



GENETYKA DLA NIE-GENETYKÓW

„OMIKA” NOWA DZIEDZINA DIAGNOSTYCZNA

Nie tylko choroby rzadkie.

„Choroby genetycznie uwarunkowane – edukacja i diagnostyka”
Program Operacyjny Wiedza Edukacja Rozwój – 2019 - 2021

Neurogenetyka molekularna

dr hab. Dorota Hoffman-Zacharska prof. IMiD
Zakład Genetyki Medycznej IMiD



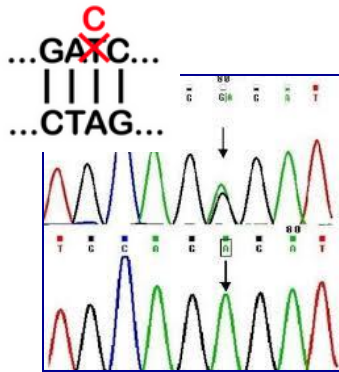
„Choroby genetycznie uwarunkowane – edukacja i diagnostyka”
Program Operacyjny Wiedza Edukacja Rozwój – 2019 - 2021

Choroby neurogenetyczne

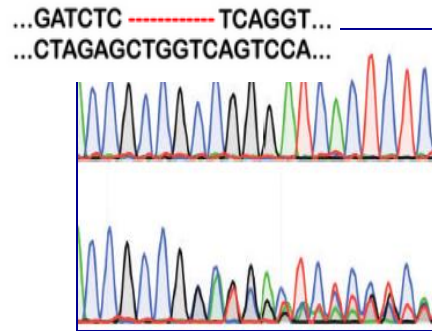
Jednostki chorobowe, charakteryzujące się udziałem czynnika/czynników genetycznych w zaburzeniach formowania lub funkcjonowania układu nerwowego

***Typ I* - wynik zaburzenia prawidłowej ekspresji genu w neuroektodermie**

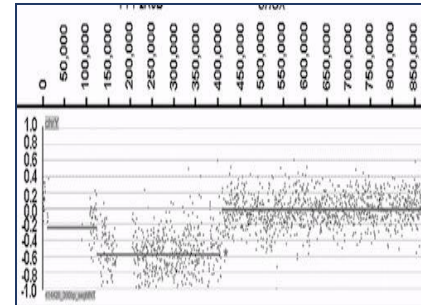
***Typ II* - charakter neurologiczny choroby jest powodowany pośrednio przez defekt genu nie ulegającego ekspresji w tkance nerwowej**



mutacje punktowe



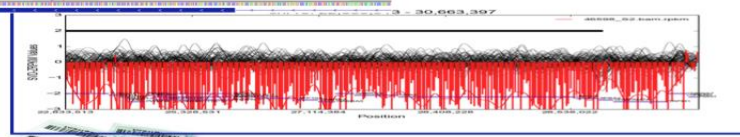
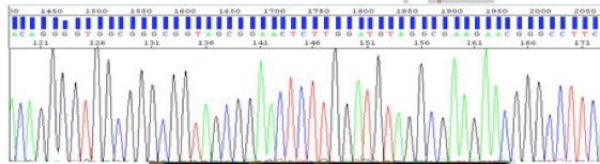
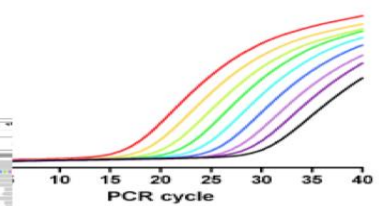
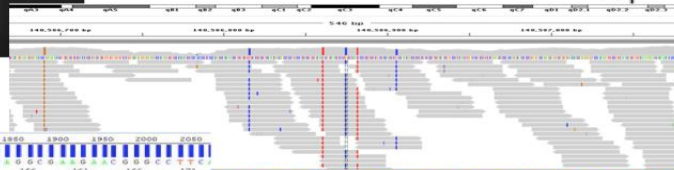
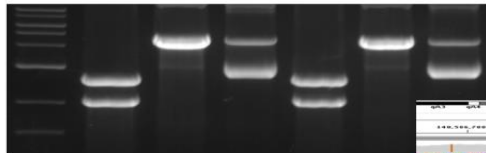
Indels
(insercje/delecje
do 100 pz)



CNV
(warianty strukturalne
>100 pz do Mpz)



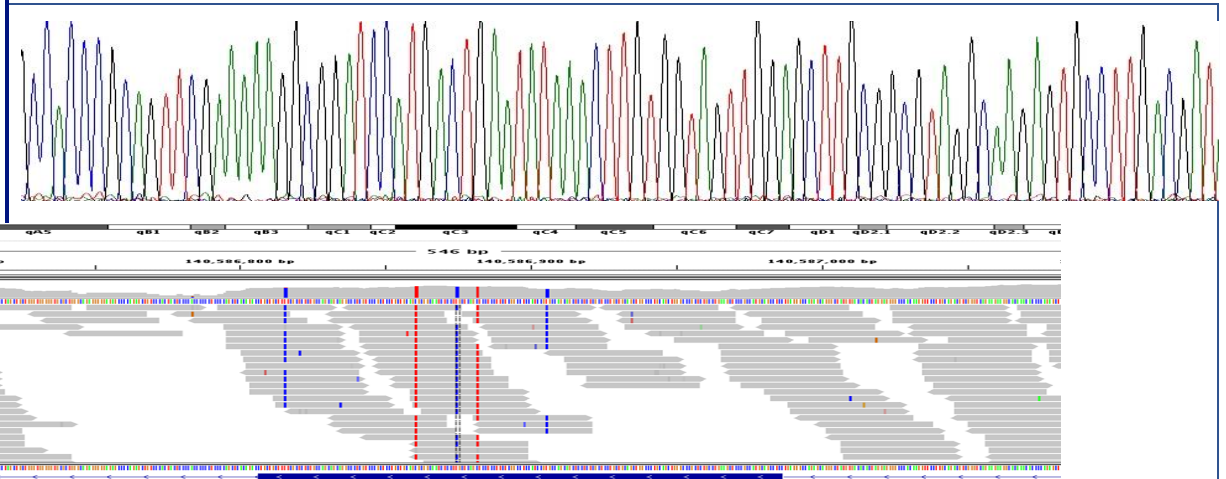
Aberracje
Chromosomowe
(zmiana struktury
lub liczby chromosomów)



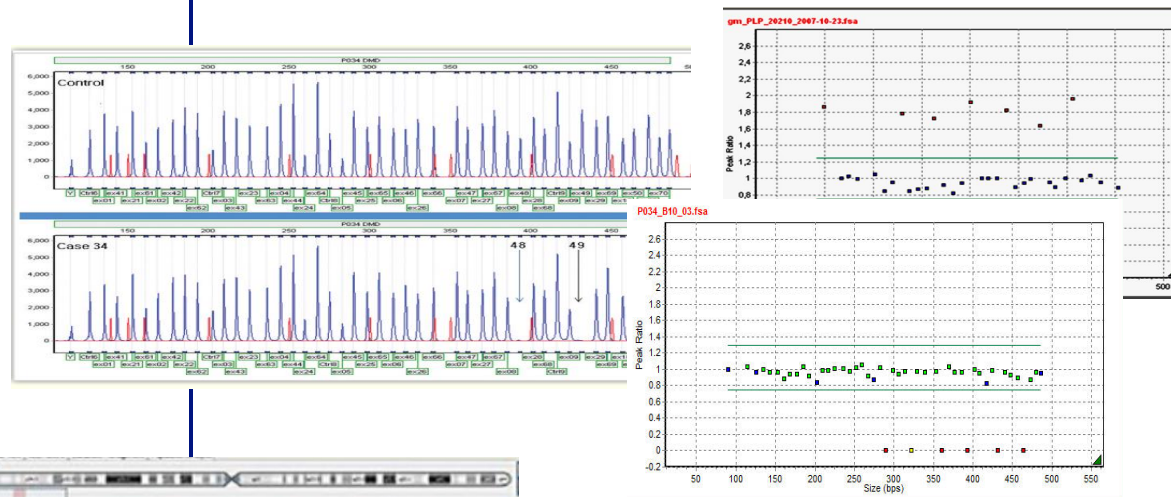
>1Mpz

SEKWENCJONOWANIE

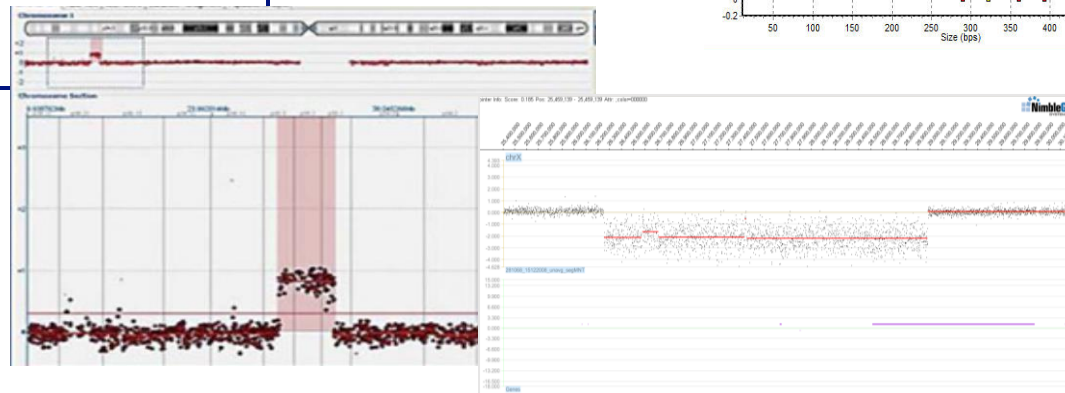
- metoda Sangera
- NGS



MLPA



aCGH

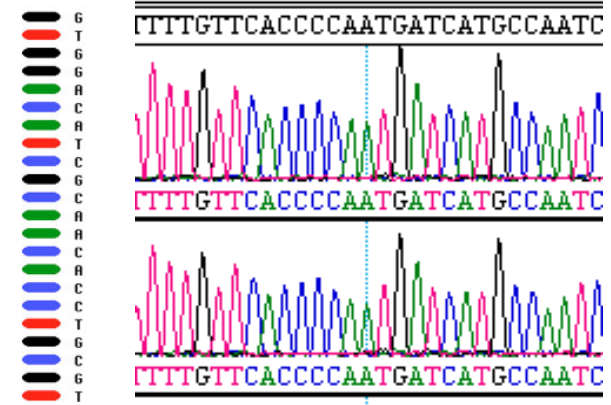


Sanger

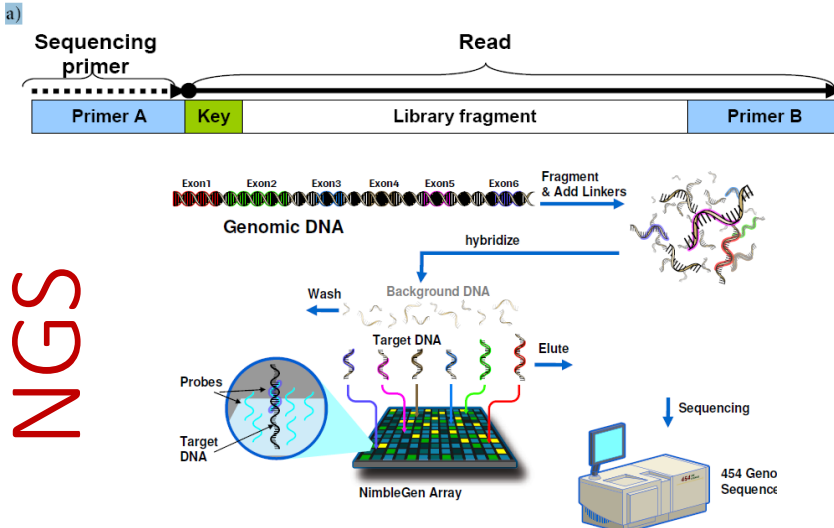


A large, light-colored laboratory instrument, likely a spectrophotometer or analyzer, with a sample compartment and control panel. It is situated on a green speckled countertop in a laboratory setting.

Analiza danych

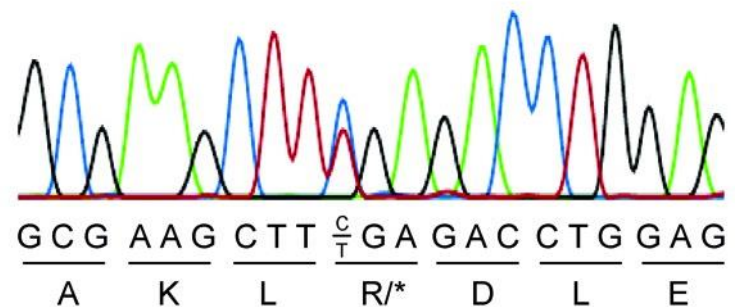
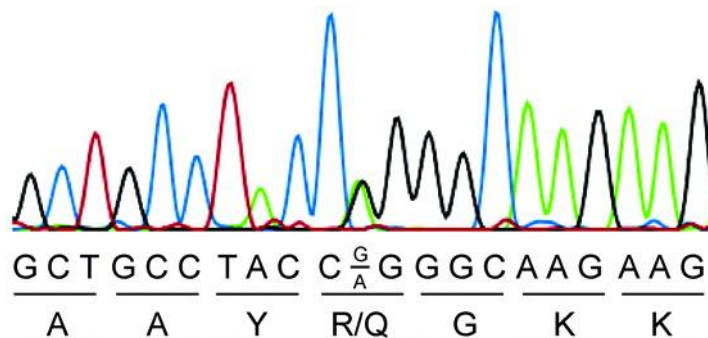


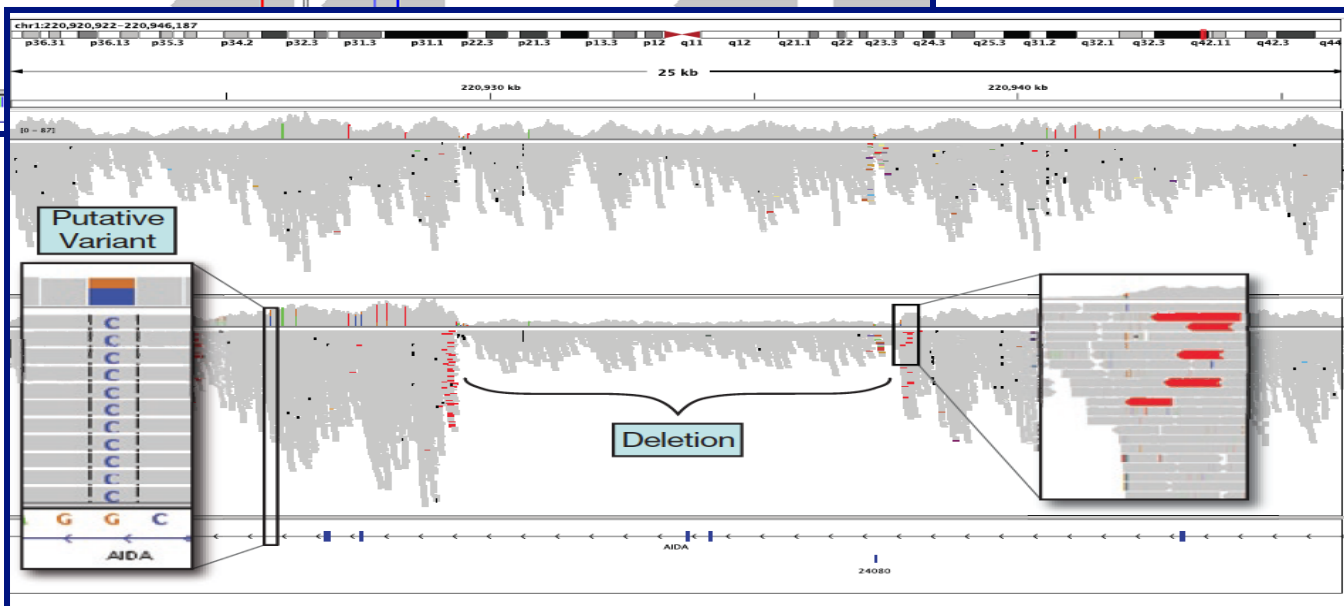
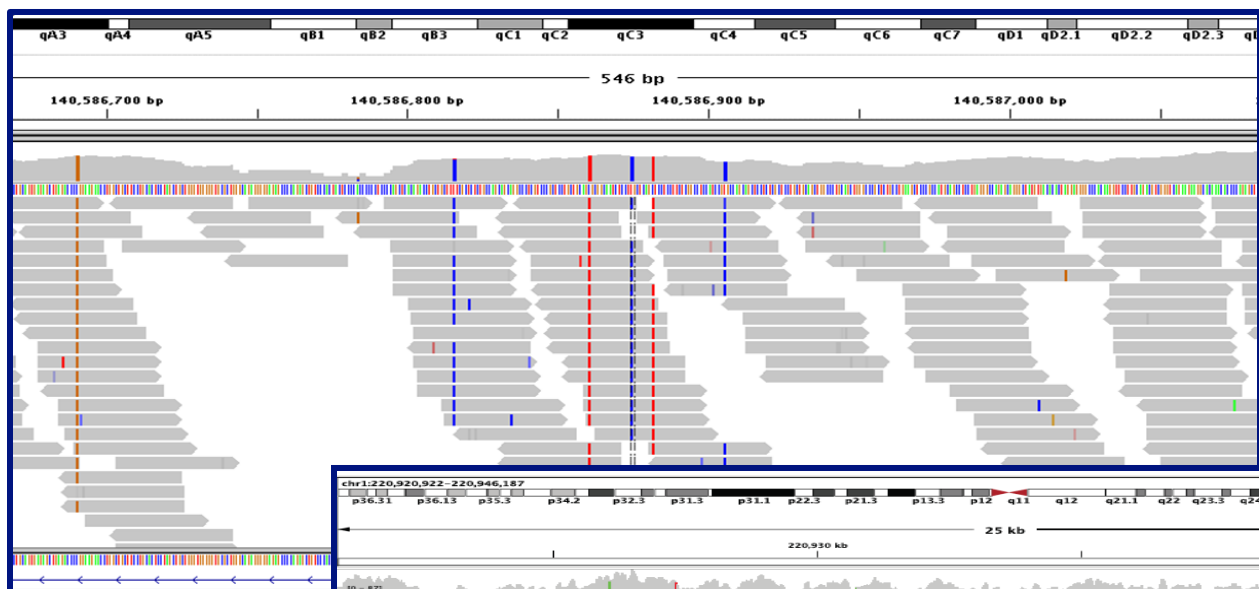
SGN

[illegible]

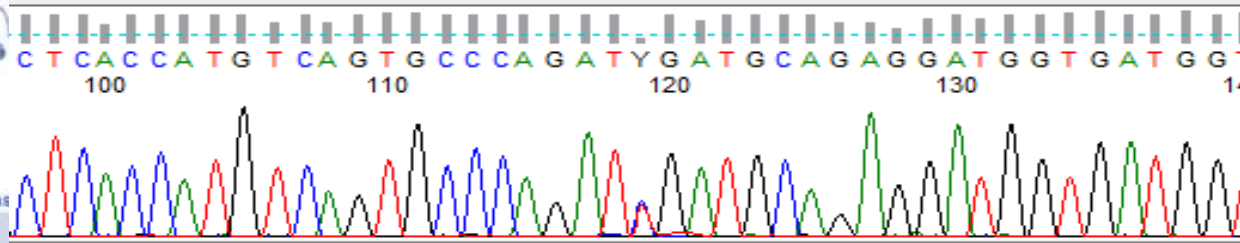
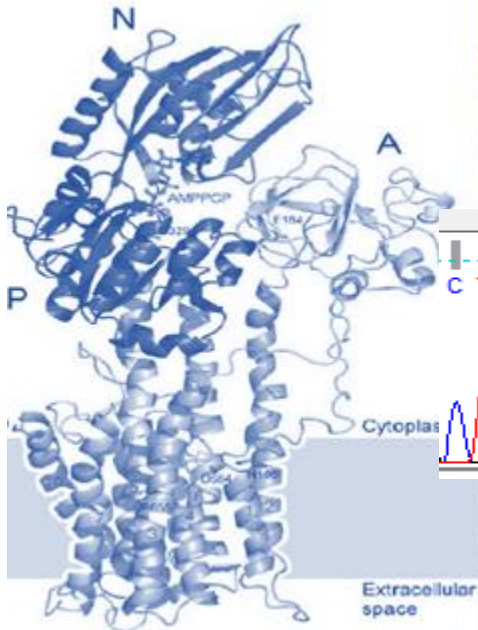
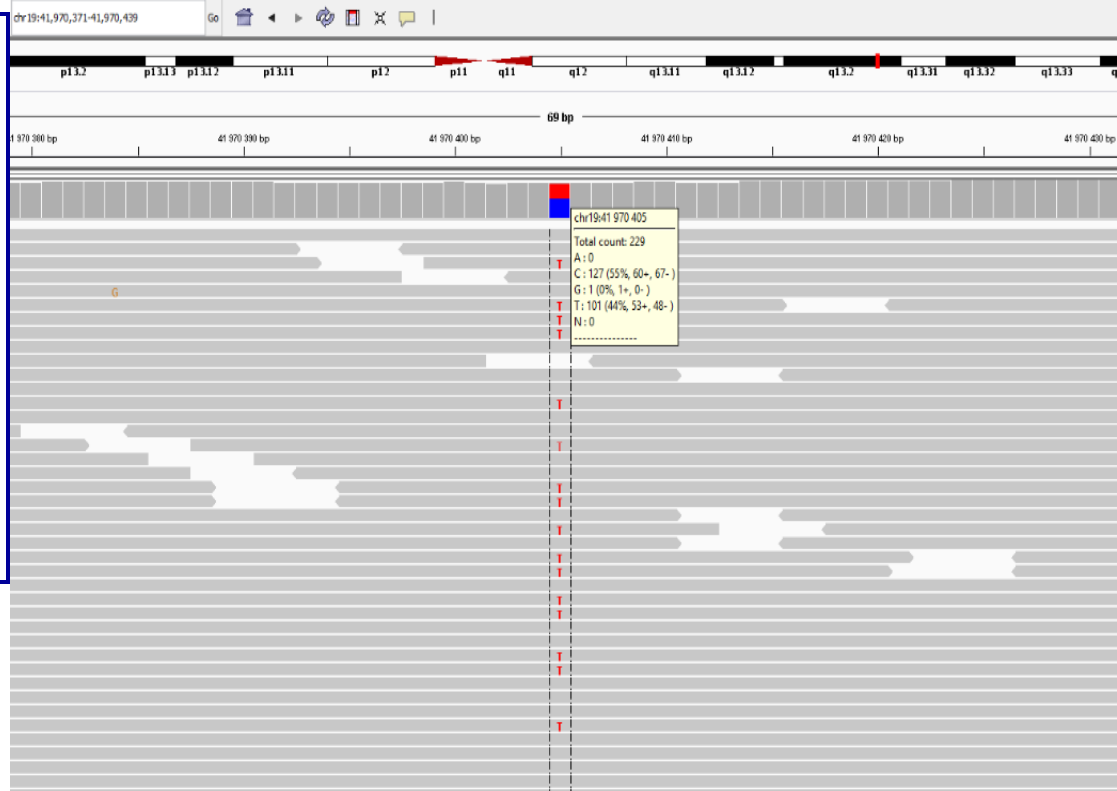
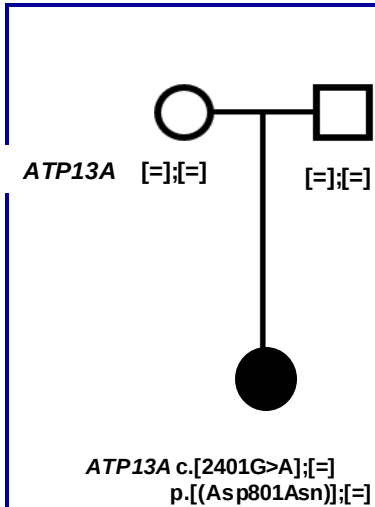
CTCCCACCCCCCTTCAGCTGGCAGCCAAGGAGGCGAAGCTTTGAGACCTGGAGGACTCACTGGCCCGT

CCTCAGCTGGCAGCCAAGGAGCGGAAGCTTTGAGACCTGGAGGACTCACT
CCTCAGCTGGCAGCCAAGGAGCGGAAGCTTTGAGACCTGGAGGACTCACT
CCTCAGCTGGCAGCCAAGGAGCGGAAGCTTTGAGACCTGGAGGACTCACT
CCTCAGCTGGCAGCCAAGGAGCGGAAGCTTTGAGACCTGGAGGACTCACT
CCTCAGCTGGCAGCCAAGGAGCGGAAGCTTTGAGACCTGGAGGACTCACT
CCTCAGCTGGCAGCCAAGGAGCGGAAGCTTTGAGACCTGGAGGACTCACT
CCTCAGCTGGCAGCCAAGGAGCGGAAGCTTTGAGACCTGGAGGACTCACT
CCTCAGCTGGCAGCCAAGGAGCGGAAGCTTTGAGACCTGGAGGACTCACT
CCTCAGCTGGCAGCCAAGGAGCGGAAGCTTTGAGACCTGGAGGACTCACT
CCTCAGCTGGCAGCCAAGGAGCGGAAGCTTTGAGACCTGGAGGACTCACT
CCTCAGCTGGCAGCCAAGGAGCGGAAGCTTTGAGACCTGGAGGACTCACT
CCTCAGCTGGCAGCCAAGGAGCGGAAGCTTTGAGACCTGGAGGACTCACT
CCTCAGCTGGCAGCCAAGGAGCGGAAGCTTTGAGACCTGGAGGACTCACT
CCTCAGCTGGCAGCCAAGGAGCGGAAGCTTTGAGACCTGGAGGACTCACT
CCTCAGCTGGCAGCCAAGGAGCGGAAGCTTTGAGACCTGGAGGACTCACT
TTCAGCTGGCAGCCAAGGAGCGGAAGCTTCGAGACCTGGAGGACTCACTG
TCAGCTGGCAGCCAAGGAGCGGAAGCTTCGAGACCTGGAGGACTCACTGG
TCAGCTGGCAGCCAAGGAGCGGAAGCTTCGAGACCTGGAGGACTCACTGG
TCAGCTGGCAGCCAAGGAGCGGAAGCTTCGAGACCTGGAGGACTCACTGG
TCAGCTGGCAGCCAAGGAGCGGAAGCTTCGAGACCTGGAGGACTCACTGG
TCAGCTGGCAGCCAAGGAGCGGAAGCTTCGAGACCTGGAGGACTCACTGG



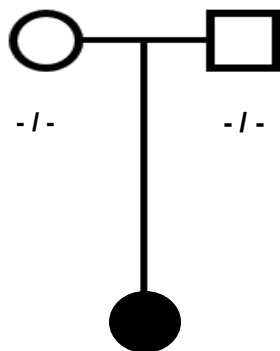


Naprzemienne porażenie dziecięce typ2

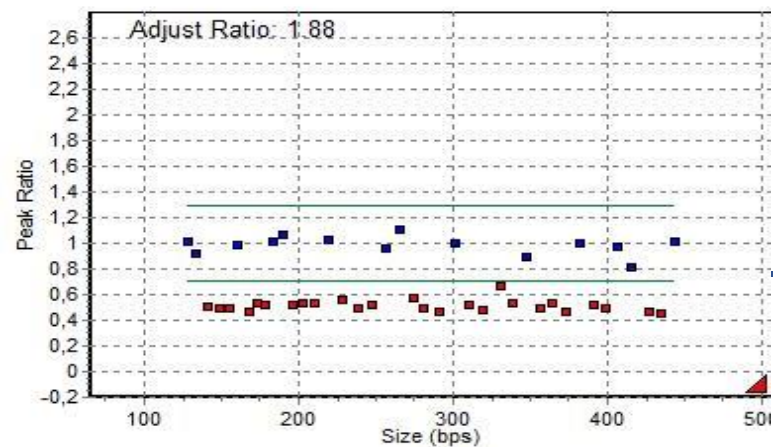
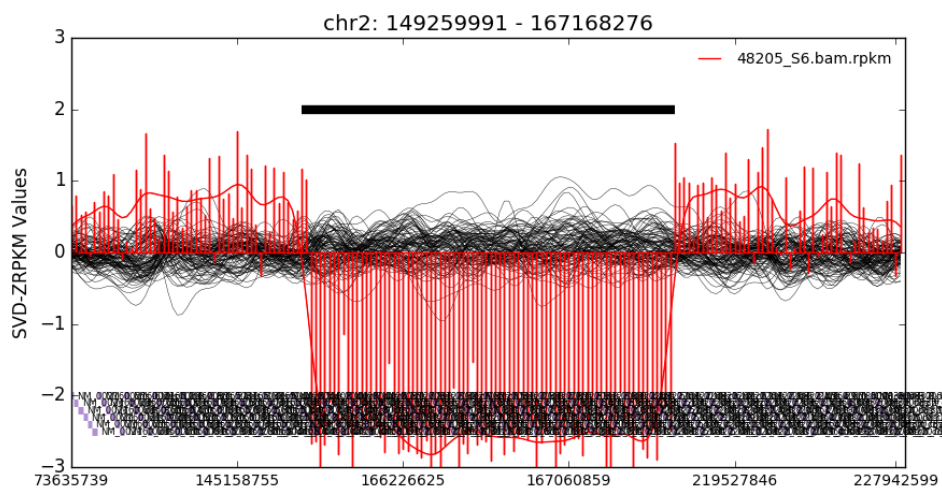
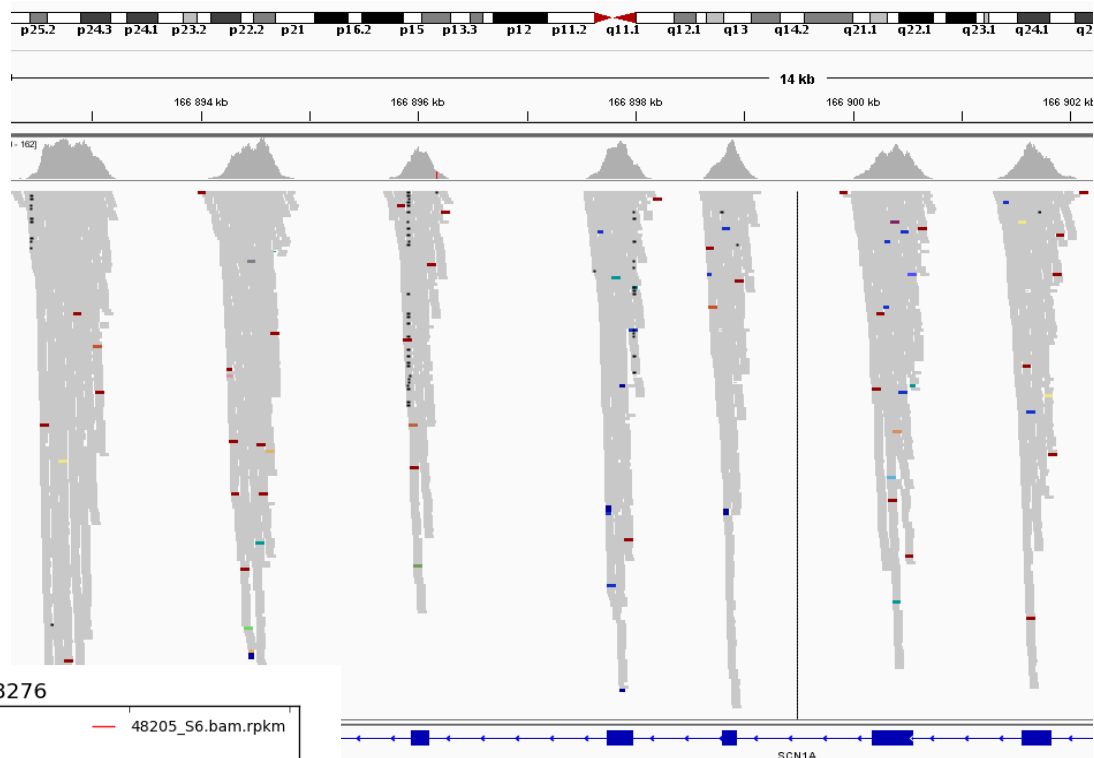


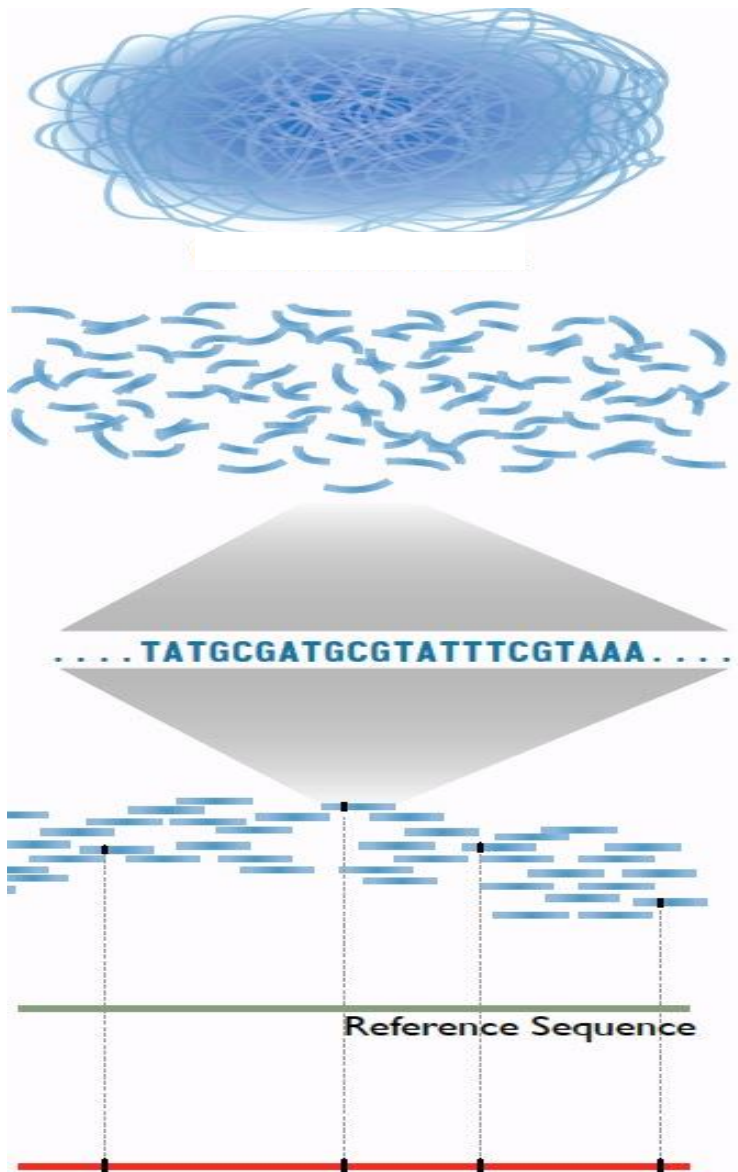
ATP13A c.2401G>A, p.Asp801Asn

Encefalopatia Padaczkowa - Zespół Dravet



SCN1A Ex 1_26 del / -





DNA genomowy pacjenta

fragmentacja

**odczyt sekwencji
milionów fragmentów**

**uliniowienie odczytów
(przrównanie do sekwencji referencyjnej)**

**identyfikacja wariantów sekwencji
odbiegających od sekwencji referencyjnej**

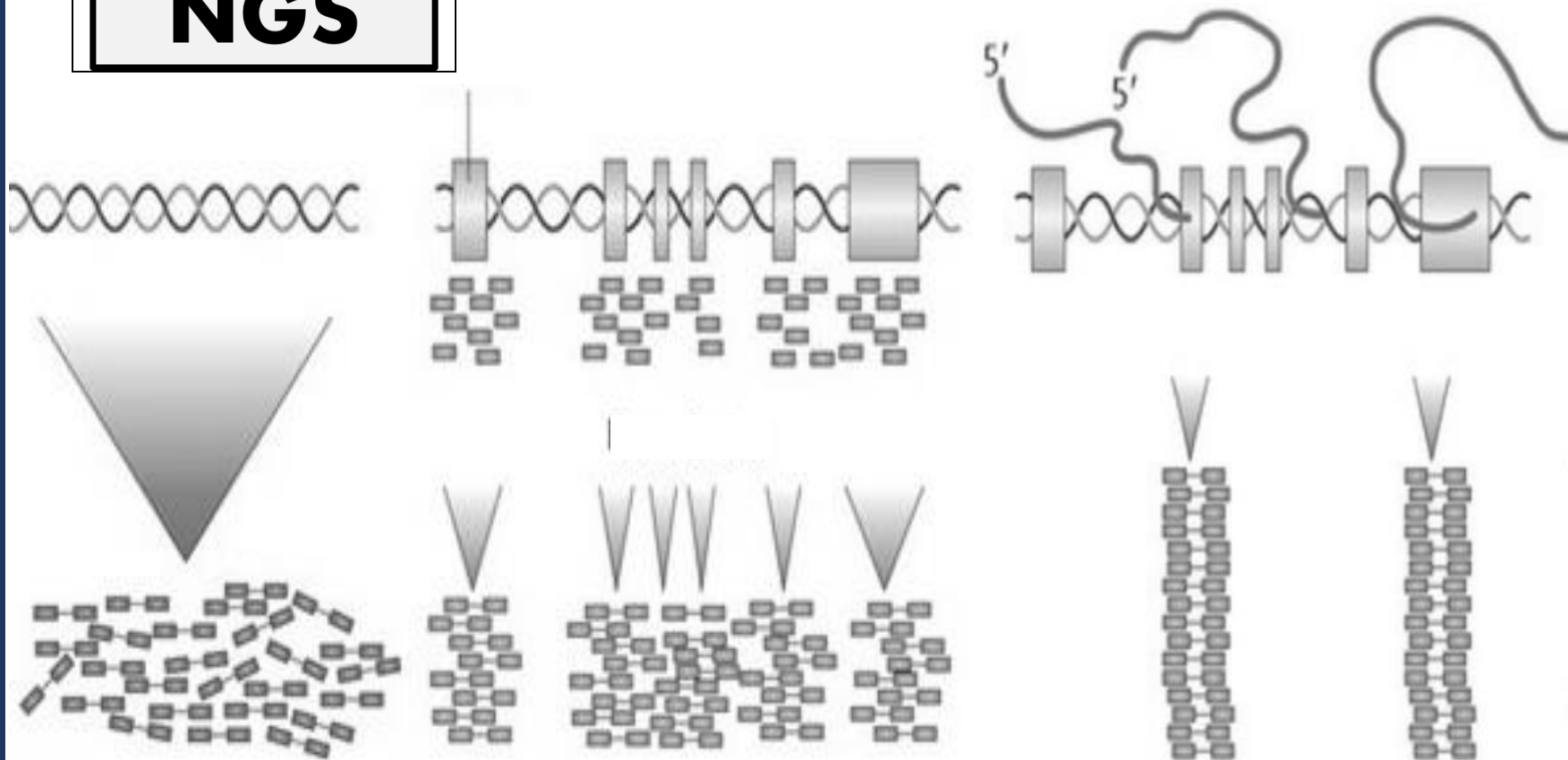
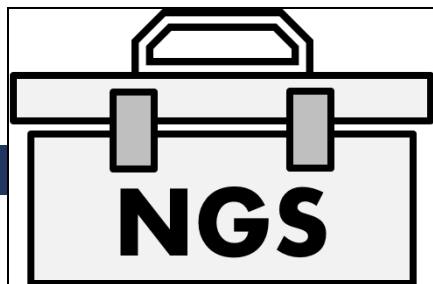


„...aby zrozumieć organizm człowieka w zdrowiu i chorobie, musimy zrozumieć wszystkie typy jego wariantów genomowych – w sumie ~ 4 000 000 wariantów ...”

Jeżeli porównamy genomy 2 osób to różnice między nimi są niewielkie – 99.9% zgodności

Genom to około 3.2×10^9 bp – różnica 0.1% to i tak kilka milionów zasad

Sekwencjonowanie Następnej Generacji (Next Generation Sequencing – NGS)

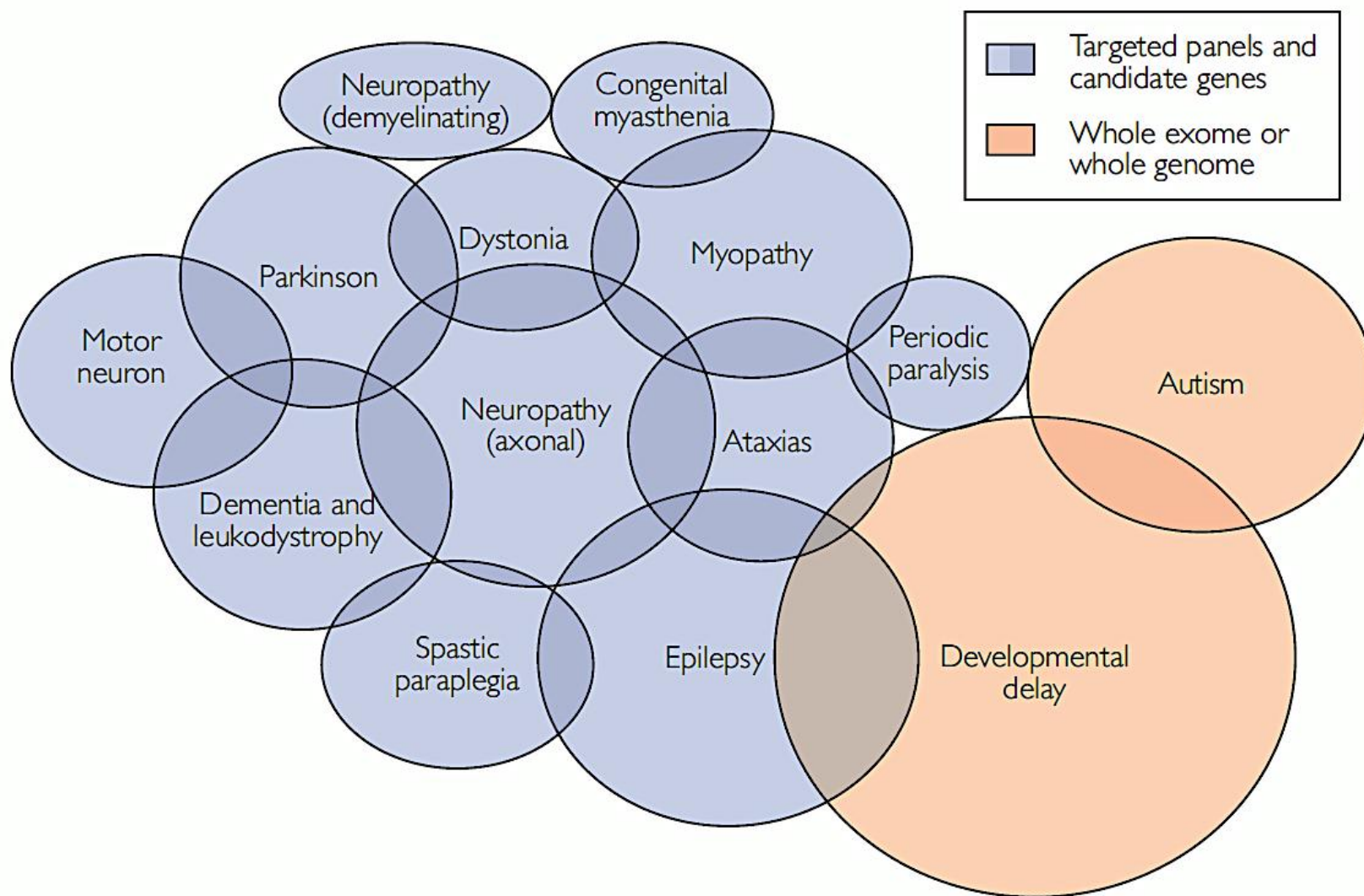


Genom

**Eksom
(1% genomu)**

Panel

Testy genetyczne w odniesieniu do różnych chorób neurogenetycznych o dziedziczeniu mendlowskim



Mutacje

– zmiany w sekwencji DNA organizmu spowodowane działaniem czynników chemicznych, fizycznych (mutacje indukowane) lub błędami w replikacji DNA (mutacje spontaniczne)

Zmiany w DNA mają początkowo charakter premutacyjny, jeżeli nie zostaną usunięte w procesach naprawczych mogą prowadzić do zmian mutacyjnych utrwalonych w kolejnych rundach replikacyjnych.

mutacje somatyczne

mutacje germinalne

Mutacje punktowe - w otwartej ramce odczytu

DNA ATG.....GTT **AAG** GCT GCT
Biał. Met.....Val **Lys** Ala Ala

Zamiana nukleotydów

- Mutacja zmiany sensu missense
- Mutacja typu nonsense
- Mutacja bez zmiany sensu

DNA ATG..... GTT **GAG** GCT GCT
Biał. Met.....Val **Glu** Ala Ala

DNA ATG..... GTT **TAG** GCT GCT
Biał. Met.....Val **Stop**

DNA ATG..... GTT **AAA** GCT GCT
Biał. Met.....Val **Lys** Ala Ala

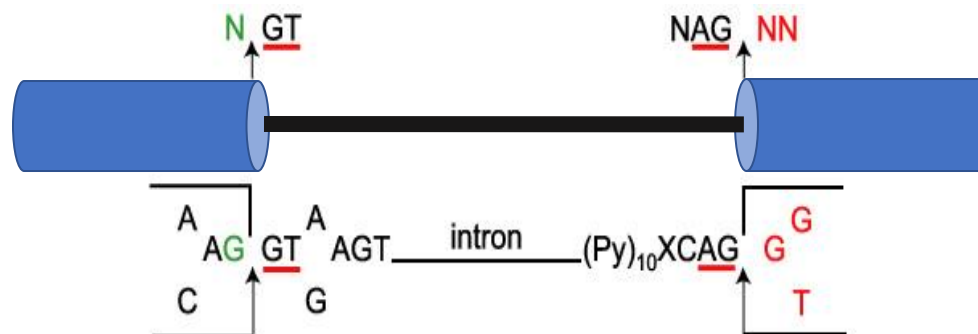
Zmiana ramki odczytu

- Delecja
- Insercja (duplikacja)

DNA ATG.....GTT **GGC TGC T**
Biał. Met.....Val **Gly Cys**

DNA ATG.....GTT **AAA GGC TGC T**
Biał. Met.....Val **Lys Gly Cys**

Mutacje splicingowe

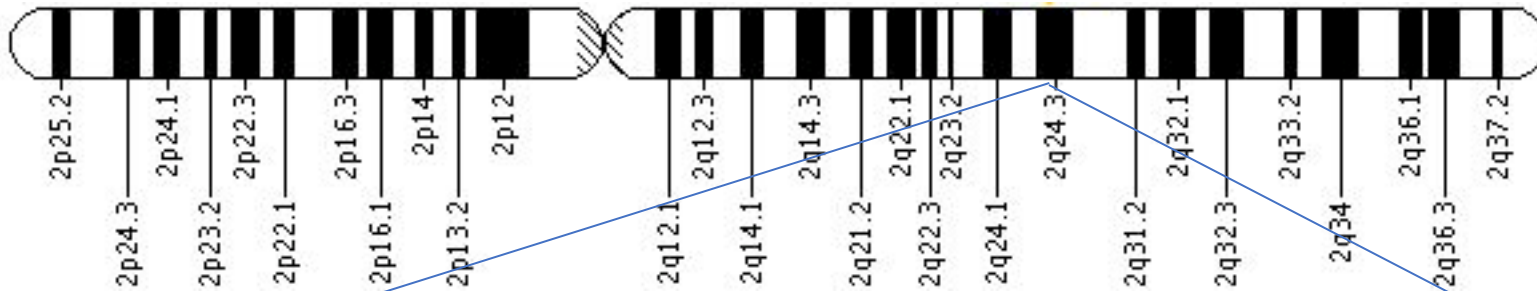


ekson skipping

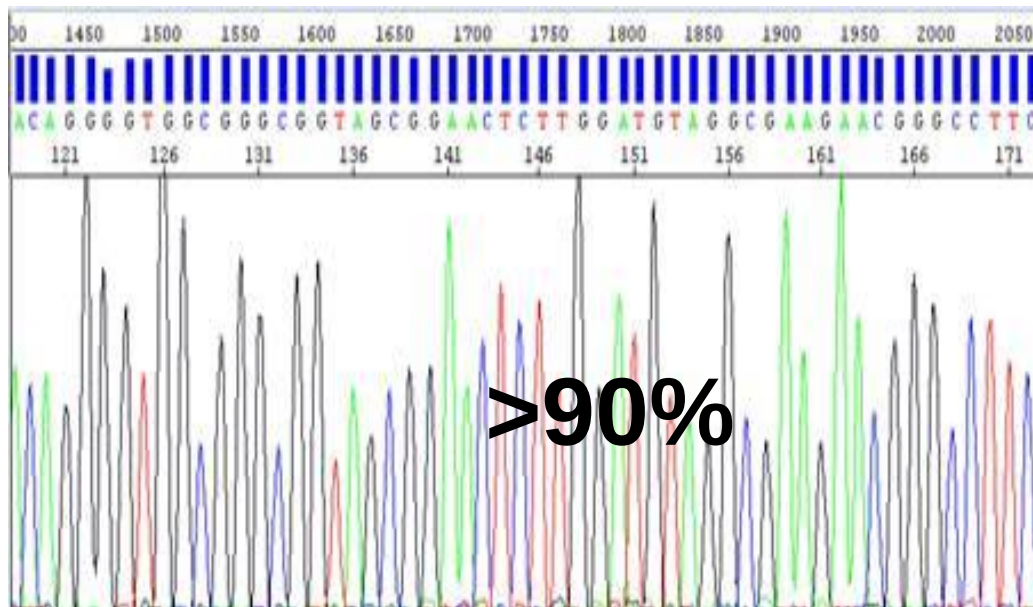


alternatywne
miejsca splicingowe

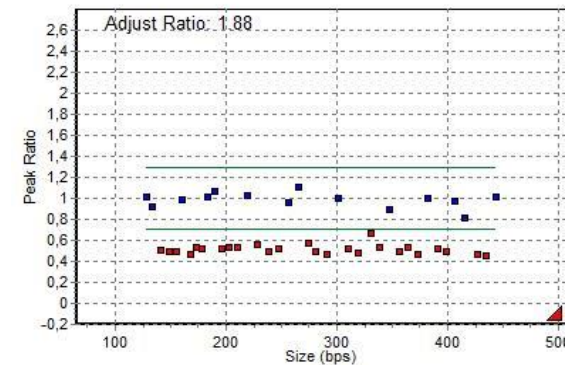




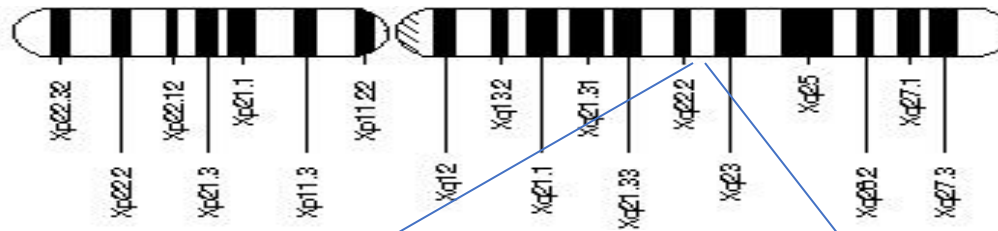
Gen *SCN1A* (MIM ID *182389); locus 2q24



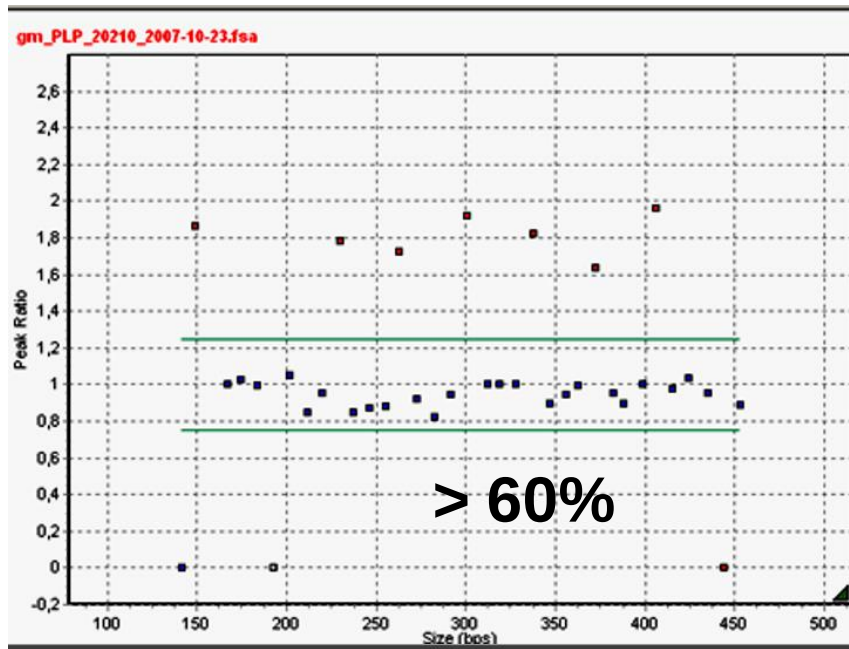
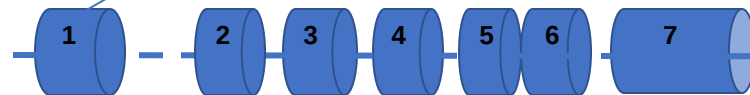
mutacje punktowe



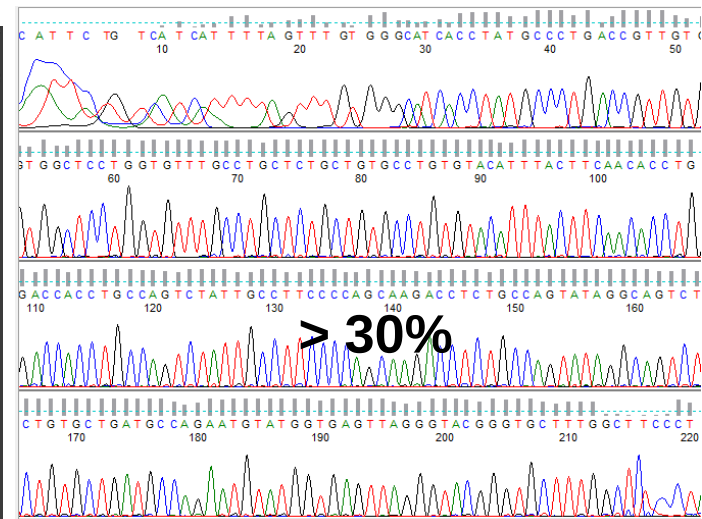
delecje/duplikacje



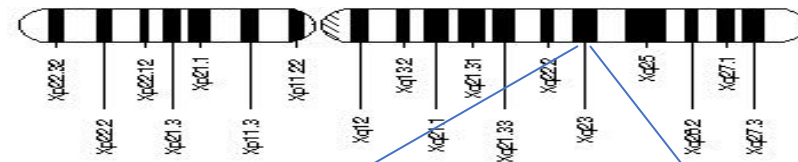
Gen PLP1 locus Xq22.2



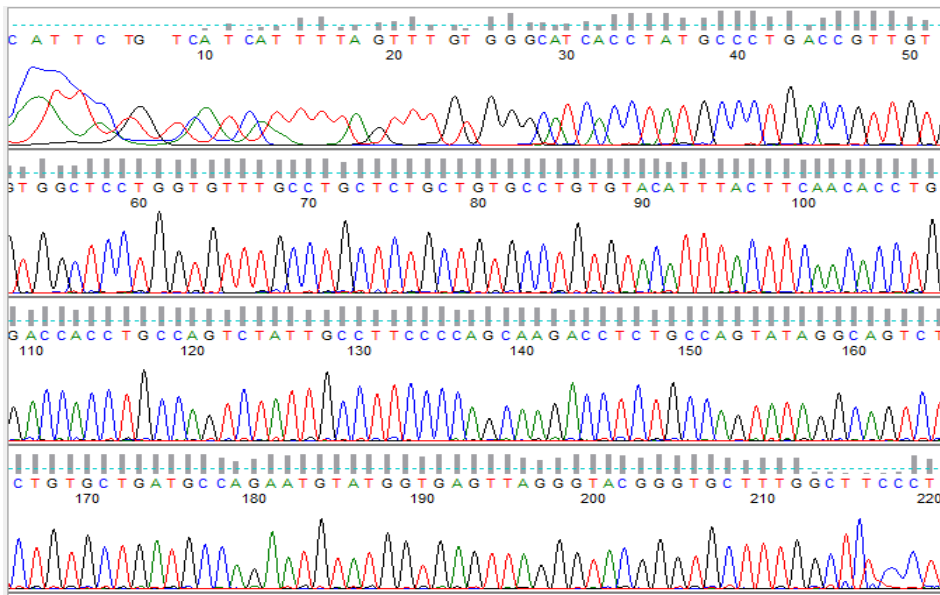
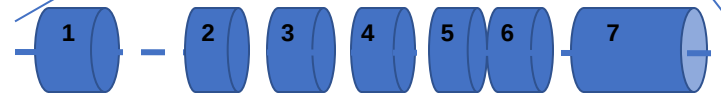
delecje/duplikacje



mutacje punktowe



Gen *PLP1* (MIM ID *300401); locus Xq22.2



mutacje punktowe

AR

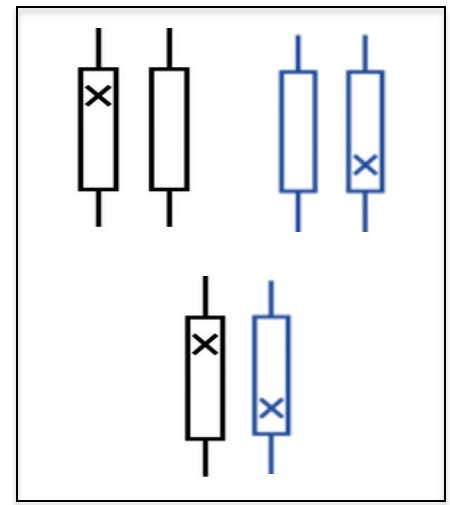
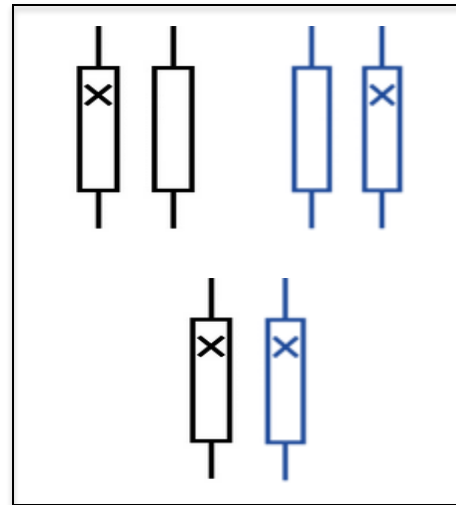
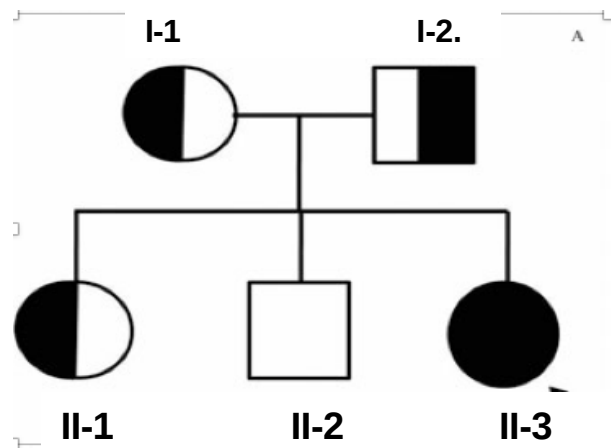
Genetic Analysis of PARK2 Variants

Top Panel: Schematic of chromosome 1 showing the location of the PARK2 gene on the short arm (p12-p13).

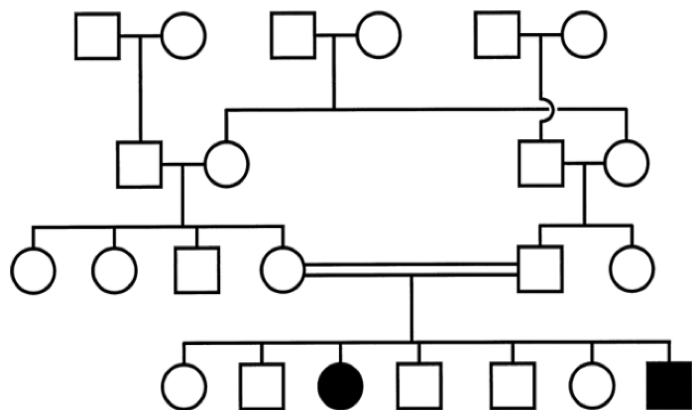
Middle Panel: Sanger sequencing chromatogram showing a G to T transition at position 235, resulting in a Glu79STOP mutation. The chromatogram shows the sequence: G G A G A A A G G T C A A T G A A T G C A A C T G G G C G. The mutation is indicated by a red arrow pointing to the T peak at position 235.

Bottom Panel: Schematic of the PARK2 gene structure showing the location of the Ex2 DEL and Ex3 c.235G>T variants. The Ex2 DEL variant is indicated by a red arrow pointing to the deletion of the second exon. The Ex3 c.235G>T variant is indicated by a red arrow pointing to the mutation in the third exon.

Analiza nosicielstwa rodziców - bialleliczności mutacji



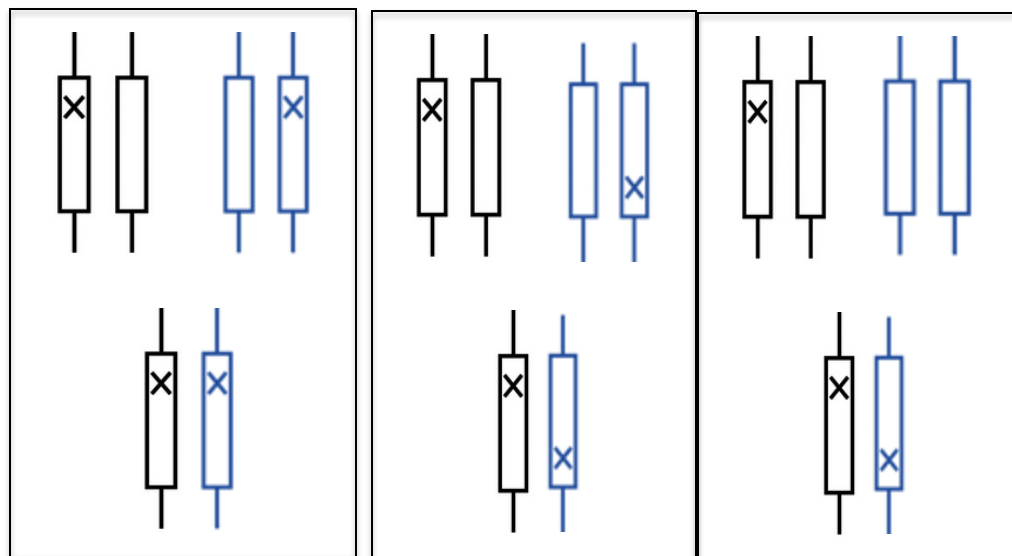
W diagnostyce chorób AR wymóg wykazania bialleliczności mutacji
Analiza nosicielstwa rodziców



Mutacje de novo

**Osoba chora może być nosicielem dwóch różnych mutacji danego genu
(częsta homozygotyczność mutacji w rodzinach spokrewnionych)**

mutacje bialleliczne

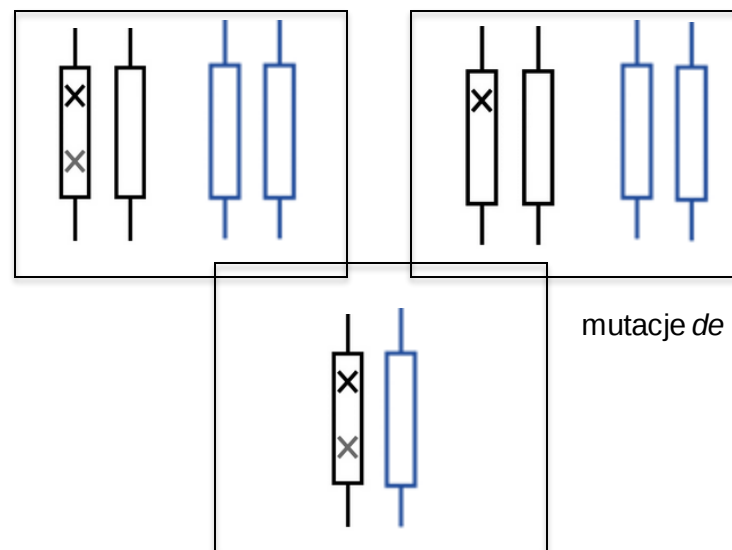


homozygota

heterozygota
złożona

mutacje de novo

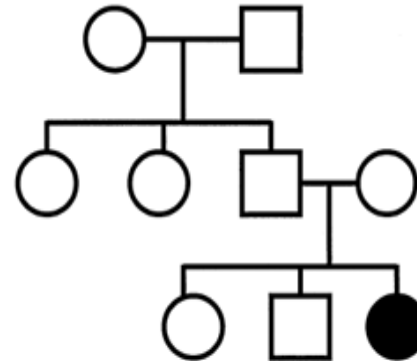
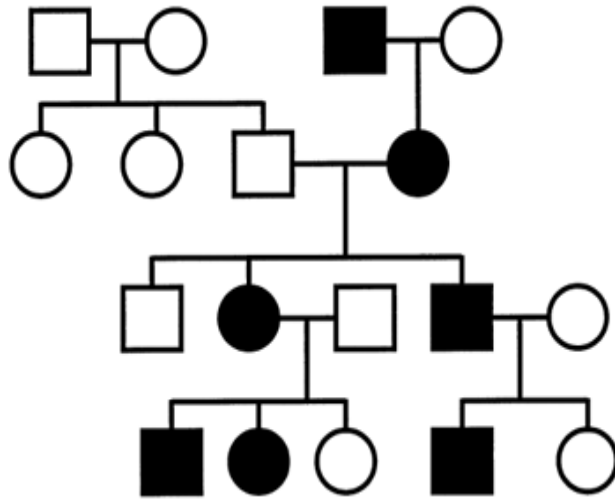
mutacje monoalleliczne



mutacje de novo

heterozygota
złożona

Dziedziczenie autosomalne dominujące (AD)

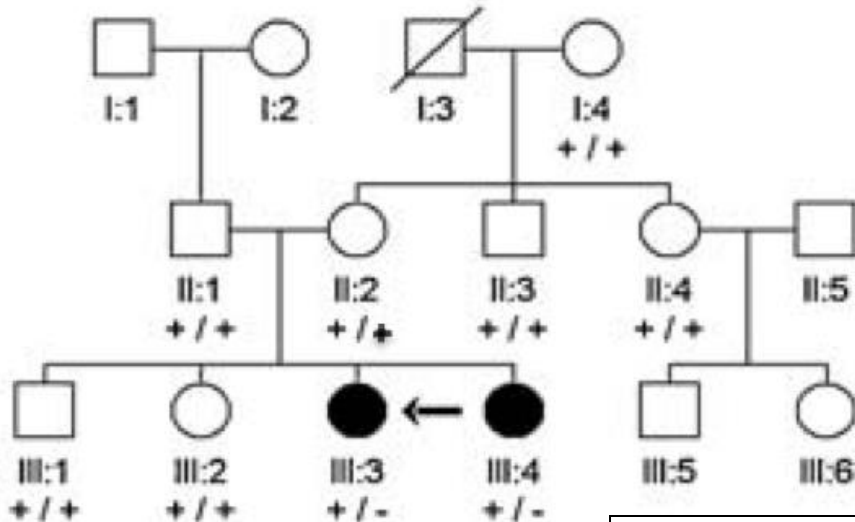
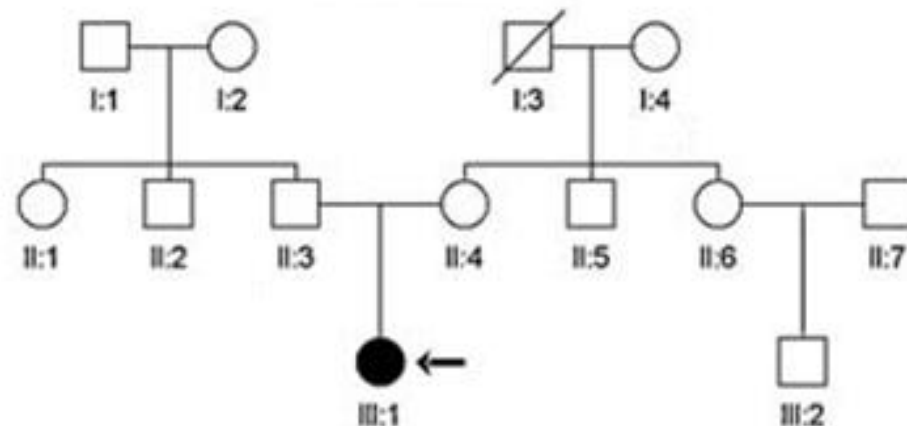


AD mutacja de novo

Typowy rodowód (dziedziczenie pionowe, niezależne od płci)

Izolowany przypadek choroby w rodzinie jako wynik nowej mutacji

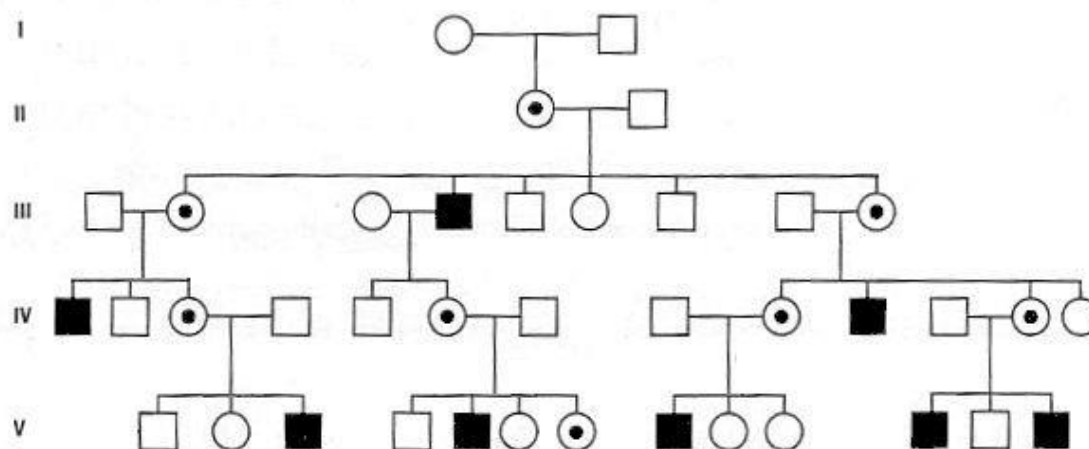
AD; mutacje *de novo* w rodowodzie
„przypadek sporadyczny”



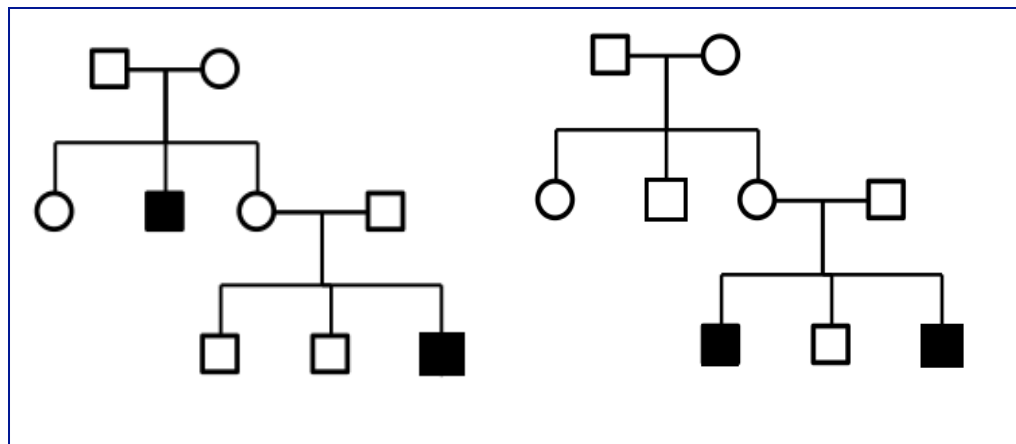
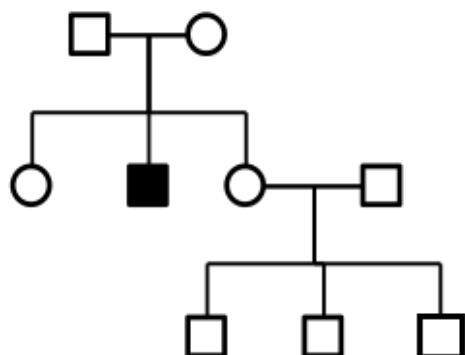
Mozaikowość

- obecność dwóch (lub więcej) genetycznie różnych linii komórkowych powstałych postzygotycznie
- mozaikowość germinalna (dotycząca komórek rozrodczych) (mutacja zaszła na wczesnym etapie rozwoju embrionalnego, dotycząc progenitorowych komórek rozrodczych grupa komórek rozrodczych jest klonem zmutowanej kom. pierwotnej)

**Typowy rodowód dla dziedziczenia sprzężonego z płcią, recesywnego - XLR
(cechy nigdy nie przekazywane są pomiędzy mężczyznami)**



Dystrofia Mięśniowa Duchenne'a (DMD) – XR, 30% *de novo*



obligatoryjne nosicielstwo mutacji - XR

Molekularne podłoże chorób człowieka

Delecje – utrata części sekwencji DNA

Insercje – wstawienie do sekwencji dodatkowych zasad, zalicza się tu również duplikacje

Mutacje punktowe

- mutacje typu missens
- mutacje typu nonsens
- mutacje sekwencji splicingowych

Mutacje typu frameshift (przesunięcie ramki odczytu)

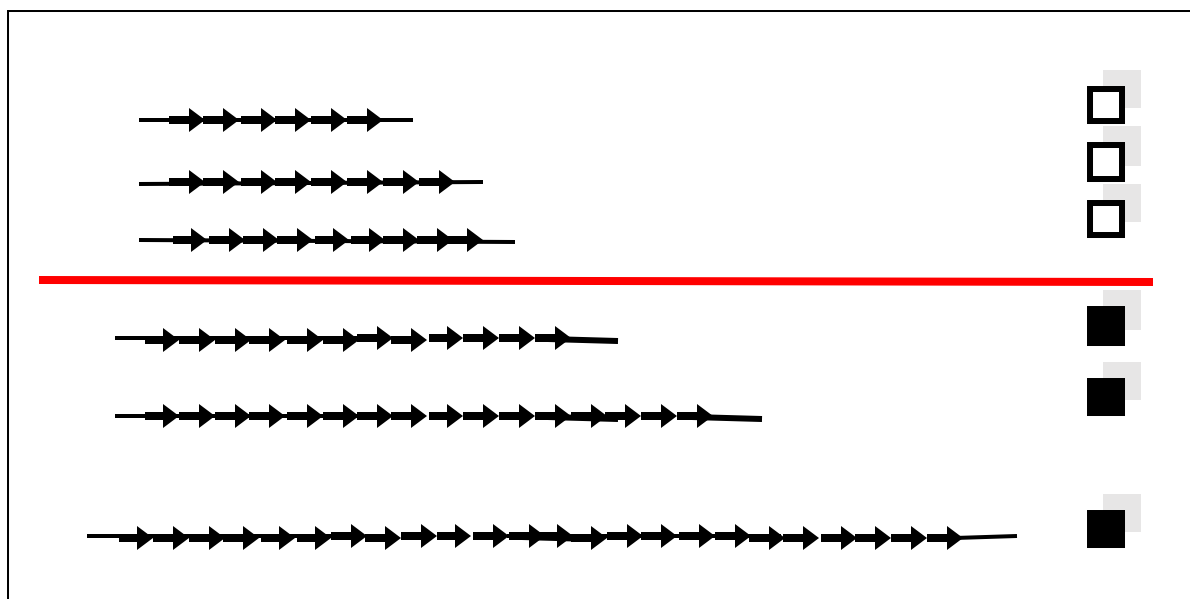
Mutacje dynamiczne

genetyka mendlowska – mutacja ma charakter stabilny (taki sam efekt fenotypowy) przy przekazywaniu następnym pokoleniom, zaistnienie jednej zmiany w DNA nie zmienia prawdopodobieństwa zaistnienia kolejnej

mutacje dynamiczne – zmiany w DNA związane z obecnością niestabilnych sekwencji mikrosatelitarnych – polegają na zwielokrotnieniu liczby jednostek podstawowych w zakresie chorobotwórczym charakteryzują się większą niestabilnością w miarę wydłużania regionu powtórzeń. Niestabilność w przekazywaniu następnym pokoleniom prowadzi do występowania w dziedziczeniu choroby zjawiska *antycypacji*

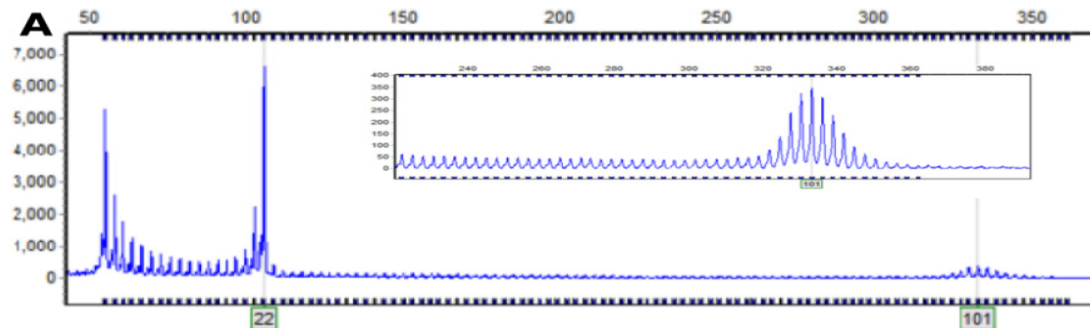
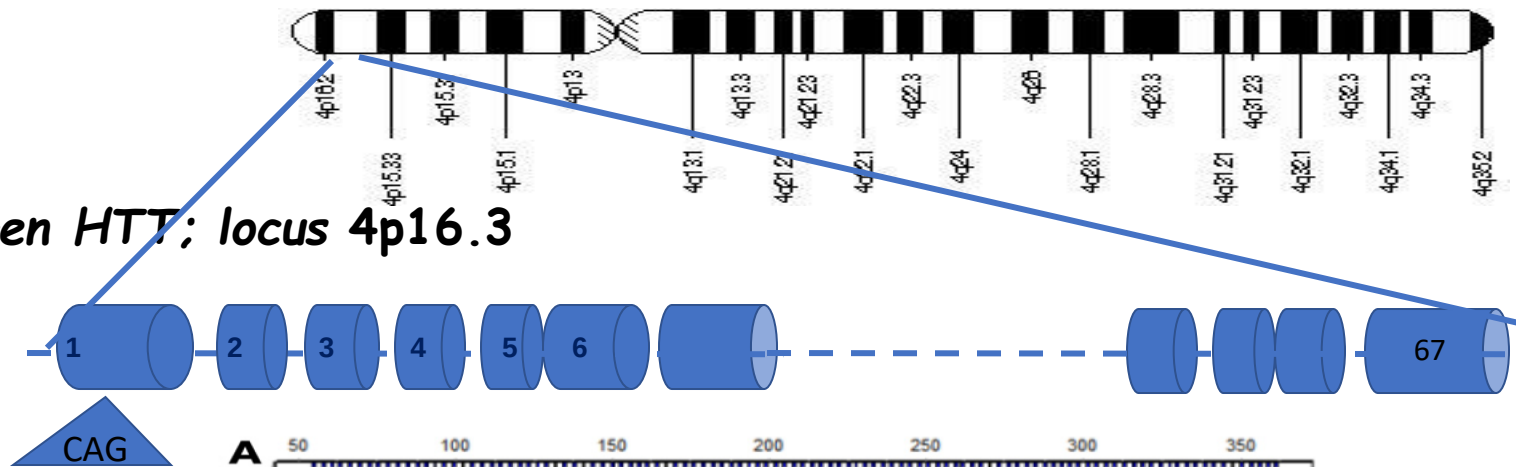
Mutacje dynamiczne

typ mutacji, gdzie zmiana materiału genetycznego polega na zwielokrotnieniu liczby potencjanie patogennych powtórzeń sekwencji mikrosatelitarnych w *locus*
(w chwili obecnej odnosi się to głównie do sekwencji trójnukleotydowych)

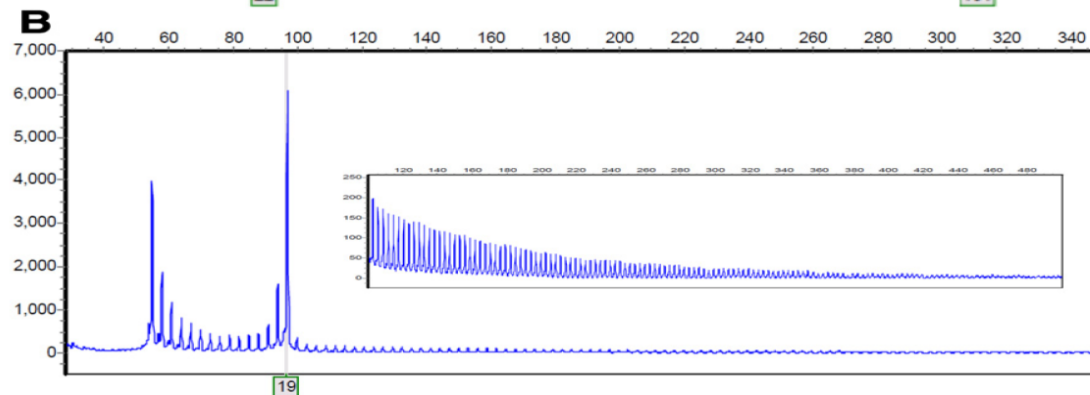


Choroba Huntingtona – mutacja dynamiczna; dziedziczenie AD

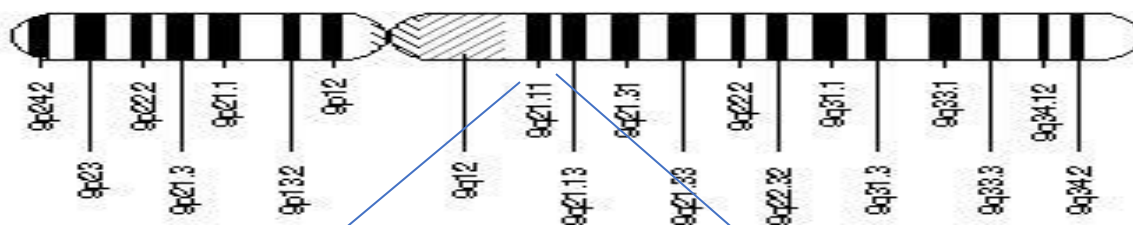
Gen HTT; locus 4p16.3



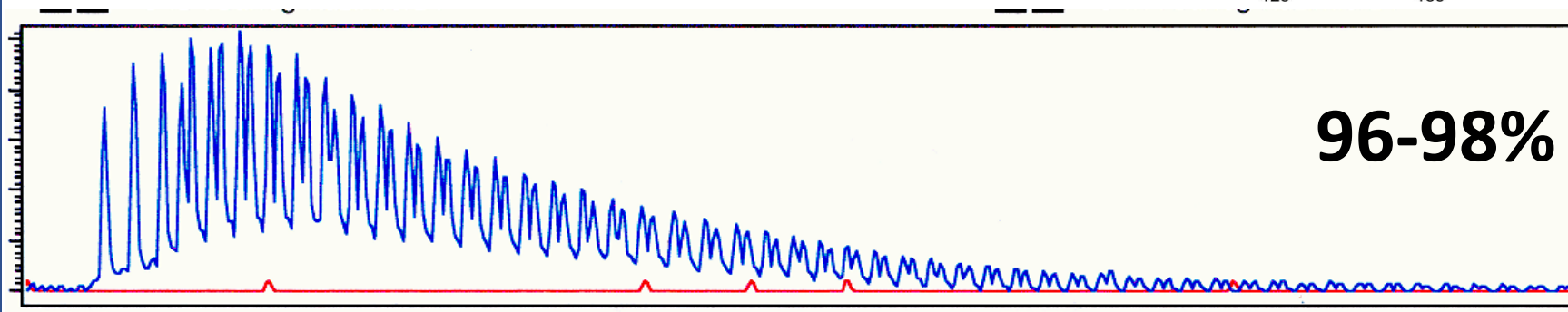
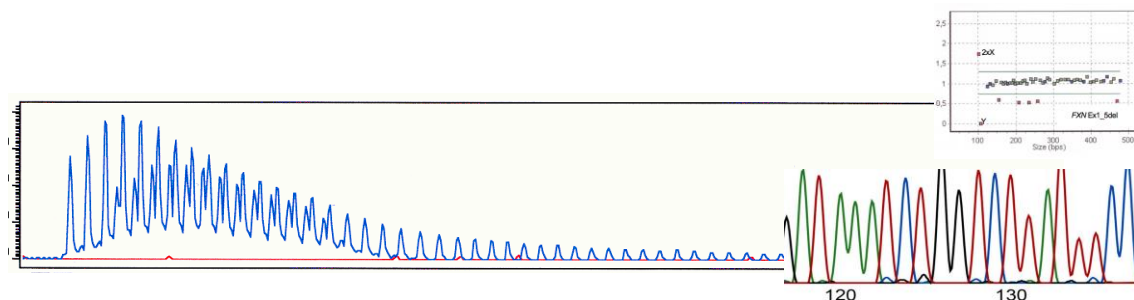
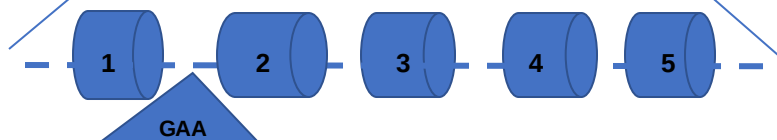
100%



Ataksja Friedreicha – mutacja dynamiczna; dziedziczenie AR

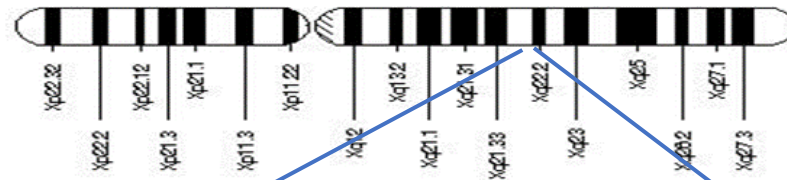


Gen FXN; locus 9q21.11

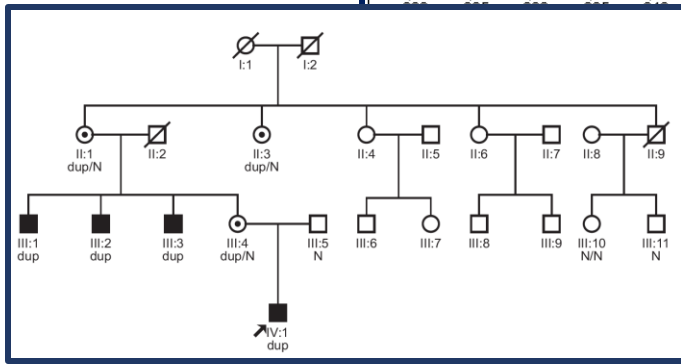
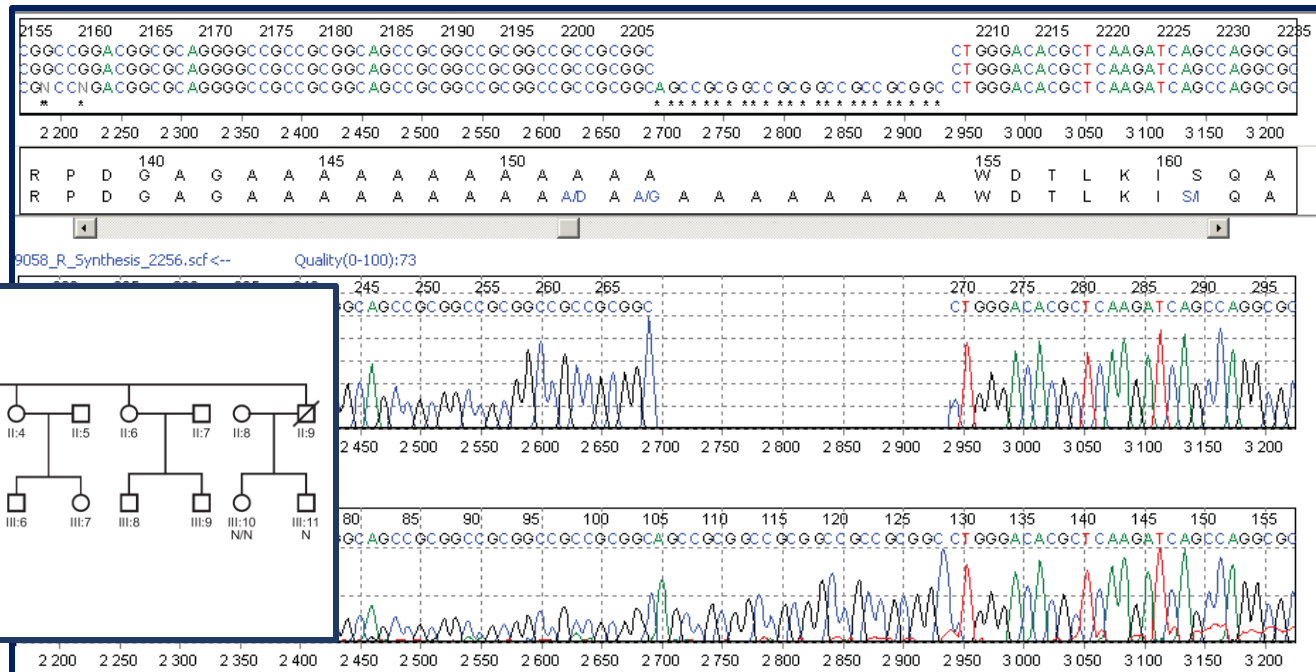


ZESPÓŁ WESTA

(MIM #308350; EPILEPTIC ENCEPHALOPATHY, EARLY INFANTILE, 1; EIEE1)



Gen **ARX** (MIM ID *300382); locus Xq21.3



Sekwencjonowania genu **ARX** - Ekson 2

Duplikacją c.428_451dup (24bp) – insercja 8 Alanin w białku **ARX**

Etapy rozwoju genetyki medycznej

Era genetyki

- identyfikacja pierwszych genów
- niewielka ilość danych genetycznych dotyczących chorób
- rzadkie warianty jako patogenne

Główne cele

- charakterystyka podłoża molekularnego chorób
- identyfikacja „genów sprawczych”

Era genomiki

- identyfikacja dużej liczby genów i mutacji
- „big data”
- kryteria oceny patogenności identyfikowanych wariantów

Główne cele

- wyodrębnienie prawdziwych mutacji patogennych z „genomic noise”

Era medycyny spersonalizowanej

- opracowanie terapii w oparciu o dane genetyczne
- powszechny dostęp do badań genetycznych

Główne cele

- uwiarygodnienie danych genetycznych do podejmowania decyzji terapeutycznych

NEXT GENERATION SEQUENCING

WGS

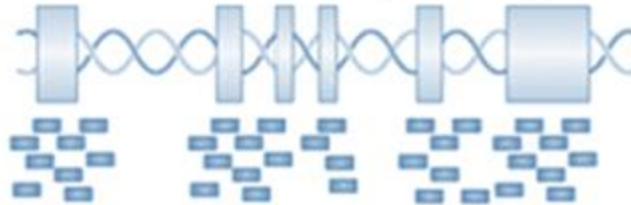
WES

Panel

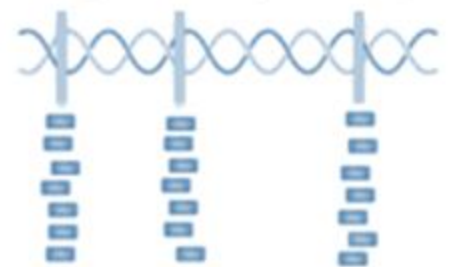
Whole genome sequencing



Whole exome sequencing



Targeted sequencing



Jesteśmy w takim momencie, gdy przeprowadzanie testów genomowych (panelowego, cało eksomowe czy nawet całogenomowego), biorąc pod uwagę względy techniczne, może okazać się tańsze niż sekwencjonowanie pojedynczego genu

Cechą tych podejść jest to, że uzyskiwane informacje często mają niepewne znaczenie.

WES czy panel ?

Ograniczenia metody

Dane kliniczne

Patogenność mutacji - która ?

Patogenność mutacji - czy na pewno?

