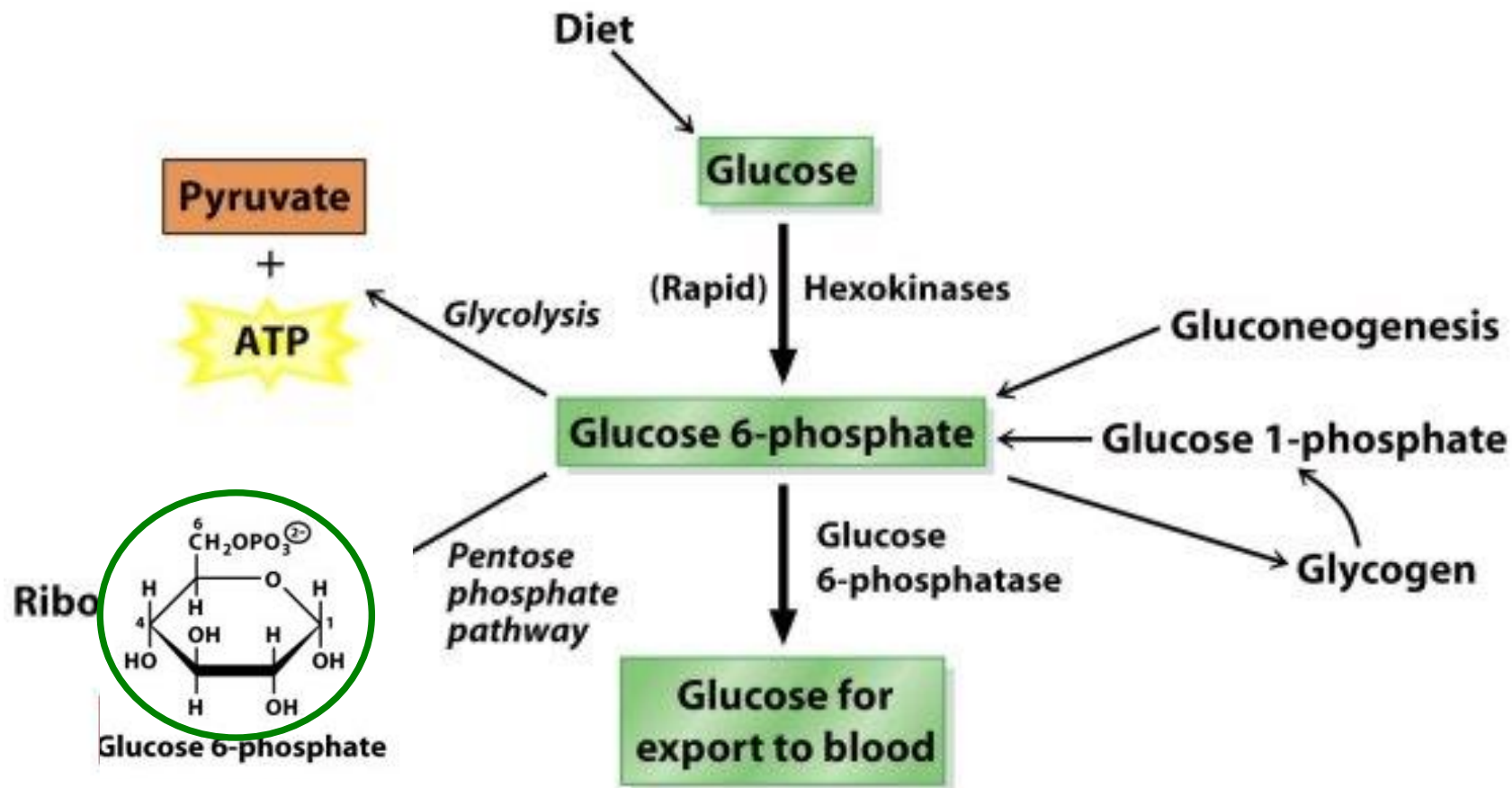
HISTORIA

- 1908 - pierwsze doniesienie o galaktozemii - Von Ruess, "Sugar Excretion in Infancy,".
- 1917 - Goppert, F. : Galaktosurie nach Milchzuckergabe bei angeborenem, familiaerem chronischem Leberleiden. Klin. Wschr. 54: 473-477, 1917.
- 1956 - udowodniono , iż w galaktozemii gromadzi się galaktozo-1-fosforan
- 1956 – za wystąpienie objawów choroby odpowiedzialny jest niedobór enzymu GALT
- 1990 - identyfikacja pierwszej mutacji w genie *GALT*

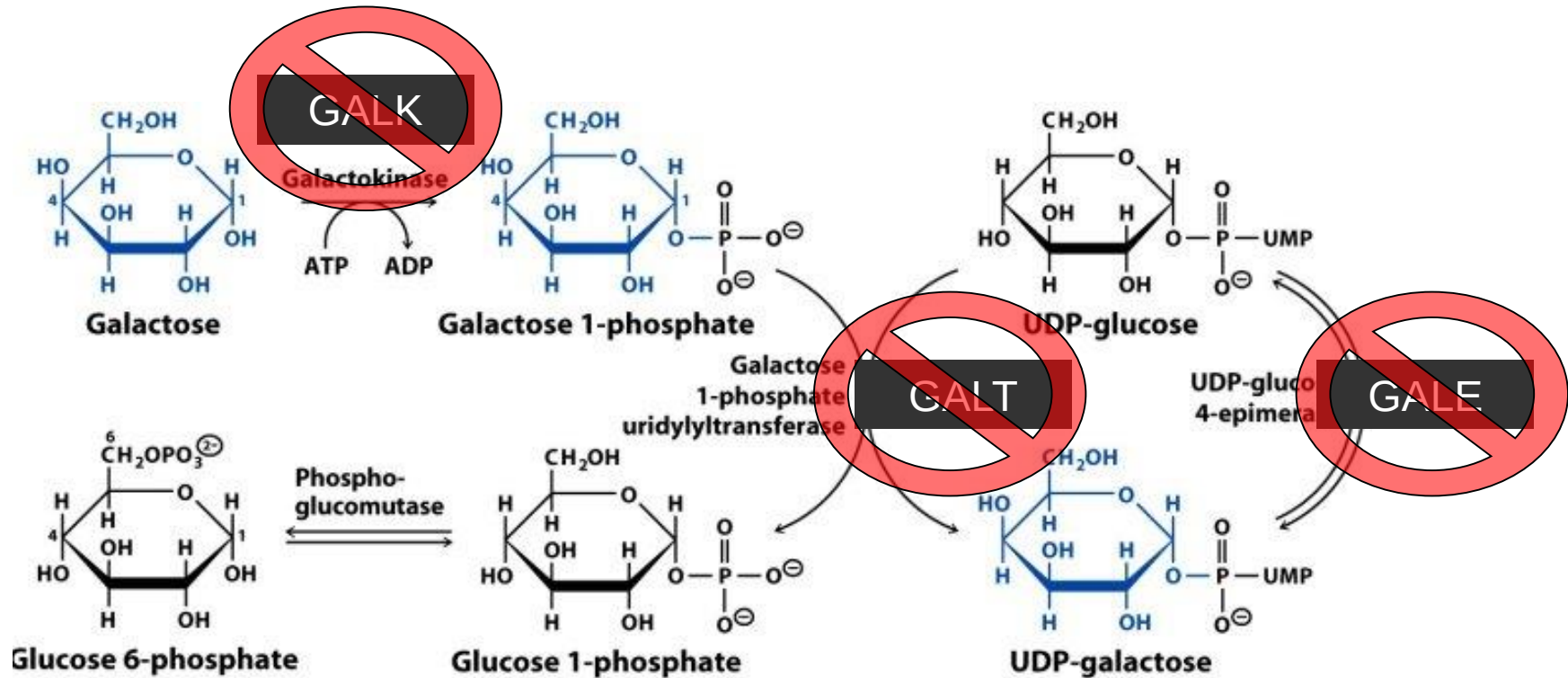
Metabolizm galaktozy – szlak Leloir'a



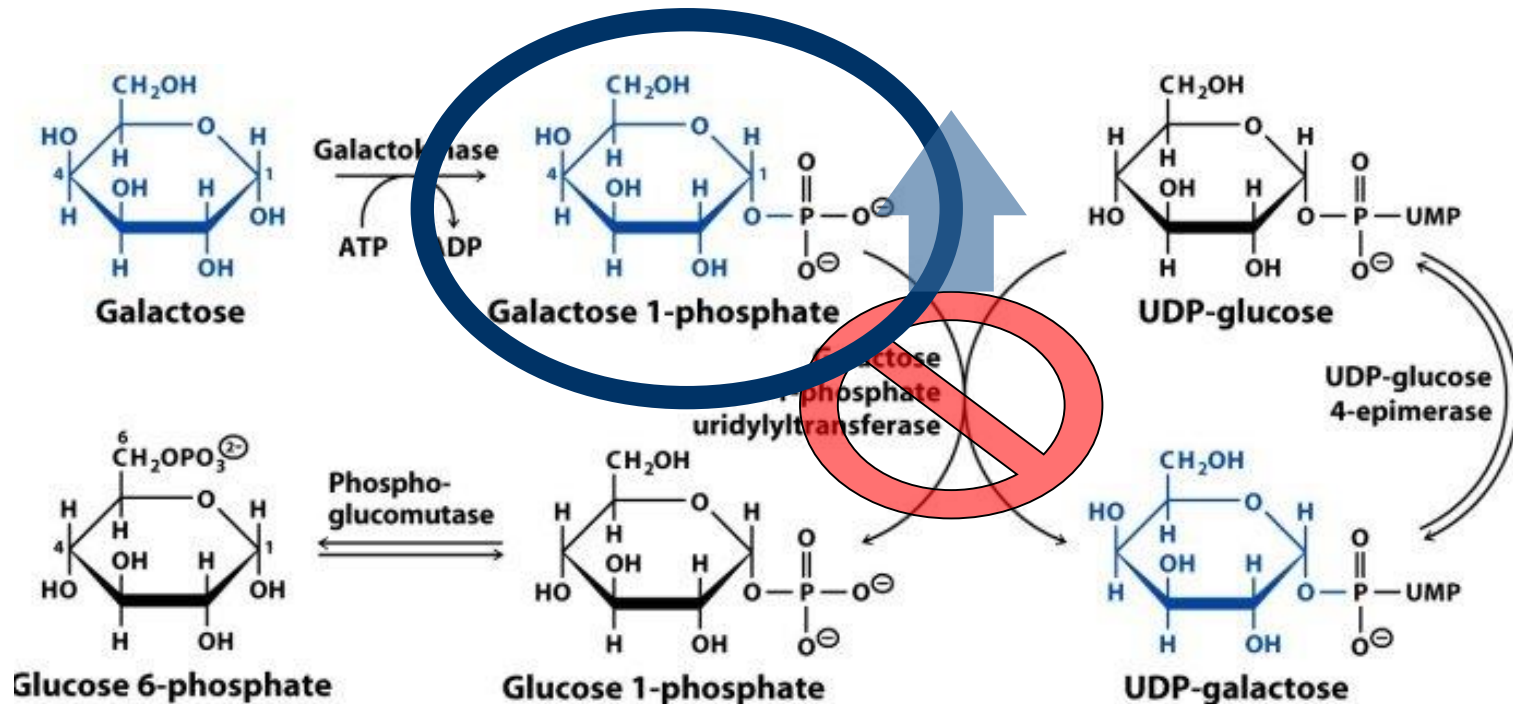
Metabolizm galaktozy cd.



Galaktozemia – deficyt enzymów związanych z przemianami galaktozy



Galaktozemia klasyczna



**BRAK / ZNACZĄCE OBNIŻENIE AKTYWNOŚCI
URYDYLILOTRANSFERAZY GALAKTOZO-1-FOSFORANOWEJ**

Główne objawy galaktozemii występujące u noworodków - po rozpoczęciu karmienia mlekiem – zwykle w pierwszych dniach życia

wymioty

biegunka

żółtaczka

zaburzenia funkcji wątroby

sepsa

niewydolność nerek i wątroby

ZGON

DIAGNOSTYKA !!!!!!!!!!!

ODSTAWIENIE LAKTOZY!!!!!!!!!!!!!!

Główne objawy galaktozemii występujące u noworodków - po rozpoczęciu karmienia mlekiem –zwykle w pierwszych dniach życia

Uszkodzenie wątroby

hepatomegalia
nieprawidłowe próby wątrobowe
żółtaczka
zaburzenia krzepnięcia krwi
wodobrzusze

Splenomegalia

Objawy ogólne

Wymioty
biegunka
Niedożywienie
Brak łaknienia
Senność/letarg
Spadek masy ciała

Uszkodzenie nerek

Zaćma wrodzona

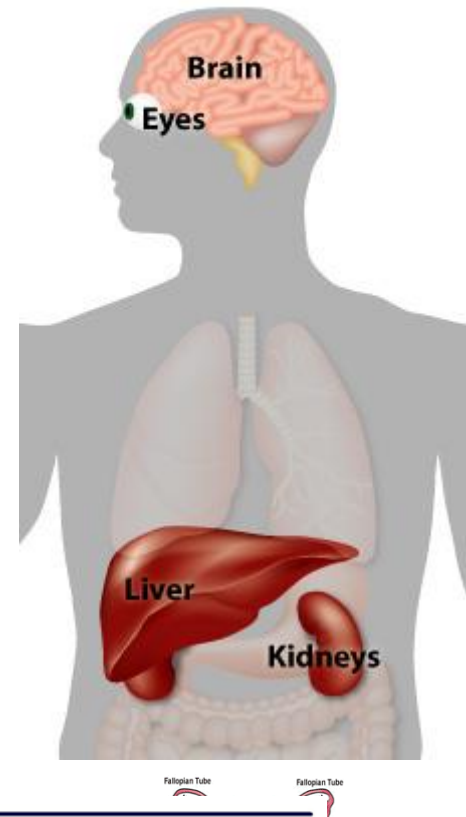
Sepsa – często *E. coli*



Późne powikłania galaktozemii

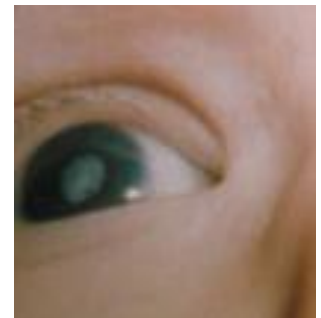
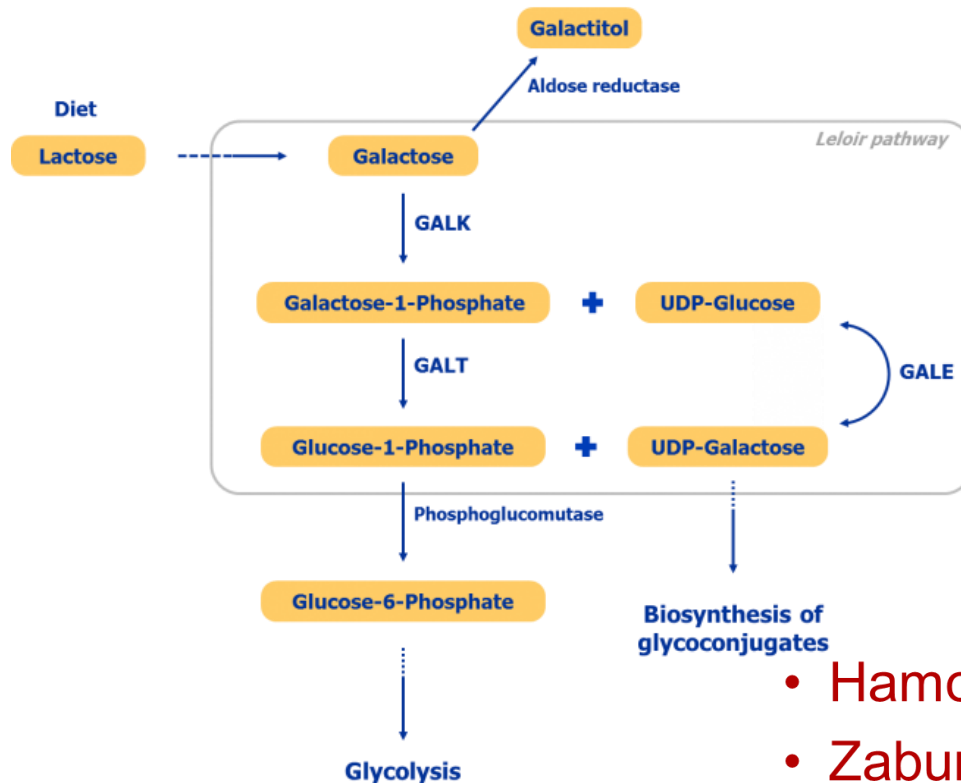
- Niepełnosprawność intelektualna
- Zaburzenia mowy
- Objawy neurologiczne
 - drżenia i ataksje
- Niewydolność jajników
- Spowolnienie wzrostu
- Zaćma

Organs Affected by Galactosemia



Patogeneza galaktozemii

- Efekt nagromadzenia się galaktozy i jej pochodnych w ilościach toksycznych



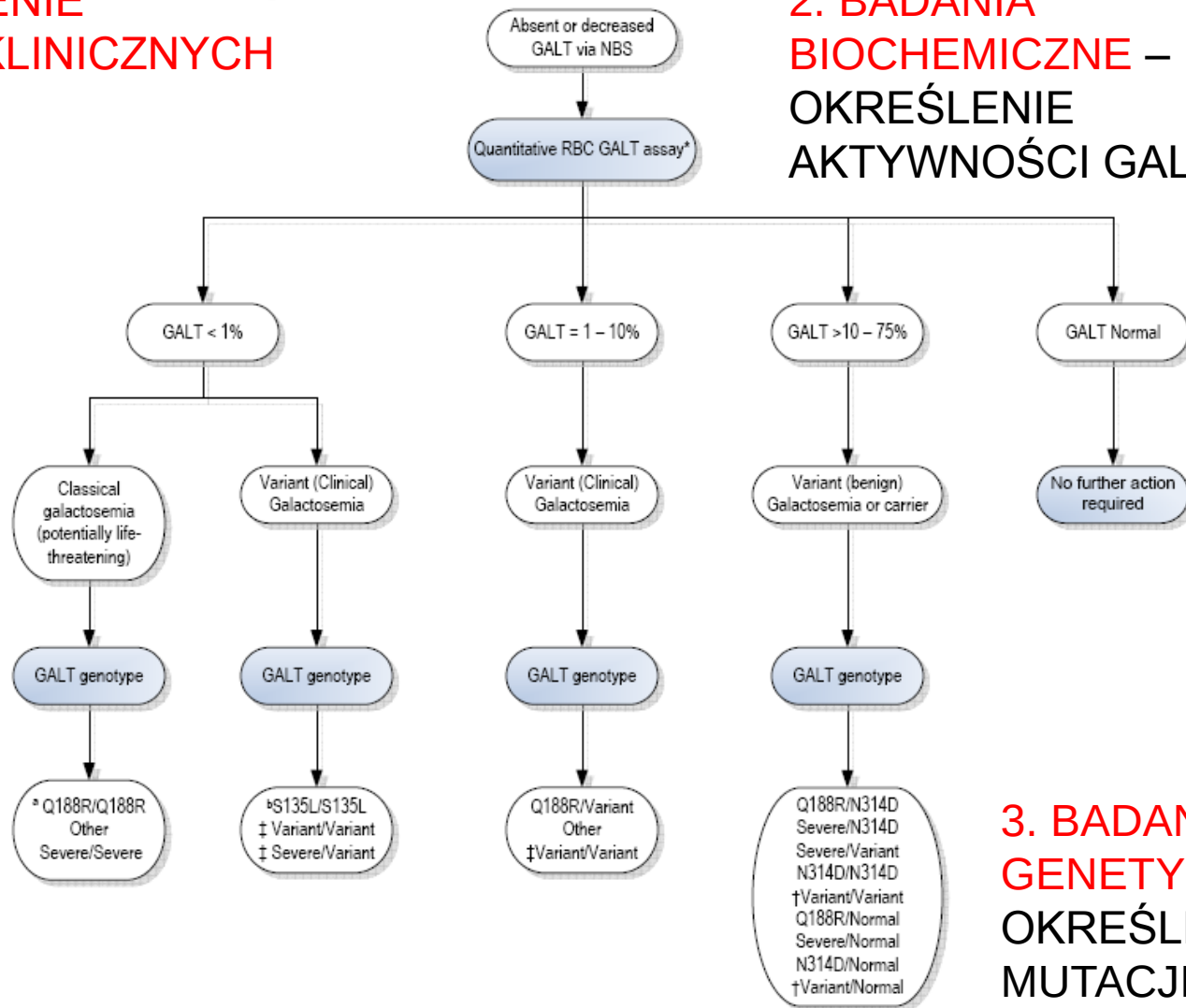
- Hamowanie enzymów glikolizy
- Zaburzenia galaktozydacji glikoprotein i glikolipidów



Galactosemia (GALT Deficiency)

1. WYSTĄPIENIE OBJAWÓW KLINICZNYCH

2. BADANIA BIOCHEMICZNE – OKREŚLENIE AKTYWNOŚCI GALT

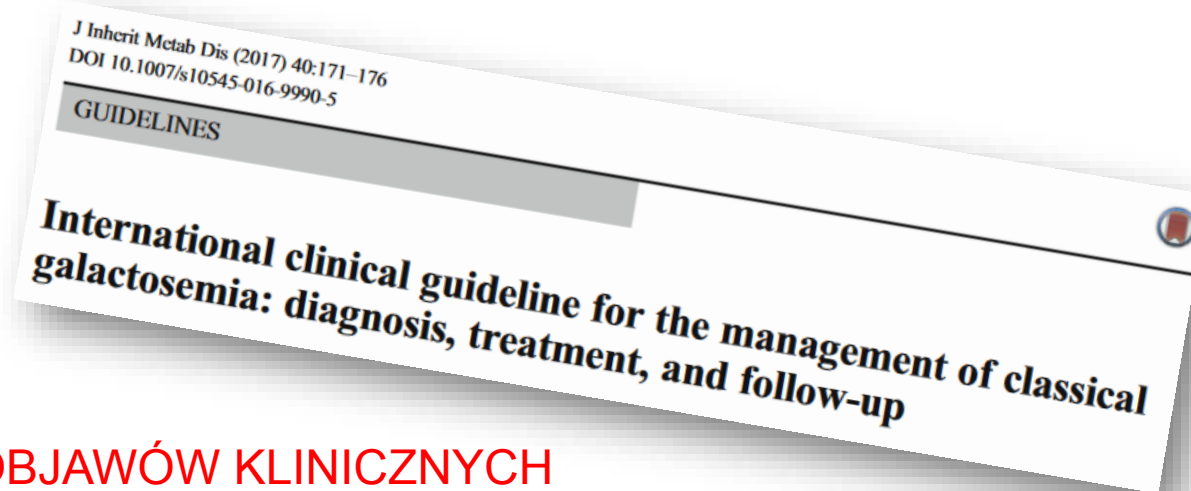


3. BADANIA GENETYCZNE – OKREŚLENIE MUTACJI W GENIE GALT



DIAGNOZA GALAKTOZEMII

1. WYSTĄPIENIE OBJAWÓW KLINICZNYCH
2. BADANIA BIOCHEMICZNE – OKREŚLENIE AKTYWNOŚCI GALT
- + 3. BADANIA GENETYCZNE - IDENTYFIKACJA PATOGENNYCH MUTACJI W GENIE *GALT* I POTWIERDZENIE ICH OBURODZICIELSKIEGO POCHODZENIA



1. WYSTĄPIENIE OBJAWÓW KLINICZNYCH
2. BADANIA GENETYCZNE – IDENTYFIKACJA ZNANYCH PATOGENNYCH MUTACJI W GENIE *GALT* I POTWIERDZENIE ICH OBURODZICIELSKIEGO POCHODZENIA

Badania biochemiczne

- Aktywność GALT
- Poziom galaktozo-1-fosforanu w erytrocytach
- Poziom całkowitej galaktozy we krwi
- Poziom galaktitolu w moczu
- Poziom 25-hydroksywitaminy D

Terapia Galaktozemii

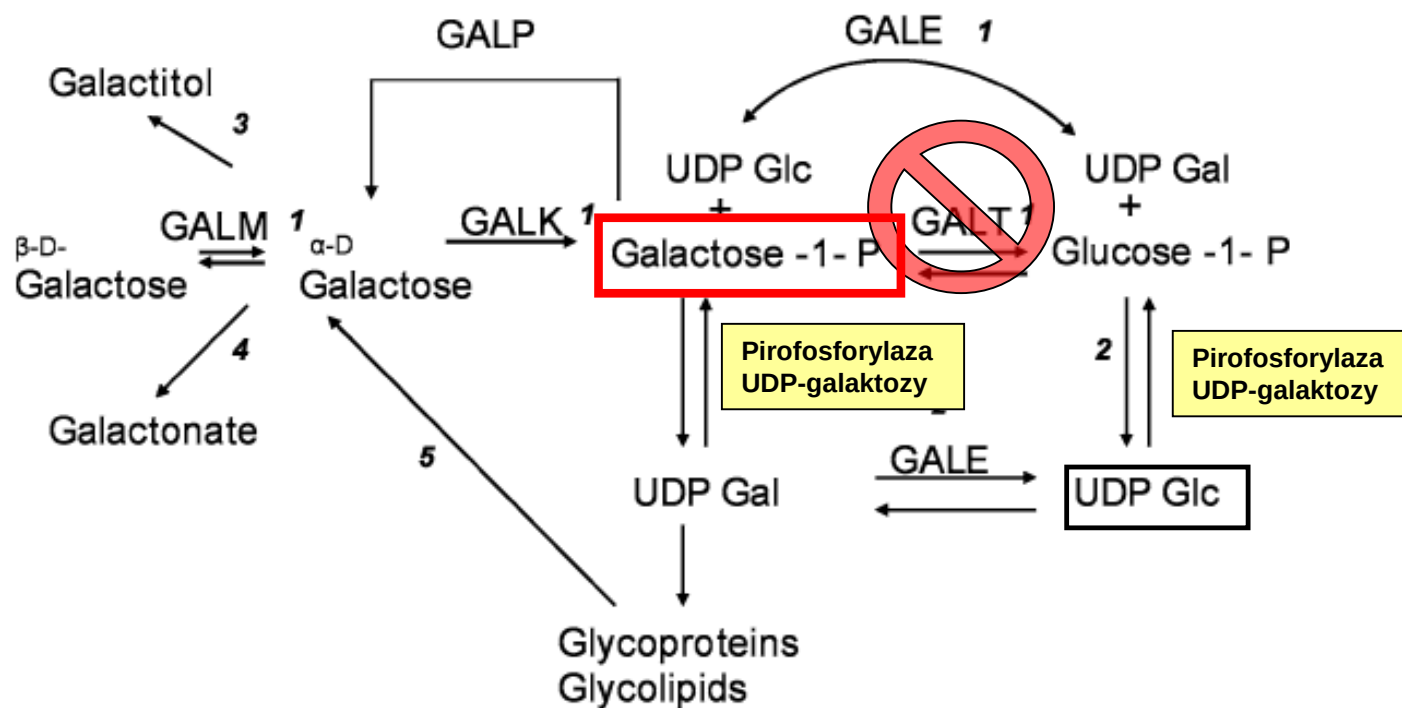
– taka sama od 1965r.

- Dieta
- Suplementacja wapnia

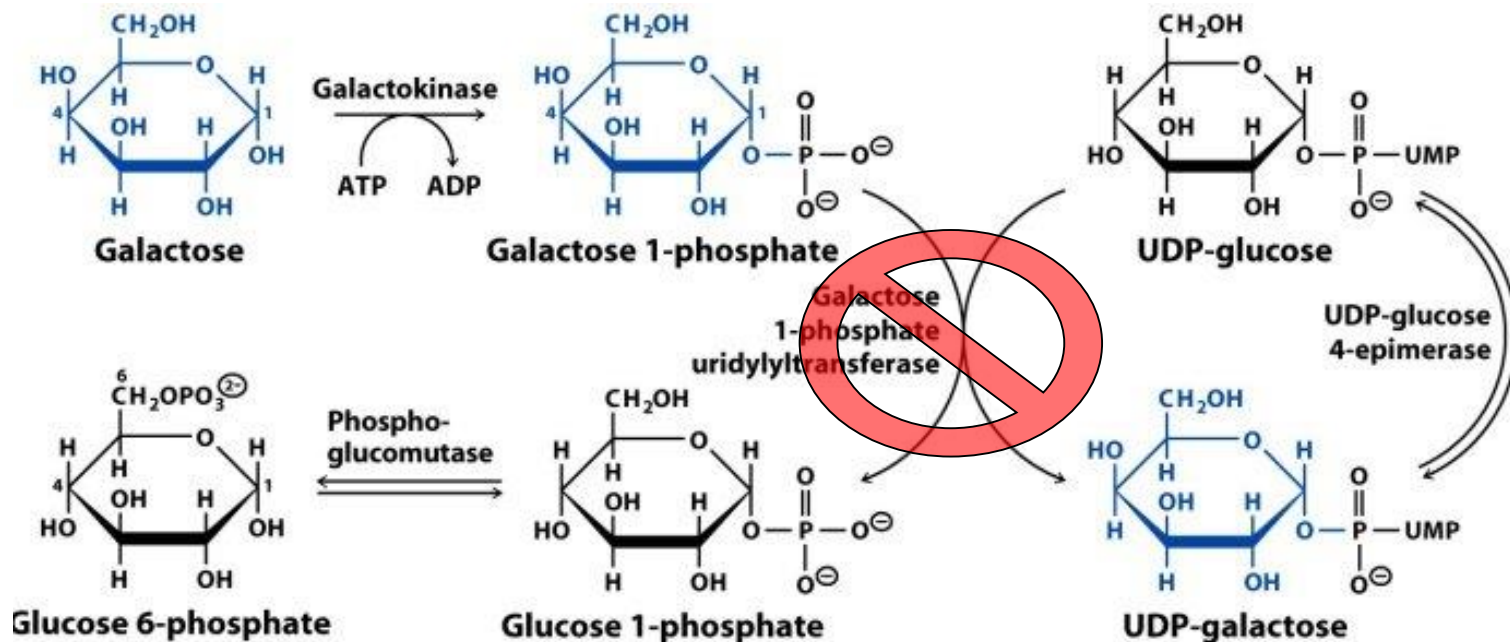
Terapia Galaktozemii – taka sama od 1965r.

- Dieta

PROBLEM! – endogenna produkcja galaktozy (1,0 g/dobę)

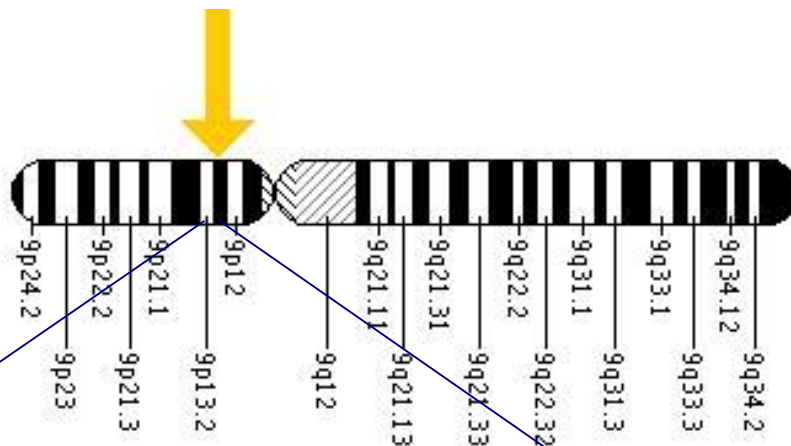


Galaktozemia klasyczna



- AR
- Mutacje w genie *GALT*
- 1/480 – w populacji Irland's Travellers
- 1-30 000/55 000 – populacja kaukaska
- 1/1 000 000 – u Japończyków

- 11 eksonów
- 4,3 kb
- 379 aminokwasów



GALT Database

- Reference sequences were M96264.1 and cDNA M60091.1. cDNA number 1 is the "A" of the start codon.
- Frameshift is documented by the original amino acid followed by the codon number and "fs" (ex. Leu159 fs).
- Click any **Column Header** to sort the display. Mouse over **Comments** icon for additional details.
- "Live Search" any term in the search box, such as "exon", "missense", "benign", etc...

- GALT Home
- GALT Database
- GALT Links
- GALT Submissions

336 variants found

Search:

Location	Mutation Type	Nucleotide Change	Protein Change	Classification	References	Comments
Entire Gene	Large Deletion			Pathogenic	Papachristoforou et. al. 2013	
Entire Gene	Large Deletion	NULL	NULL	Pathogenic	Papachristoforou et. al. 2013	
5kb	Gene Deletion	5kb del		Pathogenic	Berry (2001)	
HUMAN MUTATION 28(10), 939-943, 2007				Pathogenic	Coffee (2006)	
				Mild	Kozak (1999)	
				Pathogenic	University of Bristol, unpublished	
				Pathogenic	Zaffanello (2005)	
				Pathogenic	Gort (2009)	

DATABASES

Mutation Database for the Galactose-1-Phosphate Uridyltransferase (GALT) Gene

Rodzaje mutacji genu *GALT*

Type	Sequence variants
Missense	144
Nonsense	15
Splicing	10
Deletions	17
Insertions	6
Indels	2
Gene deletions	2
Polymorphisms	31
Unknown/uncertain significance	2
Number of reported variants	229



Fernanda R.O. Calderon i wsp. HUMAN MUTATION 28(10), 2007

Częstość mutacji genu *GALT* w Europie

Table 2. Reported Allelic Frequencies of *GALT* Mutations in Europe

Country	Reference	p.M142K	p.Q188R	p.L195P	p.K285N	p.N314D	p.N314D p.L218L	p.L218L p.E340X	p.A320T
The Netherlands	this study	0.5%	58.5%	7.1%	2.4%	0.9%	1.4%	0.9%	0.5%
Ireland	Murphy et al 1999		overall 93.6% Travellers 100% non-Travellers 89.1%						
Czech and Slovak Republics	Kozák et al 1999		46%	4.1%	25.7%	6.8% *			
Hungary	Horváth et al 2000		33.3%			11.1% **			
Poland	Żekanowski et al 1999		51.3%		33.8%				1.25%
Austria	Greber-Platzer et al 1997		60%		28%				
Germany	Podskarbi et al 1997		64.5%		9%				
Turkey	Seyrantepe et al 1999	3%	57%		6%		6%		3%
Italy	Maceratesi		18%						

Bosh, Human Mutation, 2005

Rodzaje alleli genu *GALT*

<u>Allel</u>	<u>Symbol</u>	<u>Poziom aktywności białka</u>
Prawidłowy- dzika forma białka	N	100%
Z mutacją powodującą Galactosemię- upośledzona aktywność GALT	g	0-10%

Rodzaje alleli genu *GALT*

<u>Allel</u>	<u>Symbol</u>	<u>Poziom aktywności białka</u>
Prawidłowy- dzika forma białka	N	100%
Z mutacją powodującą Galactosemię- upośledzona aktywność GALT	g	0-10%
Wariant Duarte – częściowo zachowana aktywność GALT	D lub D₂	50%
Wariant Los Angeles –GALT wykazujący wyższą aktywność niż dzika forma białka	LA lub D₁	125%

Wariant Duarte (D lub D2)

50% aktywności



c.-116_-119delGTCA

Ekson 10 p.N314D c.940A>G

Delecja w rejonie promotorowym
– obniżenie ekspresji genu

Nosicielstwo: 1/20
zdrowych osób w
Niemczech

Wariant Los Angeles (LA lub D1)

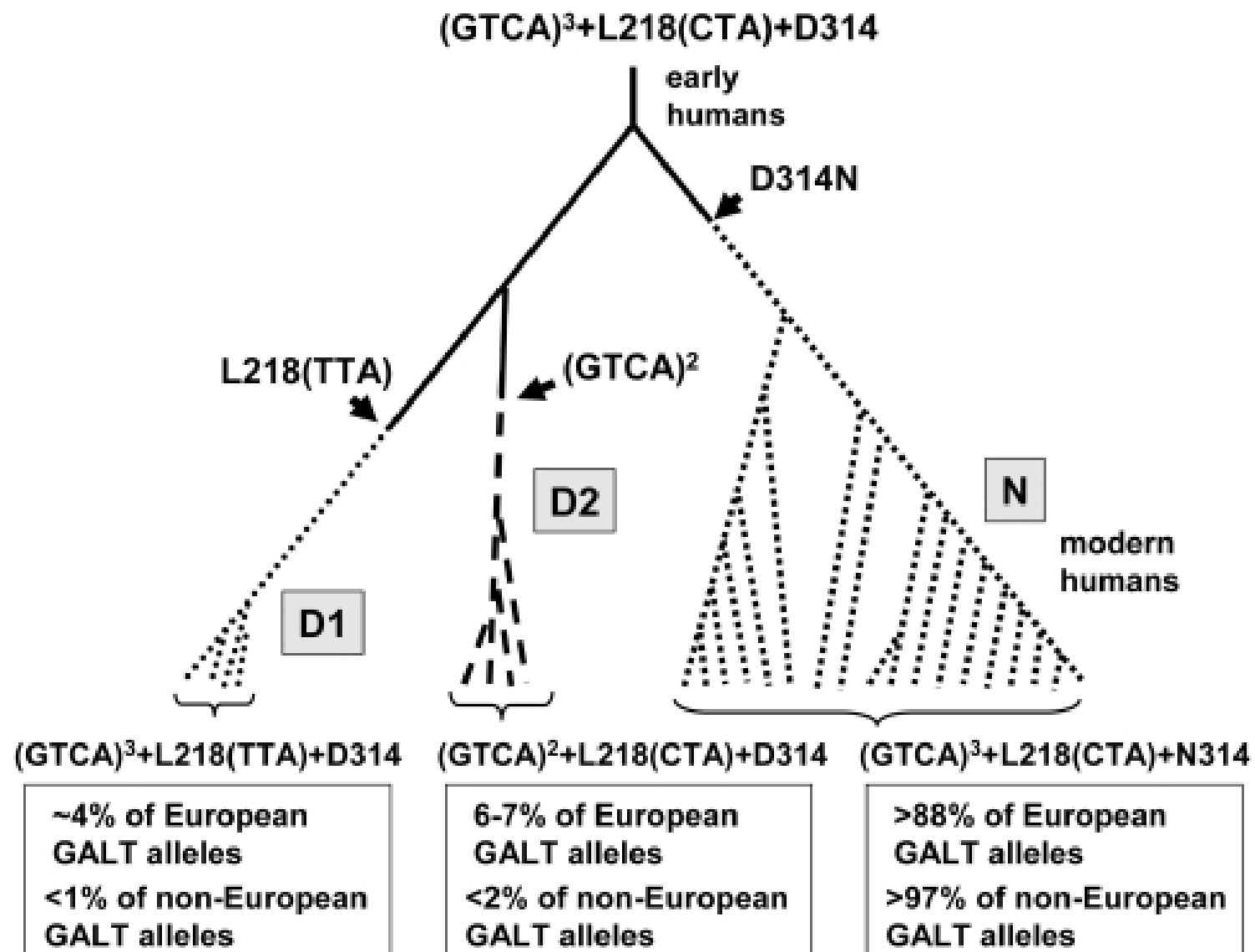
125% aktywności



**Ekson 7 p.L218L
c.652C>T**

Ekson 10 p.N314D c.940A>G

Nosicielstwo: 1/10
zdrowych osób w
Niemczech



Origins, distribution and expression of the Duarte-2 (D2) allele of galactose-1-phosphate uridylyltransferase, Hum Mol Genet, 2009, 18,9

Kombinacje alleli i ich efekt fenotypowy

	Genotype (gene pair)	Diagnosis	GALT enzyme Activity	GALT enzyme function	Clinical Management
2 normal genes	NN	Normal	100%	Normal	None
2 nonfunctioning genes	gg	Classical Galactosemia	0%	Absent	Diet, specialized medical care
2 Duarte genes	DD		50%	Reduced	None
Combinations:	Ng	Galactosemia gene carrier	50%	Reduced	None
	ND		75%	Slightly reduced	None
	Dg	Duarte Galactosemia	5-20%	Greatly	Diet
	NLA		112%	Above normal	None
	LAg		62%	Slightly reduced	None

Kombinacje alleli i ich efekt fenotypowy

	Genotype (gene pair)	Diagnosis	GALT enzyme Activity	GALT enzyme function	Clinical Management
2 normal genes	NN	Normal	100%	Normal	None
2 nonfunctioning genes	gg	Classical Galactosemia	0%	Absent	Diet, specialized medical care
2 Duarte genes	DD		50%	Reduced	None
Combinations:	Ng	Galactosemia gene carrier	50%	Reduced	None
	ND		75%	Slightly reduced	None
	Dg	Duarte Galactosemia	5-20%	Greatly	Diet ?
	NLA		112%	Above normal	None
	LA_g		62%	Slightly reduced	None

J Inherit Metab Dis (2017) 40:171–176
DOI 10.1007/s10545-016-9990-5



GUIDELINES

International clinical guideline for the management of classical galactosemia: diagnosis, treatment, and follow-up

Lindsey
François
Cynthia
Anita N
Nancy I
Eileen I
On behalf of the Galactosemia Treatment Group



Rzeczpospolita
Polska



Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



edu-metgen.imid.med.pl

	N	g
g	Ng	gg
N	NN	Ng

25% chorych, 50% nosicieli,
25% zdrowych

	D	D
g	Dg	Dg
N	DN	DN

50% chorych 50% nosicieli

Genotype (gene pair)	Diagnosis	GALT enzyme Activity	GALT enzyme function	Clinical Management
NN	Normal	100%	Normal	None
gg	Classical Galactosemia	0%	Absent	Diet, specialized medical care
DD		50%	Reduced	None
Ng	Galactosemia gene carrier	50%	Reduced	None
ND		75%	Slightly reduced	None
Dg	Duarte Galactosemia	5-20%	Greatly	Diet
NLA		112%	Above normal	None
LA _g		62%	Slightly reduced	None

Badania molekularne

1. analiza najczęściej występujących mutacji w populacji polskiej
2. analiza pozostałych eksonów
3. badanie nosicielstwa u rodziców

NM_000155.3

Gene symbol: **GALT**

Extended cDNA

Database: [Gross deletions](#) - information regarding the nature and location of each lesion is logged in narrative form because of the extremely variable quality of the original data reported. There are currently 8 mutations available in this category.

Missense/nonsense	Splicing	Regulatory	Small deletions	Small insertions	Small indels	Gross deletions	Gross insertions
251 mutations	27 mutations	No mutations	24 mutations	5 mutations	3 mutations	8 mutations	No mutations

HGMD accession	DNA level	Description	Variant class	Reported phenotype	Reference
CG015540	gDNA	>5 kb, ex. 1-10	DM	Galactosaemia	Emory (2001) GALT L SDB Unpublished.
CG015538	gDNA	38 bp., nt. 290-328	DM	Galactosaemia	Emory (2001) GALT L SDB Unpublished.
CG015539	gDNA	5 kb, 5' UTR - ex. 11	DM	Galactosaemia	Berry (2001) Mol Genet Metab 72, 316
CG067928	gDNA	5458 bp, entire gene	DM	Galactosaemia	Coffee (2006) Genet Med 8, 635
CG138840	gDNA	8.5 kb incl. entire gene + part of IL11RA	DM	Galactosaemia	Papachristoforou (2013) JIMD Rep epub, epub
CG129671	gDNA	c.569_593	DM	Galactosaemia	Boutron (2012) Mol Genet Metab 107, 438
CG052698	gDNA	ex. 1-11	DM	Galactosaemia	Boesch (2005) Hum Mutat 25, 502
CG066469	gDNA	IVS4+53_IVS10+87	DM	Galactosaemia	Gort (2006) J Inheret Metab Dis 29, 739



Mutation spectrum in the French cohort of galactosemic patients and structural simulation of 27 novel missense variations

Audrey Boutron ^a, Anna Marabotti ^{b,1}, Angelo Facciano ^{b,1}, David Cheillan ^c, Mokhtar Zater ^a, Christophe Oliveira ^a, Catherine Costa ^d, Philippe Labrune ^{e,f}, Michèle Brivet ^{a,*}
and French Galactosemia Working Group ²

^a Biochimie – Hôpital de Bicêtre, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, APHP-Paris, France

^b Laboratory of Bioinformatics and Computational Biology, Institute of Food Science-CNR, Via Roma, 64, 83100 Avellino, Italy

^c Service des Maladies Hérititaires du Métabolisme et Dépistage Néonatal – Centre de Biologie Est, Hospices Civils de Lyon, Bron, France

^d UF de génétique-Biochimie-Hôpital Henri Mondor, APHP-Paris, France

^e Centre de Référence des Maladies Hérititaires du métabolisme hépatique, Pédiatrie – Hôpital Antoine Beclère, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, APHP-Paris, France

^f Université Paris Sud, France

[13,32] c.997 C>T Ex10 4 p.Arg333Trp

This study c.998 G>T Ex10 1 p.Arg333Leu

This study c.1009 G>A Ex10 3 p.Val337Ile

This study c.1016A>G Ex10 1 p.Tyr339Cys

[33] c.1018G>A Ex10 1 p.Glu340Lys

This study c.1036 C>A Ex10 2 p.Gln346Lys

[38] c.1075 A>T Ex10 1 p.Arg359Trp

This study c.1014C>G Ex10 1 p.Gly338Gly

Nonsense variations

This study c.122G>A Ex 2 1 p.Trp41Ter

This study c.367C>T Ex 4 2 p.Arg123Ter

Structure impact	Genotypes	Age year	Sex	Clinical phenotype
Local				
Local	W300C/M142K			
High	H319Q/Q188R	<1	M	Undetermined
High	P325L/K285N	26	M	Severe ^{EXP}
High	R328C/Q188R	25	F	Severe ^{EXP}
High	R333W/Q188R	1	F	Undetermined
	R333W/Q188R	6	F	Severe ^{EXP}
	R333W/Q188R	28	M	Severe ^{EXP}
	R333W/Q188R	37	M	Mild ^{DIS}
Local	R333L/K285N	39	M	Severe ^{EXP}
High	V337I/Q188R	23	F	Mild ^{DIS}
	V337I/L195P	18	F	Severe ^{EXP}
	V337I/Y221H			
High	Y339C–N314D/K285N	14	M	Severe ^{EXP}
High	E340K–N314D/Q188R	6	M	Mild ^{DIS}
High	Q346K/Q346K	2	F	Undetermined
Local	R359W/Q188R	9	M	Severe ^{EXP}
High	G338G/K285N	7	M	Severe ^{EXP}
High	W41*/Q188R	4	M	Severe ^{EXP}
High	R123*/Q188R	6	M	Undetermined
	R123*–L218L–N314D/Q188R	18	M	Undetermined

- a deep intronic variation (c.687+66T>A) was found in a patient heterozygous for the p.Lys285Asn mutation thanks to the ability to analyse large intronic regions (more than 150 bp away from exon boundaries) with a long range PCR template.
- DNA of an Ashkenasi female patient, homozygous for p.Gln188Arg variation, was analyzed by LR-PCR because the p.Gln188Arg variation was not found in her father's DNA. Agarose gel electrophoresis of *GALT* LR-PCR products showed the presence of both a normal and a grossly deleted alleles in the proband and her father (Supplemental Fig. S1A). The deletion breakpoints were identified by co-

A missplicing effect was ruled out for p.Arg67His, p.Phe131Ser, p.Val168Met, p.Ala191Asp, p.Leu218Pro and p.Arg272His missense vari-

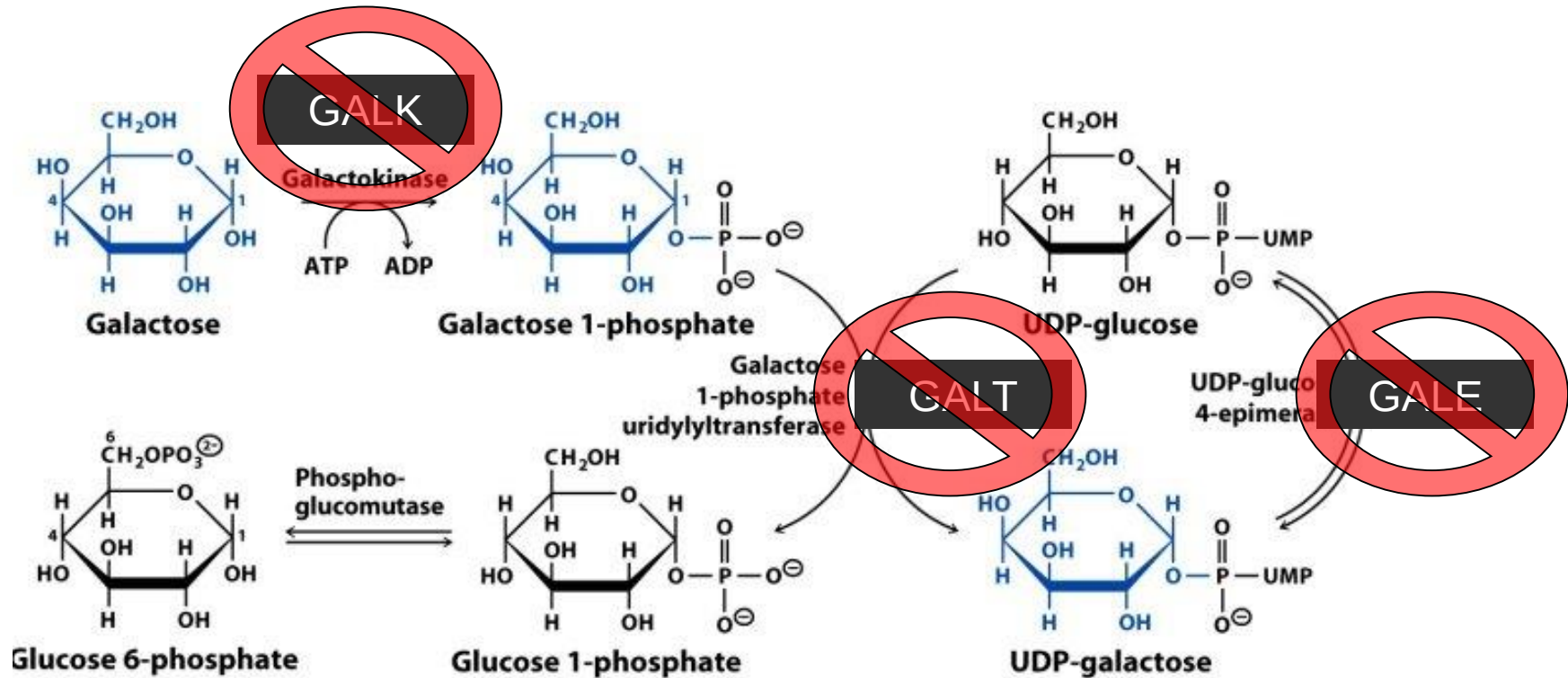
18

This study	c.1016A>G	Ex10	1	p.Tyr339Cys	High	Y339C–N314D/K285N	14	M	Severe ^{EXP}
[33]	c.1018G>A	Ex10	1	p.Glu340Lys	High	E340K–N314D/Q188R	6	M	Mild ^{DIS}
This study	c.1036 C>A	Ex10	2	p.Gln346Lys	High	Q346K/Q346K	2	F	Undetermined
[38]	c.1075 A>T	Ex10	1	p.Arg359Trp	Local	R359W/Q188R	9	M	Severe ^{EXP}
Nonsense variations									
This study	c.1014C>G	Ex10	1	p.Gly338Gly	High	G338G/K285N	7	M	Severe ^{EXP}
This study	c.122G>A	Ex 2	1	p.Trp41Ter	High	W41*/Q188R	4	M	Severe ^{EXP}
This study	c.367C>T	Ex 4	2	p.Arg123Ter	High	R123*/Q188R	6	M	Undetermined
						R123*–L218L–N314D /Q188R	18	M	Undetermined

Identyfikacja mutacji

- Weryfikacja rozpoznania klinicznego
- Pozwala na określenie nosicielstwa mutacji w rodzinie
- Określenie ryzyka urodzenia kolejnego dziecka z galaktozemią

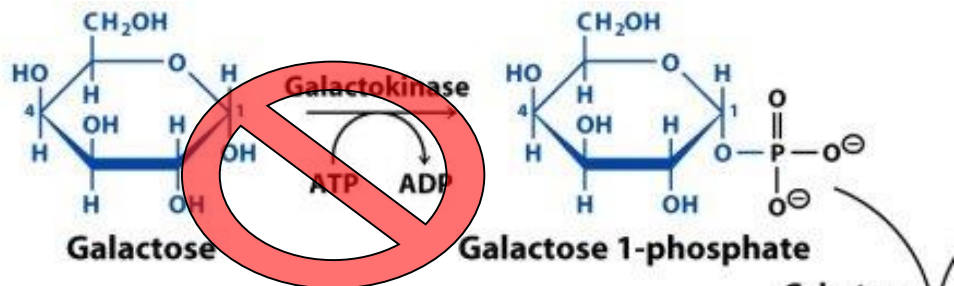
Galaktozemia – deficyt enzymów związanych z przemianami galaktozy



Galaktokinaza – GALK

Galaktozemia typu II

- Zaćma



- Brak uszkodzenia wątroby, nerek i OUN
- Znanych około 20 mutacji
- 1/ 50 000-100 000 ż.u. (Cyganie Bułgarscy – 1/10 000) (P28T – powstała około 750 lat temu)

Epimeraza (GALE)

Galaktozemia typu III

- Trzy postaci choroby – uogólniona – o ciężkim przebiegu i obwodowa – o przebiegu łagodnym oraz pośrednia
- Znanych jest 12 mutacji
- Objawy w postaci uogólnionej jak w przypadku Galaktozemia klasycznej, ale z zachowaną aktywnością GALT
- Postać obwodowa 1/64000 (U Afroamerykanów 1/6200), postać uogólniona – b.d.

DZIĘKUJĘ ZA UWAGĘ