

Potvrdenie diagnózy pomocou DNA analýzy: metódy, kritéria pre výber, metodiky, požiadavky pre dobrú spoluprácu

Ján Chandoga, Pavol Ďurina

*Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LFUK a UNB,
Oddelenie molekulovej a biochemickej genetiky
expertízne pracovisko so zameraním na molekulárnu a biochemickú genetiku zriedkavých
metabolických a vybraných genetických chorôb*

Familiárna hypercholesterolémia FH1



FH1 – familiárny deficit LDL receptora

- **autozómovo dominantné ochorenie**
- **incidencia:** heterozygotov 1:250; homozygotov **1:300 000** (1:1 000 000)
- **gén *LDLR*:** 19q; 18 exónov; kóduje glykoproteín obsahujúci 839 AMK
- mutácie génu pre *LDLR*: je popísaných viac než **1500 patogénnych variantov**, ktoré vyúsťujú v chýbanie proteínu alebo funkčný deficit (null alely, na transport defektnej alely, väzobne defektívnej alely, na internalizáciu defektnej alely, na recyklizáciu defektnej alely); časté sú mutácie v exóne 4 s ťažkou formou FH;
- **až 10% môžu predstavovať delečno - duplikačné genetické patológie!** - nemožno odhaliť sekvenčnou analýzou

Familiárna hypercholesterolémia FH2



FH2 - familiárny defekt apolipoproteínu B-100

- autozómovo dominantné ochorenie
- incidencia: heterozygotov 1: 700
- gén **APOB100**: 2p; 29 exónov; kóduje proteín obsahujúci **4562 AMK**
- mutácie génu pre APOB100 výrazne znižujú schopnosť APOB viazať sa na LDLR; častú mutáciu - **R3500Q** (p.Arg3527Gln) v 26. exóne, má 6% až 10% pacientov s FH1-FH4 v európskej populácii; ostatné zistené patogénne varianty sú zriedkavé (do 1%)

Familiárna hypercholesterolémia FH3



FH3 - familiárny defekt PCSK9

- **autozómovo dominantné ochorenie**
- **incidencia:** zriedkavá príčina FH (1% až 2% geneticky potvrdených pacientov s FH)
- **gén *PCSK9*:** (proteín konvertáza subtilizín/kexin typ 9): 1p; 12 exónov; 692 AMK
- mutácie génu typu **získania funkcie** spôsobujú *down* reguláciu LDLR v hepatocytoch pravdepodobne zvýšením endozomálnej degradácie po naviazaní na LDLR; popísaných je viac ako 20 variantov vyvolávajúcich FH3; mutácie *PCSK9* charakteru straty funkcie (3% európskej populácie má variant Arg46Leu) spôsobia naopak zvýšenie proteínov ApoB a LDLR, zvýšenie klírensu LDL-CH v dôsledku zníženia CHD rizika o 28%

inhibícia PCSK9 protilátkami predstavuje významný alternatívny terapeuticky postup pri statín - rezistentných formách FH

Familiárna hypercholesterolémia FH4



FH4 - familiárny defekt STAP1

- **autozómovo dominantné ochorenie**
- **incidencia:** frekvencia patogénnych variantov v genomických štúdiach 1:250; 1:400
- **gén *STAP1*:** 4q13.2; 9 exónov; 295 AMK proteín je substrát pre TEC proteín tyrozín kinázu
- patogénne varianty génu sú lokalizované zväčša v 3.exóne

Ďalšie zriedkavé gény podmieňujúce hypercholesterolémiu



Autozómová recesívna hypercholesterolémia (ARH – LDLRAP1)

- spôsobená mutáciami v LDLR adaptor proteín 1 géne (*LDLRAP1*), ktorý reguluje endocytózu sprostredkovanú LDLR; klinická manifestácia je analogická ako u dominantných foriem FH; mutácie v exóne 2 (gén má 9 exónov) spôsobujú manifestáciu aká je typická pre HoFH

Sitosterolémia (ARH – ABCG5/ABCG8)

- spôsobená mutáciami dvoch génov ABC transportérov – ***ABCG5*** a ***ABCG8*** (génová expresia v črevách a v pečeni); proteíny spolu s inými znižujú absorpciu sterolov v črevách, ale naopak zvyšujú ich exkréciu v pečeni; pri mutáciách so stratou funkcie sa dosiahne opačný efekt a v dôsledku zvýšených hodnôt fytosterolov (sérum viac ako 0,025 mmol/l) dôjde k *down* regulácii pečeneového LDLR a k zvýšeniu frakcie LDL; u pacientov európskeho pôvodu sú častejšie mutácie *ABCG8*, s klinickými prejavmi CHD po 20. roku a koncentráciou cholesterolu nižšou ako u HoFH foriem

Ďalšie gény : *APOE; CELSR2; SLC22A1; MYLIP; NYNRIN; ST3GAL4; LIPA*

Molekulárno-genetická diagnostika - metódy



- **molekulárno-genetické: PCR/RFLP** - *APOB100* – R3500Q
- **Real-Time PCR** - genotypy *APOE*
- **MLPA** - delečno-duplikačný skríning génu *LDLR*
- **Sangerové sekvenovanie** - *LDLR*, *PCSK9*, *APOB100*, *ABCG5*, *ABCG8*
- **MPS (NGS)** analýza použitím systému MiniSeq (Illumina) DevyserFHv2 kit: *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, *APOE*, *STAP1* a genetické markery pre polygénovo podmienené FH resp. efektívnu terapiu statínmi (*CELSR2*, *SLC22A1*, *HFE*, *MYLIP*, *ABCG8*, *NYNRIN*, *ST3GAL4*, *SLCO1B1*, *LPA*).

Varianty pre polygénovo podmienené FH a efektívnu terapiu statínmi



Marker	cDNA	Gén	Vplyv	Stav variantu	Detekcia variantov
rs629301	c.*1635T>G	<i>CELSR2</i>	FH risk	HOM	identifikovaný
rs1564348	c.1599-688T>C	<i>SLC22A1</i>	FH risk	HET	identifikovaný
rs1800562	c.845G>A	<i>HFE</i>	FH risk	-	neidentifikovaný
rs2479409	c.-861A>G	<i>PCSK9</i>	FH risk	HET	identifikovaný
rs3757354	c.-2147C>T	<i>MYLIP</i>	FH risk	-	neidentifikovaný
rs4299376	c.166-718T>G	<i>ABCG8</i>	FH risk	HET	identifikovaný
rs6511720	c.67+2015G>T	<i>LDLR</i>	FH risk	HET	identifikovaný
rs8017377	c.2932G>A	<i>NYNRIN</i>	FH risk	HET	identifikovaný
rs11220462	c.61+18215G>A	<i>ST3GAL4</i>	FH risk	-	neidentifikovaný
rs1367117	c.293C>T	<i>APOB</i>	FH risk	HOM	identifikovaný
rs429358	c.388T>C	<i>APOE</i>	Statin terapia + FH risk	-	neidentifikovaný
rs7412	c.526C>T	<i>APOE</i>	Statin terapia + FH risk	-	neidentifikovaný
rs646776	c.*1859T>C	<i>CELSR2</i>	Statin terapia	HOM	identifikovaný
rs4149056	c.521T>C	<i>SLCO1B1</i>	Statin terapia	-	neidentifikovaný
rs3798220	c.5673T>C	<i>LPA</i>	Statin terapia	-	neidentifikovaný
rs10455872	c.3947+467A>G	<i>LPA</i>	Statin terapia	HET	identifikovaný

Bodové ohodnotenie analýz



Izolácia DNA	1900 b
Vyšetrenie APOE	3200 b
Vyšetrenie APOB	3200 b
MLPA LDLR	t.č. nie je určené
Sekvenčná analýza <i>LDLR</i> génu	18 x 14 0000 252 000
MPS analýza	t.č. nie je určené

1b – VŠZP 0,05975 centu, Dôvera 0,05311 centu , Union 0,057 centu

APOB/SA LDLR – 1,3 % nákladov

MLPA LDLR/SA LDLR – 5% nákladov

Kritériá pre stanovenie diagnózy FH u dospelých: modifikované podľa DLCN (Dutch Lipid Clinic Network Score)



Rodinná anamnéza:	SKÓRE
prvostupňový príbuzný s predčasným koronárnym a/alebo cievny ochorením (muži <55, ženy < 60 rokov)	1
prvostupňový príbuzný s LDL-cholesterolom nad 95 percentilom pre vek a pohlavie	1
prvostupňový príbuzný s tendinóznymi xantómami a/alebo arcus cornealis deti mladšie ako 18 rokov s LDL-cholesterolom nad 95 percentilom pre vek a pohlavie	2
Osobná anamnéza:	
pacient s predčasným CAD – koronárne artériové ochorenie (muži <55, ženy < 60 rokov)	2
pacient s predčasným cerebrálnym alebo periférnym cievny ochorením (muži < 55, ženy <60 rokov)	1
Fyzikálny nález:	
tendinózne xantómy	6
arcus cornealis pred 45 rokom veku	4

Kritériá pre stanovenie diagnózy FH u dospelých: modifikované podľa DLCN (Dutch Lipid Clinic Network Score)



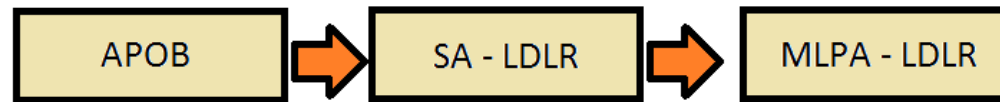
LDL-cholesterol mmol/l:	SKÓRE
LDL-C ≥ 8.5	8
LDL-C 6.5–8.4	5
LDL-C 5.0–6.4	3
LDL-C 4.0–4.9	1
DNA analýza, potvrdená mutácia v géne <i>LDLR</i> , <i>APOB</i> , <i>PCSK9</i>	8
Diagnóza podľa skóre:	
definitívna	≥ 8
pravdepodobná	6–7
možná	3–5
nepravdepodobná	< 3

Algoritmy diagnostiky FH

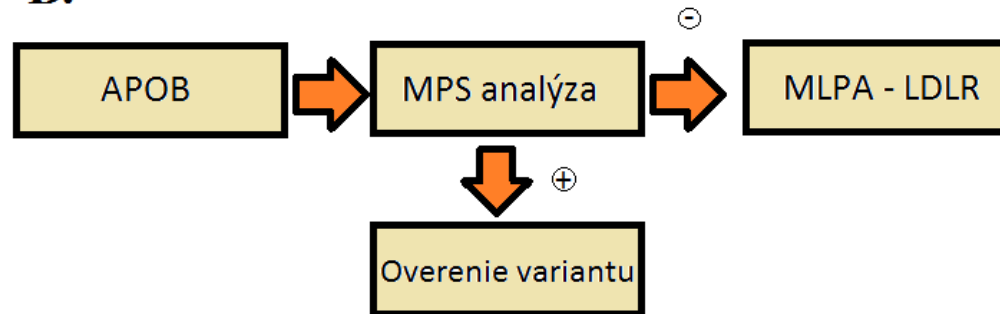


Vo vzťahu k optimalizácii nákladov

Návrh algoritmov: **A.**



B.



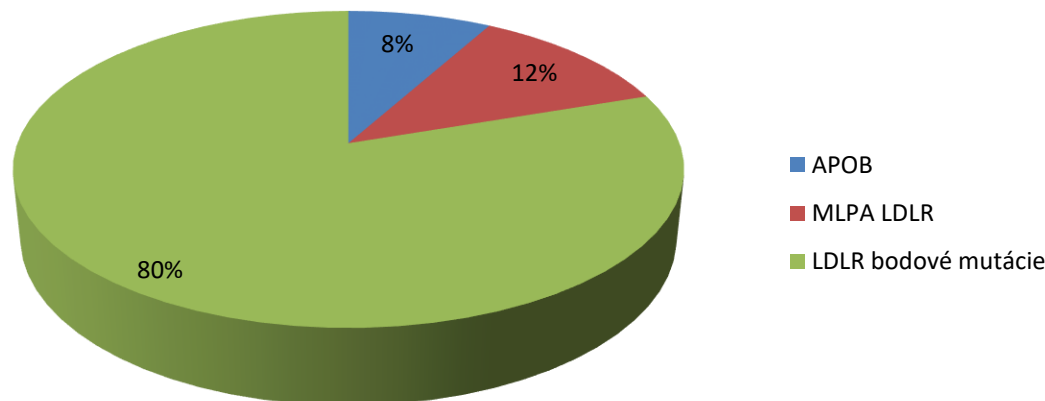
Pri MPS potreba overenia patogénnych variantov pomocou Sangerovho sekvenovania!

Pacienti s FH diagnostikovaní v ÚLBGaKG LF UK a UNB

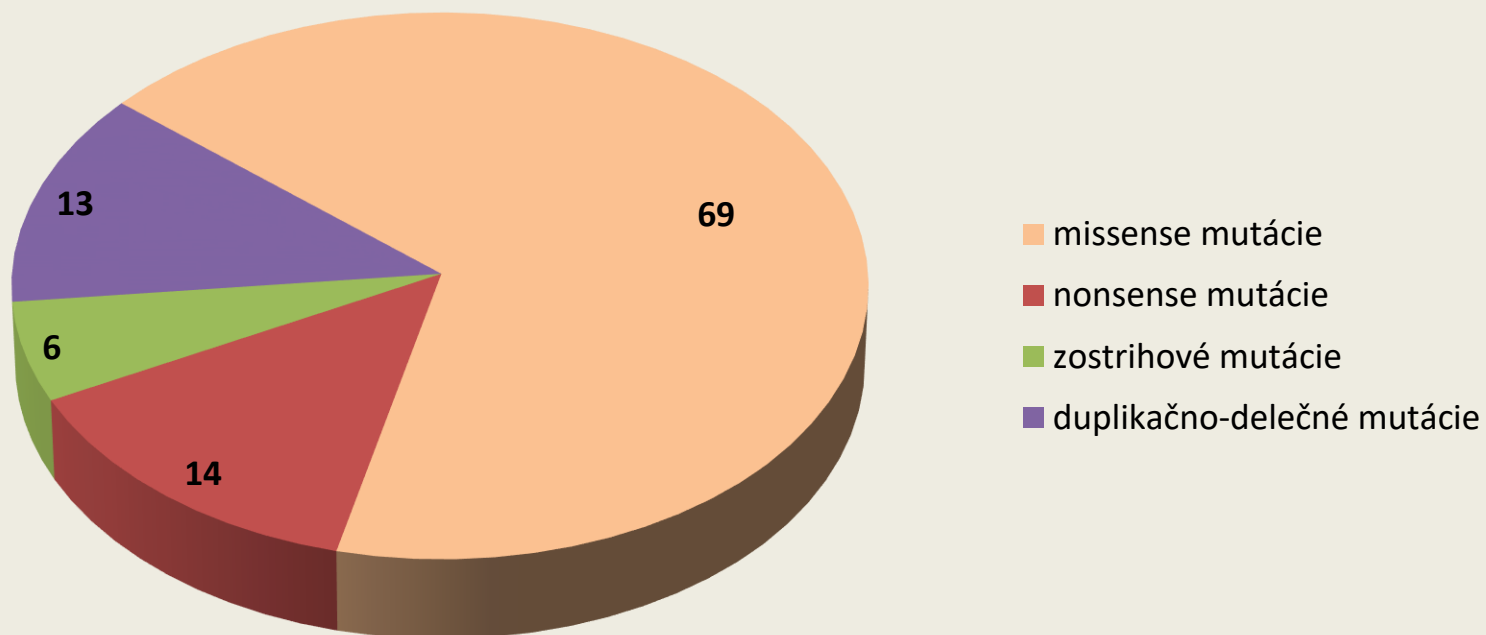


- Na našem pracovišku bolo pozitívnych 111 pacientov
- 9 pacientov mala zistený variant v *APOB100* géne
- 89 pacientov malo bodový patogénny variant v LDLR géne
- 13 pacientov malo zistený delečný patogénny variant

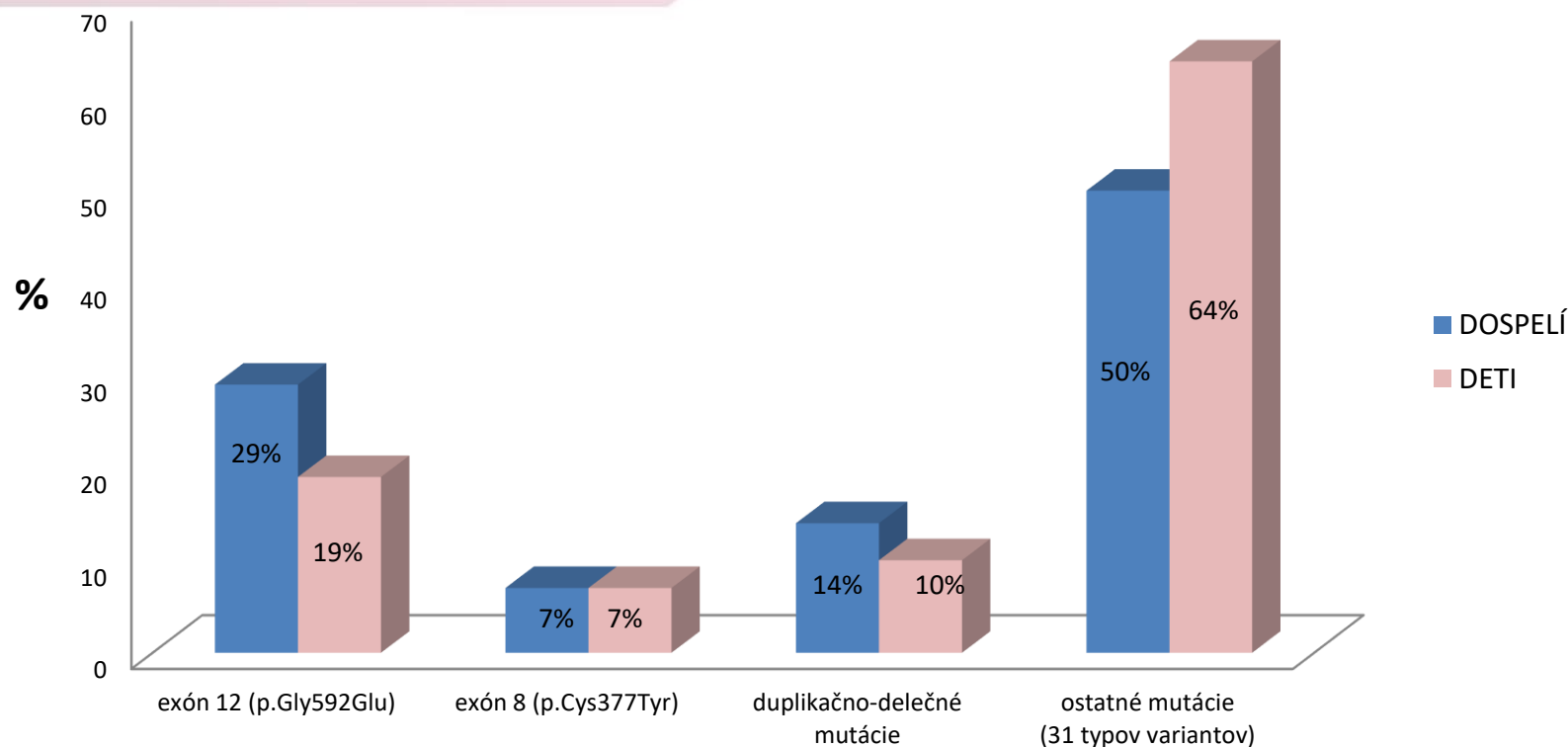
Záchyt jednotlivými metodikami



Patogénne varianty v *LDLR* géne v súbore pozitívnych pacientov (ÚLBGaKG LFUK a UNB)



Distribúcia patogénnych variantov v *LDLR* géne u detských a dospelých pacientov (ÚLBGaKG LFUK a UNB)



	POČET POZITÍVNYCH PACIENTOV:	
	dospelí	deti
exón 12 (p.Gly592Glu)	17	8
exón 8 (p.Cys377Tyr)	4	3
duplikačno-delečné mutácie	8	5
ostatné mutácie	30	27

Efektívnosť diagnostiky FH vo svete a v SR



Efektívnosť - pomer medzi vloženými vstupmi (zdrojmi) a úžitkom, ktorý sa nimi získa (kritéria – logistika - metódy a technológie – záchytnosť pacientov s FH)

Kritéria a logistika:

A. skríning dospelí (v SR 40 r.)

- hodnoty pre FH nie sú jednoznačne určené; bežne pre dispenzarizáciu a terapiu - $TCH > 6,5$; $LDL-CH > 4,0$ mmol/l; doplnia sa špecializované vyšetrenia, **MG**

B. skríning detí (v SR 11 až 17 r.)

- $TCH > 4,85$ mmol/l - reskríning
- $TCH > 6,5$ mmol/l + vysokoriziková RA - dispenz. v špec. amb. pre poruchy metab., doplní sa vyšetrenie HDL-CH, TAG; indikácia na MG (**dotazník a špecializácia!**)
- $TCH 5,5 - 6,4$ mmol/l - dispenz. a doplní sa kardiologické a endokrinologické vyš.

MEDPED – dg.FH je postavená na T-CH (viac ako 95.percentil) a vek (<20, 30, 40, >40)

SBR – $LDL-CH > 4,9$ + a) pozit.RA (hyperCH, CHD - 1.stupňový príbuzný) + b) xantómy

DLCN – systém skóre bodov je veľmi efektívny – **defFH ≥ 8 b; ppFH = 7b a 6b**

Metódy a technológie: od biochem. fenotypu ku genotypu + nízke náklady (targ.MPS)

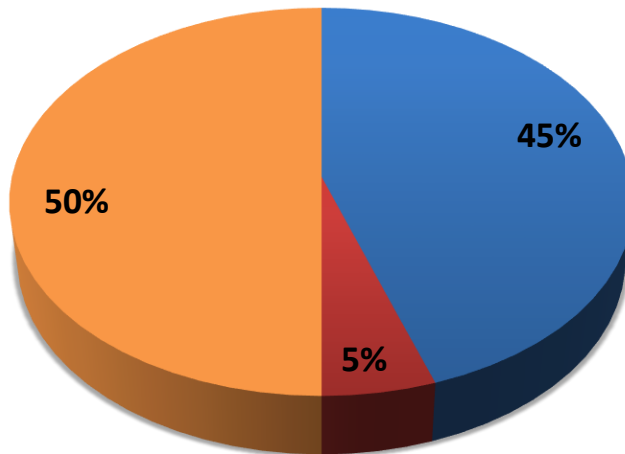
Potvrdená FH pomocou MG vyšetrení: RUS – 1%; USA – 5 %; EU – 30%; HOL - 90%; SR < 5 %
pri defFH – MG konfirmácia u 60 až 80%, pri ppFH 20% až 40%; **SR- 30%**

Geneticky podmienené hypercholesterolémie v súbore detských a dospelých pacientov (ÚLBG a KG LFUK a UNB)



DETSKÍ PACIENTI

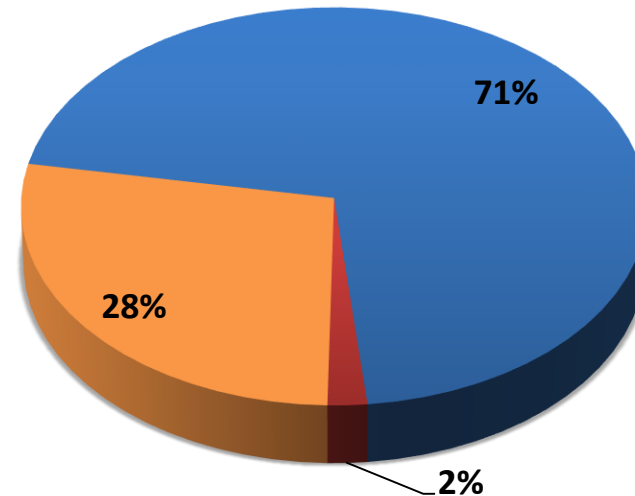
■ negatívni ■ APOB ■ LDLR



DETSKÍ PACIENTI	počet (Σ93)
negatívni	41
APOB (pozitívni)	5
LDLR (pozitívni)	47

DOSPELÍ PACIENTI

■ negatívni ■ APOB ■ LDLR



DOSPELÍ PACIENTI	Počet(Σ204)
negatívni	145
APOB (pozitívni)	4
LDLR (pozitívni)	55



Efektívnosť diagnostiky FH v ÚLBGaKG LF UK a UNB

JACC 72,(6),2018 ... FH genetic testing become the standard of care for patients with definite or probable FH, as well as for their at risk relatives

Efektívnosť diagnostiky genetickej príčiny FH u dospelých pacientov (30%) je obdobná ako vo svete, u detských pacientov (55%) je veľmi priaznivý ukazovateľ

- vysoká efektívnosť MG vyšetrení FH u detí - jasnejšie metodické pokyny a skôr selekcia pacientov s defFH (pre T-CH „*cutoff*“ (6,5 mmol/l))
- v zhode s inými literárnymi zdrojmi predpokladáme, že u väčšiny pacientov s dg. ppFH pôjde o polygénovú etiológiu alebo o pacientov s CFHL (rozsah MPS panelu?)
- pre indikáciu MG vyšetrení u FH a potvrdenie def. dg. Možno odporúčať taktiež aplikáciu dotazníka DLCN
- efektívnosť genetickej konfirmácie FH u detských pacientov favorizuje využitie MG pre **reverzný kaskádový skríning** s potenciou zachytu väčšieho počtu príbuzných s AD-FH a finančne efektívnu definitívnu dg. (70 €/pacient – 1 sekvenčná analýza)

Efektívnosť zachytu genetických FH: 1. dodržanie kritérií; 2. dobrá logistika; 3. lacné a robustné technológie; 4. aplikácia genetických markerov pre polygénne FH v budúcnosti



UNIVERZITNÁ NEMOCNICA BRATISLAVA
Pažitková 4, 821 01 Bratislava
Pracovisko: Nemocnica Staré Mesto, Mickiewiczova 13, 813 69 Bratislava

Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LFUK a UNB
Oddelenie molekulovej a biochemickej genetiky – expertízne pracovisko pre zriedkavé choroby
cgd@sm.unb.sk, tel. 02/57290 192

**Spríevodný list k molekulárno genetickému vyšetreniu
Familiárna hypercholesterolémia**

Meno a priezvisko		Adresa odosielajúceho pracoviska, tel. č. Pečiatka, kód a podpis lekára
Dátum narodenia	Pohlavie ☐ muž ☐ žena	
Rodné číslo	Dátum a čas odberu	
Materiál		
Zdravotná poisťovňa (kód)	Diagnóza (MKCH)	

Klinický obraz, osobná anamnéza, fyzikálny nález (xantómy, xantelizmy, arcus cornealis), laboratórny nález

Ďalšie diagnózy (endokrinopatia, pečenné, obličkové ochorenie)

Liečba:

Skóre podľa DLCN*:

Meno a priezvisko pacienta/pribuzného (vzťah k pacientovi)	Celkový chol mmol/l	LDL chol mmol/l	HDL chol mmol/l	TAG mmol/l	KV ochorenie + vek manifestácie, fyzikálny nález
1.					
2.					
3.					
4.					
5.					

Požadujete vyšetrenie génu:

☐APOB ☐LDLR ☐MLPA LDLR** ☐PCSK9***

Pre indikáciu vyšetrenia je potrebné, aby pacient splnil kritériá podľa DLCNS uvedené na druhej strane a aby boli tieto uvedené v žiadanke!!!

* Molekulovo genetické vyšetrenie je indikované v prípade skóre podľa DLCN (Dutch Lipid Clinic Network) nad 5 (v prípade definitívnej alebo pravdepodobnej diagnózy, Nordestgaard et al., 2013, consensus statement of the european atherosclerosis society)

** v prípade nepotvrdenia prítomnosti patogénneho variantu v géne LDLR sekvenčnou analýzou

*** v prípade ** a nepotvrdenia prítomnosti delécie/duplikácie metódou MLPA v géne LDLR



Informácia o vyšetrení: Familiárna hypercholesterolemia tvorí skupinu autozomálne dedičných ochorení spôsobených mutáciami v génoch pre LDL receptor (*LDLR*), v géne pre Apolipoprotein B-100 (*APOB*) alebo Proproteinconvertáza subtilisín/kexin typ 9 (*PCSK9*) – autozomálne dominantné hypercholesterolemie, najmä v géne pre LDL receptor adaptor proteín (*LDLRAP1*, mámy aj ako ARH) – autozomálne recesívna hypercholesterolemia. Odhaduje sa, že mutácie v týchto troch génoch tvoria 70-95% prípadov FH (genereviews.org). FH je charakterizovaná výrazne zvýšenou hladinou LDL cholesterolu, ťažkými xantómami a zvýšeným rizikom koronárnej srdcovej choroby. Ochorenie sa vyskytuje v miernnejšej heterozygotnej (heFH) a závažnej homozygotnej forme (hoFH). Heterozygoti pre FH majú patogénny variant v heterozygotnej forme v jednom z troch génov (*LDLR*, *APOB*, *PCSK9*), prevalencia je 1:200-500 (priemerné hodnoty TC: 8-15 mmol/l). **Homozygotná forma FH** môže byť zapríčinená bialelovým patogénnym variantom v jednom z uvedených génov, alebo prítomnosťou jedného patogénneho variantu v dvoch rôznych uvedených génoch. Prevalencia je 1:160000 až 1:1000000 (priemerné hodnoty TC: 12-30 mmol/l. (Nordstgaard et al 2013, genereviews.org). Bez adekvátnej liečby sa u heterozygotnej formy vyvíjajú príznaky KVO u mužov v priemere vo štvrtnej dekáde a u žien v piatej dekáde života (častejšie koronárna srdcová choroba ako NCMF, Huxley et al. 2013). U pacientov s homozygotnou formou sa manifestujú závažné KVV príhody v detstve, v priemere v druhej dekáde života (Kas Hovingh et al. 2013). **Molekulovo genetické vyšetrenie je indikované v prípade skóre DLNCS (Dutch Lipid Clinic Network Score) nad 5 (v prípade definitívnej alebo pravdepodobnej diagnózy), alebo v prípade splnenia kritérií podľa Simona Brooma.** Sekvenčná analýza neodhalí veľké delécie a duplikácie v géne *LDLR*, preto v druhom kroku, v prípade že použitím sekvenčnej analýzy nie je potvrdená prítomnosť patogénneho variantu, je indikovaný duplikačno/delečný skríning (analýza metódou MLPA), eventuálne následne sekvenčná analýza génu *PCSK9*.

Kritériá pre stanovenie diagnózy FH u dospelých: modifikované podľa Dutch Lipid Clinic Network Score

Rodinná anamnéza		skóre
-prvostupňový príbuzný s predčasným koronárnym a/alebo cievnym ochorením (muži<55, ženy <60 rokov)		1
alebo		
-prvostupňový príbuzný s LDL-cholesterolom nad 95 percentilom pre vek a pohlavie		2
-prvostupňový príbuzný s tendinóznymi xantómami a/alebo arcus comealis		
alebo		
-deti mladšie 18 rokov s LDL-cholesterolom nad 95 percentilom pre vek a pohlavie		
Osobná anamnéza		
pacient s predčasným CAD – koronárne artériové ochorenie (muži<55, ženy <60 rokov)		2
pacient s predčasným cerebrálnym alebo periférnym cievnym ochorením (muži<55, ženy <60 rokov)		1
Fyzikálny nález		
tendinózne xantómy		6
arcus cornealis pred 45 rokom veku		4
LDL-cholesterol mmol/l	LDL-C ≥ 8.5	8
	LDL-C 6.5–8.4	5
	LDL-C 5.0–6.4	3
	LDL-C 4.0–4.9	1
DNA analýza, potvrdená mutácia v géne <i>LDLR</i> , <i>APOB</i> , <i>PCSK9</i>		8

Diagnóza:

Skóre:

definitívna	≥ 8
pravdepodobná	6–7
možná	3–5
nepravdepodobná	<3

Materiál zaslaný na vyšetrenie: plná krv, odber ako na krvný obraz (do EDTA minim. aspoň 1 ml)



Ďakujem za pozornosť