

GENETYKA dla NIE-GENETYKÓW

„OMIKA” - NOWA DZIEDZINA DIAGNOSTYCZNA
Nie tylko choroby rzadkie.

NIEODPŁATNE
KURSY

dla lekarzy, diagnostów
i innych specjalistów

edu-metgen.imid.med.pl



Zastosowanie sekwencjonowania w diagnostyce molekularnej

Katarzyna Wertheim-Tysarowska
Zakład Genetyki Medycznej
Instytut Matki i Dziecka

KURS: Choroby genetyczne wieku rozwojowego
– możliwości diagnostyczne w erze badań genomowych .

IDENTYFIKACJA MUTACJI W CHOROBAH DZIEDZICZNYCH

- **WERYFIKACJA DIAGNOZY**
- **PORADNICTWO GENETYCZNE - MOŻLIWOŚĆ OKREŚLENIA RYZYKA GENETYCZNEGO**
- **BADANIE NOSICIELSTWA U KREWNYCH**
- **DIAGNOSTYKA PRENATALNA**
- **DIAGNOSTYKA PREIMPLANTACYJNA**
- **ZNACZENIE PREDYKCYJNE (PROGNOZOWANIE CIĘŻKOŚCI PRZEBIEGU CHOROBY)**
- **LECZENIE**

DIAGNOZA I USTALENIE PRZYCZYNY CHOROBY

☐ ZNACZENIE PSYCHOLOGICZNE DLA RODZINY

☐ POWSTANIE GRUP PACJENCKICH - WSPARCIE

☐ NOWE DANE MEDYCZNE

☐ WIĘKSZA ZNAJOMOŚĆ CHOROBY WŚRÓD SPECJALISTÓW

☐ DANE WIELOOŚRODKOWE

☐ ROKOWANIE

☐ OPRACOWANIE STANDARDÓW DIAGNOSTYCZNYCH

☐ BADANIA KLINICZNE

☐ LECZENIE

1860 Opublikowanie prac Mendla

1870

1880

1890

1900 Prace Mendla ponownie odkryte

1910 Zaproponowanie chromosomowej
1920 teorii dziedziczenia

1930

1940 DNA jako nośnik informacji genetycznej

1950 Odkrycie struktury DNA (Watson i Crick)

1960

1970 Opracowanie technologii rekombinacji

1980 DNA, początek klonowania

1990

2000 Opublikowanie Genomu Ludzkiego

2010

2020

Era genetyki

- identyfikacja pierwszych genów
- poznanie mechanizmów ekspresji regulacji genów
- identyfikacja genów przyczynowo związanych z chorobami genetycznymi
- charakterystyka podłoża molekularnego chorób (rzadkie warianty jako kryterium patogenności)

Era genomiki

Era medycyny spersonalizowanej

1860
1870
1880
1890
1900
1910
1920
1930
1940
1950
1960
1970
1980
1990
2000
2010
2020



AKTUALNOŚCI RDZENIOWY ZANIK MIĘŚNI LECZENIE JAK DZIAŁAMY

277	Nonacogam gamma (rDNA)	Rixubis, proszek i rozpuszczalnik do sporządzania roztworu do wstrzykiwań, 250 j.m./5 ml	1 fiol. proszku + 1 fiol. rozp. 5 ml	5909991210090	2017-09-01
278	Nonacogam gamma (rDNA)	Rixubis, proszek i rozpuszczalnik do sporządzania roztworu do wstrzykiwań, 3000 j.m./5 ml	1 fiol. proszku + 1 fiol. rozp. 5 ml	5909991210144	2017-09-01
279	Nonacogam gamma (rDNA)	Rixubis, proszek i rozpuszczalnik do sporządzania roztworu do wstrzykiwań, 500 j.m./5 ml	1 fiol. proszku + 1 fiol. rozp. 5 ml	5909991210106	2017-09-01
280	Nusinersen	Spinraza, roztwór do wstrzykiwań, 12 mg	1 fiol. 5 ml	5713219500975	2019-01-01
281	Obinutuzumab	Gazyvaro, koncentrat do sporządzania roztworu do infuzji, 1000 mg	1 fiol.po 40 ml	5902768001105	2018-07-01
282	Octocog alfa	Advate, proszek i rozpuszczalnik do sporządzania roztworu do wstrzykiwań, 1000 j.m.	1 fiol.z prosz. + 1 fiol.z rozp.po 5 ml	5909990224340	2016-07-01
283	Octocog alfa	Advate, proszek i rozpuszczalnik do sporządzania roztworu do wstrzykiwań, 1500 j.m.	1 fiol. z proszkiem + 1 fiol. z rozpuszczalnikiem po 5 ml	5909990224357	2019-01-01
284	Octocog alfa	Advate, proszek i rozpuszczalnik do sporządzania roztworu do wstrzykiwań, 2000 j.m.	1 fiol. z proszkiem + 1 fiol. z rozpuszczalnikiem po 5 ml	5909990697441	2019-01-01

Nusinersen na liście refundacyjnej!

Decyzją Ministra Zdrowia Łukasza Szumowskiego nusinersen został objęty pełną refundacją i umieszczony w projekcie listy leków refundowanych obowiązującej od 1 stycznia 2019 r.

Dzisiaj po południu projekt listy obowiązującej od 01.01.2019 r. został opublikowany w serwisie internetowym Ministerstwa Zdrowia. Nusinersen został umieszczony na pozycji 280 jako lek z odpłatnością 0%.

ów i mutacji

mutacji
se”

i

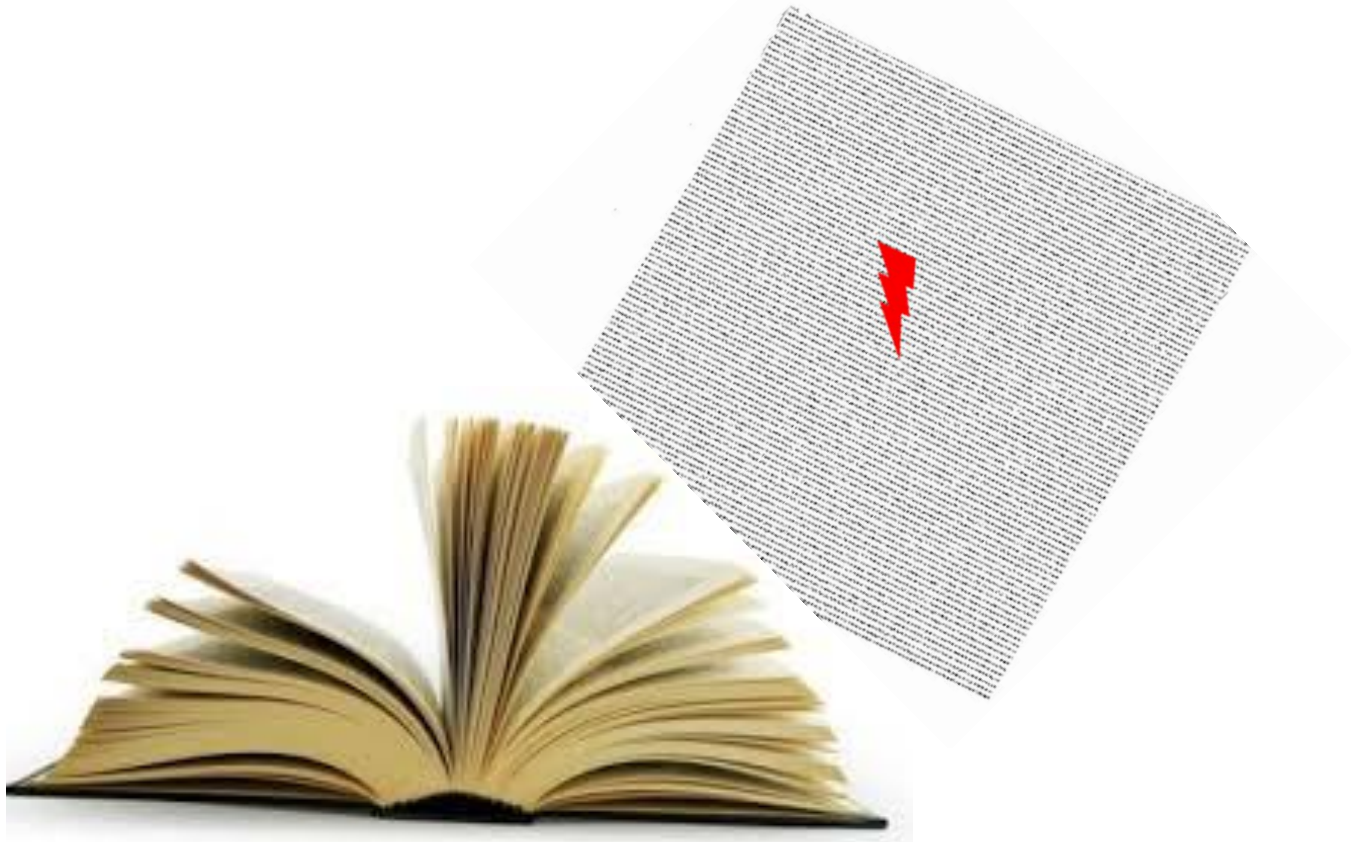
iu o dane

h

lo

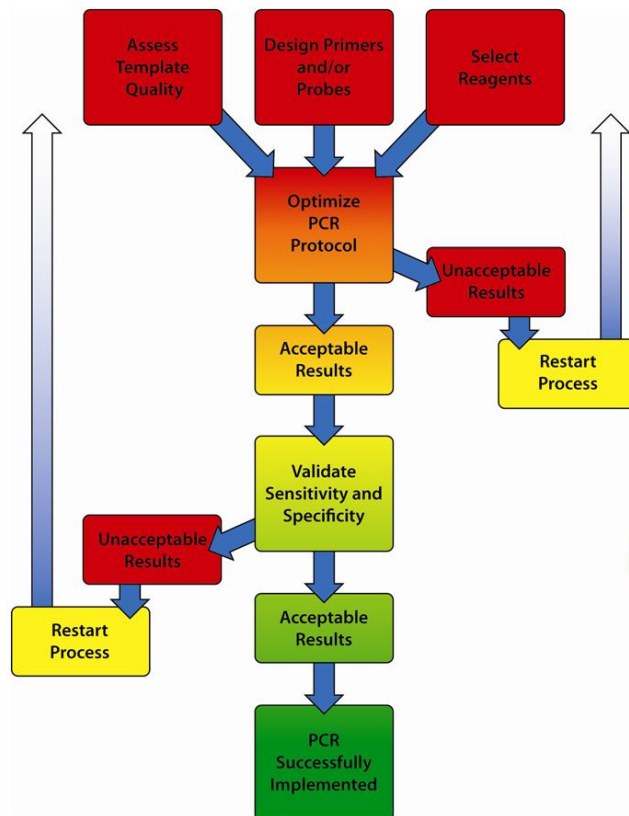
utycznych

POSZUKIWANIE MUTACJI



ROZWÓJ TECHNOLOGICZNY – SEKWENCJONOWANIE DNA

KLASYCZNA METODA – SEKWENCJONOWANIE SANGERA



PROJEKTOWANIE STARTERÓW

OPTIMALIZACJA REAKCJI PCR

ANALIZA ELEKTROFORETYCZNA

OCZYSZCZANIE PRÓBK

ZNAKOWANIE

OCZYSZCZANIE

ELEKTROFOREZA KAPILARNA

ANALIZA WYNIKÓW

1 REAKCJA = ODCZYT <1000 NUKLEOTYDÓW

POSZUKIWANIE MUTACJI



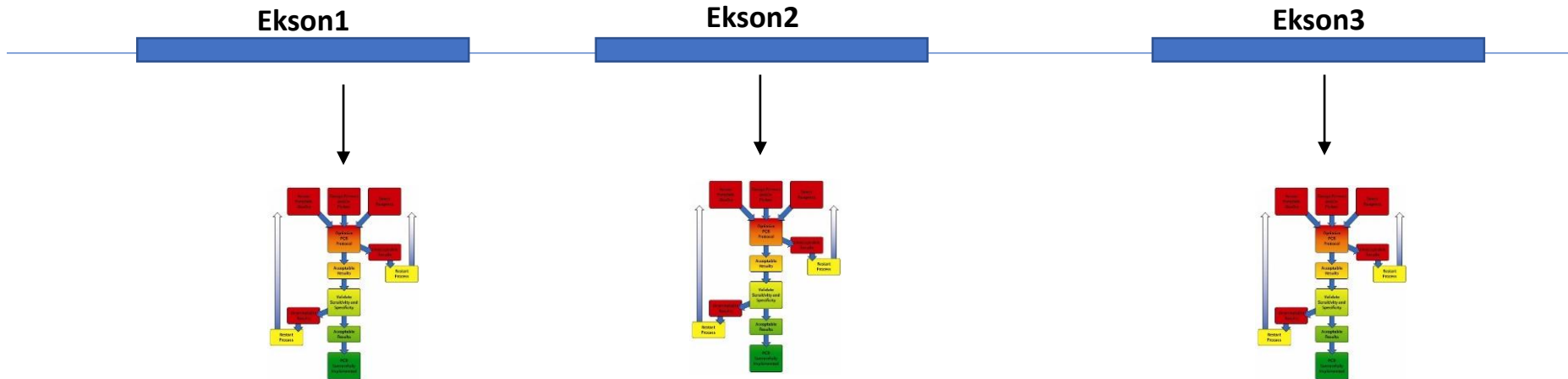
WYTYPOWANIE GENU(ÓW) DO BADANIA NA PODSTAWIE OBJAWÓW KLINICZNYCH



ANALIZA FRAGMENTÓW TEGO GENU

ROZWÓJ TECHNOLOGICZNY – SEKWENCJONOWANIE DNA

KLASYCZNA METODA – SEKWENCJONOWANIE SANGERA

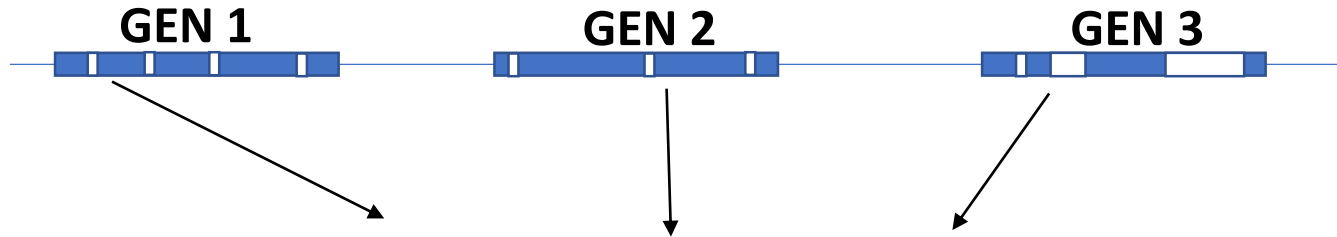


Konieczna analiza każdego kodującego fragmentu genu w oddzielnej reakcji

Pojedynczy gen: 1-178 eksonów, średnio około 10

ROZWÓJ TECHNOLOGICZNY – SEKWENCJONOWANIE DNA

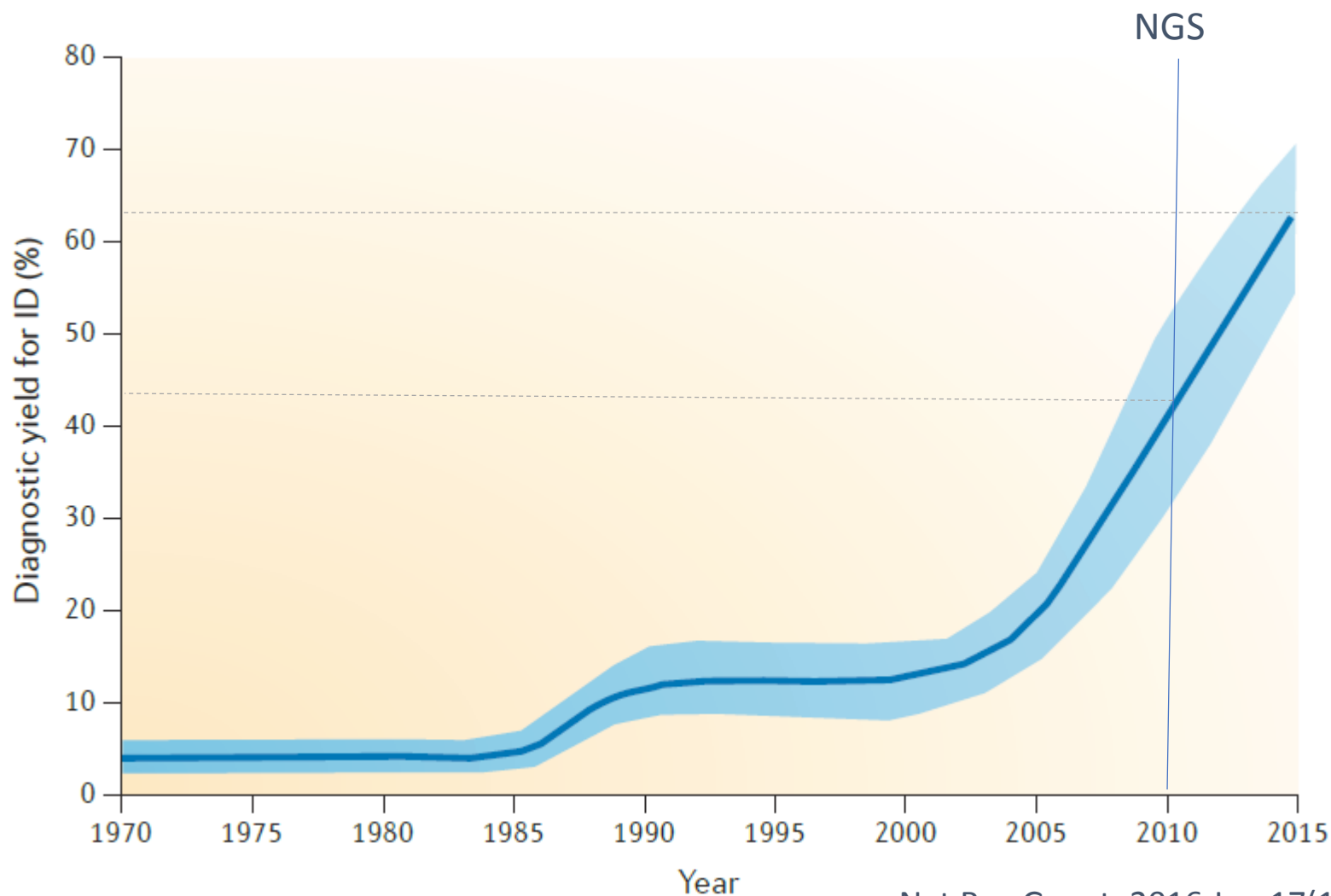
SEKWENCJONOWANIE NASTĘPNEJ GENERACJI NGS



Jednoczesna analiza wielu genów!

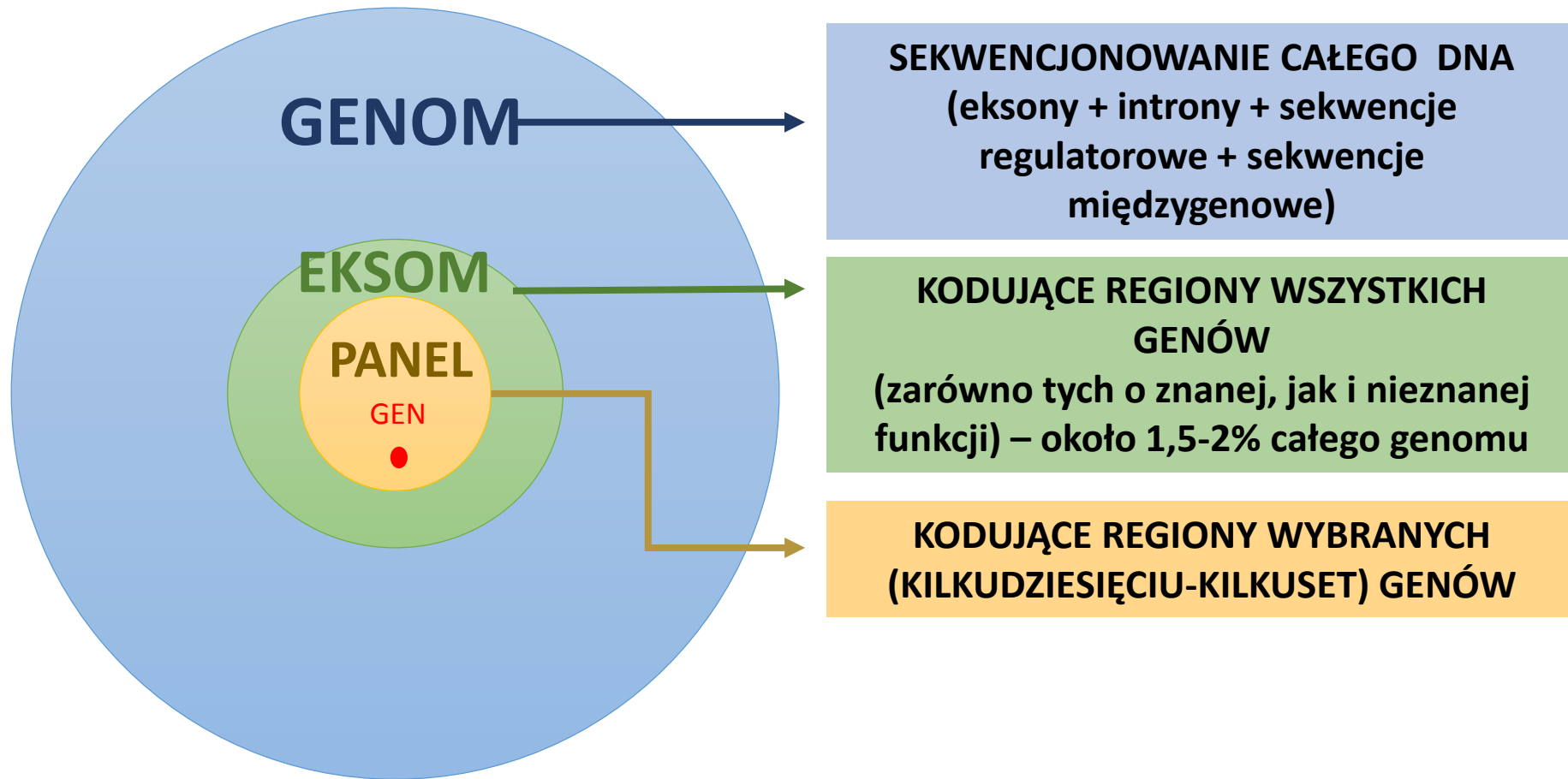
SEKWENCJONOWANIE
WIELKOSKALOWE

ODSETEK ZDIAGNOZOWANYCH OSÓB Z NI

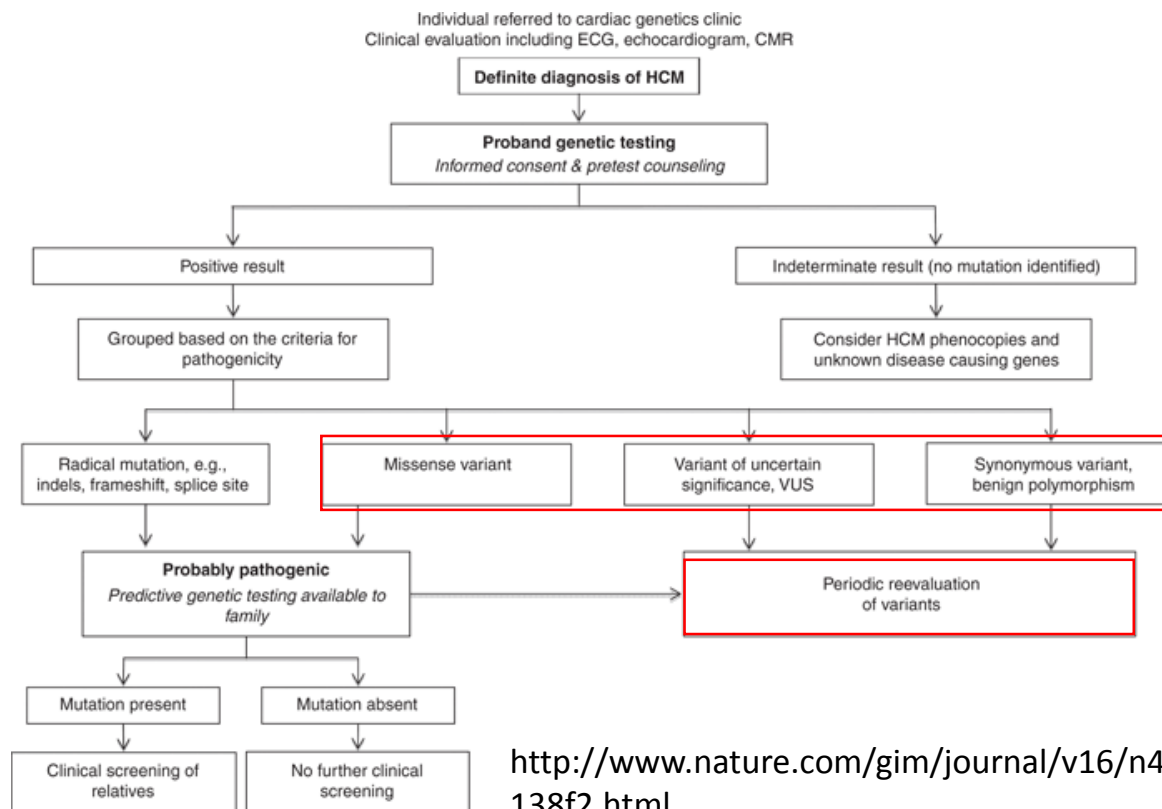


Nat Rev Genet. 2016 Jan;17(1):9-18.

SEKWENCJONOWANIE NASTĘPNEJ GENERACJI (NGS)



Klasyfikacja nowych mutacji – wyzwanie diagnostyczne!



http://www.nature.com/gim/journal/v16/n4/fig_tab/gim2013138f2.html

(plus alternate isoforms)	(257)	6984
HGMD cDNA sequences	8513	8267
HGMD primary references	58343	57390
HGMD additional references	30881	29883
HGMD phenotypes	20255	19637
HGMD mapped phenotypes	19228	18642

Number of entries by mutation type

Mutation type	Total number of entries for release 2017.2 (disease-associated/functional polymorphism sub-total)	Total number of entries for release 2017.1
Missense/nonsense	117360 (5670)	114703
Splicing	18761 (639)	18386
Regulatory	3857 (2523)	3801
Small deletions	30819 (306)	30169
Small insertions	12825 (187)	12557
Small indels	2916 (61)	2866
Repeat variations	508 (311)	507
Gross insertions/duplications	3854 (86)	3767
Complex rearrangements	1880 (124)	1857
Gross deletions	15588 (148)	15272
<i>Total</i>	<i>208368 (10033)</i>	<i>203885</i>

Number of entries by variant class

Variant class	Total number of entries for release 2017.2	Total number of entries for release 2017.1
 DM	175024	172132
 DMT	23081	21772
 DP	3690	3556
 DPP	2257	2228
 EP	4107	3992
 R	209	205

The I329T substitution exhibits a shift in polarity from non-polar to polar and displays a decrease in Kyte-Doolittle hydrophobicity from 4.5 to -0.7. Approximately 1.23% of missense mutations in HGMD are Ile-Thr. The mutation occurs 2543 amino acids from the end of the protein.

Extra information	
1	1
2	2
3	3
4	4
5	5
6	6
7	7
8	8
9	9
10	10
11	11
12	12
13	13
14	14
15	15
16	16
17	17
18	18
19	19
20	20
21	21
22	22
23	23
24	24
25	25
26	26
27	27
28	28
29	29
30	30
31	31
32	32
33	33
34	34
35	35
36	36
37	37
38	38
39	39
40	40
41	41
42	42
43	43
44	44
45	45
46	46
47	47
48	48
49	49
50	50
51	51
52	52
53	53
54	54
55	55
56	56
57	57
58	58
59	59
60	60
61	61
62	62
63	63
64	64
65	65
66	66
67	67
68	68
69	69
70	70
71	71
72	72
73	73
74	74
75	75
76	76
77	77
78	78
79	79
80	80
81	81
82	82
83	83
84	84
85	85
86	86
87	87
88	88
89	89
90	90
91	91
92	92
93	93
94	94
95	95
96	96
97	97
98	98
99	99
100	100

I148T w *CFTR*

Wariant bez znaczenia klinicznego!!!!

- ⦿ Początkowo opisana jako częsta mutacja „CF causing”
- ⦿ OBECNIE: I148T bez innego defektu w układzie *cis* nie jest odpowiedzialna za CF
- ⦿ Rekomendacje sugerują usunięcie tej mutacji z zestawów diagnostycznych, również komercyjnych
- ⦿ Po wykryciu I148T powinno wykonać się test na obecność 3199del6 (ekson 17a) w układzie *cis*

PRZEBIEG NGS

IZOLACJA DNA, PRZYGOTOWANIE
BIBLIOTEK

SEKWENCJONOWANIE

POTOK ANALIZY DANYCH

GENEROWANIE RAPORTU

POTOK ANALIZY DANYCH (*pipeline*)

1. Odczyt nukleotydu (*base calling*)

przypisanie sygnału do nukleotydu,
plik wynikowy: **FASTQ**

2. Przyrównanie / uliniowanie (*alignment, mapping*)

przyrównanie fragmentów do sekwencji
referencyjnej,
plik wynikowy: **SAM/BAM**

3. Odczyt wariantu (*variant calling*)

różnice między sekwencją badaną a
referencyjną
plik wynikowy: **VCF**

4. Adnotacja wariantów i filtrowanie

scharakteryzowanie wariantów na podstawie
różnorodnych biologicznych baz danych,
odrzućenie części wariantów

5. Wybór wariantu patogennego

wybór wariantu patogennego
lub wariantów kandydujących



POTOK ANALIZY DANYCH (*pipeline*)

1. Odczyt nukleotydu
(*base calling*)

2. Przyrównanie /
uliniowanie
(*alignment, mapping*)

3. Odczyt wariantu
(*variant calling*)

4. Adnotacja wariantów i
filtrowanie

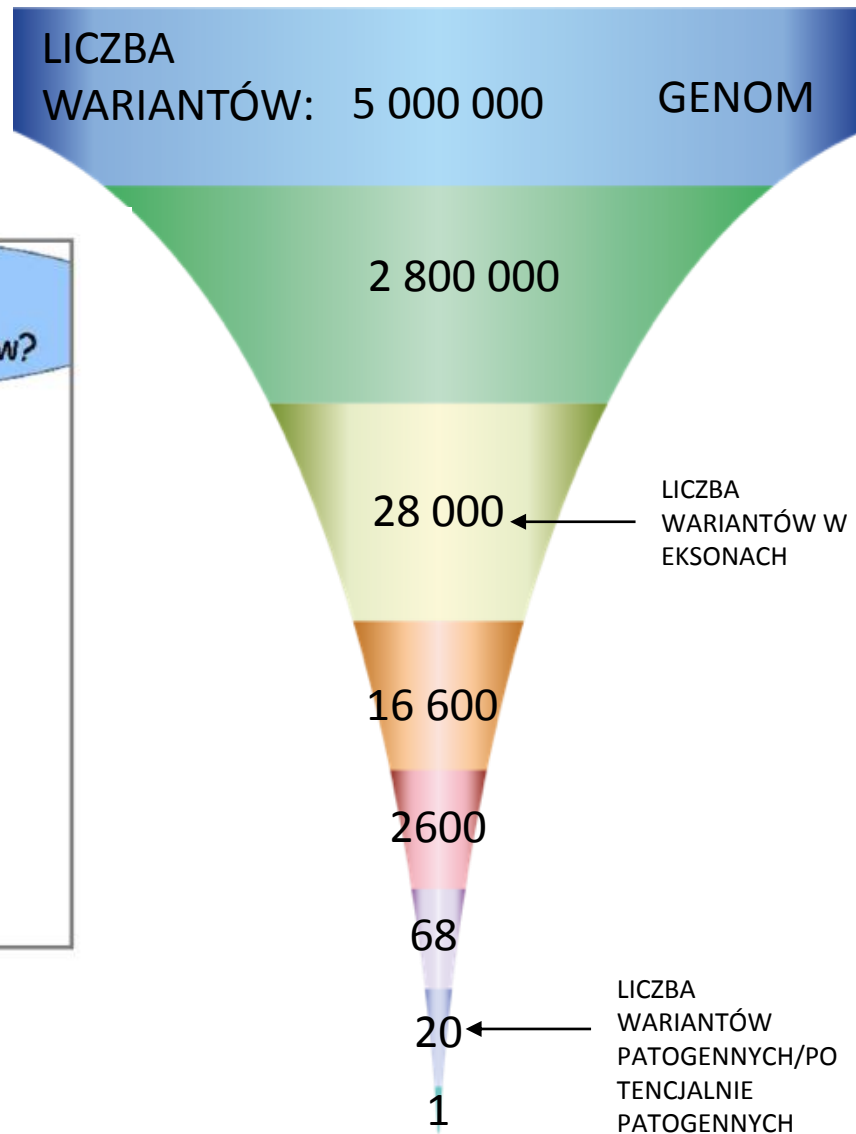
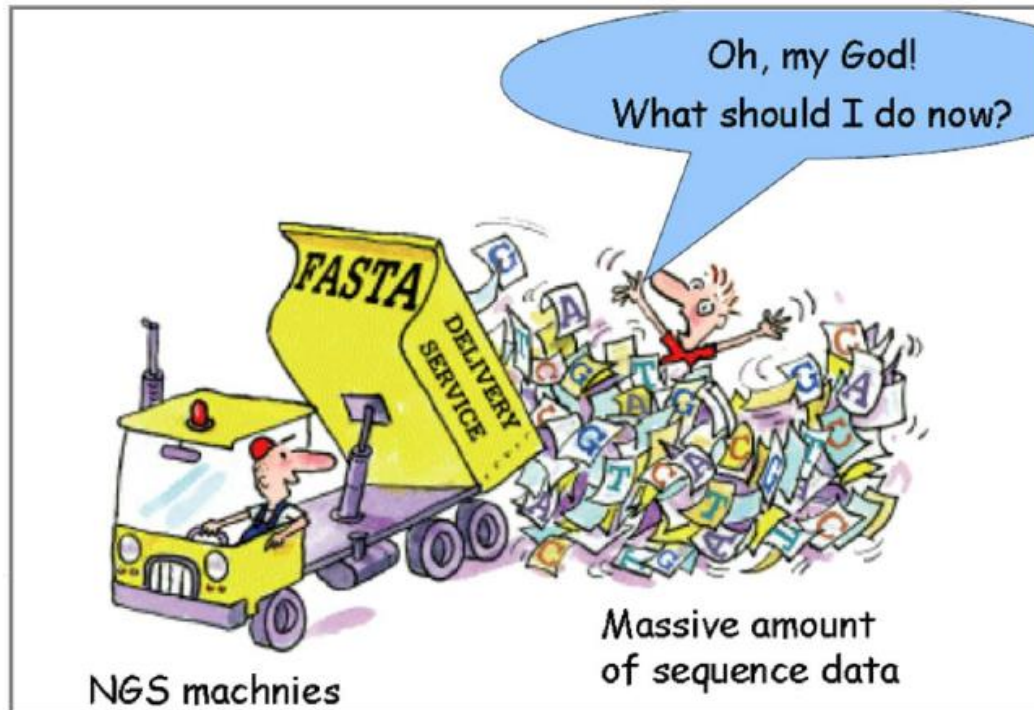
5. Wybór wariantu
patogennego

BIOINFORMATYK

DIAGNOSTA
LABORATORYJNY
I KLINICYSTA



POTOK ANALIZY DANYCH (*pipeline*)



Fundusze
Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska



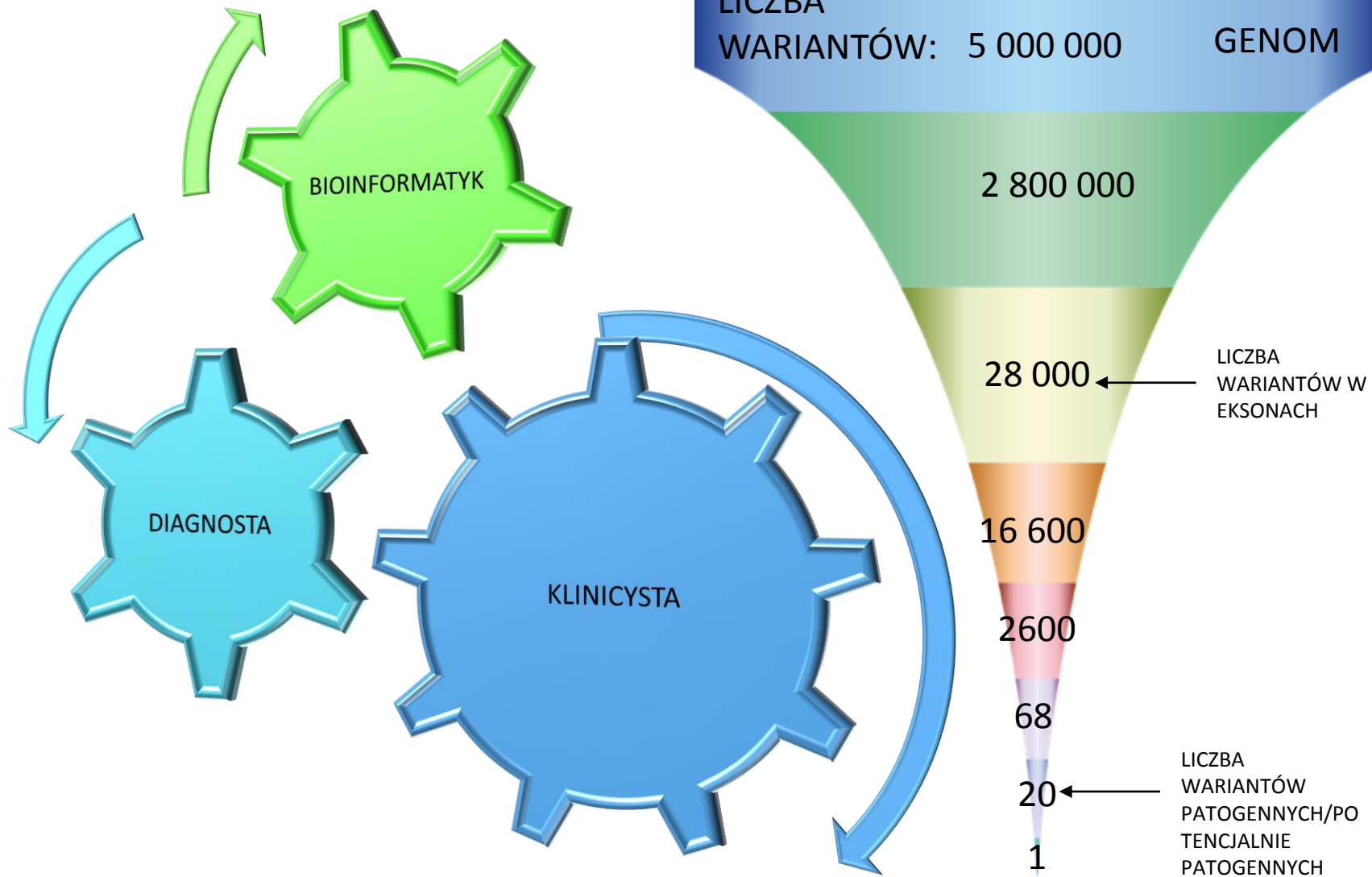
Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



edu-metgen.imid.med.pl

POTOK ANALIZY DANYCH (*pipeline*)



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska



Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



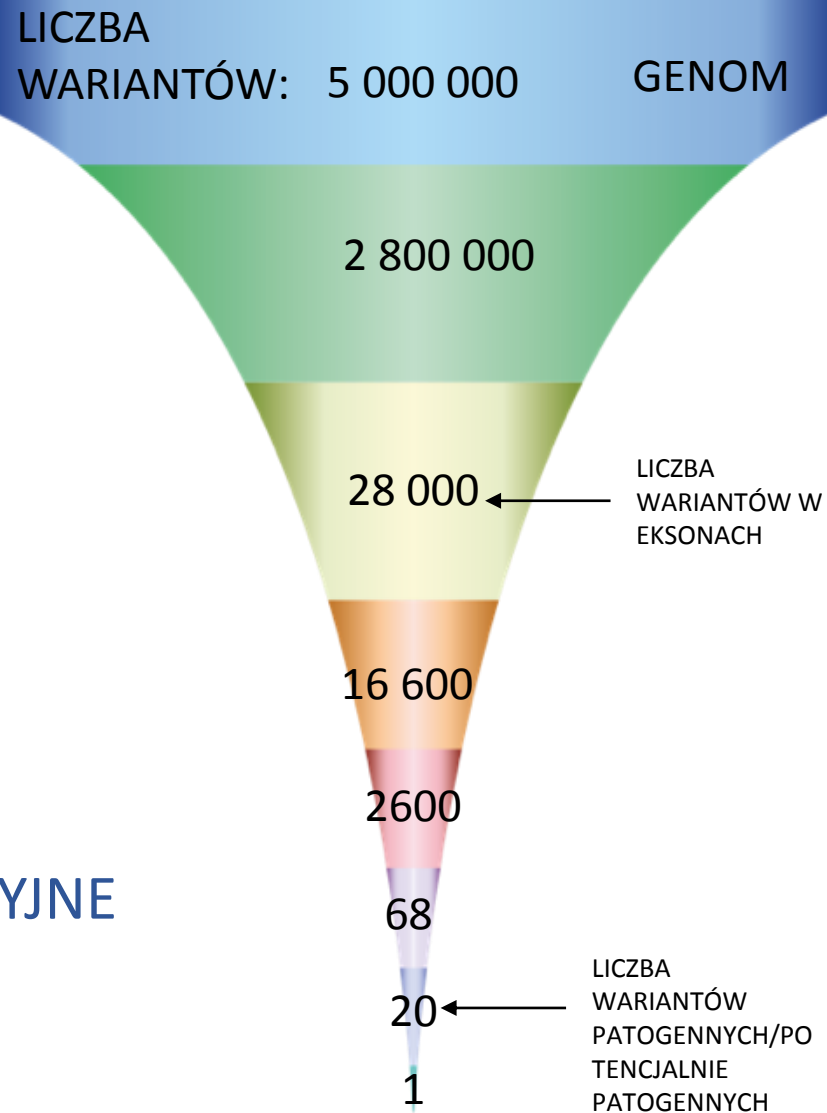
edu-metgen.imid.med.pl

POTOK ANALIZY DANYCH (*pipeline*)

4. Adnotacja wariantów i filtrowanie

5. Wybór wariantu patogennego

- OBJAWY KLINICZNE,
- WYWIAD RODZINNY
- SPOSÓB DZIEDZICZENIA CHOROBY
- BAZY DANYCH, PROGRAMY PREDYKCYJNE I PIŚMIENICTWO



POTOK ANALIZY DANYCH (*pipeline*)

BAZY POPULACYJNE

Exome Aggregation Consortium

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

Exome Variant Server

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

1000 Genomes Project

<http://browser.1000genomes.org>

dbSNP

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

dbVar

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

Częstość populacyjna (osoby zdrowe) – czy zmiana jest częsta w danej populacji?

BAZY KLINICZNE

ClinVar

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

OMIM

<http://www.omim.org>

Human Gene Mutation Database

<http://www.hgmd.org>

Locus/disease/ethnic/other-specific databases

Human Genome Variation Society

<http://www.hgvs.org/dblist/dblist.html>

Leiden Open Variation Database

<http://www.lovd.nl>

DECIPHER

<http://decipher.sanger.ac.uk>

Czy zmiana jest zarejestrowana w bazach klinicznych (osoby chore) i jaki ma status patogenności?

POTOK ANALIZY DANYCH (*pipeline*)

BAZY POPULACYJNE
Exome Aggregation Consortium

BAZY KLINICZNE

ClinVar

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

OMIM

<http://www.omim.org>

Human Gene Mutation Database

<http://www.hgmd.org>

Locus/disease/ethnic/other-specific databases

Human Genome Variation Society

<http://www.hgvs.org/dblist/dblist.html>

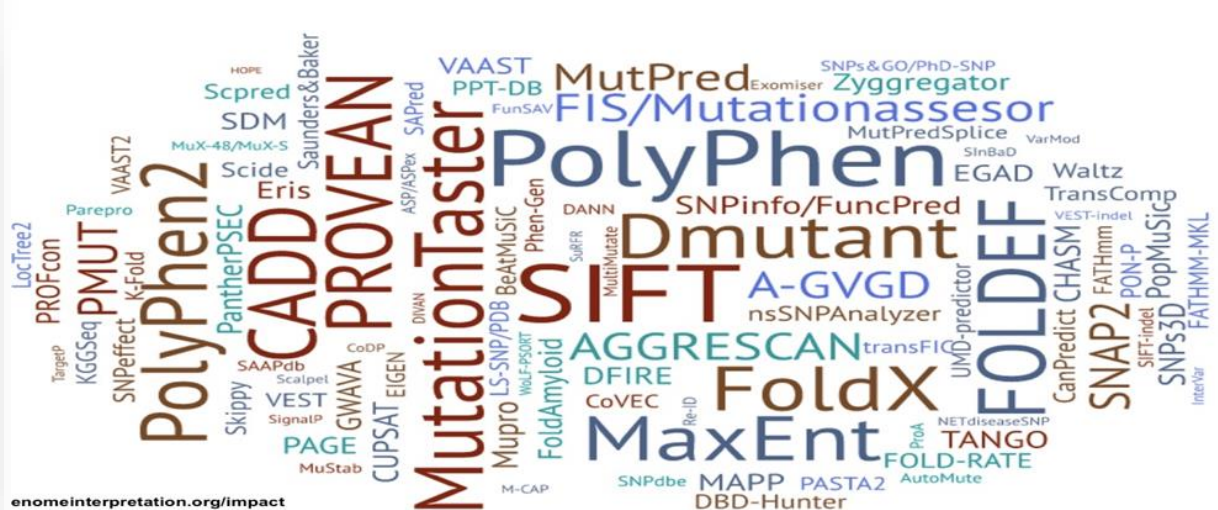
Leiden Open Variation Database

<http://www.lovd.nl>

DECIPHER

<http://decipher.sanger.ac.uk>

PROGRAMY PREDYKCYJNE DO OCENY WARIANTÓW



PIŚMIENNICTWO

BAZY DANYCH – UMOŻLIWIAJĄCE WYTYPOWANIE GENÓW NA PODSTAWIE FENOTYPU

POTOK ANALIZY DANYCH (*pipeline*)

BAZY DANYCH – UMOŻLIWIAJĄCE WYTYPOWANIE GENU NA PODSTAWIE FENOTYPU

Menu. ▾ Support the Phenomizer. Help.

Features. Diseases. **Ontology.**

Algorithm: resnik (Unsymmetric). 1 Feature.

☐	p-value. ▲	Disease Id.	Disease name.	Genes.
☐	0.0055	OMIM:250700	250700 METHEMOGLOBIN REDUCTASE DEFICIENCY;;NADP...	
☐	0.2457	OMIM:247420	LUTHERAN NULL	
☐	0.3744	OMIM:102700	SEVERE COMBINED IMMUNODEFICIENCY, AUTOSOMAL RE...	ADA (100)
☐	0.3744	OMIM:613489	#613489 CONGENITAL DISORDER OF GLYCOSYLATION, T...	COG4 (25839)
☐	0.3744	OMIM:254700	MYELOPROLIFERATIVE DISEASE, AUTOSOMAL RECESSIVE	
☐	0.3744	OMIM:615118	%615118 CRANIOMETADIAPHYSEAL DYSPLASIA; CRMDD	
☐	0.3744	OMIM:214900	CHOLESTASIS-LYPHEDEMA SYNDROME	
☐	0.3744	OMIM:613812	#613812 BILE ACID SYNTHESIS DEFECT, CONGENITAL, 3; ...	CYP7B1 (9420)
☐	0.3744	OMIM:614749	#614749 HYPERPHOSPHATASIA WITH MENTAL RETARDA...	PIGO (84720),...
☐	0.3744	OMIM:146300	HYPOPHOSPHATASIA, ADULT	ALPL (249)
☐	0.3744	OMIM:614097	#614097 ACATALASEMIA;;ACATALASIA;;CATALASE DEFI...	CAT (847)
☒	0.3744	OMIM:610968	#610968 OSTEOGENESIS IMPERFECTA, TYPE XI; OI11;;OI, ...	PPIB (5479), S...
☐	0.3744	OMIM:605479	CHOLESTASIS, BENIGN RECURRENT INTRAHEPATIC, 2; BRI...	ABCB11 (8647)
☐	0.3744	OMIM:239100	#239100 HYPEROSTOSIS CORTICALIS GENERALISATA;;V...	SOST (50964),...
☐	0.3744	OMIM:614207	#614207 HYPERPHOSPHATASIA WITH MENTAL RETARDA...	PIGO (84720),...
☐	0.3744	OMIM:242880	IMMUNOERYTHROMYELOID HYPOPLASIA	
☐	0.3744	OMIM:259700	#259700 OSTEOPETROSIS, AUTOSOMAL RECESSIVE 1; O...	CLCN7 (1186),...
☐	0.3744	OMIM:615198	%615198 OSTEOSCLEROTIC METAPHYSEAL DYSPLASIA;...	

Modifier. Num diseases.

observed. 5 of 7994

observed. 5 of 7994

Abnormality of metabolism/homeostasis

- 5-oxoprolinase deficiency
- Abnormal enzyme/coenzyme
- Abnormal aldolase level
 - Elevated aldolase level
 - Reduced aldolase level
- Abnormal erythrocyte enzyme
- Abnormal lactate dehydrogenase
- Abnormality of alkaline phosphatase
 - Platelet-activating factor ac
 - Reduced carnitine O-palmit
 - Reduced catalase activity
- Abnormal homeostasis
- Abnormal sweat homeostasis

Im lepszy opis kliniczny , najlepiej wykorzystujący pojęcia zdefiniowane w słowniku ontologicznym, a więc całkowicie jednoznaczne, tym szansa na sukces diagnostyczny większa.



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska



Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny

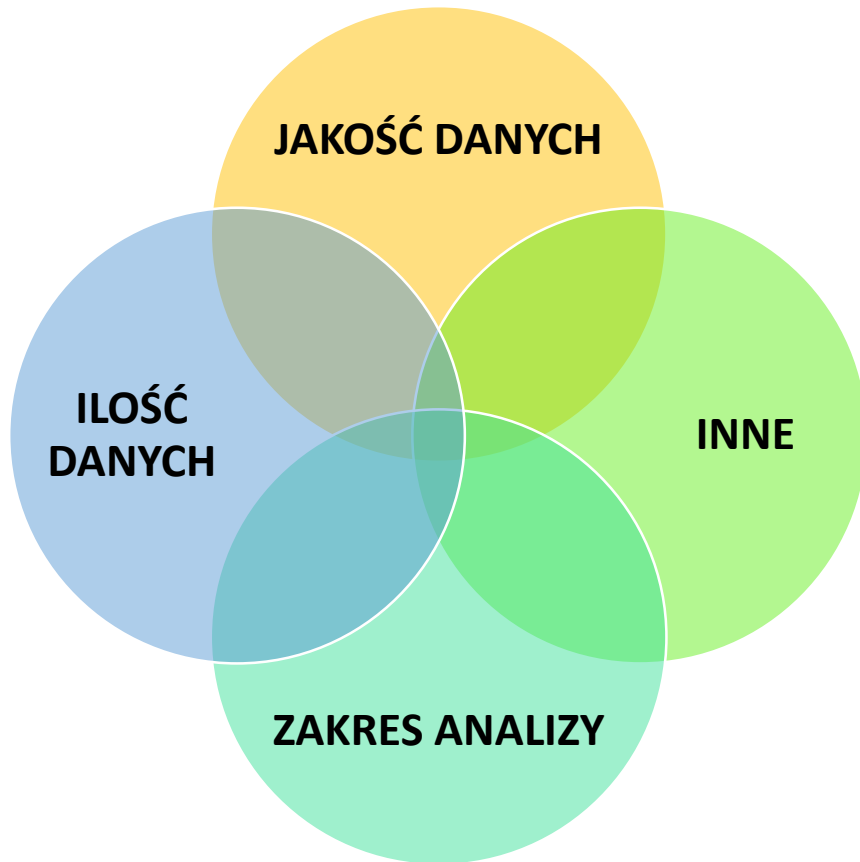


edu-metgen.imid.med.pl

KAMIEŃ MIŁOŚCI DZIĘKI NGS

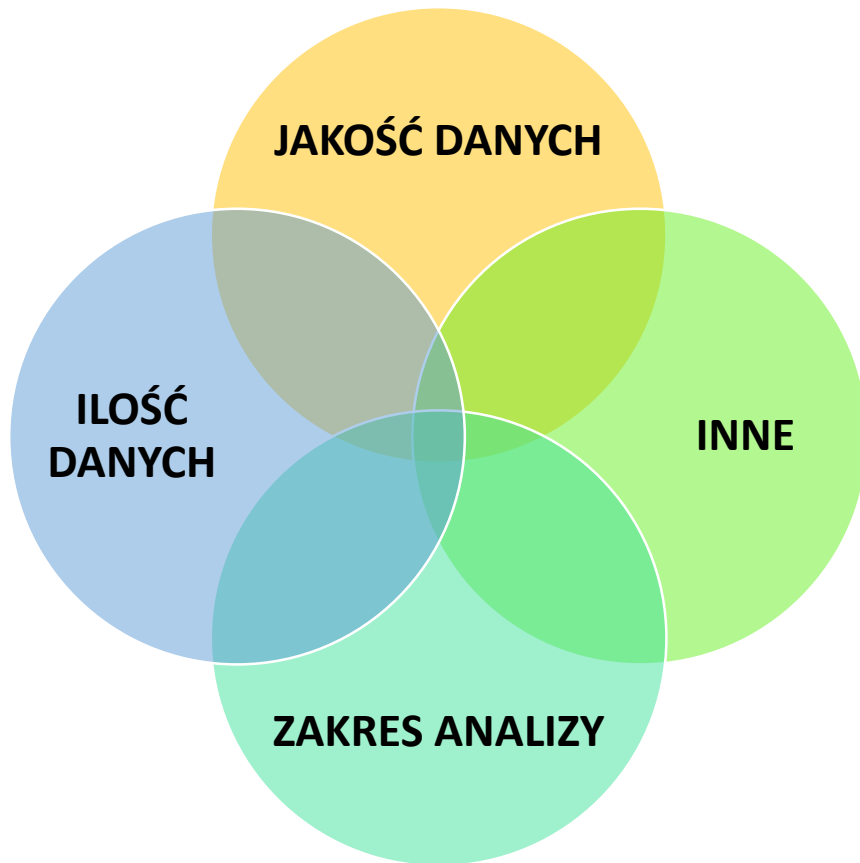
- **BADANIA GENETYCZNE NA POCZĄTKU PROCESU DIAGNOSTYCZNEGO: SKRÓCENIE ODYSEI DIAGNOSTYCZNEJ**
- **IDENTYFIKACJA NOWYCH WARIANTÓW PATOGENNYCH W GENACH NIE KORELOWANYCH WCZEŚNIEJ Z CHOROBA**
- **RÓŻNICOWANIE HETEROGENNYCH JEDNOSTEK CHOROBOWYCH**
- **ODKRYWANIE NOWEGO SPECTRUM FENOTYPOWEGO**
- **MOŻLIWOŚĆ LECZENIA**
- **MUTACJE DE NOVO ODGRYWAJĄ PROMIENIOWĄ ROLĘ W PATOGENIEZIE CHOROÓB RZADKICH**
- **MUTACJE W UKŁADZIE MOZAIKOWYM STANOWIĄ ZNACZNĄ GRUPĘ ZMIAN W CHOROBAH RZADKICH**
- **NOWE DANE DOTYCZĄCE DZIEDZICZENIA DIGENICZNEGO / POLIGENICZNEGO**
- **WYSTĘPOWANIE DWÓCH LUB WIĘCEJ CHOROÓB DZIEDZICZNYCH U POJEDYNCZEGO PACJENTA JAKO PRZYCZYNA NIETYPOWEGO FENOTYPU**
- **ONKOLOGIA: IDENTYFIKACJA NOWYCH MUTACJI W TKANCE NOWOTWOROWEJ (NP. PUNKTOWYCH, REARANŻACJI GENOWYCH I INNYCH), ZWIĘKSZENIE CZUŁOŚCI ANALIZ MATERIAŁU HETEROGENNEGO, RÓŻNICOWANIE I KLASYFIKACJA, NOWOTWORÓW, MONITOROWANIE PROCESU LECZENIA**

PROBLEMY I WYZWANIA



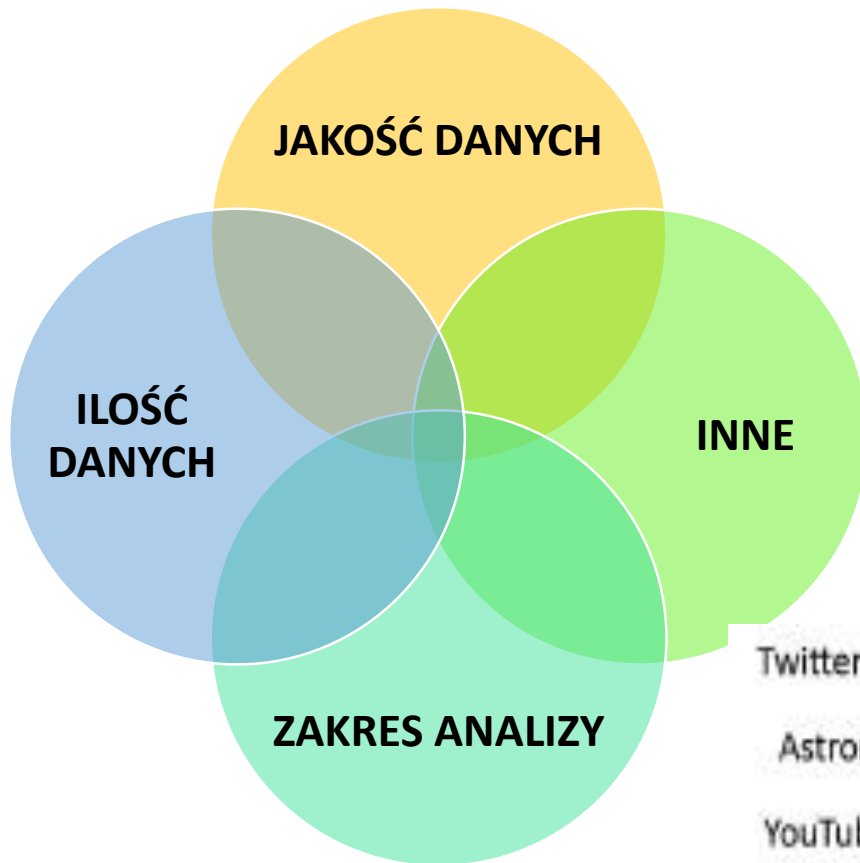
- **pokrycie <100%,**
 - **błędne mapowanie krótkich odczytów,**
 - **błędy sekwencjonowania,**
 - **ustawienia programów**
(np. raportowanie wariantów intronowych do +/- 10 nukleotydów za złączem ekson-intron)
- czy analiza obejmuje fragmenty intronowe/regulatorowe, rozległe rearanżacje,
 - UWAGA na mutacje dynamiczne oraz warianty somatyczne

PROBLEMY I WYZWANIA

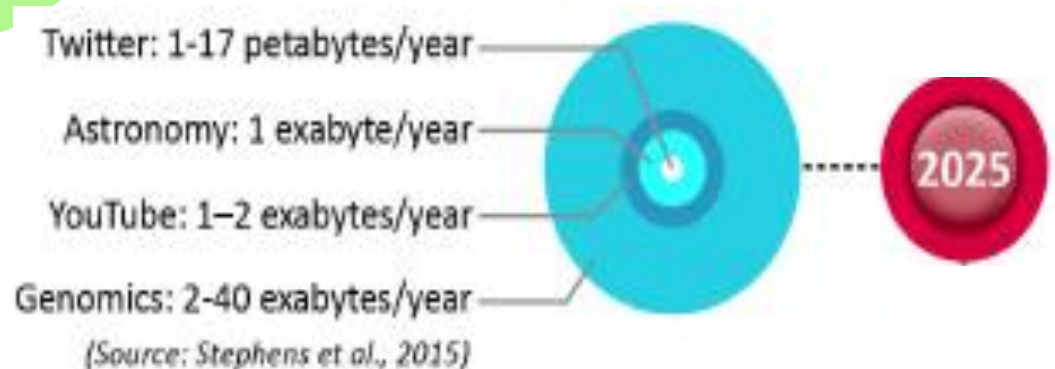


- **brak standardów dotyczących analizy danych**
(każde laboratorium ma swój potok analizy)
- **ograniczenia bazodanowe**
(np. różne listy genów dla tych samych jednostek chorobowych)
- **ocena patogenności wariantów**
- **problemy etyczne**
(m.in. „secondary findings”)
- **raportowanie wyników**
(które wyniki i w jakim kontekście powinny zostać przekazane pacjentowi), sposób przekazywania wyników pacjentowi
- **Problem udostępniania danych**
(część badań wykonywanych jest w ramach analiz naukowych, bazy danych)

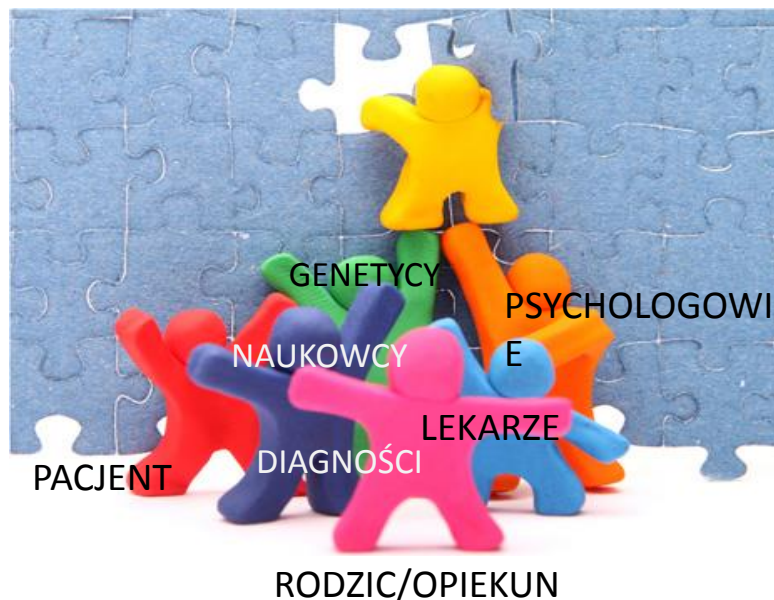
PROBLEMY I WYZWANIA



- Problem przechowywania i ochrony danych



Współpraca!!!!!!



Era genomiki

- identyfikacja dużej liczby genów i mutacji
- „big data”
- wyodrębnienie prawdziwych mutacji patogennych z „genomic noise”
- kryteria oceny patogenności identyfikowanych wariantów

Era medycyny spersonalizowanej

- opracowanie terapii w oparciu o dane genetyczne
- powszechny dostęp do badań genetycznych
- dane genetyczne potrzebne do podejmowania decyzji terapeutycznych

2000 Opublikowanie Genomu Ludzkiego

2010

2020