

Fejlődésmaradás diagnosztikája új generációs genetikai módszerekkel



Komlósi Katalin^{1,3}, Stefan Diederich¹, Desiree Lucia Fend-Guella¹,
Oliver Bartsch¹, Hao Hu², Thomas F. Wienker², H. Hilger Ropers²,
Ulrich Zechner¹, Susann Schweiger¹

¹ Humángenetika Intézet, Johannes Gutenberg Egyetem Mainz

²Molekuláris Genetika Max Planck Intézet Berlin

³ Orvosi Genetikai Intézet, Pécsi Tudományegyetem

21. MPS Konferencia

2015. augusztus 21-23. Gödöllő-Máriabesnyő

Áttekintés

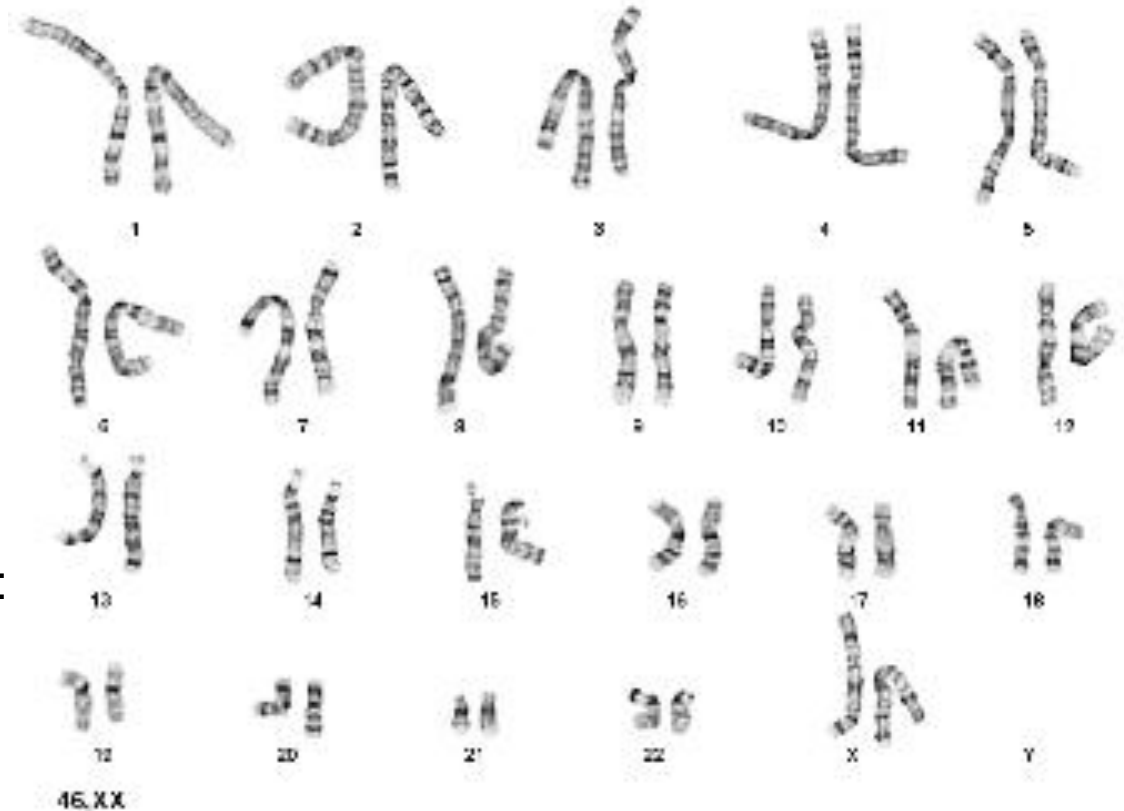
- hagyományos diagnosztika és új generációs módszerek fejlődéselmaradásban
- az új generációs panel-vizsgálatok
- példák: fejlődéselmaradás genetikai háttere, anyagcsere-betegségek más megközelítésben
- és ami még így is megfejtetlen marad: diagnosztikai stratégia a jövőben?

Diagnosztikai mélységek: fókuszálás kérdése

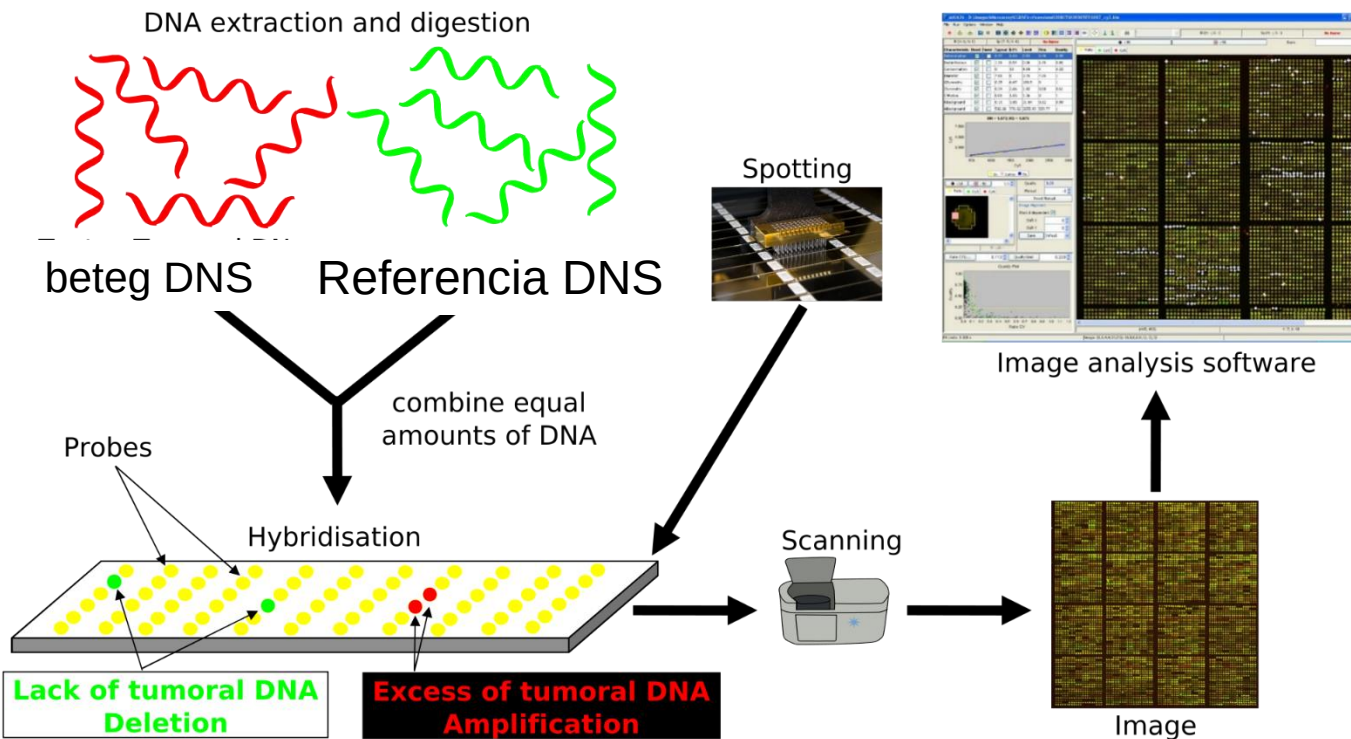
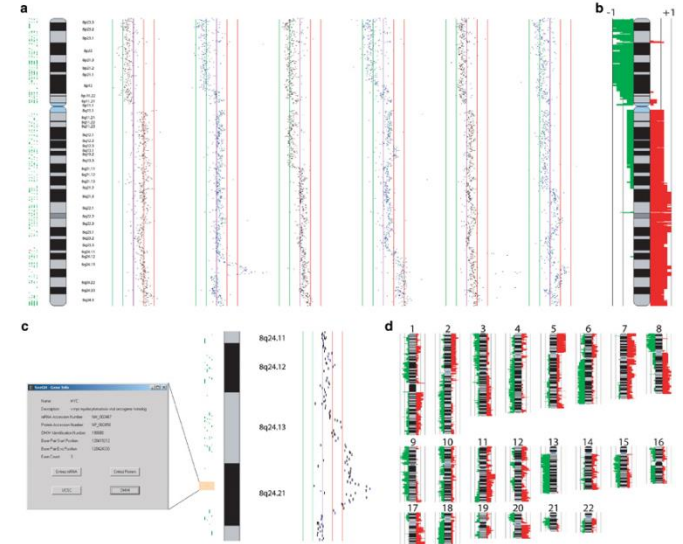
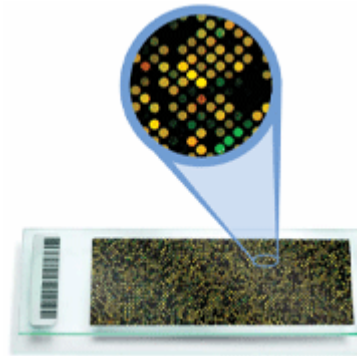


Kromoszómarendellenességek:

- triszómiák: Down-szindróma
- mozaik Patau-szindróma
- kiegyensúlyozatlan kr.
átrendeződések

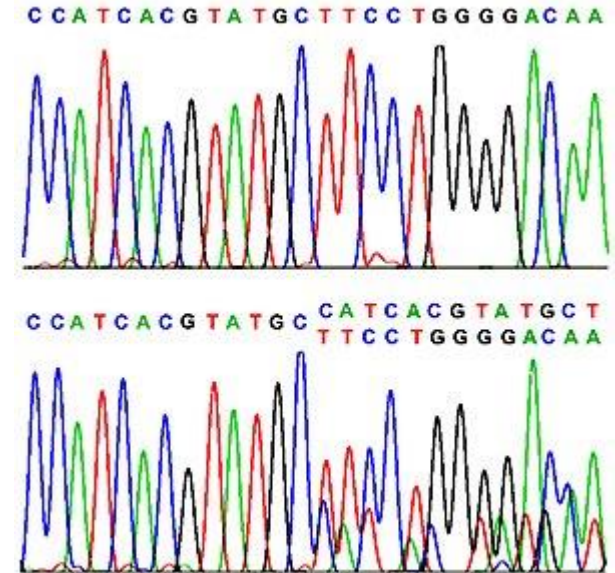
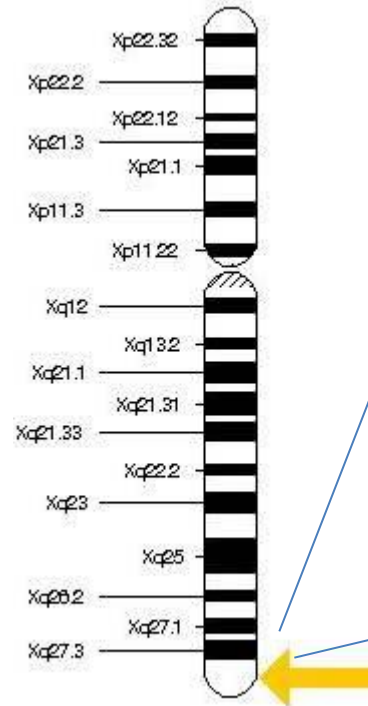
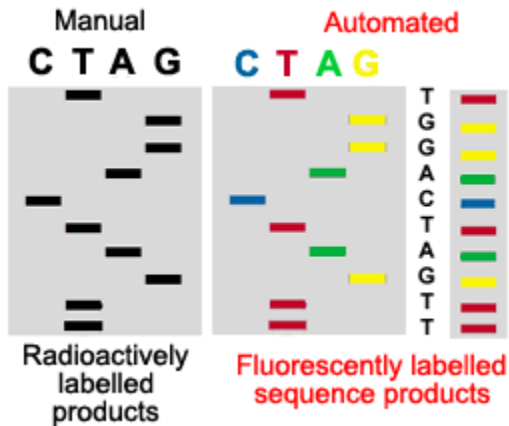


A „genom scannelése”



- Kópiaszám-vizsgálat
- Örökítőanyag hiány (deléció) vagy többlet (duplikáció) észlelése
- mikrodeléciós szindrómák

Célzott géndiagnosztika



Eredmény:

- az örökítőanyag egy célzott szakasza vizsgálható
- pl. egy teljes gén kódoló szakasza
- pontmutáció detektálása
- pl. **MPSII, Rett-szindróma**

A hagyományos genetikai diagnosztika kibővítése: több gén párhuzamos elemzése

- 1222 gén párhuzamos szekvenálása
 - Ritka recesszív öröklődésű gyermekkori betegségek
 - Kognitív zavarok/mentális retardáció
 - Anyagcserebetegségek, recesszív neurodegeneratív betegségek, monogénes epilepszia szindrómák



**Diagnózist nyújthat
monogénes mentális
retardáció/fejlődéselmaradá
s esetén**



Példa a génpanel-diagnosztikára: Kingsmore (MPIMG1) - Teszt

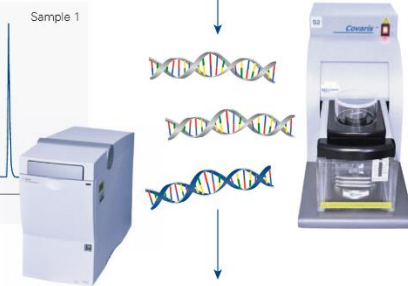
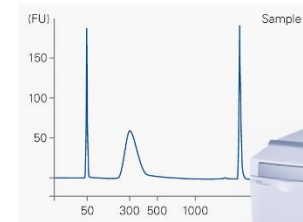
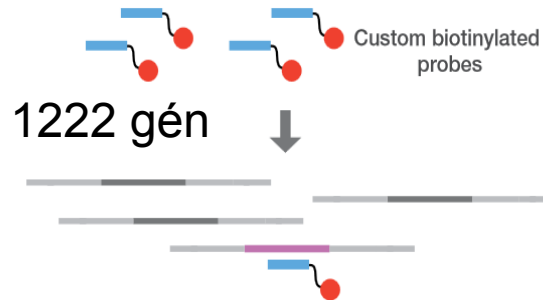
Minta előkészítés

A. Denature double-stranded, indexed DNA library

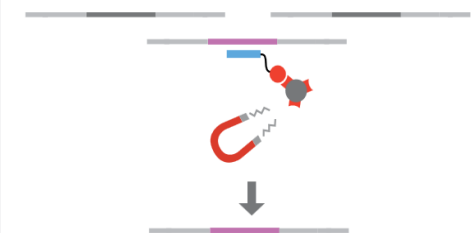
Pooled Sample Library (up to 12-plex)



B. Hybridize biotinylated probes to targeted regions



D. Elution of the enriched target regions from beads



vérminta

1 nap

DNS

3 nap

Minta
előkészítés

8 nap

TruSeq Custom Enrichment Kit (Illumina Inc.)

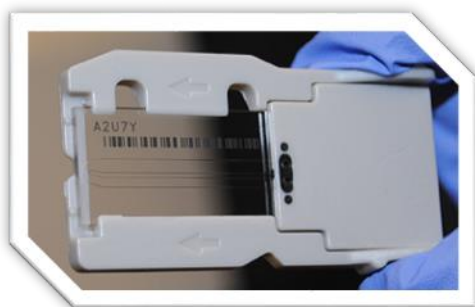
Új generációs szekvenálás – NGS: Illumina MiSeq készülék



Technologia	Sequencing by Synthesis (SBS)
Olvasási hossz	2 x 300 bp
Teljesítmény	13,2-15 Gb (55 h)

Vizsgálati lehetőségek:

- BRCA, HNPCC, FAP (2, 4, 2 gén, max. 30 beteg)
- Noonan, Neurofibromatosis, Malignus Hyperthermia, Rubinstein-Taybi szindróma, Spina Bifida (22 gén; 12 beteg)
- Kötőszöveti betegségek (32 gén; 12 beteg)
- Halláskárosodás (150 gén; 12 beteg)
- Kingsmore-Panel (1222 gén; 12 beteg)





MERAP-Pipeline

Alignment
SOAP2.21



Variánsok azonosítása:

SNV-

Kereső

Indel-

Kereső

rejtett
splicing
helyek



Utóértékelés:

Klinikai
információ

Technikai
információ

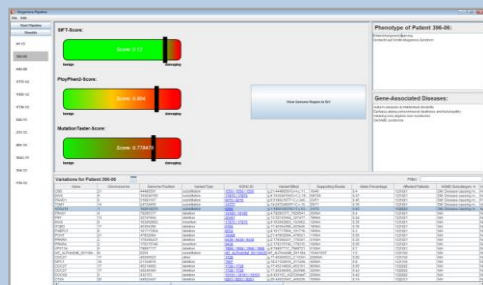
Interpretáció:

Annotáció

Rangsorolás



Adatok megjelenítése:



1 nap

3 nap

8 nap

15 nap

20 nap

vérminta

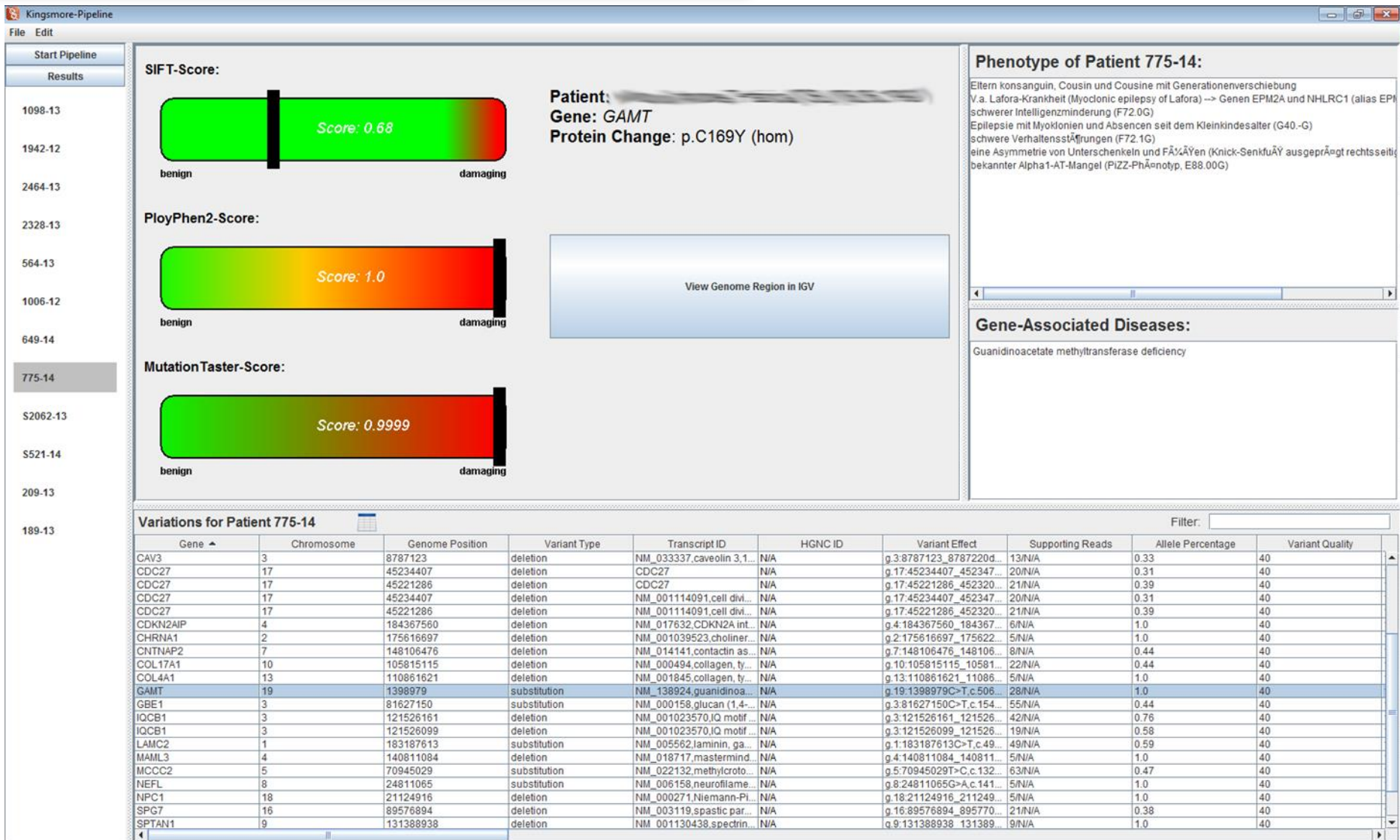
DNS

Minta
előkészítés

szekve
nálás

kiérté
kelés

Interpretáció



100-300 közötti variáns

alacsony lefedettségű és rossz minőségű futások kizárása

öröklődés-modell → pl. AR: csak homozigóta vagy összetett heterozigóta variánsok

50-100 variáns

SNPk kizárása: Exome Variant Server vagy 1000 genomes projectben nem található

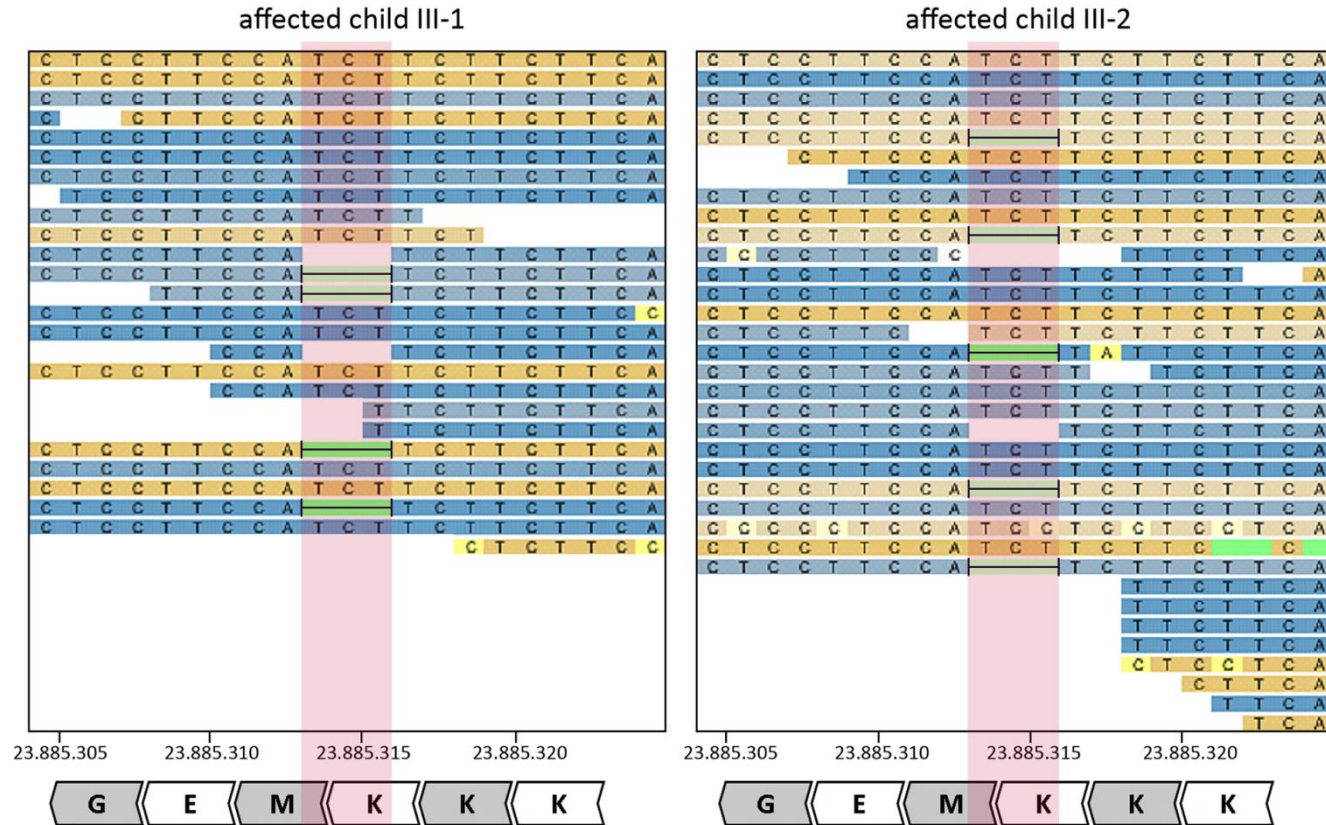
10 homozigóta variáns

HGMD adatbázis: mennyi a funkcionális génekben található eltérés? + OMIM

5 filterezett variáns

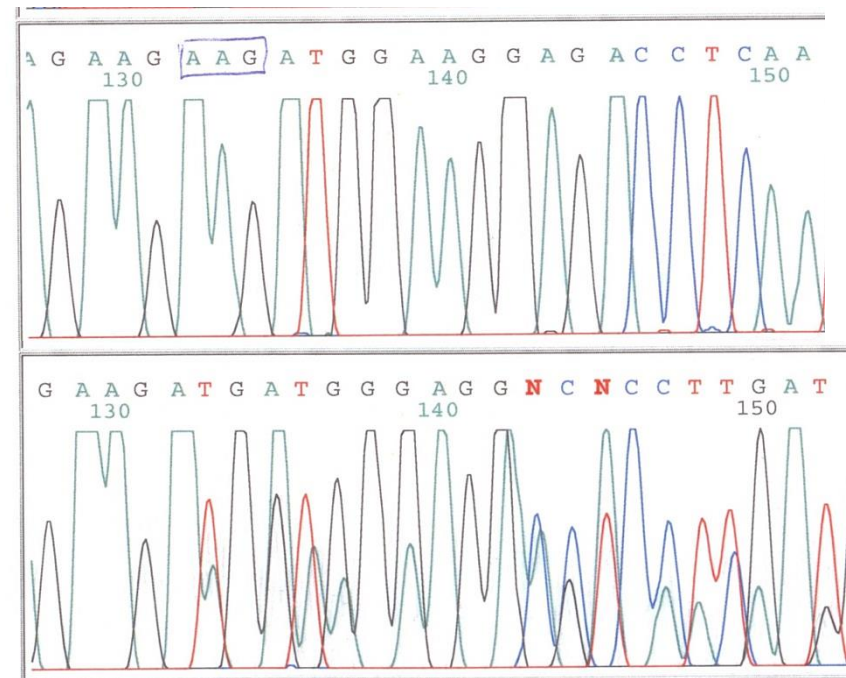
Klinikai adatok: melyik betegség illik?

1 vagy 2-3 eltérés



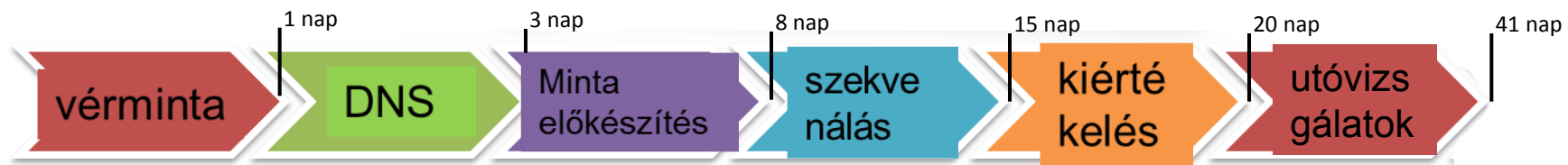
c.4849_4851delAAG (www.hgmd.cf.ac.uk; CD042611)
p.K1617del MYH7

- Sanger-szekvenálással:
 - nem érintett szülő
 - érintett gyermek
- célzott mutációvizsgálat
 - családtagok



↑
c.4849_4851delAAG

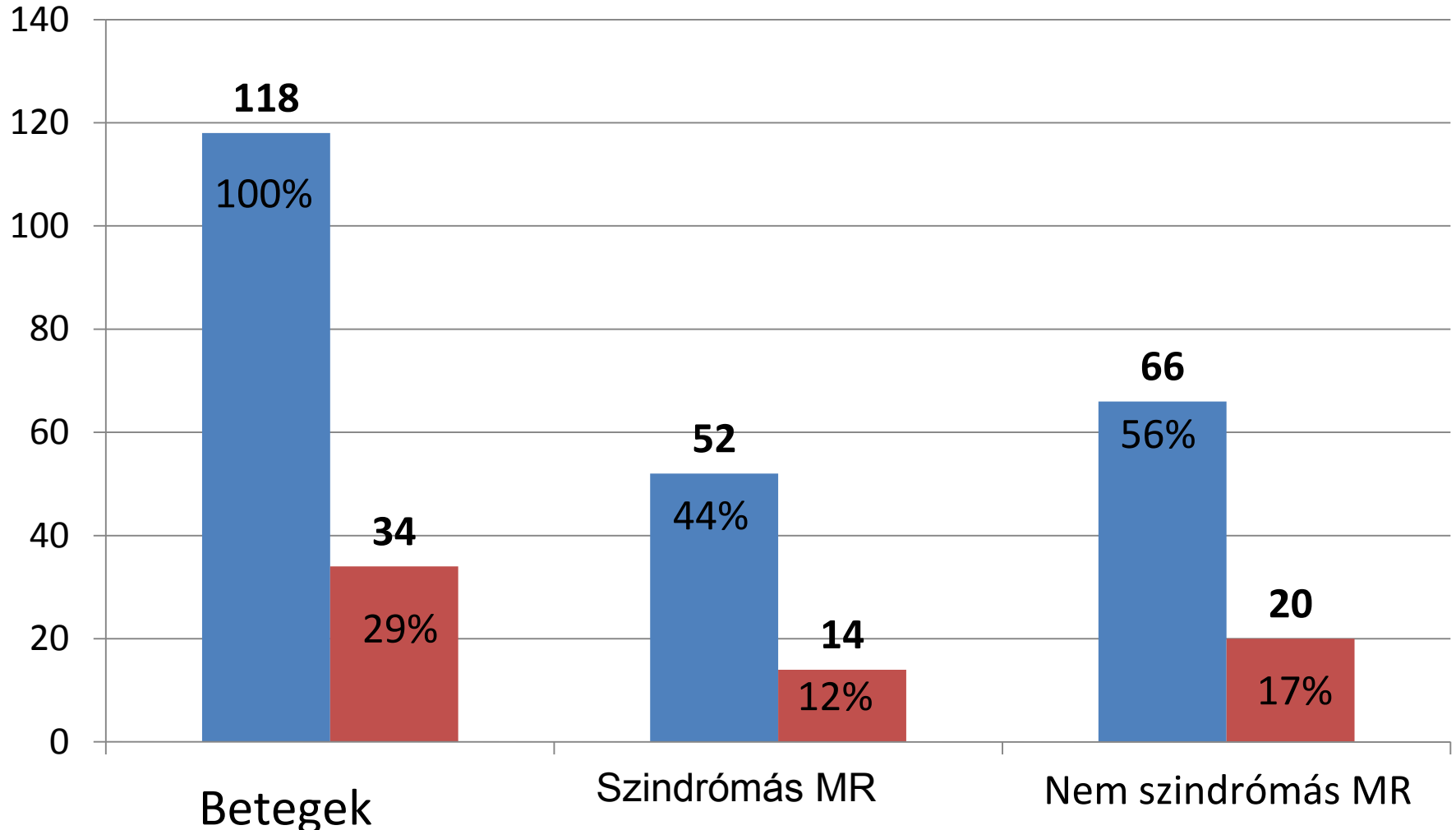
1. A lehetséges kóroki eltérések (variánsok) megerősítő vizsgálata hagyományos szekvenálással
2. Szegregációanalízis: a talált eltérések vizsgálata a szülőkben, családtagokban
3. Molekulárgenetikai lelet



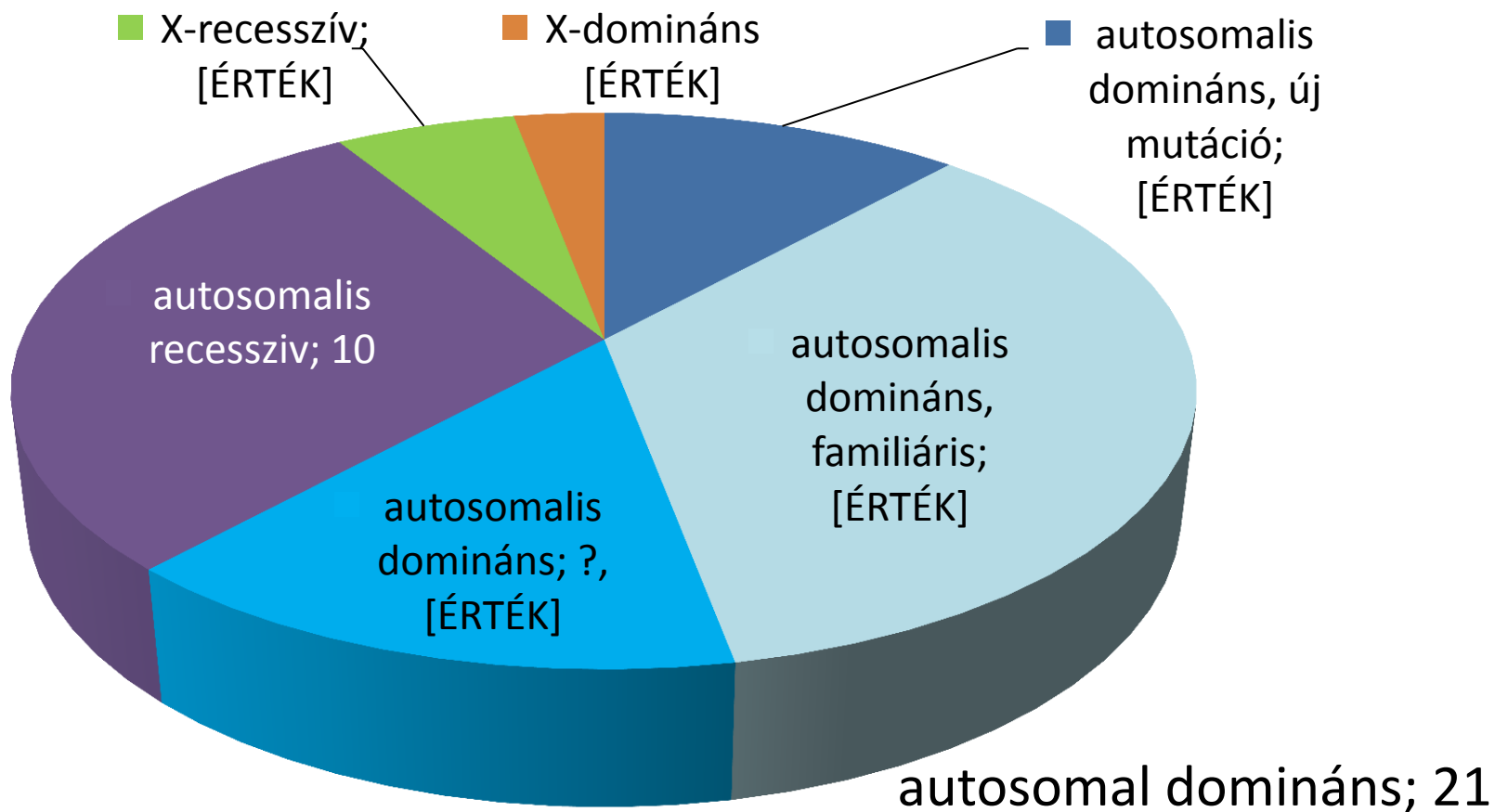
Eddig vizsgált betegek (118)

(Mutációkategória 4+5)

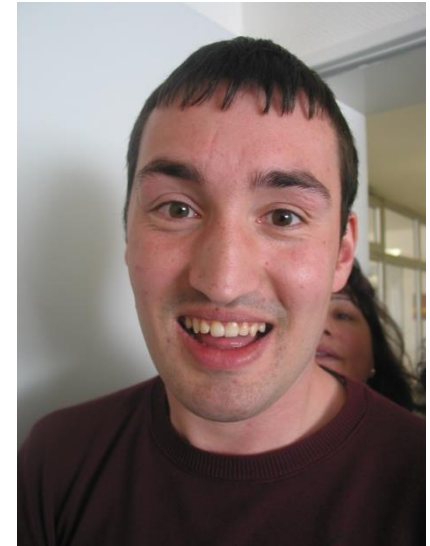
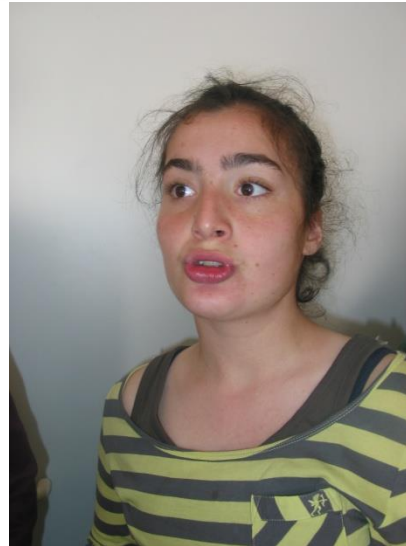
■ Betegek ■ Diagnosztizált



A pozitív esetek megoszlása öröklődésmód szerint (34 beteg)



- 27 éves fiú és 17 éves lánytestvére
- súlyos szellemi elmaradás
- Myoclonus és absence-epilepszia kicsi koruk óta (Lafora-betegség?)
- súlyos beszédfejlődési zavar
- a leánynál:
 - súlyos viselkedészavar
 - aszimmetrikus alsó végtagok



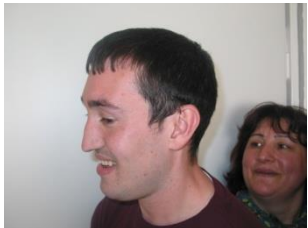
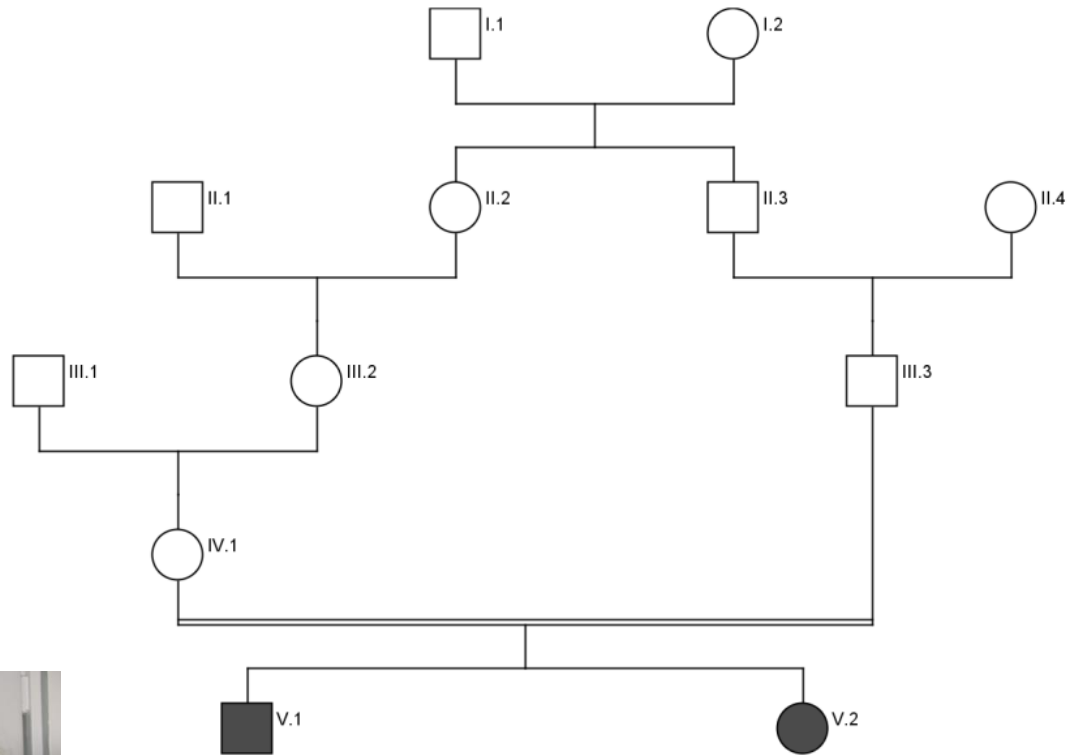
Észak-Portugália

Klinikai tünetek:

- testi fejlődés rendben
- Fejlődési rendellenesség nincs
- H, T, FK normál

Terápia:

- Fiú: 2 antiepileptikum, még így is sok roham
- Lány: 2 antiepileptikum és 3 gyógyszer viselkedészavarra



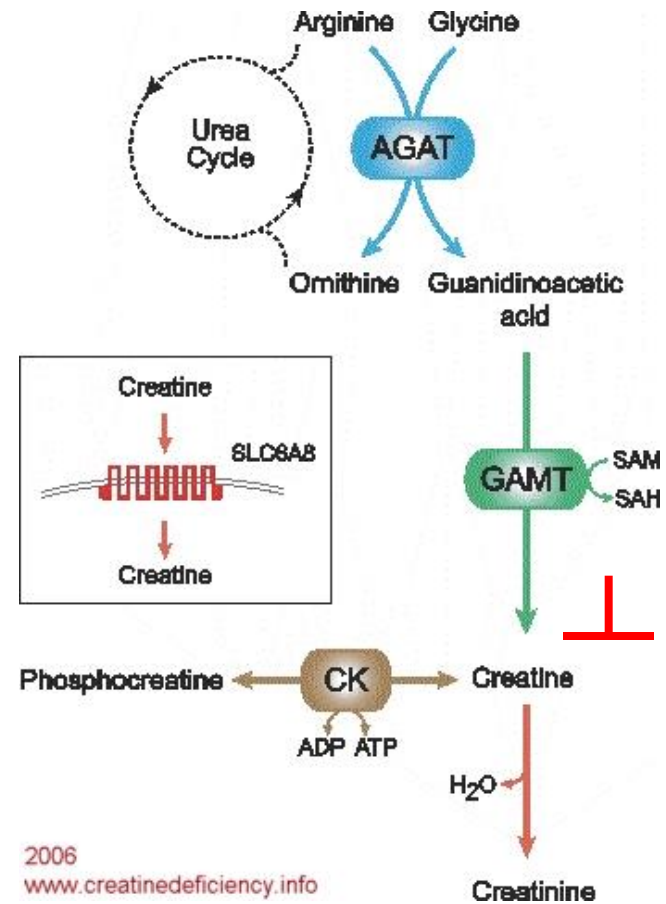
Betegút:

- Évek óta gyerekpszichiátriai centrumban
- Gyermekklinika neurológia:
anyagcserediagnosztika negatív
- Gyanú: Lafora-Epilepszia

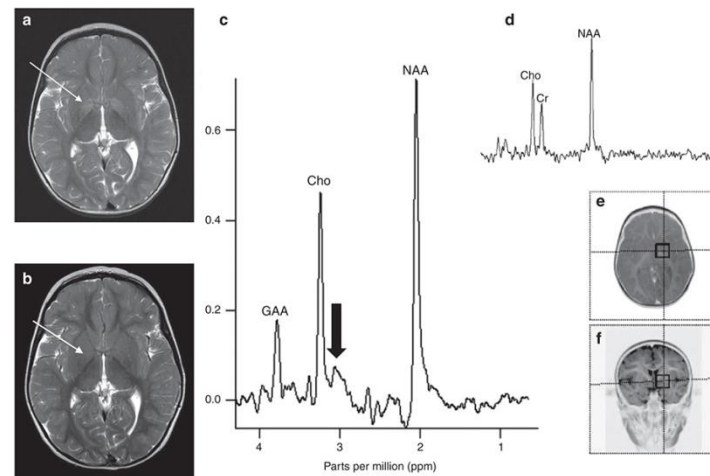
Diagnosztika:

- 1222 gén NGS-Paneldiagnosztikája
- **GAMT gén:** c.506 G>A, p.Cys169Tyr
homozygota eltérés
- „portugál” mutáció (*Caldeira Araújo et al., 2005, Am J Med Genet 133A:122-127*)
- **Kreatinszintéziszavar: GAMT-Enzimhiány**
- 25% ismétlődési kockázat

KREATINSZINTÉZIS-ZAVAROK

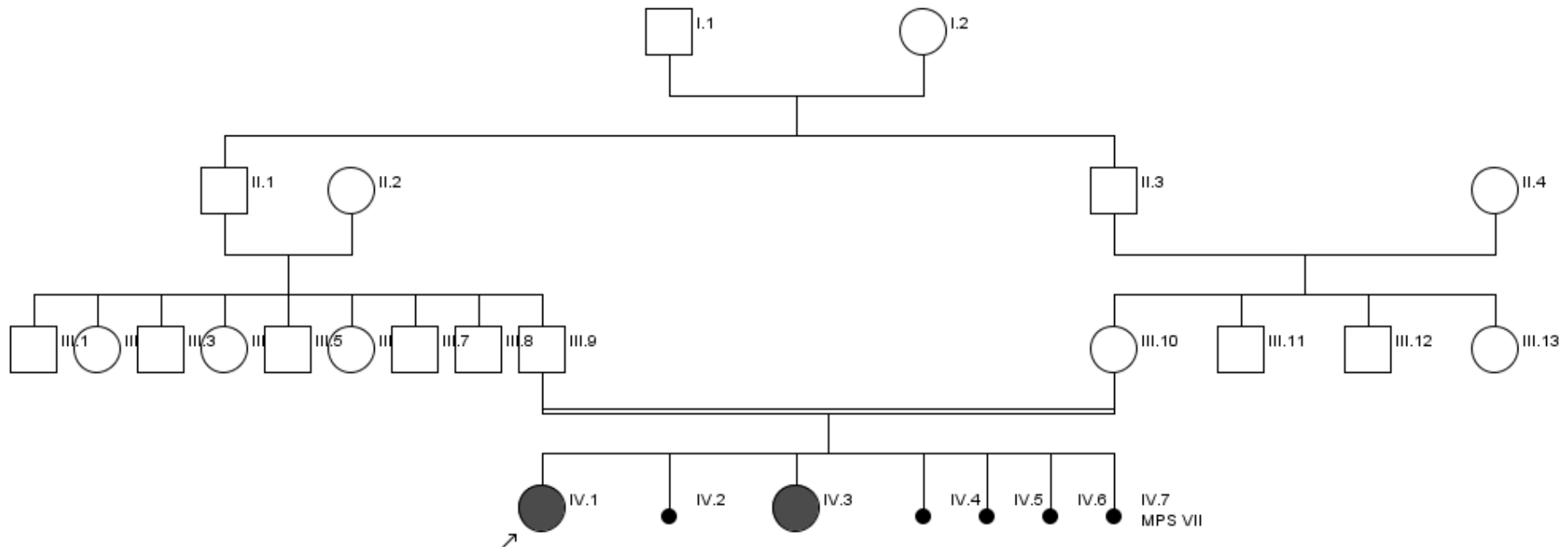


- **nagyon ritka, 1 : 1.000.000** születés (Orphanet)
- hipotonia, súlyos fejlődéselmaradás, súlyos beszédfejlődési zavar, nehezen kezelhető görcsök
- progresszív mozgászavar, ataxia, myoclonusok
- **Van rá specifikus laborvizsgálat!**
 - MS/MS: szérum és vizelet: ↓↓ Kreatinin, ↑ GAA**
- **MR-Spektroszkopia:** kreatininhiány és felhalmozódott anyagcseretermék (GAA) a törzsdúcokban és a kéregben
- **KEZELHETŐ:** napi 400-800 mg/kg Kreatin-Monohydrat és dietetikus kezelés



Joseph Clark and Kim. M. Cecil, *Pediatric Research* (2015) 77, 398–405_





Családi anamnézis:

- vérrokon család Pakisztánból
- 4 spontán abortus: hydrops foetalis
- utolsó terhességben enzimmérések: **MPS VII**
- 2 komplikációmentes terhesség, **kezdetben jól fejlődő leányok, majd súlyos leépülés**

Két súlyos betegség egy családban

Tünetek:

- a két lány fejlődése a 3./5. életévig rendben zajlott
- egyre rosszabbodó, bizonytalan járás, elmosódott beszéd, a beszéd kifejezés zavara
- rosszabbodó négyvégtagi fokozott izomtónus
- nyelészavar, súlyos táplálási nehezítettség
- ataxia
- vizelet- és széklet-inkontinencia

- MRT: fokozódó vaslerakódás a törzsdúcokban
- eddigi terápia: Botoxinjekciók, ortézisek

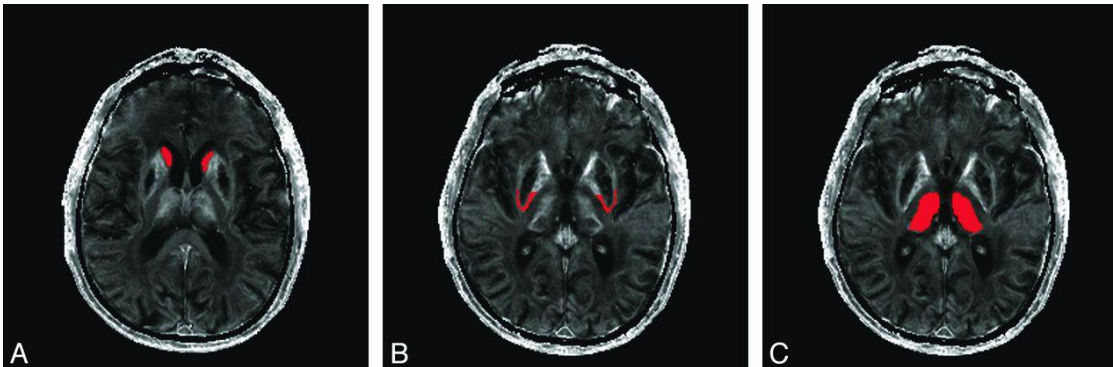
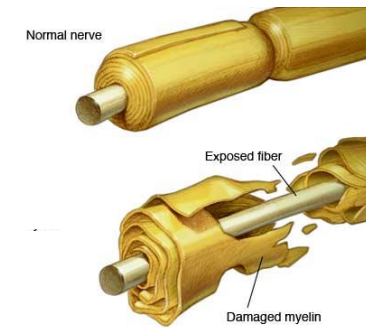
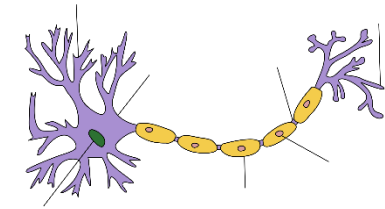
Diagnosztika:

- **FA2H** Gen: c.780C>A, p.H260Q (homozigóta)
- Zsírsav-2-hidroxiláz enzim zavara
- **autoszómális recesszív vastárolási betegség ritka formája**
- súlyos, előrehaladó betegség

25% ismétlődési kockázat

**Prenatalis diagnosztika
vagy Preimplantációs dg.?**

- **Jellegzetes tünetek:**
 - járászavar, gyakori esések
 - progresszív spaszticitás, ataxia
 - elkenődött beszéd, beszédzavar
 - nyelészavar
 - látásélesség csökkenése
 - előrehaladó kognitív zavar
 - görcsök ritkák



17 éves fiú und 11 éves húga súlyos fejlődésmaradással



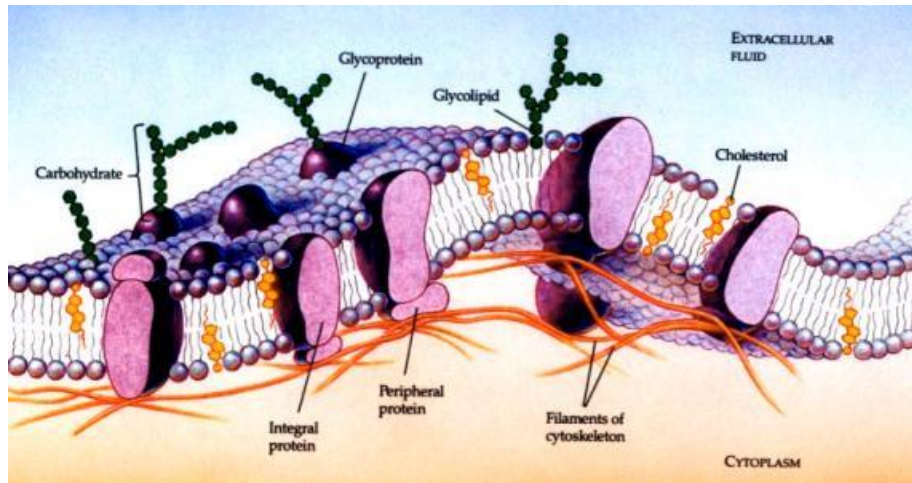


- fejlődéselmaradás a kezdetektől
- mentális retardáció
- viselkedészavar: agresszió
- az első 12 hónapban normál FK, majd mikrocephalia
- motoros elmaradás: járás 2 évesen
- beszédfejlődési zavar: 17/11 évesen alig beszélnek
- heves lázgörcsök, később epilepszia
- alacsonynövés
- szülők: egészségesek, nem vérrokonok

NGS-Paneldiagnostika:

-ALG1 gén: c.1280T>G, p.F427C, homozygota

- *ALG1*: beta-1,4-mannosyltranszferáz
- **CDG1k: Kongenitális glikolizációs zavar 1 k**
- CDG I k: súlyos betegség, korai halálhoz vezet
- **terápirezisztens görcsök, gyorsan romló mikrocephalia, alvadási zavar, MR: agyi atrófia**
- **a klasszikus kép:** disztrófia, hasmenés, hypoproteinémia, izomhipotonia, alvadási zavar, görcsök, hepatomegalia, veseelégtelenség



**Egyszerű biokémia teszt:
Transzferrin izoelektromos
fókuszálas: CDG 1 mintázat**



Ingo Helbig: Rare Epilepsy Syndromes and the Congenital Disorders of Glycosylation

CDG1k

- panelvizsgálatok bővíthetők→teljes exomszekvenálás→teljes genomszekvenálás
- Nijmegeni centrum: teljes genomszekvenálással a mentális retardációs esetek 60%-ban születik oki diagnózis
- adatok újraértékelése
- funkcionális vizsgálatok jelentősége



Köszönetnyilvánítás



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

- **Intézetek:**
- **Mainzi Humángenetika Intézet**
- **Mainzi Gyermekpszichiátriai Központ**
- **Max Planck Intézet Berlin**
- **Orvosi Genetikai Intézet, PTE**
- **Betegek és családjaik részvételéért**
- **Pályázatok:**
 - Campus Hungary ösztöndíj
 - KAAD ösztöndíj
 - OTKA 103983
 - „MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíj”

