


Alice Křebsová MD, PhD



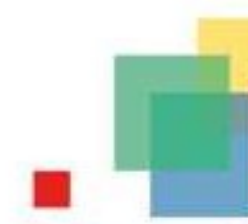
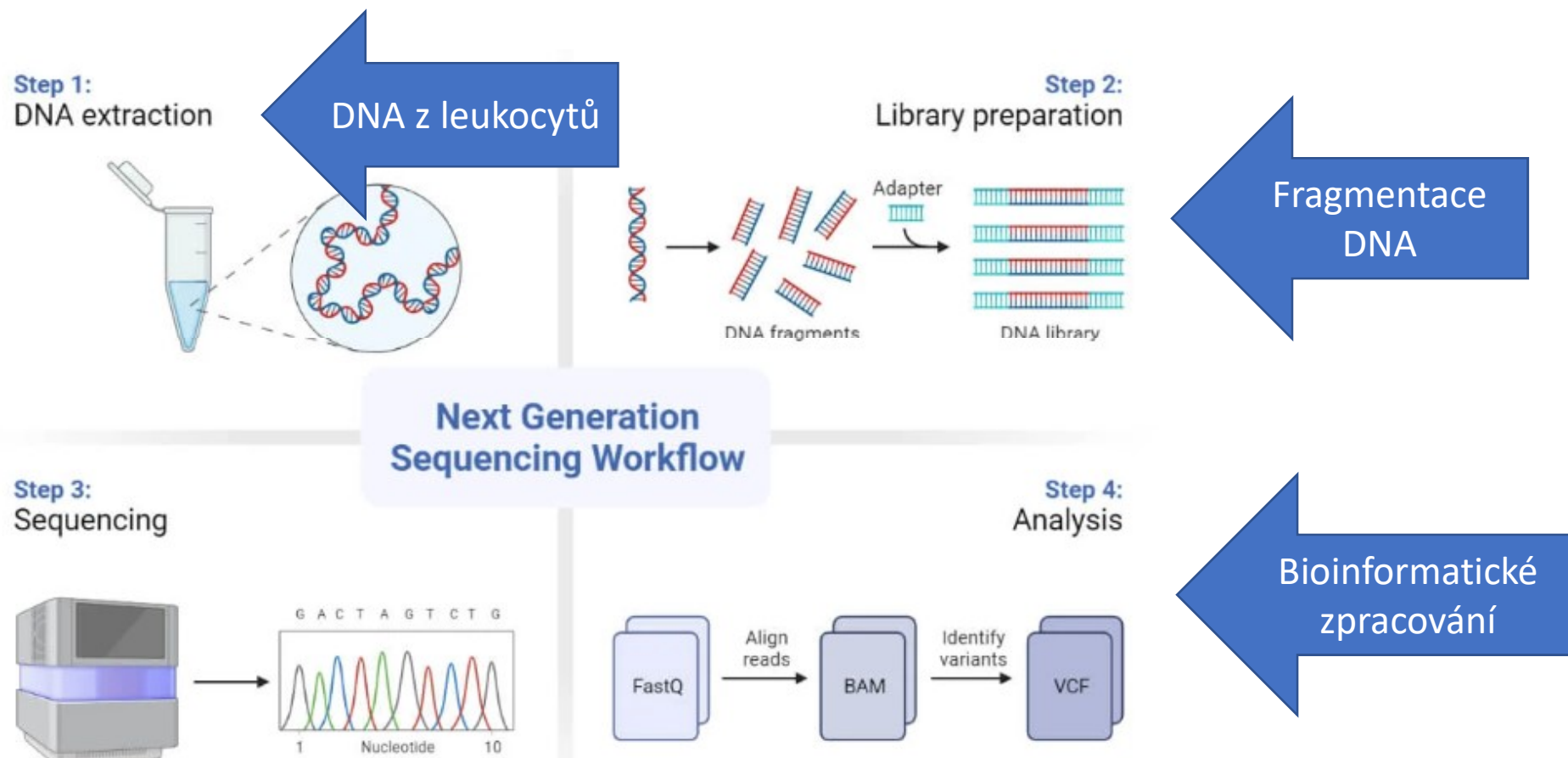
 **European Reference Network**
for rare or low prevalence complex diseases

 **Network**
Heart Diseases
(ERN GUARD-HEART)

 **Member**
IKEM – Institute of Clinical and Experimental Medicine
(Czechia)

Co dělat, když vyjde „VUS“

Princip molekulárně genetické analýzy v současné době – next generation sequencing (NGS)



Jak hodnotit výstupy z NGS?

		BENIGN CRITERIA		PATHOGENIC	
Strength of evidence		Strong	Supporting	Supporting	Moderate
Odds of Pathogenicity*		-18.7	-2.08	2.08	4.33
Evidence Category and Corresponding ACMG/AMP Codes	Population Data	BA1 ⁺ BS1 BS2			PM2
	Allelic Evidence & Cosegregation Data	BS4	BP2 BP5	PP1	
					PM3 PM6
	Computation & Predictive Data		BP1 BP3 BP4 BP7	PP2 PP3	PM1 PM4 PM5
	Functional Data	BS3			
	Other		BP6	PP4 PP5	

European Reference Network
for rare or low prevalence complex diseases

Genetic Variant Interpretation Tool (ACMG/AMP) - Czech

Czech translation

PHENO-product-level-category

sequencing ACMG Czech variant interpretation

This is a translation into Czech of the tool which can be found at:

http://www.medschool.umaryland.edu/Genetic_Variant_Interpretation_Tool1.html/

Phenosystems is grateful to Linda Jo Bone Jeng, MD, PhD, FACMG (ljeng@som.umaryland.edu for permission to reproduce a Czech translation of their tool. Věra Románková vera.romankova@ufmotol.cuni.cz for providing the Czech translation.

To aid our variant interpretation process, we created an openly-available online tool to efficiently classify variants based on the evidence categories outlined in article: Richards, et al. *Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants*. 2015. This site displays the evidence categories and descriptions in Table 3 and Table 4 with simple checkboxes for selecting appropriate criteria. The site then incorporates the algorithm in Table 5 to automatically assign the pathogenicity or benign impact based on the selected evidence categories. Since our process often requires analyzing multiple variants per patient, we have also allowed the option of aggregating each variant into an exportable table at the foot of the website for easy documentation of the variant review process for our records. This tool is based on the ACMG/AMP Standards and Guidelines, it is not affiliated with ACMG, AMP, or any of the authors of the publication.

Patient ID:

Variant ID:

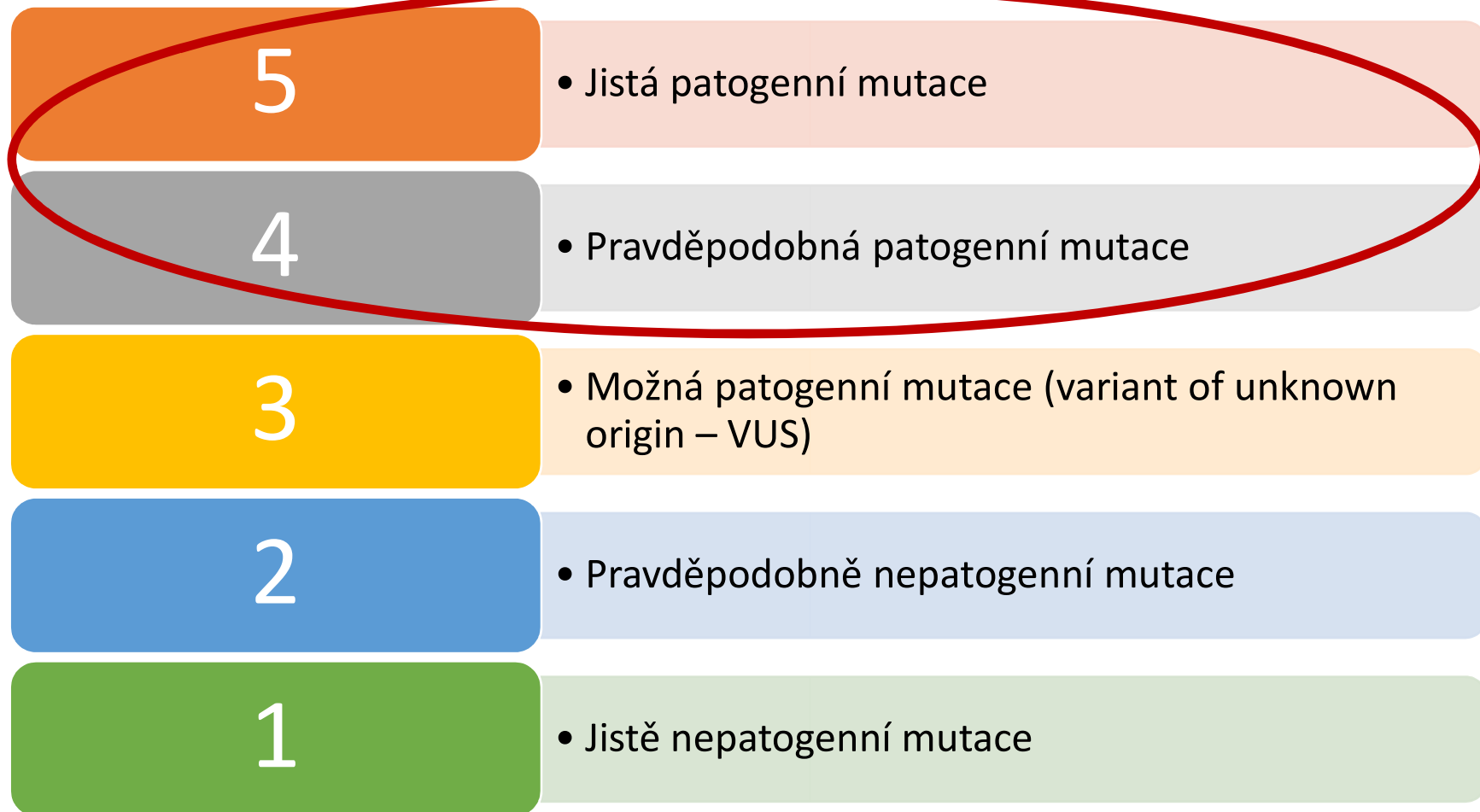
PVS1 specifické varianty typu nonsense, varianty posunující čtecí rámec, zasahující kanonické sestřihové místo +/- 2nt do intronu nebo iniciační kodonu v ≥ 1 exonu u genů, kde je známým patogenním mechanismem ztráta funkce (LOF)

- PS1 zjištěná nukleotidová záměna vede k aminokyselinové změně, která byla již dříve popsána jako patogenní
- PS2 de novo mutace detekovaná u probanda bez výskytu jeho onemocnění v rodinné anamnéze, varianta byla vyloučena u obou rodičů (rodičovství potvrzeno)
- PS3 dobře popsané in-vitro nebo in-vivo funkční studie dokládají škodlivý dopad na gen nebo genový produkt
- PS4 zastoupení varianty ve skupině nemocných osob je významně vyšší v porovnání se skupinou kontrol
- PP1 kosegregace varianty s onemocněním u několika postižených v rodině v genu, u kterého jsou známé patogenní varianty způsobující dané onemocnění

- PM1 varianta je lokalizována v oblasti s častým výskytem mutací nebo v dobře popsané funkční doméně bez benigních variant (např. aktivní místo)
- PM2 varianta se nevyskytuje v populaci kontrol (u recesivních onemocnění ve velmi nízké frekvenci) v Exome Sequencing Project, 1000 Genome Project, Exome Aggregation Consortium
- PM3 varianty detekované in trans se známou patogenní variantou u recesivních onemocnění
- PM4 vlivem delece/inzerce v nerepetitivní oblasti zachovávající čtecí rámec nebo stop-loss varianty dojde ke změně délky proteinu
- PM5 nová záměna na aminokyselinové úrovni v místě, kde byla již dříve popsána jiná patogenní varianta.
- PM6 predikovaná de-novo varianta bez ověření u rodičů
- PP1 (střední evidence) kosegregace varianty s onemocněním u několika postižených v rodině v genu, u kterého jsou známé patogenní varianty způsobující dané onemocnění.

PP1 kosegregace varianty s onemocněním u několika postižených v rodině v genu, u kterého jsou známé patogenní varianty způsobující dané onemocnění

Jak klasifikujeme nalezené DNA varianty



„Variant of unknown significance“ – VUS, klasifikace 3, dle ACMG: PM2, PP3

Efekt nalezené varianty je aktuálně zcela nejasný/neznámý

Varianta by neměla být referována pacientovi ani jeho ošetřujícímu lékaři

Nelze na jejím základě upravovat terapii

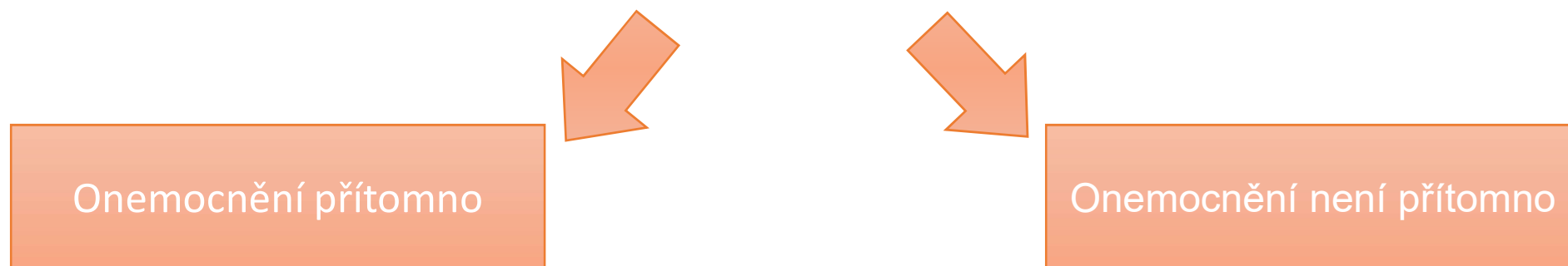
Nelze na jejím základě prediktivně testovat příbuzné

Je vhodná opakovaná re-analýza v intervalu cca 3-5 let



Kaskádové vyšetření v rodině musí být součástí genetického vyšetření

Kardiologické vyšetření prvostupňových příbuzných při nálezů VUS nebo NGS bez nálezů



- Kardiologická dispenzarizace s kompletní multidisciplinární péčí
- Nabídnout vyšetření potomků (vyšetření od cca. 10. roku života) (kaskáda)

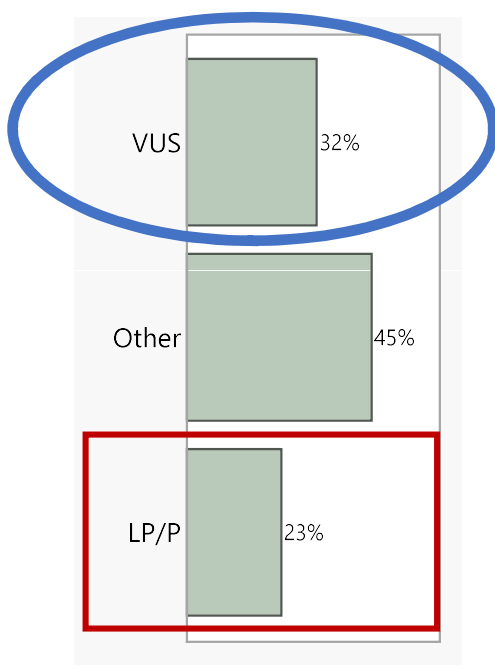
- Pokračování v pravidelných kontrolách **(2-5 let)** kvůli možnosti opožděného rozvoje onemocnění

Chybění genotypu/fenotypu u rodičů a může prokázat „de novo“ variantu (PS2)

DNA varianta je vždy u fenotyp + i druhostupňových příbuzných, nebo naopak chybí u fenotyp – příbuzných (PP2)

Reálné záchyty z naší databáze 2014-2024

Záchyt - celkem



Varianta	Počet	(%)
Celkem	4281	
Other	1932	45.1
VUS	1361	31.8
LP/P	988	23.1

LP/P varianty – zastoupené geny

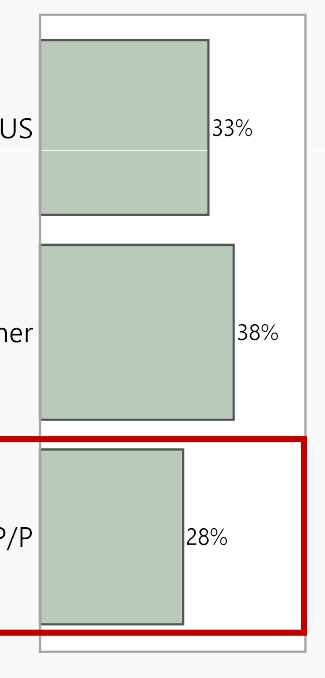
Gen	Počet	(%)
Celkem	966	
TTN	164	16.97
MYBPC3	103	10.66
MYH7	83	8.59
KCNQ1	46	4.76
PKP2	44	4.55
FBN1	41	4.24
SCN5A	36	3.72
KCNH2	28	2.89
FLNC	24	2.48
TNNT2	23	2.38
LMNA	20	2.07
DSP	18	1.86
TNNI3	14	1.44



Reálné záchyty z naší databáze 2014-2024

Kardiomyopatie (DCM, HCM, ACM, RCM, LVNC)

Záchyt

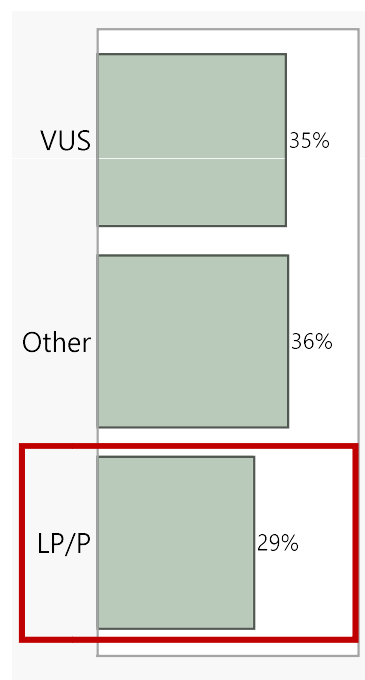


LP/P varianty

Gen	Počet	(%)
Celkem	620	
TTN	152	24.51
MYBPC3	97	15.64
MYH7	80	12.90
PKP2	38	6.12
FLNC	21	3.38
LMNA	20	3.22
TNNT2	20	3.22
DSP	18	2.90
TNNI3	14	2.25
SCN5A	11	1.77

Dilatační kardiomyopatie

Záchyt



LP/P varianty

Gen	Počet	(%)
Celkem	307	
TTN	142	46.25
FLNC	15	4.88
LMNA	15	4.88
TNNT2	12	3.90
BAG3	10	3.25
MYH7	10	3.25
DSP	8	2.60
RBM20	7	2.28
SCN5A	7	2.28
MYBPC3	6	1.95

Kde jsou molekulární příčiny jasně dědičných KVO?

Human Mutation
Variation, Informatics, and Disease



RESEARCH ARTICLE

Whole *MYBPC3* NGS sequencing as a molecular strategy to improve the efficiency of molecular diagnosis of patients with hypertrophic cardiomyopathy

Alexandre Janin, Valérie Chanavat, Pierre-Antoine Rollat-Farnier, Claire Bardel, Karine Nguyen, Philippe Chevalier, Jean-Christophe Eicher, Laurence Faivre, Juliette Piard ... See all authors ▾

First published: 15 November 2019 | <https://doi.org/10.1002/humu.23944> | Citations: 17

VÝSLEDEK VYŠETŘENÍ:

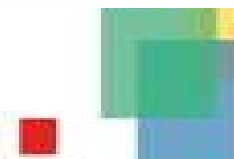
Virtuální panel - kardiomyopatie: bez nálezu varianty vysvětlující onemocnění, byla pouze detekována intronová dosud nepopsaná varianta v genu s asociací k AD rozvoji HCM - NM_000256.3(MYBPC3):c.2148+25A>C. V posledních letech se ukazuje, že tento typ variant v genu *MYBPC3* (např. c.1927+600C>T, c.1090+453C>T, c.1224-52G>A, c.1224-80G>A) tvoří významnou část HCM případů (PMID:31730716, 32396390), kauzalitu tudíž nelze vyloučit.

Analýza CNV (variability počtu kopií segmentu DNA ve vyšetřovaných genech): bez nálezu duplikace/delece

Vedlejší nálezy v genech dle doporučení ACMG^(#): bez nálezu

Less process
Reference
Network

for rare or low prevalence
complex diseases



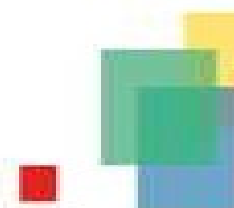
Různé transkripty – gen *PRKAG2*

NM_001304527.1

NM_016203.
4

NM_001304527.1(PRKAG2):c.13G>T (p.Gly5Trp), class 5

NM_016203.4(PRKAG2):c.466+45171G>T (brán v ClinVar jako kanonický, ale velmi pravděpodobně mylně)



Genomové sekvenování – sekvenování dlouhých fragmentů

WHOLE GENOME SEQUENCING

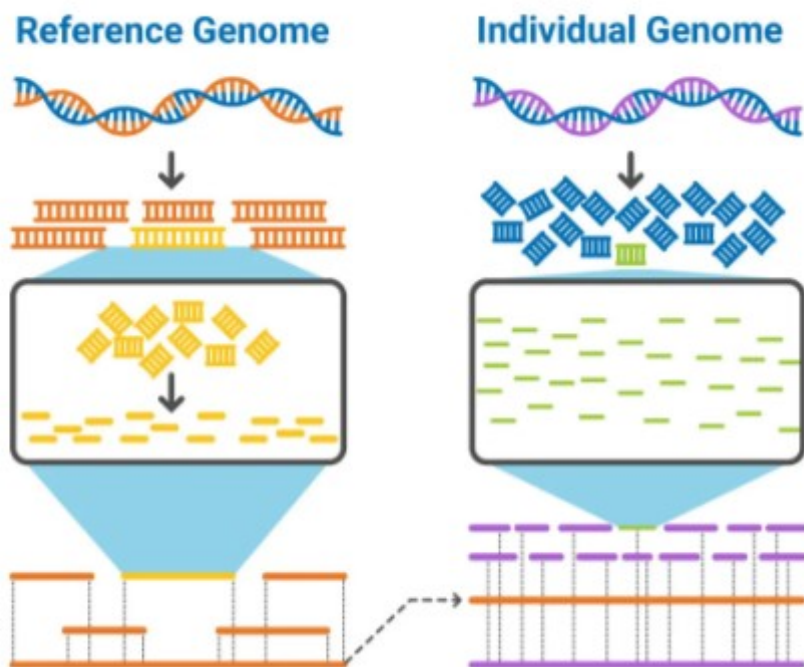
1 Break genome into large fragments and clone

2 Break individual clone into small fragments

3 Generate thousands of sequence reads

4 Assemble sequence reads for each clone

Reference genome



Snad nález DNA variant, které zanikly při fragmentaci NGS

Hluboko intronové varianty s efektem na transkripci

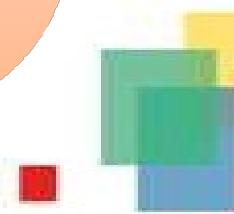
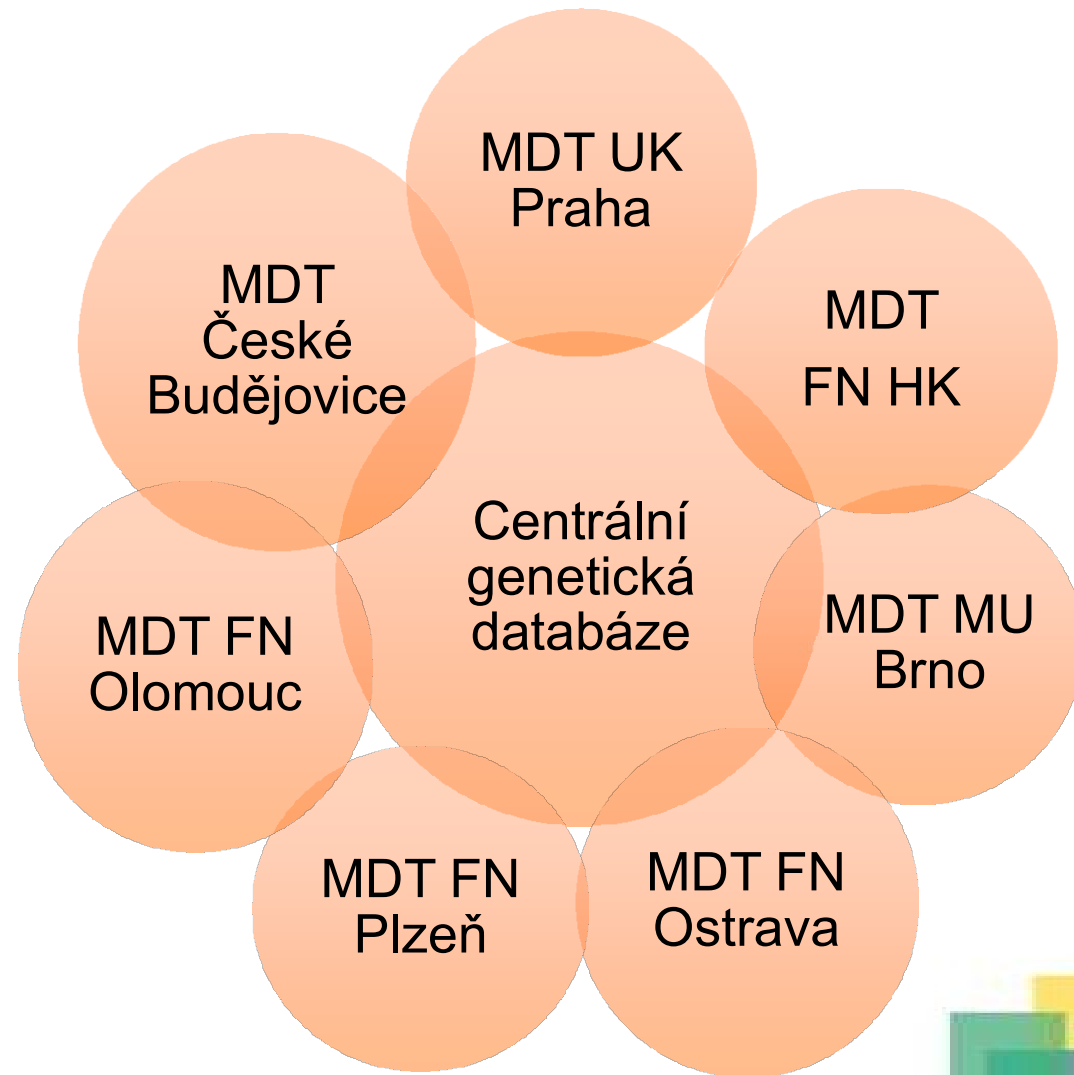
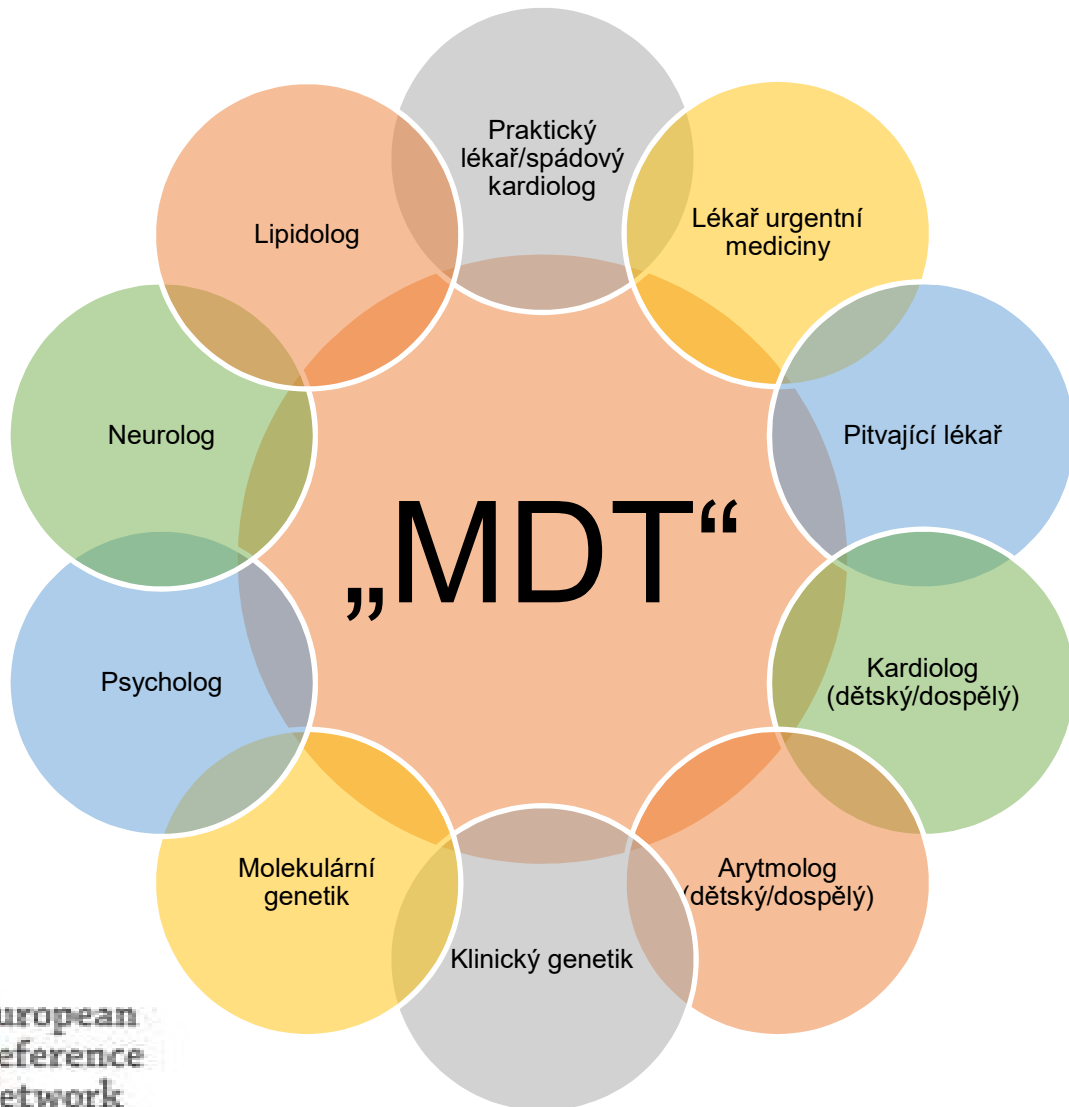
2 Generate millions of sequence reads

3 Align sequence reads into

RNA diagnostika (tkáň)



Multidisciplinární týmy v regionálních centrech



Závěry:

Určení dědičné příčiny onemocnění je aktuálně možné asi u 1/5 – 1/3 rodin

Negativní genetické vyšetření nevylučuje dědičnou formu

Opakované re-analýzy molekulárně genetických dat jsou nutné

Genomové sekvenování snad zvýší záchyt, ale bude nutno rozvinout RNA diagnostiku

VUS varianty není vhodné sdělovat pacientům ani jejich ošetřujícím klinikům až na výjimky (lokální MDT)

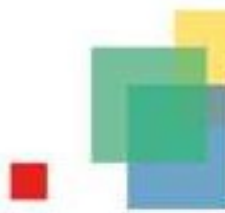
Kaskádový rodinný screening je vždy vhodný, může vést k další podpoře mínění o patogenicitě VUS varianty

Multidisciplinární regionální týmy!



Děkuji za pozornost!

alice.krebsova@ikem.cz



Popis nalezené varianty?

NM_000238.3(KCNH2): c.1600C>T, p.Arg534Cys, klasifikace 5, dle ACMG: PM1, PM2, PM5, PP3, PP5

Transkrip genu	Umístění DNA varianty na cDNA genu	Umístění varianty DNA na proteinu	Klasifikace	Kritéria ACMG:
NM_000238.3(KCNH2):	c.1600C>T	p.Arg534Cys	5	PM1, PM2, PM5, PP3, PP5
Každý gen má více RNA transkriptů, číslo transkriptu by mělo odpovídat tomu, který je přítomen v srdečním svalu.	Na pozici 1600 došlo k bodové změně cytosinu (C) na thymin (T)	V rámci sekvence genového produktu na pozici Argininu (Arg) se aminokyselina změnila na Cystein (Cys)	Jedná se o patologický variantu (P)	PM1: variant je v místě častých příčinných variant a důležité funkční domény genu PM2: DNA varianta není ve zdravé kontrolní populaci PM5: DNA variant je v místě aminokyseliny, kde byly popsány i jiné patologické varianty PP3: dle predikčních funkčních programů tato DNA varianta významně mění funkci genového produktu PP5: v jiné laboratoři již variantu identifikovali a označili za patologický

VUS (klasifikace 3), dle ACMG: PM2, PP3,

