



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



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska



Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



Od kliniki do wyniku

Encefalopatie padaczkowe i drgawki w okresie noworodkowym

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



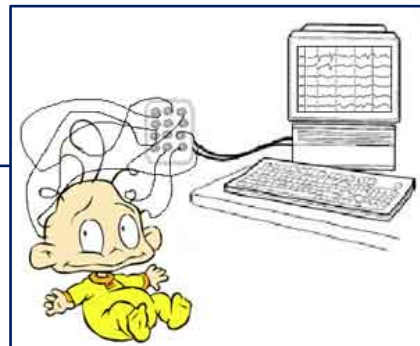
„Choroby genetycznie uwarunkowane – edukacja i diagnostyka”
Program Operacyjny Wiedza Edukacja Rozwój – 2019 - 2021

Drgawki Noworodkowe

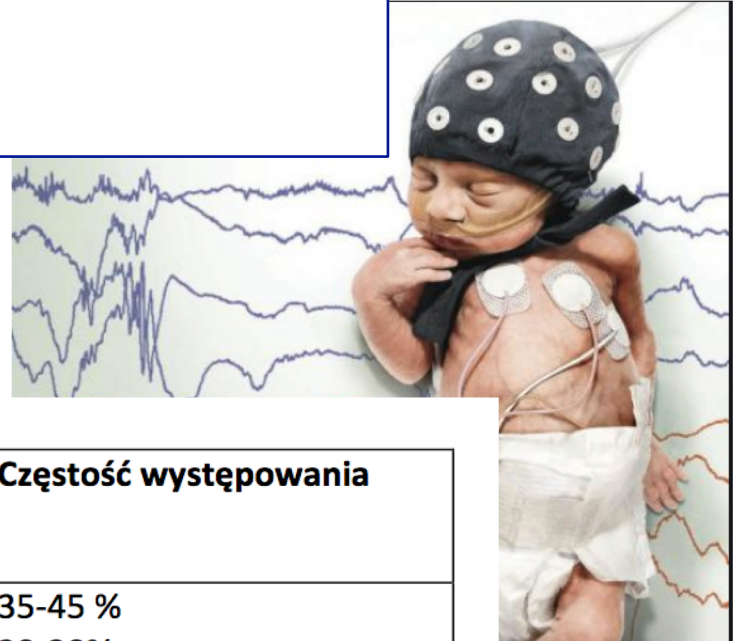
definiowane są jako zjawisko elektro-kliniczne charakteryzujące się zespołem objawów będących wynikiem nieprawidłowych, nadmiernych lub synchronicznych wyładowań czynności bioelektrycznej neuronów.

Na poziomie klinicznym to napadowe, powtarzające się stereotypowe zdarzenia, zwykle subtelnie wyrażone i dlatego trudne do odróżnienia od fizjologicznych zachowań noworodka (czyli występujące w pierwszych 28 dniach życia dziecka donoszonego lub w okresie do 44 tyg. wieku postkonceptyjnego dziecka urodzonego przedwcześnie)

DN manifestują się w EEG odrębnym wzorcem bioelektrycznym, co w praktyce oznacza, że możemy je rozpoznać jeżeli zostaną zarejestrowane w zapisie EEG .



Etiologia drgawek noworodkowych ?



Czynnik etiologiczny DN	Częstość występowania
Encefalopatia niedotlenieniowo-niedokrwienna	35-45 %
Udary i krwawienia	20-30%
→ Wady OUN	5-10%
→ Infekcje	5-20%
→ Zaburzenia metaboliczne	7-20%
Zespoły padaczkowe i uwarunkowane genetycznie	7-10%
Zakrzepica zatok żylnych mózgu	brak danych
Wodogłowie	brak danych
Zespół odstawienia	brak danych
Nieznane	10%

**Diagnostyka genetyczna w zależności od obrazu klinicznego
w pierwszej kolejności diagnozujemy zaburzenia, które
potencjalnie można leczyć**

drgawki noworodkowe występują z częstością 1,5- 5,5/1000 żywych urodzeń

częstość występowania jest zdecydowanie wyższa w grupie dzieci urodzonych przedwcześnie i wynosi 50-130/1000 żywych urodzeń.

85% DN to ostre drgawki objawowe i większość z nich będzie miała tendencję do samoograniczania

W związku z postępem diagnostyki coraz częściej w okresie noworodkowym rozpoznawana jest padaczka.

**padaczka występuje u 10-13 % noworodków z DN
ok. 85% przypadków ma podłoże genetyczne
z czego ok. 40% to encefalopatie padaczkowe**



PADACZKI

Padaczka to stan, w którym chory spełnia jeden z następujących warunków:

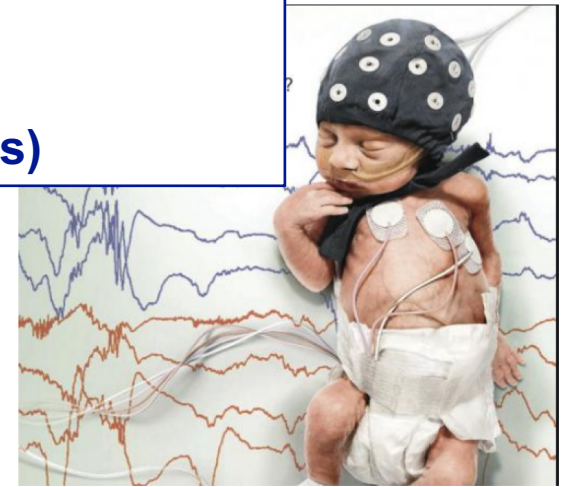
1. co najmniej dwa niesprovokowane napady drgawek w odstępie powyżej 24 godzin
2. jeden niesprovokowany napad i prawdopodobieństwo kolejnych napadów podobne do ogólnego ryzyka nawrotu (co najmniej 60%) po dwóch niesprovokowanych napadach, występujące ponad 10 lat
3. rozpoznanie zespołu padaczkowego.

*Międzynarodowa Liga Przeciwpadaczkowa,
definicja z 2014 roku*



Wczesnodziecięce Encefalopatie Padaczkowe

(Early Infantile Epileptic Encephalopathies – EIEEs)



wiekowo specyficzne zespoły katastroficznej padaczki, o szczególnie niekorzystnym rokowaniu charakteryzujące się postępującymi zaburzeniami funkcji poznawczych, czuciowych i/lub motorycznych, występującymi u początkowo prawidłowo rozwijających się dzieci.

Objawy encefalopatii padaczkowych są skutkiem napadów padaczkowych oraz podklinicznych wyładowań, które uważa się za czynnik uszkadzający rozwijający się mózg.



Fundusze
Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska

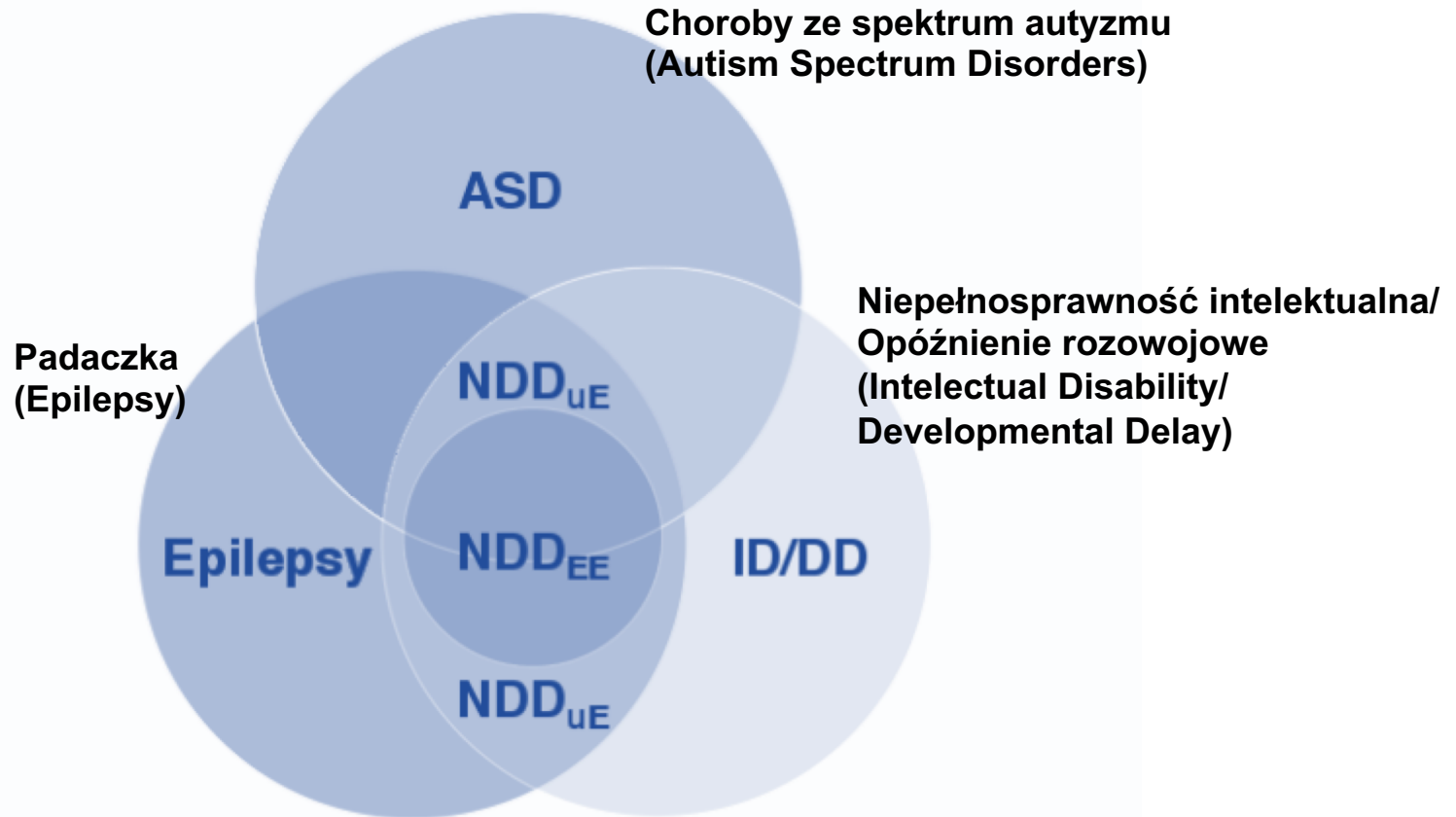


Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



Choroby Neurorozwojowe (NeuroDevelopmental Disorders)



Encefalopatie Padaczkowe

NDD_{EE} – Zaburzenia Neurorozwojowe + Padaczka

Zaburzenia Neurorozwojowe z padaczką

NDD_{UE} – Zaburzenia Neurorozwojowe z Nieokreśloną Padaczką

Mutacja genu



Zespół padaczkowy



Padaczka / napady



**Objawy
współwystępujące**

Mutacja genu



Padaczka / napady



**Objawy
współwystępujące**

Encefalopatia z padaczką

objawy współwystępujące
i padaczka są niezależne
objawy współwystępujące nie są
determinowane napadami
napady mogą pogłębiać objawy
współwystępujące

Encefalopatia padaczkowa

objawy współwystępujące
determinowane są
częstością napadów



400 tyś urodzeń/rok
DN : ok 2-2,5 tyś /rok
ok. 350 noworodków z padaczką/rok

ok. 170-180 nowych przypadków
Wczesnych Encefalopatii Padaczkowych/rok



Fundusze
Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



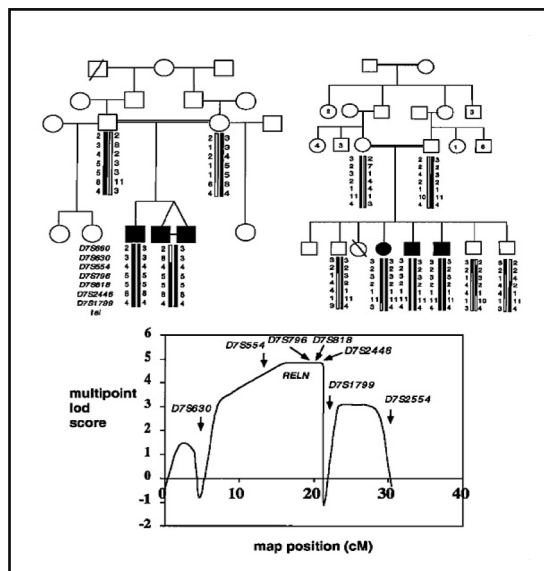
Rzeczpospolita
Polska



Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny





era kanatopatii

era NGS

Microdeletions

15q13.3
16p13.11
15q11.2

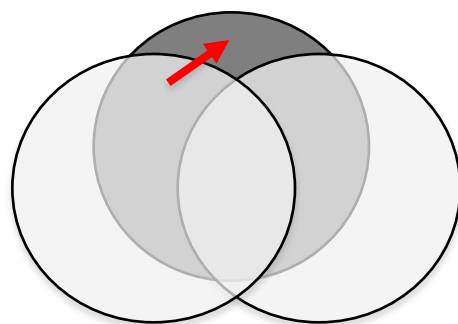
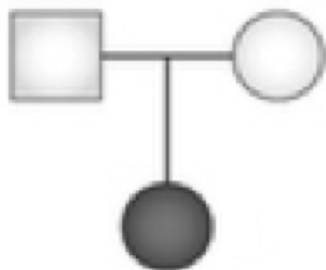
Mutacije dominujace de novo

era encefalopatii padaczkowych



Mutacje dominujące *de novo*

analiza *triosów*



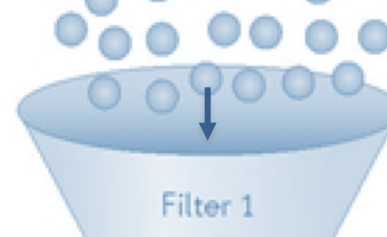
warianty
heterozygotyczne
nie występujące u rodziców

Strategia identyfikacji podłoża w sporadycznych przypadkach NI

Wykluczenie patogennych CNV oraz zespołu kruchego chr. X

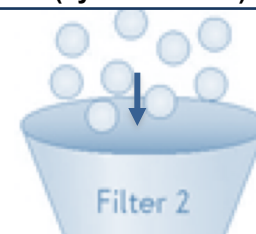
WES
mapowanie odczytów,
identyfikacja wariantów

21 755



wykluczenie wariantów nieistotnych
(synonimiczne)

5 640



wykluczenie wariantów częstych

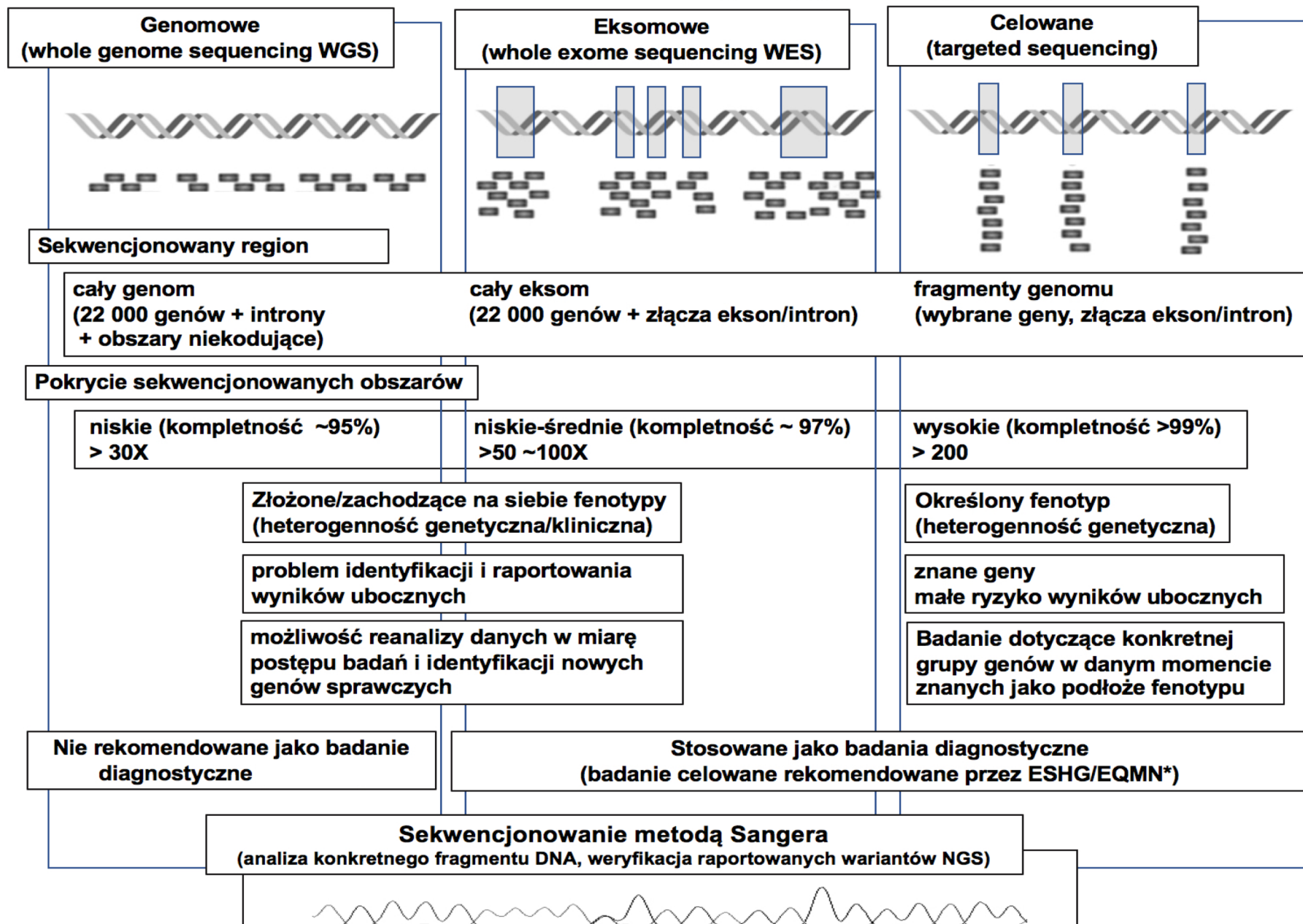
143



wykluczenie wariantów
odziedziczonych

5

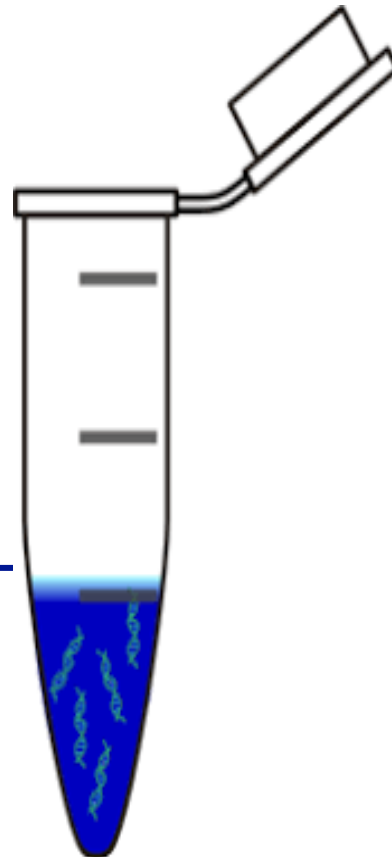
Sekwencjonowanie następnej generacji (NGS)

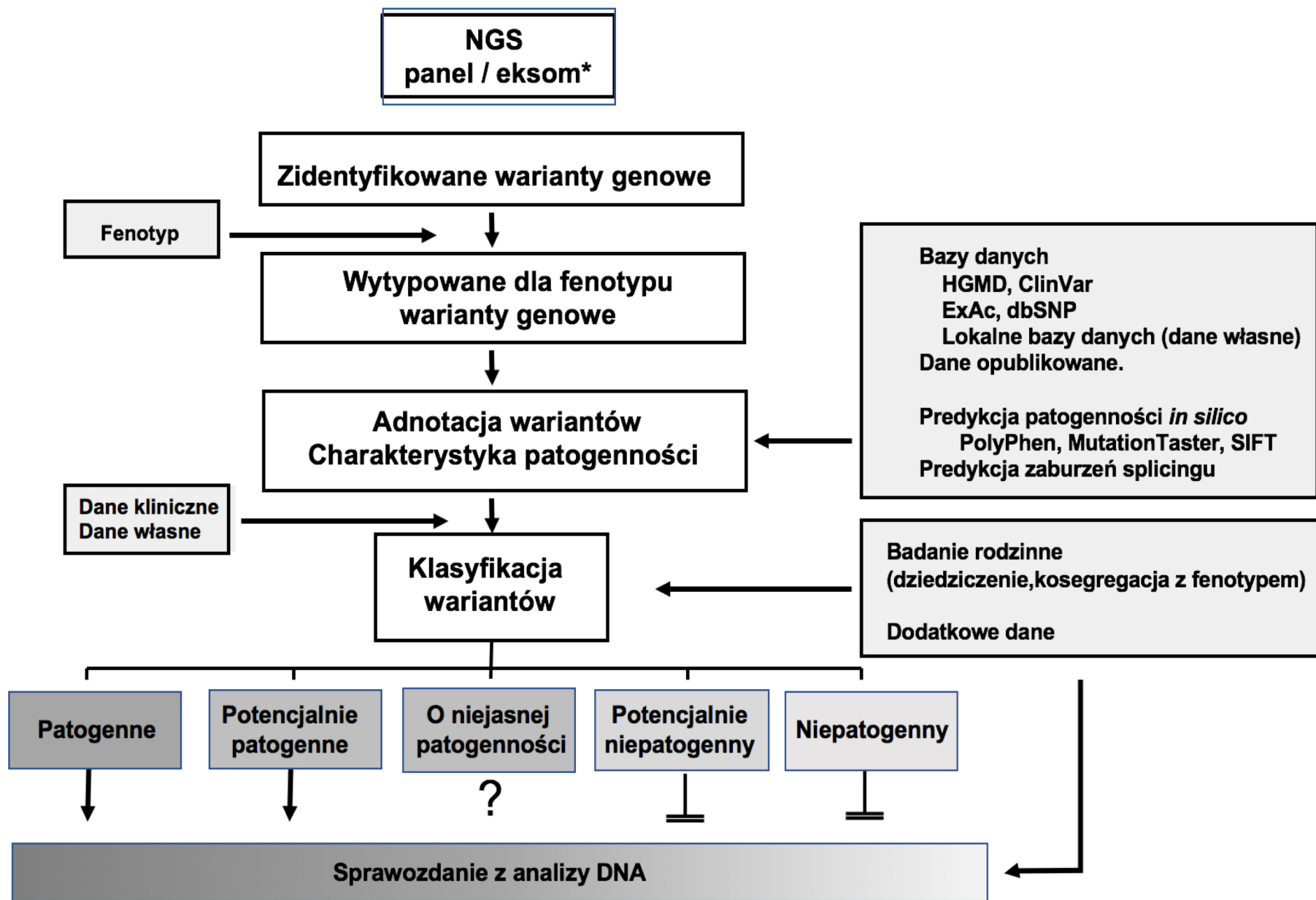


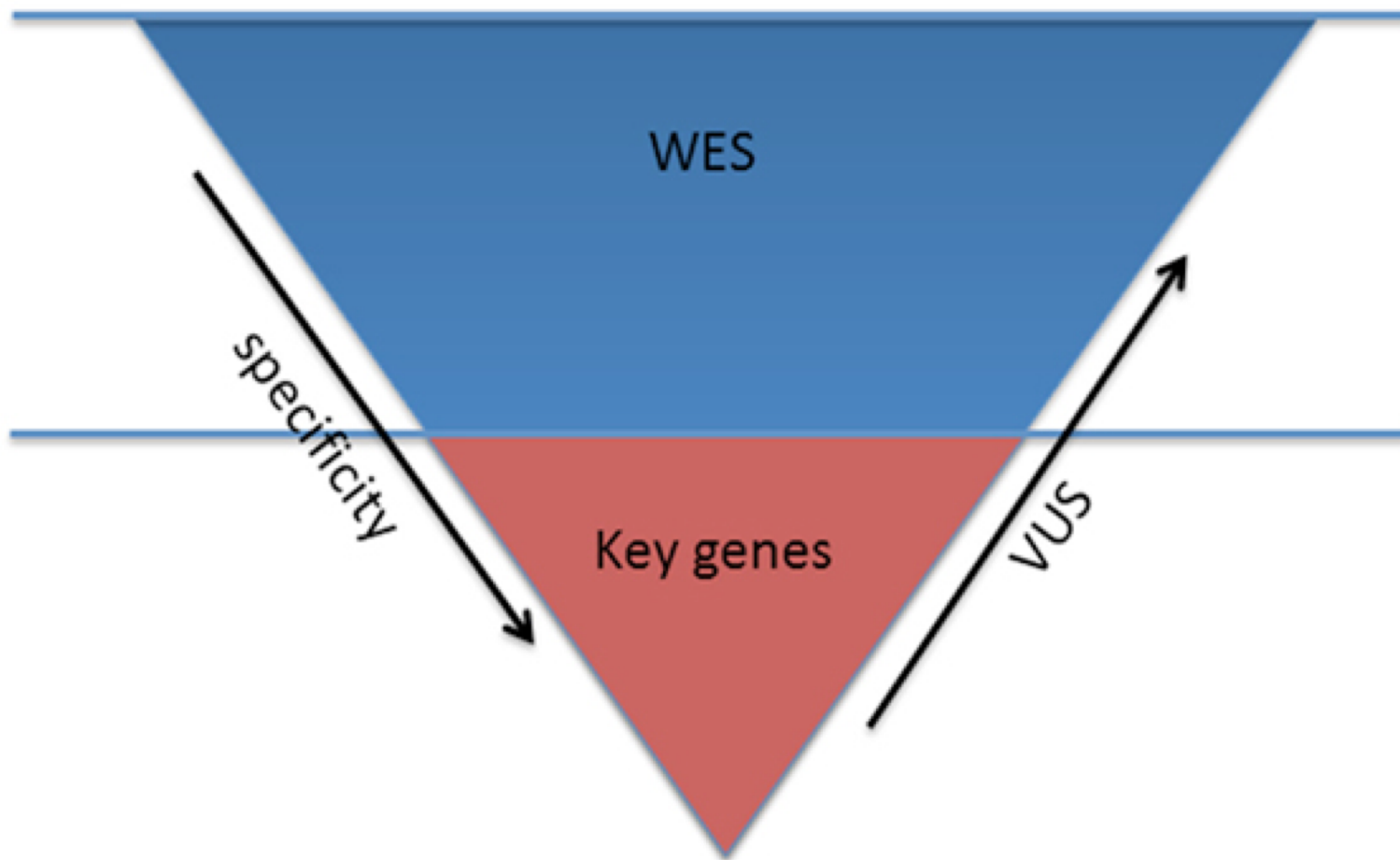
Genetyka medyczna

Diagnostyka a badania naukowe..

- **Badania naukowe** – poszukiwanie nowego gen powiązanego z daną chorobą w grupie pacjentów o podobnym fenotypie
- **Badanie diagnostyczne** – analiza w celu identyfikacji defektu genetycznego stanowiącego podłoże fenotypu



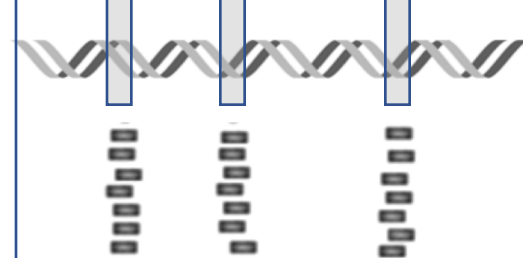
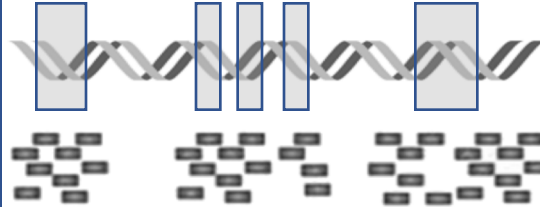




Eksomowe (whole exome sequencing WES)

Celowane (targeted sequencing)

Sekwencjonowany region



cały eksom
(22 000 genów, złącza ekson/intron)
ekson/intron)

fragmenty genomu
(wybrane geny, złącza
ekson/intron)

Pokrycie sekwencjonowanych obszarów

niskie-średnie (kompletność ~ 97%)
>50 ~100X

wysokie (kompletność >99%)
> 200

Złożone/zachodzące na siebie fenotypy
(heterogenność genetyczna/kliniczna)

problem identyfikacji i raportowania
wyników ubocznych

możliwość reanalizy danych w miarę
postępu badań i identyfikacji nowych
genów sprawczych

Określony fenotyp
(heterogenność genetyczna)

znane geny
małe ryzyko wyników ubocznych

Badanie dotyczące konkretnej
grupy genów w danym
momencie znanych jako podłoże
fenotypu

Stosowane jako badania diagnostyczne
(badanie celowane rekomendowane przez ESHG/EQMN*)

Standardowe postępowanie diagnostyczne EIEEs

Dane kliniczne

Dane genetyczne

wydajność
diagnostyczna

EEG

Niska

4%

Metabolity

5%

<16%

MRI

Niska

Niska

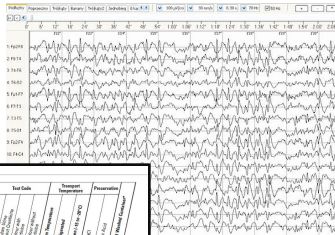
Kariotyp

Array

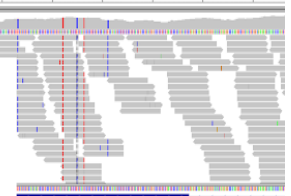
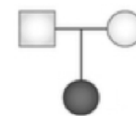
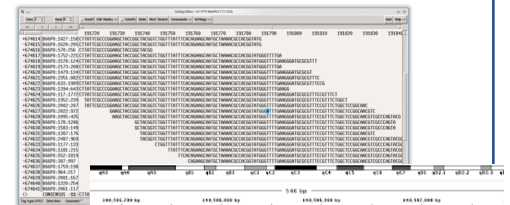
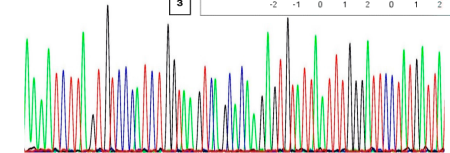
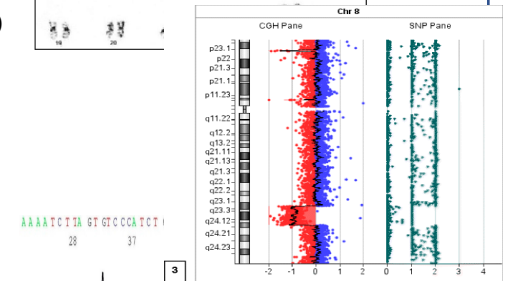
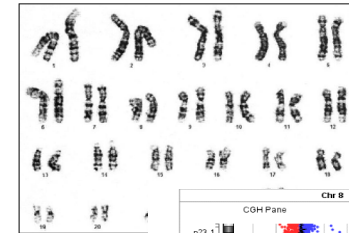
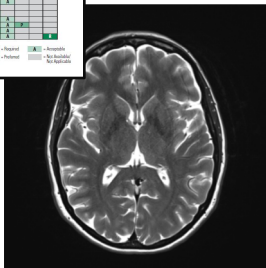
Sanger

Panel

WES
(WES Trio)



Test Name	Test Code	Test Date	Test Result	Test Interpretation
Ammonia	10000	10/10/2010	100	Normal
Bilirubin	10001	10/10/2010	1.2	Normal
Calcium	10002	10/10/2010	1.0	Normal
Creatinine	10003	10/10/2010	1.0	Normal
Glucose	10004	10/10/2010	100	Normal
Lactate	10005	10/10/2010	1.0	Normal
Phosphate	10006	10/10/2010	1.0	Normal
Sodium	10007	10/10/2010	135	Normal
Urea	10008	10/10/2010	1.0	Normal
Uric Acid	10009	10/10/2010	1.0	Normal
Vitamin B12	10010	10/10/2010	1.0	Normal
Zinc	10011	10/10/2010	1.0	Normal



20 – 30%

>30% - 50%

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

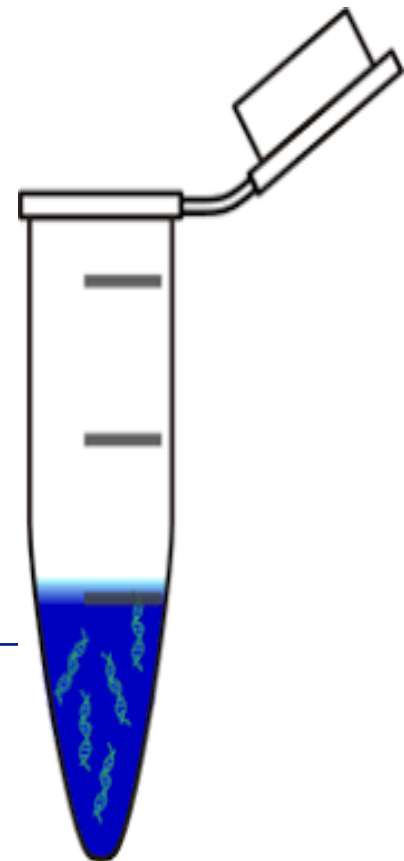
Cechą tych podejść jest to, że uzyskiwane informacje często mają niepewne znaczenie.

Czy zidentyfikowana mutacja w konkretnym genie odpowiada za chorobę pacjenta ?

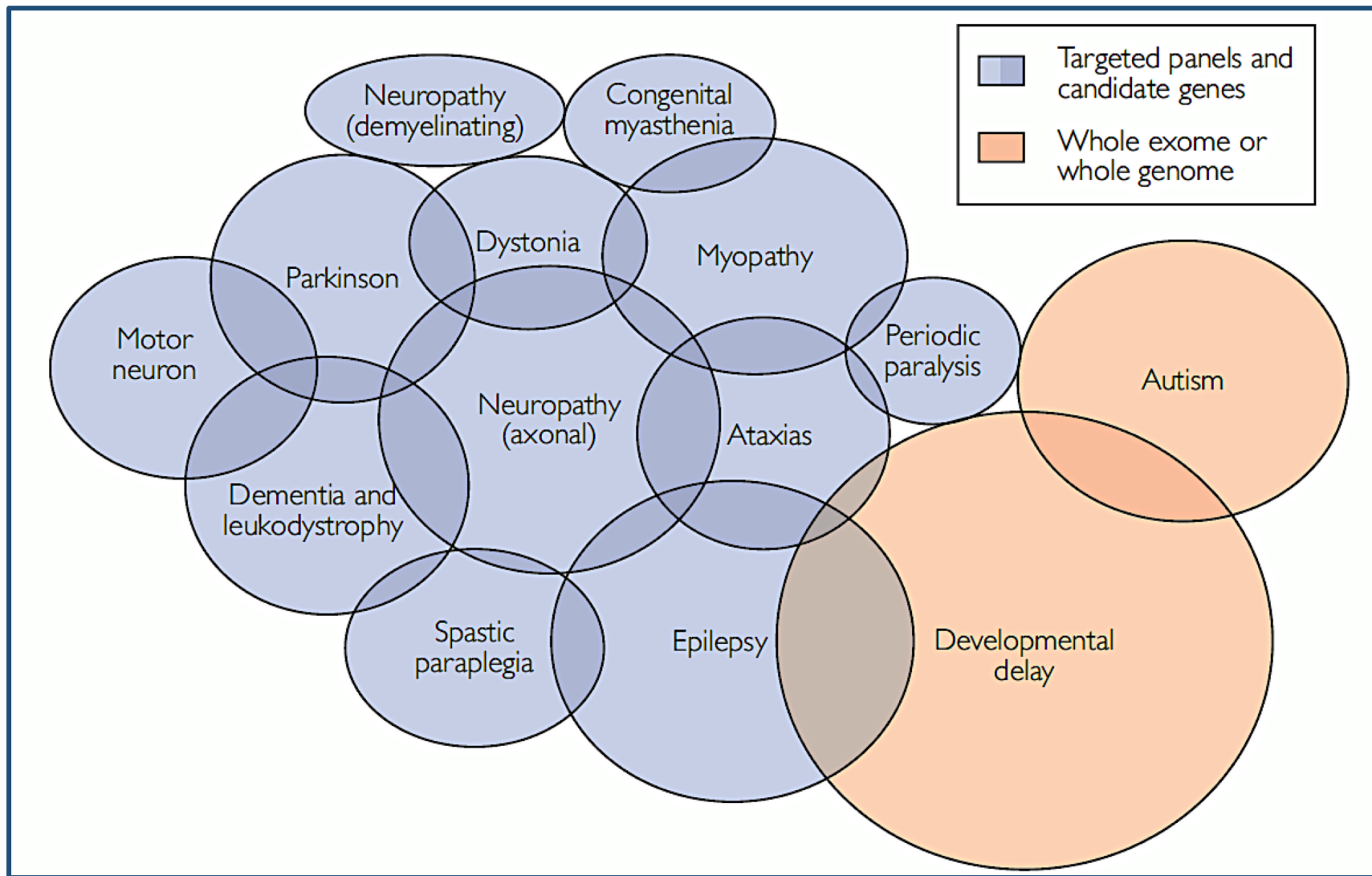
Który ze zidentyfikowanych wariantów jest istotny ?

Czy zidentyfikowany wariant jest mutacją patogenną ?

Czy zidentyfikowana mutacja jest istotna biorąc pod uwagę fenotyp pacjenta – gen ?



Testy genetyczne w odniesieniu do różnych chorób neurogenetycznych o dziedziczeniu mendlowskim





EIEE v.1/2016 Panel

ALDH7A1, ALG13, ARX, CACNA1A, CASK, CDKL5, CHD2, DNM1, FOXG1, GABRA1, GABRB3, GABRG2, GNAO1, GRIN1, GRIN2A, GRIN2B, HCN1, HNRNPU, IQSEC2, KCNA2, KCNB1, KCNQ2, KCNQ3, KCNT1, MBD5, MECP2, MEF2C, PCDH19, PNPO, POLG, PRRT2, SCN1A, SCN1B, SCN2A, SCN8A, SCN9A, SIK1, SLC25A22, SLC2A1, SLC35A2, SLC9A6, SPTAN1, STXBP1, SYNGAP1, TBC1D24, TBL1XR1, TCF4, UBE3A, ZEB2



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska

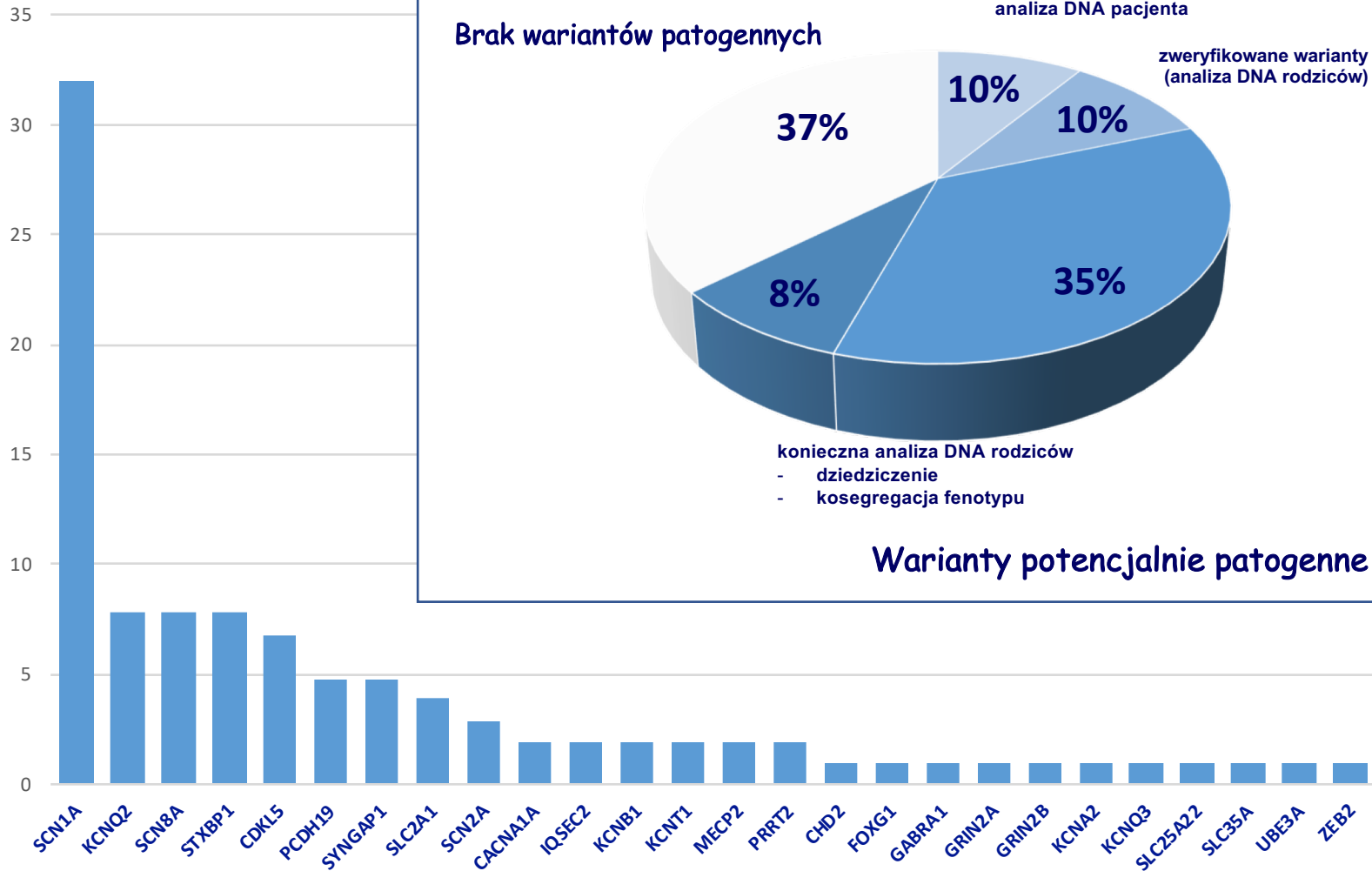


Instytut
Matki i Dziecka

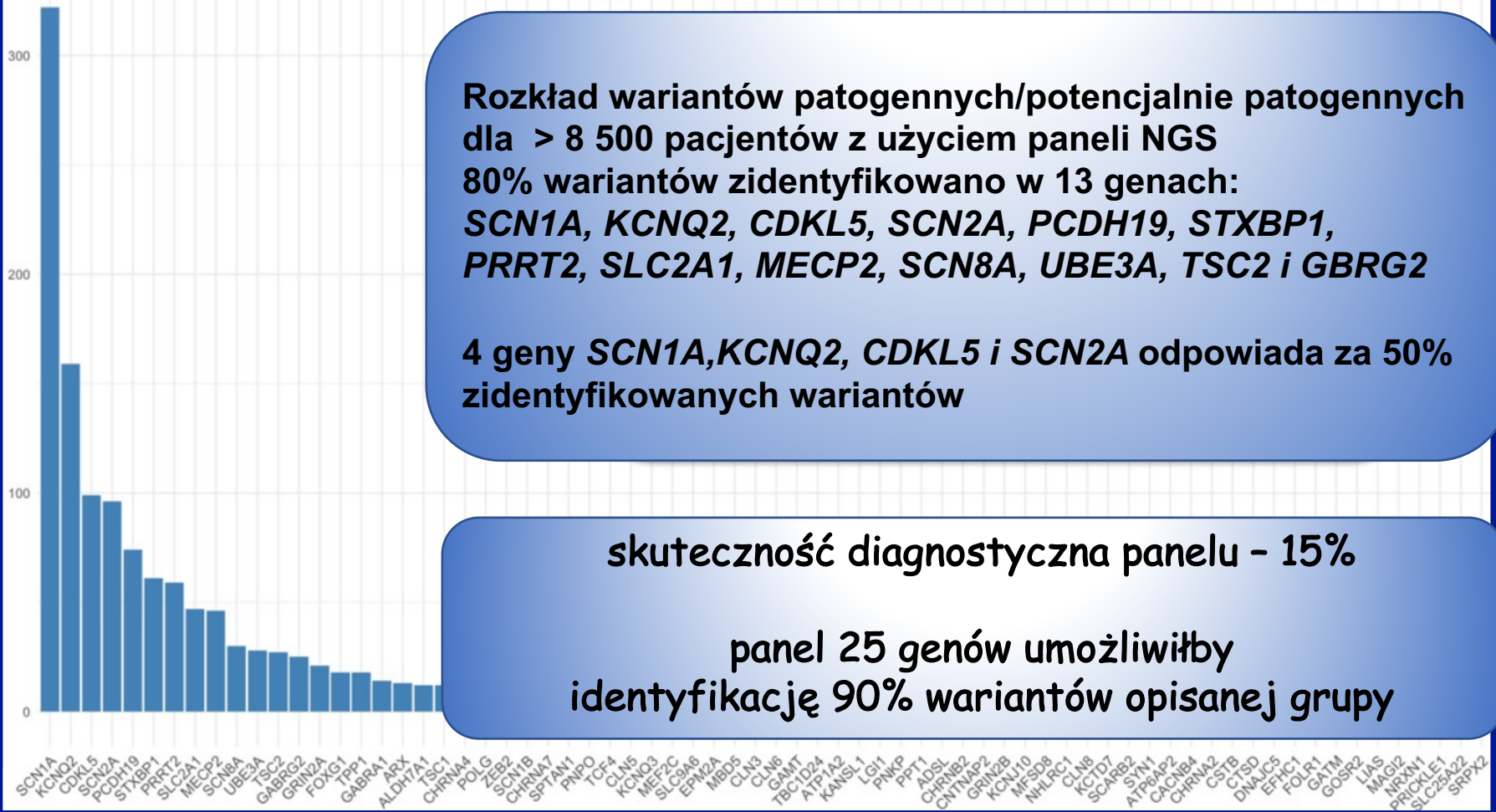
Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



**Wyniki analizy panelowej EIEE v.1 2016;
geny identyfikowane u pacjentów z potwierdzoną diagnozą (26 genów, 103 probantów)**



Wyniki analizy panelowej (70 genów) dla 8 565 pacjentów (Lindy i wsp. 2018)



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, odrzucenie części
wariantów

5. Wybór wariantu patogennego

wybór wariantu patogennego
lub wariantów kandydujących



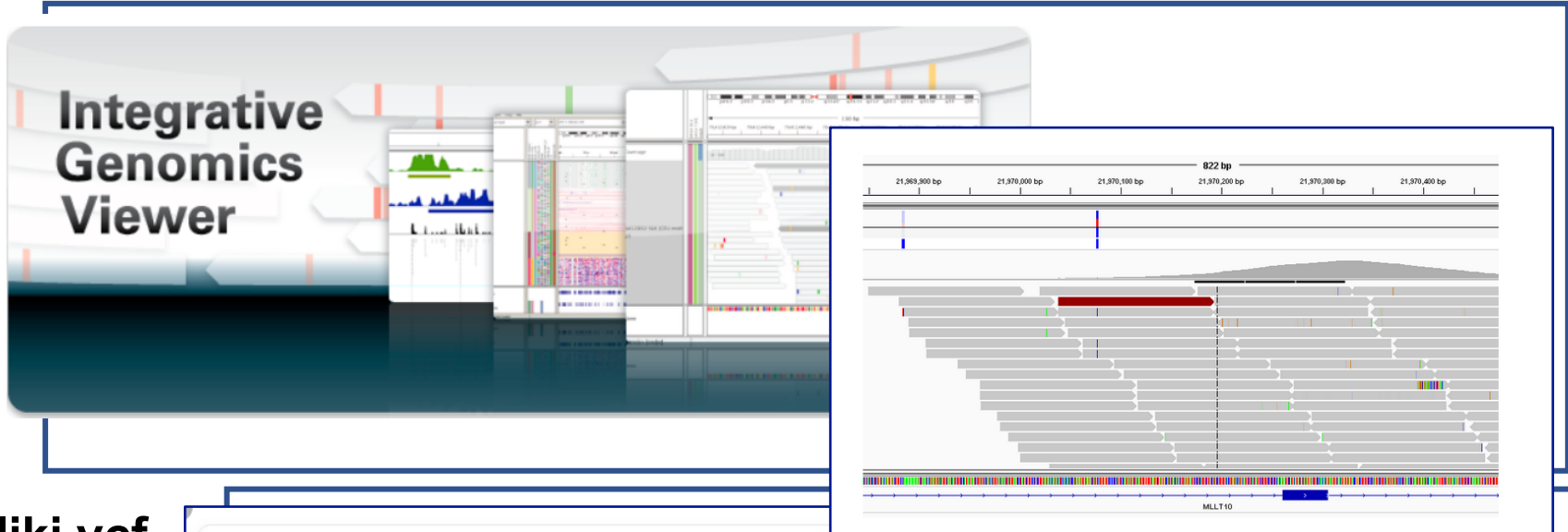
Bioinformatyk



Diagnosta + Klinicysta

Pliki BAM

– wizualizacja zidentyfikowanych wariantów



Pliki vcf

Annotation and
Filtering Tool

VariantStudio Software v3.0

© 2013 Illumina, Inc. All rights reserved.

illumina

File

Annotation & Classification

Reports

Help

Open

Close

Save As

Import VCF

Add Variants to Sample

Import Public

Current Sample: NA12878 (Sep 1...

Remove Sample

Current:

Manage Favorites

Save

Select All

Copy

Column Order

Smaller

Save As Default

Apply Default

Reset to Default

Larger

Table Options

Layout

Project

Samples

Filter Variants

Filters

General

Variant

Gene

Consequence

Population Frequency

Cross Sample Subtraction

Family Based

Custom

Classification

Gene View

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

10,000

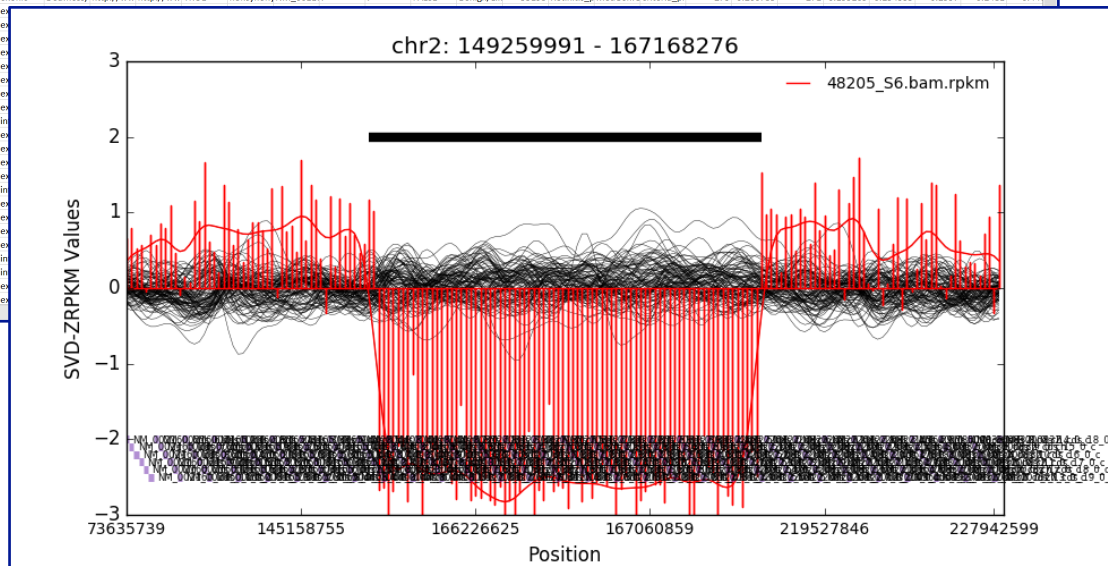
10,000

10,000

10,000

10,000

IMiD „home made pipeline” (Annovar, Conifer)

[illegible]

Kiedy podejrzewać drgawki o podłożu genetycznym?

- ☐ pokrewieństwo rodziców
- ☐ napady zgięciowe, drgawki miokloniczne, inne lekooporne, stany padaczkowe
- ☐ pogarszający się stan kliniczny, regres rozwoju
- ☐ zaburzenia pozapiramidowe, dysmorfia, nieprawidłowy obwód głowy, nieprawidłowa budowa narządów płciowych
- ☐ specyficzne obrazy EEG: supression-burst, hypsarytmia
- ☐ „wyraźne zaburzenia” wRM : lisencefalia, dysgenezja ciała modelowatego, zanik mózgu, hypomielinizacja



Badania genetyczne należy rozważać w zależności od obrazu klinicznego np. kariotyp molekularny powinien być wykonany w przypadku występowania cech dysmorfii a badania określonych genów w przypadku szczególnych wad kory, zespołów wad wrodzonych oraz „konkretnych” zespołów padaczkowych.

Spektrum chorób związanych z mutacjami

BFNIS

KCNQ2

KCNQ2 encephalopathy

Benign Familial Neonatal-Infantile Seizures (a mild, self-limited epilepsy syndrome)

BFNIS

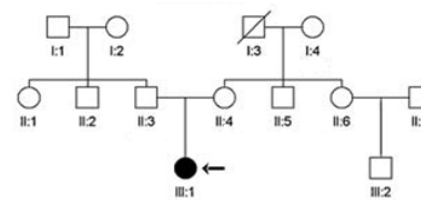
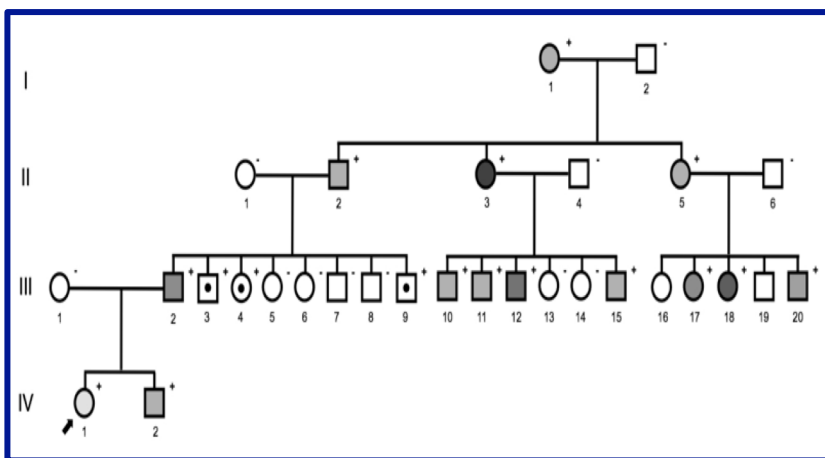
SCN2A

SCN2A encephalopathy

GEFS+

SCN1A

Dravet Syndrome



Głównie *de novo*
W przypadkach dziedzicznych związane z
mozaikowością

W pierwszej kolejności diagnozujemy zaburzenia które potencjalnie można leczyć.

- niedobór pirydoksyny, fosforanu pirydoksalu, kwasu foliowego/folinowego, kobalaminy,
- zaburzenia metabolizmu seryny, kreatyny
- niedobór transportera glukozy typu 1 (Glut-1)
- niedobór biotynidazy-zaburzenia neurotransmisji-fenyloketonuria

Diagnostyka genetyczna „ pierwszego rzutu”

	Geny
Drgawki zależne od vit. B6	<i>ALDH7A1, PNPO, PROSC, P5CDH, ALPL, PIGV, PIGO, PGAP2</i>
Zaburzenia metabolizmu seryny	<i>PHGDH, PSAT, PSP</i>
Niedobór kofaktora molibdenowego	<i>MOCS1, MOCS2, GPHN</i>
Niedobór receptora kwasu foliowego	<i>FOLR1</i>
Niedobór kreatyny	<i>GAMT, GATM, SLC6A8</i>
Izolowany niedobór oksydazy siarczynowej	<i>SUOX</i>
Niedobór transportera glukozy typu I	<i>SLC2A1</i>
ceroidolipofuscynoza	<i>TPP1</i>
Hiperglicynemia nieketotyczna	<i>AMT, GLDC</i>
Wczesne encefalopatie padaczkowe	<i>KCNQ2, KCNQ3, STXBP1, KCNT1 (najlepiej badania panelowe)</i>



NBE v.1/2018

**ABAT, ALDH7A1, ALG13, ALPL, AMT, ARHGEF9, ARX, BT
D, CACNA1A, CASK, CDKL5, CHD2, DNM1, FOLR1, FOXG1, GABRA1, GABRB3, GABRG2, GAMT, GATM, GLDC, GLRA1, GLRB, GNAO1, GPHN, GRIN1, GRIN2A, GRIN2B, HCN1, HNRNPU, IQSEC2, KCNA2, KCNB1, KCNJ10, **KCNQ2**, KCNQ3, **KCNT1**, LIAS, MBD5, MECP2, MEF2C, MOCS1, MOCS2, P5CDH, PCDH19, PGAP2, PHGDH, PHOX2B, PIGA, PIGO, PIGV, PMM2, PNPO, POLG, PROSC, PRRT2, PSAT, PSP, SCN1A, SCN1B, **SCN2A**, SCN8A, SCN9A, SIK1, SLC25A22, SLC2A1, SLC35A2, SLC6A5, SLC6A8, SLC9A6, SPTAN1, **STXBP1**, SUOX, SYNGAP1, TBC1D24, TBL1XR1, TCF4, TPP1, TSC1, TSC2, UBE3A, ZEB2**