

**XX Międzynarodowa konferencja  
Polskie Stowarzyszenie Choroby Huntingtona  
Warszawa, 17-18- 19 kwietnia 2015 r.  
Metody badań i leczenie choroby Huntingtona - aktualności**

# **INTERPRETACJA WYNIKÓW BADAŃ MOLEKULARNYCH W CHOROBI HUNTINGTONA**

**Wioletta Krysa**

**Pracownia Molekularnych Podstaw Chorób Neurodegeneracyjnych**

**Zakład Genetyki, IPiN, Warszawa**

## A Novel Gene Containing a Trinucleotide Repeat That Is Expanded and Unstable on Huntington's Disease Chromosomes

The Huntington's Disease Collaborative Research Group\*

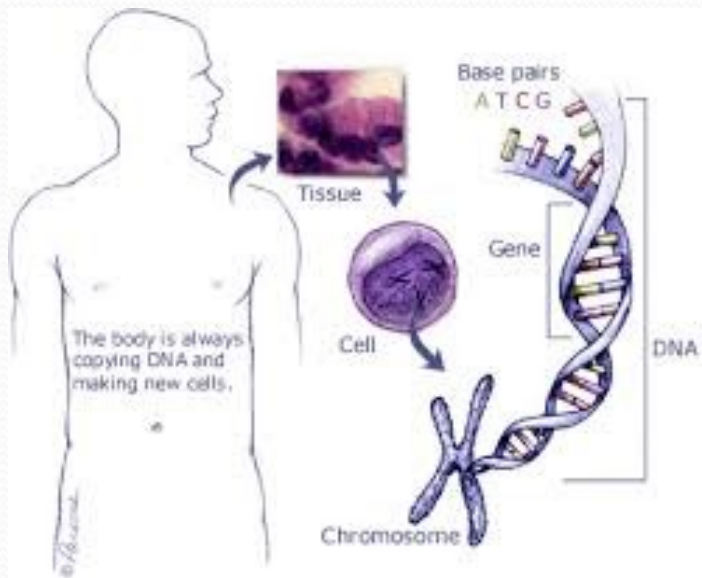
### Summary

The Huntington's disease (HD) gene has been mapped in 4p16.3 but has eluded identification. We have used

### Introduction

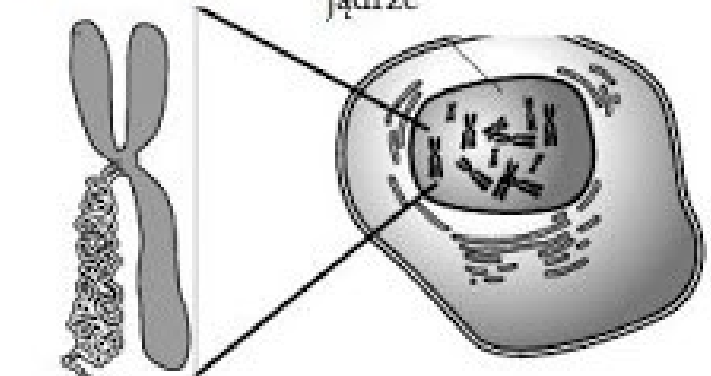
Huntington's disease (HD) is a progressive neurodegenerative disorder characterized by motor disturbance, cognitive loss, and psychiatric manifestations (Martin and Gusella, 1986). It is inherited in an autosomal dominant fashion and affects ~ 1 in 10,000 individuals in most populations of European origin (Harper et al., 1991). The hallmark of HD is a distinctive choreic movement disorder

- George Huntington - w 1872 r. artykuł „On chorea” w *Medical and Surgical Reporter*
- postępująca neurodegeneracyjna choroba o późnym początku
- monogenowy (gen *HTT*), **autosomalny (4p16.3) dominujący** wzór dziedziczenia
- częstość występowania 3 - 7 na 100.000 osób w populacji europejskiej

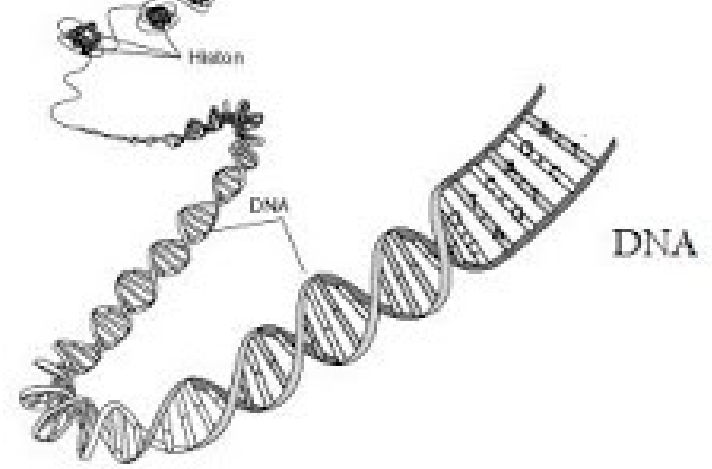
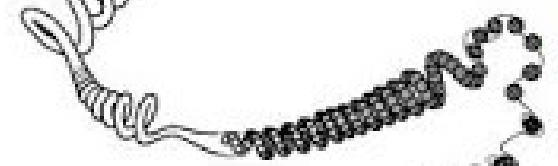


CHROMOSOM

Chromosomy w jądrze



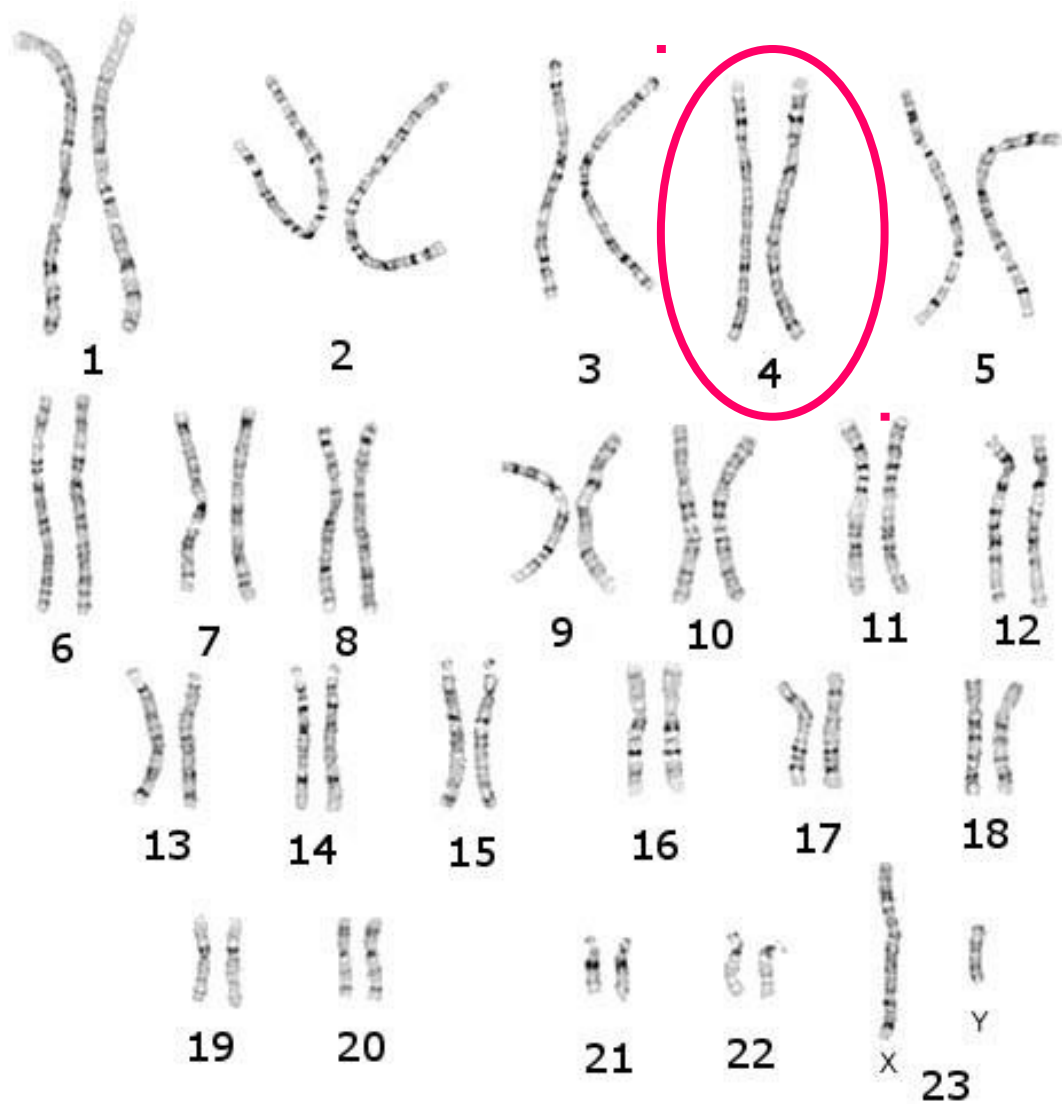
NUKLEOSOMY



# Kariotyp męski

22 pary autosomów

23 para allosomów



**Rodzaje badań molekularnych w kierunku HD (dostępne w IPIIN)**

**DIAGNOSTYCZNE**

wykonywane u pacjentów z klinicznym rozpoznaniem HD

**PRZEDOBJAWOWE**

dla osób pełnoletnich z 50% jak i 25% ryzykiem zachorowania

**PRENATALNE**

analiza DNA płodu jeżeli jedno z rodziców ma chorobotwórczy allele  
(poprzedzone analizą DNA matki i ojca)

**Badania dostępne poza IPIIN**

**PREIMPLANTACYJNE**

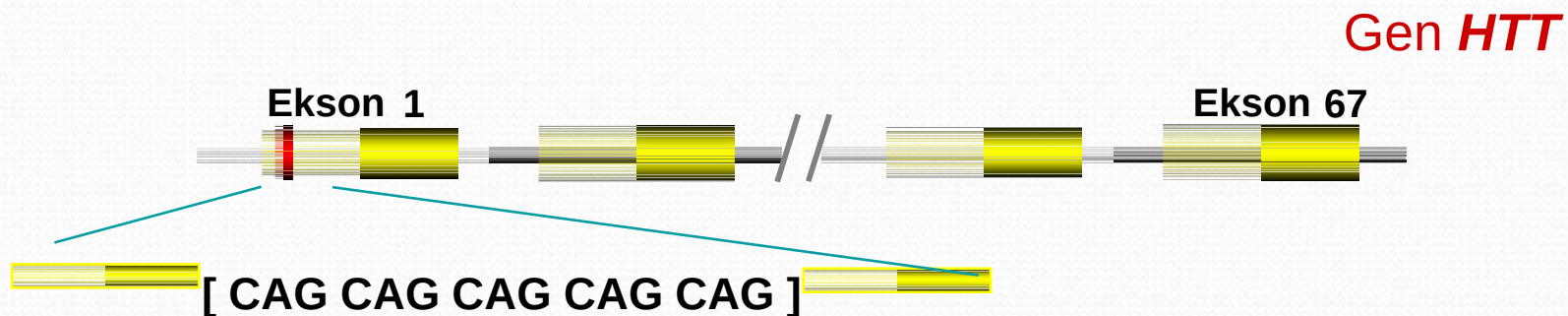
analiza DNA z komórki zarodka poprzedzająca jego transfer do macicy – w procedurze zapłodnienia *in-vitro*

# Podłoże genetyczne choroby Huntingtona

## Czynnik etiologiczny:

mutacja dynamiczna w obrębie genu *HTT*

- zwielokrotnienie sekwencji CAG poza zakres prawidłowy

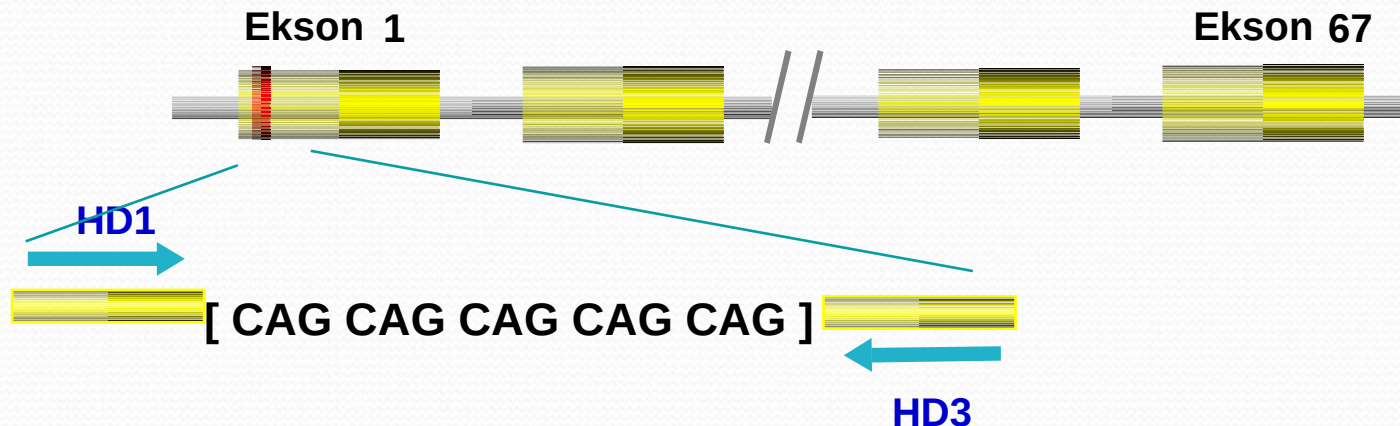


W zakresie chorobotwórczym charakteryzuje się większą niestabilnością w miarę wydłużania rejonu powtórzeń.

# Diagnostyka molekularna w HD

- PCR obszaru I eksonu przy użyciu starterów łączących się z sekwencjami flankującymi rejon powtórzeń  $(CAG)_n$
- rozdział elektroforetyczny produktów PCR
- ustalenie liczby powtórzeń  $(CAG)_n$

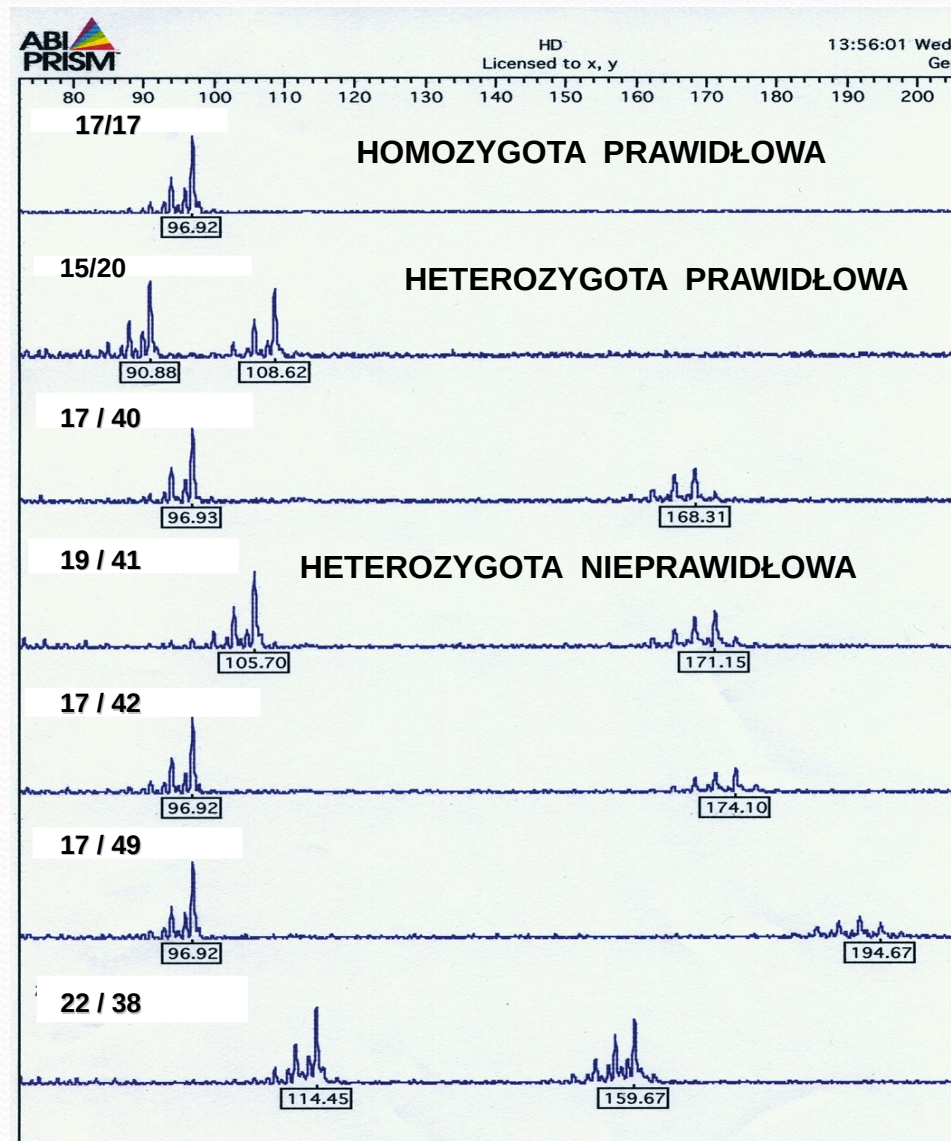
Gen *HTT*



$$(CAG)_n = \frac{\text{wielkość produktu PCR (bp)} - \text{długość starterów HD1/HD3 (47 bp)}}{3}$$

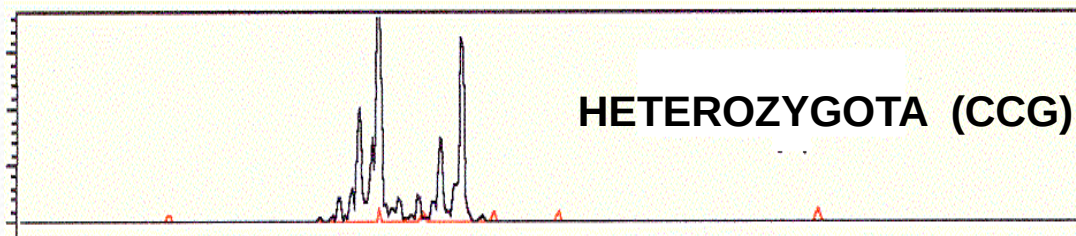
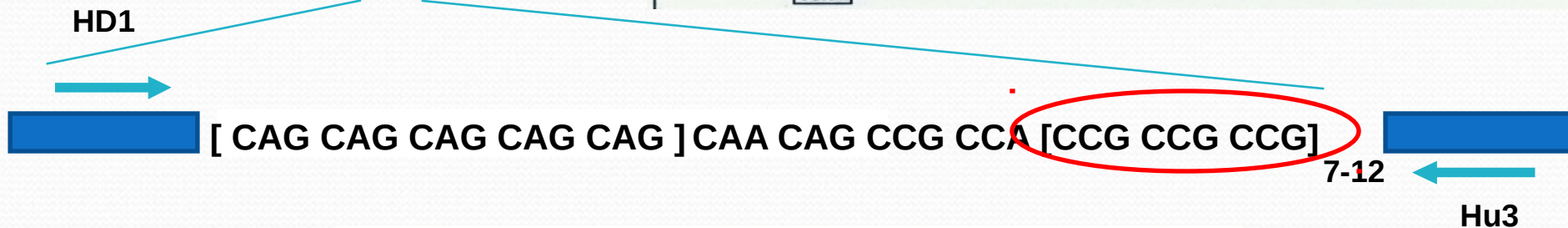
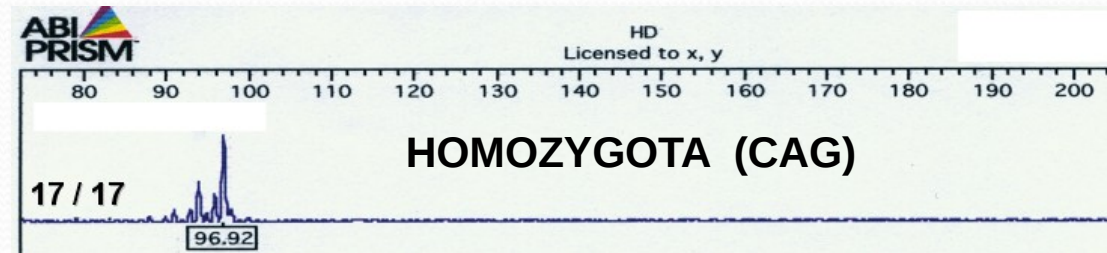
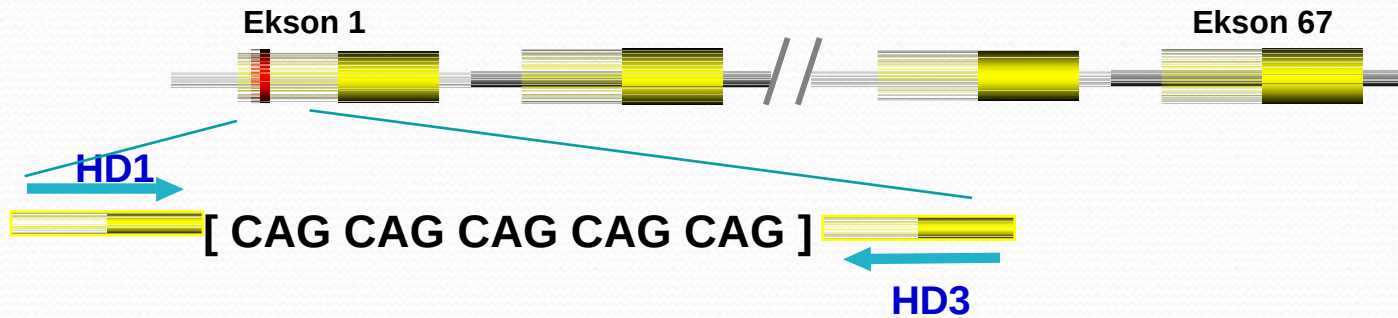
# Analiza regionu powtórzeń CAG w genie *HTT* - standardowa reakcja PCR

z wykorzystaniem znaczników fluorescencyjnych



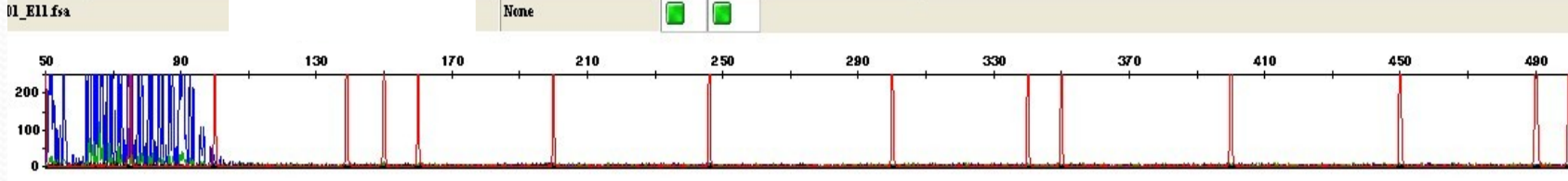
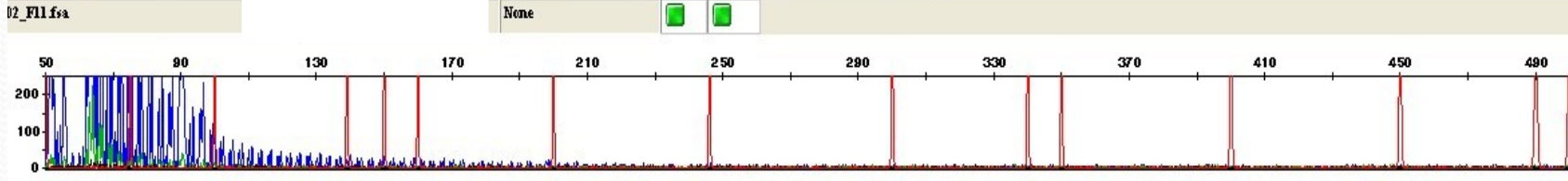
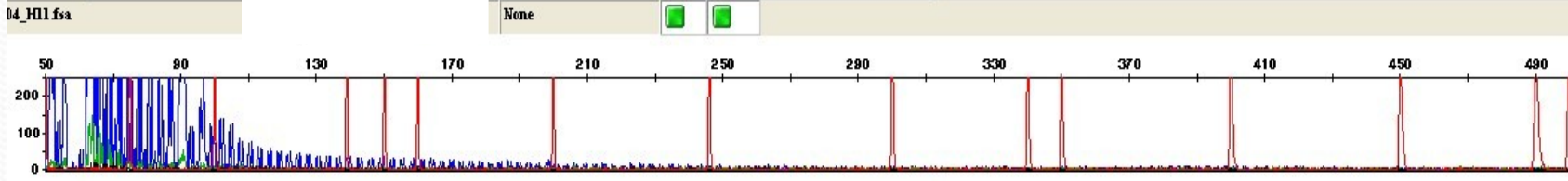
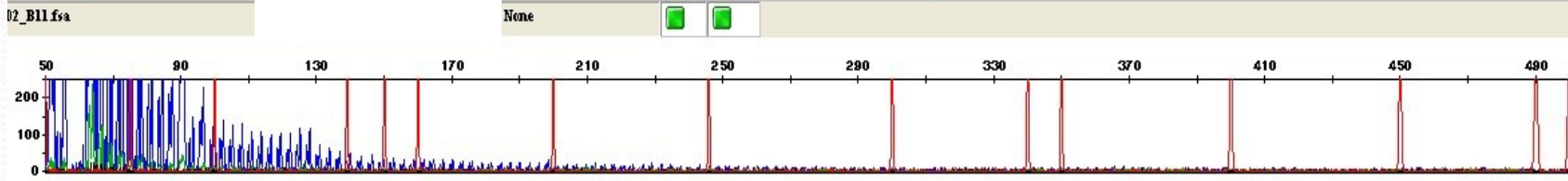
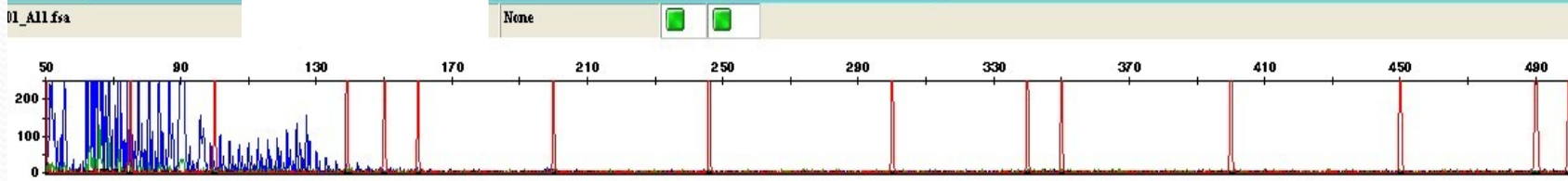
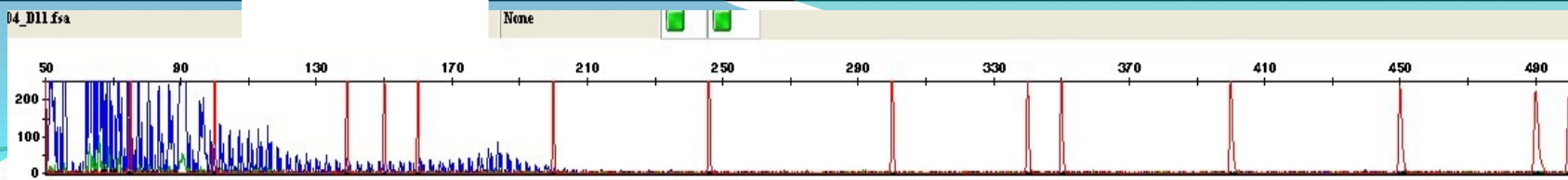


# Uzupełniające badania molekularne w chorobie Huntingtona



## REAKCJA RP-PCR (Repeat Primed PCR)

- zmodyfikowana reakcja PCR – zastosowanie 3 starterów
- metoda pośrednia, jakościowa – brak możliwości określenia liczby powtórzeń CAG
- produkty reakcji tworzą ciągłą „drabinkę” – w przypadku patogenicznej ekspansji (CAG)<sub>n</sub>
- stosowana do weryfikacji podejrzenia klinicznego HD u dzieci – dziecięca i młodzieńcza postać HD



## Interpretacja wyników badań molekularnych w HD

**10-35** (CAG)<sub>n</sub> - zakres prawidłowej liczby powtórzeń

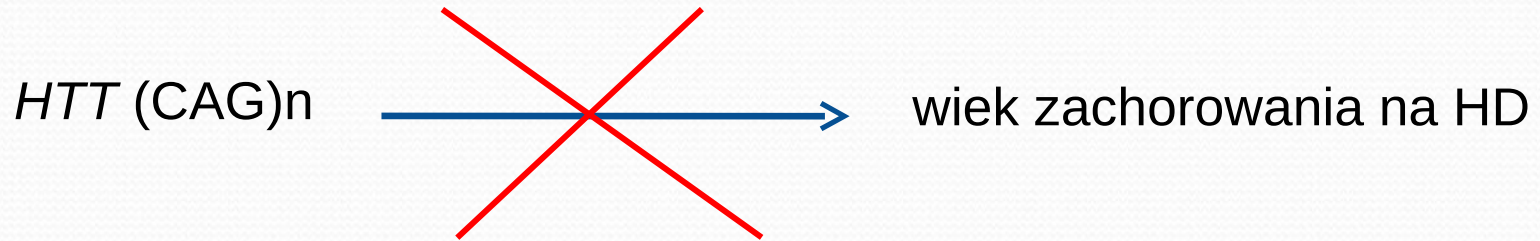
**≥ 36** (CAG)<sub>n</sub> - patogenna ekspansja

**27-39** (CAG)<sub>n</sub> – „problematiczna” interpretacja wyników

allele pośrednie - zawierają **27-35** powtórzeń CAG, osoba z takim allelem może przekazać do następnego pokolenia gen ze zwiększoną, do zakresu patogennego, liczbą (CAG)<sub>n</sub>, ale nie jest zagrożona zachorowaniem na HD

allele o „niekompletnej penetracji” - zawierają **36-39** (CAG)<sub>n</sub>, wysokie ryzyko zachorowania na HD, wynik wymaga interpretacji w kontekście historii rodzinnej

Liczba powtórzeń CAG a wiek zachorowania.....



skomplikowane modele matematyczne

Czynniki modyfikujące wiek zachorowania:

- genetyczne ~25.000 genów!!! (szczególnie do liczby powtórzeń poniżej 44CAG)
  - osobniczy polimorfizm genetyczny
  - oddziaływania huntingtyny z innymi białkami w komórce
- współwystępowanie innych chorób
- styl życia
- środowiskowe
- zdarzenia losowe



EUROPEAN **HUNTINGTON'S DISEASE** NETWORK

EHDN Grupa Robocza

## **GENETIC TESTING AND COUNSELLING GROUP**

- jakość i standardy diagnostyki molekularnej
- procedury w poradnictwie genetycznym HD

## Rekomendacje dla laboratoriów genetycznych – standardy i procedury

- laboratorium powinno się upewnić czy skierowanie na **badania przedobjawowe** pochodzi od genetyka klinicznego, który zna standardy poradnictwa w HD
- wynik badania powinien być zawsze wysyłany do lekarza kierującego, który podczas wizyty w Poradni Genetycznej omawia wszelkie jego aspekty

## Wymogi przedanalizacyjne – badanie diagnostyczne

### Identyfikacja pacjenta (Zlecenie badania laboratoryjnego)

nazwisko i imię  
imiona rodziców  
data urodzenia  
płeć

### Wywiad kliniczny (Wskazania do wykonywania badania)

wiek zachorowania  
obraz kliniczny  
wywiad rodzinny (rodowód, dane o innych członkach rodziny dotkniętych chorobą)

### ŚWIADOMA ZGODA PACJENTA NA BADANIA GENETYCZNE (podpisana przez pacjenta i lekarza)

Rozporządzenie Ministra Zdrowia z 21 stycznia 2009

Zmieniające rozporządzenie w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych.

Dz.U. 09.22.128 z 11 lutego 2009



## Wymogi przedanalizacyjne – **badanie przedobjawowe**

Badania przedobjawowe – procedura prowadzona wyłącznie przez **Poradnię Genetyczną**

Ustalenie czy Poradnia ma zdefiniowaną procedurę w takich przypadkach:

- minimum 3 wizyty
- pobranie próbki na 2 wizycie

Wcześniej stwierdzona mutacja u kogoś z rodziny (dostęp do próbki lub wyniku z akredytowanego laboratorium)

Pobranie dwóch niezależnych próbek krwi

## **Wymogi przedanalityczne – badanie prenatalne**

**Informacja o rodzicu-nosicielu mutacji (genotyp)**

**Kopia wyniku badania genetycznego**

**Próbki DNA od obojga rodziców**

**Zgoda na badania**

**\* laboratorium powinno otrzymać próbkę krwi po urodzeniu/usunięciu ciąży w celach wewnątrzlaboratoryjnej kontroli jakości**

## **LABORATORIUM GENETYCZNE**

- **Poddawanie się zewnętrznej kontroli jakości EMQN  
(The European Molecular Genetics Quality Network)**
- **Utrzymywanie wewnętrzzlaboratoryjnej kontroli jakości,  
opracowanie procedur diagnostycznych**