



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



Genetyka neonatologiczna

- nie tylko testy przesiewowe.

Diagnostyka 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

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

Kontinuum zmienności genetycznej

**Genetyka
molekularna**

DNA, nukleotydy



Chromosomy

Cytogenetyka

Zmiany pojedynczych nukleotydów (SNP, SNV)

mutacje punktowe (1 na 800 bp)

Małe insercje/ delecje (indels)

frameshift, mikrosatelity, minisatelity

Element mobilne

insercje retroelementów (300 bp – 10 kb)

Zmiana dużych elementy genomowych (>10kb)

duże delecje

duplikacje segmentalne

Lokalne rearanżacje

Zmienność chromosomalna

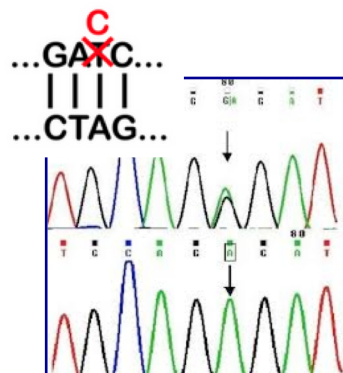
translokacje, inversje, fuzje



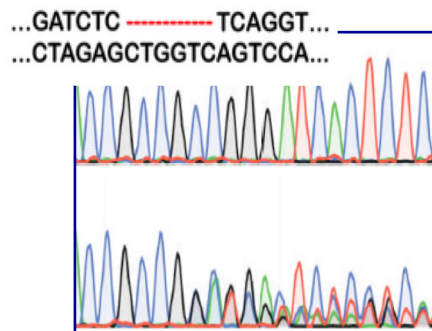
Varianty liczby kopii (CNV)



Varianty strukturalne (SV)

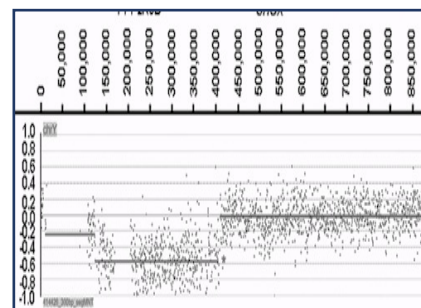


mutacje punktowe



Indels

(insercje/delecje
do 100 pz)

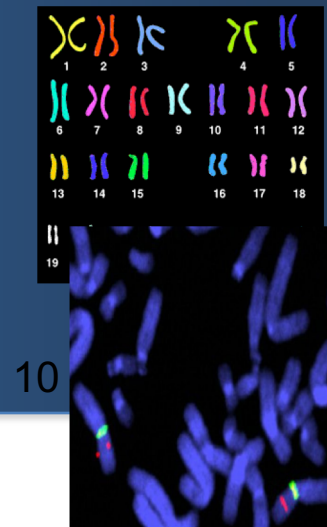
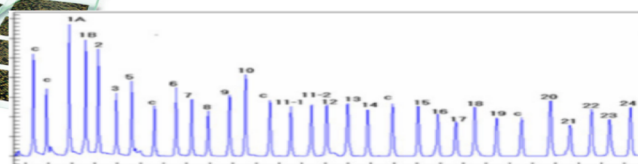
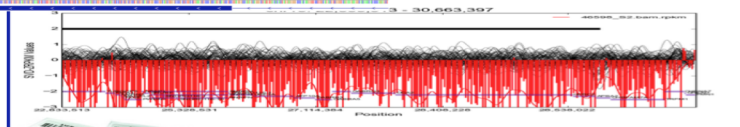
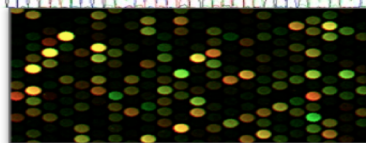
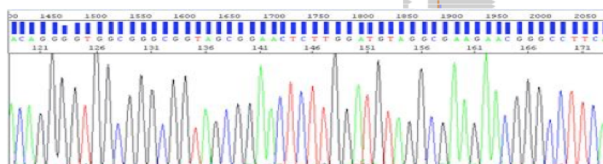
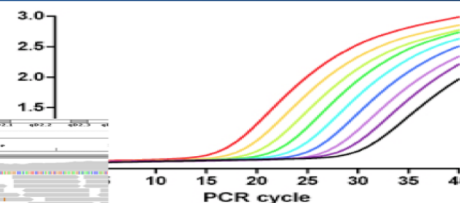
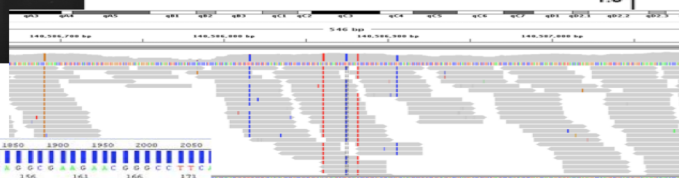
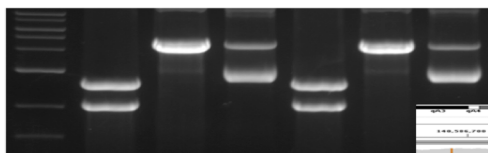


CNV

(warianty strukturalne
>100 pz do Mpz)



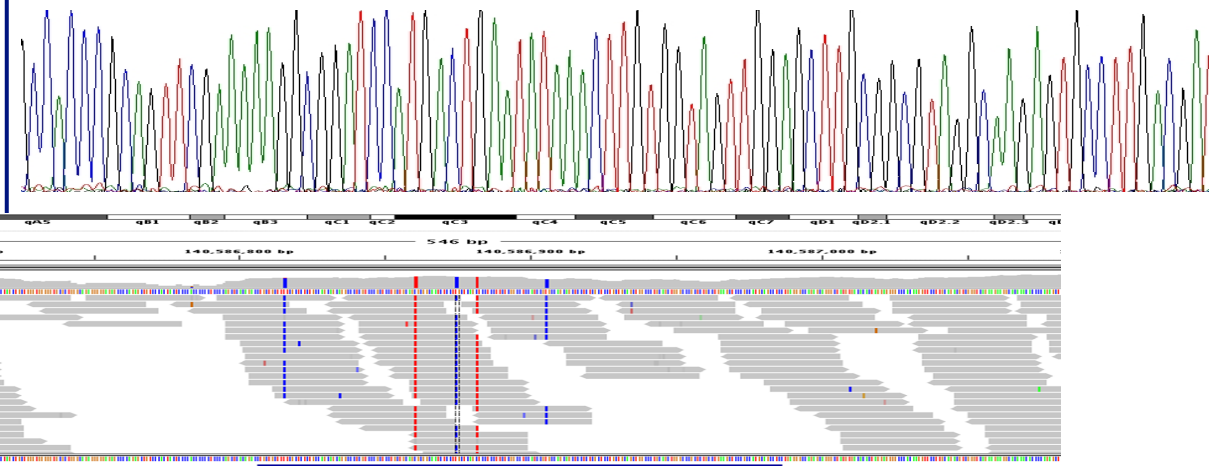
Aberracje
Chromosomowe
(zmiana struktury
lub liczby chromosomów)



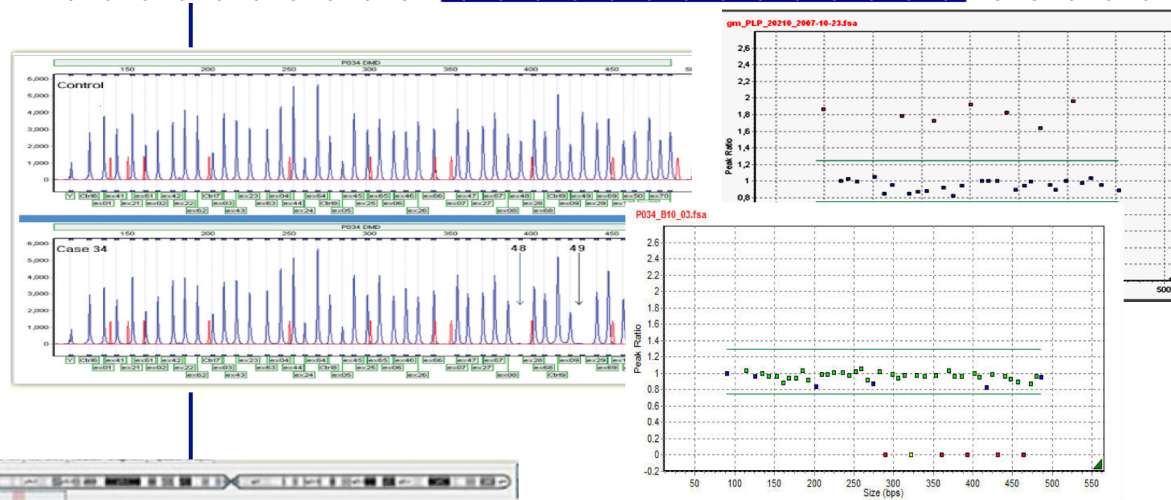
SEKWENCJONOWANIE

- metoda Sanger

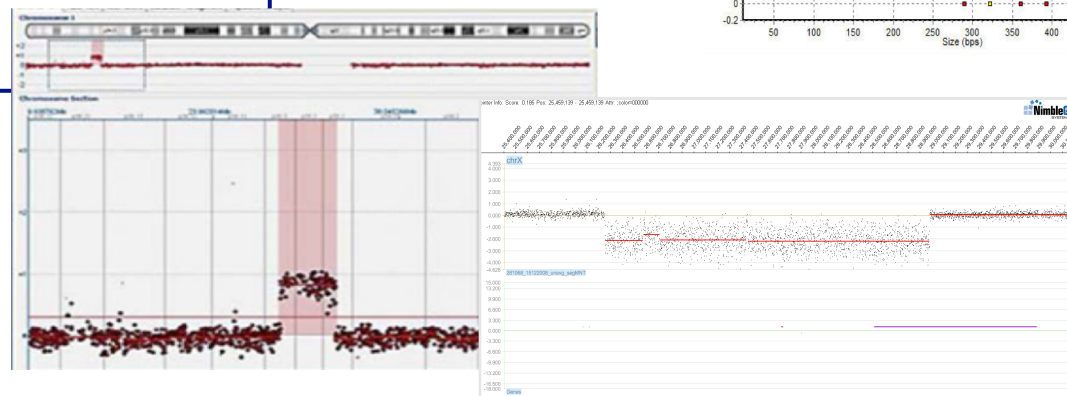
- NGS



MLPA



aCGH



ale.....

Sanger



A large, light-colored laboratory instrument, likely a DNA sequencer, with a sample loading slot and a control panel. It is situated on a green speckled countertop in a laboratory setting.

TTTTGTTTACCCCAATGATCATGCCAATC

TTTTGTTTACCCCAATGATCATGCCAATC

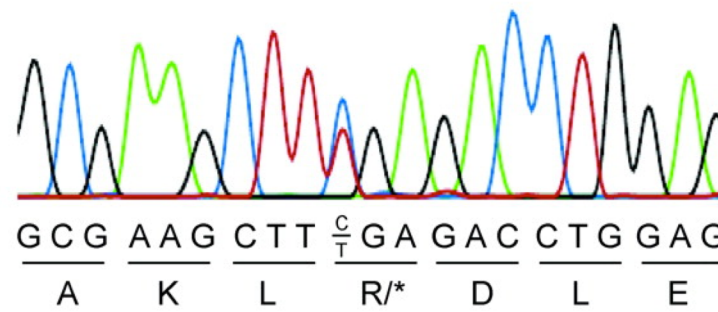
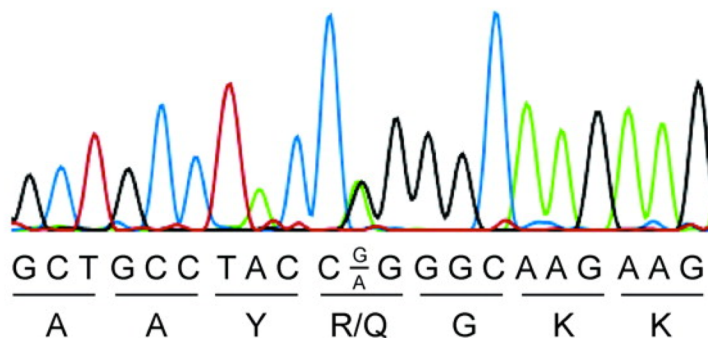
TTTTGTTTACCCCAATGATCATGCCAATC

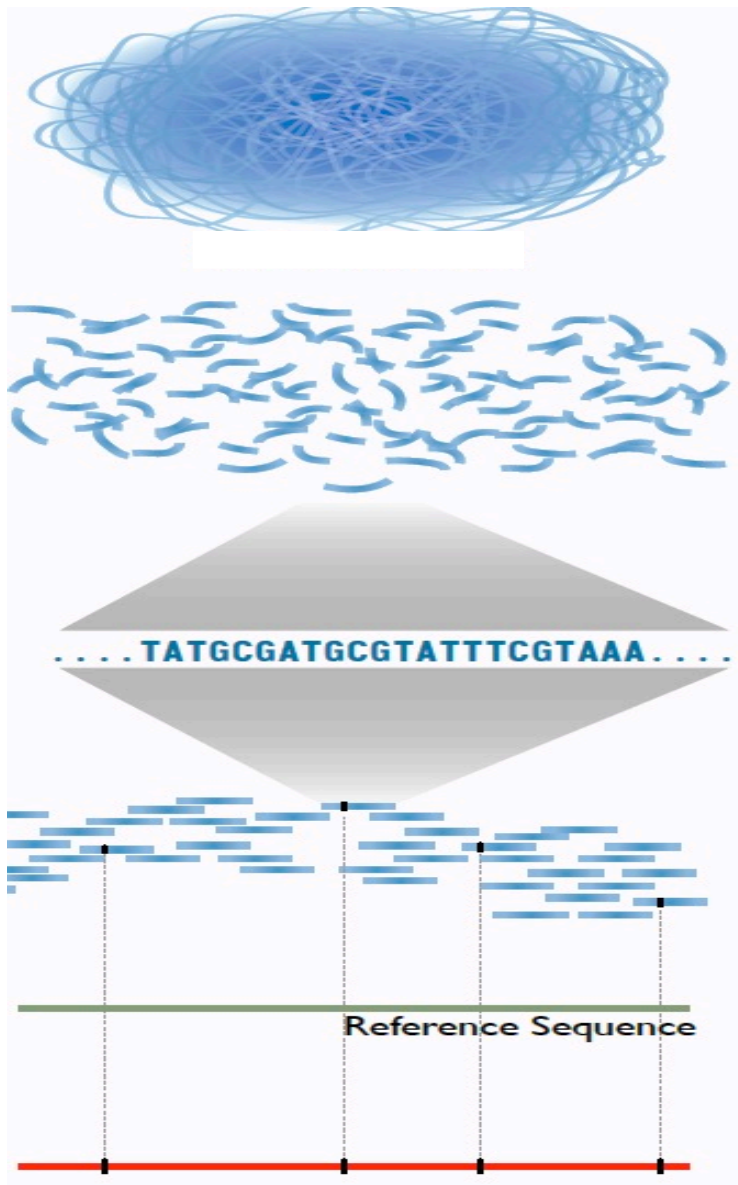
[illegible]

CTCCCACCCCCCTTCAGCTGGCAGCCAAGGAGGCGAAGCTTTGAGACCTGGAGGACTCACTGGCCCGT

GTACACTCTCTGAGGTGGTGGCTGCCTACCGGGGCAAGAAGAGGAGCGAGG
ACACTCTCTGAGGTGGTGGCTGCCTACCGGGGCAAGAAGAGGAGCGAGGTT
ACACTCTCTGAGGTGGTGGCTGCCTACCGGGGCAAGAAGAGGAGCGAGGCC
ACACTCTCTGAGGTGGTGGCTGCCTACCGGGGCAAGAAGAGGAGCGAGGCC
ACACTCTCTGAGGTGGTGGCTGCCTACCGGGGCAAGAAGAGGAGCGAGGCC
ACACTCTCTGAGGTGGTGGCTGCCTACCGGGGCAAGAAGAGGAGCGAGGCC
ACACTCTCTGAGGTGGTGGCTGCCTACCGGGGCAAGAAGAGGAGCGAGGCC
ACACTCTCTGAGGTGGTGGCTGCCTACCGGGGCAAGAAGAGGAGCGAGGCC
ACACTCTCTGAGGTGGTGGCTGCCTACCGGGGCAAGAAGAGGAGCGAGGCC
ACACTCTCTGAGGTGGTGGCTGCCTACCGGGGCAAGAAGAGGAGCGAGGCC
ACACTCTCTGAGGTGGTGGCTGCCTACCGGGGCAAGAAGAGGAGCGAGGCC
ACTCTCTGAGGTGGTGGCTGCCTACCGGGGCAAGAAGAGGAGCGAGGCCCC
ACTCTCTGAGGTGGTGGCTGCCTACCGGGGCAAGAAGAGGAGCGAGGCCCC
GAGGTGGTGGCTGCCTACCGGGGCAAGAAGAGGAGCGAGGCCCGCCCCCT
GGTGGTGGCTGCCTACCGGGGCAAGAAGAGGAGCGAGGCCCGCCCCACA
GGTGGTGGCTGCCTACCGGGGCAAGAAGAGGAGCGAGGCCCGCCCCACA
TGCTTACCAGGGCAAGAAGAGGAGCGAGGCCCGCCCCACATC
ACAGGGCAAGAAGAGGAGCGAGGCCCGCCCCACATC
ACCAGGGCAAGAAGAGGAGCGAGGCCCGCCCCACATC
ACCGGGCAAGAAGAGGAGCGAGGCCCGCCCCACATC
ACCAGGGCAAGAAGAGGAGCGAGGCCCGCCCCACATC
GGGGCAAGAAGAGGAGCGAGGCCCGCCCCACATC
AAGGGGGGGCAAGAAGAGGAGCGAGGCCCGCCCCACATC
GGGCAAGAAGAGGAGCGAGGCC
GGGCAAGAAGAGGAGCGAGGCCCGCCCCACATC
GGCAAGAGAGGAGCGAGGCCCGCCCCACATC

CCTCAGCTGGCAGCCAAGGAGGCCGAAGCTTTGAGACCTGGAGGACTCACT
CCTCAGCTGGCAGCCAAGGAGGCCGAAGCTTTGAGACCTGGAGGACTCACT
CCTCAGCTGGCAGCCAAGGAGGCCGAAGCTTTGAGACCTGGAGGACTCACT
CCTCAGCTGGCAGCCAAGGAGGCCGAAGCTTTGAGACCTGGAGGACTCACT
CCTCAGCTGGCAGCCAAGGAGGCCGAAGCTTTGAGACCTGGAGGACTCACT
CCTCAGCTGGCAGCCAAGGAGGCCGAAGCTTTGAGACCTGGAGGACTCACT
CCTCAGCTGGCAGCCAAGGAGGCCGAAGCTTTGAGACCTGGAGGACTCACT
CCTCAGCTGGCAGCCAAGGAGGCCGAAGCTTTGAGACCTGGAGGACTCACT
CCTCAGCTGGCAGCCAAGGAGGCCGAAGCTTTGAGACCTGGAGGACTCACT
CCTCAGCTGGCAGCCAAGGAGGCCGAAGCTTTGAGACCTGGAGGACTCACT
CCTCAGCTGGCAGCCAAGGAGGCCGAAGCTTTGAGACCTGGAGGACTCACT
CCTCAGCTGGCAGCCAAGGAGGCCGAAGCTTTGAGACCTGGAGGACTCACT
CCTCAGCTGGCAGCCAAGGAGGCCGAAGCTTTGAGACCTGGAGGACTCACT
CCTCAGCTGGCAGCCAAGGAGGCCGAAGCTTTGAGACCTGGAGGACTCACT
CCTCAGCTGGCAGCCAAGGAGGCCGAAGCTTTGAGACCTGGAGGACTCACT
CCTCAGCTGGCAGCCAAGGAGGCCGAAGCTTTGAGACCTGGAGGACTCACT
TTCAGCTGGCAGCCAAGGAGGCCGAAGCTTCGAGACCTGGAGGACTCACTG
TCAGCTGGCAGCCAAGGAGGCCGAAGCTTCGAGACCTGGAGGACTCACTGG
TCAGCTGGCAGCCAAGGAGGCCGAAGCTTCGAGACCTGGAGGACTCACTGG
TCAGCTGGCAGCCAAGGAGGCCGAAGCTTCGAGACCTGGAGGACTCACTGG
TCAGCTGGCAGCCAAGGAGGCCGAAGCTTCGAGACCTGGAGGACTCACTGG
TCAGCTGGCAGCCAAGGAGGCCGAAGCTTCGAGACCTGGAGGACTCACTGG





DNA genomowy pacjenta

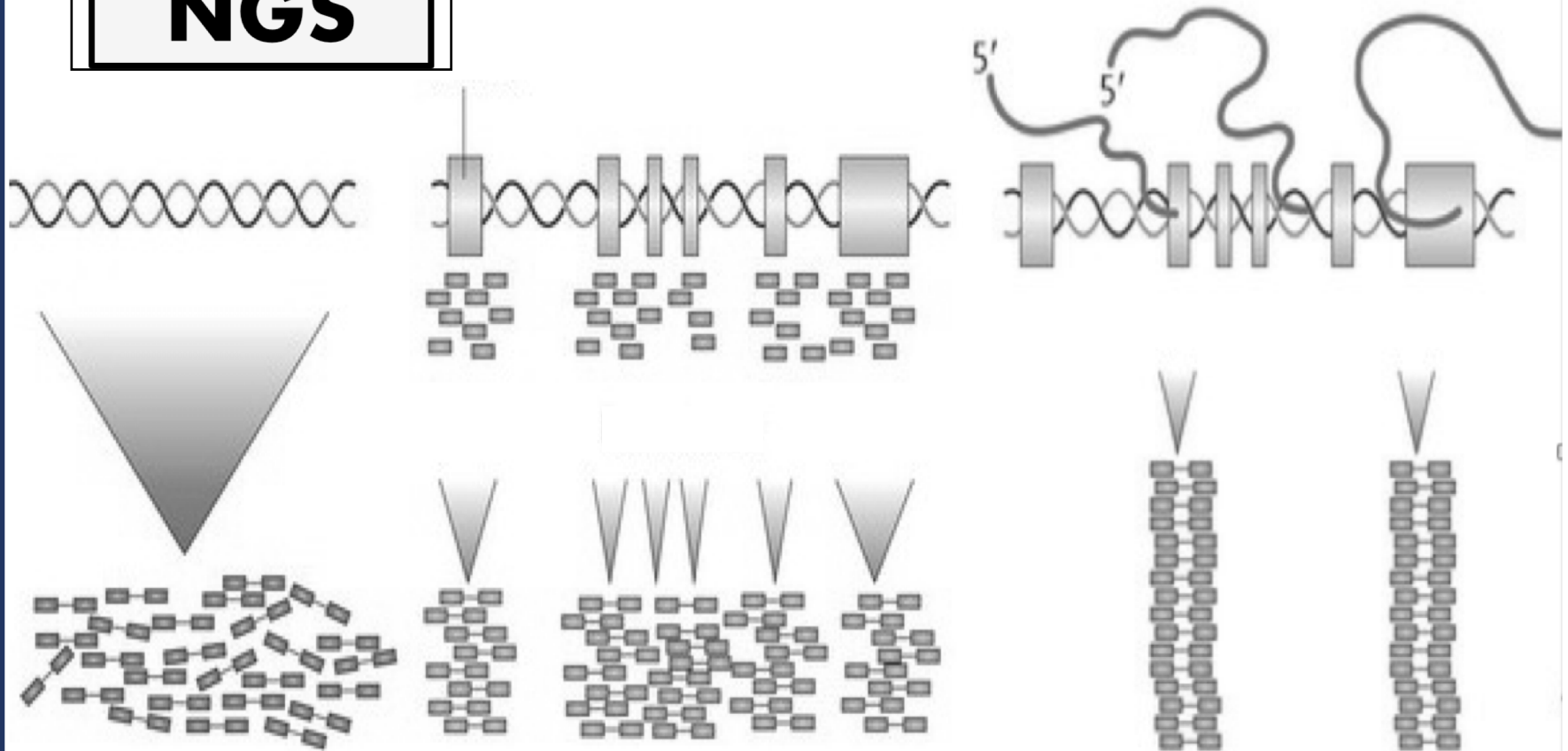
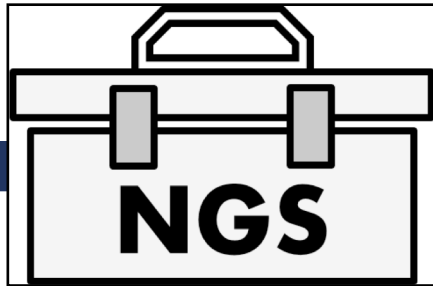
fragmentacja

odczyt sekwencji
milionów fragmentów

uliniowanie odczytów
(przyporównanie do sekwencji referencyjnej)

identyfikacja wariantów sekwencji
odbiegających od sekwencji referencyjnej

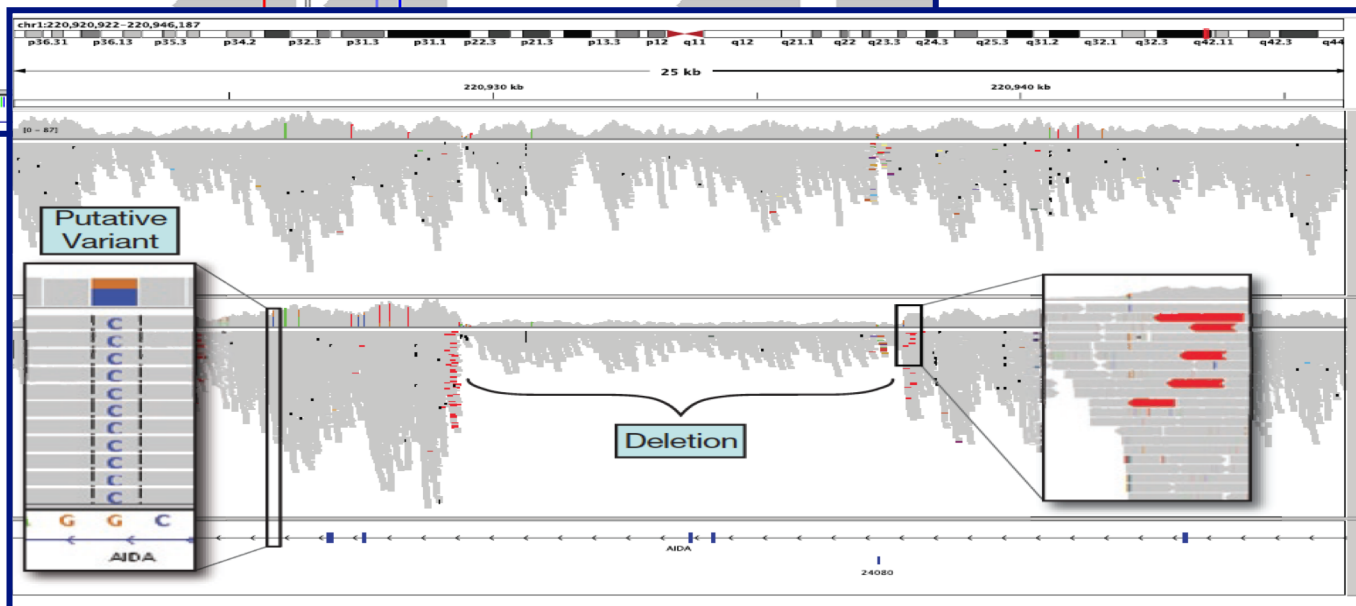
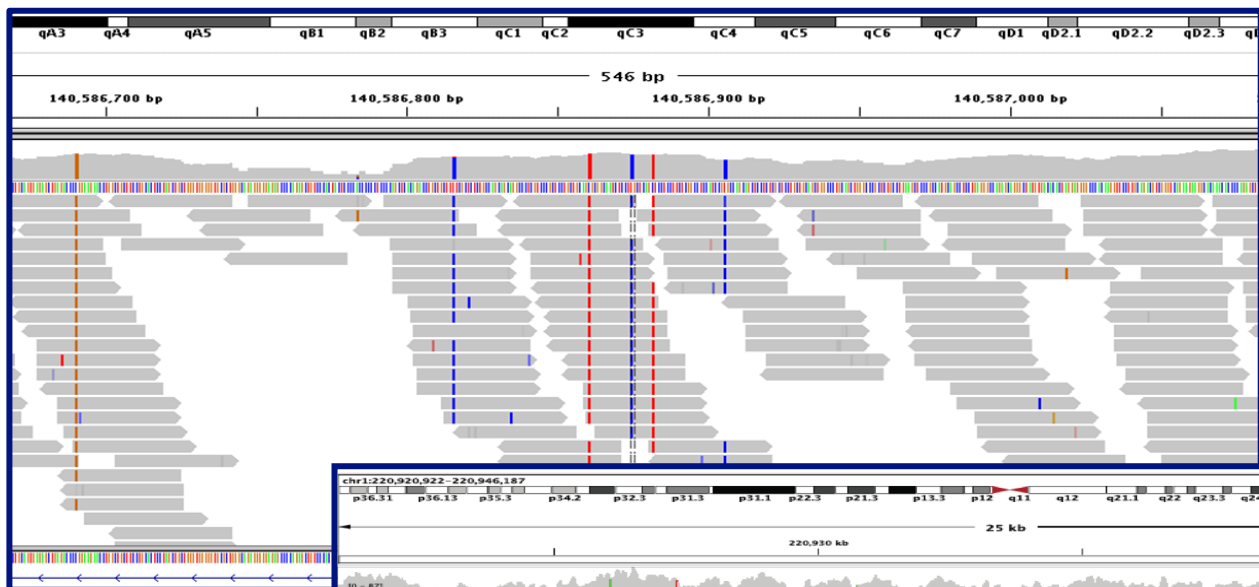
Sekwencjonowanie Następnej Generacji (Next Generation Sequencing – NGS)



Genom

**Eksom
(1% genomu)**

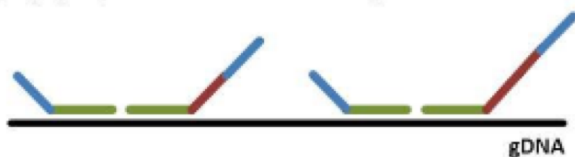
Panel



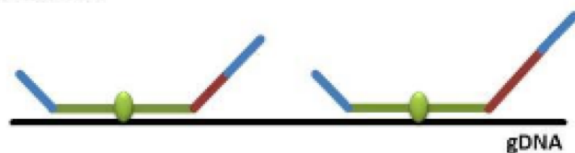
1. Sondy połówkowe MLPA



2. Hybrydyzacja sond do zdenturowanego DNA



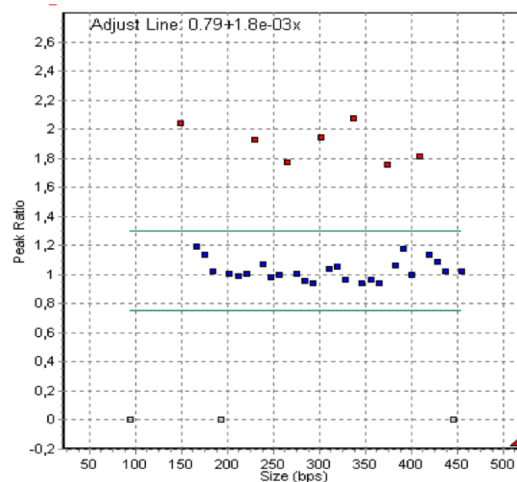
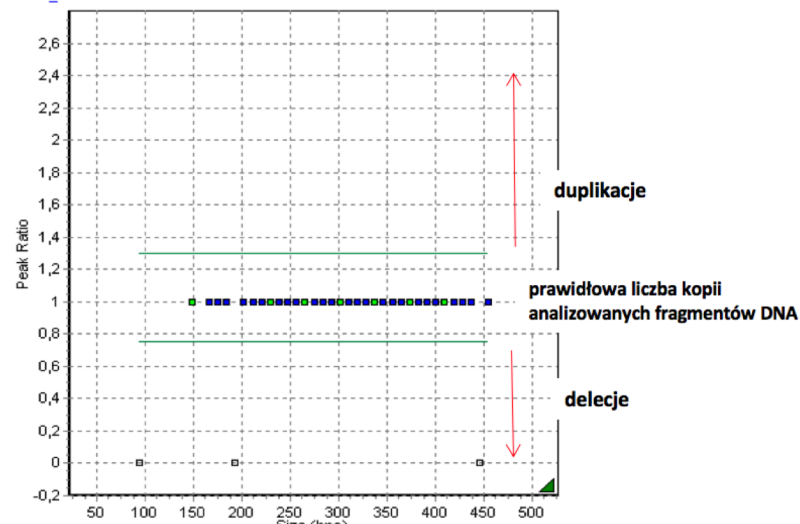
3. Ligacja sond



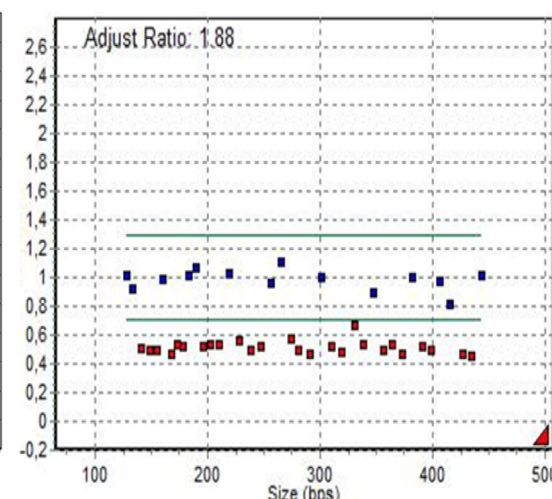
4. Denaturacja gDNA i zligowanych sond MLPA



5. Multipleksowa reakcja PCR



PLP1 dup / PMD (XR)

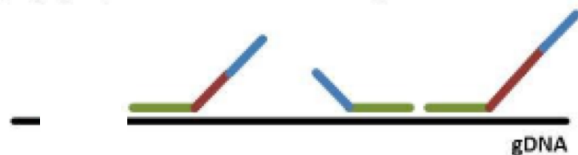


SCN1A del / DS (AD)

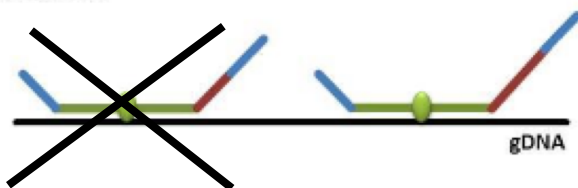
1. Sondy połówkowe MLPA



2. Hybrydyzacja sond do zdenturowanego DNA



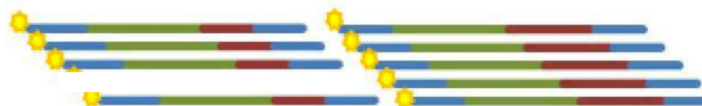
3. Ligacja sond



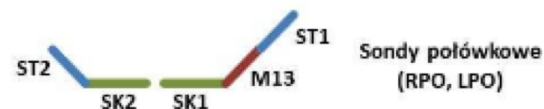
4. Denaturacja gDNA i zligowanych sond MLPA



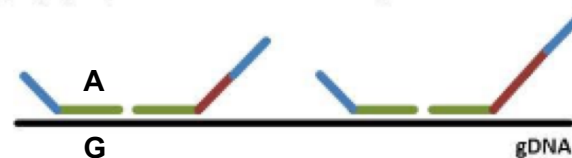
5. Multipleksowa reakcja PCR



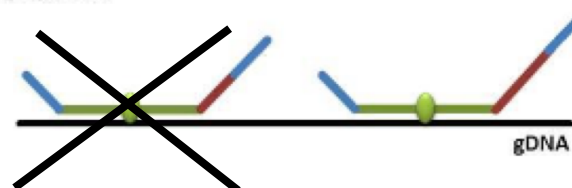
1. Sondy połówkowe MLPA



2. Hybrydyzacja sond do zdenturowanego DNA



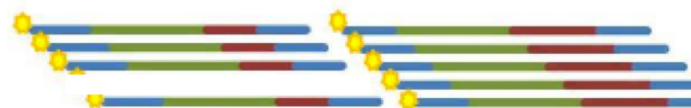
3. Ligacja sond



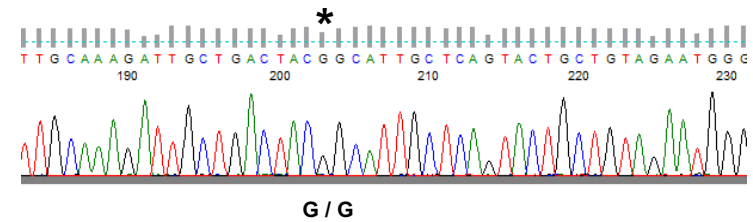
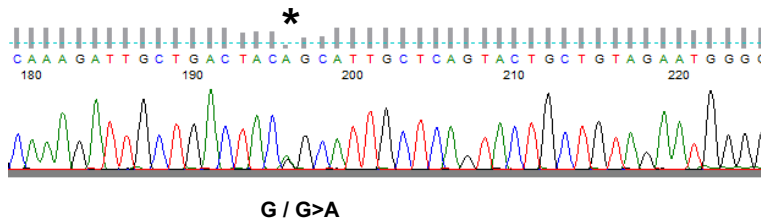
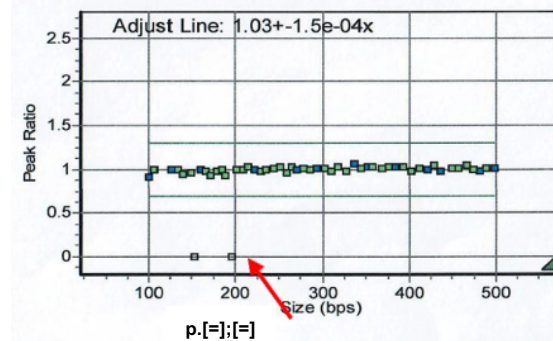
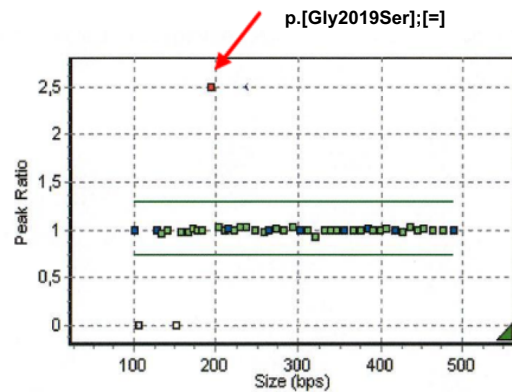
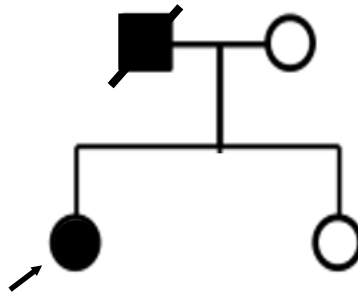
4. Denaturacja gDNA i zligowanych sond MLPA



5. Multipleksowa reakcja PCR



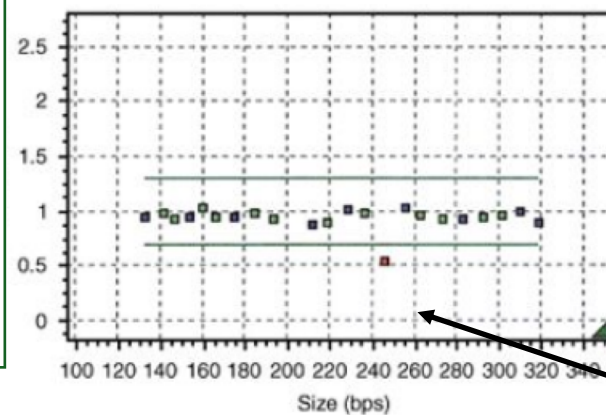
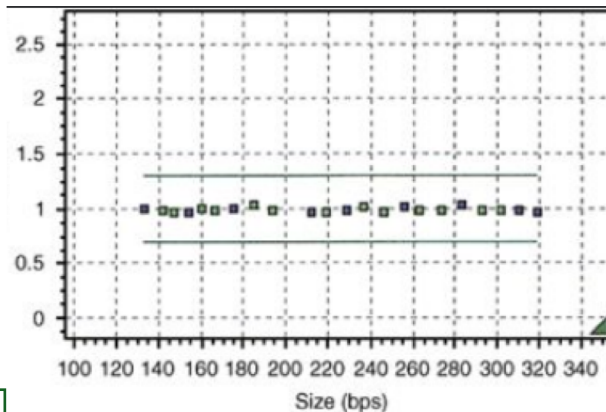
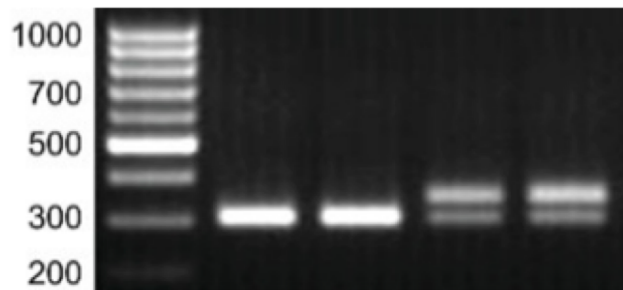
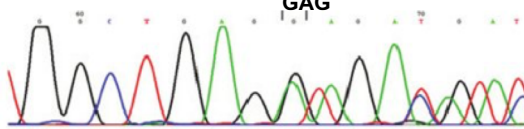
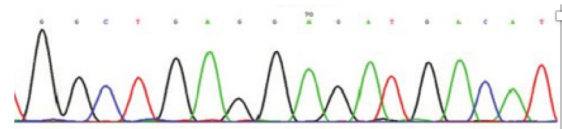
LRRK2 p.Gly2019Ser / LO-PD (AD)



DYT1

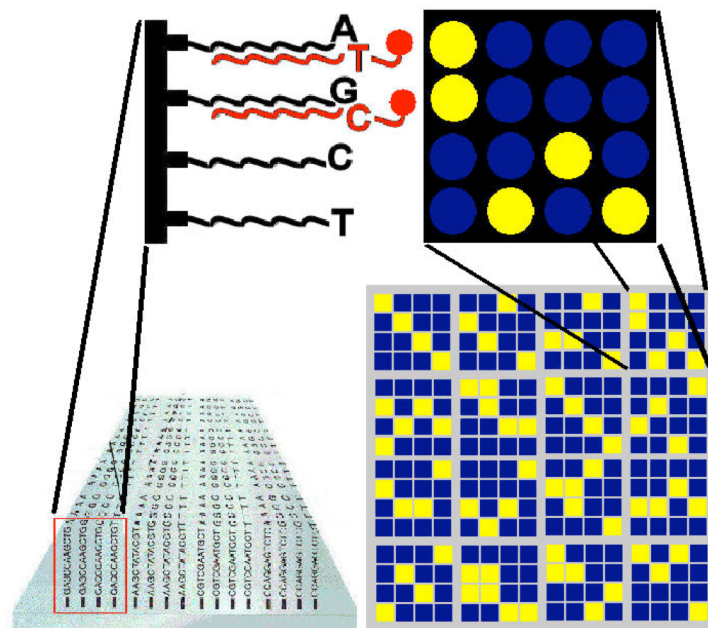
– najczęstsza mutacja 904-906 del GAG/TOR1A

5'... GAGGAG(N)₁₀... 3'
3'... CTCCTC(N)₈... 5'

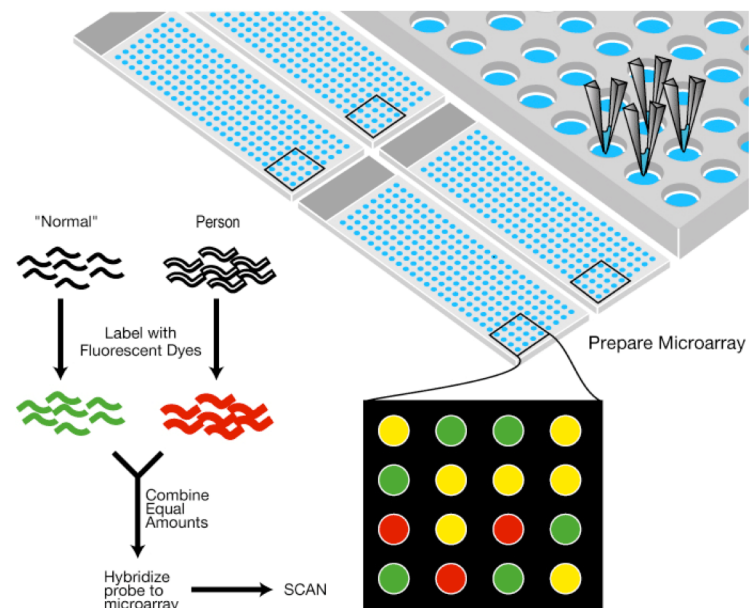


del GAG

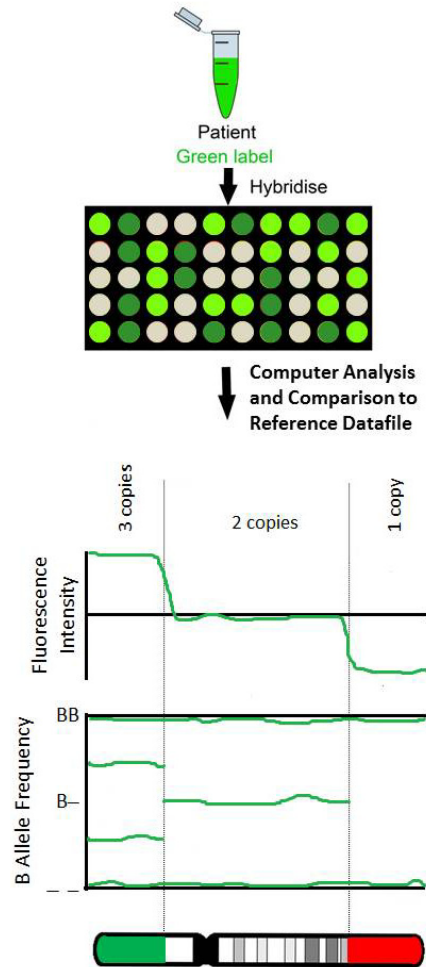
SNVs



CNVs

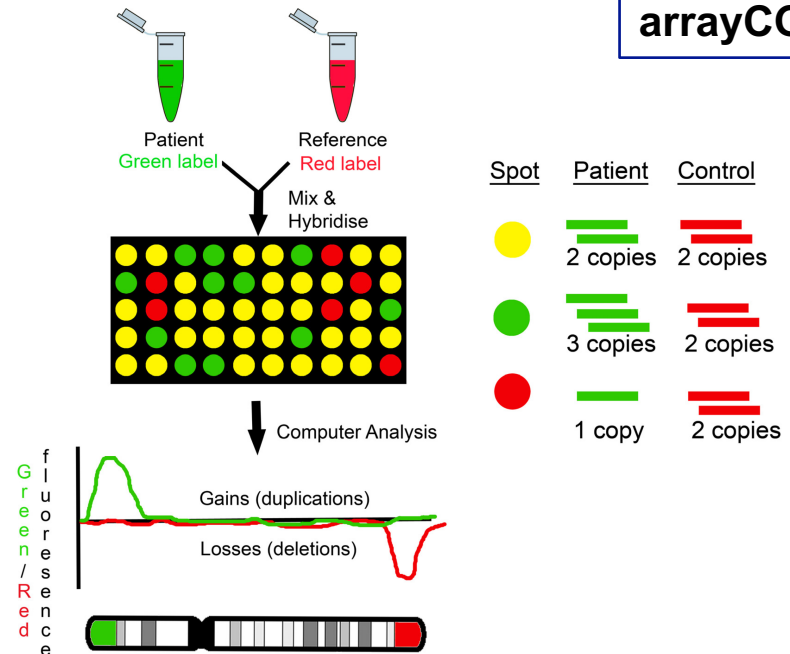


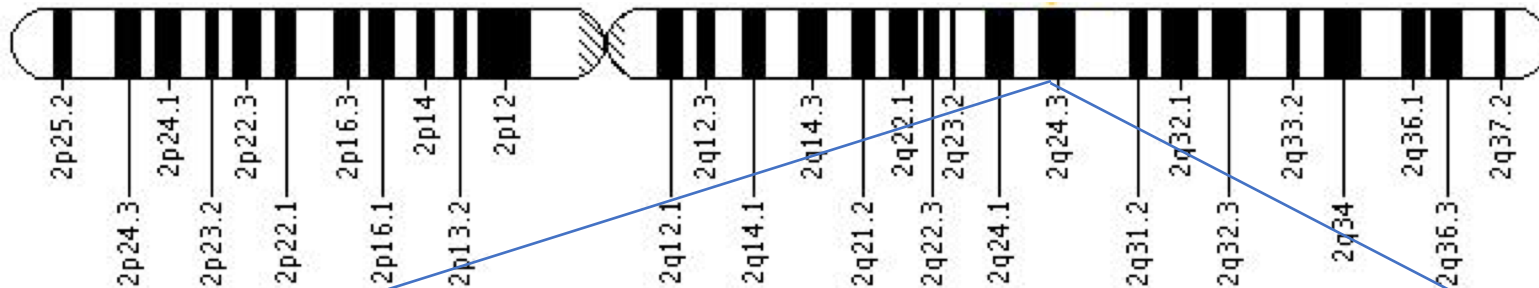
DNA microarray chip (SNV)



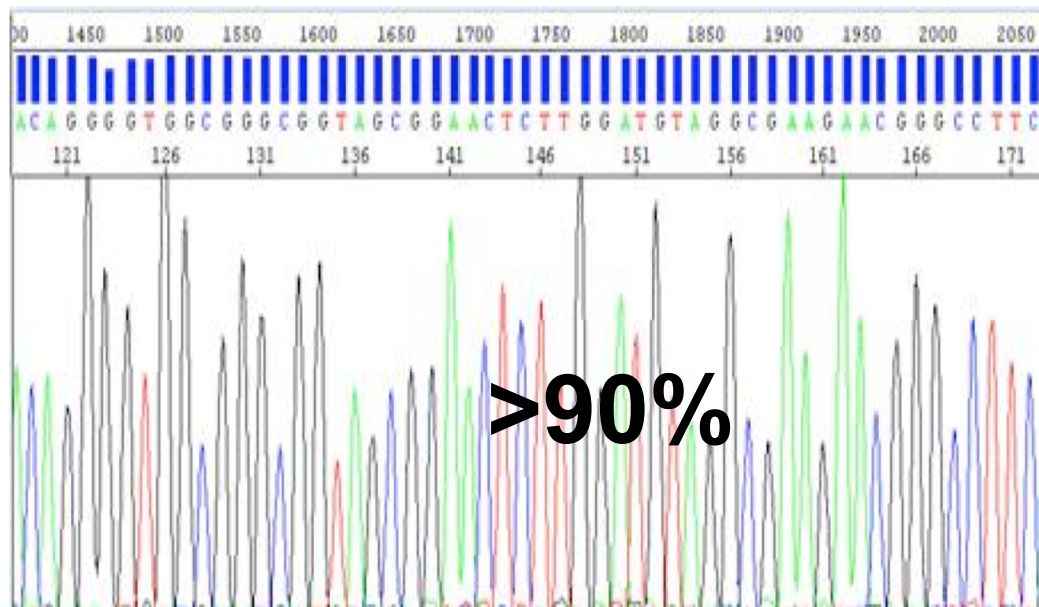
Genotype	Spot		
	Allele A	Allele B	
AA	●	●	2 copies
AB	●	●	
BB	●	●	
A-	●	●	1 copy
B-	●	●	
--	●	●	0 copies
AAA	●	●	3 copies
AAB	●	●	
ABB	●	●	
BBB	●	●	

arrayCGH (CNV)

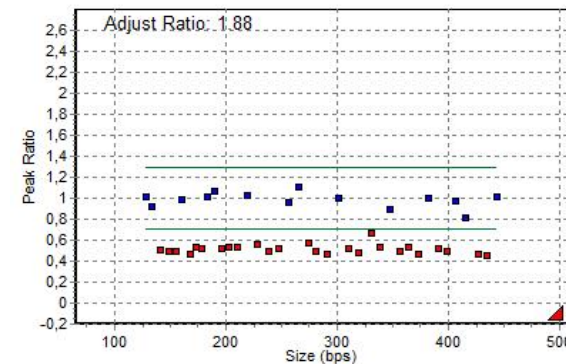




*Gen SCN1A (MIM ID *182389); locus 2q24*



mutacje punktowe



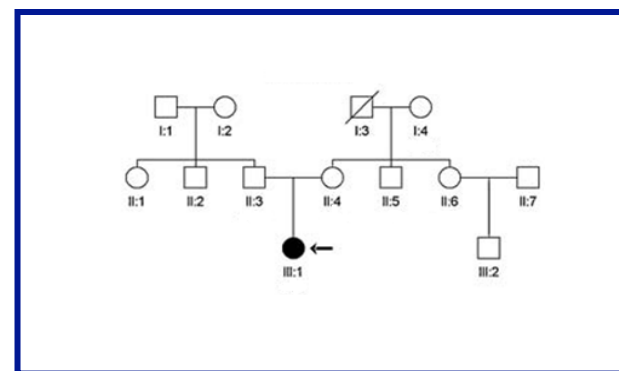
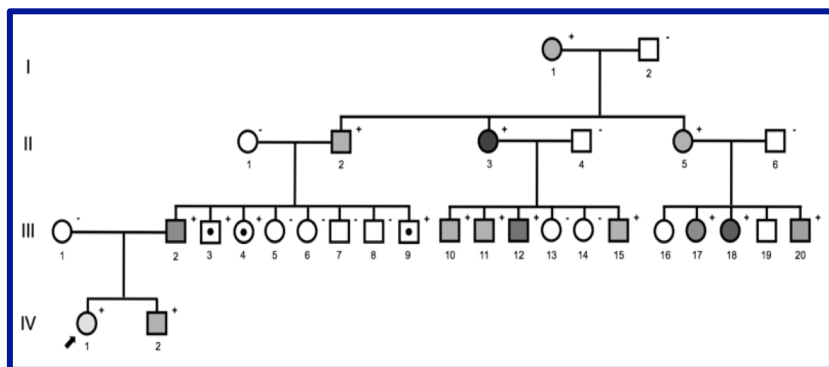
delecje/duplikacje

Spektrum chorób związanych z mutacjami genu *SCN1A*

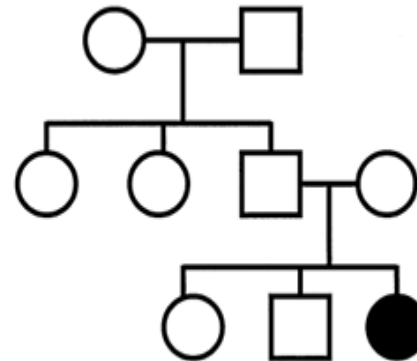
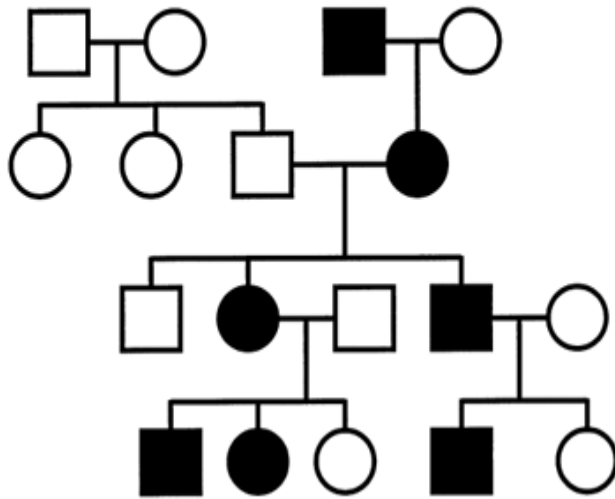
GEFS+

SCN1A

Dravet Syndrome



Dziedziczenie autosomalne dominujące (AD)

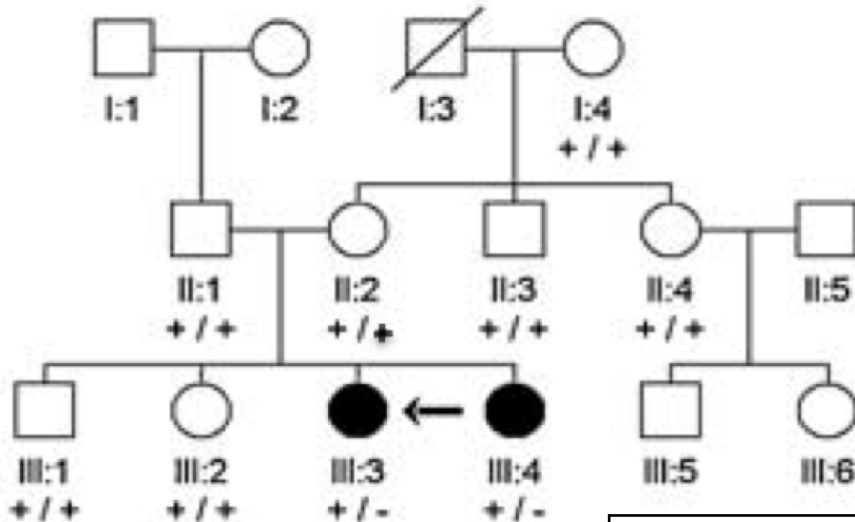
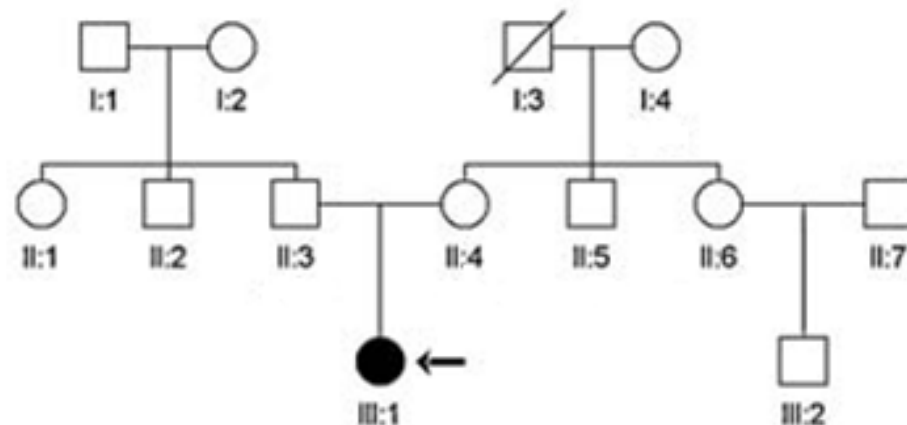


AD mutacja de novo

Typowy rodowód (dziedziczenie pionowe, niezależne od płci)

Izolowany przypadek choroby w rodzinie jako wynik nowej mutacji

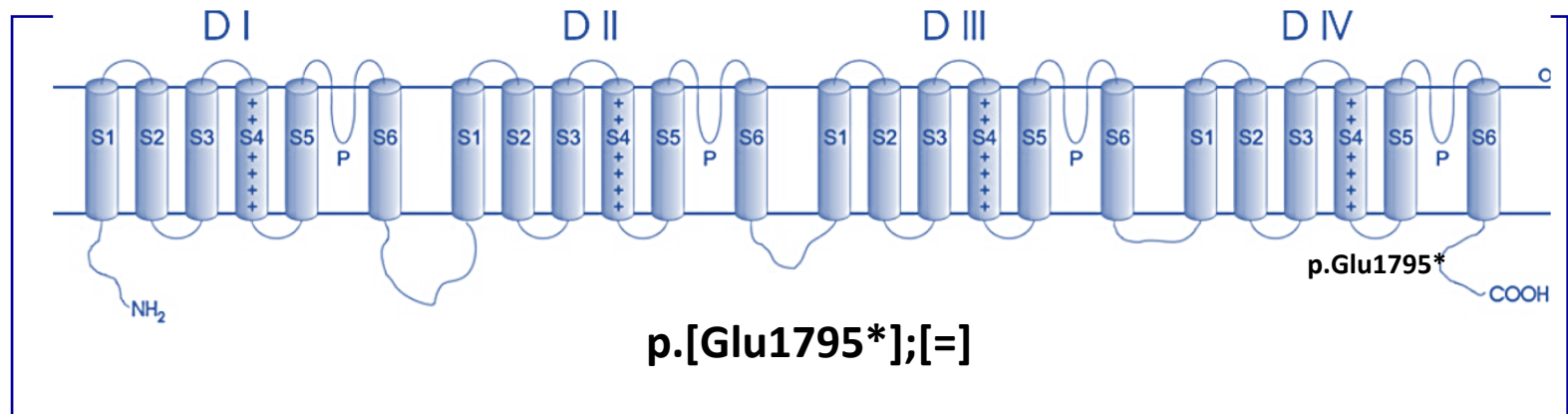
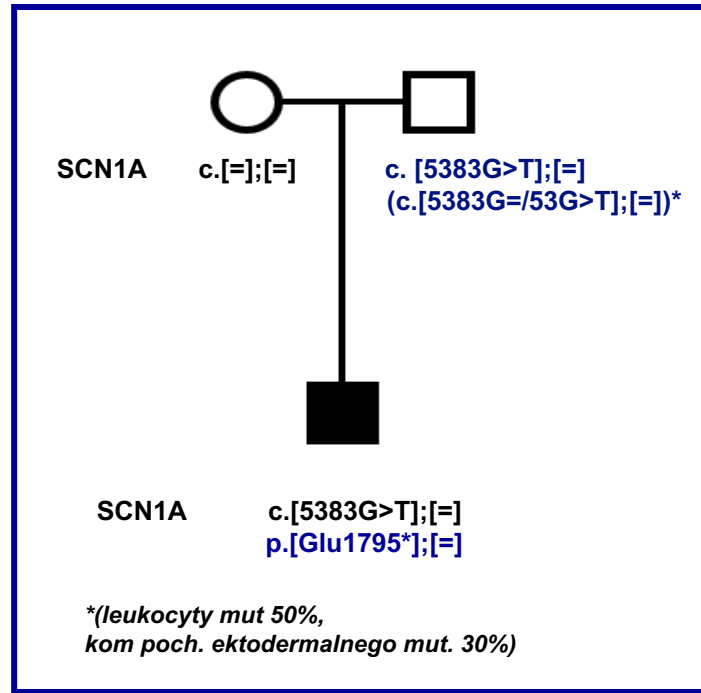
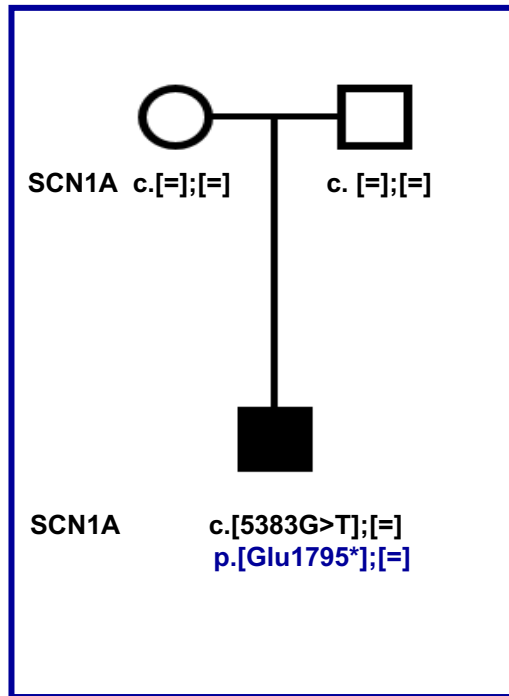
AD; mutacje *de novo* w rodowodzie
„przypadek sporadyczny”

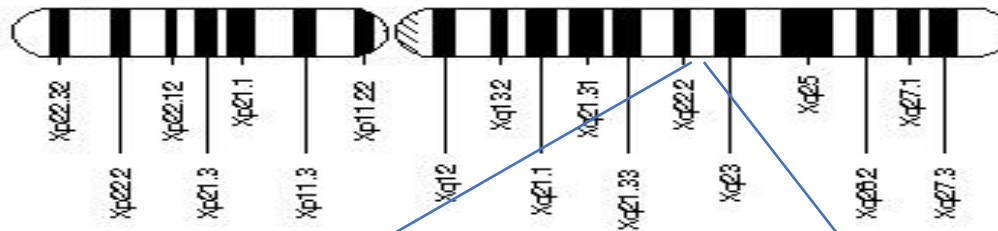


Mozaikowość

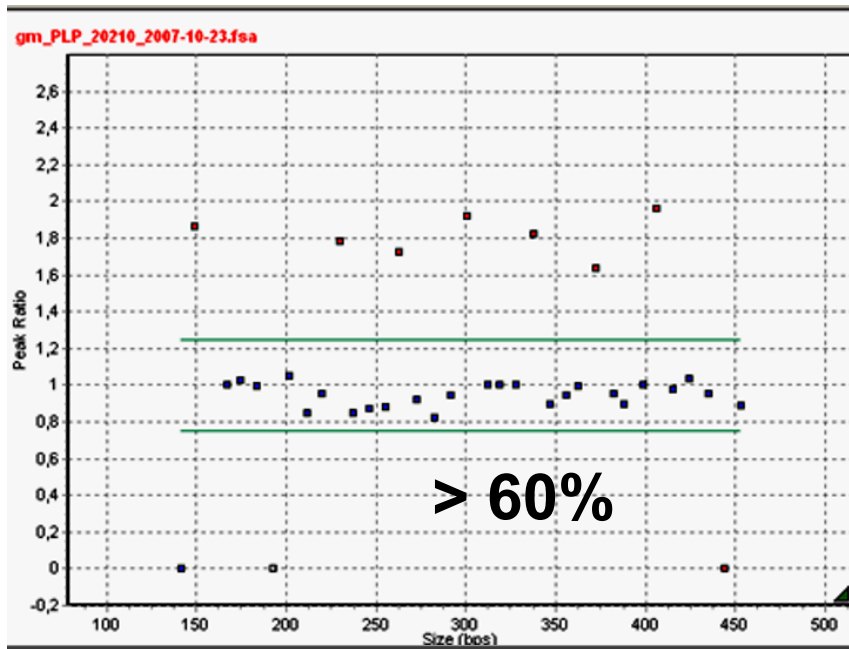
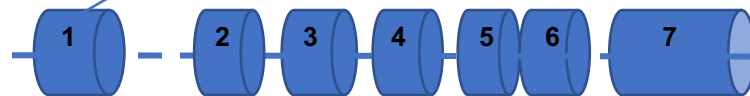
- obecność dwóch (lub więcej) genetycznie różnych linii komórkowych powstałych postzygotycznie
- mozaikowość germlinalna (dotycząca komórek rozrodczych) (mutacja zaszła na wczesnym etapie rozwoju embrionalnego, dotycząc progentitorowych komórek rozrodczych grupa komórek rozrodczych jest klonem zmutowanej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

Encefalopatia padaczkowa – zespół Dravet

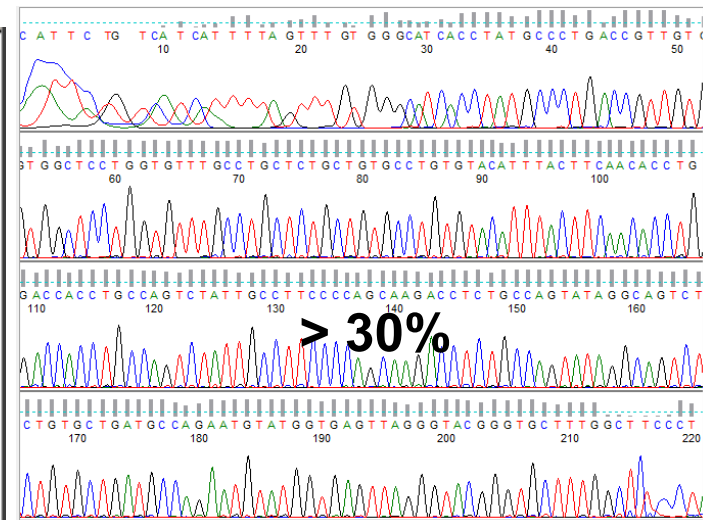




Gen PLP1 locus Xq22.2



delecje/duplikacje

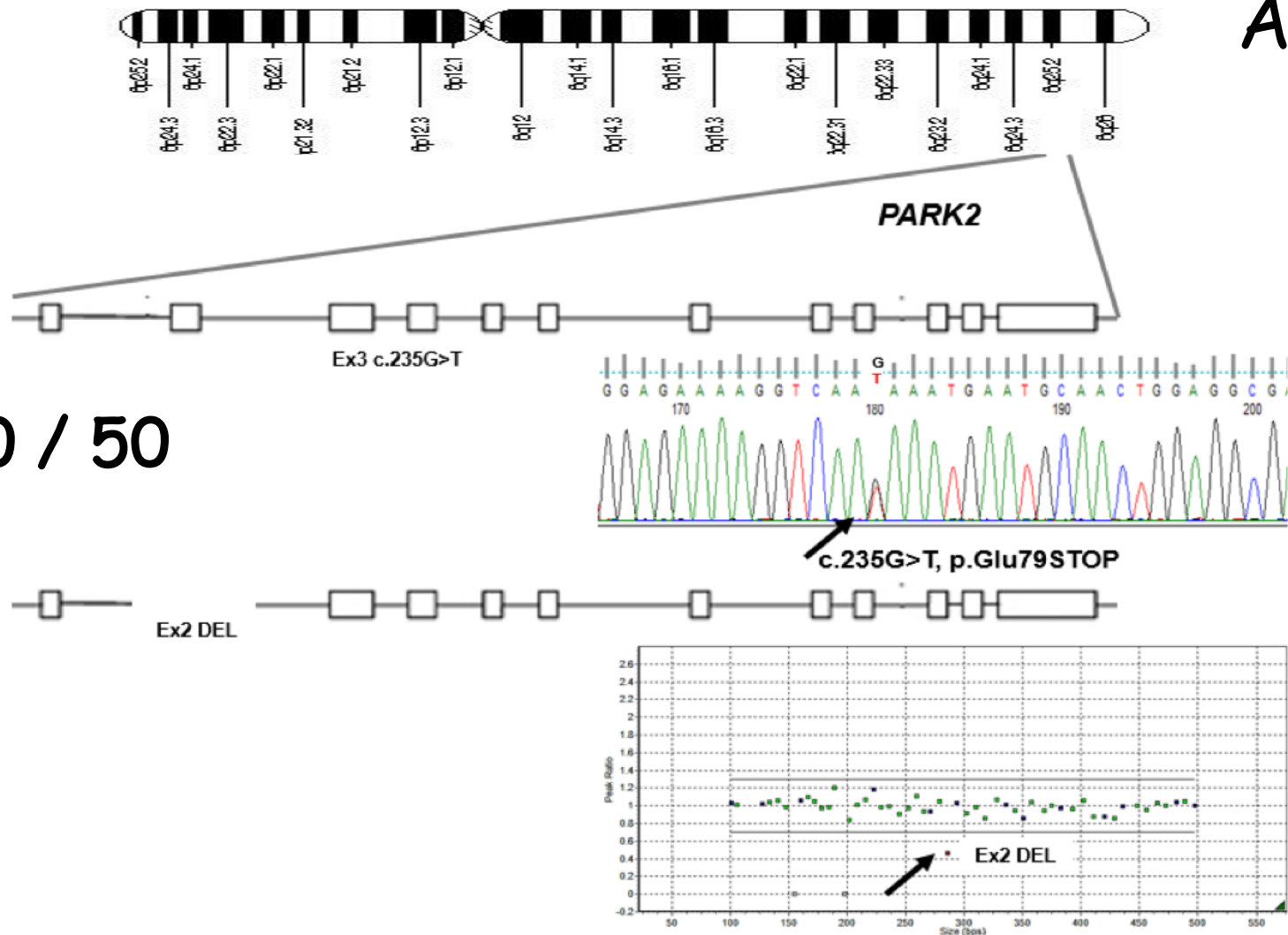


mutacje punktowe

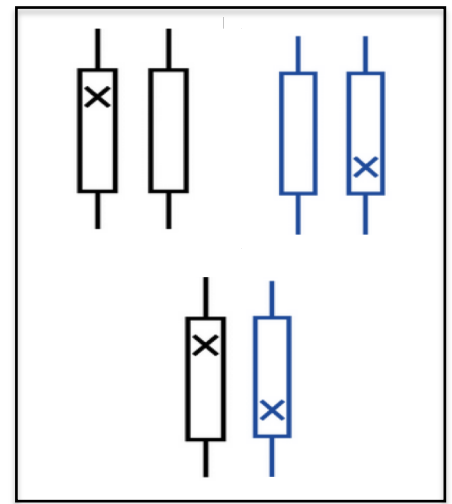
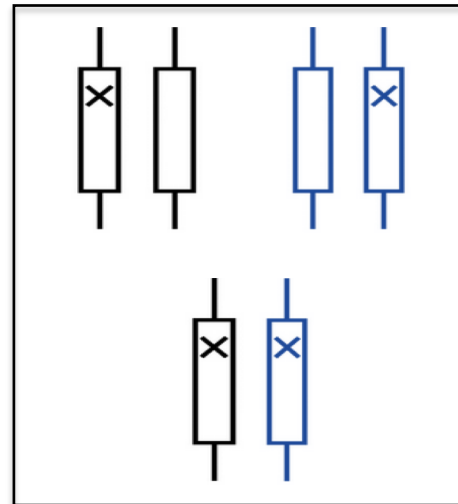
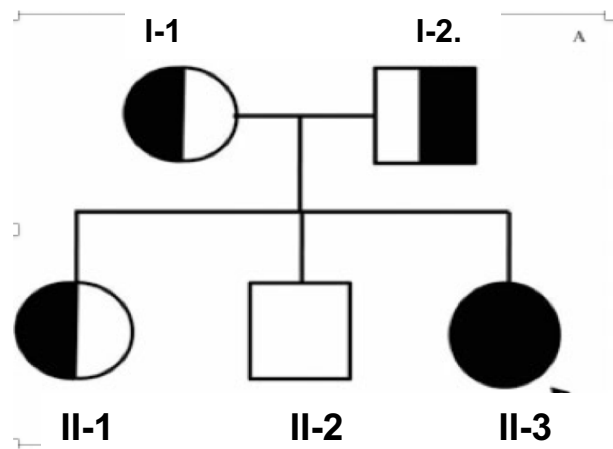
Choroba Parkinsona – o wczesnym początku (*PARK2*, *PINK1*, *DJ1*)

AR

50 / 50

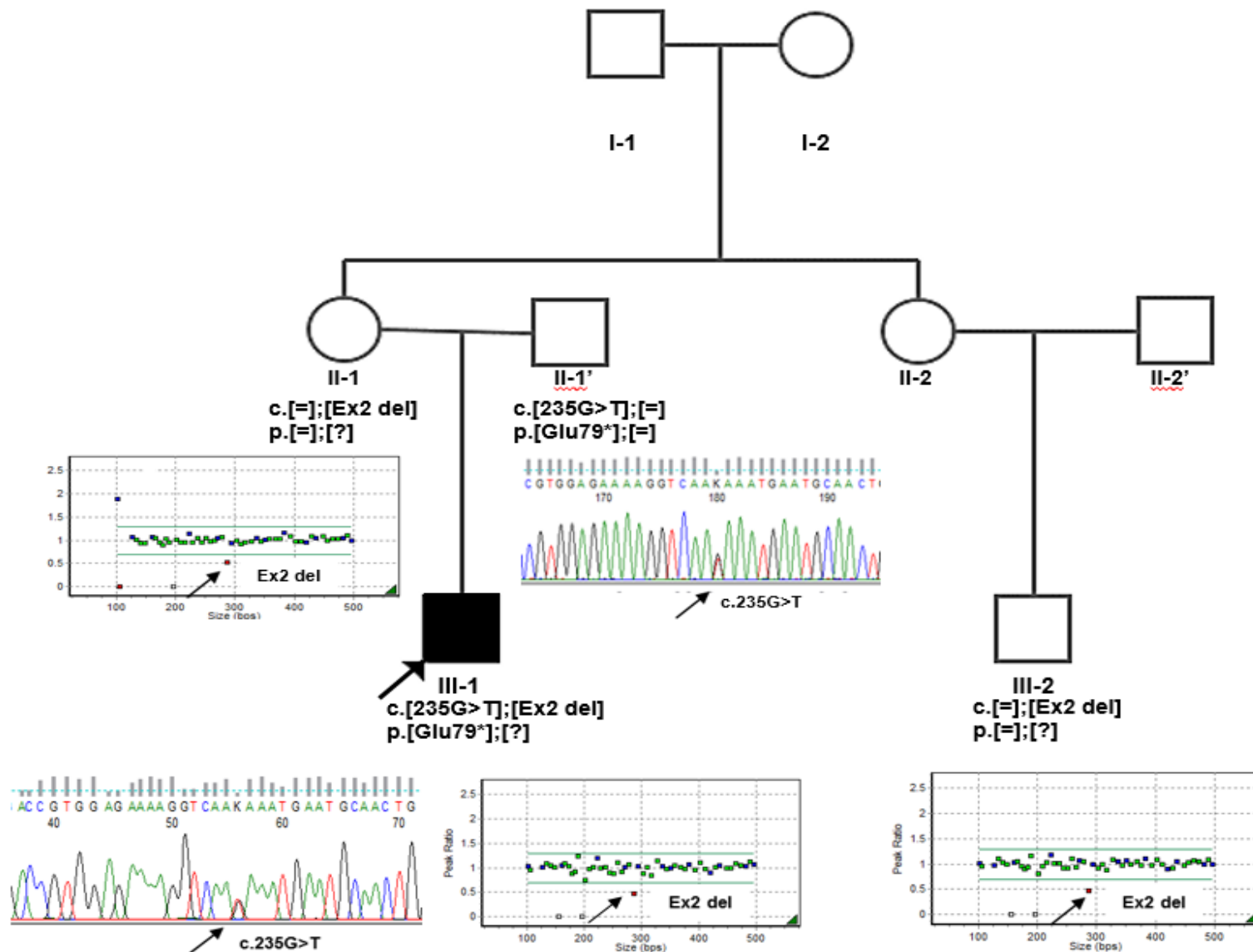


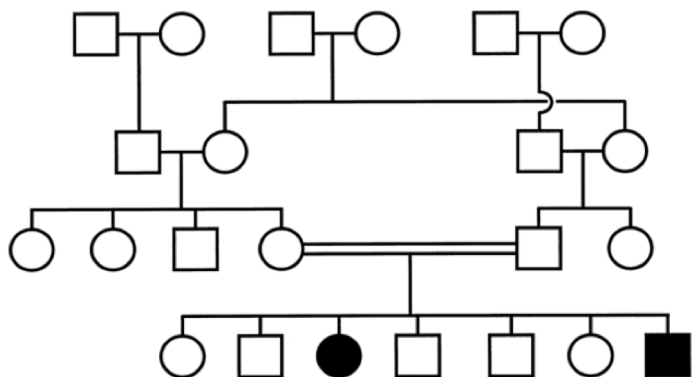
Analiza nosicielstwa rodziców - bialleliczności mutacji



W diagnostyce chorób AR wymóg wykazania bialleliczności mutacji
Analiza nosicielstwa rodziców

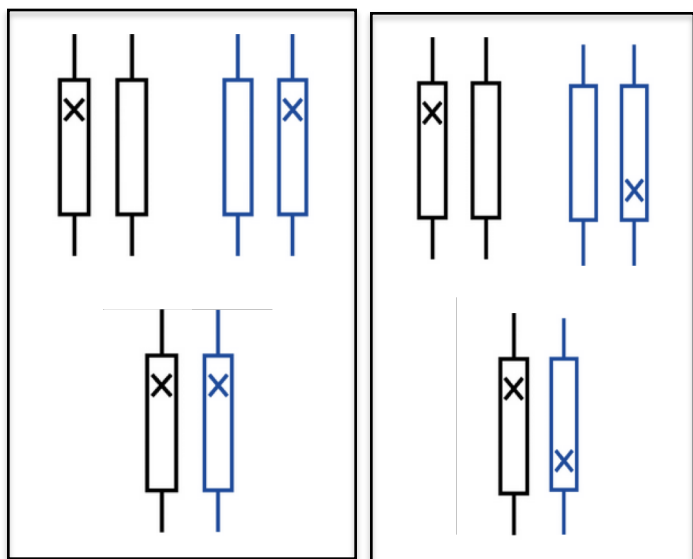
Analiza dziedziczenia mutacji w genie *PARK2* (EO_PD: AR)





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

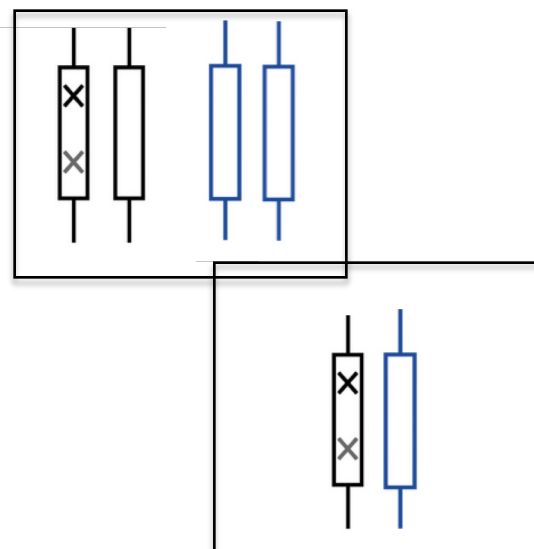
mutacje bialleliczne



homozygota

**heterozygota
złożona**

mutacje monoalleliczne



**heterozygota
złożona**



„...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

NEXT GENERATION SEQUENCING

WGS

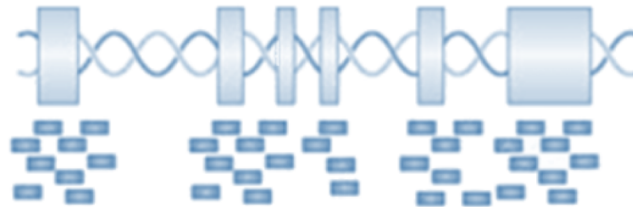
WES

Panel

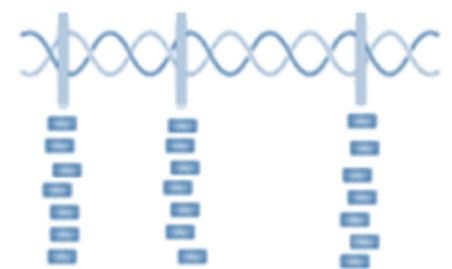
Whole genome sequencing



Whole exome sequencing

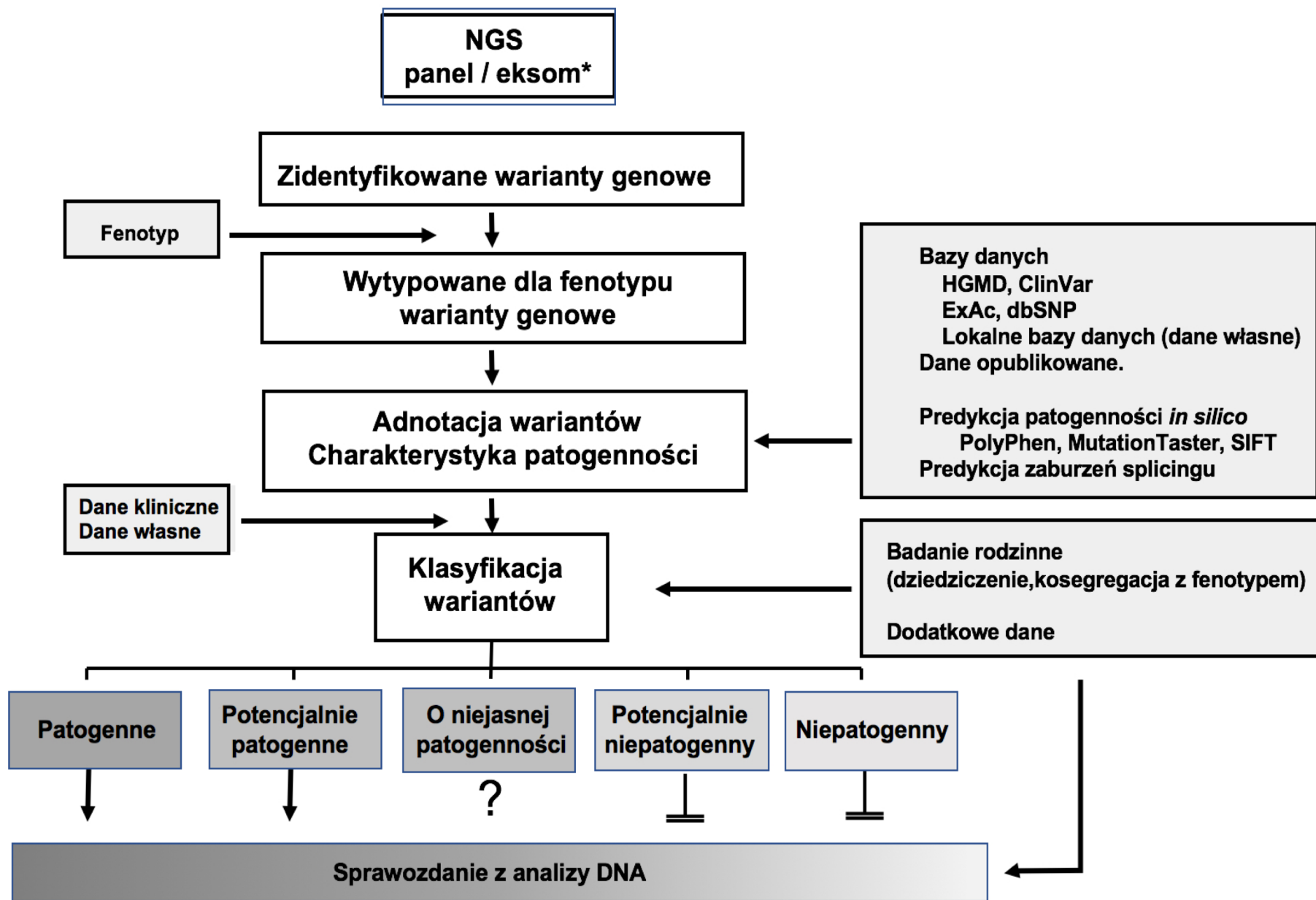


Targeted sequencing

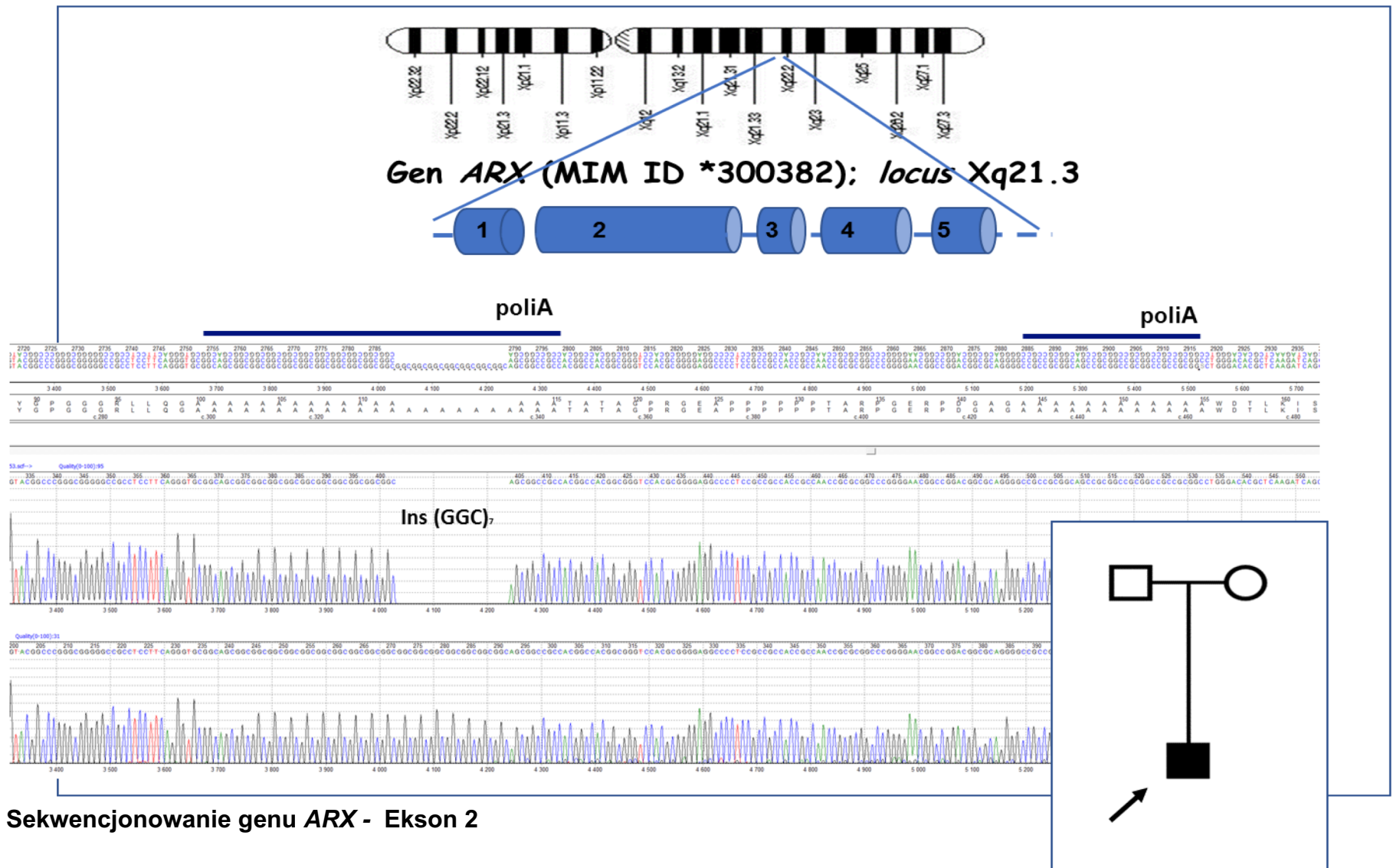


Jesteśmy w takim momencie, gdy przeprowadzanie testów genomowych (panelowego, cało eksomowe czy nawet całogenomowego), biorąc pod uwagę względy techniczne, może okazać się tańsze niż sekwencjonowanie pojedynczego genu

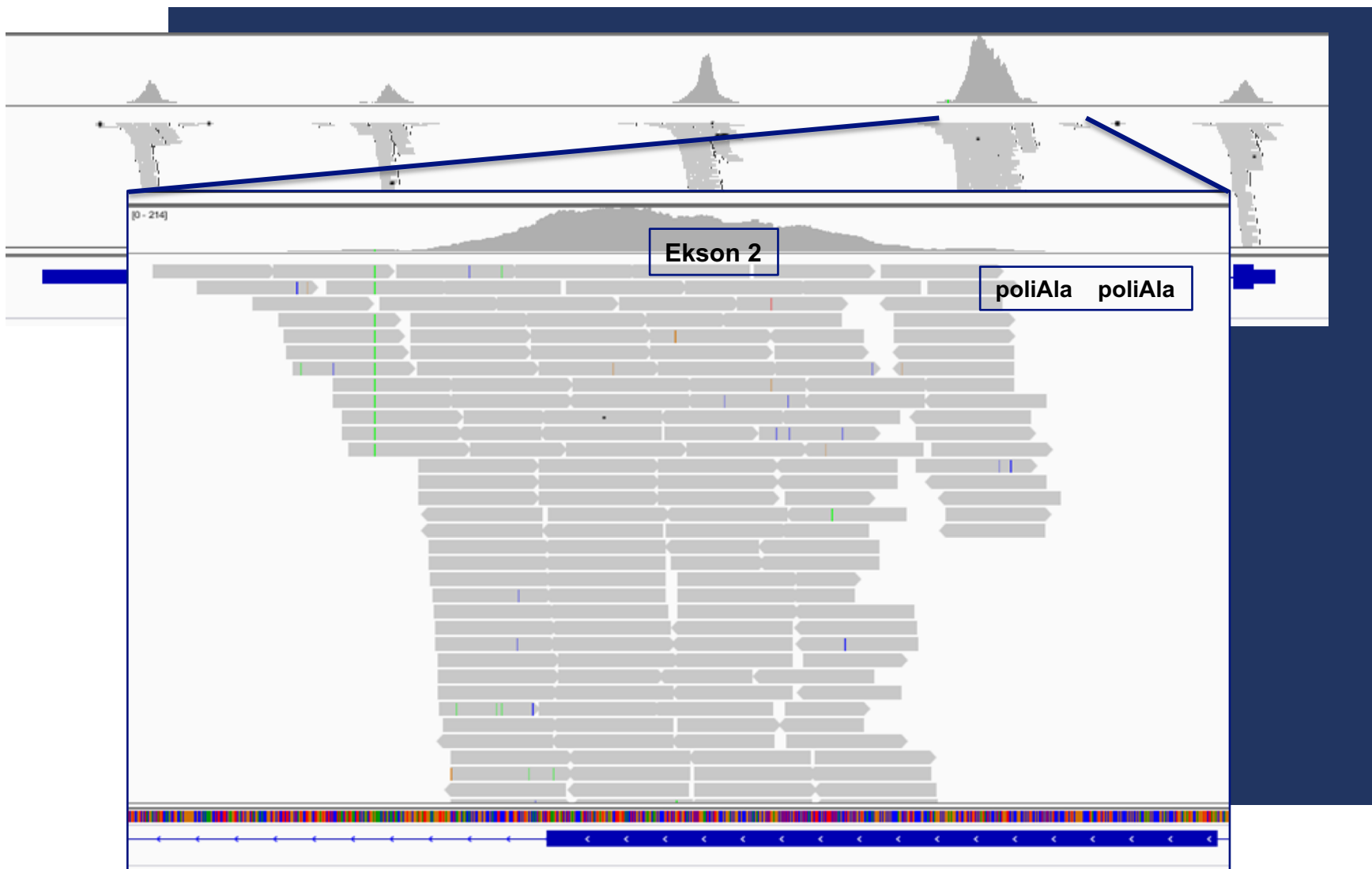
Cechą tych podejść jest to, że uzyskiwane informacje często mają niepewne znaczenie.



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



ARX - TruSight One Sequencing Panel (Illumina)



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)

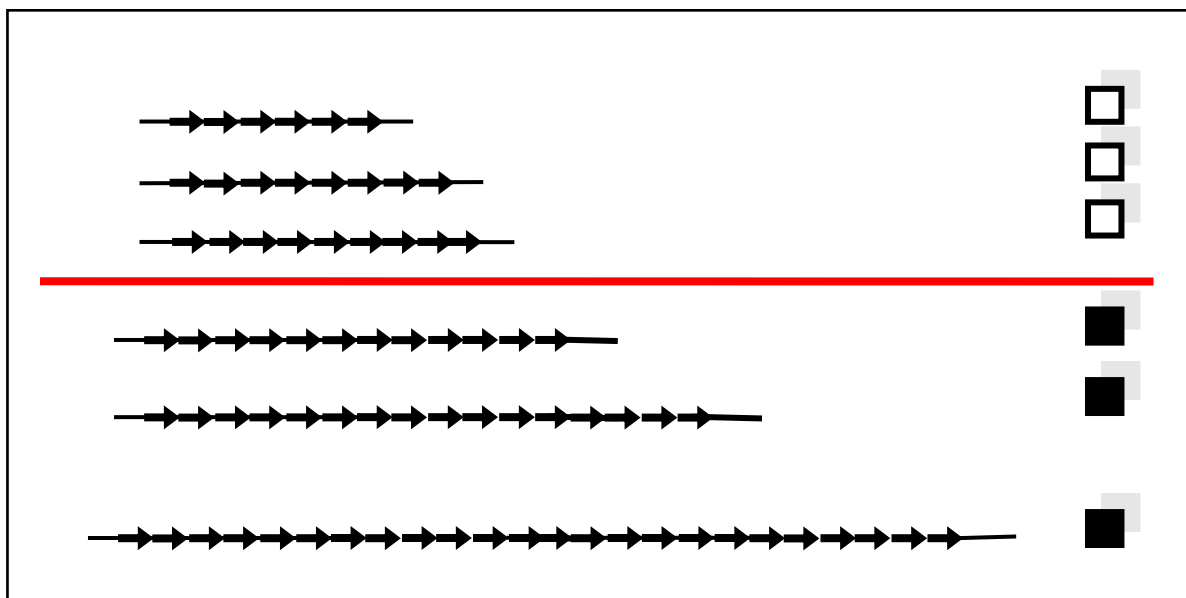
Mutacje dynamiczne

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

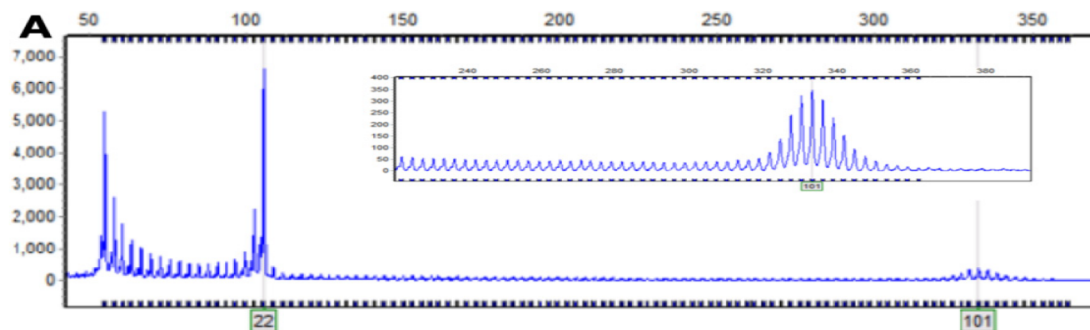
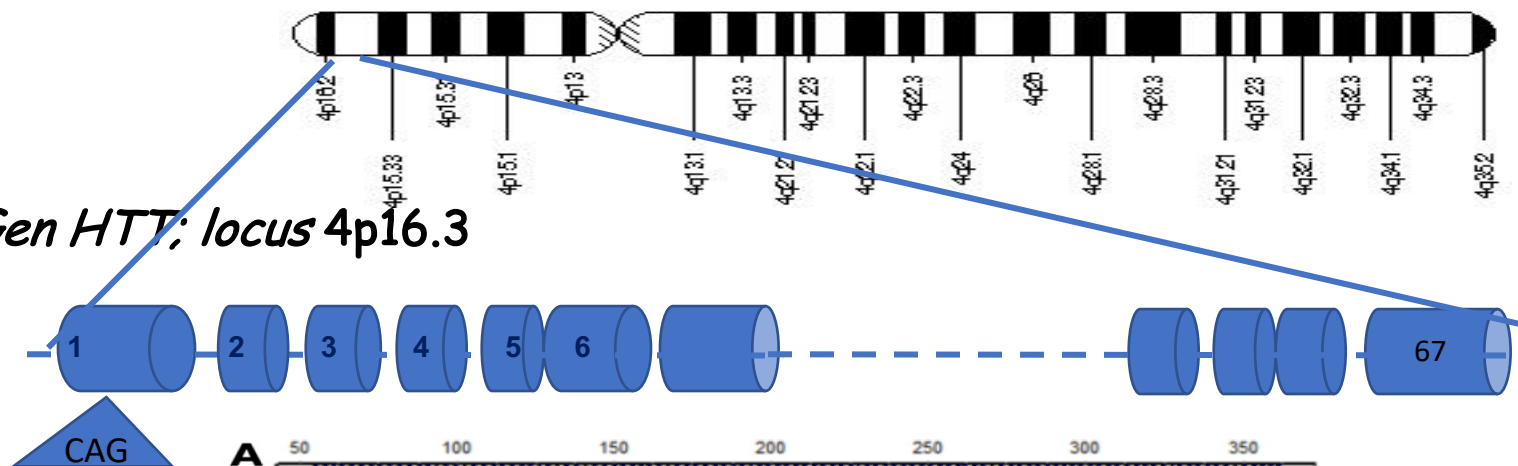
Mutacje dynamiczne

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

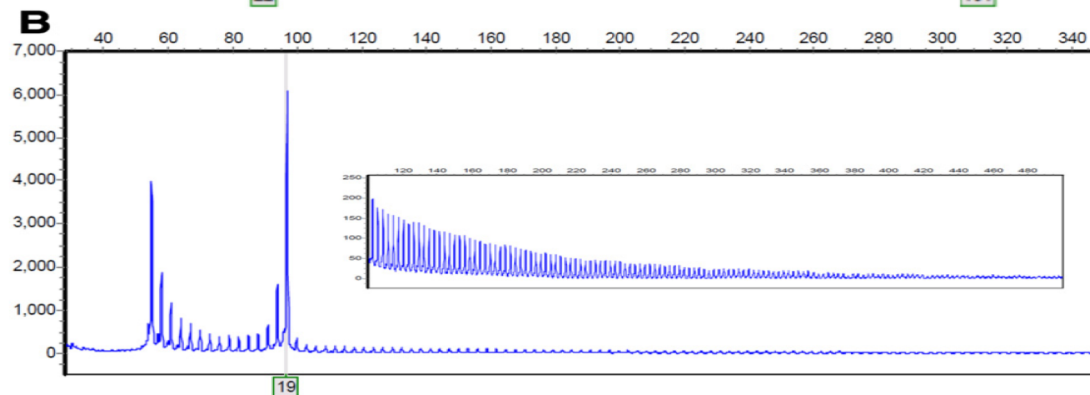


Choroba Huntingtona – mutacja dynamiczna; dziedziczenie AD

Gen HTT; locus 4p16.3



100%



Ataksja Friedreicha – mutacja dynamiczna; dziedziczenie AR

