



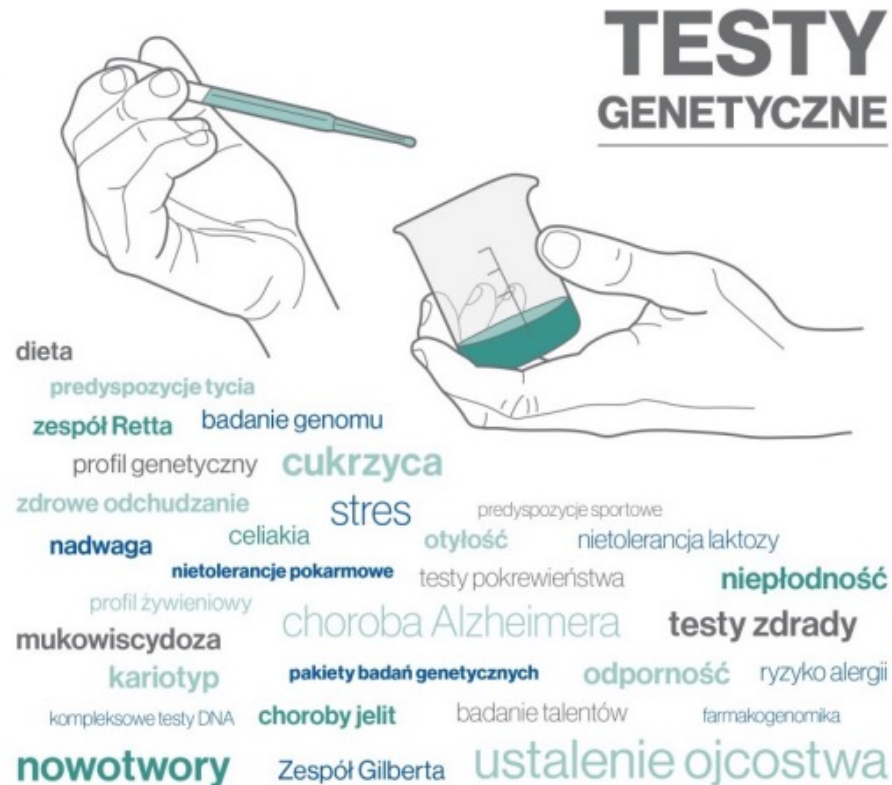
Wybór testu genetycznego w diagnostyce neurofibromatoz – dlaczego to tak istotne?

Dr n. med. Magdalena Koczkowska
Laboratorium Medycyny 3P
Międzynarodowa Agenda Badawcza
Gdański Uniwersytet Medyczny

Test genetyczny

- Analiza ludzkich chromosomów, genów lub białek wykonywana **do celów klinicznych i poradnictwa genetycznego** (*National Institutes of Health*).
- Testy genetyczne to wszelkie badania, w wyniku których otrzymuje się **dane genetyczne** (*National Human Genome Research Institute*).

Rodzaje oferowanych
testów genetycznych



Stan badań genetycznych w Polsce - raport NiK (2018)

- Powszechność badań genetycznych (rocznie > 1 000 000 testów);
- Szeroka oferta badań i niekontrolowany dostęp do badań wykonywanych odpłatnie;
- **Wielość obowiązujących aktów prawnych** - brak wystandaryzowanych regulacji prawnych w Polsce.

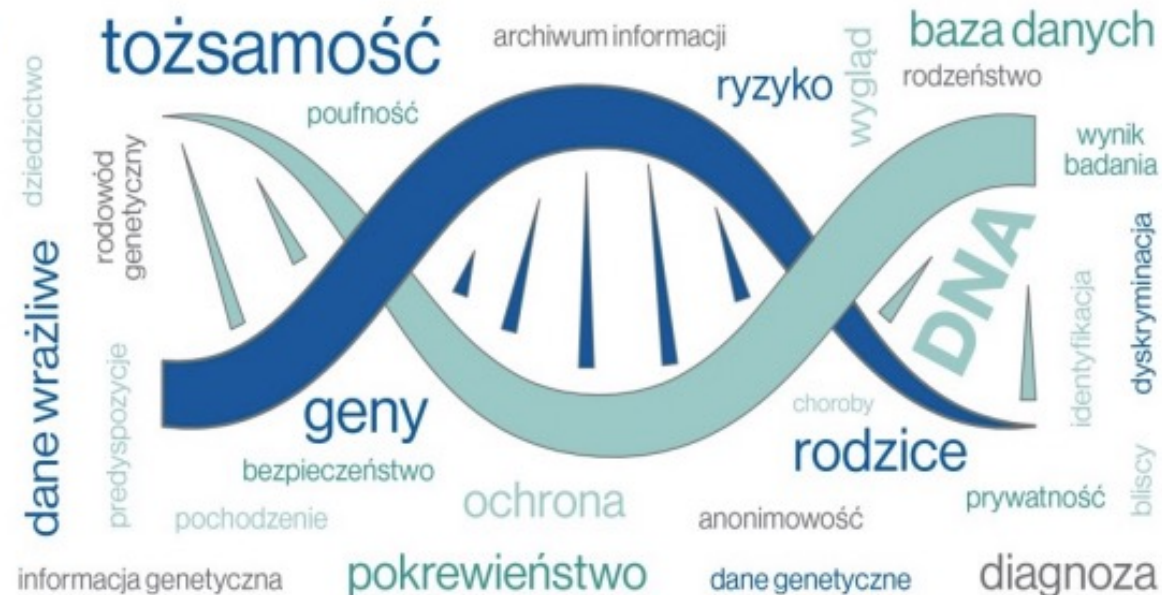


Stan badań genetycznych w Polsce – raport NiK (2018)

Zagrożenia wskazane przez NIK:

- “Ryzyko nadużyć w zakresie gwarancji **bezpieczeństwa danych genetycznych i wiarygodności badań genetycznych**, w szczególności wykonywanych poza systemem ochrony zdrowia”
- “Niska świadomość społeczna o badaniach genetycznych i ich konsekwencjach”

Informacje zawarte
w DNA człowieka



Standardy jakości
dla biobanków polskich
v. 2.00

pod redakcją

Agnieszki Matery-Witkiewicz
Joanny Gleńskiej-Olender
Karoliny Zagórskiej
Izabeli Uhrynowskiej-Tyszkiewicz
Małgorzaty Witoń

Znaczenie wyniku testu genetycznego

Marker diagnostyczny - wspomagający proces postawienia diagnozy

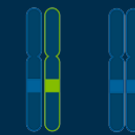
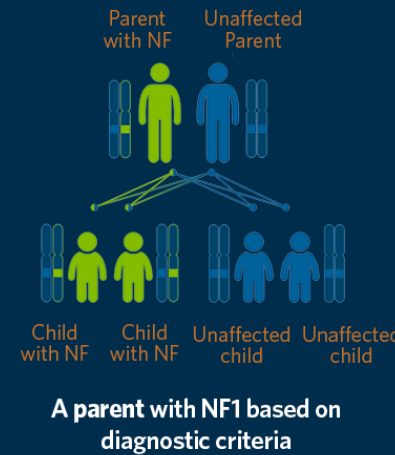
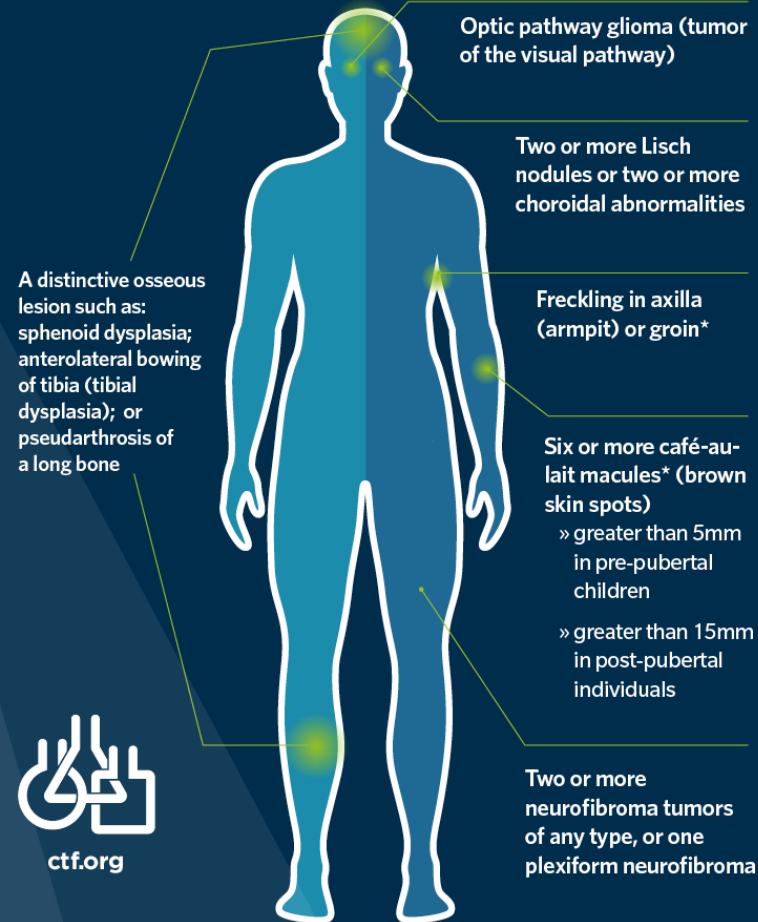
Marker predykcyjny - pozwalający na prognozowanie odpowiedzi na zastosowane leczenie

Marker prognostyczny - pozwalający na prognozowanie rokowania

- potwierdzenie rozpoznania klinicznego - wczesna i prawidłowa diagnoza
- dla celów poradnictwa genetycznego
- dla celów prognostycznych (prognozowanie przebiegu choroby)
- dla celów terapeutycznych (leczenie celowane)

WSPÓŁPRACA DIAGNOSTY LABORATORYJNEGO Z KLINICYSTĄ

A diagnosis of NF1 can be given if an individual has two or more of the following manifestations.



A pathogenic *NF1* gene variant

Additional Genetic Criteria Updates:

- The term "mutation" is no longer accepted; pathogenic variant is now the preferred term.
- Genetic analysis is not REQUIRED for diagnosis but may allow for an earlier diagnosis.
- Genetic analysis ALONE is not sufficient to diagnose NF1 - diagnosis requires a second diagnostic feature of NF1.

*At least one of the two pigmented findings (café-au-lait macules or freckling) should be bilateral.

www.nature.com/gim

Genetics
inMedicine



ARTICLE

Revised diagnostic criteria for neurofibromatosis type 1 and Legius syndrome: an international consensus recommendation

Eric Legius^{1,85,86}, Ludwine Messiaen^{2,85}, Pierre Wolkenstein^{3,85}, Patrice Pancza^{4,85}, Robert A. Avery⁵, Yemima Berman⁶, Jaishri Blakeley⁷, Dusica Babovic-Vuksanovic⁸, Karin Soares Cunha⁹, Rosalie Ferner¹⁰, Michael J. Fisher¹¹, Jan M. Friedman¹², David H. Gutmann¹³, Hildegard Kehrer-Sawatzki¹⁴, Bruce R. Korf², Victor-Felix Mautner¹⁵, Sirkku Peltonen^{16,17}, Katherine A. Rauen¹⁸, Vincent Riccardi¹⁹, Elizabeth Schorry²⁰, Anat Stemmer-Rachamimov²¹, David A. Stevenson²², Gianluca Tadini²³, Nicole J. Ullrich²⁴, David Viskochil²⁵, Katharina Wimmer²⁶, Kaleb Yohay²⁷, International Consensus Group on Neurofibromatosis Diagnostic Criteria (I-NF-DC)*, Susan M. Huson^{28,85}, D. Gareth Evans^{29,85} and Scott R. Plotkin^{30,85}

Marker diagnostyczny

2022 UPDATES

DIAGNOSTIC CRITERIA FOR NF2-RELATED SCHWANNOMATOSIS

Formerly called Neurofibromatosis Type 2 (NF2)

- ❖ *NF2*-related schwannomatosis
- ❖ *SMARCB1*-related schwannomatosis
- ❖ *LZTR1*-related schwannomatosis
- ❖ 22q-related schwannomatosis
- ❖ Schwannomatosis-NOS (not otherwise specified)

Genetics in Medicine (2022) 24, 1967–1977



Genetics
in
Medicine

www.journals.elsevier.com/genetics-in-medicine

ARTICLE

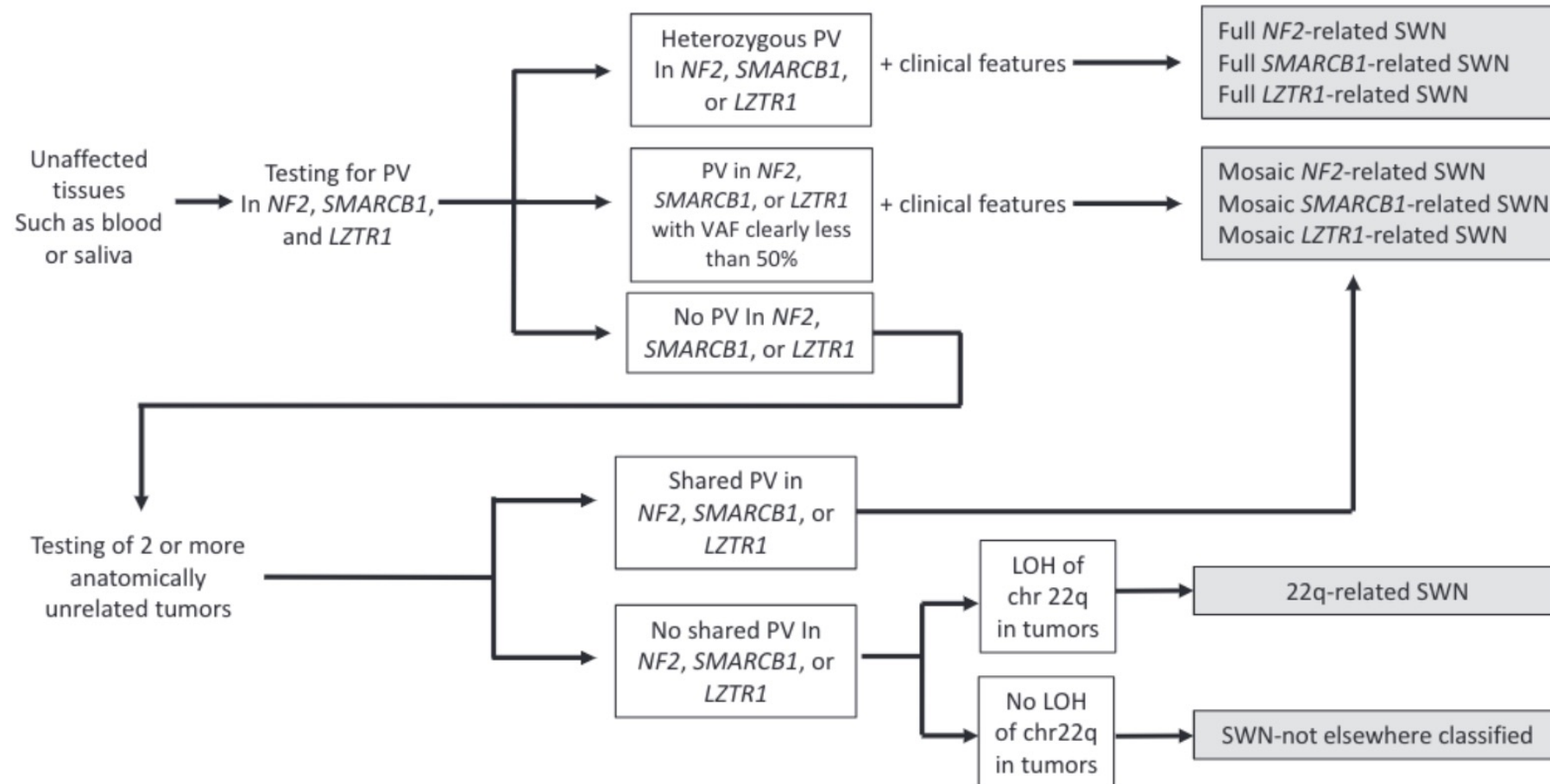
Updated diagnostic criteria and nomenclature for neurofibromatosis type 2 and schwannomatosis: An international consensus recommendation



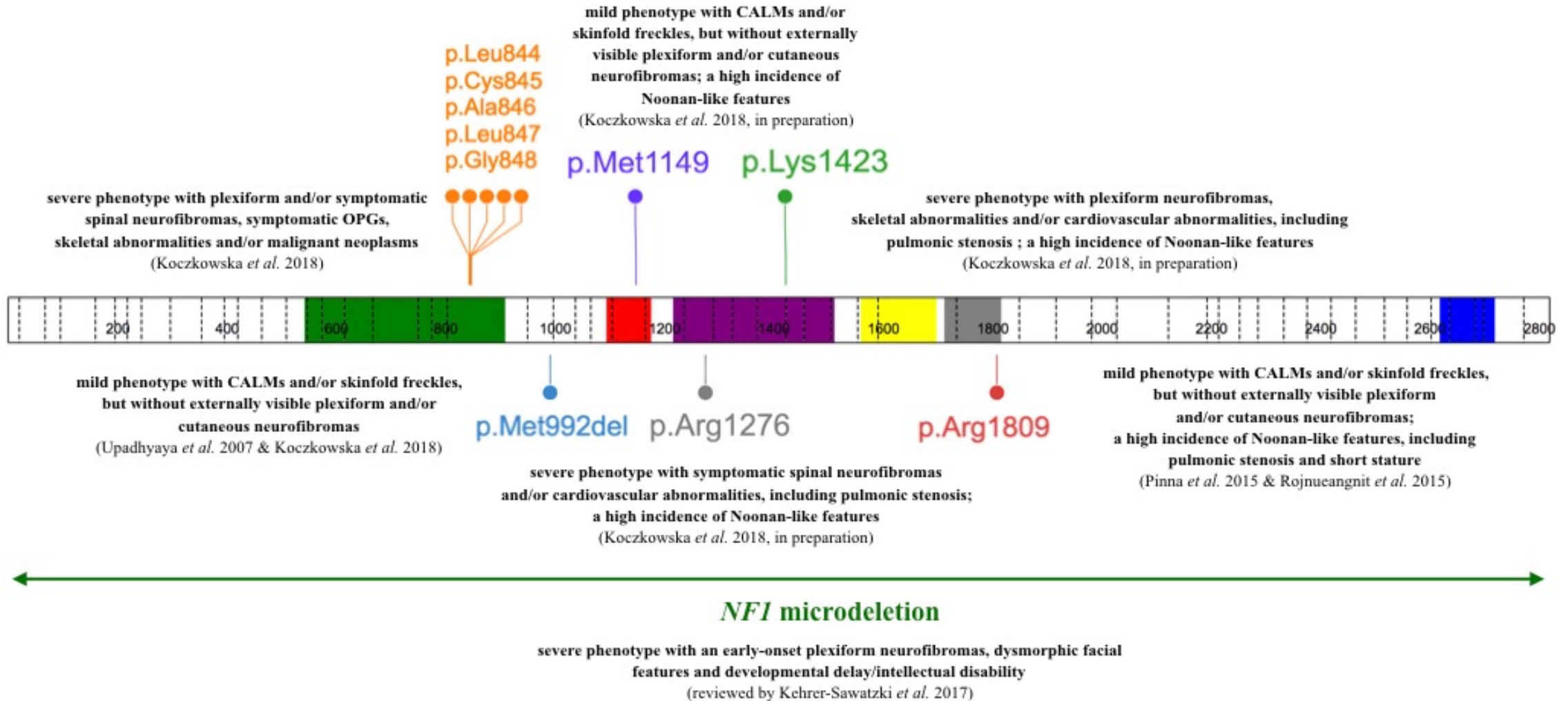
Scott R. Plotkin^{1,*}, Ludwine Messiaen², Eric Legius³, Patrice Pancza⁴, Robert A. Avery⁵, Jaishri O. Blakeley⁶, Dusica Babovic-Vuksanovic⁷, Rosalie Ferner⁸, Michael J. Fisher⁹, Jan M. Friedman¹⁰, Marco Giovannini¹¹, David H. Gutmann¹², Clemens Oliver Hanemann¹³, Michel Kalamarides¹⁴, Hildegard Kehrer-Sawatzki¹⁵, Bruce R. Korf², Victor-Felix Mautner¹⁶, Mia MacCollin¹⁷, Laura Papi¹⁸, Katherine A. Rauen¹⁹, Vincent Riccardi²⁰, Elizabeth Schorry²¹, Miriam J. Smith²², Anat Stemmer-Rachamimov²³, David A. Stevenson²⁴, Nicole J. Ullrich²⁵, David Viskochil²⁶, Katharina Wimmer²⁷, Kaleb Yohay²⁸, International Consensus Group on Neurofibromatosis Diagnostic Criteria (I-NF-DC), Susan M. Huson²⁹, Pierre Wolkenstein³⁰, D. Gareth Evans²²

Aktualny algorytm postępowania diagnostycznego

Genetic testing strategy for NF2 and SWN



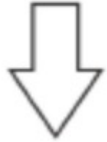
Marker prognostyczny



Rodzaje wariantów genetycznych

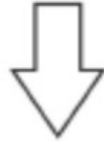
MUTACJE

GENOWE
(PUNKTOWE)



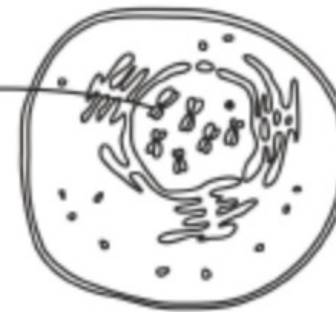
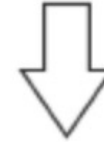
zachodzą na poziomie
sekwencji nukleotydowej

CHROMOSOMOWE
(STRUKTURALNE)



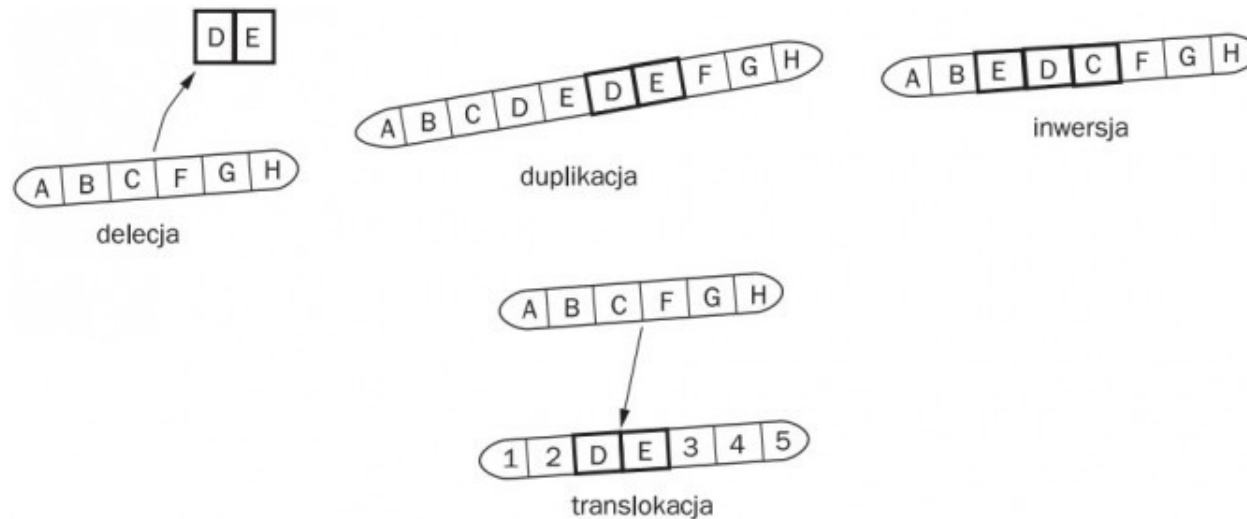
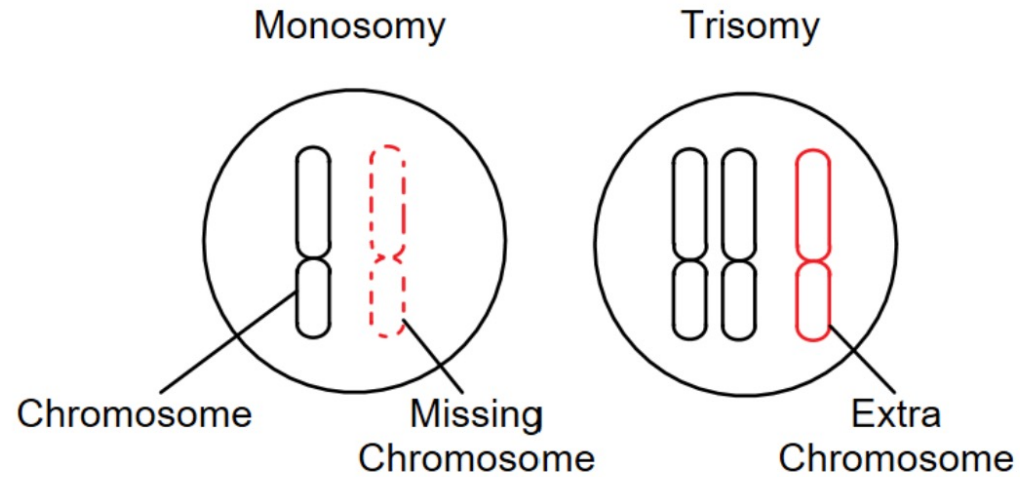
są to zmiany
w strukturze
chromosomów

GENOMOWE



polegają na zmianie
liczby chromosomów

Rodzaje wariantów genetycznych

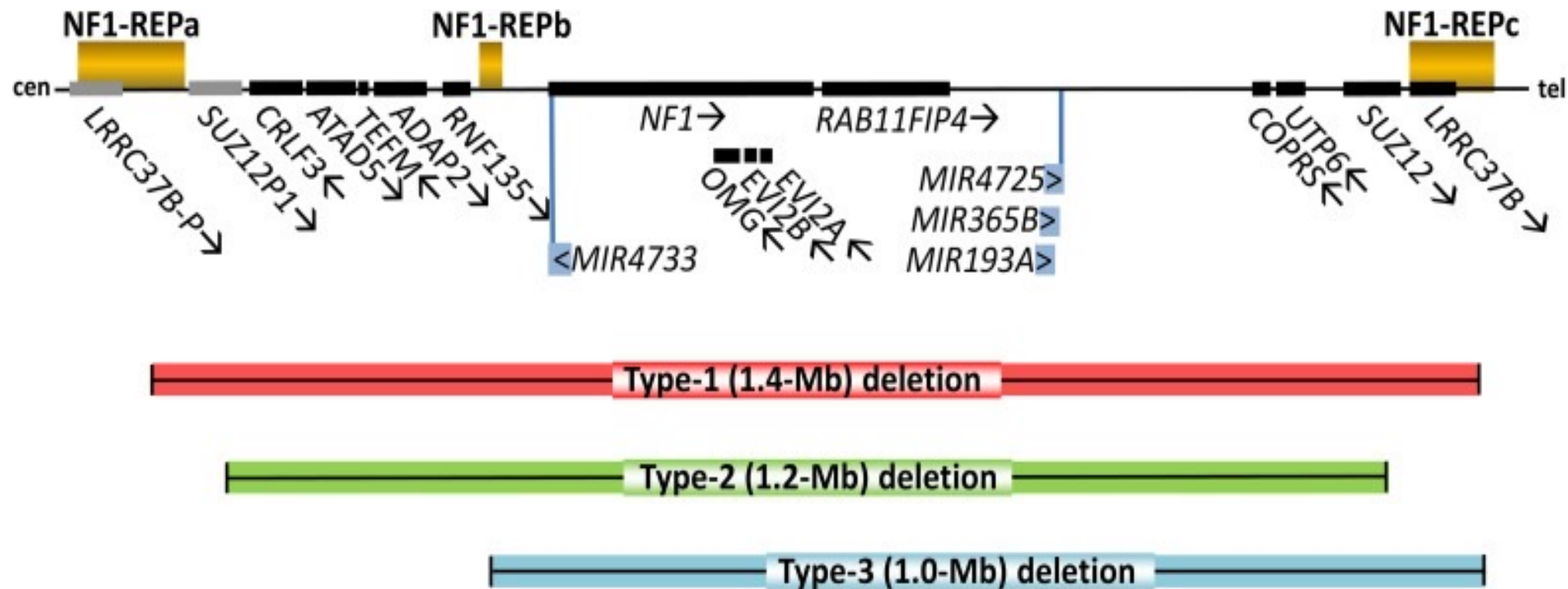


Schemat mutacji chromosomowych

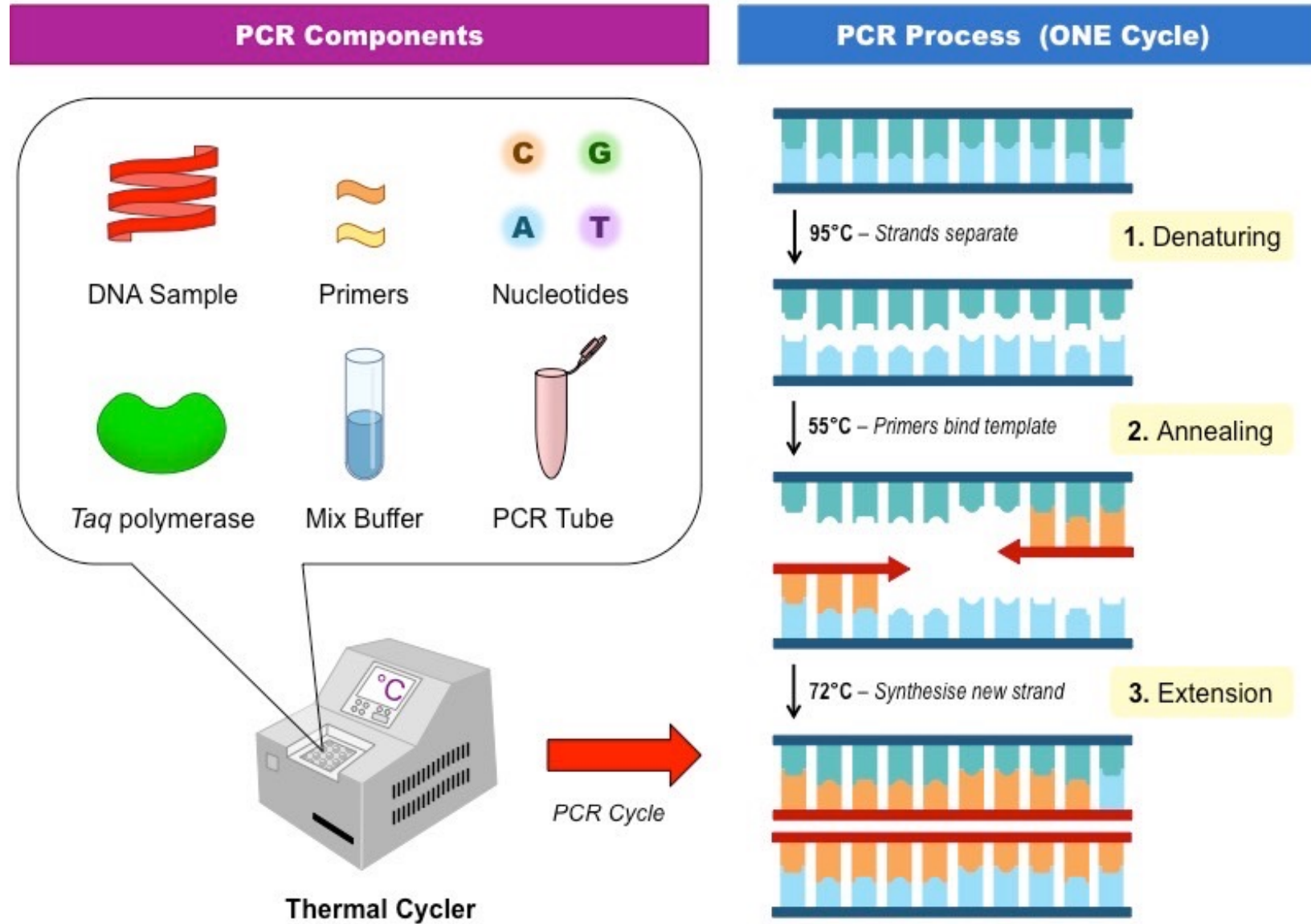
<https://www.dymockstutoring.edu.au/hsc-biology-types-of-dna-mutations-chromosomal-mutations/>

<https://opracowania.pl/opracowania/biologia/mutacje,oid,1406>

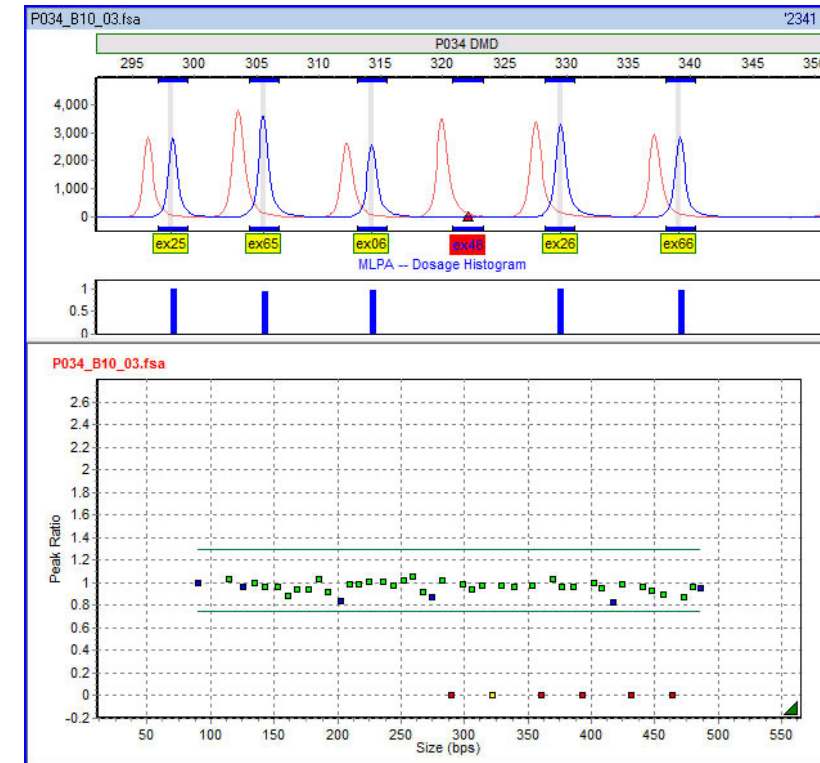
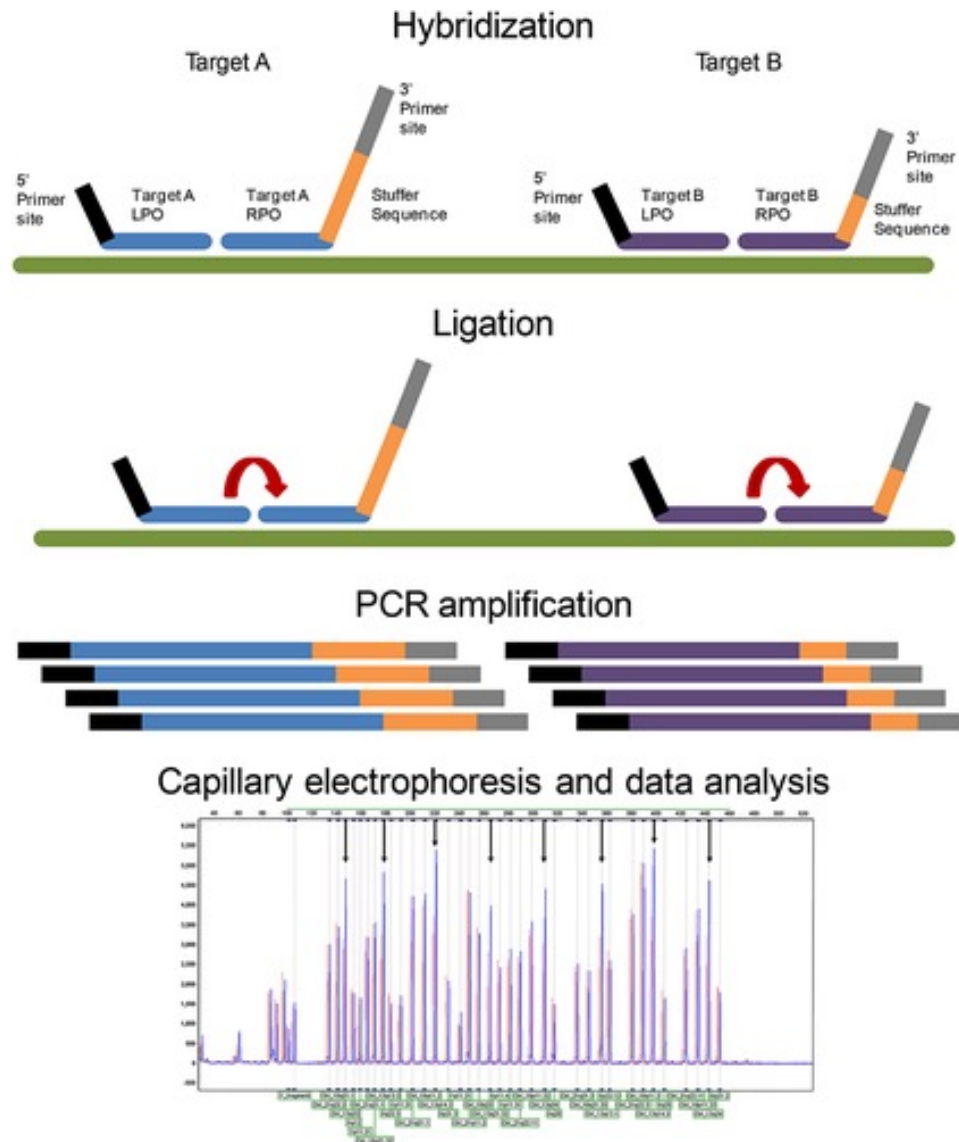
Rodzaje wariantów genetycznych



PCR = łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*)

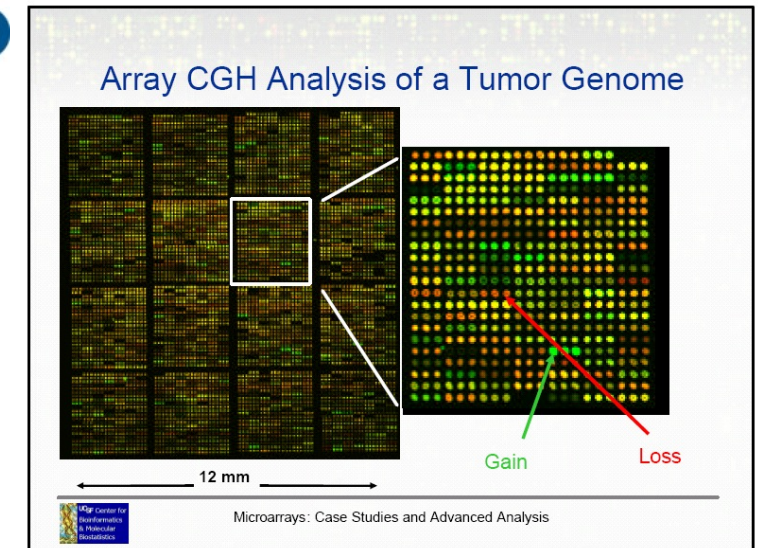
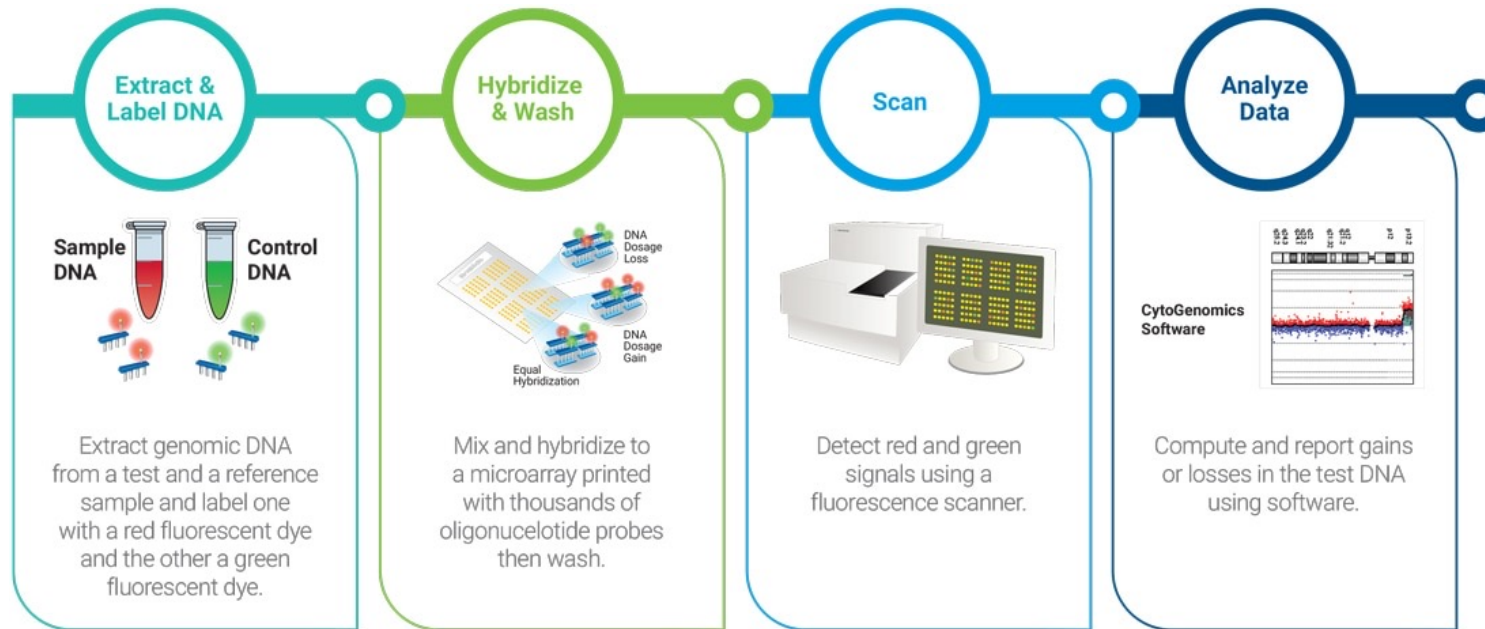


MLPA = Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification



- równoczesna analiza 40-45 różnych sekwencji nukleotydowych w jednej reakcji
- brak wymagań sprzętowych
- 50-200 ng DNA pacjenta
- krótki czas badania - 2 dni i stosunkowo niski koszt

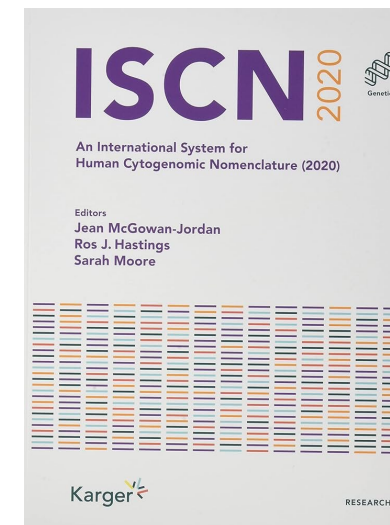
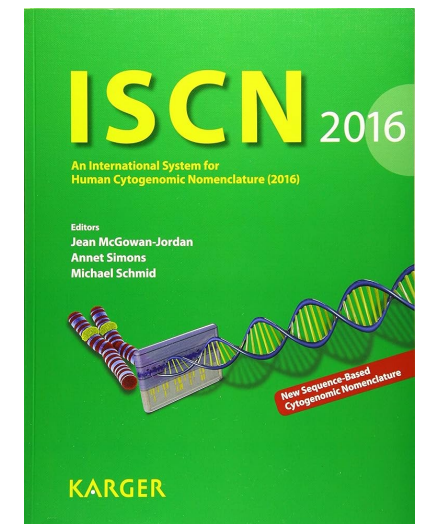
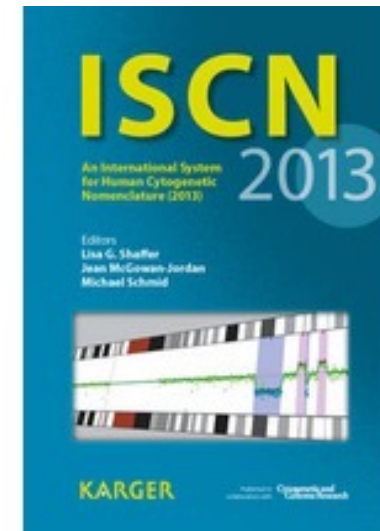
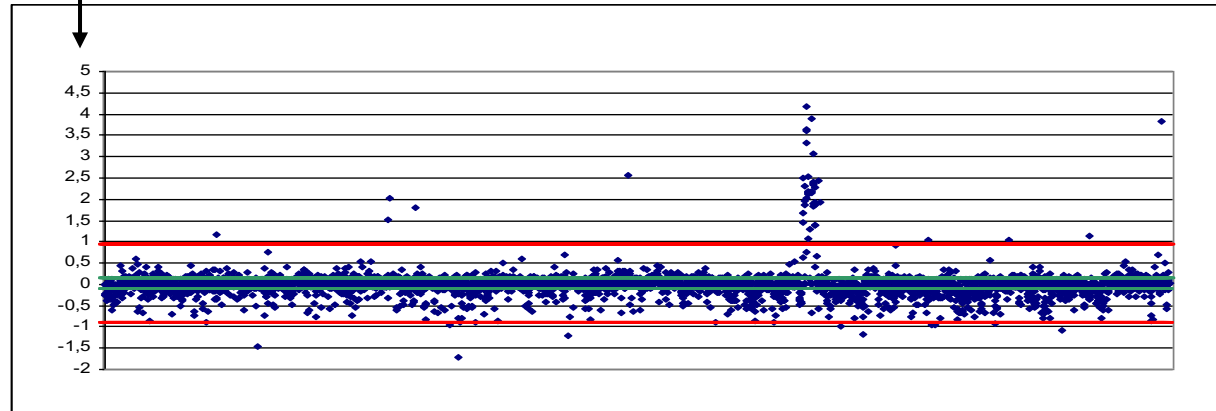
Mikromacierze-CGH (ang. *array comparative genomic hybridization*)



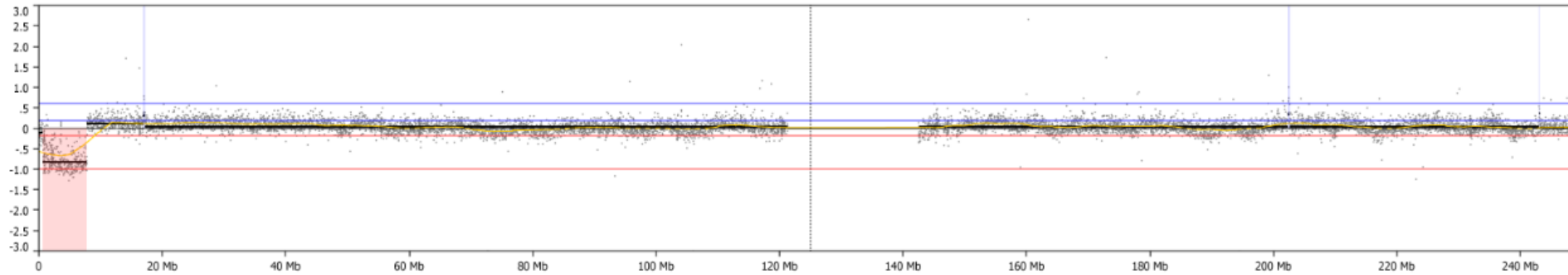
- karyotypowanie molekularne (analiza całego genomu z większą rozdzielczością)
- analiza niezrównoważonych aberracji chromosomowych (utrata materiału i/lub dodatkowy materiał genetyczny)
- kosztowna metoda (specjalistyczny sprzęt)

Mikromacierze-CGH

\log_2 intensywność fluorescencji DNA badanego /
intensywność fluorescencji DNA kontrolnego



Mikromacierze-CGH



Database of Genomic Variants

A curated catalogue of structural variation in the human genome

Hosted by:
The Centre for
Applied Genomics



[About The Project](#) | [Genome Browser](#) | [Download](#) | [Links](#) | [Data Submissions](#) | [Email us](#)

Please select genome assembly:

View Data by Chromosome

[1](#) [2](#) [3](#) [4](#) [5](#) [6](#) [7](#) [8](#) [9](#) [10](#) [11](#) [12](#) [13](#) [14](#) [15](#) [16](#) [17](#) [18](#) [19](#) [20](#) [21](#) [22](#) [X](#) [Y](#) [All](#)

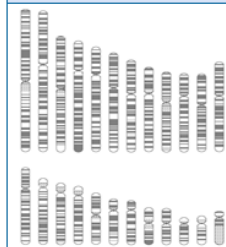
Keyword Search

Exact Match? Yes No
Examples: clone name, accession number, cytoband or gene

BLAT Search

Enter sequence in FASTA format here:

View Data by Genome



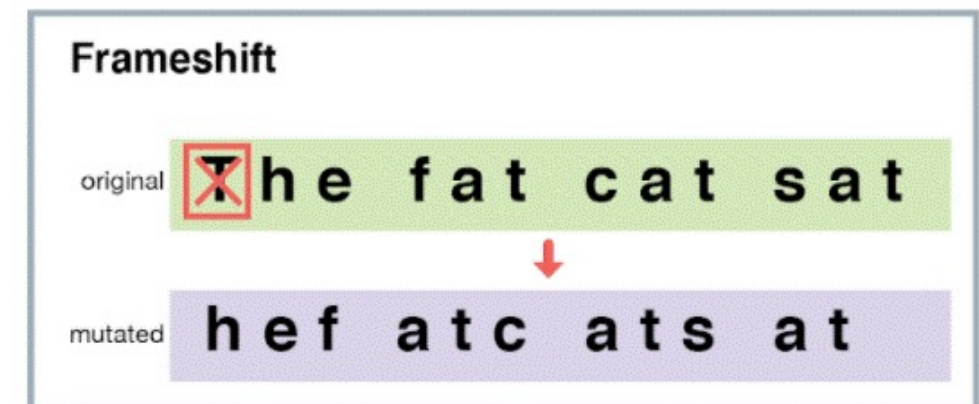
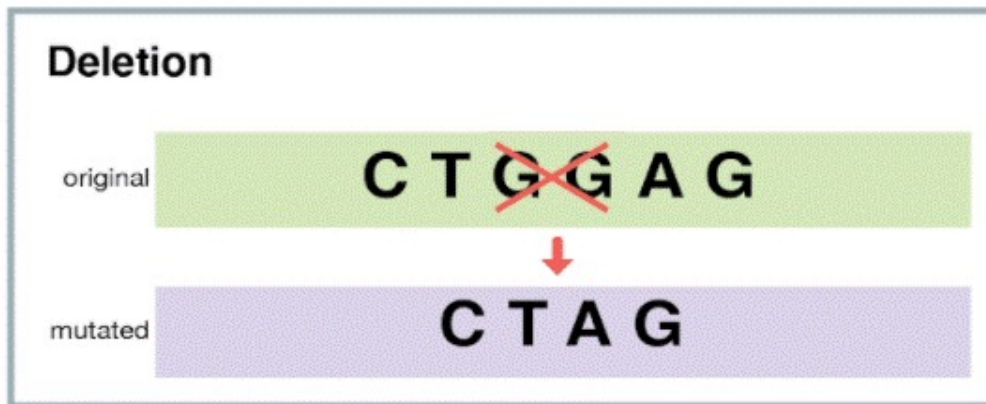
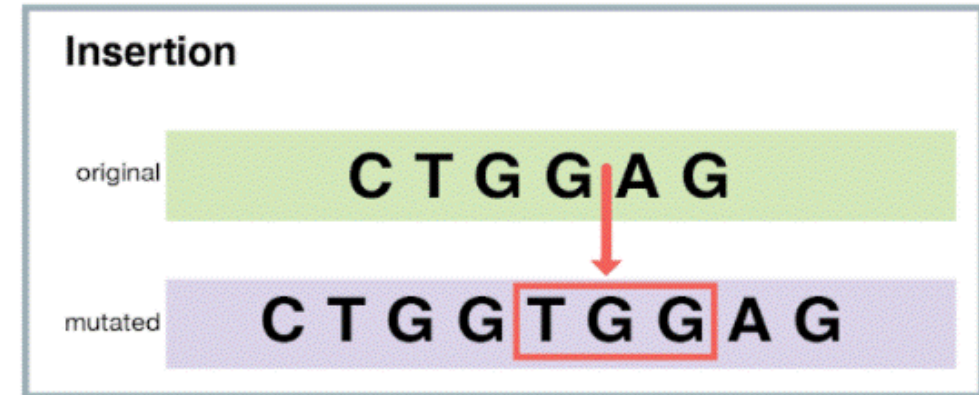
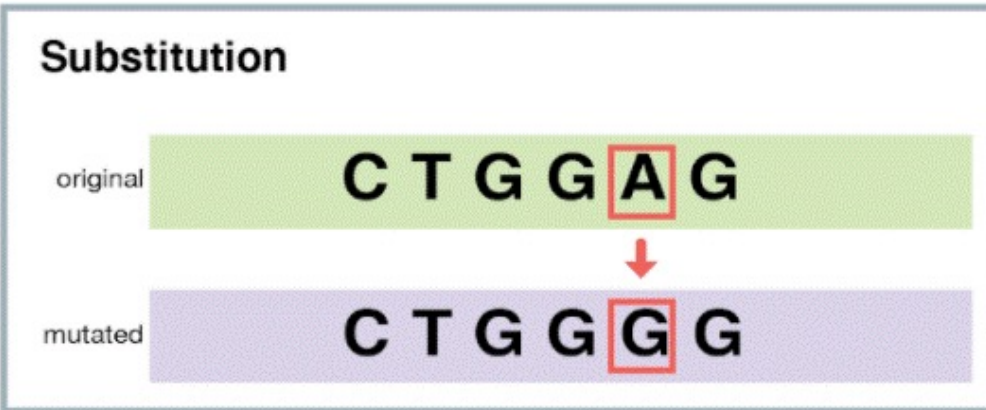
Summary Statistics

Total entries: 101923 (hg18)
CNVs: 66741
Inversions: 953
InDels (100bp-1Kb): 34229
Total CNV loci: 15963
Articles cited: 42
Last updated: Nov 02, 2010
Join our [mailing list](#)

Copy Number Variation (CNV):

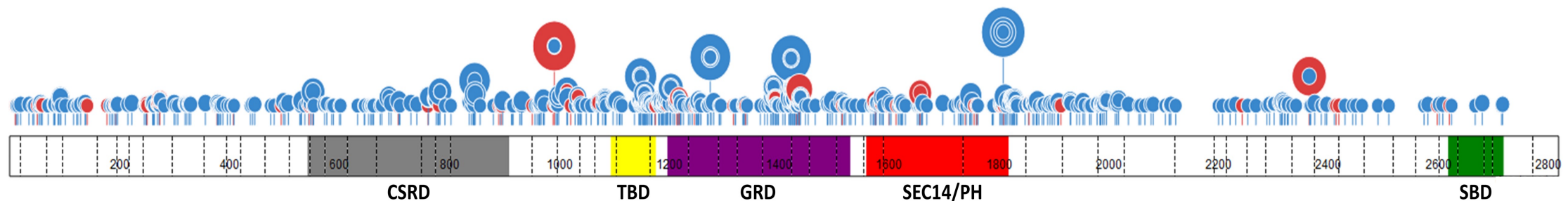
- pathogenic
- likely pathogenic
- benign
- likely benign
- variant of uncertain significance

Rodzaje wariantów genetycznych - warianty genowe (punktowe)



Spektrum wariantów patogennych w genie *NF1*

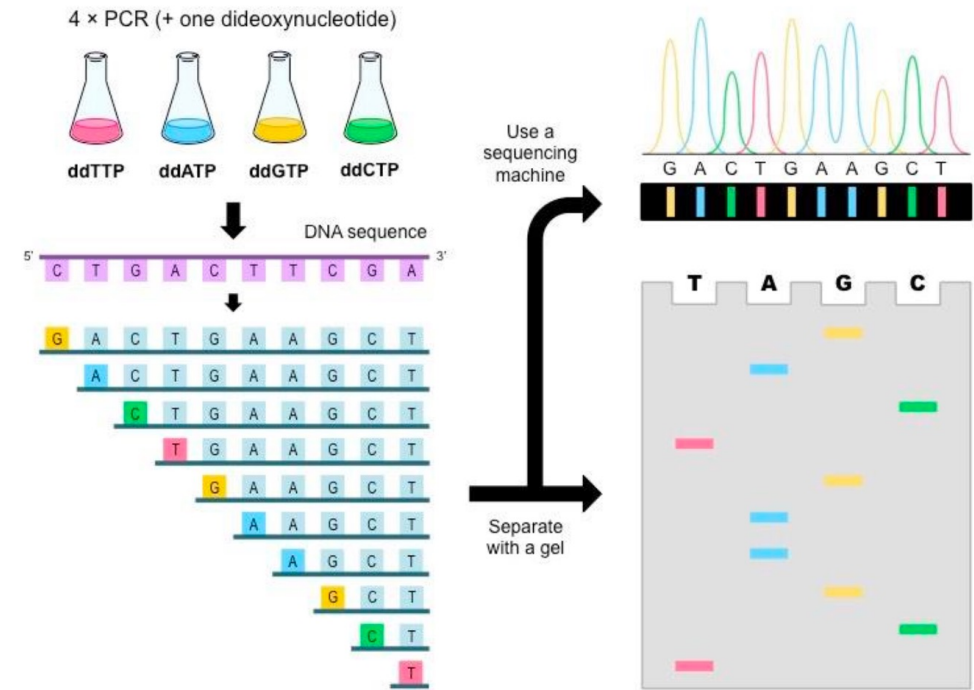
- **Heterogenność alleli** - zjawisko, w którym różne warianty patogenne w tym samym *locus* (genie) prowadzą do tych samych lub bardzo podobnych fenotypów, np. *CFTR*, *NF1*;
- **>3,500** wariantów patogennych w genie *NF1*, w tym tylko 31 wariantów z częstością $\geq 0.4\%$ (UAB);
- 50% wariantów to zmiany *de novo*;
- brak tzw. *hotspotów*;
- ~25% warianty typu *splicing*, w tym *deep intronic variants*;
- warianty typu *missense* (analiza predykcyjna *in-silico*).



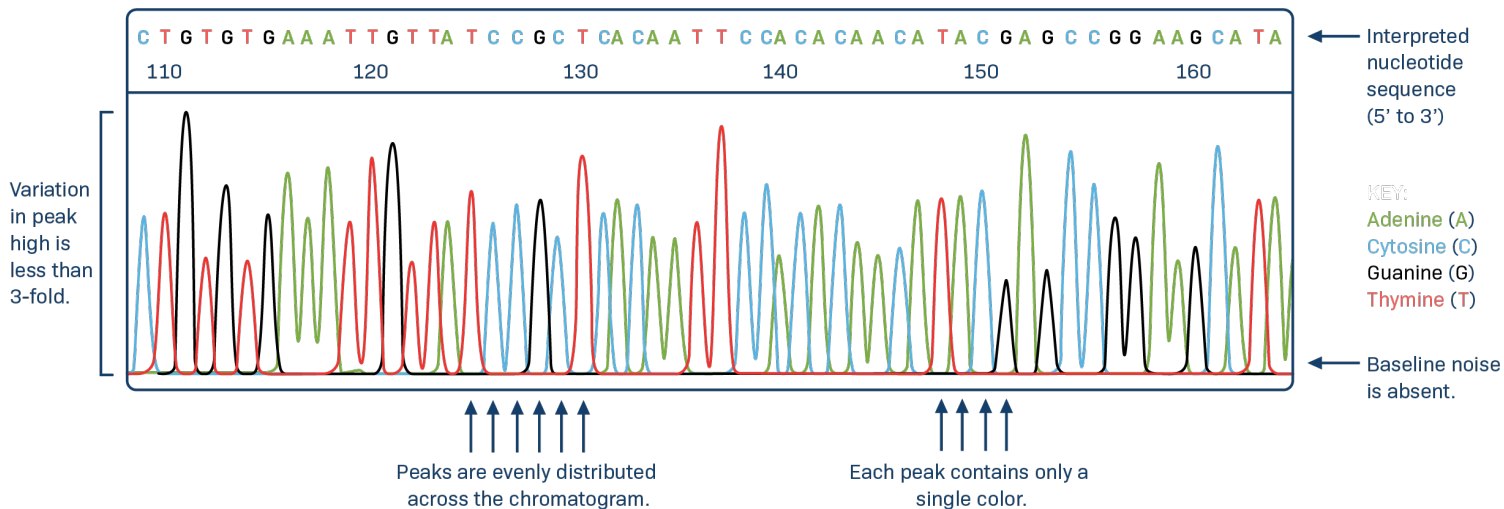
Sekwencjonowanie

Sekwencjonowanie - odczyt sekwencji nukleotydowej fragmentu DNA

Sekwencjonowanie Sangera (I generacji) - metoda terminacji łańcucha (detekcja z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej)



<http://www.onlinebiologynotes.com/sangers-method-gene-sequencing/>



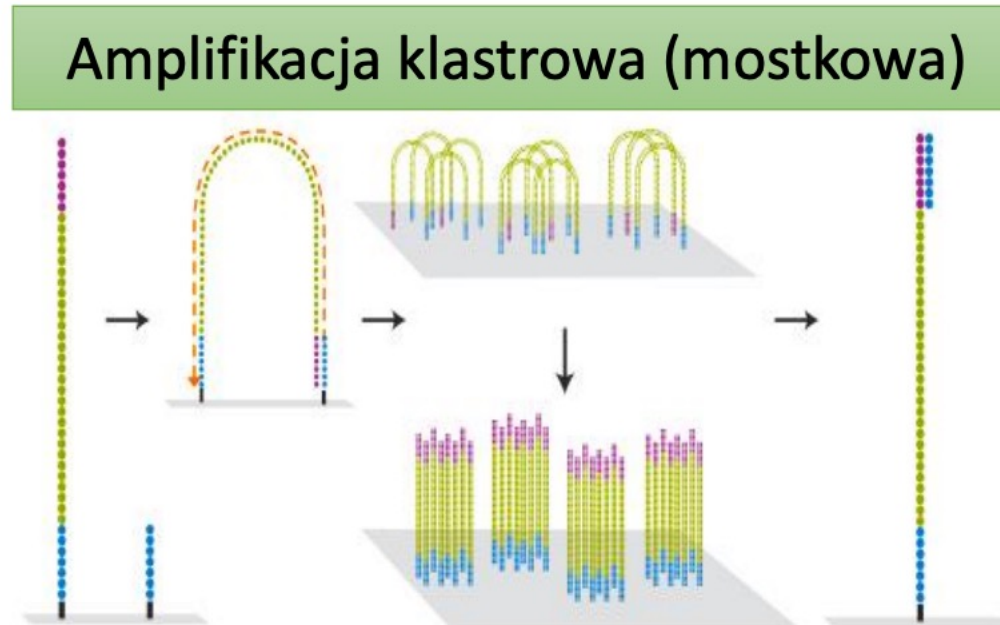
Sekwencjonowanie

Sekwencjonowanie następnej/nowej generacji

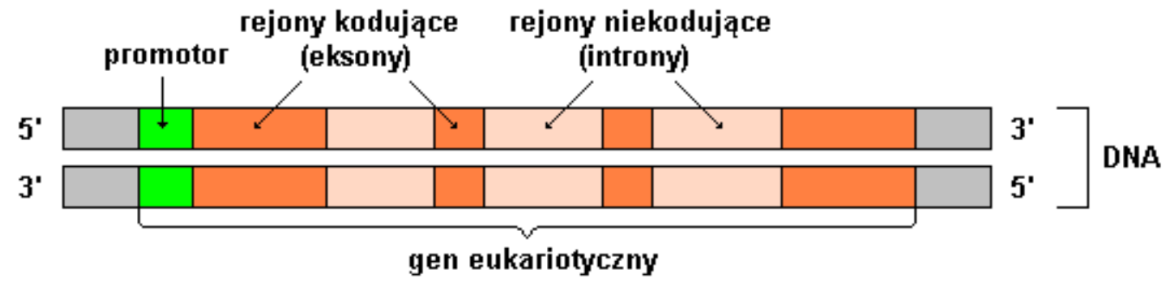
(ang. *next-generation sequencing*, NGS) -

wysokoprzepustowe sekwencjonowanie równoległe:

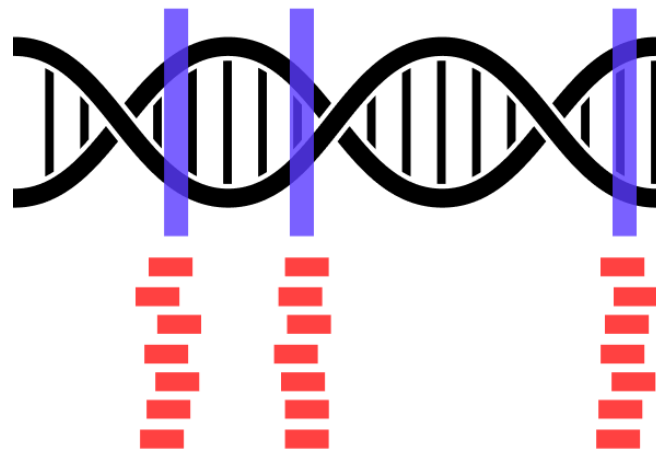
- **sekwencjonowanie II generacji** (np. Illumina - sekwencjonowanie krótkich odczytów)
- **sekwencjonowanie III generacji** (np. Nanopore Oxford Technology - sekwencjonowanie długich odczytów)



Diagnostyka molekularna



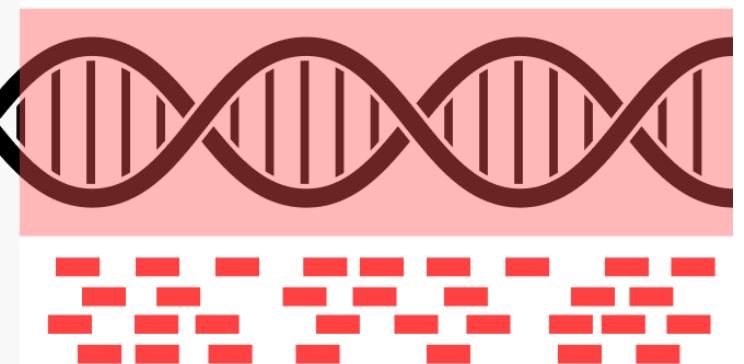
Targeted Sequencing
(Panels)



Whole Exome Sequencing
(WES)

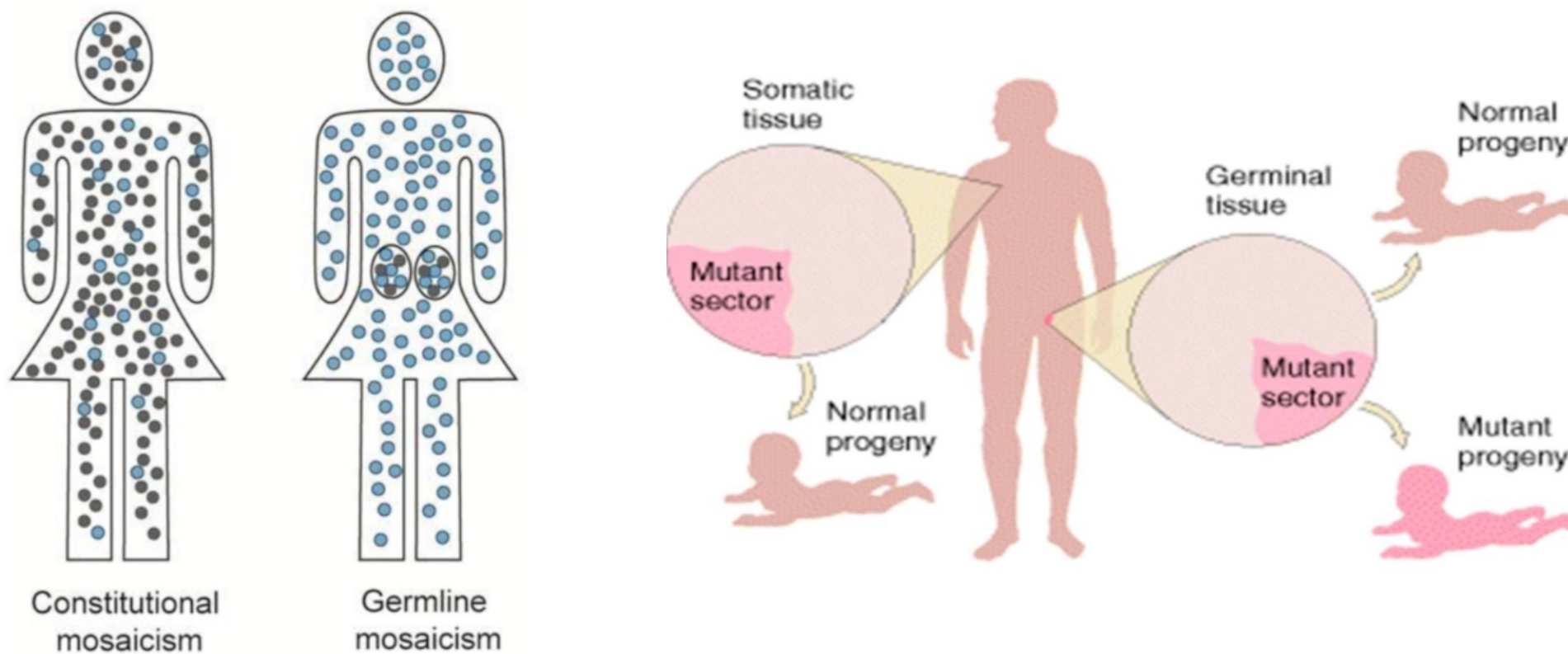


Whole Genome Sequencing
(WGS)



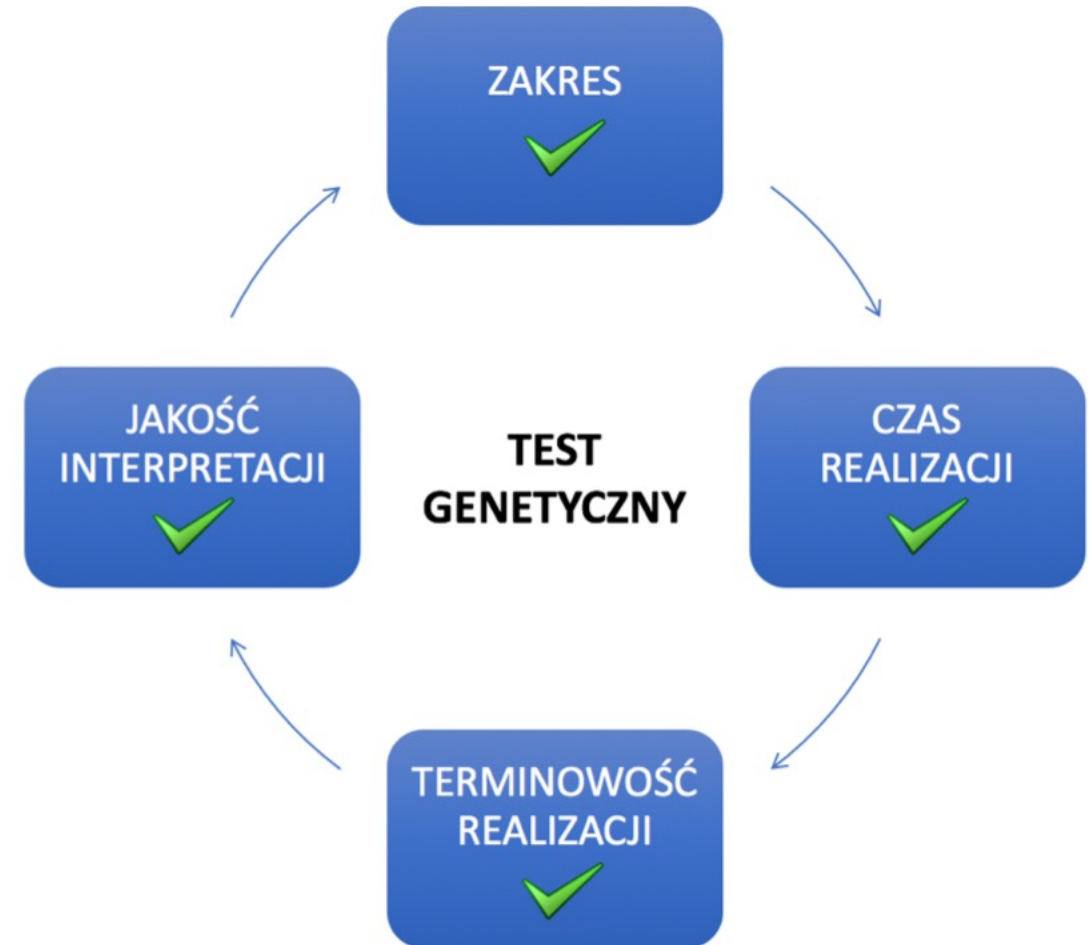
Mozaikowość (mozaicyzm)

Obecność u jednej osoby dwóch lub więcej linii komórkowych o różnym genotypie, które powstały z pojedynczej zygoty - **mozaikowość somatyczna i germlinalna**



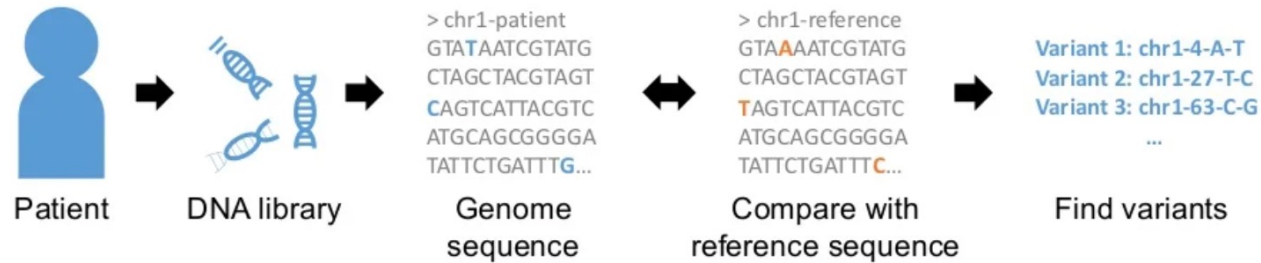
Interpretacja wyniku testu genetycznego

Otrzymanie prawidłowego wyniku oznaczenia w ramach wykonanej analizy molekularnej to tylko jeden z etapów diagnostyki genetycznej, a dopiero **prawidłowe przedstawienie wyniku pacjentowi wraz z interpretacją zgodną z najnowszymi doniesieniami literaturowymi oraz aktualnym stanem wiedzy w bazach danych** kończy proces prawidłowo wykonanego badania genetycznego.

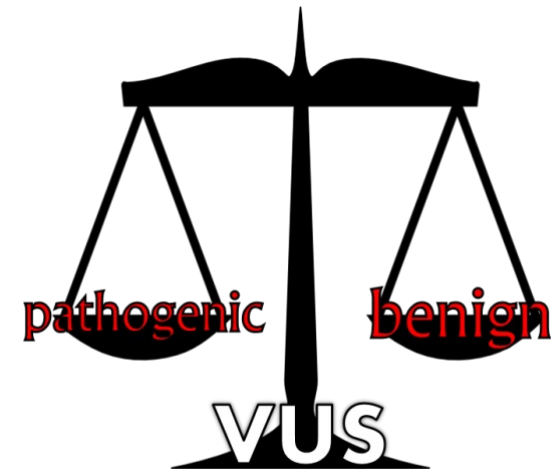
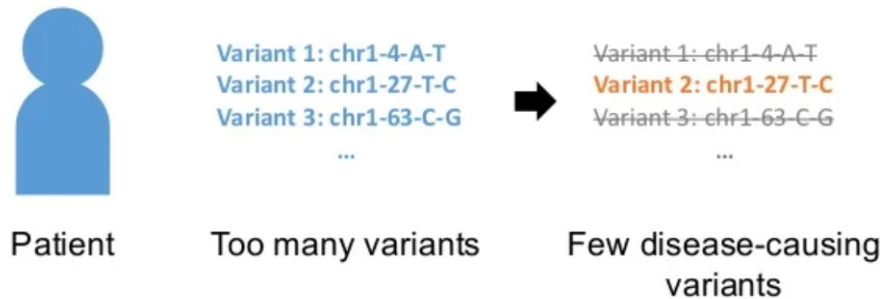


Interpretacja wyniku testu genetycznego

General workflow of genetic diagnosis of a patient



The problem is ...



→ How to select disease-causing variants correctly?

Warianty o nieznanym znaczeniu klinicznym

Gene	N in LOVD	% LOVD VUS	N in ClinVar	% ClinVar VUS/Conflict	% Single Submitter
NF1	15932	565 (3.5%)	8264	3516 (42.5%)	5387 (65.2%)
SPRED1	190	43 (22.6%)	474	230 (48.5%)	361 (76.2%)
NF2	160	30 (18.3%)	1175	635 (54%)	920 (78.3%)
SMARCB1	164	114 (69%)	728	339 (46.6%)	511 (70.2%)
LZTR1	198	67 (33.8%)	1321	560 (42.4%)	803 (60.8%)

ClinVar: ~50% to warianty o nieznanym znaczeniu klinicznym

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



- **mutation** ? permanent change in the nucleotide sequence
- **polymorphism** ? variant with a frequency above 1%



ACMG guidance for the interpretation of sequence variants

- pathogenic
- likely pathogenic
- uncertain significance
- likely benign
- benign

Interpretacja wyniku testu genetycznego

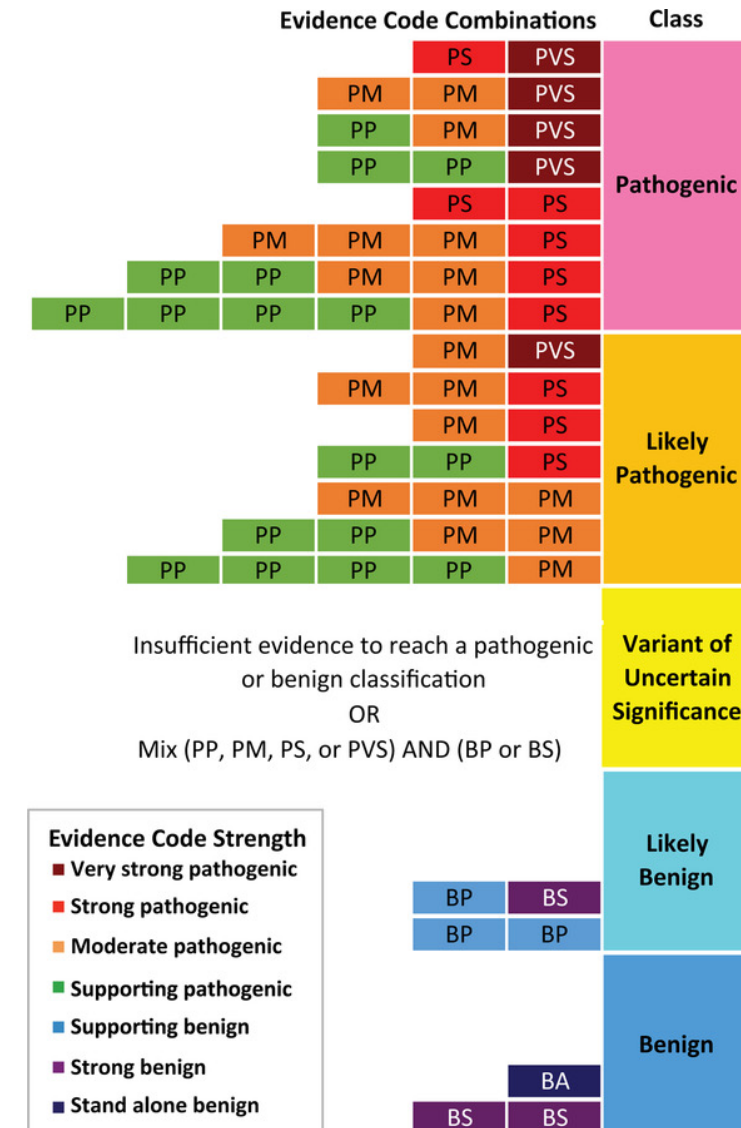
	Benign		Pathogenic			
	Strong	Supporting	Supporting	Moderate	Strong	Very strong
Population data	MAF is too high for disorder BA1/BS1 OR observation in controls inconsistent with disease penetrance BS2			Absent in population databases PM2	Prevalence in affecteds statistically increased over controls PS4	
Computational and predictive data		Multiple lines of computational evidence suggest no impact on gene /gene product BP4 Missense in gene where only truncating cause disease BP1 Silent variant with non predicted splice impact BP7 In-frame indels in repeat w/out known function BP3	Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene /gene product PP3	Novel missense change at an amino acid residue where a different pathogenic missense change has been seen before PM5 Protein length changing variant PM4	Same amino acid change as an established pathogenic variant PS1	Predicted null variant in a gene where LOF is a known mechanism of disease PVS1
Functional data	Well-established functional studies show no deleterious effect BS3		Missense in gene with low rate of benign missense variants and path. missenses common PP2	Mutational hot spot or well-studied functional domain without benign variation PM1	Well-established functional studies show a deleterious effect PS3	
Segregation data	Nonsegregation with disease BS4		Cosegregation with disease in multiple affected family members PP1	Increased segregation data →		
De novo data				De novo (without paternity & maternity confirmed) PM6	De novo (paternity and maternity confirmed) PS2	
Allelic data		Observed in <i>trans</i> with a dominant variant BP2 Observed in <i>cis</i> with a pathogenic variant BP2		For recessive disorders, detected in <i>trans</i> with a pathogenic variant PM3		
Other database		Reputable source w/out shared data = benign BP6	Reputable source = pathogenic PP5			
Other data		Found in case with an alternate cause BP5	Patient's phenotype or FH highly specific for gene PP4			

Kryteria:

- częstość występowania wariantu w populacji;
- analiza predykcyjna *in-silico*;
- badania funkcjonalne;
- dane dotyczące segregacji wariantu w rodzinie (*de novo*, segregacja z fenotypem);
- obecności innych wariantów u pacjenta z potencjalnie patogennym wariantem ...

Interpretacja wyniku testu genetycznego

	Benign		Pathogenic			
	Strong	Supporting	Supporting	Moderate	Strong	Very strong
Population data	MAF is too high for disorder BA1/BS1 OR observation in controls inconsistent with disease penetrance BS2			Absent in population databases PM2	Prevalence in affecteds statistically increased over controls PS4	
Computational and predictive data		Multiple lines of computational evidence suggest no impact on gene /gene product BP4 Missense in gene where only truncating cause disease BP1 Silent variant with non predicted splice impact BP7 In-frame indels in repeat w/out known function BP3	Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene /gene product PP3	Novel missense change at an amino acid residue where a different pathogenic missense change has been seen before PM5 Protein length changing variant PM4	Same amino acid change as an established pathogenic variant PS1	Predicted null variant in a gene where LOF is a known mechanism of disease PVS1
Functional data	Well-established functional studies show no deleterious effect BS3		Missense in gene with low rate of benign missense variants and path. missenses common PP2	Mutational hot spot or well-studied functional domain without benign variation PM1	Well-established functional studies show a deleterious effect PS3	
Segregation data	Nonsegregation with disease BS4		Cosegregation with disease in multiple affected family members PP1	Increased segregation data →		
De novo data				De novo (without paternity & maternity confirmed) PM6	De novo (paternity and maternity confirmed) PS2	
Allelic data		Observed in <i>trans</i> with a dominant variant BP2 Observed in <i>cis</i> with a pathogenic variant BP2		For recessive disorders, detected in <i>trans</i> with a pathogenic variant PM3		
Other database		Reputable source w/out shared data = benign BP6	Reputable source = pathogenic PP5			
Other data		Found in case with an alternate cause BP5	Patient's phenotype or FH highly specific for gene PP4			



Akredytacja i certyfikacja laboratoriów genetycznych

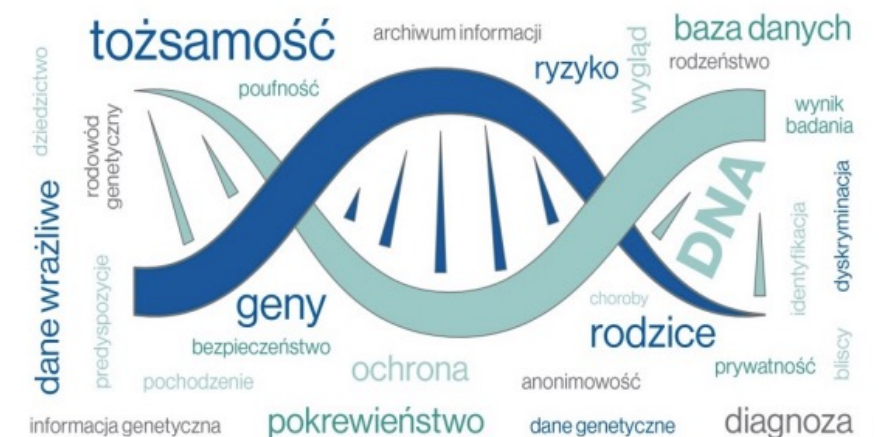


COLLEGE of AMERICAN
PATHOLOGISTS



Podsumowanie

- Badania genetyczne powinny być zlecone przez lekarza.
- Przed przystąpieniem do badania, prosimy dokładnie przeczytać **formularz świadomej zgody** i zadawać pytania, gdy coś jest niejasne, przed podpisaniem.
- Wybierajmy **laboratoria posiadające aktualne akredytacje i certyfikaty**.
- **Każdy** wynik badania genetycznego powinien być przekazywany pacjentowi przez lekarza razem z kompleksową interpretacją oraz poradą genetyczną.
- Wynik bez pełnej i zgodnej z najnowszymi danymi interpretacji klinicznej ma niewielkie znaczenie praktyczne.
- Badania genetyczne są często czasochłonne i kosztowne, a **interpretacja diagnostyczno-kliniczna uzyskanych wyników badań jest pracochłonna**.



Dziękuję za uwagę!

Dr n. med. Magdalena Koczkowska
Laboratorium Medycyny 3P
Gdański Uniwersytet Medyczny

email:

magdalena.koczkowska@gumed.edu.pl