



NIEDOSŁUCH W ERZE GENOMOWEJ, MOŻLIWOŚCI DIAGNOSTYCZNE

Choroby genetyczne wieku rozwojowego
– możliwości diagnostyczne w erze badań genomowych

05 - 06.09.2020 Warszawa

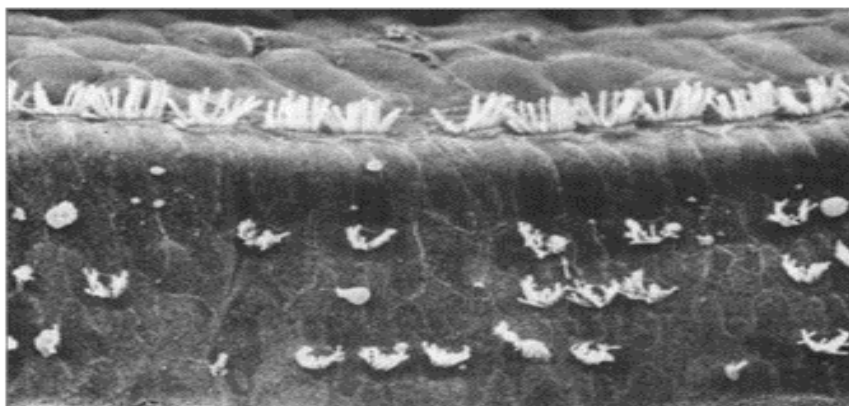
<https://www.mimiwatercolorprints.com/collections/anatomy-watercolor-prints>



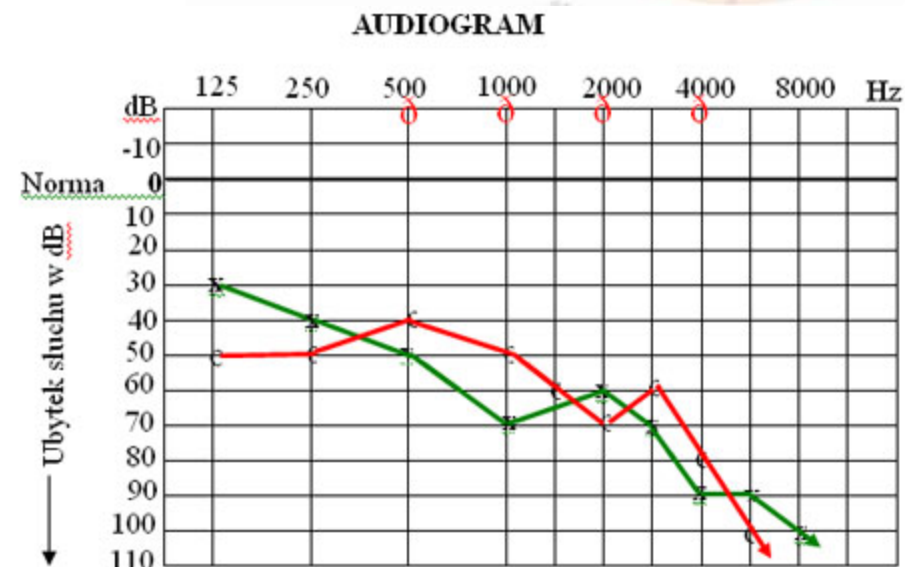
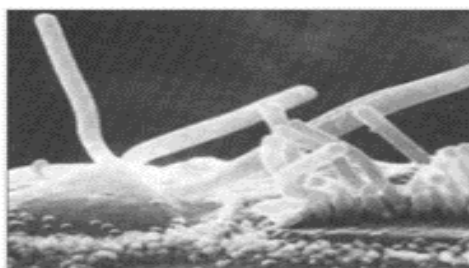
Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój

Niedosłuch definiuje się jako zaburzenie ze strony narządu słuchu polegające na nieprawidłowym odbiorze i/lub przewodzeniu dźwięków.

466 milionów ludzi na świecie dotkniętych jest niedosłuchem z czego **34 miliony to dzieci** (WHO) – ponad **5%** światowej populacji



Uszkodzone
komórki słuchowe



Prawe ucho – kolor zielony = x
Lewe ucho – kolor czerwony = o

Program Powszechnych Przesiewowych Badań Słuchu u Noworodków (PPPBuN):

- **ośrodki I stopnia referencyjności – ok 7% dzieci z nieprawidłowym badaniem przesiewowym słuchu** oraz z czynnikami ryzyka, które mogą prowadzić do uszkodzenia słuchu.
- **ośrodki II stopnia referencyjności – ok 4,8% dzieci z potwierdzonym niedosłuchem** (średnio zgłasza się 80% dzieci z ośrodków I SR)

• *Dane z I – XI 2017 roku*

(http://www.sluch.ump.edu.pl/pdf/uszko/uszko_21_2019.pdf)

- *Ośrodek I stopnia referencyjności – 92% badanych dzieci – słuch prawidłowy*
- *Ośrodki II i III stopnia referencyjności:
Diagnostykę ukończyło 12 790 dzieci
Niedosłuch jednostronny 108 dzieci
Niedosłuch obustronny 225 dzieci
średni wiek zdiagnozowanego dziecka 84 dni*

W Polsce uszkodzenie słuchu, bez uwzględnienia jego przyczyny, występuje z częstością 3:1000 żywo urodzonych dzieci (wg. PPPBuN).



U około 10 tys. dzieci rocznie występują potencjalne czynniki ryzyka mogące doprowadzić do utraty słuchu w wieku późniejszym.

Kryteria podziału niedosłuchu

I. Upośledzenie słuchu jednostronne lub obustronne

II. Upośledzenie słuchu ostre, przewlekłe lub trwałe

III. Upośledzenia słuchu, od lekkiego do całkowitej utraty słuchu

IV. Niedosłuch przewodzeniowy (ang. conductive), odbiorczy (ang. sensorineural) i mieszany (mixed)

V. Niedosłuch syndromiczny i izolowany

VI. Niedosłuch prelingualny i postlingualny

VII. Niedosłuch uwarunkowany genetycznie i niedosłuch spowodowany przez czynniki środowiskowe

VIII. Niedosłuch o dziedziczeniu autosomalnym recesywnym, autosomalnym dominującym, dziedziczeniu sprzężonym z płcią, dziedziczeniu mitochondrialnym

Choroba dziedziczona jest w **80%** przypadków w sposób autosomalny recesywny.

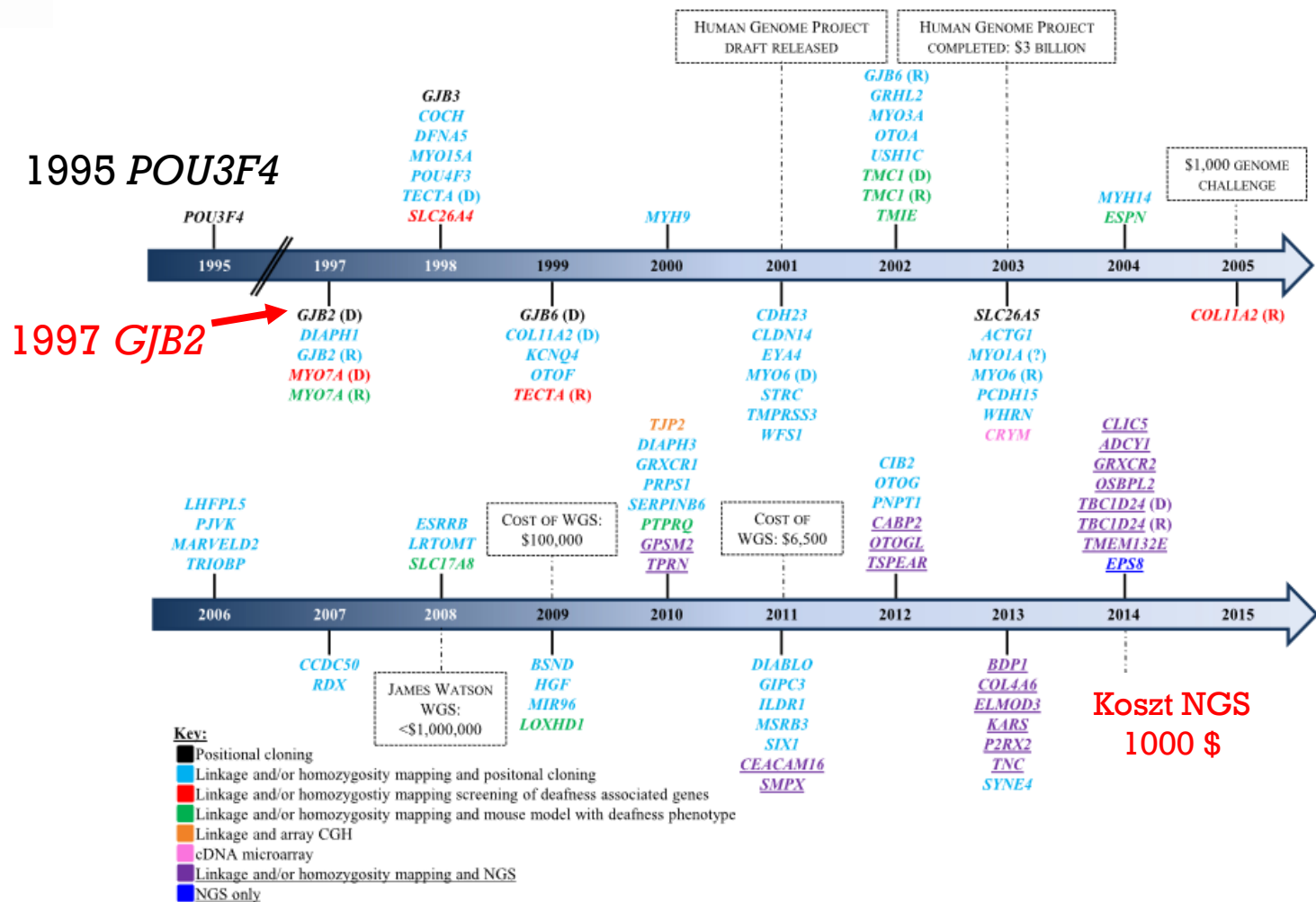
Niedosłuch o dziedziczeniu autosomalnym dominującym to ok. **20%** przypadków.

Dziedziczenie sprzężone z chromosomem X i mitochondrialne to **<1%** przypadków niedosłuchu



Niedosłuch wrodzony stanowi 60% niedosłuchu, z czego 70% ma charakter izolowany

Historia odkrywania genów niedosłuchu



Po 2015 roku w bazie Hereditary Hearing Loss Homepage zostały zarejestrowane **23 nowe geny** korelowane z patogenezą niedosłuchu niesyndromicznego

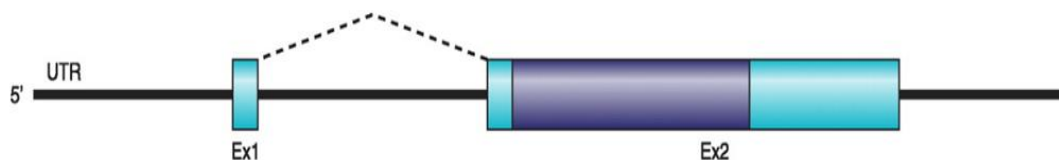


Van Camp G, Smith RJH. Hereditary Hearing Loss Homepage. <https://hereditaryhearingloss.org>.

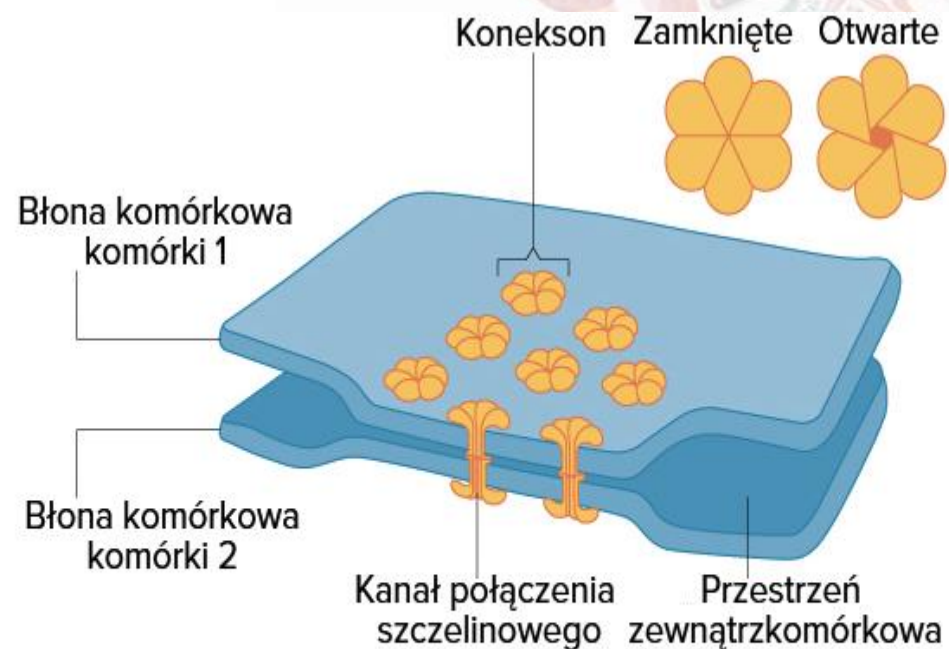
GEN *GJB2*

KLUCZOWA ROLA GENU *GJB2* W PATOGENEZIE NIEDOSŁUCHU NIESYNDROMICZNEGO

Mutacje genu *GJB2* mogą być przyczyną nawet 50% prelingualnego niedosłuchu izolowanego

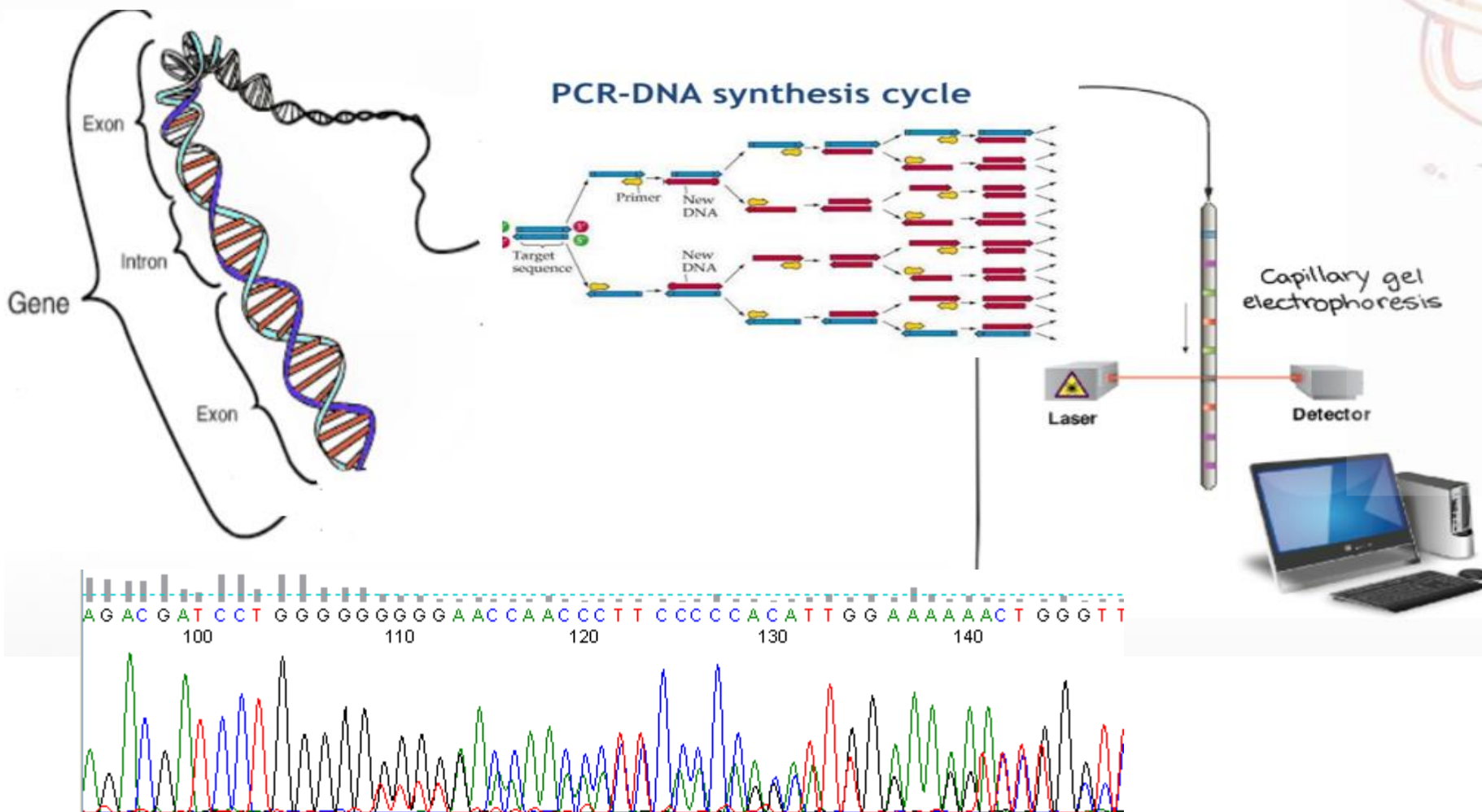


Schemat budowy genu *GJB2*



Źródło ilustracji: OpenStax Biology. Modyfikacja pracy autorstwa Mariana Ruiz Villareal.

ERA SEKWENCJONOWANIA SANGEROWSKIEGO



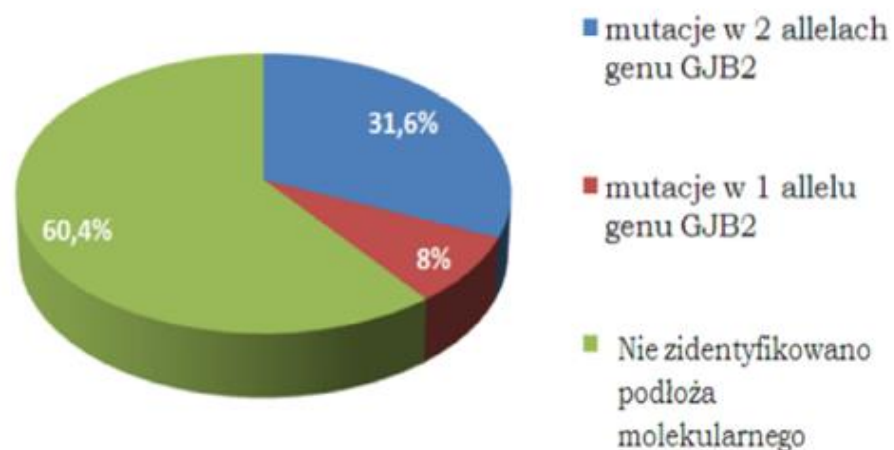
Mutacja c.35delG w układzie heterozygotycznym



Sekwencjonowanie opracowane w 1977 r przez
Frederica Sangera

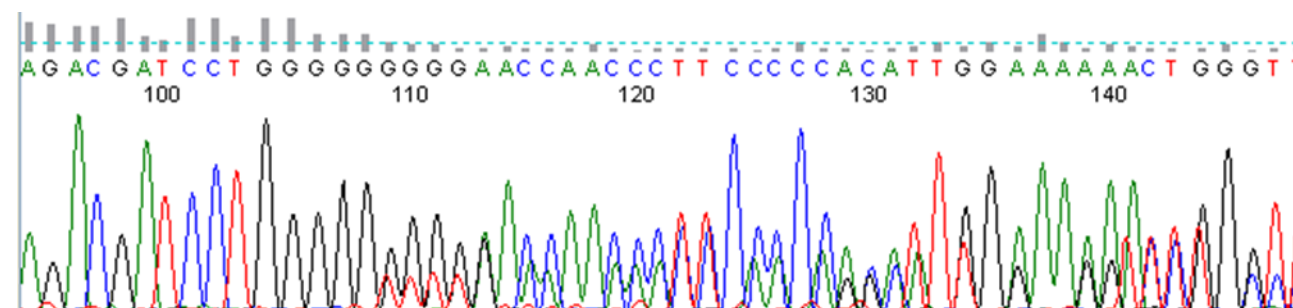
ERA SEKWENCJONOWANIA SANGEROWSKIEGO

Wyniki 12 lat badań
pacjentów z niedosłuchem w ZGM IMiD,
przed wprowadzeniem do badań techniki NGS

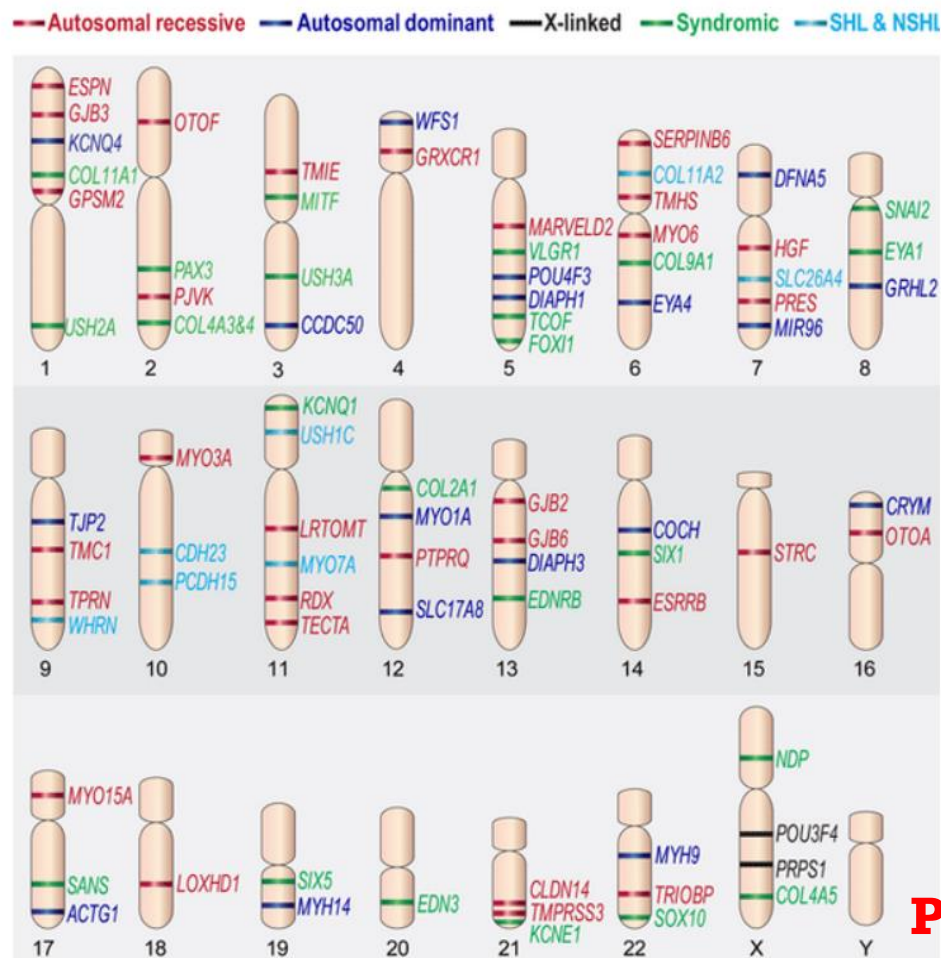


Mutacje genu *GJB2* mogą być przyczyną od 30 do nawet 50% prelingualnego niedosłuchu niesyndromicznego w zależności od badanej populacji

DOŚWIADCZENIA WŁASNE



Rozmieszczenie na poszczególnych chromosomach genów związanych przyczynowo z niedosłuchem



Hereditary Hearing Loss Homepage

Niedosłuch niesyndromiczny (NSHL):

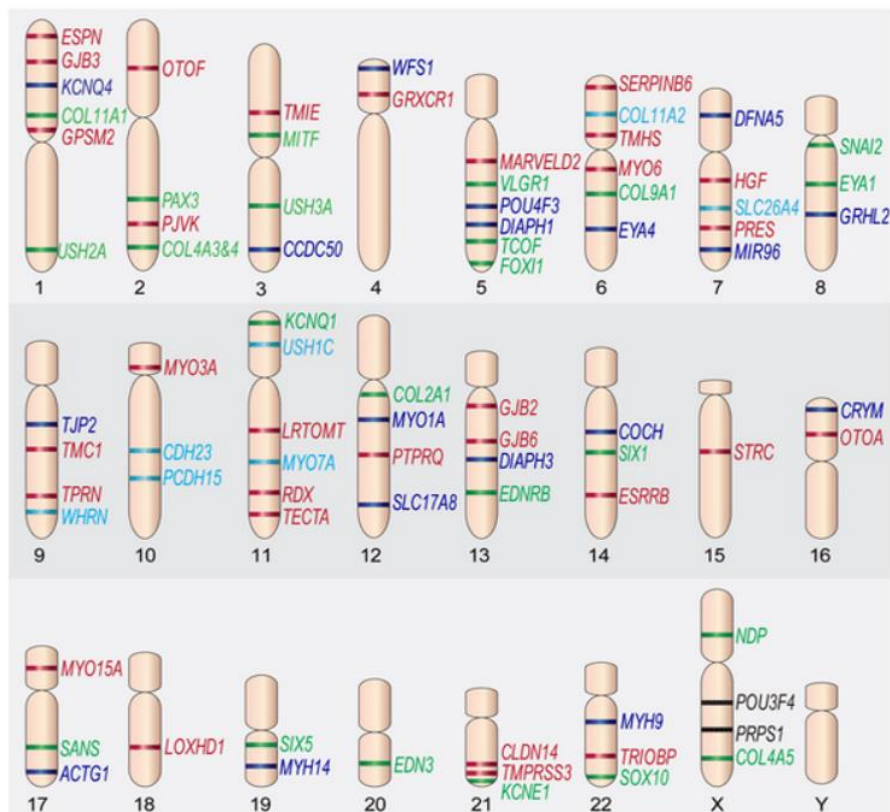
- 72 geny związane z NSHL, dziedziczenie autosomalne recesywne
 - 44 geny związane z NSHL dziedziczenie autosomalne dominujące
 - 5 genów związanych z NSHL dziedziczenie sprzężone z płcią
- +
- geny związane z niedosłuchem syndromicznym i mitochondrialnym

PONAD 150 GENÓW ZWIĄZANYCH Z NIEDOSŁUCHEM!!!

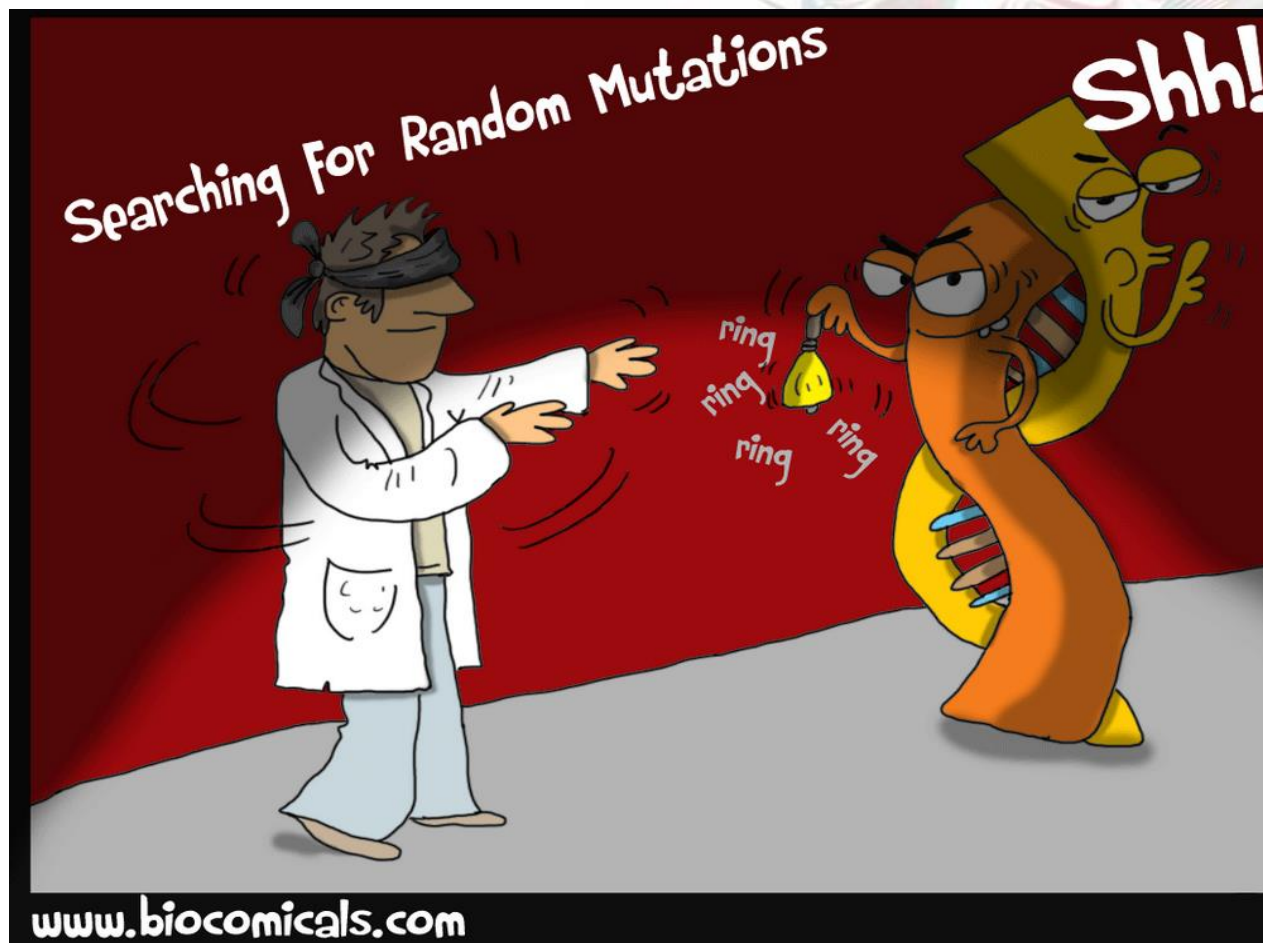


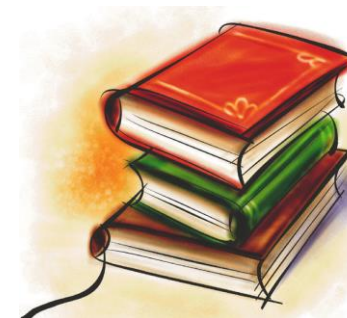
ERA SEKWENCJONOWANIA SANGEROWSKIEGO

— Autosomal recessive — Autosomal dominant — X-linked — Syndromic — SHL & NSHL

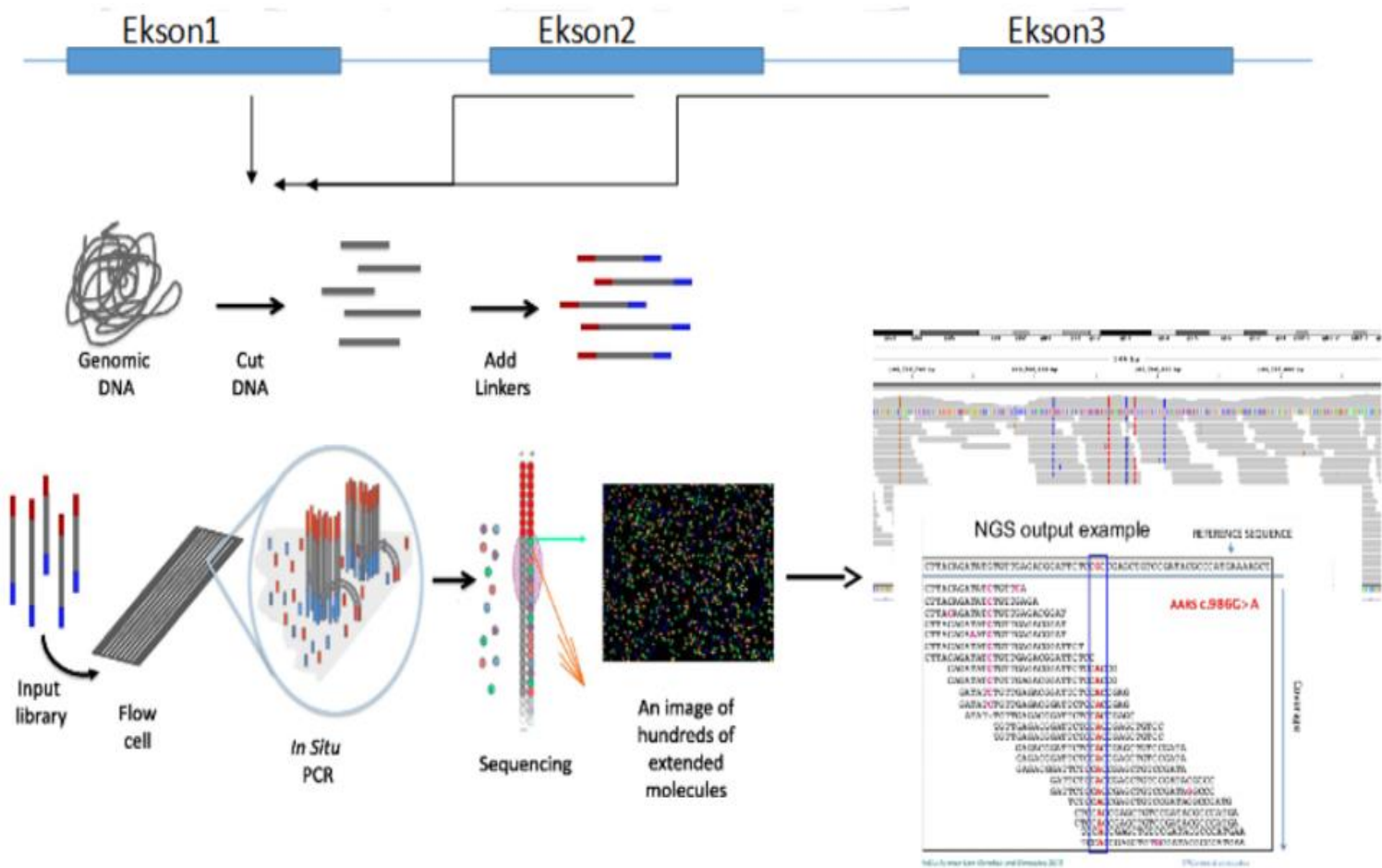


Który gen wybrać ????
Od którego zacząć????





Schemat procedury NGS

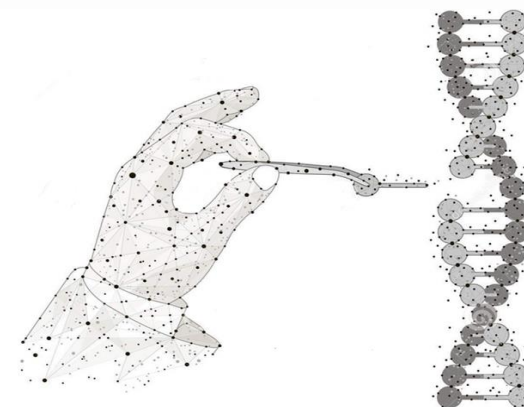
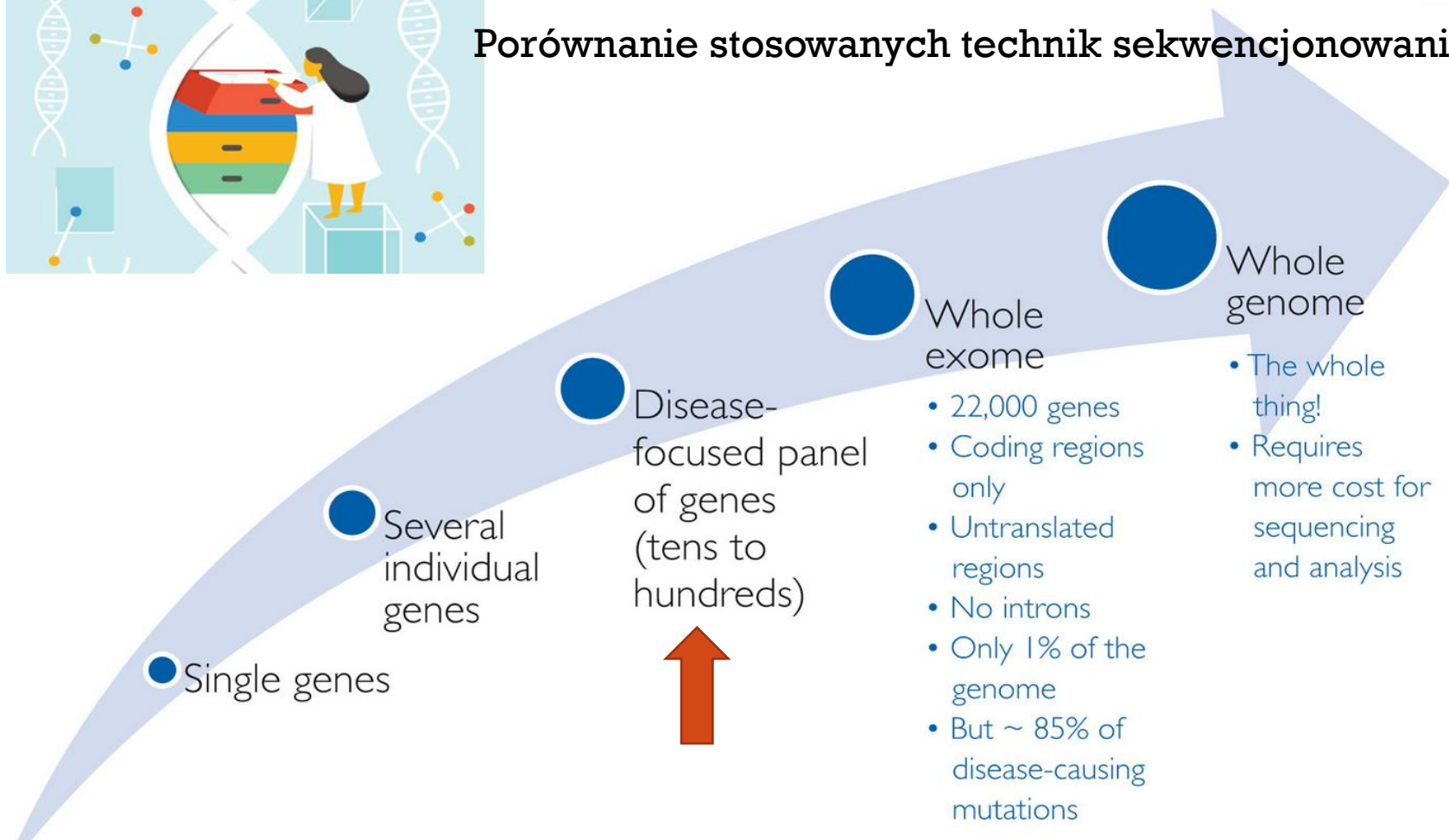


©2011, Illumina Inc. All rights reserved.

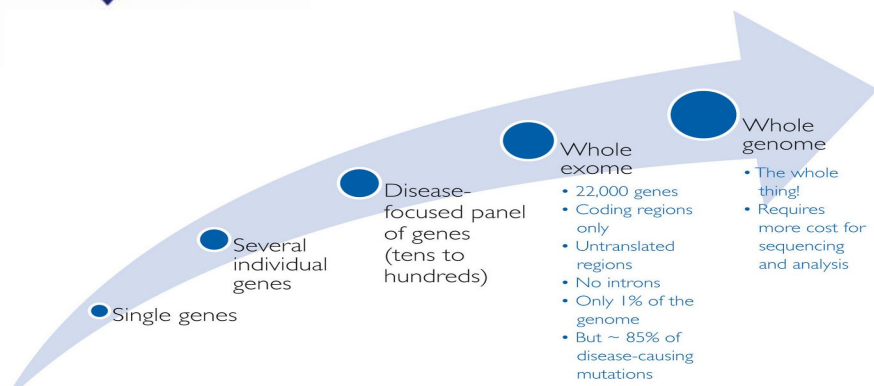
ERA SEKWENCJONOWANIA NASTĘPNEJ GENERACJI



Porównanie stosowanych technik sekwencjonowania

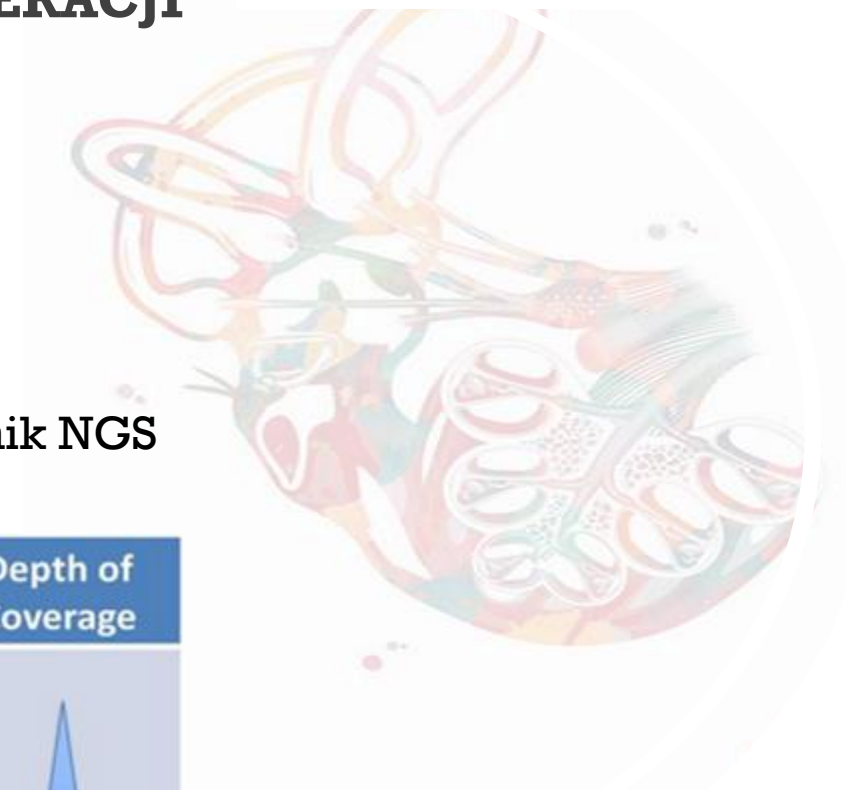


ERA SEKWENCJONOWANIA NASTĘPNEJ GENERACJI



Porównanie stosowanych technik NGS

Technology	Percent of Genome Sequenced	Cost	Depth of Coverage
Whole Genome Sequencing	>95%		
Whole Exome Sequencing	~1.5% (protein-coding regions)		
Targeted Sequencing	0.005% - 0.1%		



ERA SEKWENCJONOWANIA NASTĘPNEJ GENERACJI

Etapy analizy danych surowych NGS

1. Odczyt nukleotydu (*base calling*)

przypisanie sygnału do nukleotydu,
plik wynikowy: BCL → FASTQ

2. Przyrównanie / uliniowanie (*alignment*)

przyrównanie fragmentów do sekwencji referencyjnej
plik wynikowy: SAM/BAM

najdłuższy
etap

3. Odczyt wariantu (*variant calling*)

różnice między sekwencją badaną a referencyjną,
plik wynikowy: VCF

4. Adnotacja wariantów i filtrowanie

scharakteryzowanie wariantów korzystając z różnorodnych biologicznych
baz danych, odrzucenie części wariantów
plik wynikowy: csv, tsv, txt

5. Selekcja wariantu patogenicznego

wybór wariantu patogenicznego lub wariantów kandydujących

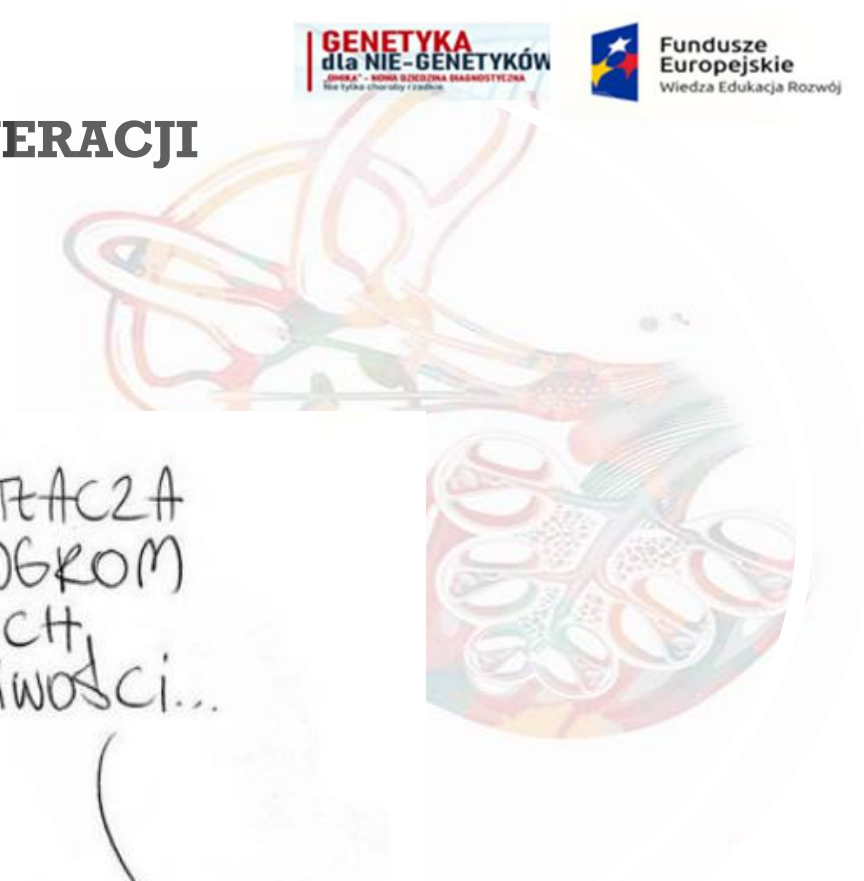


ERA SEKWENCJONOWANIA NASTĘPNEJ GENERACJI

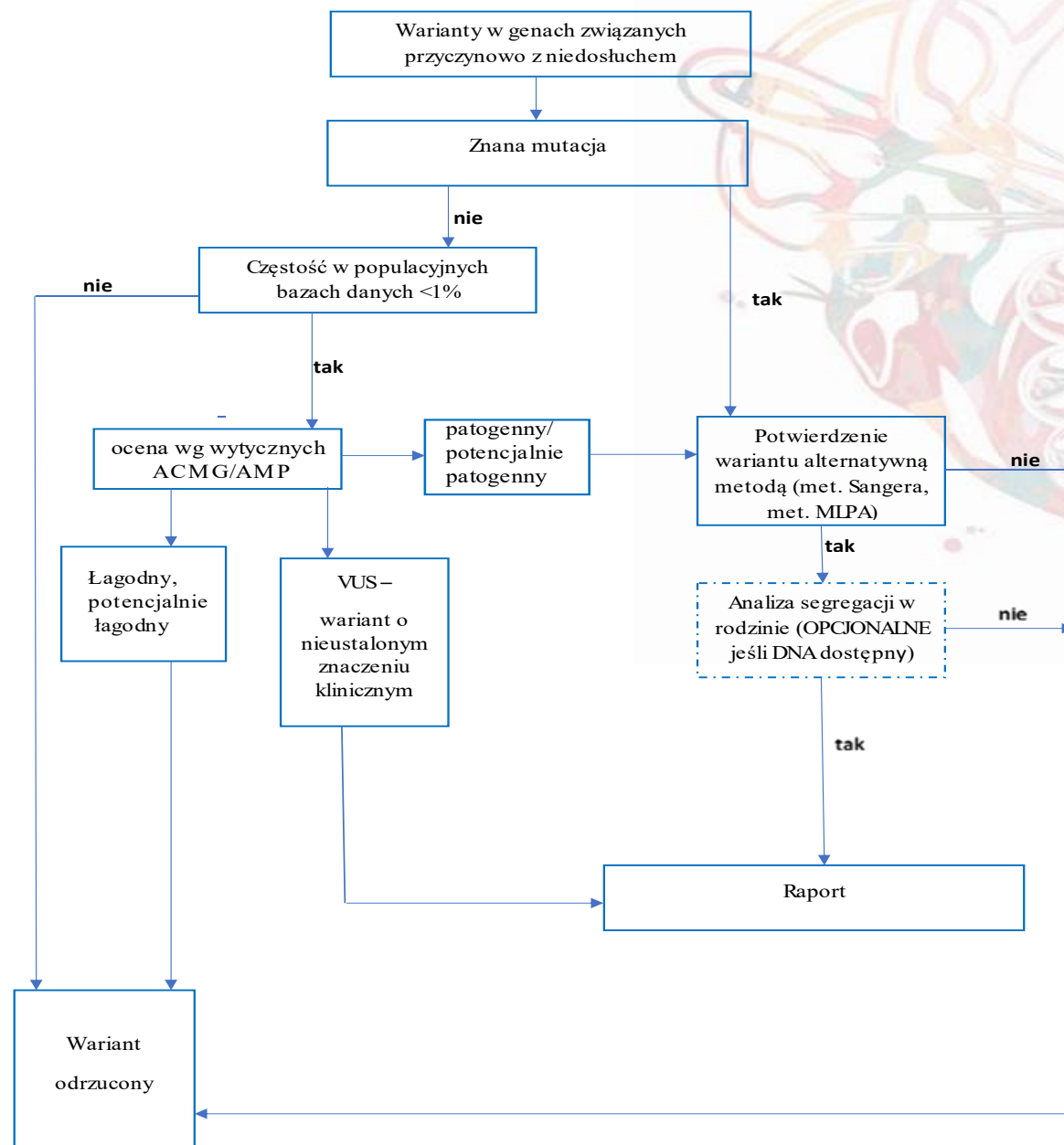
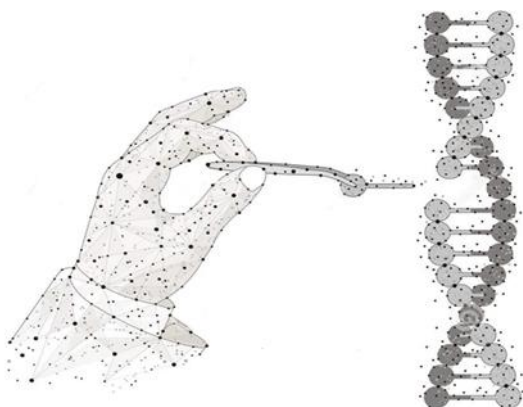


<http://biocomicals.blogspot.com>
www.biocomicals.com

PRZYTRACZA
MNIE OGROM
MOICH
MOŻLIWOŚCI...



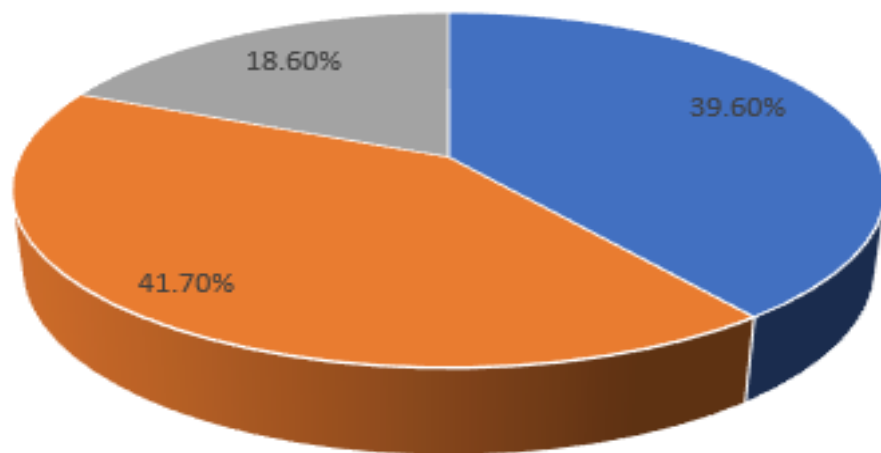
Schemat analizy danych NGS
(potok analizy danych)
- priorytetyzacja i filtracja
czyli
selekcja wariantu patogennego



DIAGNOSTYKA NGS NIEDOSŁUCHU DOŚWIADCZENIA WŁASNE

Analiza :

- 1) zestaw TruSight One (Illumina) - 16 osób
 - 2) opracowany w ZGM IMiD panel celowany (166 genów korelowanych przyczynowo z niedosłuchem) z wykorzystaniem zestawu NimbleGene SeqCap EZ (Roche) - 32 osoby.
- Razem 48 osób z niedosłuchem izolowanym i wykluczonymi mutacjami genu *GJB2*.



■ diagnoza molekularna ■ brak diagnozy molekularnej ■ niejednoznaczny

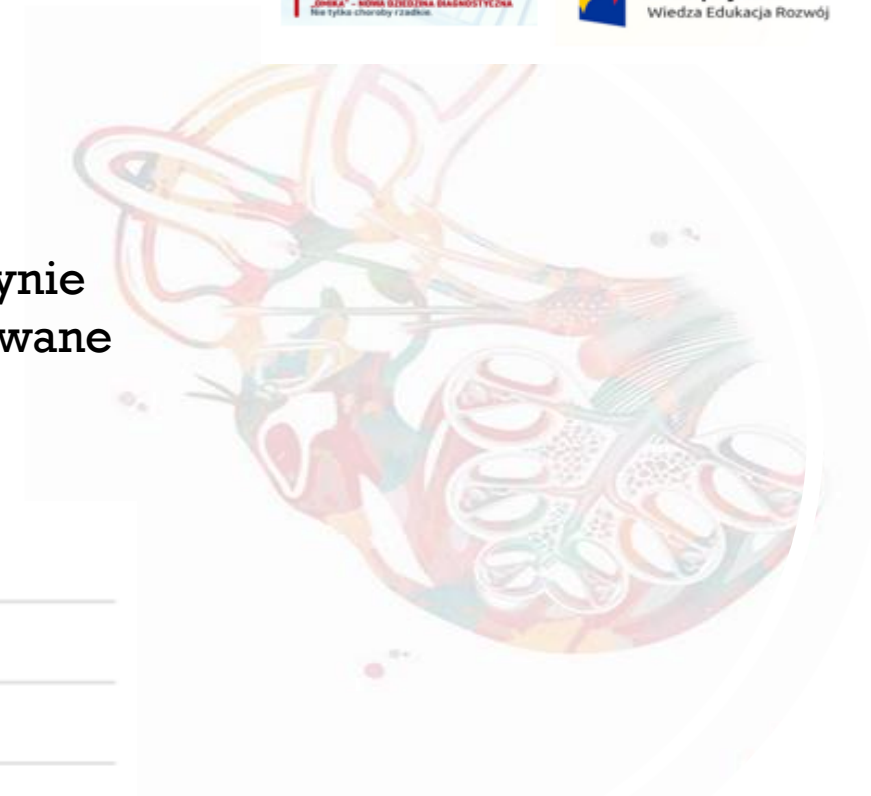
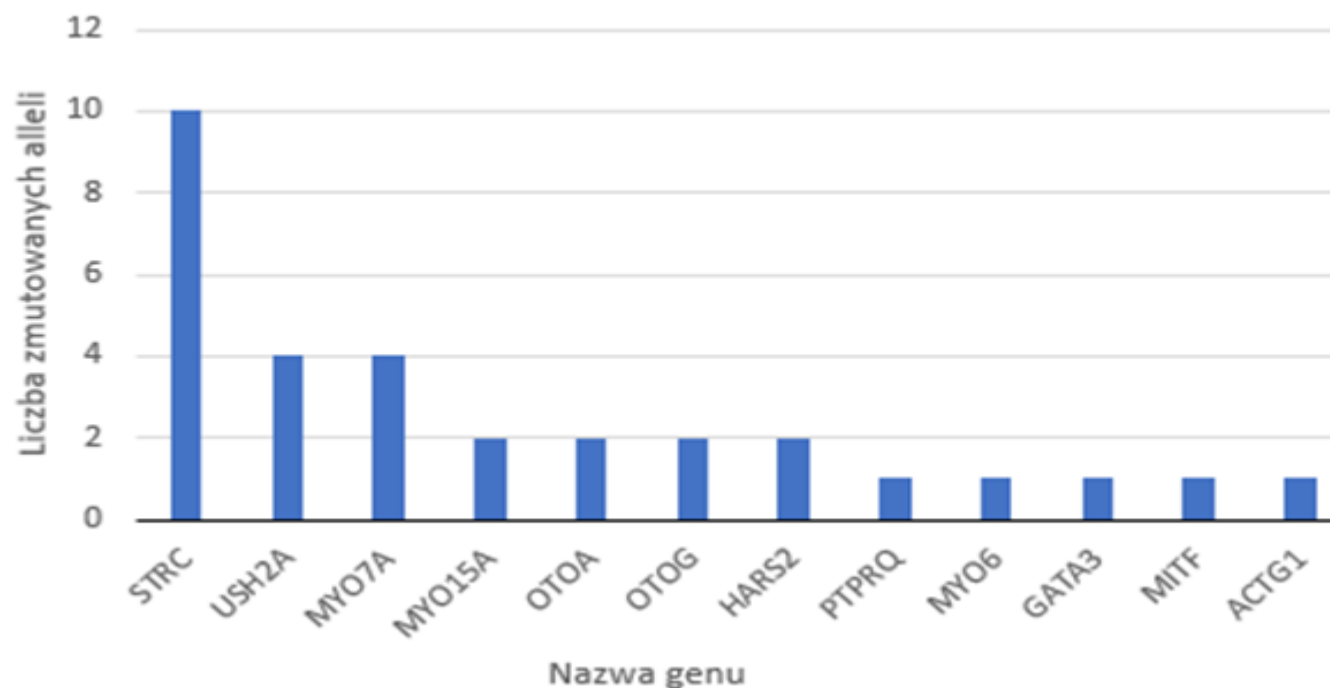
Mutacje przyczynowe zidentyfikowano u 19 badanych (39,60%).

Dla 20 pacjentów (**41,70%**) nie udało się ustalić molekularnego podłoża niedosłuchu, a dla 10 z nich (**18,60%**) wynik był niejednoznaczny.

Charakterystyka podłoża molekularnego niedosłuchu izolowanego w grupie polskich pacjentów - zastosowanie techniki sekwencjonowania następnej generacji do identyfikacji genów i mutacji odpowiedzialnych za dziedziczną postać choroby

DIAGNOSTYKA NGS NIEDOSŁUCHU DOŚWIADCZENIA WŁASNE

Dla 19 pacjentów z ustalonym genotypem molekularnym zidentyfikowano mutacje przyczynowe, aż w **13 genach**. Jedynie dla 3 genów: **STRC**, **USH2A** i **MYO7A** mutacje były identyfikowane więcej niż u jednego pacjenta. Zidentyfikowano 6 nowych nieopisanych mutacji.

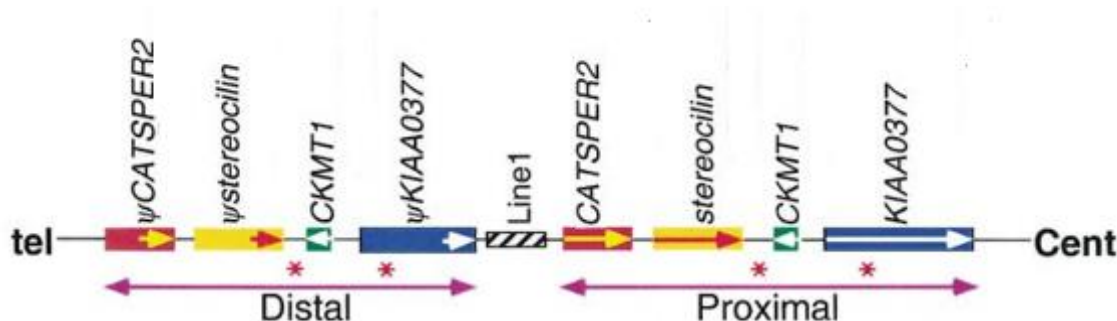


DIAGNOSTYKA NGS NIEDOSŁUCHU DOŚWIADCZENIA WŁASNE

Największy odsetek mutacji przyczynowych stanowią delecje (39%), a w szczególności rozległe delecje genu *STRC*, bo aż 69% (10 z 13).

Gen *STRC* (*locus 15q15.3*) koduje stereocilinę, białko połączeń bocznych komórek słuchowych zewnętrznych

W *locus 15q15.3* obserwujemy tandemową duplikację genów i pseudogenów, gdzie regiony proksymalny i dystalny mają 98% zgodności sekwencji.



Eur J Hum Genet. 2003 Jul;11(7):497-502.

Delecje genu *STRC* i *CATSPER2* powodują niedosłuch niesyndromiczny u kobiet i zespół DIS u mężczyzn, co ma znaczenie dla poradnictwa genetycznego

Delecje w genie *STRC* stanowią drugą po mutacjach genu *GJB2*, przyczynę niedosłuchu niesyndromicznego u polskich pacjentów.



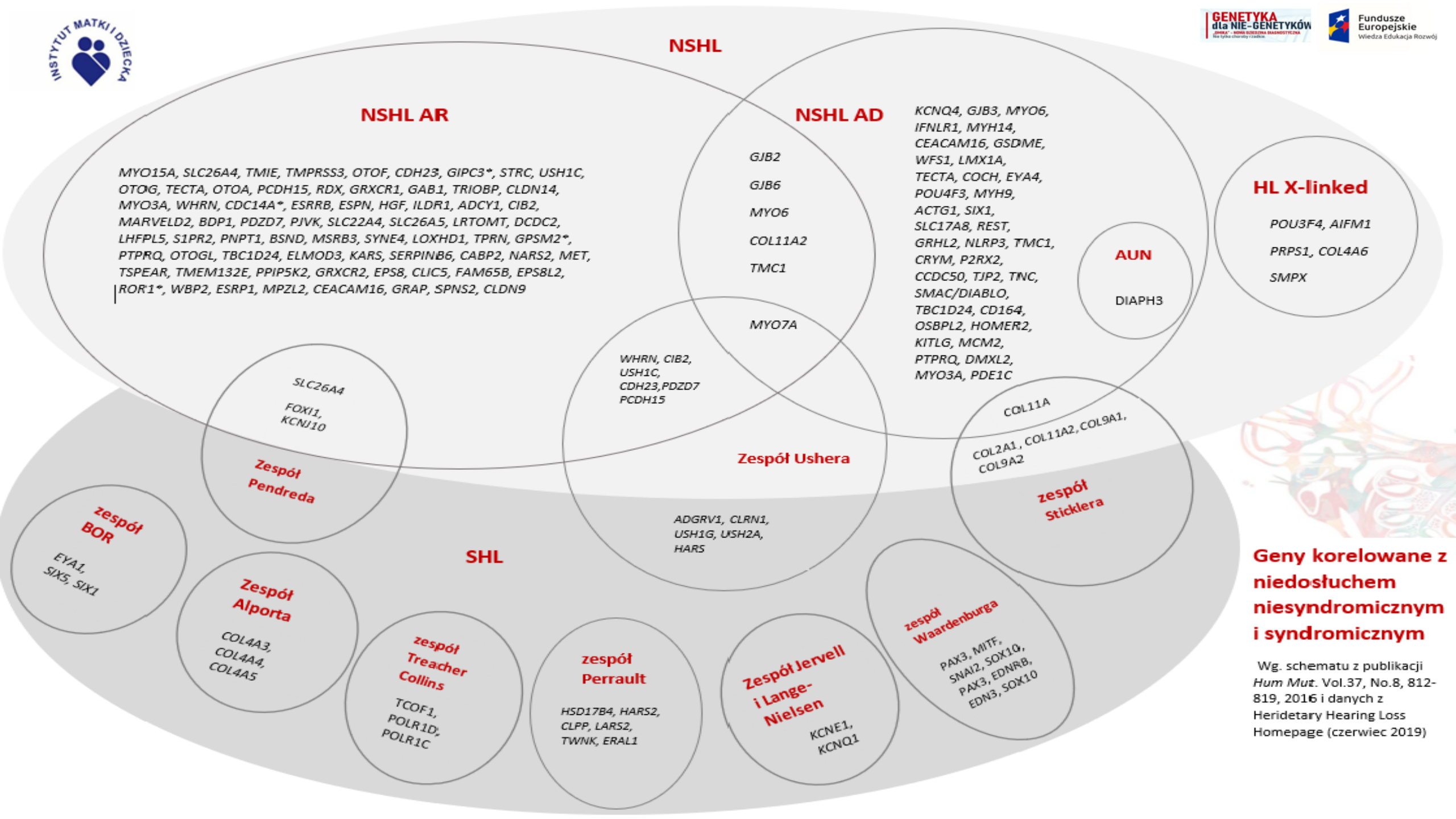
Zmiana rozpoznania klinicznego na podstawie wyników analizy molekularnej

Sugerowana zmiana rozpoznania klinicznego z niedosłuchu niesyndromicznego na syndromiczny

(47% pacjentów z ustalonym rozpoznaniem molekularnym):

- 2 pacjentów z mutacjami w genie *USH2A* - zespół Ushera
- 2 pacjentów z mutacjami w genie *MYO7A* i 1 z mutacjami w genie *CDH23* wymagają dokładnej ewaluacji klinicznej celem potwierdzenia/wykluczenia zespołu Ushera
- 2 pacjentów płci męskiej z delecją genów *STRC* i *CATSPER2* - zespół DIS (Deafness Infertility Syndrome)
- 1 pacjent - mutacja w genie *GATA3* - zespół Barakata
- 1 pacjentka z mutacją w genie *HARS2* - zespół Perrault
- 1 pacjentka z mutacją w genie *MITF* - zespół Waardenburga





DIAGNOSTYKA NGS NIEDOSŁUCHU DOŚWIADCZENIA WŁASNE



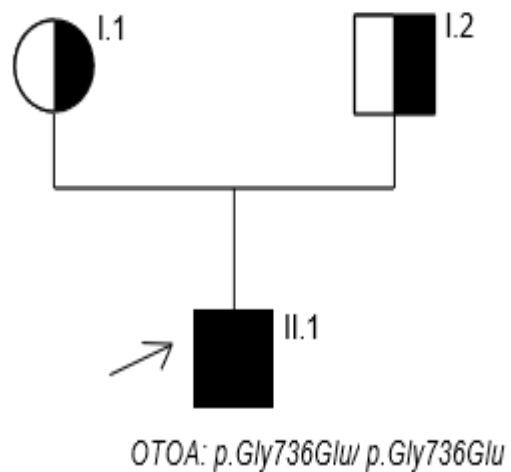
SCHEMAT DIAGNOSTYKI POLSKICH PACJENTÓW Z NIEDOSŁUCHEM IZOLOWANYM



DIAGNOSTYKA NGS NIEDOSŁUCHU DOŚWIADCZENIA WŁASNE

Przypadek 1:

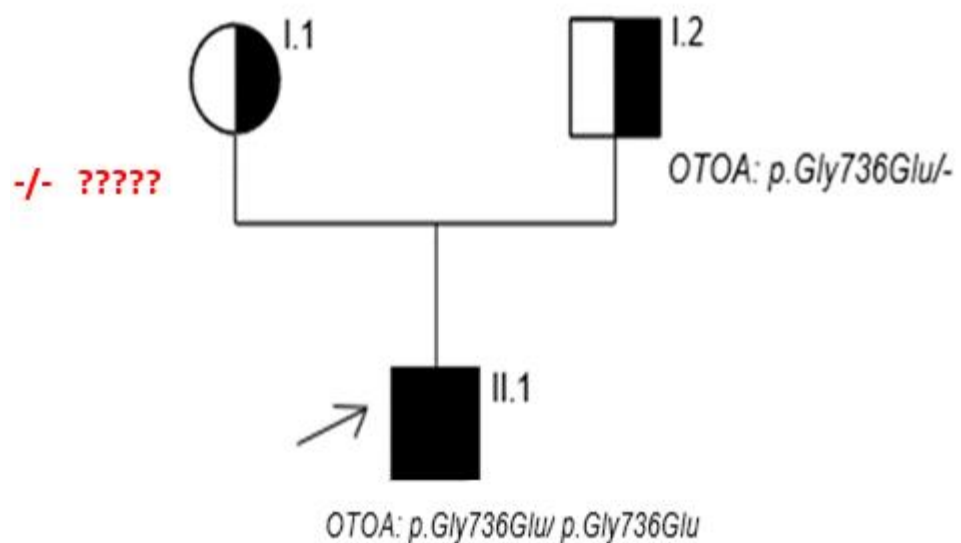
- pacjent z niedosłuchem izolowanym, obustronnym
- rodzice słyszą



Sugerowane dziedziczenie oburodzicielskie,
rodzice nosiciele mutacji p.Gly763Glu



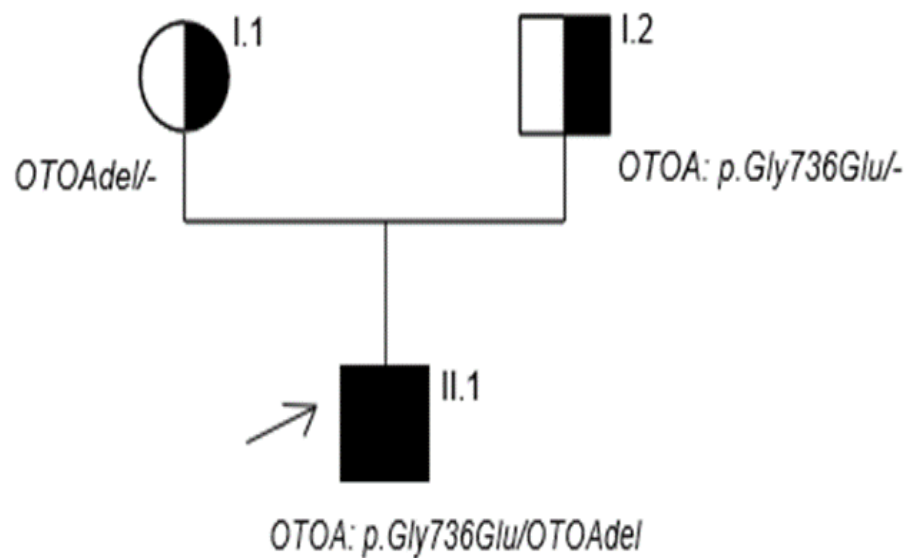
DIAGNOSTYKA NGS NIEDOSŁUCHU DOŚWIADCZENIA WŁASNE



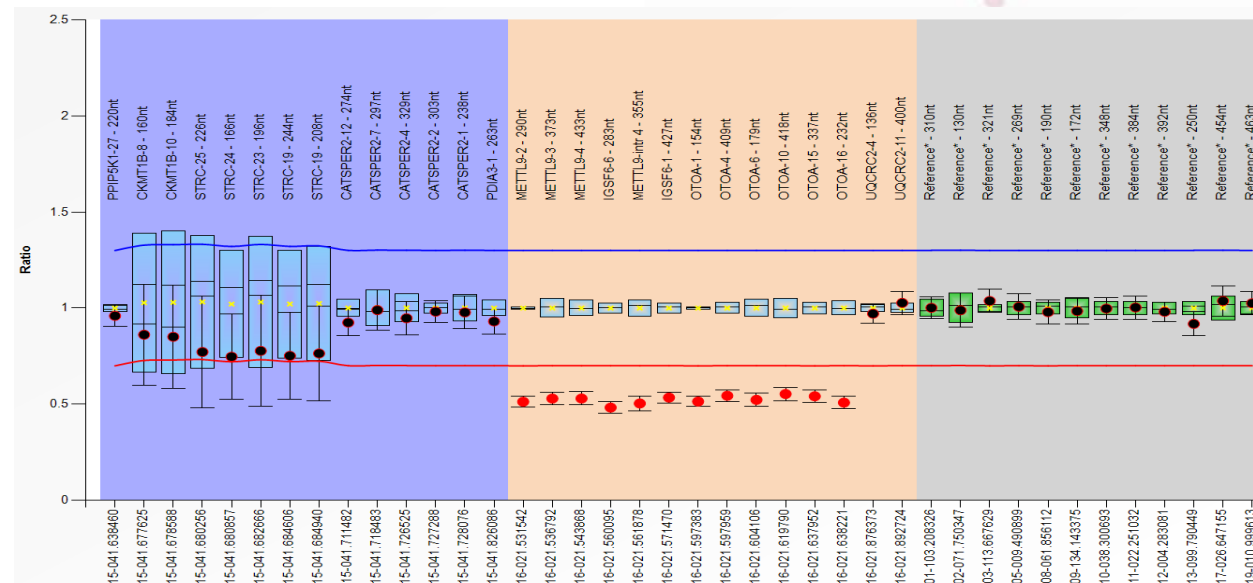
Analiza segregacji mutacji w rodzinie



DIAGNOSTYKA NGS NIEDOSŁUCHU DOŚWIADCZENIA WŁASNE



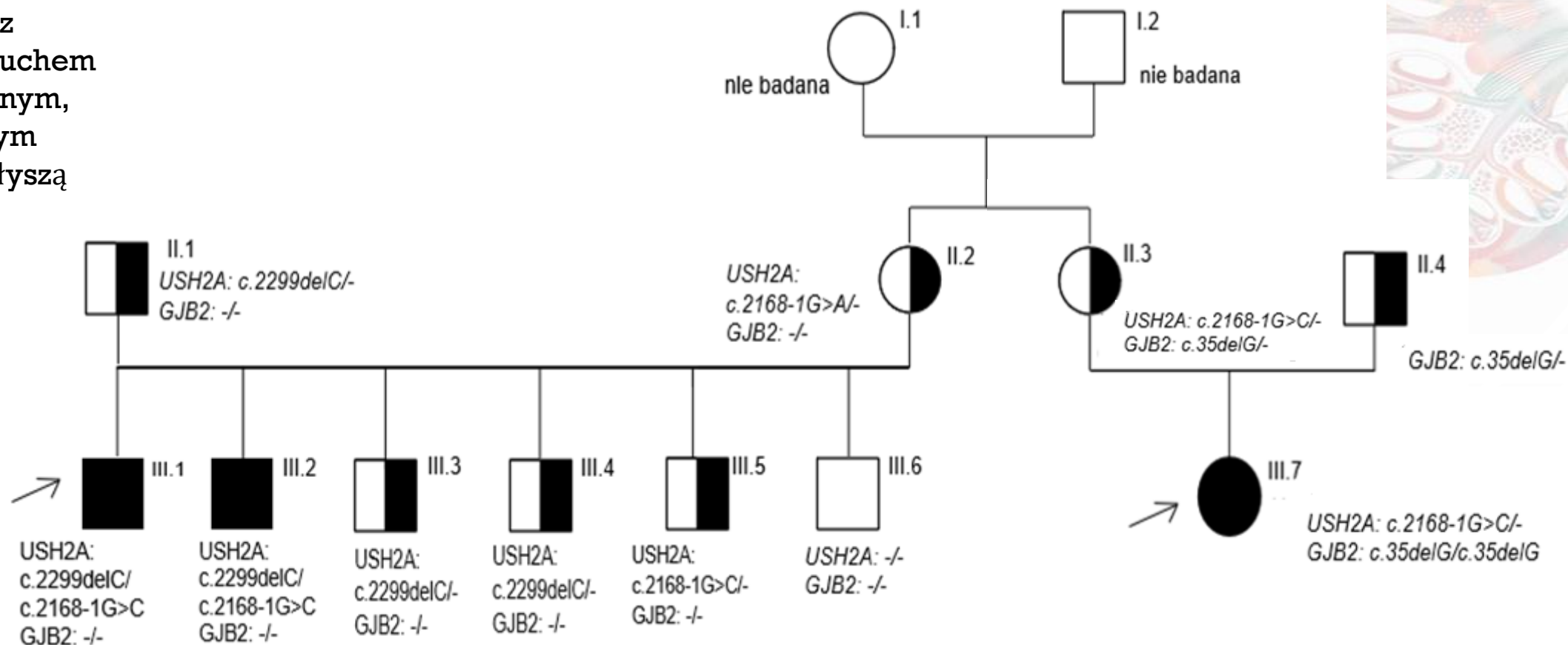
Analiza metodą MLPA



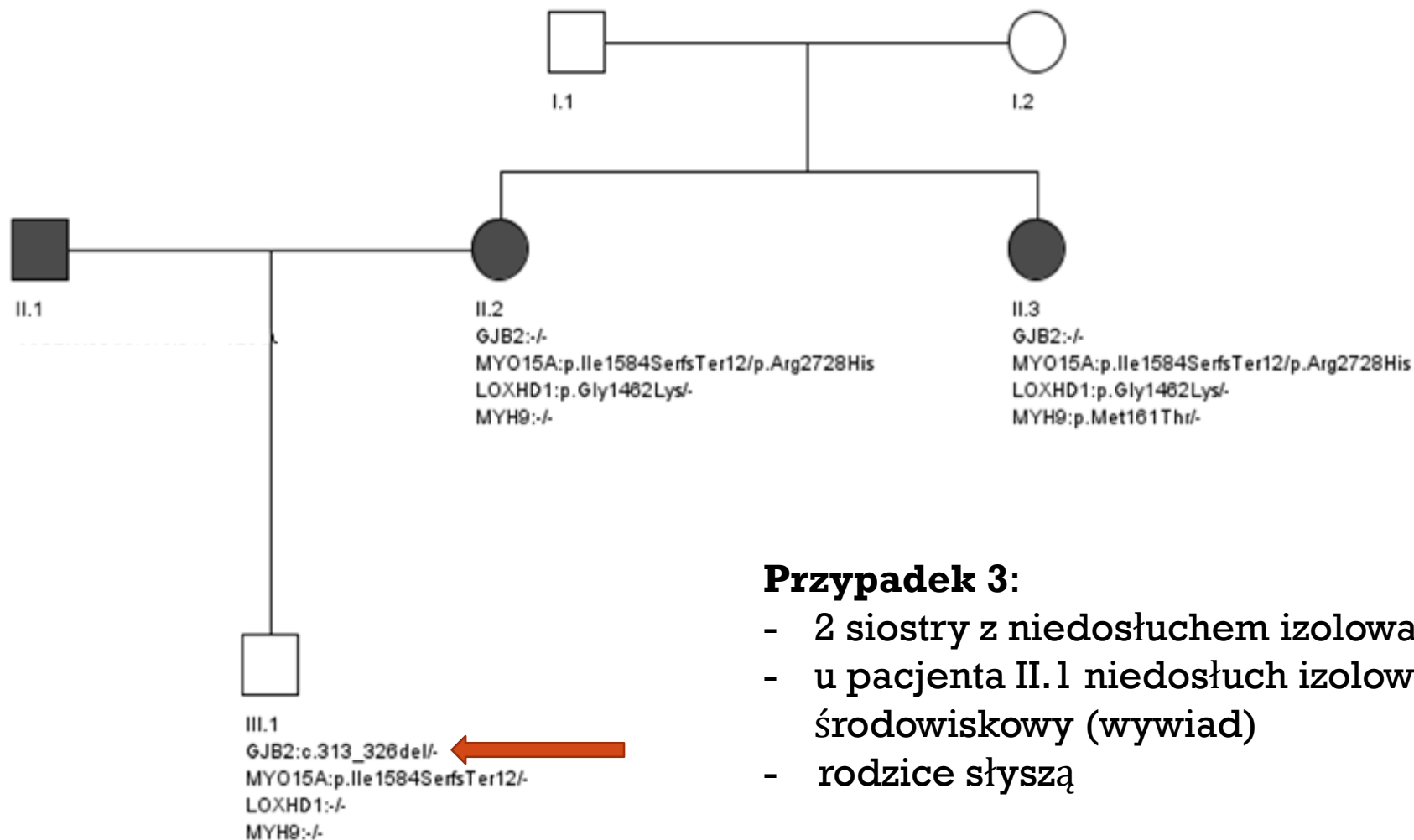
DIAGNOSTYKA NGS NIEDOSŁUCHU DOŚWIADCZENIA WŁASNE

Przypadek 2:

- 2 braci z niedosłuchem izolowanym, obustronnym
- rodzice słyszą



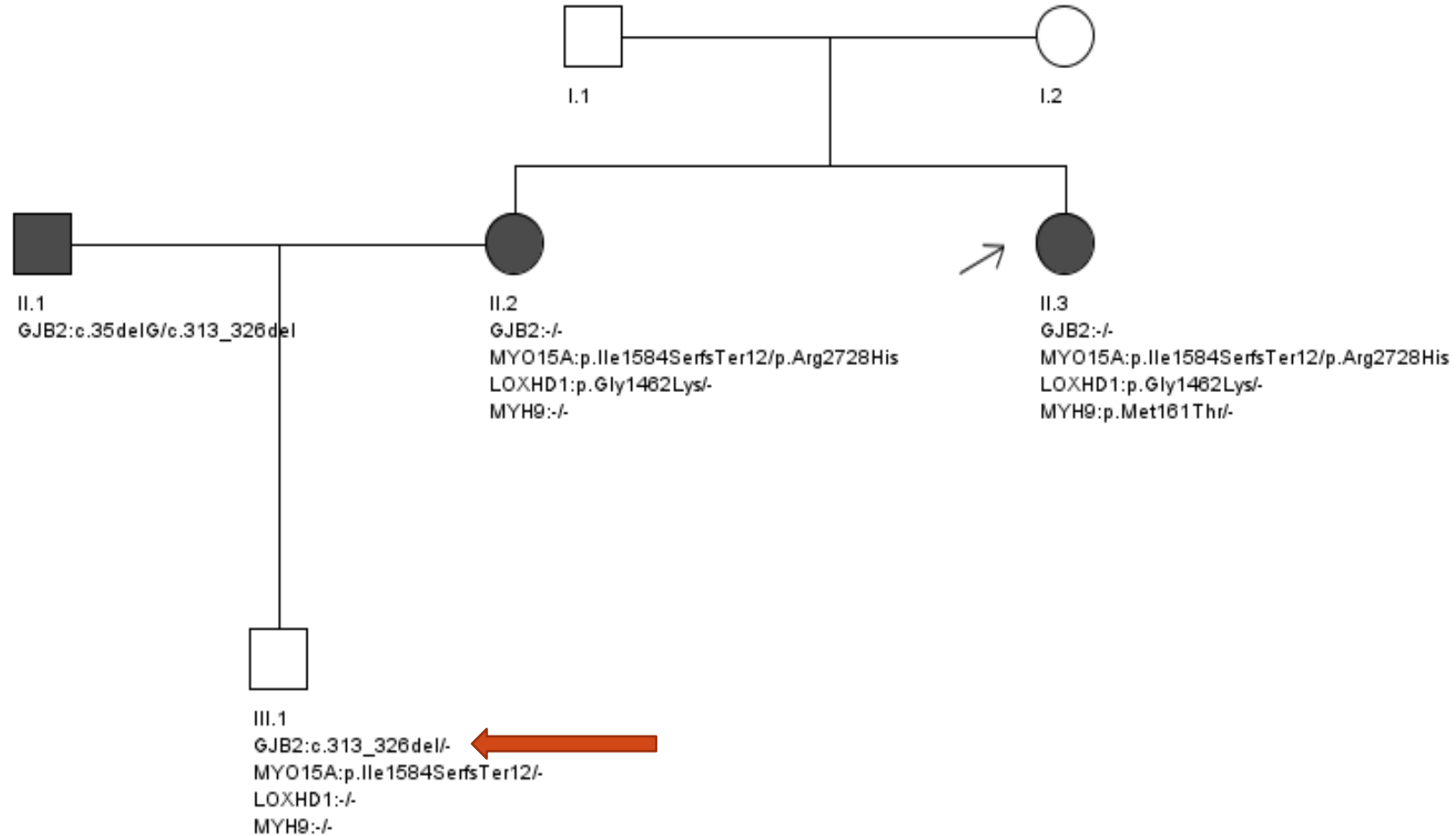
DIAGNOSTYKA NGS NIEDOSŁUCHU DOŚWIADCZENIA WŁASNE



Przypadek 3:

- 2 siostry z niedosłuchem izolowanym, obustronnym
- u pacjenta II.1 niedosłuch izolowany, obustronny, środowiskowy (wywiad)
- rodzice słyszą

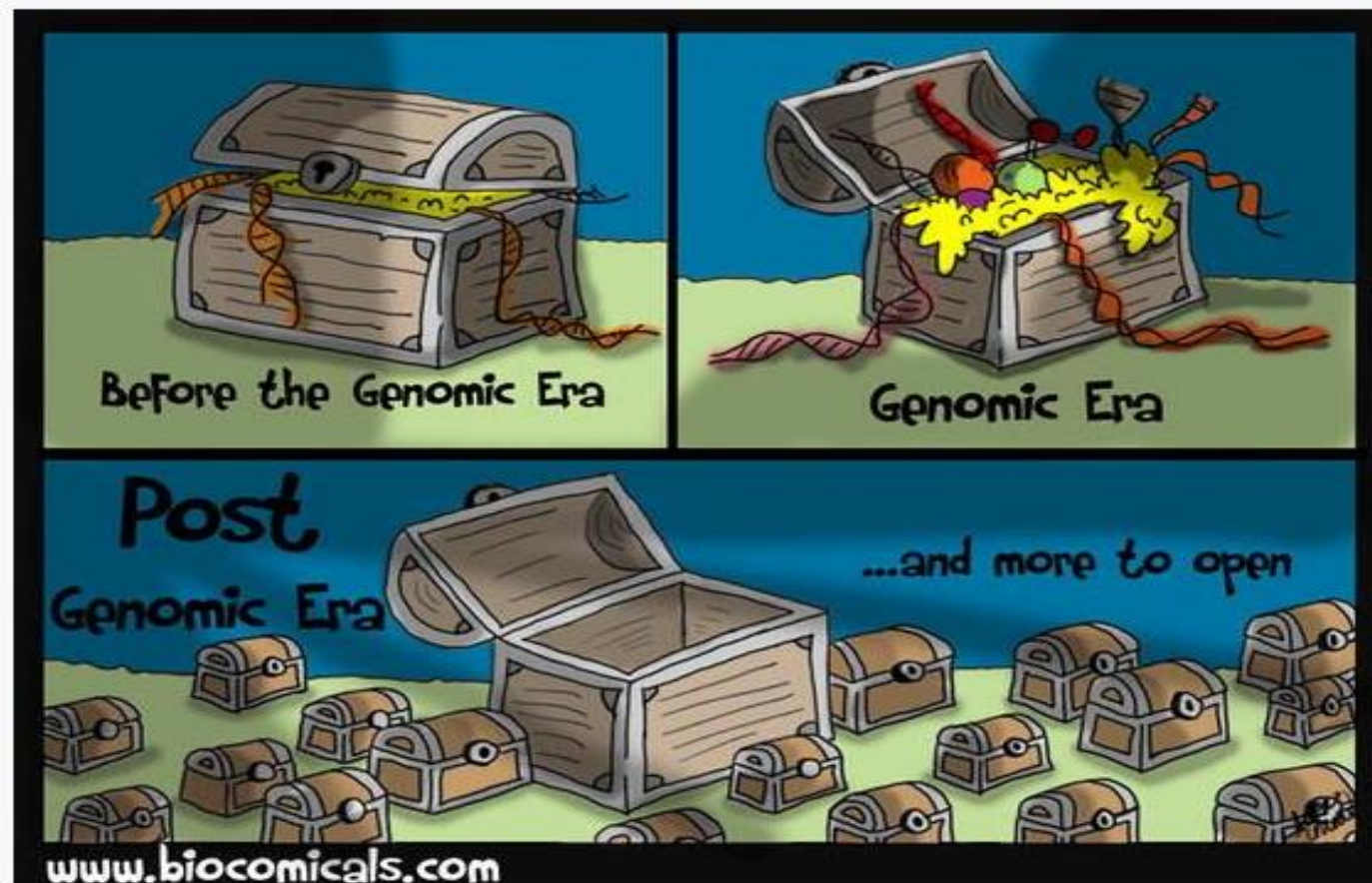
DIAGNOSTYKA NGS NIEDOSŁUCHU DOŚWIADCZENIA WŁASNE



JAK BĘDZIE WYGLĄDAĆ PRZYSZŁOŚĆ?



CZY JUŻ WSZYSTKO WIEMY?



DZIĘKUJĘ ZA UWAGĘ

katarzyna.niepokoj@imid.med.pl

22 3277177

Dziękuję wszystkim
współpracownikom
z ZGM IMiD
oraz
współpracującym
lekarzom z innych
ośrodków

<https://www.mimiwatercolorprints.com/collections/anatomy-watercolor-prints>

