



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM

Podstawowe zasady interpretacji wyników badań genetycznych i klasyfikacji wariantów.

Podstawowe pojęcia, modele dziedziczenia, ACMG

dr n med. Anna Madetko-Talowska
Zakład Genetyki Medycznej UJCM

Diagnostyka prenatalna

Wyniki badań wysokoprzepustowych (aCGH, WES) mogą powodować **trudności w interpretacji!**

Przed pobraniem materiału należy poinformować pacjentkę o **znaczeniu wyniku** jaki uzyska jak również o ograniczeniach metody.



Proponując dany test diagnostyczny należy poinformować pacjentkę o możliwej konieczności wykonywania badań genetycznych u niej oraz jej partnera i **zadbać o dostępność** takiej diagnostyki.

**REKOMENDACJE POLSKIEGO TOWARZYSTWA GINEKOLOGÓW I
POŁOŻNIKÓW ORAZ POLSKIEGO TOWARZYSTWA GENETYKI
CZŁOWIEKA DOTYCZĄCE BADAŃ PRZESIEWOWYCH ORAZ
DIAGNOSTYCZNYCH BADAŃ GENETYCZNYCH WYKONYWANYCH W
OKRESIE PRENATALNYM 2022**

ptgc



Po co nam tyle testów i jak się zabrać do interpretacji wyników...



Warianty genowe

Zmiany w obrębie jednego genu (na poziomie sekwencji zasad nukleinowych), mogą prowadzić do powstania nowych alleli. Warianty dotyczące tylko jednej zasady nukleinowej to **warianty pojedynczych nukleotydów (SNV)**.



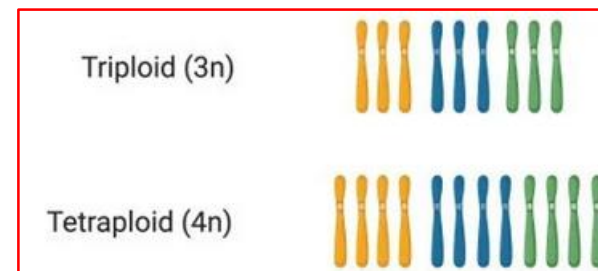
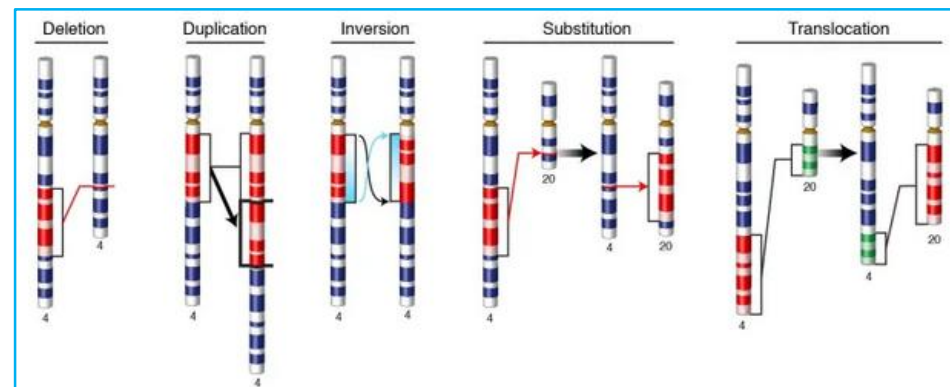
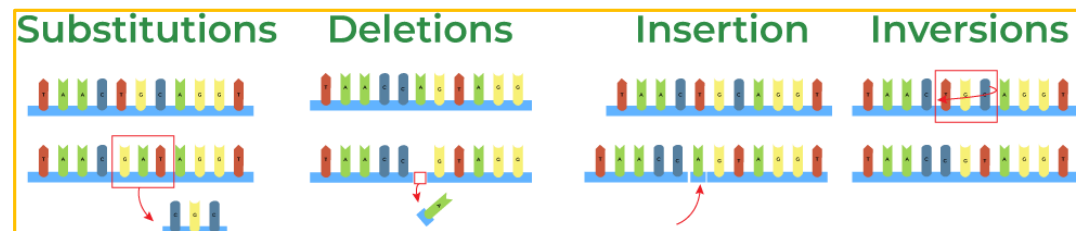
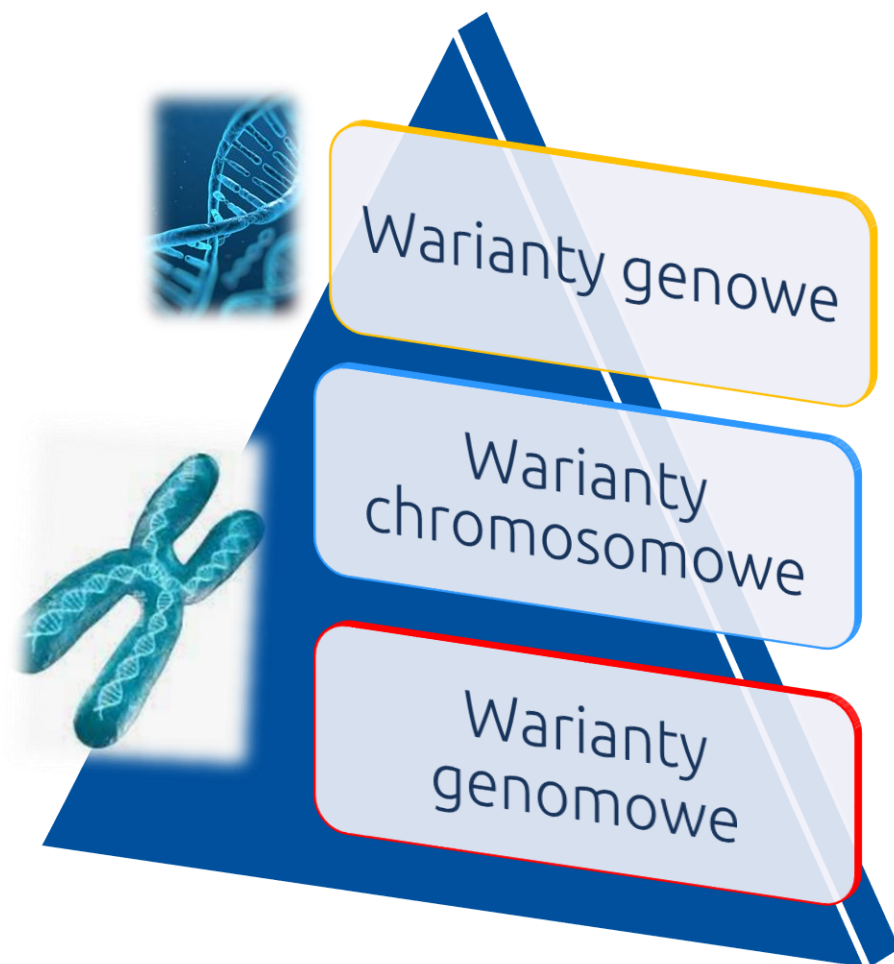
Warianty chromosomowe

Dotyczą zmian w strukturze chromosomów - **aberracje chromosomowe**.

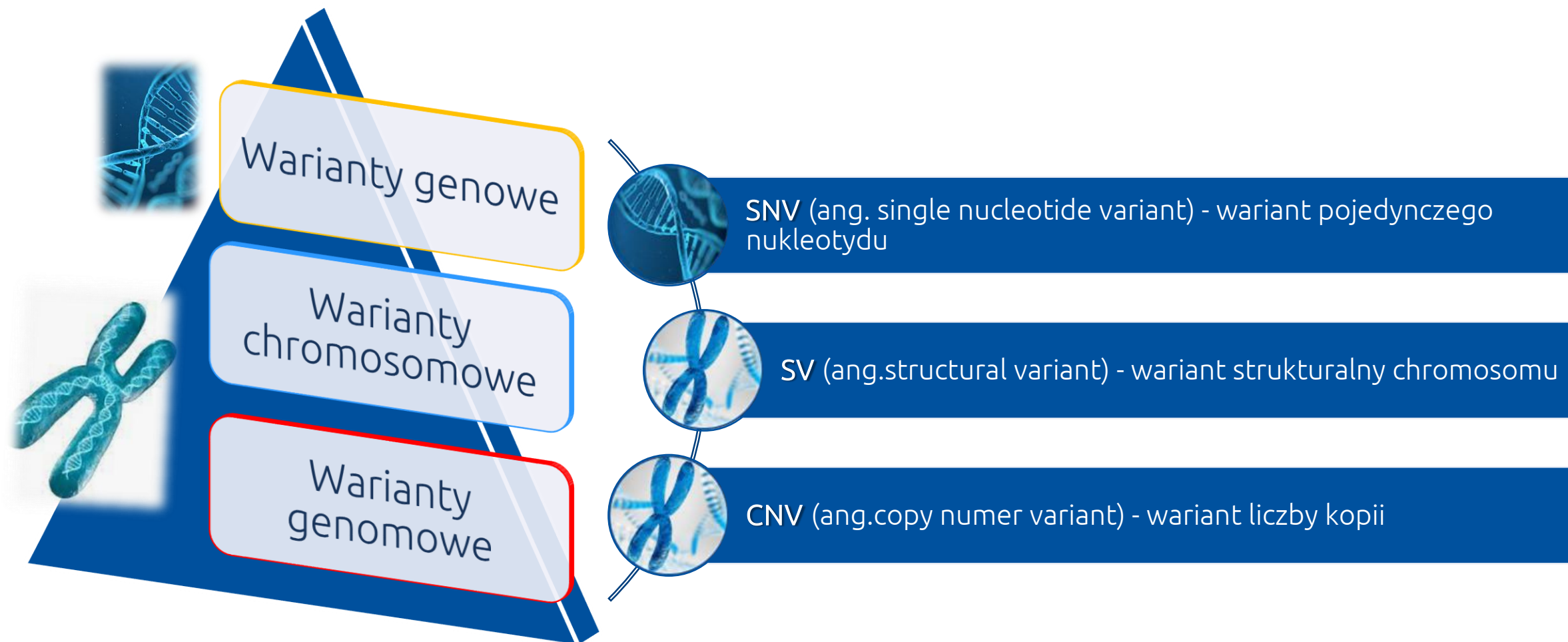
Warianty genomowe

Obejmują zmiany w liczbie chromosomów - **aberracje liczbowe**, prowadzą do poliploidalności oraz aneuploidii.

Po co nam tyle testów i jak się zabrać do interpretacji wyników...

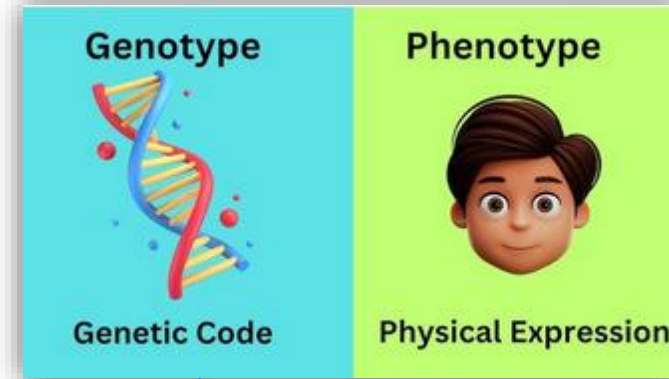
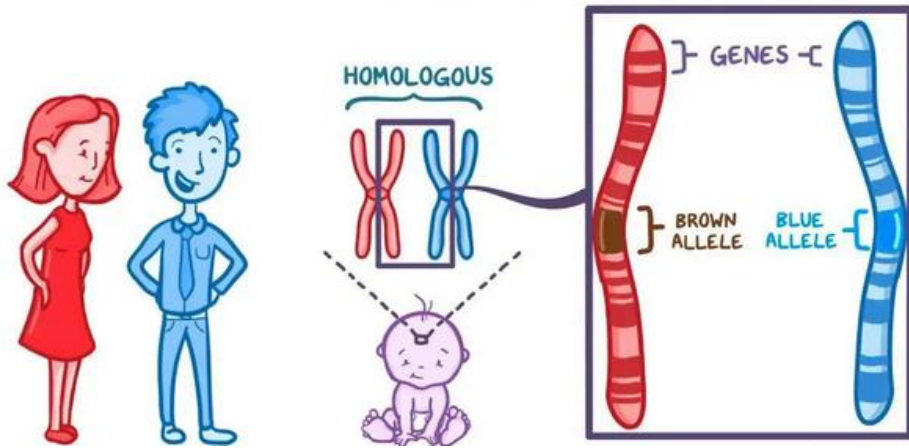


Po co nam tyle testów i jak się zabrać do interpretacji wyników...

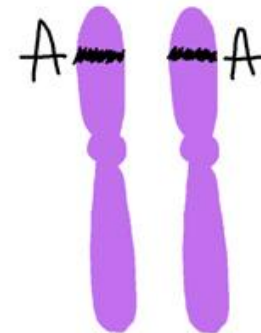
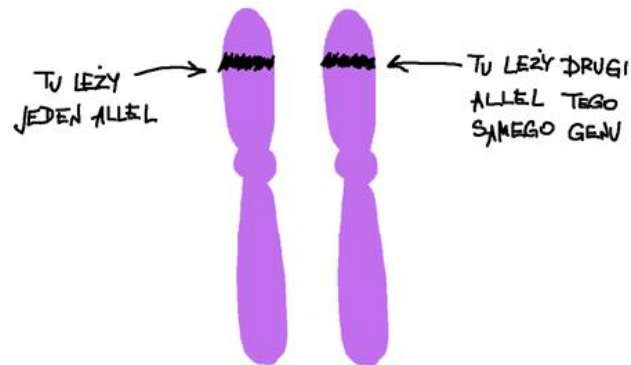


Szybki bieg przez podstawowe pojęcia...

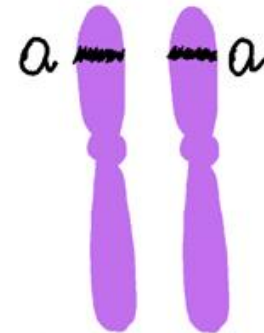
czyli to co niezbędne aby zrozumieć genetykę



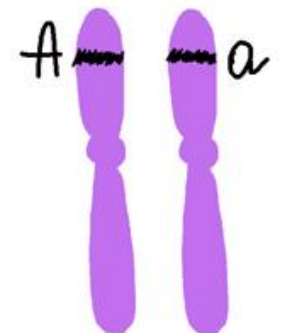
WARIANT



HOMOZYGOTA
DOMINUJĄCA



HOMOZYGOTA
RECESYWNA

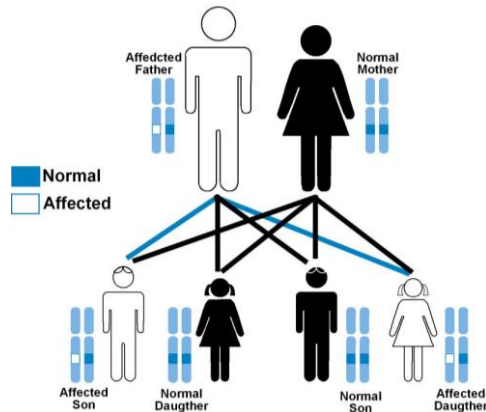


HETEROZYGOTA

Dziedziczenie autosomalne

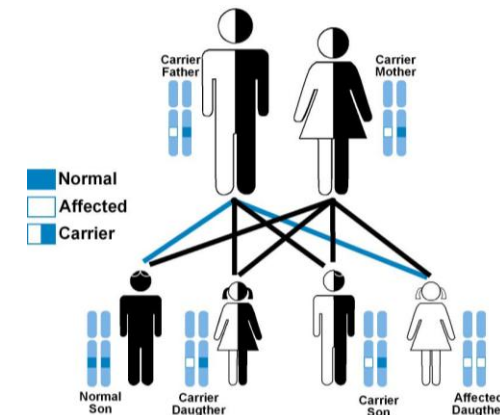
DOMINUJACE

- ✓ Cecha (choroba) ujawnia się już u heterozygot (**Aa**)
- ✓ Stan homozygotyczności (**AA**) dla patogennego wariantu genu spotyka się rzadko, gdyż jest letalny
- ✓ Cecha (choroba) występuje z jednakową częstością u obu płci
- ✓ „Pionowe” przekazywanie cechy
- ✓ nie ma nosicielstwa
- ✓ Ze związku heterozygoty (**Aa**) z osobą zdrową (**aa**):
- ✓ 50% potomstwa (**Aa**) jest obarczona cechą (chorobą),
- ✓ 50% - to osoby zdrowe (**aa**)



RECESYWNE

- ✓ Cecha (choroba) ujawnia się u homozygot recesywnych oraz heterozygot złożonych.
- ✓ Cecha (choroba) występuje z jednakową częstością u obu płci.
- ✓ „Poziome” przekazywanie cechy
- ✓ Ze związku dwóch heterozygot (**Aa**):
- ✓ 25% (1/4) potomstwa będzie zdrowe (**AA**),
- ✓ 50% (1/2) będzie nosicielami choroby (**Aa**),
- ✓ 25% (1/4) będzie chore (**aa**)

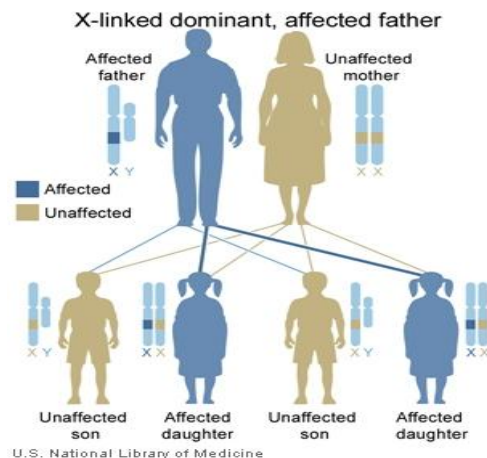
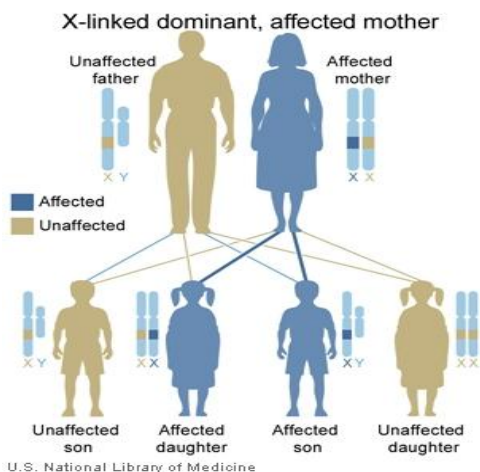


✓ UWAGA! Ryzyko nosicielstwa u zdrowego dziecka pary nosicieli 2/3 (66%)

Dziedziczenie sprzężone z płcią

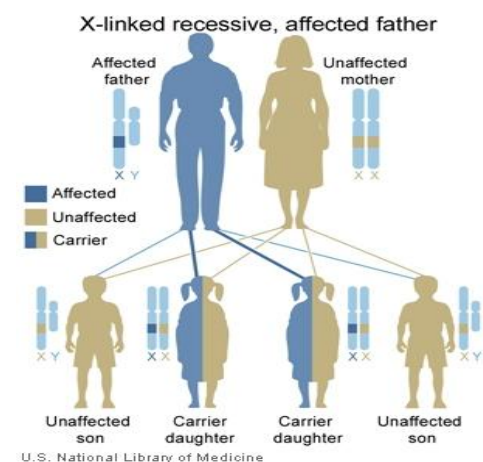
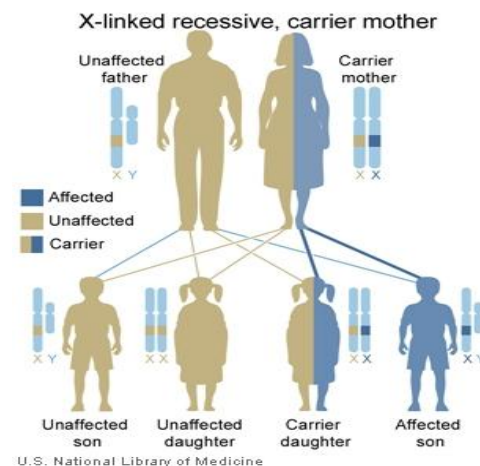
DOMINUJACE

- ✓ choroba ujawnia się u heterozygot, zarówno kobiet jak i mężczyzn
- ✓ u kobiet- różnorodność ekspresji (inaktywacja jednego z chromosomów X)
- ✓ niektóre choroby są letalne dla płci męskiej (w wywiadzie możemy obserwować poronienia samoistne)
- ✓ **chore kobiety** o genotypie heterozygoty przekazują cechę 50% swojego potomstwa, niezależnie od płci
- ✓ **chory mężczyzna** ma wyłącznie chore córki i wyłącznie zdrowych synów

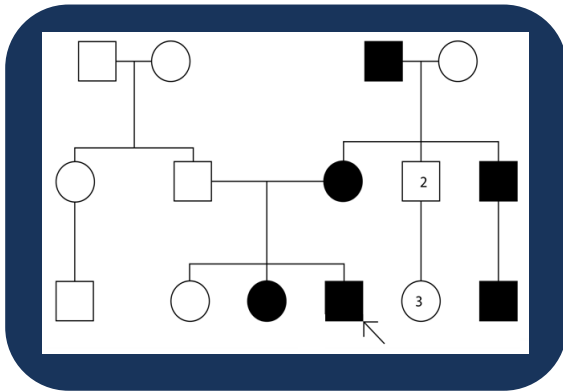


RECESYWNE

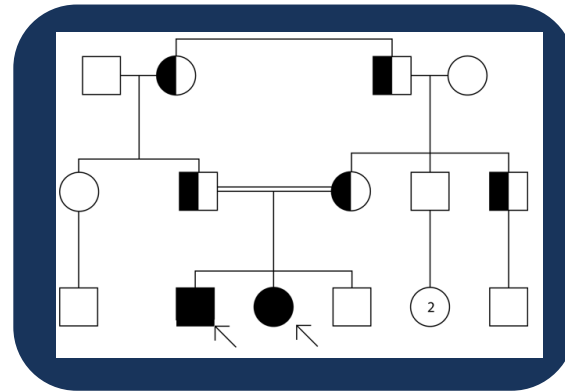
- ✓ chorują niemal wyłącznie mężczyźni (genotyp hemizygoty)
- ✓ choroba zazwyczaj jest dziedziczona przez chorych synów od swoich matek (bezobjawowych nosicielek)
- ✓ chory mężczyzna nigdy nie przekazuje choroby swoim synom.
- ✓ wszystkie córki chorego mężczyzny są nosicielkami.
- ✓ Istnieje 50% prawdopodobieństwa, że heterozygotyczne kobiety prześlą zmutowany gen zarówno synom, jak i córkom.



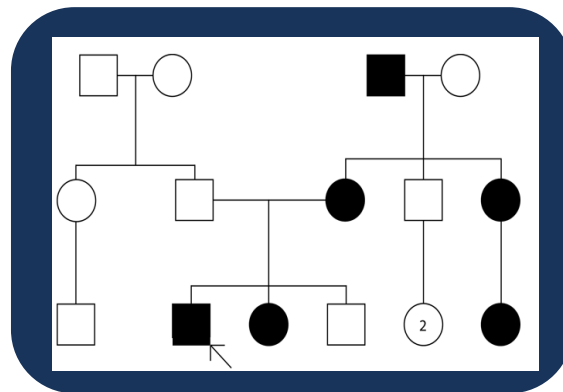
Rodowód - przydatny dodatek w dokumentacji pacjentki



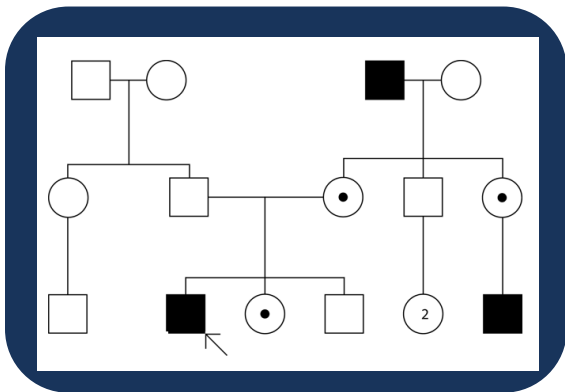
AD



AR



XLD

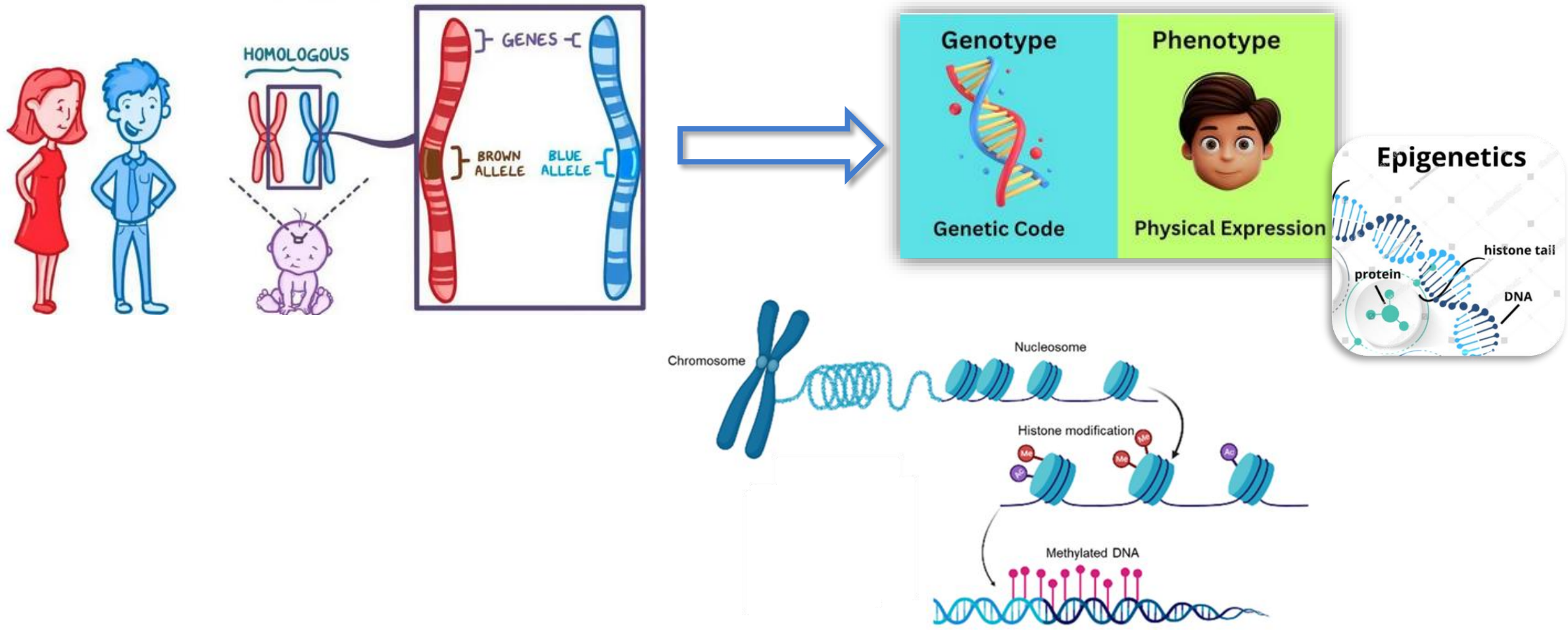


XLR

	osoba płci męskiej
	osoba płci żeńskiej
	osoba płci nieznannej lub nieistotnej
	aktualnie trwająca ciąża
	poronienie
	małżeństwo
	małżeństwo krewniacze
	potomstwo (będące rodzeństwem)
	liczba zdrowych osób danej płci
	bliźnięta dizygotyczne
	bliźnięta monozygotyczne
	bliźnięta o nieznannej zygocie
	osoba chora o danej płci
	zdrowi nosiciele cech autosomalnych recesywnych
	zdrowa nosicielka cechy sprzężonej z chromosomem X recesywnej
	proband

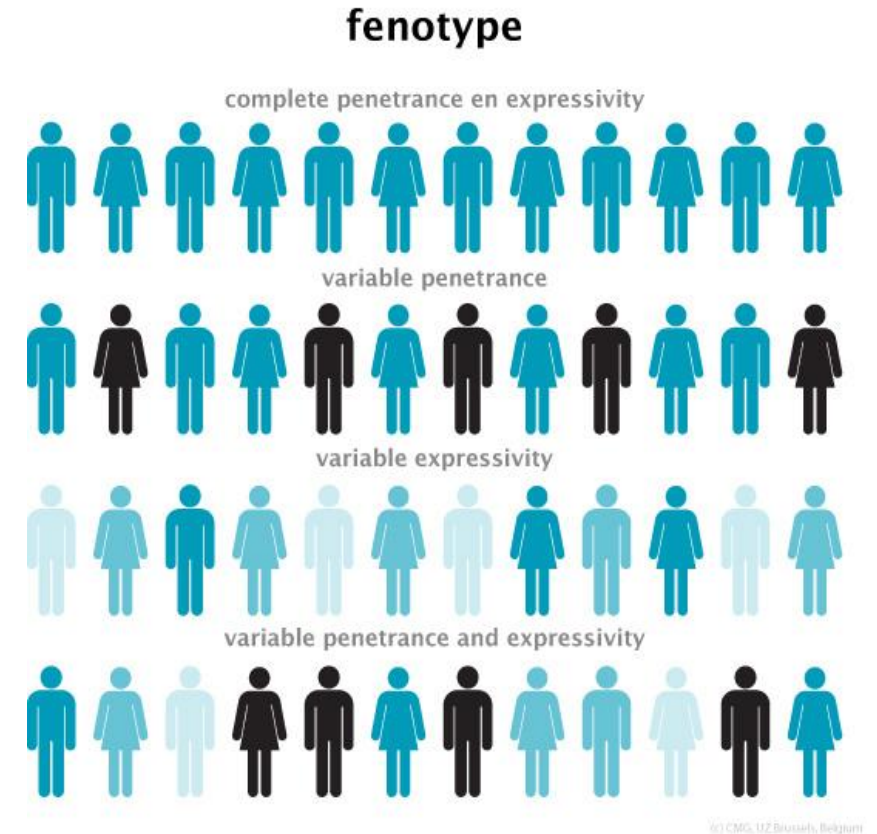


Co miesza nam w głowie....



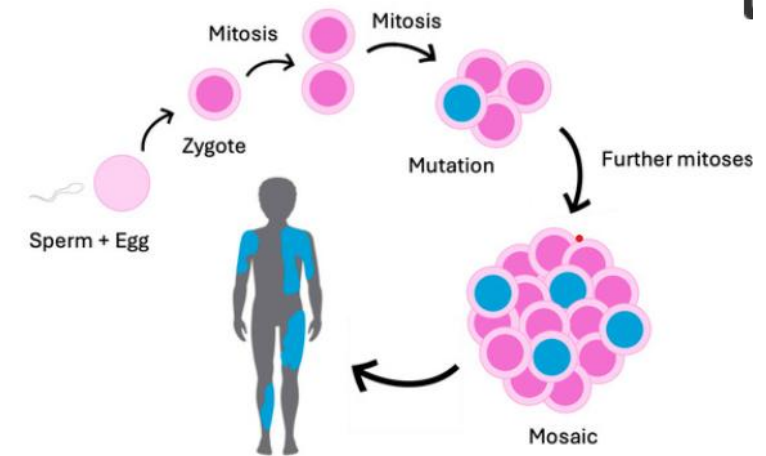
Co miesza nam w głowie....

- ✓ niepełna penetracja - u niektórych osób choroba nie ujawnia się mimo obecności „nieprawidłowego genu”
- ✓ zmienna ekspresja - u osób, które mają ten sam „nieprawidłowy gen” obserwuje się różne nasilenie objawów chorobowych, nawet wśród członków tej samej rodziny.
- ✓ opóźniona manifestacja - późne wystąpienie pierwszych objawów choroby



Co miesza nam w głowie...

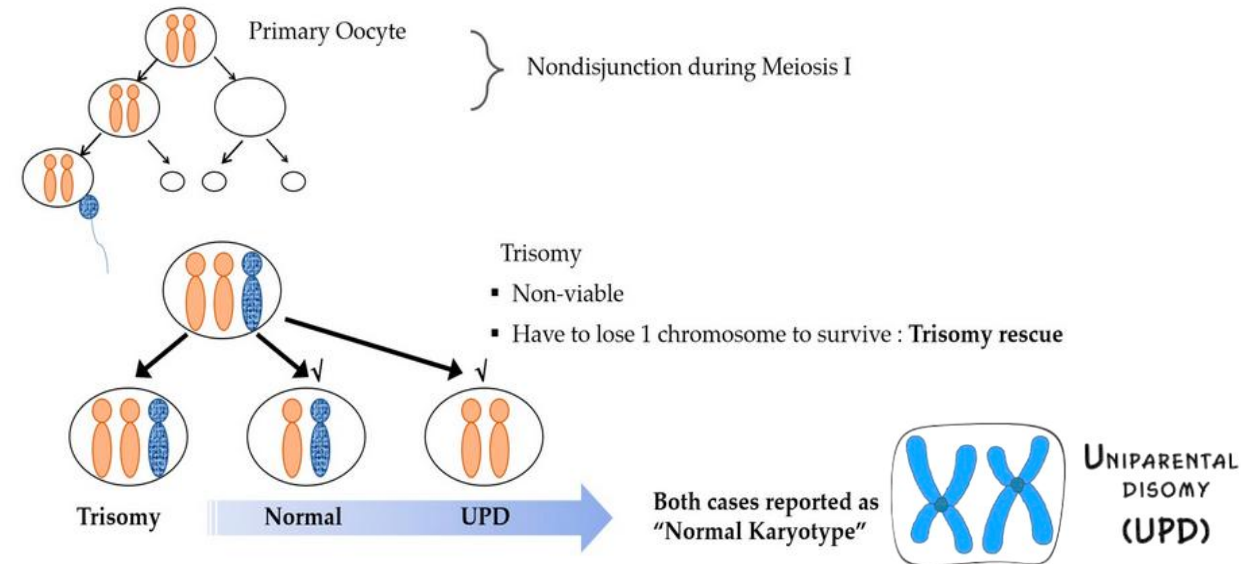
- ✓ **mozaicyzm** - w tym **mozaicyzm tkankospecyficzny** (np. pozytywne wyniki testów NIPT, które nie potwierdzają się u płodu) oraz **gonadalny** (variant patogenny występuje tylko w gonadach taka osoba jest zdrowa, ale ma podwyższone ryzyko urodzenia dziecka chorego)



- ✓ **disomia jednorodzicielska (UPD)** - odziedziczenie dwóch chromosomów danej pary od jednego rodzica (utrata heterozygotyczności - **LOH**)

UWAGA NA chromosomy

6, 7, 11, 14, 15 oraz 20
(loci związane z zaburzeniami imprintingu genomowego)



<https://www.mdpi.com/2075-4418/13/4/580>

Dostałem(łam) wynik badania i nic z tego nie rozumiem ...

Dane pacjentki
- wskazania do wykonania badania

Genotyp pacjenta (płodu)
zapis ISCN lub HGVS



Opis wyniku

informacja słowna: co oznacza genotyp,
korelacja genotyp-fenotyp

ISCN 2024 - International System for Human Cytogenetic Nomenclature



całkowita liczba chromosomów chromosomy płci aberracje chromosomowe w kolejności numerycznej aberracje strukturalne za liczbowymi

47,XX,t(6;9)(q24;p23),+7,dup(7)(p15p13)

arr [GRCh38] 10p11.22p15.3(33,390,002_66,408,950)x3

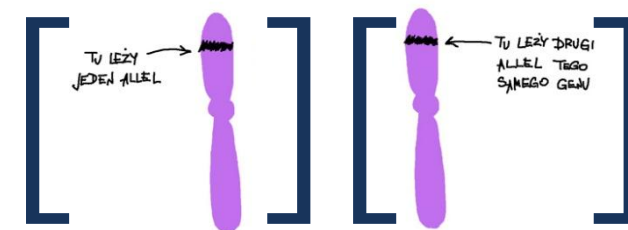
1. **arr** (array CGH) - nazwa techniki jaką wykonano badanie
2. **genom referencyjny** - „wzorzec genomu” względem którego wykonano badanie
3. **chromosomowy zakres zidentyfikowanej aberracji** (jeśli więcej niż jedna wymieniamy je w kolejności numerycznej chromosomów)
4. **nukleotydowy zapis zidentyfikowanej aberracji** (dokładne określenie jej zakresu - wielkości i lokalizacji)
5. liczba kopii miejsca objętego aberracją u pacjenta

Nic z tego nie rozumiem ... Co to jest HGVS?

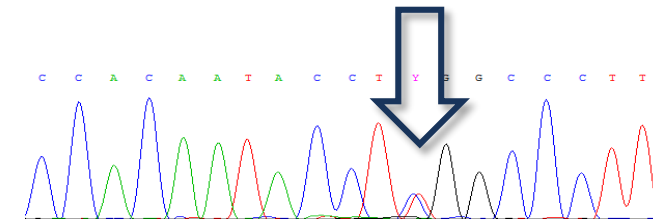
- Znajdowane zmiany na poziomie sekwencji DNA muszą być opisane przy użyciu specyficznego języka, aby uniknąć nieporozumień co do jego znaczenia → **Sequence Variant Nomenclature**

ENST00000553106.5:c.[1222C>T];[1222=]
ENSP00000448059.4:p.[(Arg408Trp)];[(Arg408=)]

↑ ↑
allele badanego genu



1. Sekwencja referencyjna genu/białka
2. Substytucja nukleotydowa lub inna wykryta u pacjenta zmiana w sekwencji DNA
3. Zamiana aminokwasowa, która pojawia się w białku w przypadku nieprawidłowości w DNA opisanej wyżej



“:” (dwukropek) służy do oddzielenia identyfikatora typu sekwencji referencyjnej (numer_dostępu.wersji) od rzeczywistego opisu wariantu

“[]” (nawiasy kwadratowe) są używane do opisu alleli

“;” (średnik) służy do oddzielania wariantów i alleli

“()” (nawiasy okrągłe) służą do wskazania niepewności i jedynie przewidywanych konsekwencji

“>” (znak większości) służy do opisu wariantów typu substytucja na poziomie DNA i RNA

“=” (znak równości) służy do wskazania, że sekwencja została przeanalizowana, ale jest nie zmieniona w stosunku do sekwencji referencyjnej, przykłady: c.1222C= lub p.(Arg408=)

Nie każdy z wykrytych w badaniu genetycznym wariantów odpowiada za obserwowane u płodu objawy

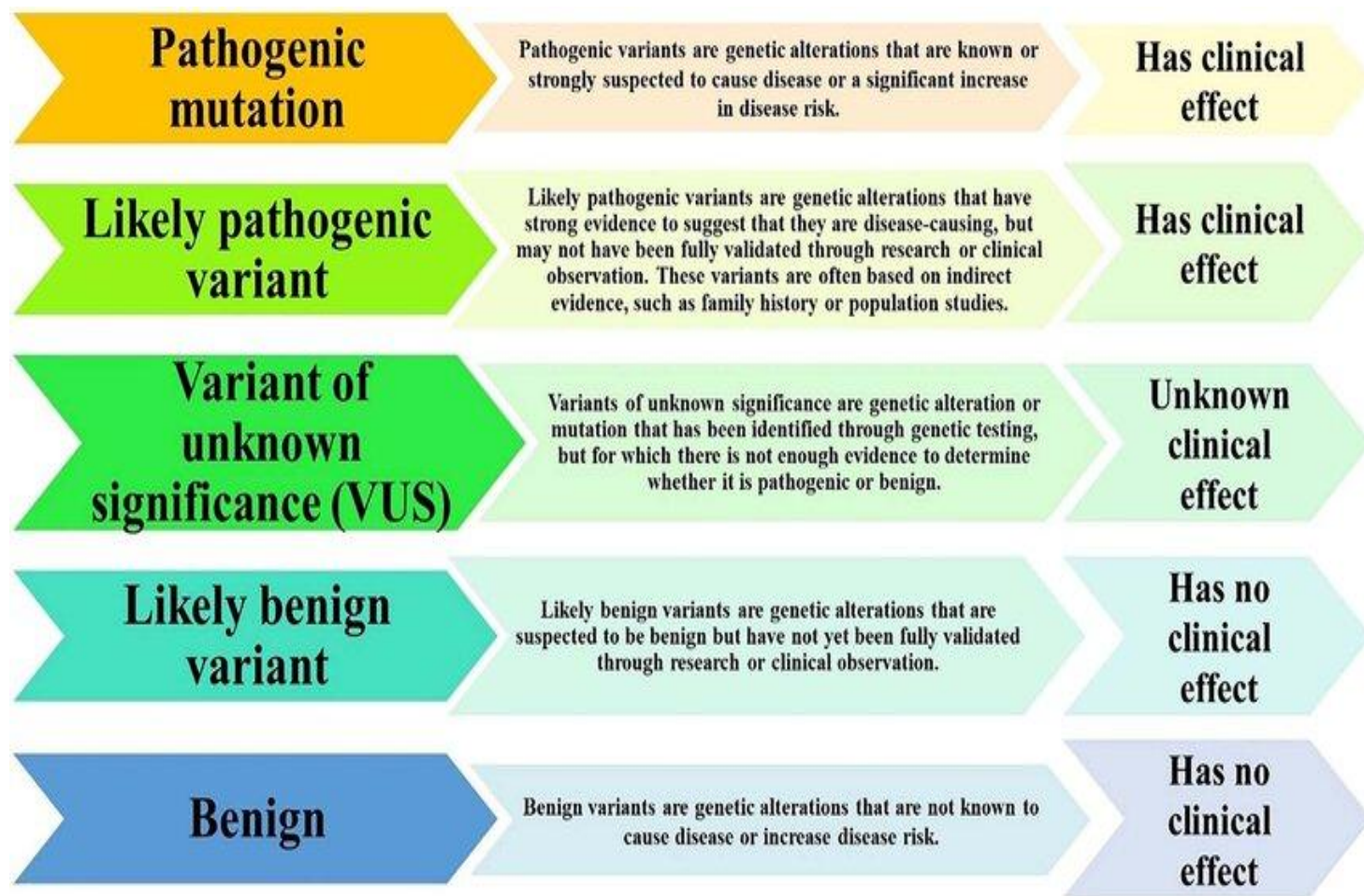


- Częstość populacyjna wariantu > częstość występowania choroby
- Brak wpływu na sekwencję aminokwasową białka lub zmiana aminokwasu w nie konserwatywnej domenie białka
- Model dziedziczenia oraz dane literaturowe nie wskazujące na związek wariantu z chorobą/ fenotypem probanta



- Niska częstość wariantu w populacji; wariant wcześniej nieidentyfikowany
- Występowanie wariantu u osób z podobnym do probanta fenotypem
- Kosegregacja wariantu z chorobą/ cechami fenotypowymi probanta
- Badania funkcjonalne wskazujące na związek wariantu z występującymi objawami

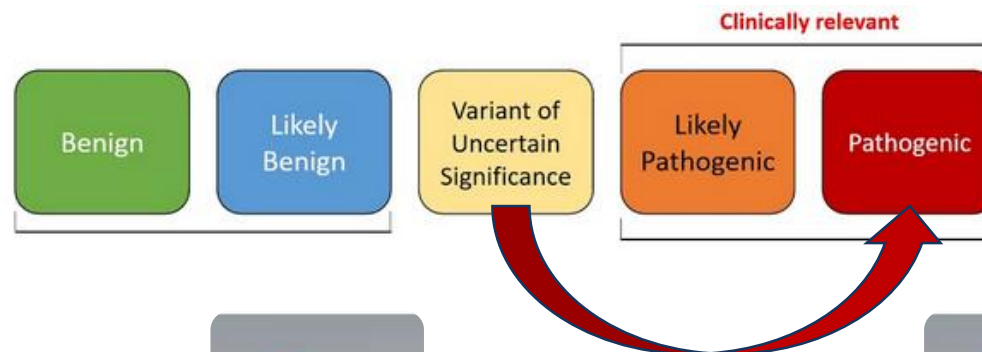
Być albo nie być wariantem o niepewnym znaczeniu klinicznym...



ACMG/AMP guidelines ¹	Points ²	Posterior probability ³	VUS temperature scale ⁴
Pathogenic	≥10	99%	
Likely pathogenic	6-9	90%	
Uncertain significance	1 strong + 1 supporting OR 2 moderate + 1 supporting OR 1 moderate + 3 supporting	5	Hot
	1 strong OR 2 moderate OR 1 moderate + 2 supporting OR 4 supporting	4	Warm
	1 moderate + 1 supporting OR 3 supporting	3	Tepid
	1 moderate OR 2 supporting	2	Cool
		32.5%	
	1 supporting	1	Cold
		0	Ice cold
		18.8%	
Likely benign	-1 to -6	10%	
Benign	<-6	0.1%	

Sian Ellard, Emma Baple et al: ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification in; Rare Disease 2020

VUS w diagnostyce prenatalnej... i co teraz?



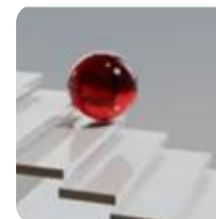
PP1

- współsegregacja wariantu z chorobą
- wariant występuje u osób chorych i nie występuje u osób zdrowych w tej samej rodzinie



PS2 / BS2

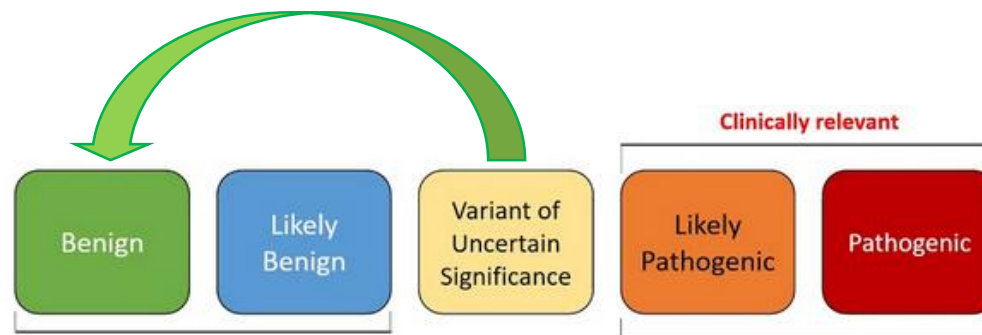
- wariant de novo
- wariant nowo powstały u osoby chorej, bez obecności u biologicznych rodziców



PP4 / BP3

- specyfika fenotypu
- fenotyp pacjenta jest charakterystyczny dla choroby związanej z danym wariantem.

VUS w diagnostyce prenatalnej... i co teraz?



BA1

- wariant występuje z częstością wykluczającą jego rolę w chorobie (>5% w populacji dla choroby rzadkiej)
- sprawdź dobrze (np. gnomAD)



BS2

- wariant obserwowany u zdrowych homozygot lub u wielu zdrowych heterozygot w przypadku dominujących chorób o pełnej penetracji



BS4

- Wariant nie współsegreguje z chorobą w rodzinie (np. chory nie ma wariantu, a zdrowy ma)

Prenatal WES → WES TRIO



- w badaniu sprawdzany jest materiał genetyczny dziecka (płodu) i rodziców
- celem jest maksymalne zwiększenie szans na postawienie prawidłowej diagnozy (jak najszybsze i najskuteczniejsze znalezienie i wytypowanie zmian odpowiedzialnych za fenotyp probanta)
- w standardowym badaniu WES trio wydawany jest tylko jeden szczegółowy wynik, dotyczy on diagnostyki dziecka (płodu)
- **Jak najlepsza znajomość fenotypu płodu stanowi podstawę właściwej interpretacji wyników badania!!**

© American College of Medical Genetics and Genomics

ACMG STATEMENT

Genetics
inMedicine



The use of fetal exome sequencing in prenatal diagnosis: a points to consider document of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)

Kristin G. Monaghan, PhD¹, Natalia T. Leach, PhD², Dawn Pekarek, MD³, Priya Prasad, MD⁴ and Nancy C. Rose, MD⁵; on behalf of the ACMG Professional Practice and Guidelines Committee

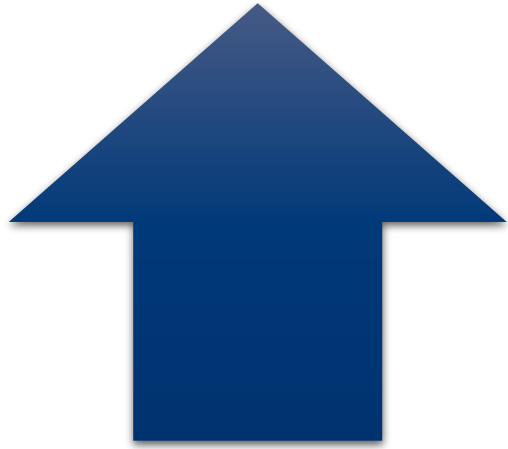
ISPD POSITION STATEMENT

PRENATAL
DIAGNOSIS WILEY

International Society for Prenatal Diagnosis Updated Position Statement on the use of genome-wide sequencing for prenatal diagnosis

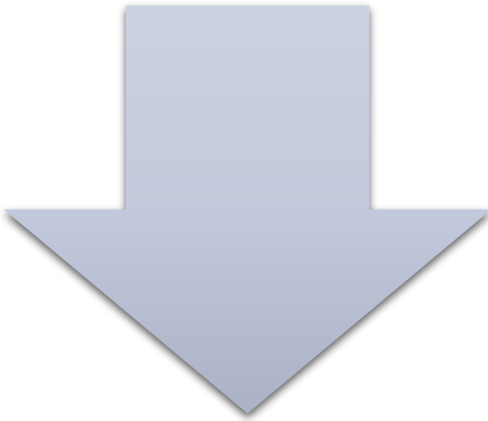
Ignatia B. Van den Veyver^{1,2} | Natalie Chandler³ | Louise E. Wilkins-Haug⁴ |
Ronald J. Wapner⁵ | Lyn S. Chitty^{3,6} | ISPD Board of Directors

Co może mnie zaskoczyć w diagnostyce wysokoprzepustowej?



Zidentyfikowanie wariantu powodującego chorobę, w genie który nie jest istotny dla pytania klinicznego (nie ma związku z przyczyną skierowania pacjenta na badanie), ale za zgodą pacjenta został celowo przeanalizowany podczas testu genetycznego.

SECONDARY FINDING



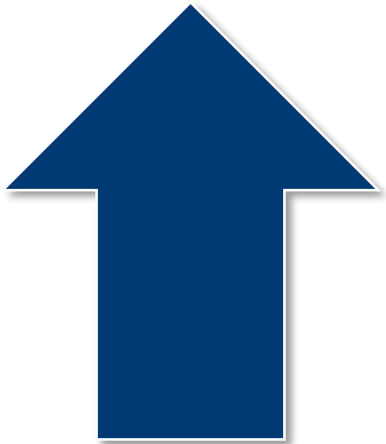
Niezamierzone wykrycie wariantu podczas wykonywania testu, który NIE jest związany z pytaniem klinicznym (fenotypem probanta), ale ma znaczenie kliniczne.

INCIDENTAL FINDING (Znalezisko przypadkowe)

Co może mnie zaskoczyć w diagnostyce wysokoprzepustowej?

Practice Guideline > Genet Med. 2023 Aug;25(8):100866. doi: 10.1016/j.gim.2023.100866.
Epub 2023 Jun 22.

ACMG SF v3.2 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: A policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)



SECONDARY FINDING

Przykład: wariant w genie BRCA1 zwiększający ryzyko choroby nowotworowej zidentyfikowany u 5 latki badanej ze względu na niepełnosprawność intelektualną



INCIDENTAL FINDING (Znalezisko przypadkowe)

Przykład: wariant w genie GJB2 powodujący niedosłuch zidentyfikowany u noworodka badanego ze względu na wadę serca oraz hipotrofię



Wyzwania interpretacyjne...

Skutki pozytywne:

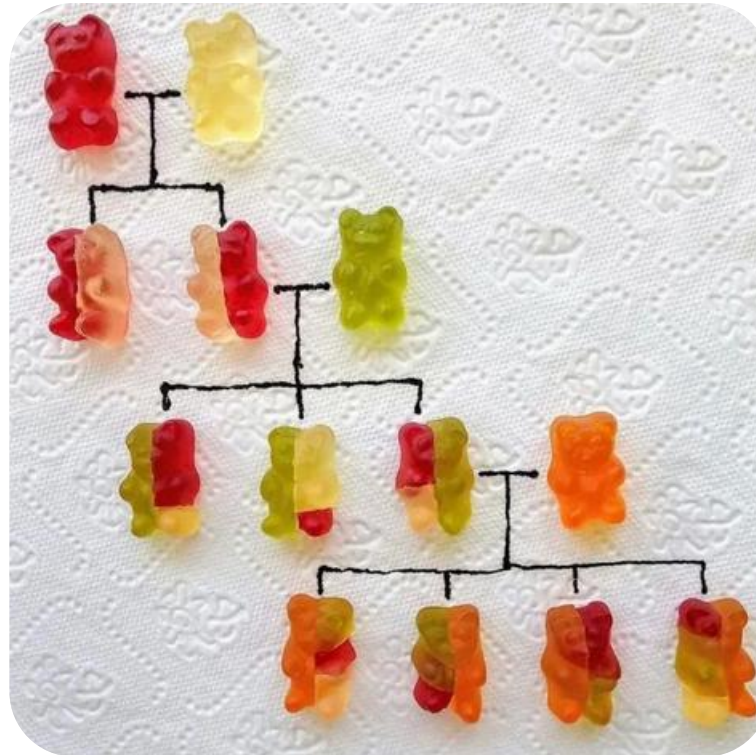
- genetyczna predyspozycja do choroby, którą można leczyć/zapobiegać wystąpieniu objawów
- podejmowanie decyzji prokreacyjnych przez partnerów
- ryzyko zdrowotne, które można zmniejszyć poprzez zmianę stylu życia



Skutki negatywne:

- Zidentyfikowanie wariantu odpowiadającego za chorobę, której nie można leczyć/zapobiegać wystąpieniu objawów
- zidentyfikowanie wariantu odpowiadającego za chorobę o późnym początku (w chwili diagnostyki pacjent nie prezentuje objawów klinicznych)
- problemy z ubezpieczeniem zdrowotnym/pracodawcą itp.
- obciążenie psychiczne członków rodziny
- podjęcie terapii bez jednoznacznych wskazań klinicznych

Dziękuję za uwagę...



Genetykę można jednak całkiem łatwo wyjaśnić ☺