



РЕПУБЛИКА СЕВЕРНА МАКЕДОНИЈА
УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ ВОСКОПЈЕ
УНИВЕРЗИТЕТСКА ШКОЛА ЗА ДОКТОРСКИ
СТУДИИ

ФАРМАЦЕВТСКИ ФАКУЛТЕТ - СКОПЈЕ
СТУДЕНТСКИ ПРАШАЊА 2

011-ГК

Број:
Датум: 25.10.2021 година
Скопје

До
Фармацевтски факултет во Скопје
Совет на студиската програма по фармација

ПРИЈАВА

за учество на годишна конференција во IV семестар во академска 2021/2022 година

Студент	Марија Димишковска
Број на индекс	64/др
Ментор	Проф. д-р Дијана Плашеска-Каранфилска
Студиска програма	III циклус докторски студии
Студиска подпрограма	/
Поле на истражување	Генетика
Тема	Молекуларна карактеризација на ретките болести и класификација на детектираните генски варијанти
Година на запишување на докторски студии	2018
Број на остварени кредити	57
Забелешка	/

Скопје, 25.10.2021 година.

Студент

Ментор

УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ ВО СКОПЈЕ
ШКОЛА ЗА ДОКТОРСКИ СТУДИИ
ФАРМАЦЕВТСКИ ФАКУЛТЕТ
Студиска програма: ТРЕТ ЦИКЛУС

Кандидат: Марија Димишковска

Број на индекс: 64/Др

Вработен во: Истражувачки Центар за Генетско Инженерство и Биотехнологија „Георги Д. Ефремов“, Македонска Академија на Науките и Уметностите

Ментор: Проф. Др. Дијана Плашеска-Каранфилска

Студиска година: втора (III семестар)

Семинарски труд

Наслов на темата:

Молекуларна карактеризација на ретките болести и класификација на детектираните генски варијанти

Иако дури 80% од ретките болести имаат генетска причина, а употребата на новите секвенционирачки технологии овозможи побрзо и поевтино испитување на ретките болести, сепак поставувањето на генетска дијагноза сеуште може да биде голем предизвик. Имено, покрај потребата од детално познавање на фенотипот на пациентот, неопходни се познавања на гените кои може да се асоцирани со болеста [1, 2]. За таа цел од огромна помош се датабазите кои содржат информации за гени и заболувања како што се: Online Mendelian Inheritance in Man - OMIM, OrphaNet, ClinGen и други [Web извори]. Во овие референтни датабази може да се најдат информации за механизмот на болеста (хаплоинсуфициенција, триплосензитивност, губење или здобивање на функција на протеинот), начинот на наследување, како и за пенетрантноста на болеста [3].

Сепак, употребата на панели со едновремено испитување на поголем број на гени предизвика потешкотии при справување со големиот број на генски варијанти кои се детектираат кај секој испитаник. Така на пример: при секвенционирање на кодирачките региони од 4800 гени (клинички егзом) се добиваат околу 9000 генски варијанти додека пак при секвенционирање на целосен егзом се добиваат околу 20000 генски варијанти по пациент. Па така покрај потребата од детално познавање на фенотипот на пациентот, начинот на наследување на болеста и информации за гените кои се асоцирани со болеста,

за поставување на генетска дијагноза со употреба на новите секвенционирачки технологии неопходно е изнаоѓање на една дефинитивна генска промена (или две промени за рецесивни заболувања) од „купот“ промени детектирани кај пациентот.

Процесот на издвојување на дефинитивен причинител на болеста вклучува биоинформатичка обработка со анотација на варијантите според референтни извори, пребарување на научна и медицинска литература и класифицирање на детектираните варијанти кај пациентот.

Биоинформатичката обработка на варијантите вклучува пребарување и анотација на варијантите според: 1) бази на референтни геноми (NCBI Genome, UCSC Genome) кои служат за идентификација на соодветна референтна секвенца; 2) популациски бази (ExAC, gnomAD, EVS) кои вклучуваат податоци за варијанти детектирани во различни популациони студии во кои се исклучени субјекти со педијатриски заболувања и роднински поврзани субјекти; 3) бази за заболувања (ClinVar, OMIM, HGMD, LOVD) кои содржат промени детектирани кај афектирани индивидуи; 4) алатки за *in silico* предикција на ефектот на варијантата врз протеинот (PolyPhen2, SIFT, MutationTaster, Human Splicing Finder) [4-7].

Класификација на детектираните промени пак претставува нивно сортирање според ефектот што го имаат врз протеинот. Со цел за воведување на унифицирана терминологија за класификација на генските варијанти, во 2013 година е формирана работна група која се состои од членови на американскиот колеџ за медицинска генетика и геномика (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG), асоцијацијата за молекуларна патологија (Association for Molecular Pathology, AMP) и членови од колеџот на американски патолози (College of American Pathologists, CAP). Оваа работна група во 2015 година објави стандарди и препораки за интерпретација на генски варијанти и нивно униформирано класифицирање на: патогени, веројатно патогени, со непознато клиничко значење (Variant of Unknown Significance – VUS), веројатно бенигни или бенигни промени [8].

Според здружението, најпрво се сугерира на замена на дотогаш користените термини „мутација“ и „полиморфизам“ со општиот термин „варијанта“ и следните определби: патогена, веројатно патогена, со непознато клиничко значење, веројатно бенигна или бенигна. При репортирање на варијанта, било да е во научен или клинички

запис, се препорачува наведување на користената референтна секвенца и унифицирано именување на варијантите и тоа со користење на стандардите пропишани од здружението за варијанти во хуманиот геном (Human Genome Variation Society - HGVS) [9]. На овој начин се обезбедува недвосмислено (унифицирано) обележување на варијантата со што се овозможува ефикасно споделување и последователно користење на генетските информации.

Според стандардите и препораките за интерпретација на генски варијанти, воспоставени се два сета на критериуми – еден за класификација на патогени и веројатно патогени промени и еден за класификација на бенигни и веројатно бенигни промени [8].

Критериумите кои се користат за патогена класификација се поделени на:

- **Многу силни (Very Strong; PVS1)**

Ова правило важи за варијанти кои предизвикуваат нефункционална алела во ген каде губењето на неговата функција (loss of function) е познат механизам на болеста. Такви промени се: *nonsense*, *frameshift*, промени на канонските сплајсинг места, иницирачки кодон, како и делеции на еден или повеќе егзони.

- **Силни (Strong; PS1-4)**

PS1: Варијанта која предизвикува иста аминокиселниска промена како претходно позната патогена варијанта без разлика на нуклеотидната промена (Пр. Val→Leu предизвикано од G>C или G>T во истиот кодон).

PS2: Варијанта настаната *de novo* со притоа докажано родителство, кај пациент без фамилијарна историја.

PS3: Варијанта за која има објавени *in vitro* или *in vivo* функционални студии кои го покажуваат штетниот ефект врз генот или генскиот продукт.

PS4: Фреквенцијата на варијантата кај афектирани индивидуи е поголема од фреквенцијата во контролна група.

- **Умерени (Moderate; PM1-6)**

PM1: Варијантата е лоцирана во мутациски *hot spot* и/или критички и функционален домен на протеинот. Притоа во регионот не е објавена позната бенигна варијанта.

PM2: Варијантата не се среќава во популациски бази (ExAC, gnomAD, EVS) или да е со екстремно ниска фреквенција за рецесивни гени.

PM3: За рецесивни болести, варијантата е детектирана во *trans* со друга патогена варијанта со вклучено тестирање на родителите за носителство.

PM4: Варијантата предизвикува промена на должината на протеинот како резултат на *in-frame* инсерции или делеции, во нерепетитивен регион од генот.

PM5: Нова *missense* варијанта во аминокиселински остаток каде е позната друга *missense* промена (Пр. Arg156His е позната патогена промена, а сега е детектирана Arg156Cys).

PM6: Варијантата е отсутна од родителите, но не е докажано нивно родителство, поради што се претпоставува дека оваа варијанта е настаната *de novo*.

- **Поткрепувачки (Supporting; PP1-5)**

PP1: Варијантата косегрегира со болеста кај повеќе афектирани членови од семејството и се наоѓа во ген кој е докажан предизвикувач на болеста.

PP2: Варијантата е *missense*, се наоѓа во ген кој има ниска стапка на бенигни *missense* варијанти и најчести патогени промени во генот се *missense* промени.

PP3: Повеќе компјутерски софтвери приложуваат докази за патоген ефект врз генот (PolyPhen2, SIFT, MutationTaster, Human Splicing Finder итн.).

PP4: Варијантата се наоѓа во ген кој е високо специфичен за фенотипот на пациентот и оваа болест е со единечна генетска етиологија.

PP5: Варијантата е репортирана како патогена од страна на истакнати извори (ClinVar, UniProt), но доказите не се достапни за самата лабораторија да изврши дополнителна проценка.

Критериумите кои се користат за бенигна класификација пак се поделени на:

- **Самостоен (Stand Alone; BA1)**

Овој критериум се однесува на варијанти со алелна фреквенција поголема од 5% во популациските бази (ExAC, gnomAD, EVS).

- **Силни (Strong; BS1-4)**

BS1: Алелната фреквенција е повисока од очекуваната за да предизвикува болест.

BS2: Варијантата е детектирана кај здрава возрасна индивидуа во хомозиготна, хетерозиготна или хемизиготна форма во ген асоциран со рецесивна, доминантна или X-врзана болест со целосна пенетрантност и ран почеток.

BS3: Варијантата за која има објавени *in vitro* или *in vivo* функционални студии кои покажуваат дека нема штетен ефект врз протеинот.

BS4: Недостаток од сегрегација кај афектираните членови од фамилијата.

• **Поддржувачки (Supporting: BP1-7)**

BP1: Варијантата е *missense* и се наоѓа во ген за кој се знае дека примарно трункирачки варијанти се патогени.

BP2: Варијантата е детектирана во *trans* позиција со патогена варијанта за доминантен и целосно пенетрантен ген или во *cis* со патогена варијанта во ген со било каков начин на наследување.

BP3: Варијантата е *in-frame* делеција или инсерција и се наоѓа во репетитивен регион на генот без позната функција.

BP4: Повеќе компјутерски софтвери укажуваат дека варијантата нема патоген ефект врз генот или генскиот продукт.

BP5: Варијантата е пронајдена кај пациент со друга детектирана молекуларна причина за болеста.

BP6: Варијантата е репортирана како бенигна од страна на истакнати извори, но доказите не се достапни за самата лабораторија да изврши дополнителна проценка.

BP7: Синонимна варијанта за која компјутерските софтвери не предвидуваат ефект врз сплајсинг консензус секвенцата ниту пак создавање на ново сплајс место и дополнително нуклеотидот не е високо конзервиран.

Овие правила се однесуваат на сите достапни податоци за варијантата, без разлика дали тие податоци се собрани од истражување на тековниот случај или од претходно објавени податоци во литературата или во релевантните датабази. Со согледување на целокупните докази прибрани за една варијанта (и оние во прилог на патогена и оние во прилог на бенигна класификација) и со нивно комбинирање, се овозможува извлекување на краен заклучок и класификација на одредената варијанта како патогена/веројатно патогена (класа 5/4) или веројатно бенигна/бенигна (класа 2/1). Сепак доколку за

варијантата од интерес нема доволно критериуми за да биде класифицирана или доколку бенигните и патогените докази се конфликтни, варијантата останува како варијанта со непозната клиничка сигнификантност (класа 3).

Работна група составена од членови од европското здружение за хумана генетика (European Society of Human Genetics – ESHG) оваа година на европската конференција за хумана генетика (European Human Genetics Conference, Gothenburg, Sweden, June 15–18, 2019) предложија дводимензионален систем за класификација на варијанти со користење на молекуларни и клинички податоци. Молекуларниот систем се заснова на ACMG/AMP препораките, но се разликува по тоа што за варијантите со непознато клиничко значење, кои според ACMG/AMP системот се рангираат како 3, воведува вредност од 0 која важи за сите VUS варијанти за кои нема никакви податоци, додека пак VUS варијантите кои се силни кандидати (hot VUS или VUS+) се вреднуваат како класа 3. Клиничкото оценување пак ги зема предвид пенетрантноста на генот и експресивноста на варијантата (хипоморфна или рецесивна варијанта), односно доколку варијантата е ризик фактор (како на пример *F2 R506Q*) има клиничко значење 2, доколку варијантата се наоѓа во благо пенетрантен ген (како на пример *ATM*) има клиничко значење 3, додека пак ако се наоѓа во високо пенетрантен ген (како на пример *BRCA1*) има клиничко значење 5.

Имено овој дводимензионален систем препорачува комбинирање на молекуларното и клиничкото рангирање (A+B), со што се добива сумарна вредност која доколку изнесува над 4, тогаш таа варијанта се препорачува да се репортира во клиничкиот извештај.

Пред развојот на новите секвенционирачки технологии и воведувањето на ACMG/AMP препораките, користење на бази со клинички податоци беа единствениот извор на кој лабораториите можеа да се потпрат при карактеризирање на детектиран генски дефект во избраниот ген за анализа. Сепак, развојот на новите секвенционирачки технологии, масивното секвенционирање на голем број гени и обработката на панел од гени кои можат да се асоцирани со болеста (наместо анализата на само еден ген) обезбедија огромно количество на информации како за фреквенција на голем број варијанти кои можат да се сретнат во различните популации, така и за ретките патогени промени детектирани кај пациентите. Ваквиот развој во молекуларната биологија укажа

на потребата за неслепо користење на клиничките датабази и поголема претпазливост при клиничко репортирање на варијантите [10, 11].

Со воведување на ACMG/AMP препораките и ESHG препораките за дводимензионално класифицирање, покрај користење на клиничките датабази, се наложува динамичен процес на експертско прегледување на сите достапни докази за една варијанта и нејзино евалуирање со користење на: податоци од достапната литература, функционални студии, популациски фреквенции, статистичка анализа на клинички податоци, податоци за фенотипот и фамилијарната историја на пациентот како и податоци од искуството на самата лабораторија. Сето ова, обезбедува поголеми шанси за изнаоѓање на дефинитивен генски дефект и намалена стапка на грешки при класификација на варијантите. На овој начин се овозможи поголема прецизност на генетските тестирања и поставување на попрецизни дијагнози што е од клучно значење за воспоставување на соодветен медицински третман.

Литература

1. Gainotti S, Mascalzoni D, Bros-Facer V, Petrini C, Florida G, Roos M, Salvatore M, Taruscio D. Meeting Patients' Right to the Correct Diagnosis: Ongoing International Initiatives on Undiagnosed Rare Diseases and Ethical and Social Issues. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(10). pii: E2072.
2. Field MJ, Boat TF. Rare Diseases and Orphan Products: Accelerating Research and Development. Washington (DC): National Academies Press (US); 2010.
3. Strande NT, et al. Evaluating the Clinical Validity of Gene-Disease Associations: An Evidence-Based Framework Developed by the Clinical Genome Resource. *Am J Hum Genet*. 2017;100(6):895.
4. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 2010;7:248.
5. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009;4:1073.
6. Schwarz JM, Rödelsperger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods*. 2010;7:575.
7. FO Desmet, Hamroun D, Lalande M, Collod-Beroud G, Claustres M, Beroud C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acid Research*. 2009;37(9):e67
8. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL. 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. *Genet Med*. 2015;17(5):405.
9. den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, Roux AF, Smith T, Antonarakis SE, Taschner PE. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat*. 2016;37(6):564.
10. Gradishar W, Johnson K, Brown K, Mundt E, Manley S. Clinical Variant Classification: A Comparison of Public Databases and a Commercial Testing Laboratory. *Oncologist*. 2017;22(7):797.
11. Walsh R. et al. Quantitative approaches to variant classification increase the yield and precision of genetic testing in Mendelian diseases: the case of hypertrophic cardiomyopathy. *Genome Med*. 2019;11(1):5.

Web извори

<https://www.omim.org/>

<https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>

<https://www.clinicalgenome.org/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>

<https://genome.ucsc.edu/index.html>

<http://exac.broadinstitute.org/>

<https://gnomad.broadinstitute.org/>

<https://evs.gs.washington.edu/EVS/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>

<http://www.hgmd.org>

<https://www.lovd.nl>

100

СМ

УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ ВО СКОПЈЕ
ШКОЛА ЗА ДОКТОРСКИ СТУДИИ
ФАРМАЦЕВТСКИ ФАКУЛТЕТ

Студиска програма: трет циклус за докторски студии од областа за фармација

РЕЦЕНЗИЈА

На семинарски труд од III семестар под наслов **"Молекуларна карактеризација на ретките болести и класификација на детектираните генски варијанти"** на докторандот магистер по молекуларна биологија **Марија Димишкова**

Со одлука на Советот на докторски студии на Фармацевтскиот факултет во Скопје, определена е рецензентска комисија за оцена на семинарскиот труд од трет циклус на студии во состав: проф. д-р **Александар Димовски**, редовен професор на Фармацевтски факултет во Скопје, д-р **Љубица Шутуркова**, редовен професор на Фармацевтскиот факултет во Скопје, д-р **Дијана Плашеска-Каранфилска**, насловен професор на Фармацевтски факултет во Скопје.

По прегледот на доставениот семинарски труд, Рецензентската комисија го доставува следниот

ИЗВЕШТАЈ

Во однос на предложениот семинарски труд, Комисијата констатира дека истиот ги содржи сите елементи предвидени при оваа фаза.

Најпрво, кандидатот го прикажува предизвикот во поставување на генетска дијагноза кај ретките болести и укажува на бази кои содржат информации за гени и заболувања кои можат да помогнат при утврдување на генетската причина на ретките болести.

Потоа кандидатот, врз основа на многубројни литературни податоци и врз основа на искуството стекнато во текот на работата во ИЦГИБ (Истражувачки центар за генетско инженерство и биотехнологија „Георги Д. Ефремов“, МАНУ), ги изнесува предностите на новите секвенционирачки технологии, но и потешкотиите со кои се справуваат здравствените и научните работници кои се вклучени во обработка на податоците добиени со овие методи. Со цел за утврдување на генетската причина на болеста кај пациентот, кандидатот ја истакнува важноста на: биоинформатичката обработка со анотација на варијантите според поголем број референтни извори, темелно пребарување на научна и медицинска литература, како и класифицирање на детектираните варијанти.

Кандидатот ги опишува најновите правила и препораки за класификација на детектираните варијанти пропишани од американскиот колеџ за медицинска генетика и геномика (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG), Асоцијацијата за молекуларна патологија (Association for Molecular Pathology, AMP) и Колеџот на американски патолози (College of American Pathologists, CAP). Покрај ACMG препораките, кандидатот наведува и најнов начин на класификација на варијантите наречен димензионален систем за класификација со комбинирање на молекуларното и клиничкото рангирање, предложен во 2019 година од членови на Европското здружение за хумана генетика (European Society of Human Genetics – ESHG).

Кандидатот ја истакнува и важноста за навремена и прецизна молекуларна карактеризација кај пациентите со ретки болести како важен елемент за спроведување на соодветен и современ медицински третман.

ЗАКЛУЧОК

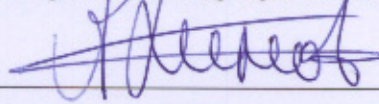
По прегледот на семинарскиот труд под наслов "Молекуларна карактеризација на ретките болести и класификација на детектираните генски варијанти" на докторандот Марија Димишковска, Рецензентската комисија констатира дека станува збор за семинар кој ги прикажува предностите и предизвиците при поставување на генетска дијагноза кај ретките болести со користење на новите секвенционирачки технологии и претставува основа за понатамошно истражување на ретките болести на докторандот.

ПРЕДЛОГ

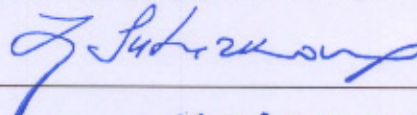
Врз основа на горенаведеното, Рецензентската комисија позитивно го оценува доставениот семинарски труд под наслов "Молекуларна карактеризација на ретките болести и класификација на детектираните генски варијанти" на докторандот Марија Димишковска и му предлага на Советот на докторски студии на Фармацевтскиот факултет при УКИМ во Скопје да го прифати и закаже негова презентација.

Рецензентска комисија:

д-р Александар Димовски, редовен професор
на Фармацевтски факултет во Скопје



д-р Љубица Шутуркова, редовен професор на
Фармацевтски факултет во Скопје



д-р Дијана Плашеска-Каранфилска,
насловен вонреден професор на Фармацевтски
факултет во Скопје

