

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ-ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ (2.1)

Εφαρμογή μεθόδων ανάλυσης VUS σε σπάνια νοσήματα -
παρουσίαση σε συνέδριο

GoMedPrecision

Υπεύθυνος Συντάκτης Παραδοτέου: Ζωή Λυγερού, Καθηγήτρια

Ομάδα Εργασίας: 2.1: "Εφαρμογή μεθόδων ανάλυσης VUS σε σπάνια νοσήματα -
παρουσίαση σε συνέδριο

Μήνας Ολοκλήρωσης: M15

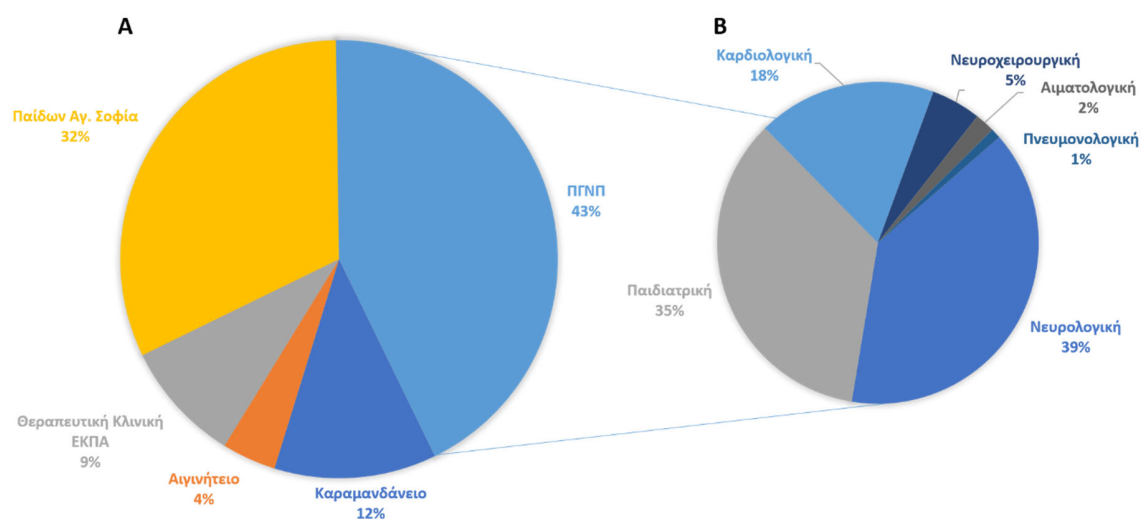
Συγγραφείς: Ιωάννα Παπαδιονυσίου, Βαλεντίνη Τζιμογιάννη, Ειρήνη
Βέλτσου, Καθ. Ζωή Λυγερού

Περίληψη: 2.1 “Εφαρμογή μεθόδων ανάλυσης VUS σε σπάνια νοσήματα -παρουσίαση σε συνέδριο

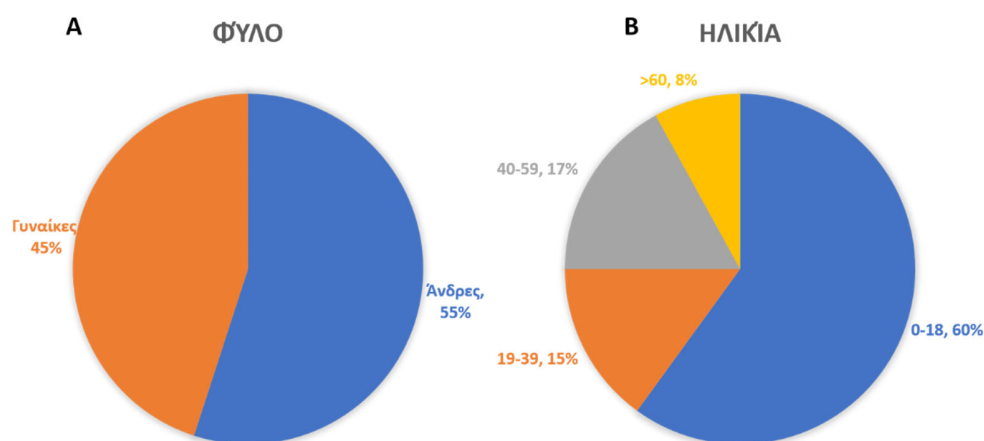
Κόορτη ασθενών με σπάνια νοσήματα

Η Αλληλούχιση Νέας Γενιάς (Next Generation Sequencing – NGS) αποτελεί μια επαναστατική τεχνολογία στη γονιδιωματική, η οποία έχει προσφέρει σημαντικά οφέλη στην κατανόηση και διάγνωση σπάνιων νοσημάτων. Μέσω της αλληλούχισης όλων των εξονίων του γονιδιώματος (Whole Exome Sequencing – WES) γίνεται δυνατός ο εντοπισμός παραλλαγών σε επίπεδο νουκλεοτιδίου, όπως αντικαταστάσεις, καθώς και μικρών ελλείψεων και προσθηκών (indels) εντός των κωδικοποιητικών περιοχών του συνόλου των γονιδίων του ανθρώπινου γονιδιώματος. Αντίθετα, για μεγάλες ελλείψεις/ προσθήκες ή άλλες δομικές παραλλαγές, καθώς και για τον εντοπισμό παραλλαγών που εδράζονται εκτός των κωδικοποιητικών περιοχών των γονιδίων, που δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν με WES, γίνεται αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing – WGS). Αυτή η τεχνολογία είναι πολύτιμη για τη διάγνωση γενετικών διαταραχών, αφού πολλές σπάνιες νόσοι οφείλονται σε τέτοιου τύπου γενετικές παραλλαγές. Με την έγκαιρη διάγνωση μέσω NGS, οι κλινικοί ιατροί μπορούν να προσφέρουν πιο στοχευμένη και αποτελεσματική φροντίδα στους ασθενείς, να προτείνουν κατάλληλες θεραπευτικές προσεγγίσεις και να προσφέρουν γενετική συμβουλευτική στον ασθενή και την οικογένειά του.

Το Ινστιτούτο Ιατρικής Ακρίβειας του Πανεπιστημίου Πατρών έχει υλοποιήσει αλληλούχιση όλων των εξονίων (WES) 400 ασθενών με σπάνια νοσήματα στην Ελλάδα, με σκοπό την εύρεση των υπεύθυνων γονιδίων, ένα βήμα καθοριστικό για την πρόγνωση, επιλογή θεραπείας, ένταξη σε κλινικές μελέτες νέων φαρμάκων και γενετική συμβουλευτική. Η κόορτη ασθενών που έχει δημιουργηθεί αποτελείται τόσο από παιδιατρικούς όσο και από ενήλικους ασθενείς, από διαφορετικά νοσηλευτικά ιδρύματα και κλινικές της χώρας (Εικόνα 1), ενώ συμπεριλήφθηκαν διάφοροι φαινότυποι, που κυμαίνονται από νευροαναπτυξιακές και νευρολογικές/νευρομυϊκές καταστάσεις έως διαταραχές ανάπτυξης, μεταβολικές, καρδιαγγειακές και σκελετικές ανωμαλίες. Επιπλέον, ορισμένα δημογραφικά στοιχεία φαίνονται στην Εικόνα 2.



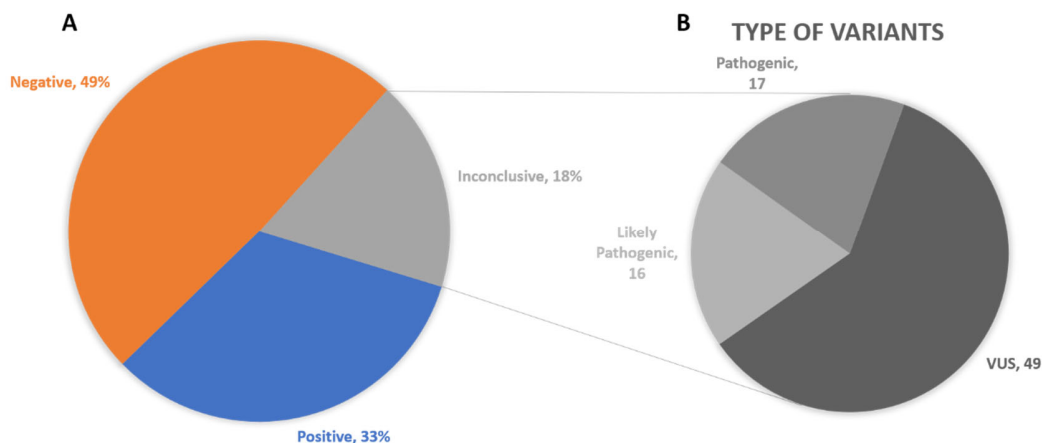
Εικόνα 1: Συμμετέχοντα νοσηλευτικά ιδρύματα και κλινικές. (Α) Ποσοστό εγγεγραμμένων ασθενών ανά νοσηλευτικό ίδρυμα. **(Β)** Ποσοστό εγγεγραμμένων ασθενών ανά κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Πατρών (ΠΓΝΠ).



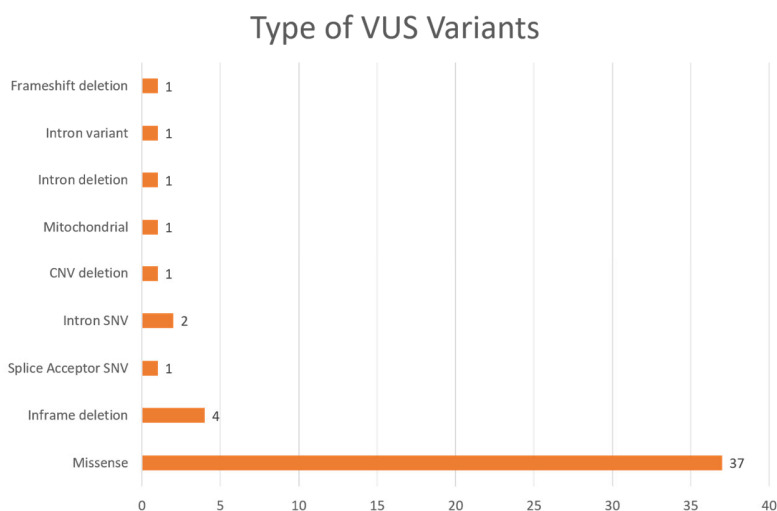
Εικόνα 2: Δημογραφικά στοιχεία συμμετεχόντων ασθενών. (Α) Ποσοστό συμμετεχόντων ανδρών και γυναικών. **(Β)** Ηλικιακή κατανομή συμμετεχόντων.

Η αρχική ανάλυση των δεδομένων WES προσδιόρισε την υποκείμενη γενετική αιτία στο 33% των περιπτώσεων, παρέχοντας ένα θετικό αποτέλεσμα. Επιπλέον, στο 18% των περιπτώσεων, εντοπίστηκε παραλλαγή αγνώστου κλινικής σημασίας (Variant of Uncertain Significance – VUS), δίνοντας ένα μη καθοριστικό αποτέλεσμα, ενώ στο 49% των περιστατικών δεν εντοπίζονται σχετιζόμενες παραλλαγές υπογραμμίζοντας την ανάγκη

πραιτέρω ανάλυσης (Εικόνα 3). Τέλος, η πλειοψηφία των VUS παραλλαγών που έχουμε εντοπίσει αποτελούν παραλλαγές αντικατάστασης βάσης (Εικόνα 4).



Εικόνα 3: Αποτελέσματα WES. (A) Το 33% των περιστατικών ήταν θετικά, το 18% ήταν ασαφή (εντοπίστηκαν παραλλαγές αγνώστου κλινικής ή Παθογόνες (Pathogenic) /Πιθανώς Παθογόνες (Likely Pathogenic) παραλλαγές σε γονίδια αγνώστου σημασίας για το εκάστοτε νόσημα ή σε ετεροζυγωτία σε αυτοσωμικές υπολειπόμενες ασθένειες) και το 49% ήταν αρνητικά. (B) Πλήθος παθογόνων, πιθανώς παθογόνων παραλλαγών και παραλλαγών αγνώστου κλινικής σημασίας που εντοπίστηκαν στα περιστατικά με ασαφές αποτέλεσμα.



Εικόνα 4: Διαφορετικοί τύποι παραλλαγών αγνώστου κλινικής σημασίας. Έχουν εντοπιστεί 37 παραλλαγές αντικατάστασης βάσης (missense), 4 διαγραφής εντός αναγνωστικού πλαισίου (inframe deletion), 2 προσθήκης ενός νουκλεοτιδίου (intron SNV), 1 αλλαγής αναγνωστικού πλαισίου λόγω διαγραφής (frameshift deletion), 1 παραλλαγή σε ιντρονική περιοχή (intron variant), 1 διαγραφής σε ιντρονική περιοχή (intron deletion), 1 σε τμήμα του μιτοχονδριακού DNA (mitochondrial), 1 παραλλαγής αριθμού αντιγράφων από διαγραφή (CNV deletion) και 1 (splice acceptor SNV).

Στόχος μελέτης

Στόχος της μελέτης είναι η ανάλυση της κοόρτης των ασθενών με σπάνια νοσήματα με σκοπό την εύρεση των υπεύθυνων γονιδίων και την αξιολόγηση μεθόδων πρόβλεψης παθογονικότητας παραλλαγών.

Για την επίτευξη του στόχου αυτού ακολουθούνται διαφορετικές στρατηγικές:

1. Αξιολόγηση των παραλλαγών άγνωστης κλινικής σημασίας (VUS) με τη χρήση *in silico* εργαλείων, βάσεων δεδομένων και βιβλιογραφίας.
2. Ανάλυση σε επίπεδο οικογένειας (Segregation Analysis).
3. Συνδυαστική ανάλυση πολλαπλών γενετικών τόπων και ομικών δεδομένων.
4. WGS σε ασθενείς για τους οποίους η ανάλυση WES δεν οδήγησε σε αποτέλεσμα.

1. Αξιολόγηση παραλλαγών άγνωστης κλινικής σημασίας με τη χρήση *in silico* εργαλείων, βάσεων δεδομένων και βιβλιογραφίας

Για την επαναξιολόγηση παραλλαγών άγνωστης κλινικής σημασίας χρησιμοποιήθηκαν πολλαπλές βάσεις δεδομένων και εργαλεία, όπως τα κατωτέρω:

- <https://franklin.genoox.com>
- <https://varsome.com>
- <https://alphamissense.hegelab.org>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>
- <https://gnomad.broadinstitute.org>
- <https://spliceailookup.broadinstitute.org>

Η διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει τον έλεγχο των κριτηρίων της ACMG που μπορούν να εφαρμοστούν για κάθε παραλλαγή καθώς και την αναζήτηση της εκάστοτε παραλλαγής στη βιβλιογραφία. Βάσεις δεδομένων όπως η Franklin, Varsome και Clinvar χρησιμοποιούνται για τη διερεύνηση προϋπάρχουσας γνώσης και ευρημάτων άλλων ερευνητών. Με τη χρήση του GnomAD ελέγχεται η συχνότητα εμφάνισης κάθε παραλλαγής στον πληθυσμό. Επιπρόσθετα, με το SpliceAI εξετάζεται η πιθανότητα με την οποία η παραλλαγή που μελετάται να επηρεάζει το εναλλακτικό μάτισμα.

Για παραλλαγές αντικατάστασης βάσης που οδηγούν σε παρανοηματικές μεταλλάξεις χρησιμοποιείται το εργαλείο τεχνητής νοημοσύνης AlphaMissense με το οποίο γίνεται πρόβλεψη της παθογονικότητας με βάση τον αλγόριθμο πρόβλεψης δομής AlphaFold. Με τον αλγόριθμο αυτό υπολογίζεται το αντίκτυπο μιας παραλλαγής στη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης. Η παθογονικότητα εκφράζεται με το «σκορ παθογονικότητας» (pathogenicity score) του οποίου οι τιμές κυμαίνονται από 0-1 (0-0.34: πιθανώς μη παθογόνες παραλλαγές, 0.35-0.55 ασαφείς και 0.56-1 πιθανώς παθογόνες παραλλαγές). Στον Πίνακα 1 παρατίθεται το σκορ παθογονικότητας VUS παραλλαγών που έχουμε εντοπίσει στην κοόρτη ασθενών με σπάνια νοσήματα. Παρατηρούμε πως 21 από τις 34 παραλλαγές αντικατάστασης βάσης εμφανίζουν σκορ παθογονικότητας > 0.56, το οποίο τις καθιστά πιθανώς παθογόνες. Η μελέτη της συνκληρονόμησης αυτών των παραλλαγών με το νόσημα, που μπορεί να επιτευχθεί μέσω της ανάλυσης σε επίπεδο οικογένειας, θα μπορούσε να συμβάλλει στην εξακρίβωση της παθογονικότητάς τους.

Πίνακας 1: Πρόβλεψη παθογονικότητας με τη χρήση του in silico εργαλείου «AlphaMissense». Με πορτοκαλί παρουσιάζονται οι πιθανώς παθογόνες παραλλαγές (Likely Pathogenic -LP), με μπλε οι πιθανώς μη παθογόνες παραλλαγές (Likely Benign -LB) και με άσπρο οι ασαφείς (Ambiguous - Amb).

A/A	Γονίδιο	Όνομα παραλλαγής	AlphaMissense	
1	GNB4	NM_021629.4:c.43C>T	0.765	LP
2	SH3TC2	NM_024577.4:c.3526T>G	0.863	LP
3	GDAP1	NM_018972.4:c.213G>C	0.832	LP
4	EMD	NM_000117.3:c.553T>C	0.099	LB
5	DDX11	NM_030653.4:c.1630G>C	0.075	LB
6	XDH	NM_000379.4:c.2413C>T	0.763	LP
7	GRIN2A	NM_001134407.3:c.253C>G	0.386	Amb
8	SLC10A1	NM_003049.4:c.806T>G	0.962	LP
9	PYCR2	NM_013328.4:c.40G>C	0.975	LP
10	SLC12A1	NM_000338.3:c.1757G>A	1	LP
11	EFL1	NM_024580.6:c.3271A>C	0.415	Amb
12	PMP22	NM_000304.4:c.124T>C	0.986	LP
13	IKZF5	NM_001372123.1:c.459G>C	0.969	LP
14	GDAP1	NM_018972.4:c.113A>G	0.981	LP

15	ATP2A1	NM_004320.6:c.2464C>T	0.991	LP
16	ABCD1	NM_000033.4:c.848A>C	0.973	LP
17	BCORL1	NM_001379451.1:c.5101G>A	0.859	LP
18	NR5A1	NM_004959.5:c.990G>C	0.32	LB
19	ACTA1	NM_001100.4:c.795G>T	0.813	LP
20	TNPO3	NM_001382216.1:c.1397T>C	0.991	LP
21	RYR2	NM_001035.3:c.6997C>T	0.883	LP
22	LDLR	NM_000527.5:c.949G>A	0.472	Amb
23	KCNQ2	NM_172107.4:c.2258C>T	0.239	LB
24	SNTA1	NM_003098.3:c.220C>G	0.053	LB
25	MYH2	NM_017534.6:c.1463T>C	1	LP
26	ALDH18A1	NM_002860.4:c.1502T>C	0.965	LP
27	COQ4	NM_016035.5:c.238C>T	0.091	LB
28	ABCD1	NM_000033.4:c.542A>G	0.898	LP
29	GDF6	NM_001001557.4:c.619del	0.119	LB
30	KCNH2	NM_000238.4:c.580G>A	0.28	LB
31	MYH6	NM_002471.4:c.1408G>T	0.881	LP
32	MYH7	NM_000257.4:c.4348G>A	0.874	LP
33	RYR2	NM_001035.3:c.995G>A	0.147	LB
34	NPR2	NM_003995.4:c.1484G>A	0.123	LB

2. Ανάλυση σε επίπεδο οικογένειας – Segregation Analysis

Η ανάλυση σε επίπεδο οικογένειας είναι μια γενετική ανάλυση με την οποία μελετάται ο τρόπος κληρονομής των παραλλαγών μεταξύ των μελών μιας οικογένειας. Παράλληλα, διερευνάται η συσχέτιση των παραλλαγών με το εκάστοτε νόσημα και η παθογονικότητα των μελετώμενων παραλλαγών.

Για την ανάλυση σε επίπεδο οικογένειας των γενετικών παραλλαγών (παθογόνων, πιθανώς παθογόνων ή αγνώστου κλινικής σημασίας) που εντοπίζονται μέσω WES σε ασθενείς, ακολουθείται η εξής διαδικασία. Γίνεται λήψη ολικού περιφερικού αίματος από τους ασθενείς και συγγενείς πρώτου ή/και δευτέρου βαθμού από το οποίο απομονώνεται ολικό γενωμικό DNA. Στη συνέχεια, ακολουθεί ο σχεδιασμός κατάλληλων εκκινήτων για την ενίσχυση της περιοχής ενδιαφέροντος, στην οποία εντοπίζεται η μελετώμενη παραλλαγή. Η ενίσχυση των περιοχών γίνεται μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και τέλος, η αλληλούχιση της περιοχής ενδιαφέροντος πραγματοποιείται μέσω αλληλούχισης Sanger.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων αλληλούχισης Sanger γίνεται αντιστοίχιση της αλληλουχίας της ενισχυμένης περιοχής με το γονιδίωμα αναφοράς, κατά την οποία επιβεβαιώνεται η ύπαρξη της μελετώμενης παραλλαγής στον ασθενή, ενώ διερευνάται η ύπαρξή της στα συγγενικά μέλη. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με το σχεδιασμό του

γενεαλογικού δέντρου, τον επανέλεγχο της κατηγοριοποίησης της παραλλαγής, ανάλογα την παθογονικότητάς της, και την ενημέρωση των παραπέποντων ιατρών για το τελικό αποτέλεσμα.

Μέχρι στιγμής, έχει πραγματοποιηθεί ανάλυση σε επίπεδο οικογένειας για 9 παραλλαγές άγνωστης κλινικής σημασίας, εκ των οποίων 7 προβλέπεται μέσω *in silico* εργαλείων να είναι Πιθανώς Παθογόνες και 2 Πιθανά Μη Παθογόνες. Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν για 4 από αυτές ήταν ικανά για την επανακατηγοριοποίησή τους από παραλλαγές Άγνωστης κλινικής σημασίας σε Πιθανώς παθογόνες παραλλαγές. Τέλος, για ορισμένες παραλλαγές τα δεδομένα μας δεν ήταν επαρκή για την επανακατηγοριοποίηση τους, ωστόσο είναι συμβατά με την παθογονικότητα που προβλέπεται από το εργαλείο AlphaMissense. (Πίνακας 3)

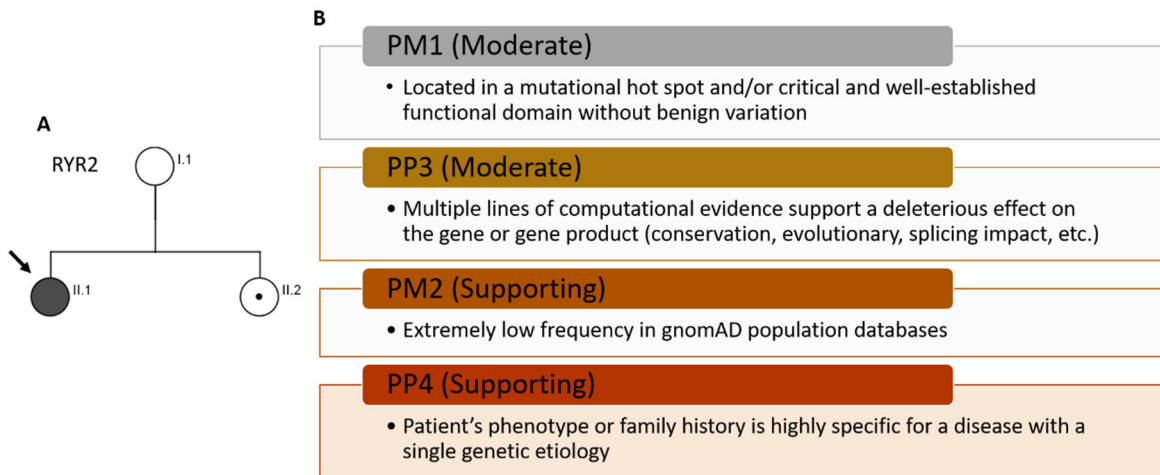
Πίνακας 3: Παραλλαγές αγνώστου κλινικής σημασίας (VUS) για τις οποίες έγινε μελέτη σε επίπεδο οικογένειας. Οι σκιαγραφημένες παραλλαγές επανακατηγοριοποιήθηκαν σε πιθανώς παθογόνες. Το «X» της τελευταίας στήλης υποδηλώνει τη συμφωνία μεταξύ της πρόβλεψης της παθογονικότητας του *in silico* εργαλείου, με τα δεδομένα της παρούσας μελέτης.

A/A	Γονίδιο	Όνομα Παραλλαγής	Πρόβλεψη Παθογονικότητας AlphaMissense	
1	SH3TC2	NM_024577.4:c.3526T>G	LP	X
2	PMP22	NM_000304.4:c.124T>C	LP	X
3	TNPO3	NM_001382216.1:c.1397T>C	LP	X
4	RYR2	NM_001035.3:c.6997C>T	LP	X
5	KCNH2	NM_000238.4:c.580G>A	LB	X
6	MYH6	NM_002471.4:c.1408G>T	LP	
7	MYH7	NM_000257.4:c.4348G>A	LP	
8	GDAP1	NM_018972.4:c.213G>C	LP	X
9	RYR2	NM_001035.3:c.995G>A	LB	X

Κατά την ανάλυση σε επίπεδο οικογένειας παραλλαγών αγνώστους κλινικής σημασίας, στόχος είναι απόκτηση νέων δεδομένων (πχ: εύρεση της ίδιας παραλλαγής σε συγγενείς με τον ίδιο φαινότυπο που δεν είχαν υποβληθεί σε γενετική ανάλυση, χαρακτηρισμός μιας παραλλαγής ως *de novo* ή διαπίστωση ότι μια παραλλαγή άγνωστης κλινικής σημασίας βρίσκεται *in trans* με παθογόνο παραλλαγή) που θα βοηθήσουν στην επανακατηγοριοποίηση των παραλλαγών σύμφωνα με τα κριτήρια της ACMG. Παράλληλα, ελέγχεται η ικανότητα πρόβλεψης της παθογονικότητας των παραλλαγών με τη χρήση *in silico* εργαλείων, όπως είναι το AlphaMissense.

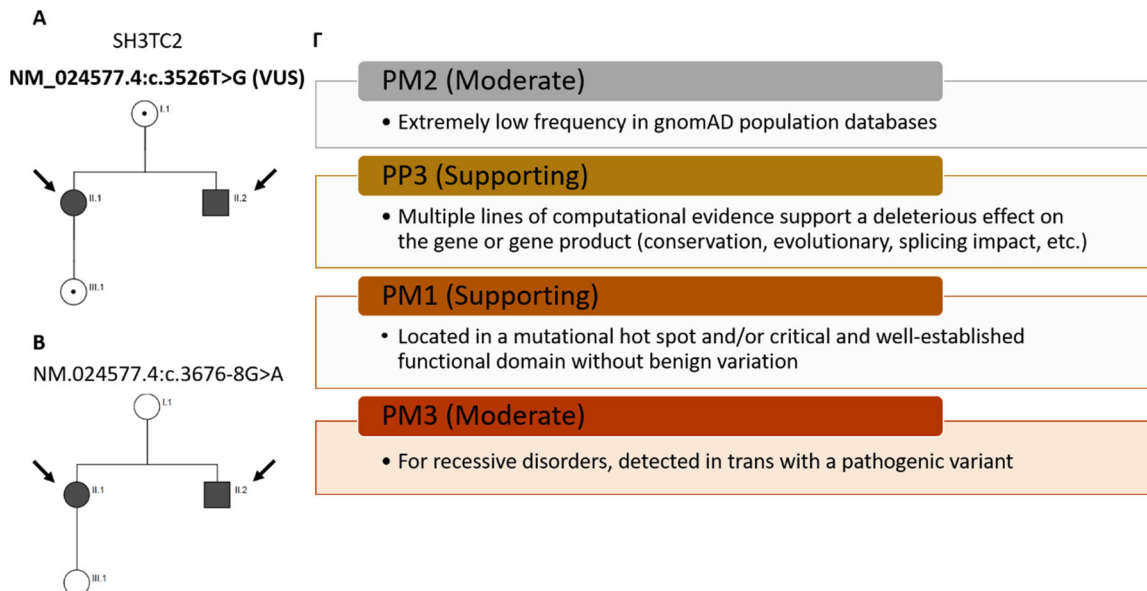
Παρακάτω παρουσιάζονται τα γενεαλογικά δέντρα και τα κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την επανακατηγοριοποίηση των τεσσάρων παραλλαγών (Εικόνα 4-8). Αρχικά επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη της παραλλαγής NM_001035.3:c.6997C>T στο γονίδιο RYR2 στην ασθενή (II.1), που πάσχει από Πολύμορφη Κατεχολαμινεργική Κοιλιακή Ταχυκαρδία (CPVT), και ο συσχετισμός με την κλινική εικόνα της ασθενούς,

σύμφωνα με τα ειδικά για το νόσημα κριτήρια. Παράλληλα, η ίδια παραλλαγή εντοπίστηκε και στην αδερφή της ασθενούς (II.2) (Εικόνα 5A).



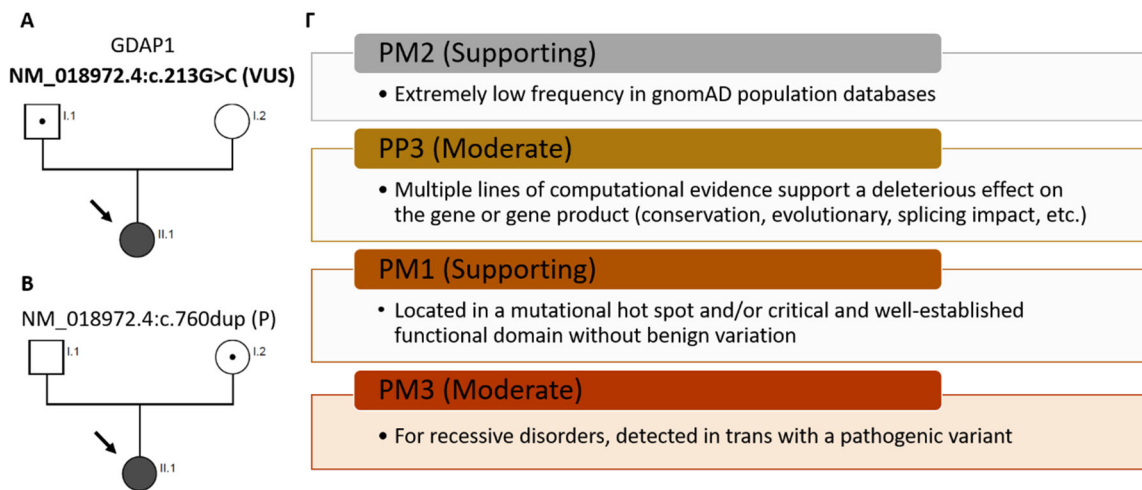
Εικόνα 5: Επανακατηγοριοποίηση της παραλλαγής (RYR2) NM_001035.3:c.6997C>T από VUS σε Likely Pathogenic. (A) Γενεαλογικό δέντρο κληρονομής της παραλλαγής. Το βέλος υποδεικνύει τον αρχικό ασθενή, ο οποίος πραγματοποίησε WES. **(B)** Τα πληρούμενα κριτήρια της ACMG, βάσει των οποίων γίνεται η επανακατηγοριοποίηση της παραλλαγής (2 Moderate + 2 Supporting → Likely Pathogenic). Το σκιαγραφημένο κριτήριο προστέθηκε κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης.

Αντίστοιχα, επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη τόσο της παραλλαγής αγνώστου κλινικής σημασίας NM_024577.4:c.3526T>G, όσο και της παθογόνου παραλλαγής NM.024577.4:c.3676-8G>A, στο γονίδιο SH3TC2, στους ασθενείς (II.1 και II.2), που πάσχουν από Charcot-Marie-Tooth disease. Ωστόσο, στην μητέρα των ασθενών (I.1) εντοπίστηκε μόνο η παραλλαγή αγνώστου κλινικής σημασίας, υποδηλώνοντας ότι η παθογόνος παραλλαγή προήλθε από τον πατέρα των ασθενών (Εικόνα 6A). Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι οι δύο εντοπιζόμενες παραλλαγές στο γονίδιο SH3TC2 βρίσκονται in trans.



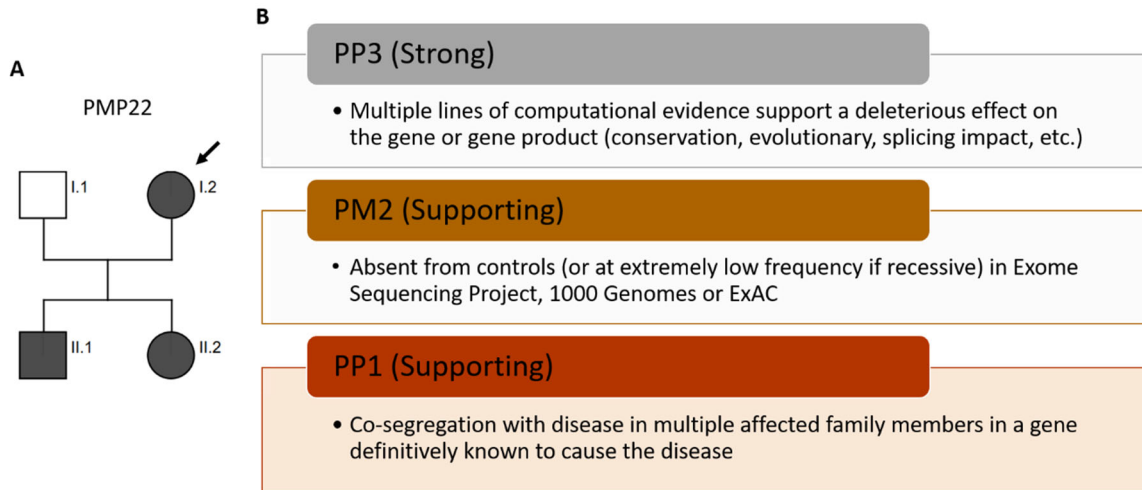
Εικόνα 6: Επανακατηγοριοποίηση της παραλλαγής (SH3TC2) NM_024577.4:c.3526T>G από VUS σε Likely Pathogenic. (A) Γενεαλογικό δέντρο κληρονόμησης της VUS παραλλαγής. Το βέλος υποδεικνύει τον αρχικό ασθενή, ο οποίος πραγματοποίησε WES. **(B)** Γενεαλογικό δέντρο κληρονόμησης της Παθολογικής παραλλαγής. Το βέλος υποδεικνύει τον αρχικό ασθενή, ο οποίος πραγματοποίησε WES. **(Γ)** Τα πληρούμενα κριτήρια της ACMG, βάσει των οποίων γίνεται η επανακατηγοριοποίηση της παραλλαγής (2 Moderate + 2 Supporting → Likely Pathogenic). Το σκιαγραφημένο κριτήριο προστέθηκε κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης.

Συνεχίζοντας, επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη τόσο της παραλλαγής αγνώστου κλινικής σημασίας NM_018972.4:c.213G>C, όσο και της παθολογικής παραλλαγής NM_018972.4:c.760dup, στο γονίδιο GDAP1, στην ασθενή II.1, που πάσχει από Charcot-Marie-Tooth disease. Ενώ από τη μελέτη σε επίπεδο οίγνευσης βρέθηκε ότι η μία παραλλαγή που εντοπίστηκε στην ασθενή II.1 προήλθε από τον πατέρα της (I.1) και η δεύτερη από τη μητέρα της (I.2) (Εικόνα 7A, 7B). Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι οι δύο εντοπιζόμενες παραλλαγές στο γονίδιο GDAP1 βρίσκονται in trans.



Εικόνα 7: Επανακατηγοριοποίηση της παραλλαγής (GDAP1) NM_018972.4:c.213G>C από VUS σε Likely Pathogenic. (A) Γενεαλογικό δέντρο κληρονόμησης της VUS παραλλαγής. Το βέλος υποδεικνύει τον αρχικό ασθενή, ο οποίος πραγματοποίησε WES. **(B)** Γενεαλογικό δέντρο κληρονόμησης της παθολογικής παραλλαγής. Το βέλος υποδεικνύει τον αρχικό ασθενή, ο οποίος πραγματοποίησε WES. **(Γ)** Τα πληρούμενα κριτήρια της ACMG, βάσει των οποίων γίνεται η επανακατηγοριοποίηση της παραλλαγής (2 Moderate + 2 Supporting → Likely Pathogenic). Το σκιαγραφημένο κριτήριο προστέθηκε κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης.

Τέλος, επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη της παραλλαγής NM_000304.4:c.124T>C στο γονίδιο PMP22 στην ασθενή (I.2), που πάσχει από Charcot-Marie-Tooth disease. Παράλληλα, η ίδια παραλλαγή εντοπίστηκε και στα δύο τέκνα της ασθενούς (II.1, II.2), τα οποία επίσης δείχνουν συμβατό φαινότυπο (Εικόνα 8A).



Εικόνα 8: Επανακατηγοριοποίηση της παραλλαγής (PMP22) NM_000304.4:c.124T>C από VUS σε Likely Pathogenic. (A) Γενεαλογικό δέντρο κληρονόμησης της παραλλαγής. Το βέλος υποδεικνύει τον αρχικό ασθενή, ο οποίος πραγματοποίησε WES. **(B)** Τα πληρούμενα κριτήρια της ACMG, βάσει των οποίων γίνεται η επανακατηγοριοποίηση της παραλλαγής (1 Strong + 2 Supporting → Likely Pathogenic). Το σκιαγραφημένο κριτήριο προστέθηκε κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης.

Με βάσει τα νέα δεδομένα που προέκυψαν από την ανάλυση σε επίπεδο οικογένειας, έγινε επανέλεγχος των κριτηρίων της ACMG που πληρούνται για κάθε παραλλαγή. Το τελικό συμπέρασμα ήταν ότι και στις δύο περιπτώσεις ικανοποιούνται 2 κριτήρια μετρίας ισχύος (Moderate) και 2 υποστηρικτικά κριτήρια (Supporting), συνδυασμός που κατατάσσει μια παραλλαγή ως Πιθανώς Παθογόνο (Likely Pathogenic) (Εικόνες 5B και 6B).

Τέλος, σε κάποιες περιπτώσεις έχει πραγματοποιηθεί διερεύνηση ύπαρξης παθογόνων/πιθανώς παθογόνων παραλλαγών σε άλλα συγγενικά μέλη του εκάστοτε ασθενούς, στοχεύοντας στον εντοπισμό συγγενικών μελών που φέρουν την παραλλαγή και έχουν ρίσκο εμφάνισης της πάθησης. Έτσι, στα άτομα αυτά μπορεί να δοθεί σωστή ιατρική καθοδήγηση, περιλαμβάνοντας συστηματικούς προληπτικούς ελέγχους ή ακόμα και προληπτική θεραπεία.

Πίνακας 4: Παθογόνες/Πιθανώς παθογόνες παραλλαγές για τις οποίες μελετήθηκε η κληρονόμησή τους σε συγγενικά μέλη.

A/A	Γονίδιο	Όνομα Παραλλαγής
1	DYSF	NM_001130987.2:c.11495G>A
2	DYSF	NM_001130987.2:c.2550_2553del
3	ACVR1	NM_001111067.4:c.617G>A
4	MPZ	NM_000530.8:c.103G>A
5	CERS1	NM_021267.5:c.269del
6	MPZ	NM_000530.8:c.103G>A

7	TTN	NM_001267550.2:c.62251dup
8	SCN5A	NM_000335.5:c.4996G>A
9	TTN	NM_001267550.2:c.58870C>T

3. Συνδυαστική ανάλυση πολλαπλών γενετικών τόπων και ομικών δεδομένων

- Συνδυαστική ανάλυση πολλαπλών γενετικών τόπων

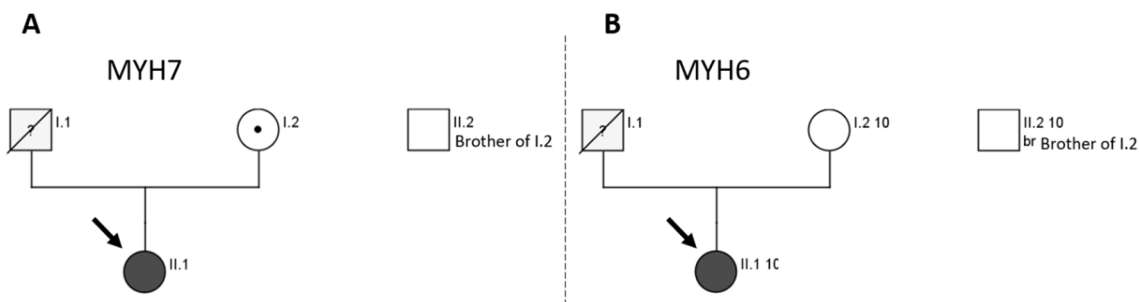
Είναι γνωστό πως η ύπαρξη περισσότερων της μιας γενετικής παραλλαγής μπορεί αθροιστικά, να οδηγήσει στην εκδήλωση κάποιου φαινοτύπου. Επομένως, η ταυτόχρονη μελέτη πολλαπλών γενετικών τόπων μπορεί να οδηγήσει στον εντοπισμό παραλλαγών που η ταυτόχρονη εμφάνισή τους είναι υπεύθυνη για την πρόκληση κάποιας ασθένειας.

Από την κοόρτη ασθενών της συγκεκριμένης μελέτης, σε πέντε περιστατικά εντοπίστηκαν δύο γενετικές παραλλαγές, είτε στο ίδιο γονίδιο (3 περιστατικά), είτε σε διαφορετικά γονίδια (2 περιστατικά) (Πίνακας 5). Για να διερευνήσουμε εάν οι συγκεκριμένες παραλλαγές αθροιστικά μπορούν να οδηγήσουν στην εκδήλωση των αντίστοιχων φαινοτύπων, στραφήκαμε στη βιβλιογραφική αναζήτηση.

Πίνακας 5: Περιστατικά που εντοπίστηκαν δύο παραλλαγές.

A/A	1 ^η Παραλλαγή			2 ^η Παραλλαγή		
	Γονίδιο	Όνομα Παραλλαγής		Γονίδιο	Όνομα Παραλλαγής	
1	DYSF	NM_001130987.2:c.11495G>A	P	DYSF	NM_001130987.2:c.2550_2553del	P
2	SH3TC2	NM.024577.4:c.3676-8G>A	P	SH3TC2	NM.024577.4:c.3526T>G	VUS
3	MYH6	NM_002471.4:c.1408G>T	VUS	MYH7	NM_000257.4:c.4348G>A	VUS
4	GDAP1	NM_018972.4:c.760dup	P	GDAP1	NM_018972.4:c.213G>C	VUS

Για το περιστατικό με τις παραλλαγές στα γονίδια MYH6 και MYH7, όπου ο ασθενής πάσχει από Διατακτική Μυοκαρδιοπάθεια, εντοπίσαμε την δημοσίευση των Suzuki et al. που υποστηρίζουν ότι η ταυτόχρονη ύπαρξη παραλλαγών στα γονίδια MYH6 και MYH7 είναι υπεύθυνη για την εκδήλωση Υπερτροφικής Μυοκαρδιοπάθειας.



Εικόνα 8: Γενεαλογικά δέντρα κληρονόμησης δύο παραλλαγών που εντοπίστηκαν στον ίδιο ασθενή. (Α) Γενεαλογικό δέντρο κληρονόμησης της παραλλαγής (ΜΥΗ7) NM_000257.4:c.4348G>A. **(Β)** Γενεαλογικό δέντρο κληρονόμησης της παραλλαγής (ΜΥΗ6) NM_002471.4:c.1408G>T. Το βέλος υποδεικνύει τον αρχικό ασθενή, ο οποίος πραγματοποιήσε WES.

- **Συνδυαστική ανάλυση πολλαπλών ομικών δεδομένων**

Με το συνδυασμό διαφορετικών ομικών δεδομένων είναι δυνατή η πληρέστερη κατανόηση του τρόπου λειτουργίας των βιολογικών συστημάτων και μηχανισμών και πώς αυτοί επηρεάζονται από την ύπαρξη γενετικών παραλλαγών. Σε μια προσπάθεια να κατανοήσουμε τους παράγοντες που οδηγούν στην εμφάνιση διαφορετικών ασθενειών, όταν δεν έχει εντοπιστεί κάποια γενετική παραλλαγή από την ανάλυση WES, σκοπεύουμε να πραγματοποιήσουμε μεταβολομική ανάλυση μεταβολιτών με Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (NMR).

Συγκεκριμένα, σε δύο ασθενείς που πάσχουν από υπερχοληστερολαιμία, στους οποίους όμως δεν εντοπίστηκε κάποια παραλλαγή μέσω του WES, κρίθηκε χρήσιμο να πραγματοποιηθεί μεταβολομική ανάλυση μεταβολιτών με NMR. Για αυτήν την ανάλυση, γίνεται λήψη ολικού αίματος (πλάσμα και ορός) και ούρων που θα χρησιμοποιηθούν για τον εντοπισμό των μεταβολιτών και στη συνέχεια θα συγκριθούν με τους μεταβολίτες που έχουν εντοπιστεί σε έναν control πληθυσμό (σε συνεργασία με το εργαστήριο του Γ. Σπυρούλια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών). Η μεταβολομική μελέτη αποτελεί αντικείμενο ξεχωριστού παραδοτέου.

4. Αλληλούχιση ολικού γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing - WGS)

Η ανάλυση WGS, παρά το υψηλότερο κόστος που απαιτεί για την υλοποίηση της, αποτελεί την τέχνη NGS με την καλύτερη διαγνωστική απόδοση. Μέσω της WGS μπορούν να εντοπιστούν παραλλαγές σε μη-κωδικοποιητικές περιοχές του γονιδιώματος, ενώ παράλληλα διευκολύνεται η ανίχνευση δομικών παραλλαγών (Structural Variations - SVs) και παραλλαγών αριθμού αντιγράφων (Copy Number Variations - CNVs).

Μέχρι στιγμής, έχουν επιλεγεί πέντε ασθενείς στους οποίους θα πραγματοποιηθεί WGS (Πίνακας 6). Οι ασθενείς αυτοί εμφανίζουν σαφές πρότυπο γενετικού νοσήματος και ισχυρό φαινότυπο στους οποίους όμως δεν εντοπίστηκε κάποια παραλλαγή που να συνδέεται με το φαινότυπό τους, μέσω του WES. Ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι οι ασθενείς 1 και 2 (Πίνακας 6) είναι συγγενείς 1^{ου} βαθμού. Για την ανάλυση αυτή, από ολικό περιφερικό αίμα απομονώνεται γενωμικό DNA το οποίο χρησιμοποιείται για την ανάλυση. Η ανάλυση WGS θα γίνει σε συνεργασία με το εργαστήριο του Π. Χατζή, Ινστιτούτο Φλέμινγκ.

Πίνακας 6: Ασθενείς στους οποίους θα πραγματοποιηθεί Whole Genome Sequencing.

A/A	Φύλο	Έτος Γέννησης	Φαινότυπος
1	Άνδρας	1975	Υπερχοληστερολαιμία
2	Γυναίκα	2016	Υπερχοληστερολαιμία
3	Άνδρας	1991	Υποτροπιάζουσες λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος
4	Γυναίκα	2022	Διαταραχή βάδισης, Βάδισμα ευρείας βάσης, Υπερανακλαστικότητα των κάτω άκρων, Δυστονία των άκρων, Περικοιλιακές υποπυκνότητες λευκής ουσίας
5	Γυναίκα	2021	Αναπτυξιακή καθυστέρηση, Μυοκλονικοί σπασμοί, Μικροκεφαλία, Στοματοπροσωπική απραξία

Τα αποτελέσματα της πρόβλεψης παθογονικότητας παραλλαγών άγνωστης κλινικής σημασίας παρουσιάστηκαν στο εξής συνέδριο:

74^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, 13-15 Δεκεμβρίου 2024, Θεσσαλονίκη

Τίτλος: Investigating the pathogenicity of Variants of Uncertain Significance (VUS) in rare diseases using sequencing techniques

Συγγραφείς: I. Papadionysiou, V. Tzimogianni, E. Veltsou, P. Michalieris, D. Veltista, E. Chroni, R. Koros, P. Davlourous, R. Seung Woo, K. JiHye, Z. Lygerou

Παρακάτω παρατίθενται η σχετική περίληψη και η αναρτημένη παρουσίαση

Investigating the pathogenicity of Variants of Uncertain Significance (VUS) in rare diseases using sequencing techniques

Ioanna Papadionysiou¹, Valentini Tzimogianni¹, Eirini Veltsou¹, Panagiotis Michalieris¹, Dimitra Veltista², Elisavet Chroni², Rafail Koros³, Periklis Davlourous³, Ryu Seung Woo⁴, Kim JiHye⁴, Zoi Lygerou¹

¹Molecular Genetics Unit, General Biology Department, Medical School, University of Patras, Greece, ²Neuromuscular Center, University General Hospital of Patras and Medical School, University of Patras, Greece, ³Cardiology Unit, Pathology Clinic, University General Hospital of Patras and Medical School, University of Patras, Greece, ⁴3billion Inc., Seoul, South Korea.

Rare diseases (RDs) are disorders characterized by their low prevalence (less than 1 in 2000 people is affected), that can be life-threatening or lead to chronic disability. Nearly 400 million people worldwide are affected by RDs, with an estimated 1 million individuals impacted in Greece. Due to their high phenotypic and genetic heterogeneity, accurate diagnosis is challenging, leaving many patients undiagnosed. As the majority of RDs have a genetic etiology, Whole-Exome Sequencing (WES) has proven valuable in the identification of underlying genetic defects and definitive diagnoses.

In this study, WES was performed on a Greek cohort of 400 patients who suffered from RDs and remained undiagnosed at the time of the analysis. The cohort encompassed both pediatric and adult patients, while various phenotypes were included ranging from neurodevelopmental and neurological/neuromuscular conditions to growth, metabolic, cardiovascular and skeletal abnormalities.

WES identified the underlying genetic cause in 33% of cases (positive result) and additionally, in 18% of cases, a Variant of Uncertain Significance (VUS) was identified (inconclusive result). To further investigate these cases, in silico tools were used and targeted Sanger Sequencing was performed in probands and family members for segregation analysis, aiming at identifying afflicted undiagnosed members and/or reclassifying the VUS. Based on the acquired data and a reassessment of the American College of Medical Genetics (ACMG) criteria, several VUS variants were reclassified, providing new insights into both patient and disease management.

Clarifying the pathogenicity of VUS provides scientists and clinicians with valuable insights into the genetic factors of a disease, enabling improved prediction, prevention, and treatment strategies.

Investigating the pathogenicity of Variants of Uncertain Significance (VUS) in rare diseases using sequencing techniques

Ioanna Papadionysiou¹, Valentini Tzimogianni¹, Eirini Veltsou¹, Panagiotis Michalieris¹, Dimitra Veltista², Elisavet Chroni², Rafail Koros³, Periklis Davlouros³, Ryu Seung Woo⁴, Kim Ji-Hye⁴, Zoi Lygerou¹

¹Molecular Genetics Unit, General Biology Department, Medical School, University of Patras, Greece, ²Neuromuscular Center, University General Hospital of Patras and Medical School, University of Patras, Greece, ³Cardiology Unit, Pathology Clinic, University General Hospital of Patras and Medical School, University of Patras, Greece, ⁴3billion Inc., Seoul, South Korea.

Introduction

Rare diseases (RDs) affect millions worldwide, with the majority having a genetic origin. Despite advancements in genetic research, the diagnosis of these conditions remains a significant challenge due to their complexity and rarity. Whole Exome Sequencing (WES), a powerful genomic technology that focuses on sequencing the protein-coding regions of the genome, has emerged as a transformative tool in unraveling the genetic basis of these diseases. By identifying pathogenic variants in coding regions, WES has significantly improved diagnostic rates and expanded our understanding of genetic disorders. However, many patients with rare diseases still face diagnostic uncertainty due to the limitations of current variant interpretation frameworks and our incomplete knowledge of genetic and molecular mechanisms. In this project, we aim to elucidate the pathogenicity of Variants of Uncertain Significance (VUS) by integrating multiple complementary approaches, combining advanced genomic tools with functional and computational analyses.

1. Whole Exome Sequencing (WES) in a Greek cohort of 400 patients

A

B

C

D

(A) Enrolled cases per every collaborating clinic. (B) Enrolled cases per every collaborating clinic in General University Hospital of Patras. (C) Positive results were identified in 33% of the cases, inconclusive findings in 18% and negative results in 49% (no clinically significant pathogenic variants detected). (D) Different types of VUS.

3. Reclassification of VUS variants into Likely Pathogenic

Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia (CPVT)

- Arrhythmogenic heart disorder
- Induced by physical activity, stress or catecholamine infusion
- Recurrent syncope, seizures, or sudden death after physical activity or emotional stress.
- Normal clinical findings

VUS missense variant in RYR2
→ Pathogenicity score: 0.88

PM1 (Moderate)

- Located in a mutational hot spot and/or critical and well-established functional domain without benign variation

PP3 (Moderate)

- Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene or gene product

PM2 (Supporting)

- Extremely low frequency in gnomAD population databases

PP4 (Supporting)

- Patient's phenotype or family history is highly specific for a disease with a single genetic etiology

Charcot-Marie-Tooth

- Demyelinating, peripheral neuropathy
- Distal motor and sensory impairment → foot deformities
- Motor nerve conduction velocities are decreased

VUS missense variant in SH3TC2
→ Pathogenicity score: 0.86

PM2 (Moderate)

- Extremely low frequency in gnomAD population databases

PP3 (Supporting)

- Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene or gene product

PM1 (Supporting)

- Located in a mutational hot spot and/or critical and well-established functional domain without benign variation

PM3 (Moderate)

- For recessive disorders, detected in trans with a pathogenic variant

2. Investigating variant reclassification in clinical genetics

Literature → New data on the variant

Databases → Franklin Varsome ClinVar → Variant's pathogenicity

In silico predictive tools → AlphaMissense SpliceAI → Pathogenicity score Δ score

Compatibility of clinical phenotype → Variant's pathogenicity

Segregation Analysis → Sanger Sequencing → Inheritance patterns & pathogenicity

Variant's pathogenicity

Pathogenicity score Δ score

Variant's pathogenicity

Inheritance patterns & pathogenicity

Summary

- 4 VUS variants have been reclassified → Likely Pathogenic
- The integration of in silico tools with sequencing techniques for analyzing Variants of Uncertain Significance (VUS) holds great promise for improving the diagnostic yield in rare disease (RD) cases. This synergy facilitates the reclassification of VUS into more definitive categories—either pathogenic or benign—while also uncovering critical insights into the molecular mechanisms driving these conditions

Ελλάδα 2.0

ΕΘΝΙΚΟ ΣΧΕΔΙΟ ΑΝΑΚΑΜΨΗΣ ΚΑΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Με τη χρηματοδότηση της Ευρωπαϊκής Ένωσης

NextGenerationEU

GoMedPrecision

3billion

This project (TAEDR-0539180) is implemented within the framework of the Action "Actions in interdisciplinary scientific areas with special interests for the connection with the productive fabric", Greece 2.0 - National Recovery and Resilience Plan.