

# Ο Γενετικός έλεγχος στα κληρονομικά αυτοφλεγμονώδη νοσήματα: Δυνατότητες, ερμηνεία και προοπτικές.

Δημήτρης Παλαμηδάς

Μοριακός Βιολόγος-Γενετιστής, MSc

Εργαστήριο Παθολογικής Φυσιολογίας

Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ, Αθήνα



Οκτώβριος, 2023

# Περίγραμμα Ομιλίας

## 1. Μοριακές εξετάσεις - Μεθοδολογίες

1. Μέθοδος Βασισμένη στον ανάστροφο υβριδισμό

2. Real Time PCR

3. **NGS vs Αλληλούχηση κατά Sanger**

4. Whole Exome vs Targeted Sequencing (gene panels)

## 2. Αυτοφλεγμονώδη Νοσήματα

1. NGS στη διάγνωση των Αυτοφλεγμονωδών Νοσημάτων

2. Νεότερα δεδομένα από την επιστημονική βιβλιογραφία

## 3. Πως αξιολογείται το αποτέλεσμα;

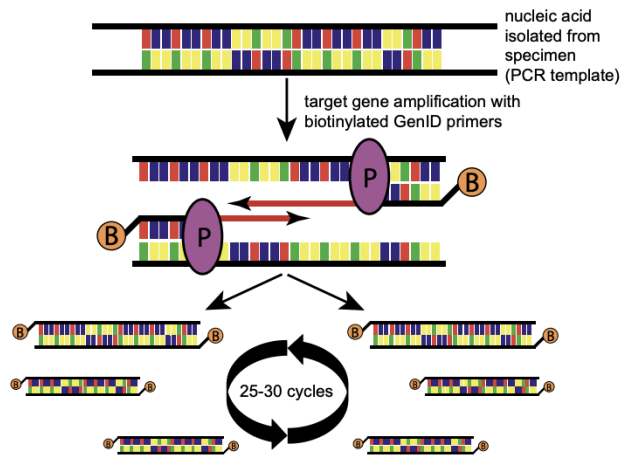
1. Βάσεις γενετικών δεδομένων

2. Ένα παράδειγμα κλινικού συνδρόμου με σπάνια ευρήματα γονιδιακού ελέγχου

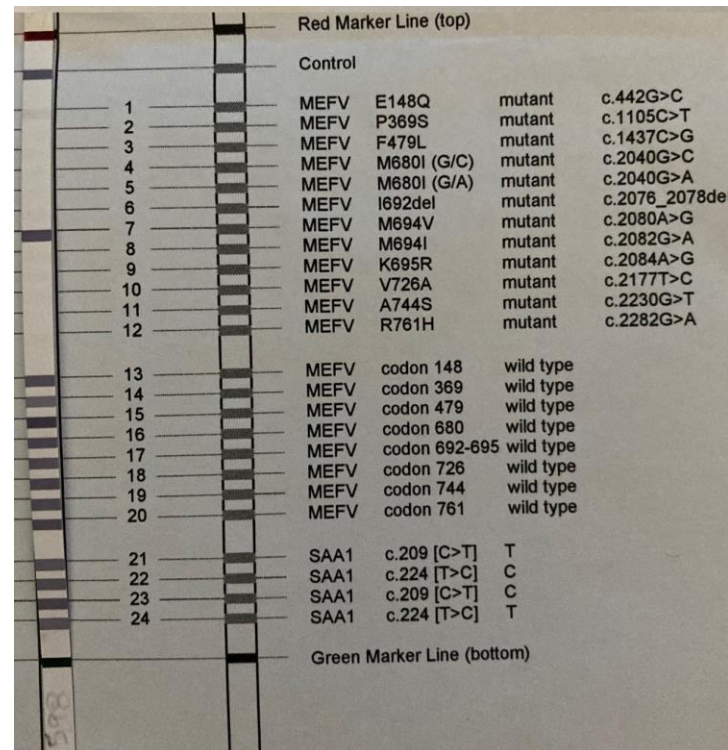
# 1. Μοριακές εξετάσεις - Μεθοδολογίες

## 1.1. Μέθοδος Βασισμένη στον ανάστροφο υβριδισμό

### Παρουσίαση Μεθόδου



### Αποτέλεσμα

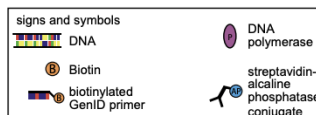


- Εντοπισμός SNPs (single nucleotide polymorphism)
- Εντοπισμός μεταλλαγών σε ομόζυγη και ετερόζυγη κατάσταση

Χρησιμοποιείται κυρίως:

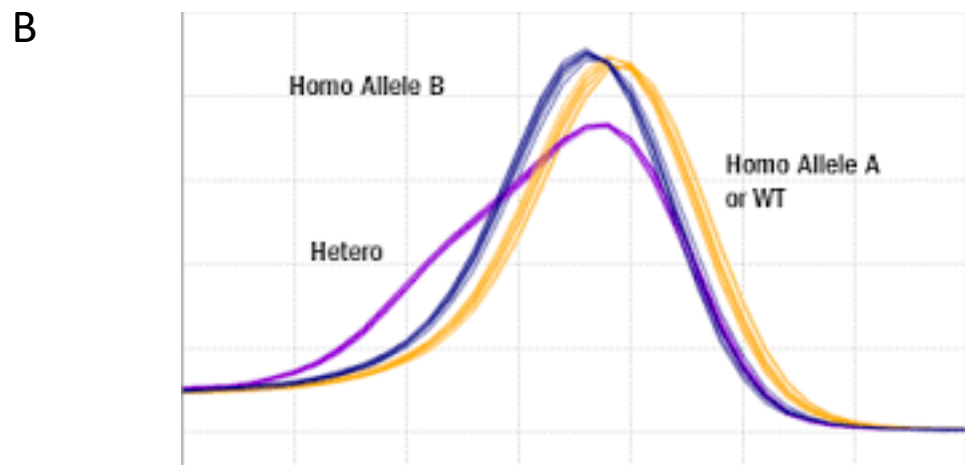
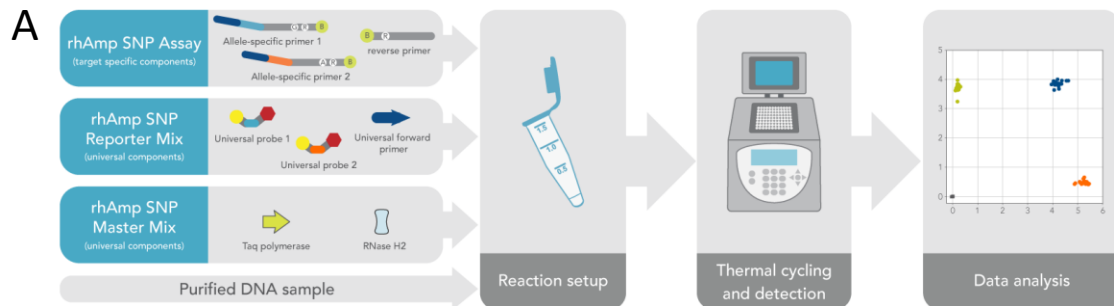
- Στον μοριακό έλεγχο για FMF (Familial Mediterranean Fever)
- Στον μοριακό έλεγχο θρομβοφιλίας-καρδιαγγειακού κινδύνου
- Στην γονοτύπηση HLA-B27

sequence-specific DNA probes immobilized on nitrocellulose strip



# 1. 1. Μοριακές εξετάσεις - Μεθοδολογίες

## 1.2. Real Time PCR



*Figure:*A. Real Time PCR workflow for genotyping B. Amplification plot depicting genotyping results by Real Time PCR detection.

- Εύκολη και γρήγορη προετοιμασία αντιδράσεων PCR
- **Εντοπισμός SNP** με τη χρήση μικρής ποσότητας DNA
- Εντοπισμός μεταλλαγών σε **ομόζυγη και ετερόζυγη κατάσταση**
- Χαρακτηρισμός αλληλίων του γενετικού τόπου των **HLA gen complex**
- Μεθοδολογία που αξιοποιείται και στην ιολογία
- Επιτρέπει τον ταυτόχρονο εντοπισμό περιορισμένου αριθμού SNP

# 1. Μοριακές εξετάσεις - Μεθοδολογίες

## 1.3. NGS vs Αλληλούχηση κατά Sanger

### Αλληλούχηση κατά Sanger

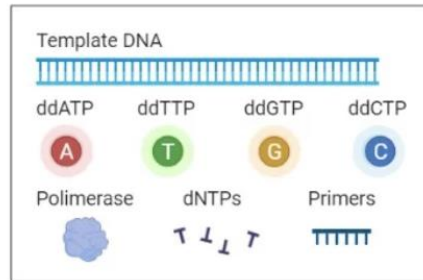
#### Πλεονεκτήματα

- Γρήγορο, οικονομικό, αποτελεσματικό για μικρές περιοχές του γονιδιώματος
- Εγκαθιδρυμένο πρωτόκολλο
- Απλή ανάλυση αποτελέσματος
- Ελεγχόμενο μέγεθος 500-700 bps

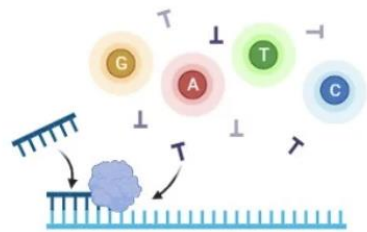
#### Μειονεκτήματα

- Χαμηλή ευαισθησία (~15–20% VAF όριο ανίχνευσης)
- Χαμηλή ανακαλυπτική δυνατότητα
- Σχεδόν αδύνατος ο έλεγχος ολόκληρης της αλληλουχίας ενός γονιδίου

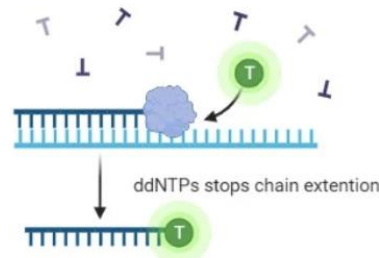
#### Reagents



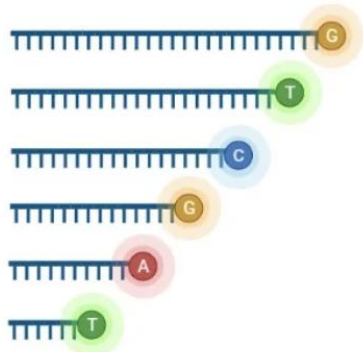
#### ① Primer annealing and chain extension



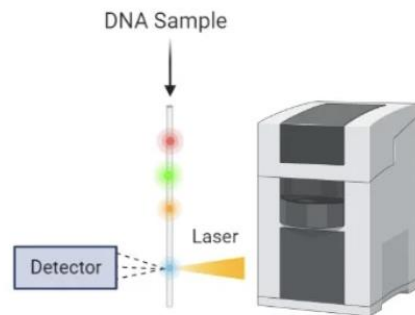
#### ② ddNTP binding and chain termination



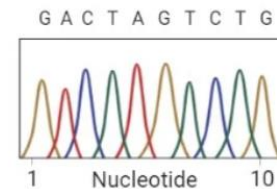
#### ③ Fluorescently labelled DNA sample



#### ④ Capillary gel electrophoresis and fluorescence detection

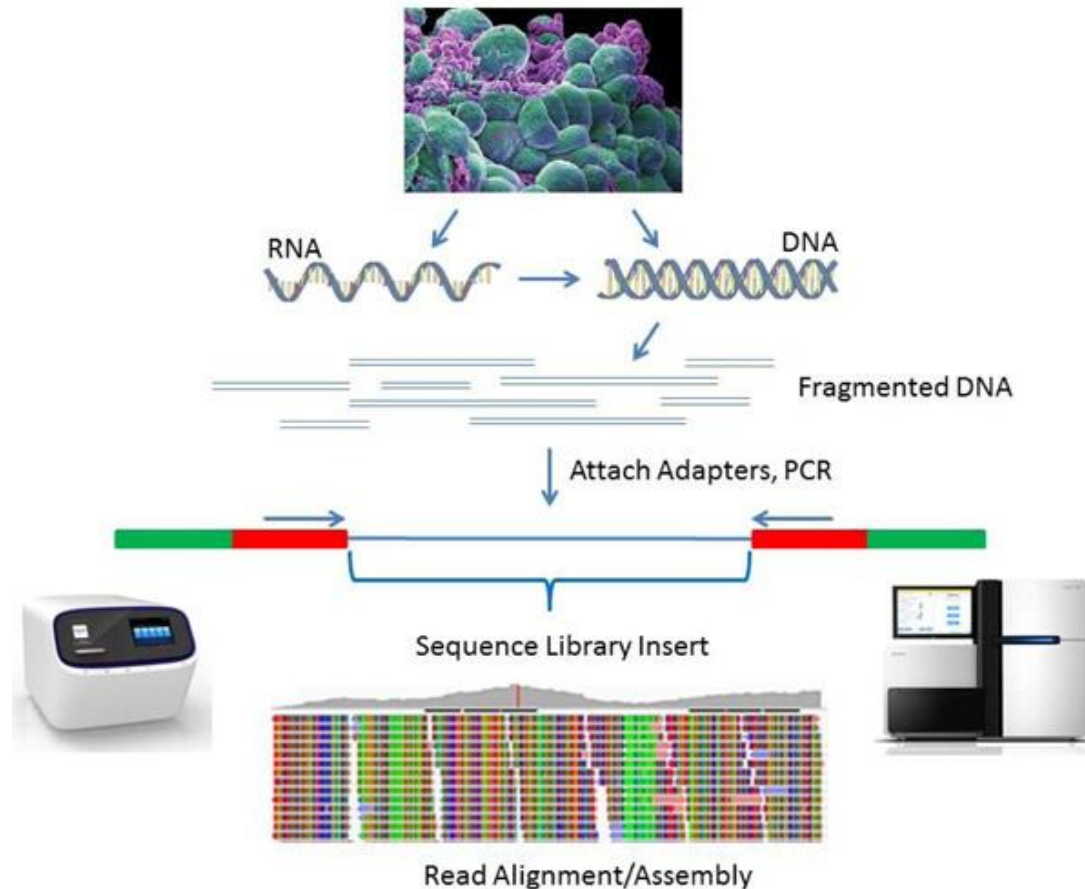


#### ⑤ Sequence analysis and reconstruction



# 1. Μοριακές εξετάσεις - Μεθοδολογίες

## 1.3. NGS vs Αλληλούχηση κατά Sanger



### Next Generation Sequencing

#### Αλληλούχηση Νέας Γενιάς

#### Πλεονεκτήματα

- Υψηλή ευαισθησία (μεγάλο βάθος ανάγνωσης-εντοπισμός μεταλλαγών σε ποσοστό 1% )
- Υψηλή ανακαλυπτική δυνατότητα
- Μεγάλος όγκος παραγόμενων δεδομένων
- Ταυτόχρονη αλληλούχηση πολλαπλών δειγμάτων

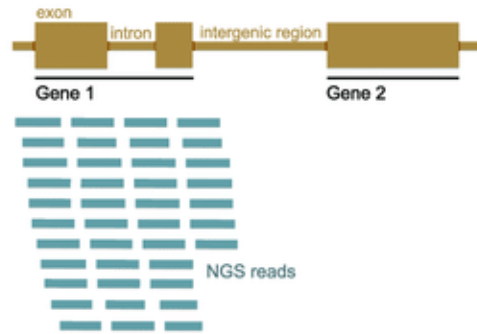
#### Μειονεκτήματα

- Όχι τόσο οικονομικό για αλληλούχηση λίγων στόχων (1–20 γονίδια)
- Χρονικά μεγαλύτερο πρωτόκολλο
- Πιο σύνθετη ανάλυση αποτελεσμάτων

# 1. Μοριακές εξετάσεις - Μεθοδολογίες

## 1.4. Targeted Sequencing vs Whole Exome vs Whole Genome

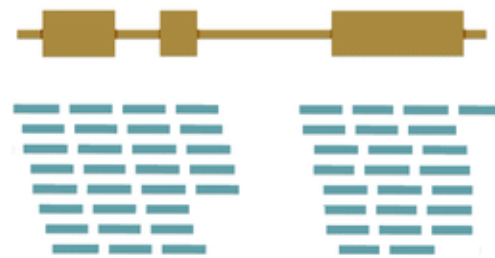
### Targeted Sequencing (TS)



- Selection (capture):**  
**Panel of genes of interest**  
(typically 20-200 predefined genes)
- greatest sequencing depth\*
  - most cost effective

Fixed selection of genes,  
analysis cannot be expanded

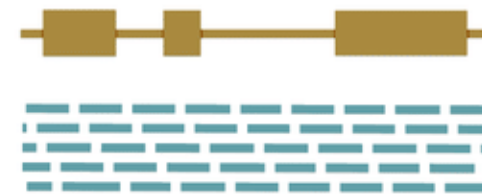
### Whole Exome Sequencing (WES)



- Selection (capture):**  
**All exons of all known genes**  
(1.5-2% of all human DNA)
- variable read depth at boundaries
  - greater sequencing depth\*
  - more cost effective

Subsequent *in silico* selection of genes/gene list(s) of interest  
(but entire dataset generated: analysis can be expanded to other genes)

### Whole Genome Sequencing (WGS)



- No selection:**  
**Entire human DNA analyzed**  
Including introns, RNA genes, etc.
- moderate read depth\*
  - similar read depth throughout
  - may also detect copy number variants and repeat expansions
  - higher price

Βάθος κάλυψης:

200-300x

20-30x

10-20x

# 1. Μοριακές εξετάσεις - Μεθοδολογίες

## 1.4. Next Generation Sequencing Workflow



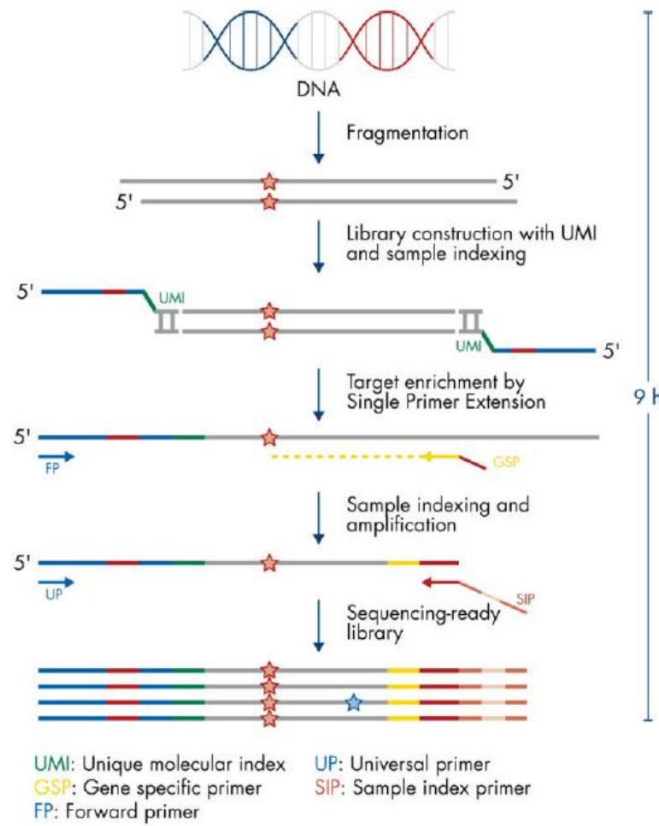
**QiaSeq Targeted DNA Custom Panel Manual**

<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/next-generation-sequencing/dna-sequencing/somatic-panels/qiaseq-targeted-dna-custom-panels>

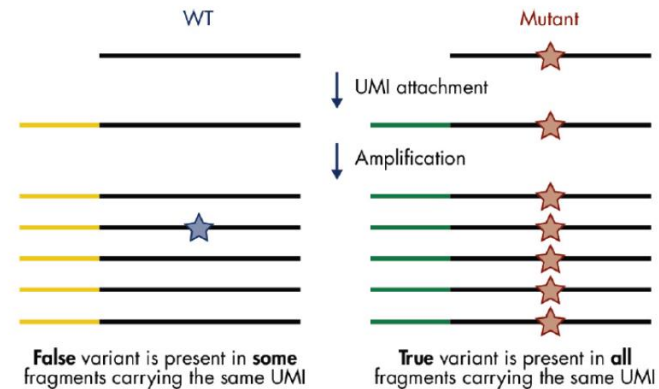


# 1. Μοριακές εξετάσεις - Μεθοδολογίες

## 1.4. Next Generation Sequencing Κατασκευή Βιβλιοθηκών



### Principle of variant detection with UMIs



## 2. Αυτοφλεγμονώδη Νοσήματα

Χωρίζονται σε 3 κατηγορίες:

- Ιντερφερονοπαθειες : SAVI, CANDLE
- Διαταραχές του φλεγμονοσώματος: FMF, CAPS, NLRC4 , PAPA Syndrome
- Διαταραχές υπερ-ενεργοποίησης του NFκB μονοπατιού: TRAPS, Blau Syndrome, Haploinsufficiency of A20, DIRA, DITRA
- Αυτοφλεγμονώδεις διαταραχές σχετιζόμενες με άλλους μηχανισμούς: MKD, DADA2
- Απορρύθμιση μηχανισμών της φυσικής ανοσίας
- Περιοδικά επεισόδια φλεγμονωδών αποκρίσεων (μη λοιμώδους αιτιολογίας)
- Συμπτωματολογία:
  - Πυρετός, εξάνθημα, αρθραλγία, ραγοειδίτιδα, άσηπτη μηνιγγίτιδα, πλευριτική συλλογή
  - Λεμφαδενοπάθεια, σπληνομεγαλία
  - Δευτερογενής αμυλοείδωση
- Η έναρξη είναι συνήθως σε νεαρή ηλικία
- Αυξημένοι δείκτες φλεγμονής (CRP, ESR) κατά τη διάρκεια των κρίσεων

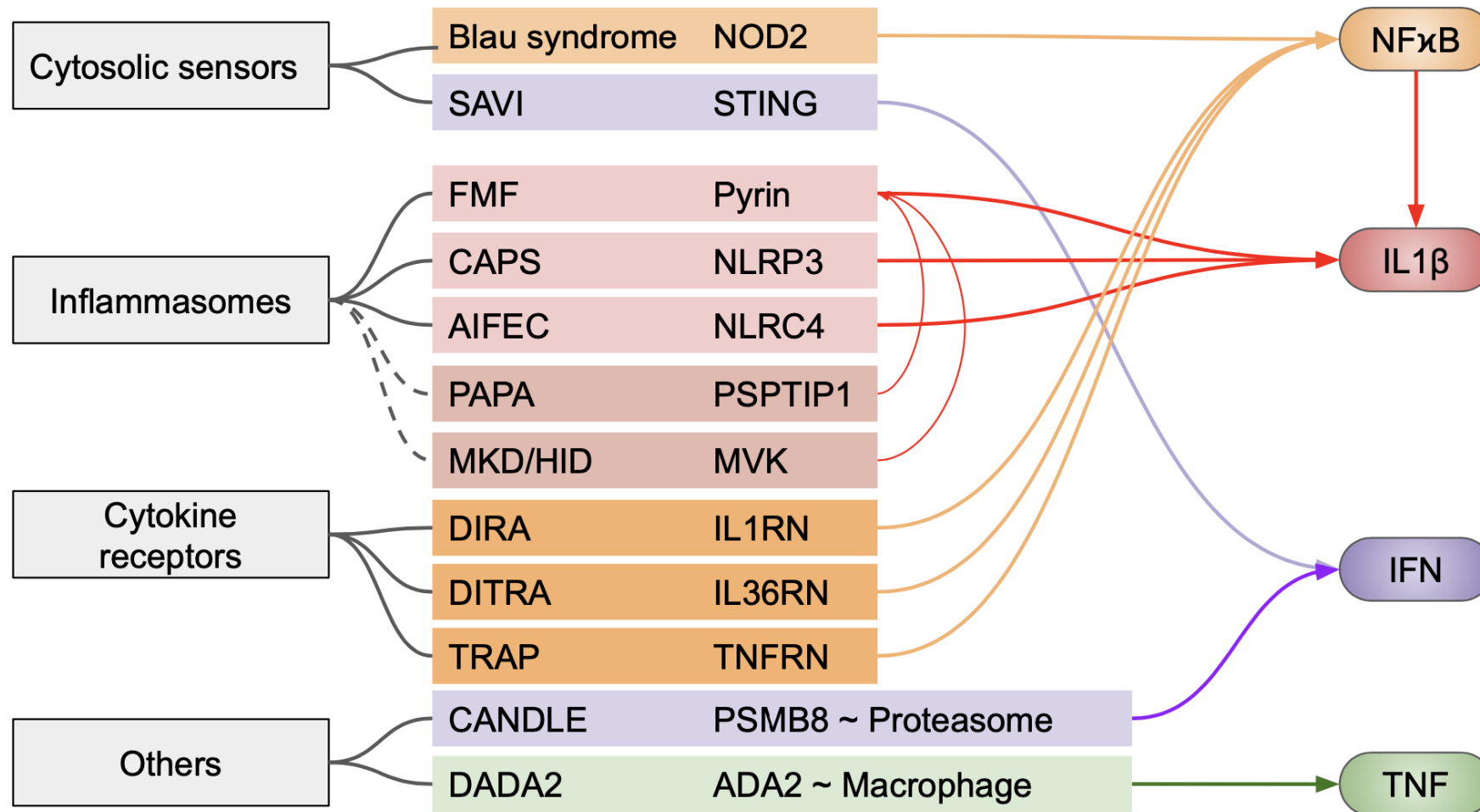
## 2. Αυτοφλεγμονώδη Νοσήματα

**Table 2** New Eurofever/PRINTO classification criteria for hereditary recurrent fevers and their performance in the 281 patients with consensus

CAPS	FMF	TRAPS	MKD
<p>Presence of a <i>confirmatory NLRP3 genotype*</i> and <i>at least one</i> among the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Urticarial rash.</li> <li>▶ Red eye (conjunctivitis, episcleritis, uveitis).</li> <li>▶ Neurosensorial hearing loss.</li> </ul> <p>OR</p> <p>Presence of <i>not confirmatory NLRP3 genotype†</i> and <i>at least two</i> among the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Urticarial rash.</li> <li>▶ Red eye (conjunctivitis, episcleritis, uveitis).</li> <li>▶ Neurosensorial hearing loss.</li> </ul>	<p>Presence of <i>confirmatory MEFV genotype*</i> and <i>at least one</i> among the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Duration of episodes 1–3 days.</li> <li>▶ Arthritis.</li> <li>▶ Chest pain.</li> <li>▶ Abdominal pain.</li> </ul> <p>OR</p> <p>Presence of <i>not confirmatory MEFV genotype‡</i> and <i>at least two</i> among the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Duration of episodes 1–3 days.</li> <li>▶ Arthritis.</li> <li>▶ Chest pain.</li> <li>▶ Abdominal pain.</li> </ul>	<p>Presence of <i>confirmatory TNFRSF1A genotype*</i> and <i>at least one</i> among the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Duration of episodes <math>\geq 7</math> days.</li> <li>▶ Myalgia.</li> <li>▶ Migratory rash.</li> <li>▶ Periorbital oedema.</li> <li>▶ Relatives affected.</li> </ul> <p>OR</p> <p>Presence of a <i>not confirmatory TNFRSF1A genotype†</i> and <i>at least two</i> among the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Duration of episodes <math>\geq 7</math> days.</li> <li>▶ Myalgia.</li> <li>▶ Migratory rash.</li> <li>▶ Periorbital oedema.</li> <li>▶ Relatives affected.</li> </ul>	<p>Presence of a <i>confirmatory MVK genotype*</i> and <i>at least one</i> among the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Gastrointestinal symptoms.</li> <li>▶ Cervical lymphadenitis.</li> <li>▶ Aphthous stomatitis.</li> </ul>
Sensitivity: 1	Sensitivity: 0.94	Sensitivity: 0.95	Sensitivity: 0.98
Specificity: 1	Specificity: 0.95	Specificity: 0.99	Specificity: 1
Accuracy: 1	Accuracy: 0.98	Accuracy: 0.99	Accuracy: 1

# 2. Αυτοφλεγμονώδη Νοσήματα

## Summary of the diseases



# 2. Αυτοφλεγμονώδη Νοσήματα

## 2.1 NGS στα Αυτοφλεγμονώδη Νοσήματα

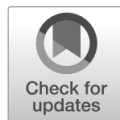
<u>Γονίδιο</u>	<u>Σχετιζόμενο Σύνδρομο</u>	<u>Μονοπάτι</u>
MEFV	Familial Mediterranean fever ( <b>FMF</b> )	Inflammasomes
MVK	Mevalonate kinase deficiency/Hyper IgD syndrome ( <b>MVK/HIDS</b> )	Inflammasomes
NLRC4	NLRC4 macrophage activation syndrome/ familial cold autoinflammatory syndrome 4 ( <b>MAS/FCAS4</b> )	Inflammasomes
PSTPIP1	Pyogenic arthritis, pyoderma gangrenosum and acne syndrome ( <b>PAPA</b> )	Inflammasomes
NLRP3	Cryopyrin-associated periodic syndromes ( <b>FCAS, MWS, NOMID/CINCA</b> )	Inflammasomes
NLRP12	Familial cold autoinflammatory syndrome 2 ( <b>FCAS2</b> )	Inflammasomes
IL36RN	Deficiency of IL-36-receptor antagonist ( <b>DITRA</b> )	NFκB Pathway
TNFRSF1A	TNFR1-associated periodic syndrome ( <b>TRAPS</b> )	NFκB Pathway
NOD2	Blau syndrome/early-onset sarcoidosis ( <b>Blau syndrome</b> )	NFκB Pathway
TNFAIP3	Haploinsufficiency of A20 ( <b>HA20</b> )	NFκB Pathway
PSMB8	Proteasome-Associated Autoinflammatory Syndromes ( <b>PRAAS</b> )	INF Pathway
ADA2/CECR1	Deficiency of adenosine deaminase 2 ( <b>DADA2</b> )	TNF pathway
CARD14	CARD14-mediated psoriasis ( <b>CAMPS/PSORS2</b> )	Autoinflammation
ELANE	ELANE-related neutropenia	Autoinflammation
TRNT1	Sideroblastic anaemia with immunodeficiency, fevers and developmental delay ( <b>SIFD</b> )	Autoinflammation
LPIN2	LPIN2 deficiency/ <b>Majeed syndrome - CRMO</b>	Autoinflammation

# 2. Autoinflammatory Diseases

## 2.2. Νεότερα δεδομένα από την επιστημονική βιβλιογραφία

Clinical Rheumatology (2020) 39:3733–3745  
<https://doi.org/10.1007/s10067-020-05108-1>

ORIGINAL ARTICLE



### Genetic panel screening in patients with clinically unclassified systemic autoinflammatory diseases

Ferhat Demir<sup>1</sup> · Özlem Akgün Doğan<sup>2</sup> · Yasemin Kendir Demirkol<sup>2</sup> · Kübra Ermiş Tekkuş<sup>3</sup> · Sezin Canbek<sup>3</sup> · Şerife Gül Karadağ<sup>4</sup> · Hafize Emine Sönmez<sup>4</sup> · Nuray Aktay Ayaz<sup>4</sup> · Hamdi Levent Doğanay<sup>3</sup> · Betül Sözeri<sup>1</sup>

Received: 27 January 2020 / Revised: 14 March 2020 / Accepted: 16 April 2020 / Published online: 26 May 2020  
© International League of Associations for Rheumatology (ILAR) 2020

#### Abstract

**Objective** Systemic autoinflammatory diseases (SAIDs) may not always present with typical clinical findings of a monogenic disease. We aimed to genetically screen and diagnose these clinically unclassified patients by next-generation sequencing (NGS) analysis.

**Method** A total of 64 patients who had clinical findings of a periodic fever syndrome but did not meet the clinical diagnostic criteria for any SAID or had clinical findings for more than one monogenic SAID were identified as “clinically unclassified SAIDs.” NGS panel analysis, including 16 genes, was performed in these patients. Patients, who could not be classified as one of the defined SAID after the result of the NGS gene analysis, were identified as “undefined SAID.”

**Results** The most common autoinflammatory symptoms in unclassified SAID patients were abdominal pain (60.9%), arthralgia (48.4%), urticarial rash (43.8%), myalgia (40.6%), oral aphthae (28.1%), and conjunctivitis (20.3%), respectively. In the result of the NGS gene panel screening, pathogenic, likely pathogenic variants, or VUS (variants of uncertain significance) were detected in 36 of 64 patients in at least one gene in the NGS panel. A total of 15 patients were diagnosed with a monogenic SAID according to both phenotypic and genotypic data; 12 patients as FMF, two patients as FCAS, and one patient as TRAPS, respectively. A total of 49 patients who did not meet the classification criteria including genetic results for a monogenic SAID were followed as undefined SAID.

Μελέτη 64 ατόμων με αδιάγνωστο αυτοφλεγμονώδες νόσημα αξιοποιώντας ένα πάνελ 16 γονιδίων με τη χρήση NGS

- **Συμπέρασμα:** Η χρήση του NGS σε συνδυασμό με ένα ευρύ πάνελ γονιδίων αυξάνει τη διαγνωστική αξία για ορισμένους ασθενείς με αδιάγνωστο αυτοφλεγμονώδες νόσηματα

# 2. Autoinflammatory Diseases

## 2.2. Νεότερα δεδομένα από την επιστημονική βιβλιογραφία

Clinical & Experimental Immunology  
The Journal of Translational Immunology



Clinical and Experimental Immunology

ORIGINAL ARTICLE

doi: 10.1111/cei.13511

### Is gene panel sequencing more efficient than clinical-based gene sequencing to diagnose autoinflammatory diseases? A randomized study

M. Rama,\* T. Mura,<sup>†</sup> I. Kone-Paut,<sup>‡</sup>  
G. Boursier,\* S. Aouinti,<sup>‡</sup> I. Touitou\*<sup>§</sup>  
and G. Sarrabay<sup>¶</sup>

\*Department of Medical Genetics, Rare Diseases and Personalized Medicine, Rare and Autoinflammatory Diseases Unit, CHU Montpellier, Univ Montpellier, <sup>†</sup>Medical Information Department, Montpellier University Hospital, Montpellier, <sup>‡</sup>Department of Paediatric Rheumatology, CEREMAIA, Bicêtre Hospital, AP-HP, University of Paris Sud Saclay, AP-HP, Le Kremlin-Bicêtre, and <sup>§</sup>IRMB, University of Montpellier, INSERM, CEREMAIA CHU Montpellier, Montpellier, France

Accepted for publication 12 August 2020  
Correspondence: G. Sarrabay, Institute for Regenerative Medicine and Biotherapies, INSERM U1183, Saint Eloi University Hospital, 80 Avenue Auguste Fliche, Montpellier Cedex 05, France and CEREMAIA, Arnaud de Villeneuve Hospital, 371 Avenue du Doyen Gaston Giraud, 34090 Montpellier, France.  
E-mail: g.sarrabay@inserm.fr

#### Summary

The aim of this study was to compare the effectiveness of the gene-panel next-generation sequencing (NGS) strategy versus the clinical-based gene Sanger sequencing for the genetic diagnosis of autoinflammatory diseases (AIDs). Secondary goals were to describe the gene and mutation distribution in AID patients and to evaluate the impact of the genetic report on the patient's medical care and treatment. Patients with AID symptoms were enrolled prospectively and randomized to two arms, NGS ( $n = 99$ ) (32–55 genes) and Sanger sequencing ( $n = 197$ ) (one to four genes). Genotypes were classified as 'consistent/confirmatory', 'uncertain significance' or 'non-contributory'. The proportion of patients with pathogenic genotypes concordant with the AID phenotype (consistent/confirmatory) was significantly higher with NGS than Sanger sequencing [10 of 99 (10.1%) versus eight of 197 (4.1%)]. *MEFV*, *ADA2* and *MVK* were the most represented genes with a consistent/confirmed genotype, whereas *MEFV*, *NLRP3*, *NOD2* and *TNFRSF1A* were found in the 'uncertain significance' genotypes. Six months after the genetic report was sent, 54 of 128 (42.2%) patients had received effective treatment for their symptoms; 13 of 128 (10.2%) had started treatment after the genetic study. For 59 of 128 (46%) patients, the results had an impact on their overall care, independent of sequencing group and diagnostic conclusion. Targeted NGS improved the diagnosis and global care of patients with AIDs.

**Keywords:** genetic testing, hereditary autoinflammatory diseases, Sanger

#### Στόχοι

- 32 γονίδια (NGS) vs 4 γονίδια (Sanger)
- Μελέτη σε 100 και 200 ασθενείς, αντίστοιχα

#### Συμπεράσματα

- Με τη χρήση ενός πάνελ γονιδίων και τη χρήση NGS αυξήθηκε η διαγνωστική ισχύ 2,5 φορές
- 10.1% διαγνωσθέντες με NGS
- 4.1% διαγνωσθέντες με Sanger
- Η στοχευμένη αλληλούχηση με NGS μπορεί να βελτιώσει τη διάγνωση αυτοφλεγμονωδών νοσημάτων

# 3. Πως αξιολογείται το αποτέλεσμα;

The screenshot shows the Infevers website interface. At the top, there are navigation tabs for different gene categories: 'A to H genes', 'I to L genes', 'M to O genes' (selected), 'P to Q genes', 'R to S genes', and 'T to Z genes'. Below the tabs, a dropdown menu is open for the 'M to O genes' category, listing several genes: MVK, NCSTN, NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP7, NOD2, and OTULIN. The 'MEFV' gene is highlighted in red. The main content area features the Infevers logo, a 'NEW' badge, and a list of genes. Below this, there is a section titled 'A HGVS affiliated Locus Specific Database since 2001.' with logos for ISSAID and the EU 5th framework. The page also mentions 'References : 2003 2004 2008 2014 2018'.

## Βάση δεδομένων Περιοδικών Πυρετών

- Infevers

<https://infevers.umai-montpellier.fr/web/>

## Γενετικές Βάσεις Δεδομένων

- Varsome.com
- Clinvar.com

## Βιβλιογραφικές βάσεις δεδομένων

- PubMed
- Google Scholar



# 3. Πως αξιολογείται το αποτέλεσμα;

## 3.1 Βάσεις γενετικών δεδομένων

**varsome** PSTPIP1:c.835C>T hg19 Search Editions About Community News Demo Sign in Join

chr15-77324732-C-T (PSTPIP1:p.P279S) Submit to ClinVar Link publication Classify Share API Link Favorites

<b>General Information</b> SNV PSTPIP1(NM_003978.5):c.835C>T (p.Pro279Ser)	PharmGKB No data available	<b>Germline Classification</b> Uncertain Significance 1 points = 2 P - 1 B	<b>Frequencies</b> exomes: not found (cov: 54.2) genomes: not found (cov: 34.2)	<b>Conservation Scores</b> phyloP100: 5.301	Structural Variants
<b>Genes</b> PSTPIP1	<b>Transcripts</b> NM_003978.5 - missense MANE Select	<b>ClinVar</b> No data available	<b>MitoMap</b> No data available	<b>In-Silico Predictors</b> PP3: Supporti... 3 12 5 4 2 2	Beacon Network
<b>Community Contributions</b>	<b>Region Browser</b>	<b>LOVD</b> No data available	<b>Deafness Variation Database</b> New No data available	<b>ClinGen</b> No data available	Protein Viewer
<b>Publications</b> Variant: 0 Gene: 117	<b>Expression Data</b> Top: whole_blood Tissues: 54	<b>Uniprot Variants</b> No data available	<b>OMIM</b> No data available	<b>GWAS</b> No data available	

**Variant** Explain

Chromosome	Position	REF Sequence	ALT Sequence	Variant type	Cytoband	HGVS	Gene symbol
chr15	77324732	C	T	SNV	15q24.3	PSTPIP1(NM_003978.5):c.835C>T (p.Pro279Ser)	PSTPIP1

This variant has been viewed 12 times on VarSome.

Feedback Cite VarSome

# 3. Πως αξιολογείται το αποτέλεσμα;

## 3.1 Βάσεις γενετικών δεδομένων

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:

Ανιχνεύθηκαν οι παρακάτω νουκλεοτιδικές παραλλαγές που αλλάζουν την αλληλουχία της πρωτεΐνης:

Γονίδιο	Γενετική Παραλλαγή* Γονότυπος	Αμινοξική αλλαγή	Κλινική Σημασία	Συχνότητα αλληλομόρφου στον γενικό πληθυσμό (AF)	Συνολική κάλυψη θέσης (coverage)
PSTPIP1	Ετεροζυγωτία NM_003978:exon11:c.835C>T	P279S	Αδιευκρίνιστης Κλινικής Σημασίας	0.000001	282
CARD14	Ετεροζυγωτία NM_001366385:exon12:c.1264G>A	E422K	Μη παθογόνος	0.0228	245

[\*ονοματολογία γονιδίων και παραλλαγών σύμφωνα με τις οδηγίες του Human Genome Variation Society (HGVS). Βιβλιογραφία: Den, Dunnen, J.T., Dalgleish, R., Maglott, D.R., Hart, R.K., Greenblatt, M.S., McGowan-Jordan, J., Roux, A.-F., Smith, T., Antonarakis, S.E. and Taschner, P.E. (2016), HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. Human Mutation, 37: 564-569. doi:10.1002/humu.22981]

### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:

Ανιχνεύθηκαν 2 μεταλλαγές σε ετεροζυγωτία στα γονίδια PSTPIP1 και CARD14.

Η μεταλλαγή NM\_003978:exon11:c.835C>T που ανιχνεύθηκε σε ετεροζυγωτία στο εξόνιο 11 του γονιδίου PSTPIP1, θεωρείται αδιευκρίνιστης κλινικής σημασίας από τις γενετικές βάσεις δεδομένων, ενώ δεν υπάρχουν αναφορές στην επιστημονική. Το γονίδιο PSTPIP1 ακολουθεί τον αυτοσωμικό επικρατή τύπο κληρονομιάς και παθογόνες μεταλλαγές του γονιδίου σχετίζονται με την εμφάνιση του συνδρόμου PAPA (1).

Η μεταλλαγή NM\_001366385:exon12:c.1264G>A που ανιχνεύθηκε σε ετεροζυγωτία στο εξόνιο 12 του γονιδίου CARD14 δεν σχετίζεται με την εκδήλωση συμπτωμάτων αυτοφλεγμονωδών συνδρόμων, καθώς οι γενετικές βάσεις δεδομένων και η σχετική βιβλιογραφία την αξιολογούν ως αθώα μεταλλαγή, ωστόσο έχει συσχετιστεί με γενετική προδιάθεση στην ψωριασική νόσο (2).

Για την διάγνωση απαιτείται η συνεκτίμηση της κλινικής εικόνας της ασθενούς.

### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Smith EJ, Allantaz F, Bennett L, Zhang D, Gao X, Wood G, Kastner DL, Punaro M, Aksentijevich I, Pascual V, Wise CA. Clinical, Molecular, and Genetic Characteristics of PAPA Syndrome: A Review. Curr Genomics. 2010 Nov;11(7):519-27. doi: 10.2174/138920210793175921
- Coto-Segura P, González-Fernández D, Batalla A, Gómez J, González-Lara L, Queiro R, Alonso B, Iglesias S, Coto E. Common and rare CARD14 gene variants affect the antitumour necrosis factor response among patients with psoriasis. Br J Dermatol. 2016 Jul;175(1):134-41

- c.835C>T → Η κυτοσίνη (C) στη θέση 835 αντικαταστάθηκε από θυμίνη (T)
- P279S → Η Προλίνη (P) αντικαταστάθηκε από Σερίνη (S)
- Αδιευκρίνιστης Κλινικής Σημασίας → δεν υπάρχουν δεδομένα μη παθογένειας
- Μη παθογόνος → Οι γενετικές βάσεις δεδομένων την κρίνουν ως αθώα μεταλλαγή ή εμφανίζει υψηλή συχνότητα εμφάνισης στον γενικό πληθυσμό
- AF → συχνότητα εμφάνισης στον γενικό πληθυσμό
- 0.02 = 2%
- 0.000001 = 0.0001%
- Κάλυψη θέσης → πόσες φορές αλληλουχήθηκε η βάση
- Αυτοσωμικός επικρατής τύπος κληρονομιάς → αρκεί η κληρονομία ενός και μόνο γονιδίου από τον ένα γονέα, προκειμένου να εκδηλωθεί η ασθένεια

# 3. Πως αξιολογείται το αποτέλεσμα;

## 3.2. Ένα παράδειγμα κλινικού συνδρόμου με σπάνια ευρήματα γονιδιακού ελέγχου

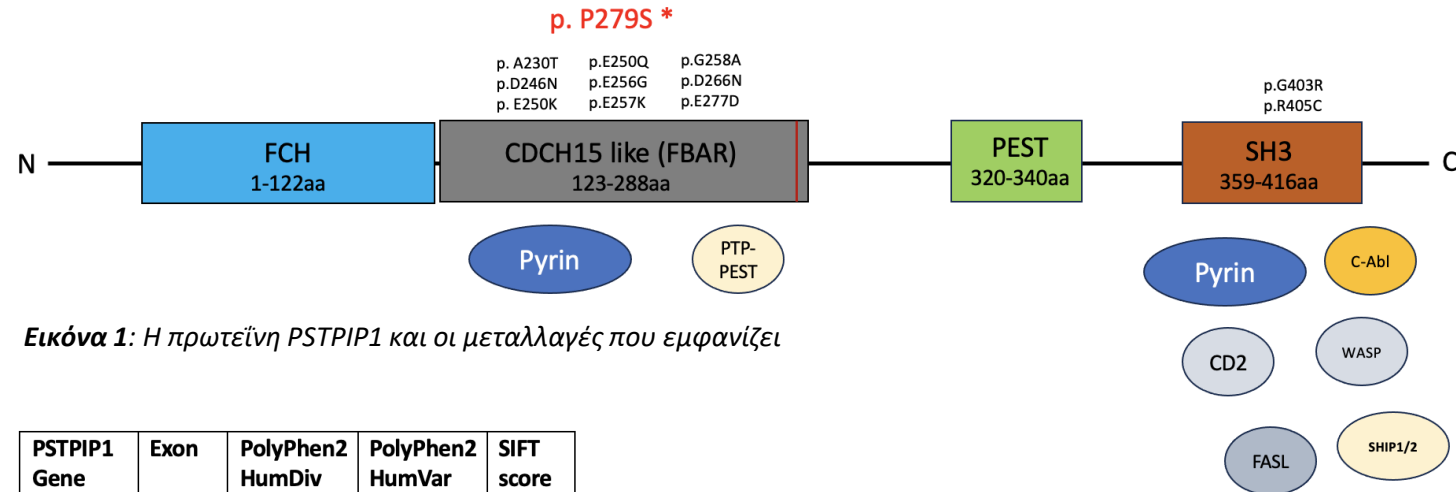
### Περιστατικό από το τμήμα μας

- Ασθενής 17 ετών
- Με περιοδικά εμπύρετα προ 10ετίας
- Μη διαγνωσμένο μονογονιδιακό αυτοφλεγμονώδες νόσημα
- Σε ύφεση μετά από χρήση canakinumab (5 ετών)
- Υποτροπή της νόσου στα 17 έτη

# 3. Πως αξιολογείται το αποτέλεσμα;

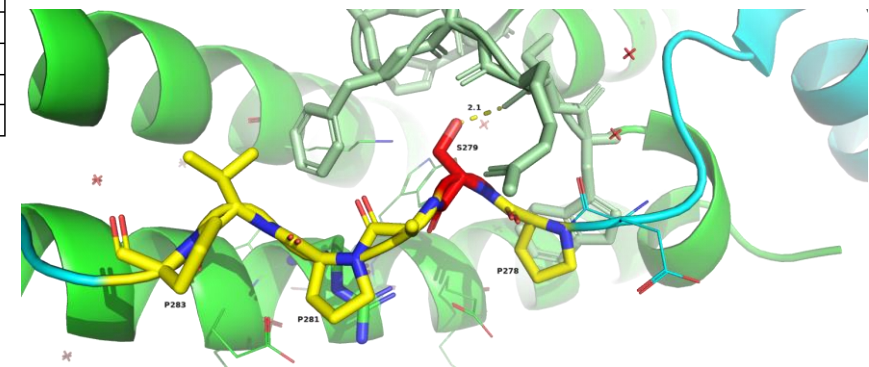
## 3.2. Ένα παράδειγμα κλινικού συνδρόμου με σπάνια ευρήματα γονιδιακού ελέγχου

- Εντοπίστηκε η μεταλλαγή P279S του γονιδίου PSTPIP1
- Κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο
- Δεν έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία
- Οι γενετικές βάσεις δεδομένων τη χαρακτηρίζουν ως Αδιευκρίνιστης Κλινικής Σημασίας
- In silico μελέτη μας υποστηρίζει πως είναι παθογόνος



PSTPIP1 Gene Mutation	Exon	PolyPhen2 HumDiv	PolyPhen2 HumVar	SIFT score
P279S	11	0.995	0.753	0.036
E277D	11	0.698	0.218	0.36
E250Q	11	0.985	0.974	0.00
E250K	11	0.993	0.991	0.00
A230T	10	0.007	0.032	0.11

**Πίνακας 1:** Σκορ παθογένειας σε 3 υπολογιστικά εργαλεία πρόβλεψης της επίδρασης μίας μεταλλαγής στην λειτουργία της παραγόμενης πρωτεΐνης. Σύγκριση με γνωστές μεταλλαγές του PSTPIP1.

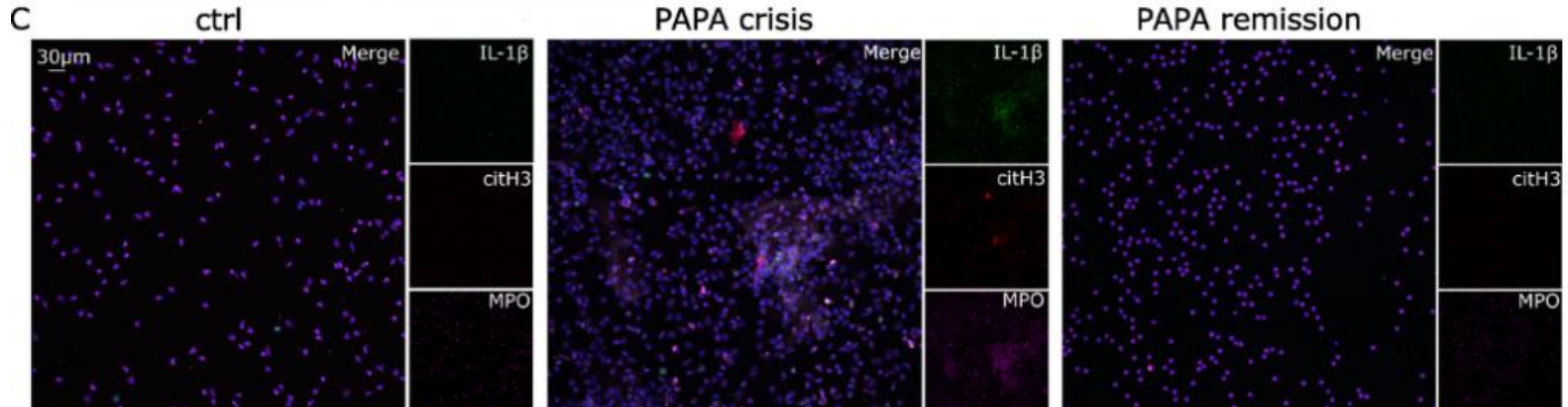
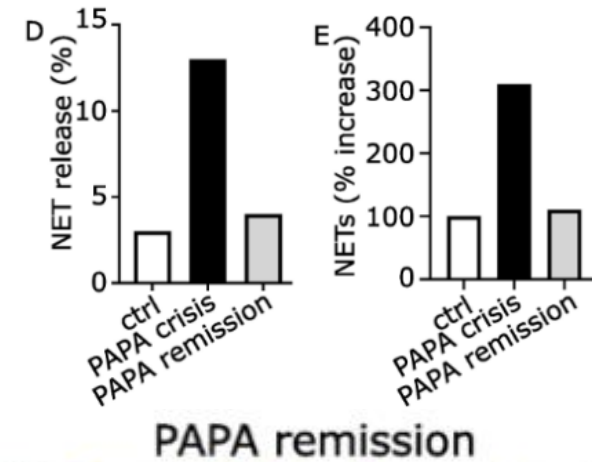


**Εικόνα 2:** In silico μελέτη της μεταλλαγής.

# 3. Πως αξιολογείται το αποτέλεσμα;

## 3.2. Ένα παράδειγμα κλινικού συνδρόμου με σπάνια ευρήματα γονιδιακού ελέγχου

- Τα ουδετερόφιλα του ασθενή κατά την κρίση εμφανίζουν αυξημένο ποσοστό NETs
- Τα NETs αυτά είναι διακοσμημένα με IL-1β



# Συσχετίσεις φαινοτύπου-γονοτύπου στη βιβλιογραφία

RHEUMATOLOGY

Concise report

## Molecular and clinical spectrum of four pedigrees of TRAPS in Greece: results from a national referral center

Adrianos Nezos<sup>1</sup>, Ourania D. Argyropoulou<sup>1</sup>, Eleni Klinaki<sup>2</sup>, Nikolaos Marketos<sup>3</sup>, Panagiota Karagianni<sup>1</sup>, Elias Eliopoulos<sup>4</sup>, Panayiotis Vlachoyiannopoulos<sup>1</sup>, Despoina N. Maritsi<sup>2</sup> and Athanasios G. Tzioufas<sup>1</sup>

### Abstract

**Objective.** Tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome (TRAPS) is a rare autosomal dominantly inherited autoinflammatory disease caused by mutations of the *TNFRSF1A* gene. To address the association between *TNFRSF1A* mutations and clinical phenotype, we analyzed four pedigrees of TRAPS patients.

**Methods.** Four Greek patients with TRAPS-like clinical features were screened for *TNFRSF1A* mutations by sequencing exons 2, 3 and 4. Following positive testing, twenty-two members of their families were also genetically and clinically screened.

**Results.** Twenty-six members of four unrelated Greek families were investigated. The C73Y (c.305G>A) mutation of the *TNFRSF1A* gene was identified in five patients, with two of the five carrying a concomitant R92Q variation. We also identified seven C73W (c.306C>G), two T50M (c.236C>T) and seven R92Q (c.362G>A) carriers. Symptoms varied and the C73Y, C73W and T50M mutations were associated with the most severe clinical manifestations. The R92Q phenotype ranged from asymptomatic to mild disease. Molecular modelling linked pathogenicity with aberrant TNFRSF1A disulphide bond formation.

**Conclusion.** In this first pedigree analysis of TRAPS in Greece, we identified the rare C73Y *TNFRSF1A* mutation. A wide clinical spectrum was observed with the C73Y, C73W and T50M mutations that affect TNFRSF1A disulphide bonds and are associated with worse symptoms.

**Key words:** tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome (TRAPS), gene mutations, clinical phenotypes, molecular modelling

Rheumatology 2020;59:1241–1246  
doi:10.1093/rheumatology/kez424  
Advance Access publication 27 September 2019

- Μία σπάνια μεταλλαγή χαρακτηρίστηκε κατά τη γενετική ανάλυση του *TNFRSF1A* γονιδίου σε 4 οικογένειες στην Ελλάδα
- Η μεταλλαγή C73Y στο *TNFRSF1A* γονίδιο συσχετίστηκε με βαρύ κλινικό φαινότυπο του συνδρόμου TRAPS

# Σωματικές μεταλλάξεις στα Αυτοφλεγμονώδη Νοσήματα

- Μια σωματική μετάλλαξη περιγράφει οποιαδήποτε μεταλλαγή που συμβαίνει σε σωματικούς ιστούς μετά τη γονιμοποίηση. Αυτές οι μεταλλάξεις δεν αφορούν τη γαμετική σειρά και κατά συνέπεια δεν μεταβιβάζονται στους απογόνους.

## TET2-Driver and NLRC4-Passenger Variants in Adult-Onset Autoinflammation

**TO THE EDITOR:** Somatic mosaicism causing autoinflammatory diseases is increasingly recognized,<sup>1</sup> but the onset and mechanisms of clonal expansion remain enigmatic. We describe the case of a patient who underwent surgical resection and chemotherapy for Ewing's sarcoma at

### Figure 1 (facing page). Clinical, Laboratory, and Genetic Findings.

Panel A shows selected clinical findings (urticaria and pleuropericarditis [on a combined fluorodeoxyglucose positron-emission tomographic and computed tomographic image] at time point e, shown in Panels B and D) and histologic findings (skin-biopsy sample with prominent neutrophils in the dermis [arrows], and bone marrow–biopsy sample with a hypercellular myeloid compartment, immature mononuclear cells, and mature polynuclear cells [arrow indicates mitosis]), both at time point d). Hematoxylin and eosin staining was used to evaluate the biopsy samples. Panel B shows levels of C-reactive protein, total white cells, neutrophils, interleukin-18, and interleukin-1 receptor antagonist over time with indicated time points (a through f). EBV denotes Epstein–Barr virus. Panel C shows pedigree information (left) and the results of Sanger sequencing (right). For the pedigree information, squares indicate male family members, and circles female members; the solid circle represents the patient. Panel D shows variant allele fraction over time in different cell types for *NLRC4* (upper graph) and *TET2* (lower graph) (ClinVar accession numbers, SCV003803080 and SCV003803079). Panel E shows the results of genotyping of 19 of 20 selected single T cells obtained at 30.6 years of age.

Autoinflammatory disorders

## Low-ratio somatic NLRC4 mutation causes late-onset autoinflammatory disease

Jun Wang<sup>1, 2</sup>, Qiao Ye<sup>3</sup>, Wenjie Zheng<sup>4</sup>, Xiaomin Yu<sup>2</sup>, Fang Luo<sup>3</sup>, Ran Fang<sup>1, 2</sup>, Yaoyao Shangguan<sup>4</sup>, Zhijun Du<sup>5</sup>,

Pui Y Lee<sup>6</sup>, Taijie Jin<sup>1, 2</sup>, Qing Zhou<sup>1, 2</sup>

Correspondence to Dr Qing Zhou, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang, China; zhouq2@zju.edu.cn; Dr Taijie Jin, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang, China; jintaijie@zju.edu.cn

### Abstract

**Objectives** We aim to investigate the genetic basis of a case of late-onset autoinflammatory disease characterised by arthritis, recurrent fever and skin rashes.

**Methods** We performed whole-exome/genome sequencing and digital droplet PCR (ddPCR) to identify the pathogenic somatic mutation. We used single-cell RNA sequencing (scRNA-seq), intracellular cytokine staining, quantitative PCR, immunohistochemistry and western blotting to define inflammatory signatures and to explore the pathogenic mechanism.

**Results** We identified a somatic mutation in *NLRC4* (p.His443Gln) with the highest mosaicism ratio in the patient's monocytes (5.69%). The somatic mutation resulted in constitutive NLRC4 activation, spontaneous apoptosis-associated speck-like protein containing a C-terminal caspase recruitment domain (ASC) aggregation, caspase-1 hyperactivation and increased production of interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-18. Moreover, we demonstrated effective suppression of inflammatory cytokine production by targeting gasdermin D, an approach that could be considered as a novel treatment strategy for patients with *NLRC4*-associated autoinflammatory syndrome.

**Conclusions** We reported a case of a late-onset autoinflammatory disease caused by a somatic *NLRC4* mutation in a small subset of leucocytes. We systemically analysed this condition at a single-cell transcriptomic level and revealed specific enhancement of inflammatory response in myeloid cells.

<http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2021-221708>

# Συμπεράσματα

- Κάθε ασθενής με πυρετό αγνώστου αιτιολογίας και περιοδικότητα θα πρέπει να υποβάλλεται σε μοριακό έλεγχο αυτοφλεγμονωδών νοσημάτων
- Ο μοριακός έλεγχος θα πρέπει να διενεργείται με τεχνικές ευρείας βάσεως (π.χ. NGS ), καθώς:
  - A) Νέες μεταλλάξεις περιγράφονται καθημερινά στα γονίδια αυτά
  - B) Η κλινική εικόνα των ασθενών μπορεί να μην συμβαδίζει με την περιγραφόμενη έως τώρα
- Τέλος, η ανάδειξη νέων μεταλλάξεων επιβάλλει την επιβεβαίωση της παθογενετικής τους λειτουργίας, μέσω in vitro μελετών.





Ευχαριστώ!