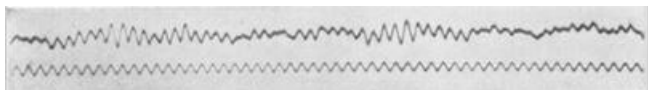


Новые подходы к диагностике наследственных заболеваний нервной системы

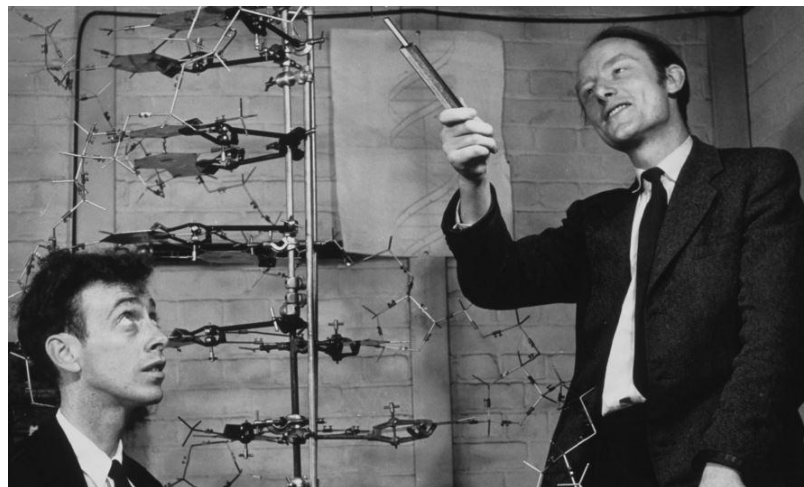
Канивец И.В.
врач-генетик,
руководитель отдела генетики
Медико-генетического центра
«Геномед»



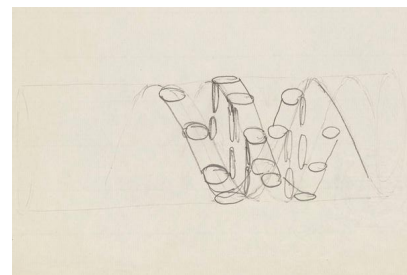
Ханс Бергер



Первая ЭЭГ человека,
записанная в 1924 году



Джеймс Уотсон и
Фрэнсис Крик



Эскиз двойной спирали ДНК.
Ф. Крик, 1953

Число генов и фенотипов (OMIM)

	Аутосомные	X-сцепленные	Y-сцепленные	Митохондриальные	Всего
Ген описан	14568	715	49	35	15367
Ген и фенотип, сочетание	78	0	0	2	80
Фенотип описан, молекулярная причина известна	4478	310	4	29	4821
Фенотип описан, молекулярная причина неизвестна	1489	124	5	0	1618
Другое (в основном фенотипы, с предполагаемым менделевским наследованием)	1680	111	2	0	1793
Итого	22293	1260	60	66	23679

Типы наследования заболеваний нервной системы

- моногенные заболевания, подчиняющиеся менделевским закономерностям: аутосомно-рецессивные и аутосомно-доминантные;
- моногенные заболевания, наследование которых отклоняется от менделевского наследования (сцепленные с половыми хромосомами)
- мультифакториальное наследование;
- митохондриальный тип наследования (материнский, или цитоплазматический);
- импринтинг;
- хромосомные аномалии

Эмпирические риски (на примере мультифакториальной эпилепсии)

- Риск возникновения эпилепсии у детей больного составляет 4%, что в 4 раза выше, чем в популяции в целом
- Риск возникновения эпилепсии, если больны оба родителя составляет 20-30% (высокий генетический риск)
- Риск возникновения эпилепсии у монозиготного близнеца, если другой болен - 80%
- Риск возникновения заболевания у дизиготного близнеца 10-20%

Для чего нужна точная генетическая диагностика

- установление диагноза
- определение прогноза для пациента (продолжительность жизни, будет ли прогрессировать, возможность реабилитации)
- определение прогноза для членов семьи (возможность рождения здорового ребенка, пренатальная диагностика)
- прогноз эффективности лекарственной терапии
- прогноз эффективности хирургического лечения

Проблемы, связанные с генетической диагностикой

- генетическая гетерогенность
- клинический полиморфизм
- неправильное представление о возможностях тех или иных методов
- отсутствие алгоритмов применения этих методов в клинической практике
- ошибки при выборе метода диагностики
- ошибки при выборе лаборатории
- ошибки при трактовке результатов исследований

Генетическая гетерогенность

Моногенные заболевания, обусловленные мутациями в гене *SCN1A*

- синдром Драве (OMIM: 607208)
- генерализованные эпилептические приступы с фебрильными судорогами плюс, тип 2 (OMIM: 604403)
- семейные фебрильные судороги, тип 3А (OMIM: 604403)
- семейная гемиплегическая мигрень, тип 3 (OMIM: 609634)

Генетическая гетерогенность

Этиология эпилептических энцефалопатий

Мутации в генах

SCN1A

STXBP1

SPTAN1

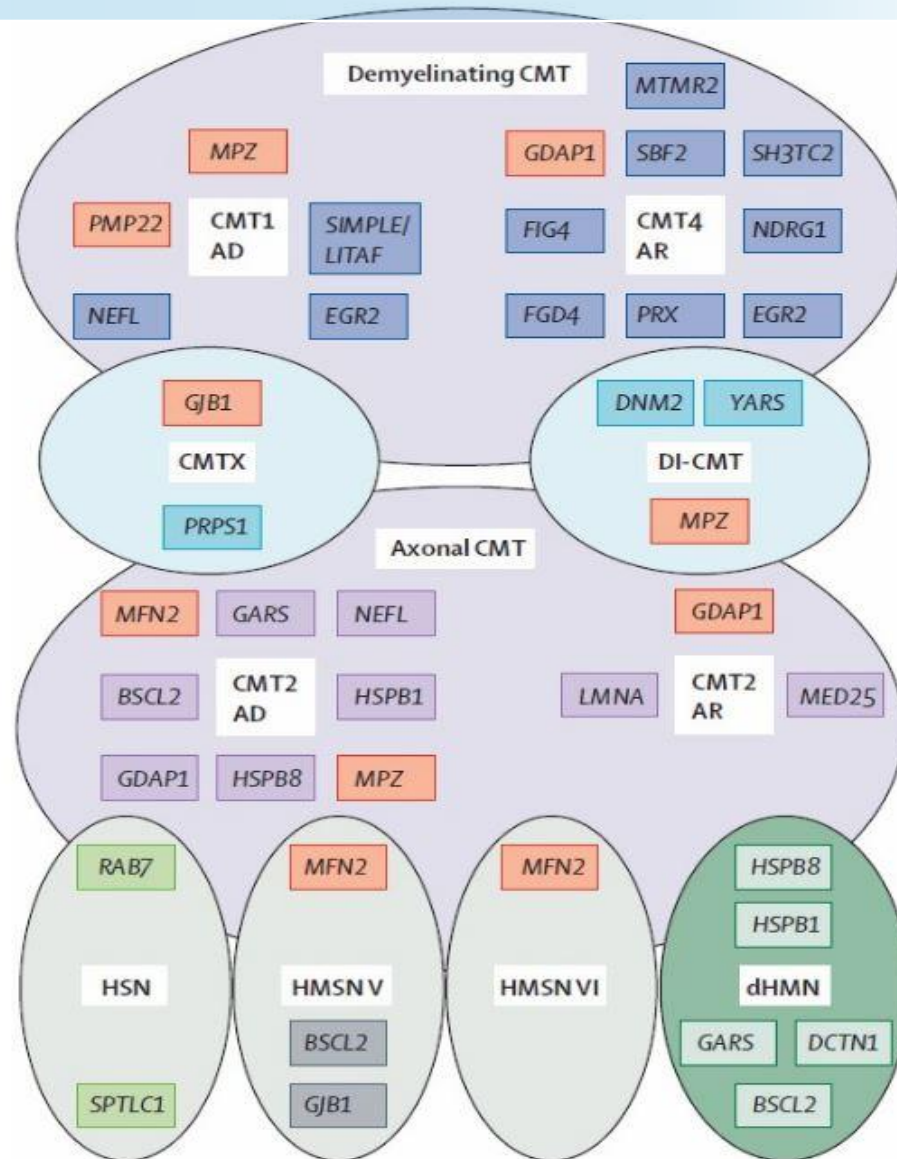
ARX

CDKL5

(большинство de novo)

Вариации числа копий (CNVs)
у 8% пациентов

Генетическая гетерогенность



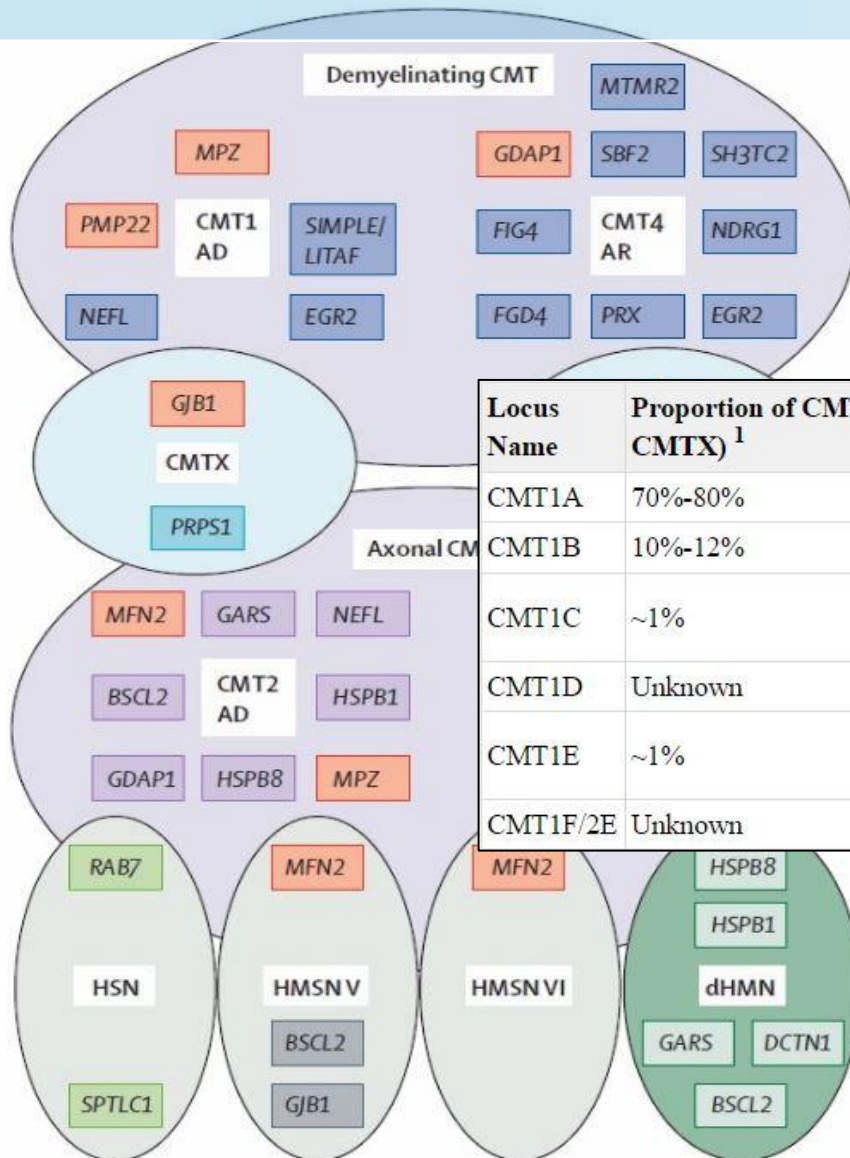
В основе многих алгоритмов диагностики лежат

- частота встречаемости отдельных генетических вариантов
- наличие мажорных мутаций в генах, приводящих к их возникновению
- особенности клинических проявлений

Что мешает использовать такие алгоритмы?

- частота встречаемости генетических вариантов может различаться в отдельных популяциях
- мажорные мутации выявляются не всегда
- особенности клинических проявлений отдельных генетических вариантов выявляются не всегда

Использование алгоритмов



Locus Name	Proportion of CMT1 (excluding CMTX) ¹	Gene	Protein Product
CMT1A	70%-80%	<i>PMP22</i>	Peripheral myelin protein 22
CMT1B	10%-12%	<i>MPZ</i>	Myelin P ₀ protein
CMT1C	~1%	<i>LITAF</i>	Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor
CMT1D	Unknown	<i>EGR2</i>	Early growth response protein 2
CMT1E	~1%	<i>PMP22</i>	Peripheral myelin protein 22 (sequence changes)
CMT1F/2E	Unknown	<i>NEFL</i>	Neurofilament light polypeptide

Какой метод выбрать?

ПЦР

Таргетное
секвенирован
ие

ХМА

FISH

Секвенирован
ие по Сэнгеру

TMC

MLPA

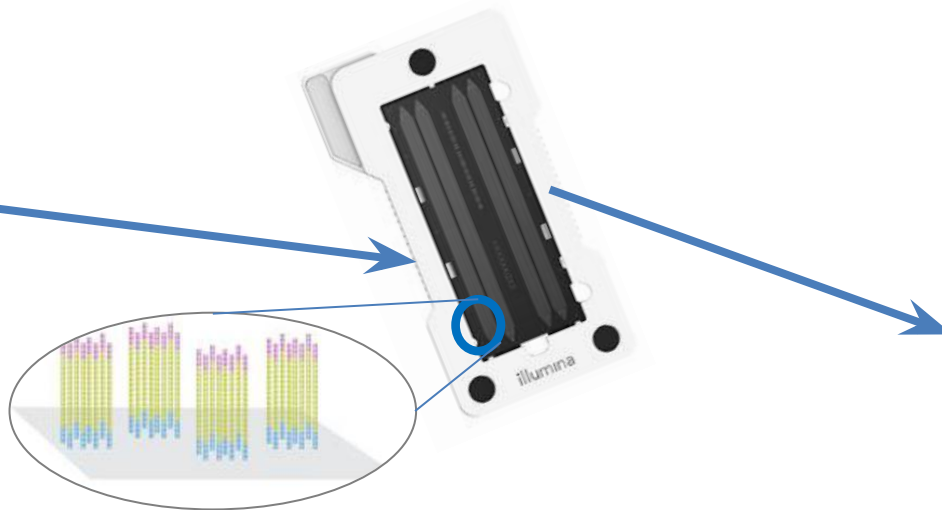
Анализ
кариотип
а

NGS



Секвенирование нового поколения

NGS представляет собой новый подход для идентификации генетической изменчивости многих генов за один прием



Предтестовая
консультация

Забор
образцов

Лабораторное
исследование

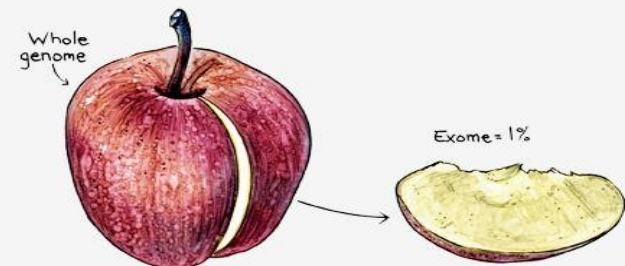
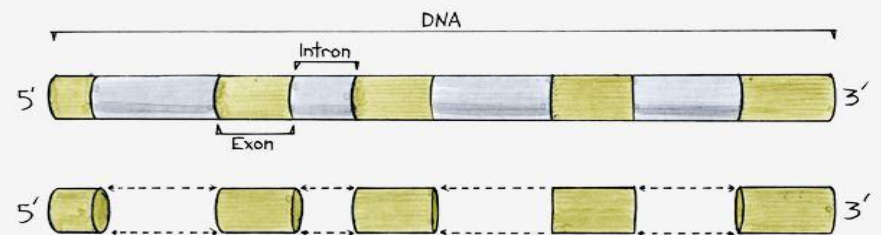
Анализ
данных

Заключение

Посттестовая
консультация

Секвенирование экзона

Секвенирование экзона (Exome sequencing) – секвенирование всех кодирующих белки участков генов (экзонов). Экзом (180000 экзонов или приблизительно 30 млн. пар оснований) составляет около 1% генома человека, но мутации в нем имеют гораздо больше шансов вызывать серьезные последствия, чем в остальных !



Панели, клиническое экзом или полный экзом?

	Панели	Клиническое секвенирование экзома	Полное секвенирование экзома
Число генов			20000
Выявление структурных вариантов			Лучше
Выявление новых генов			Возможно
Эффективность			46%
Преимущество	Возможность включения редких генов, не входящих в КСЭ	Соотношение цена/эффективность	Анализ всех кодирующих участков
Цена	Доступная	Доступная	Доступная

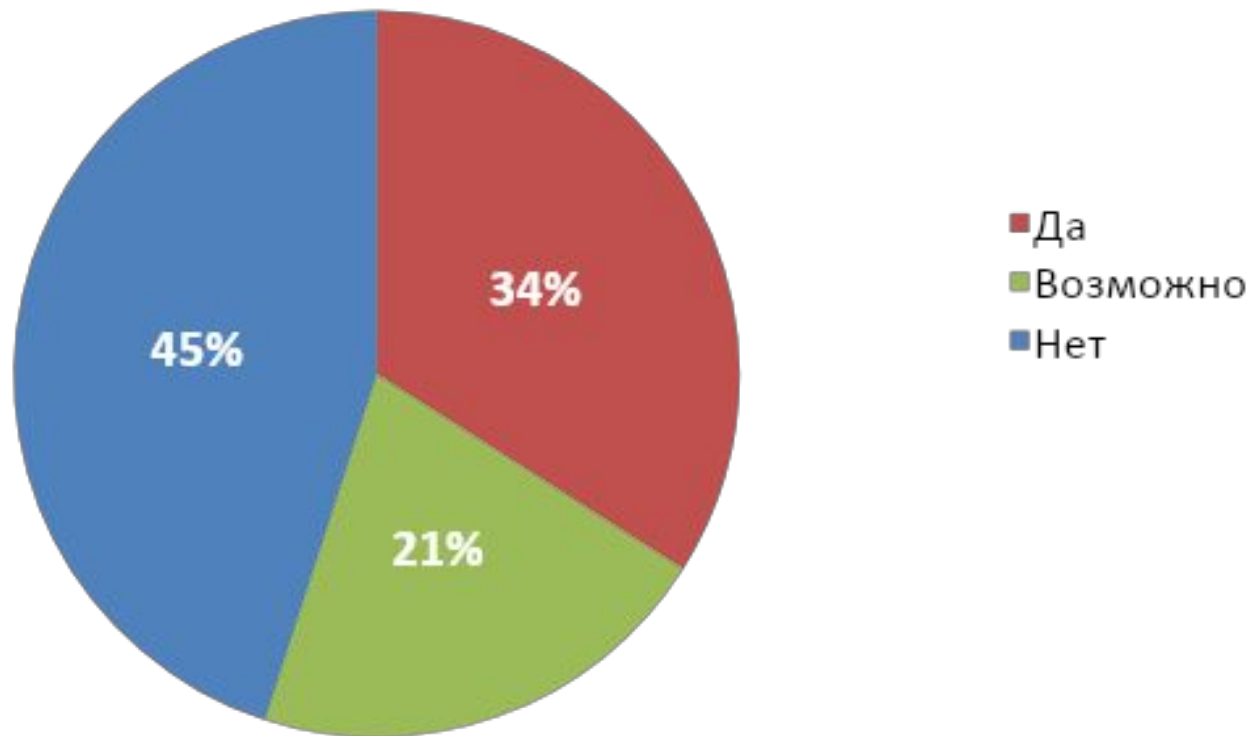
Преимущества обследования трио:

- Идентификация новых редких мутаций
- Идентификация новых синдромов
- Более точная идентификация доминантных ранее описанных синдромов

Панель “Наследственные эпилепсии” (560 генов)

- Ранние эпилептические энцефалопатии, фебрильные судороги, генерализованные судороги с фебрильными +, миоклонус эпилепсии, ночные лобные эпилепсии, височные эпилепсии, доброкачественные неонатальные судороги
- Болезни нарушения гликозилирования
- Лейкодистрофии и пероксисомные болезни
- 120 вариантов других болезней нарушения обмена веществ
- 40 вариантов моногенных пороков и органических патологий мозга сопровождающихся судорогами (в том числе, кортикальная дисплазия шизенцефалия, лиссенцефалия, туберозный склероз и др.)
- 50 наследственных синдромов, сопровождающихся судорогами
- 31 вариант неспецифической УО с судорогами
- 10 нейродегенеративных заболеваний ЦНС с судорогами

Панель “Наследственные эпилепсии”



Всего 488 пациентов с диагнозом “Эпилепсия”

Клинический пример

- Пациент – девочка, 10 лет
- Диагноз: криптогенная фокальная эпилепсия с фебрильно-провоцируемым приступом
- Исследование генома «СНП-микроматрица»
- Результаты исследования

**ДОСТАТОЧНО ЛИ ДАННЫХ
ДЛЯ УСТАНОВЛЕНИЯ
ДИАГНОЗА?**

Мутация	Ген	Скрипт	Частота аллеля*
chrX:99661877_83dup7	PCDH19	020766	не описана

- Гетерозиготные мутации в гене *PCDH19* ассоциированы с ранней детской эпилептической энцефалопатией 9 (OMIM: 300088). Заболевание наследуется по X-сцепленному доминантному типу и ограничено женским полом.

Клинический пример (продолжение)

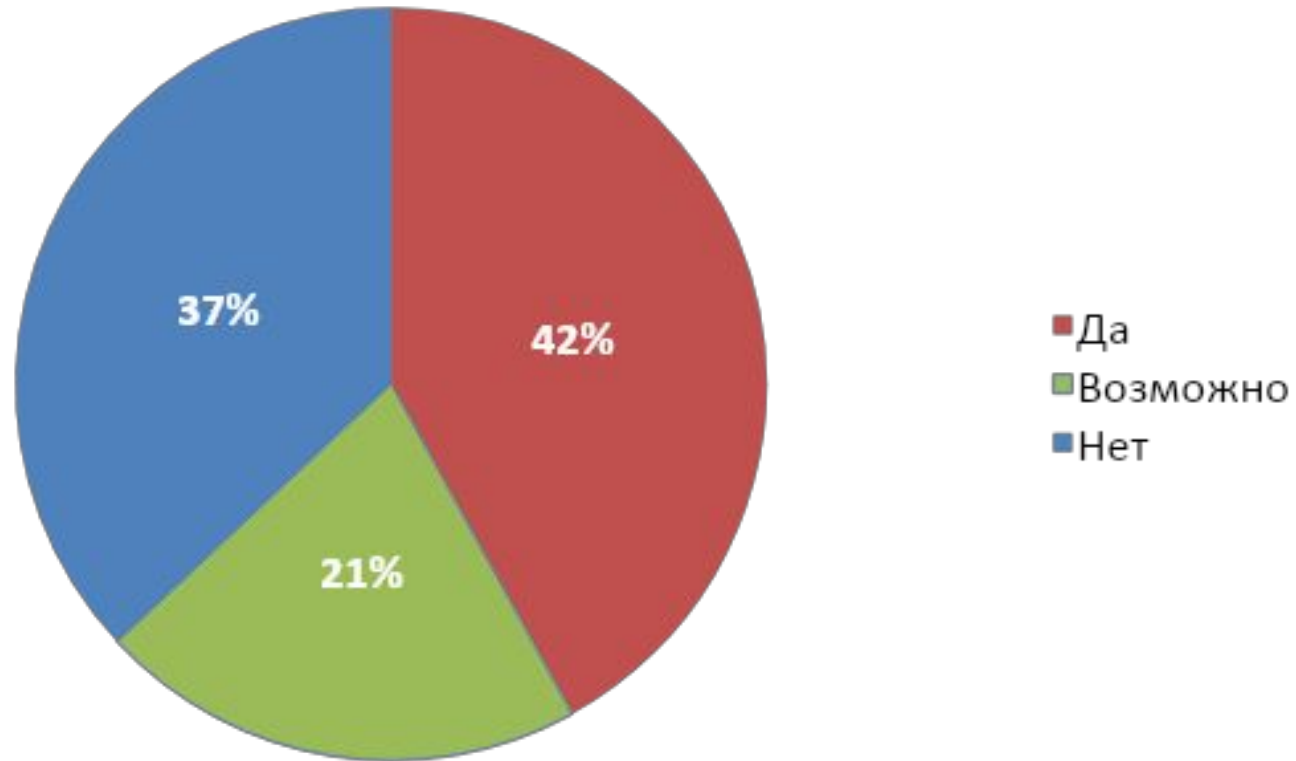
Секвенирование по Сэнгеру (прямое секвенирование)

- Обязательно проводится до установления клинического диагноза
- Подтверждает наличие выявленного при NGS варианта у пробанда
- Позволяет установить происхождение мутации или статус *de novo*
- Позволяет подтвердить компаунд-гетерозиготное состояние мутации у пробанда

Панель “Нервно-мышечные заболевания” (391 ген)

- Первично-мышечные заболевания
- Болезни мотонейрона
- Заболевания периферических нервов
- Болезни нервно-мышечных синапсов
- Метаболические миопатии
- Миотонии и периодический паралич

Панель “Нервно-мышечные заболевания” (391 ген)

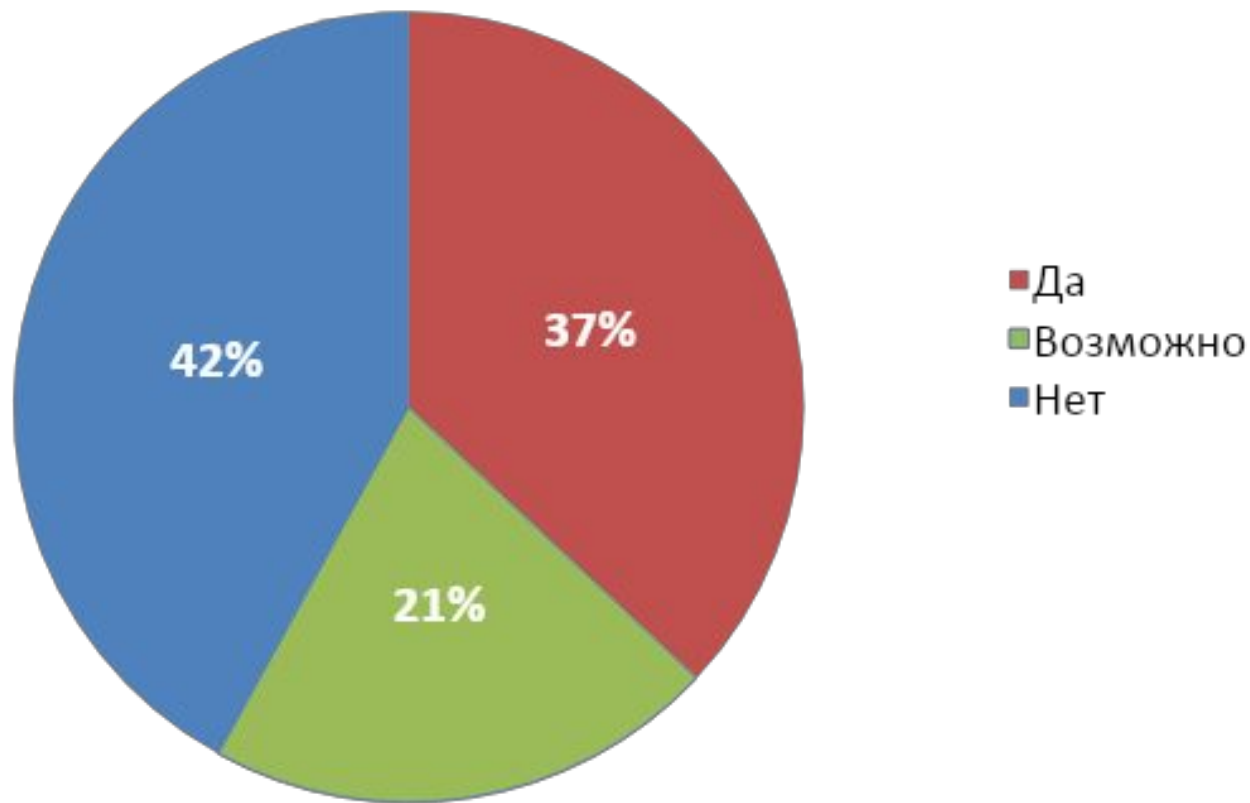


Всего 214 пациентов

Панель “Нейродегенеративные заболевания” (723 гена)

- Деменции
- Паркинсонизм
- Атаксии
- Пароксизмальные двигательные расстройства
- Нейродегенерация, ассоциированная с накоплением металлов
- Нейрональный цероидный липофусциноз
- БАС
- Синдром исчезающего белого вещества

Панель “Нейродегенеративные заболевания”



Всего 220
пациентов

Клинический пример

- Пациент К., девочка 14 лет. В 11 лет – эпилептический приступ. В настоящее время – прогрессирующая атрофия мозжечка, ЭЭГ – без эпилептической активности.
- Отсутствует ухудшение зрения

Клинический пример (продолжение)

Результаты секвенирования

1. Патогенные мутации, являющиеся вероятной причиной заболевания

Положение (hg19)	Генотип	Ген	Положение в кДНК	Замена АК	Экзон	Транскрипт	Частота аллеля*	Глубина прочтения
Не выявлено								

2. Вероятно патогенные мутации, являющиеся возможной причиной заболевания

Положение (hg19)	Генотип	Ген	Положение в кДНК	Замена АК	Экзон	Транскрипт	Частота аллеля*	Глубина прочтения
chr11:6640426C>T	C/T	TPP1	c.89+1G>A	-	инт. 2	NM_000391.3	н/д	117х

3. Мутации с неизвестным клиническим значением, имеющие возможное отношение к фенотипу. Для уточнения статуса патогенности таких мутаций и их отношения к заболеванию у пациента могут потребоваться дополнительные исследования.

Положение (hg19)	Генотип	Ген	Положение в кДНК	Замена АК	Экзон	Транскрипт	Частота аллеля*	Глубина прочтения
chr6:52317555C>T	C/T	EFHC1	c.643C>T	p.Leu215Phe	4	NM_018100.3	0.005%	122х
chr9:131340406C>G	C/G	SPTAN1	c.1103C>G	p.Ala368Gly	9	NM_001130438.2	н/д	54х
chr11:6638006C>G	C/G	TPP1	c.772G>C	p.Ala258Pro	7	NM_000391.3	н/д	135х

Клинический пример (продолжение)

Что из найденного нужно подтвердить и как?

1. Патогенные мутации, являющиеся вероятной причиной заболевания

Положение (hg19)	Генотип	Ген	Положение в кДНК	Замена АК	Экзон	Транскрипт	Частота аллеля*	Глубина прочтения
Не выявлено								

2. Вероятно патогенные мутации, являющиеся возможной причиной заболевания

Положение (hg19)	Генотип	Ген	Положение в кДНК	Замена АК	Экзон	Транскрипт	Частота аллеля*	Глубина прочтения
chr11:6640426C>T	C/T	TPP1	c.89+1G>A	-	инт. 2	NM_000391.3	н/д	117x

3. Мутации с неизвестным клиническим значением, имеющие возможное отношение к фенотипу. Для уточнения статуса патогенности таких мутаций и их отношения к заболеванию у пациента могут потребоваться дополнительные исследования.

Положение (hg19)	Генотип	Ген	Положение в кДНК	Замена АК	Экзон	Транскрипт	Частота аллеля*	Глубина прочтения
chr6:52317555C>T	C/T	EFHC1	c.643C>T	p.Leu215Phe	4	NM_018100.3	0.005%	122x
chr9:131340406C>G	C/G	SPTAN1	c.1103C>G	p.Ala368Gly	9	NM_001130438.2	н/д	54x
chr11:6638006C>G	C/G	TPP1	c.772G>C	p.Ala258Pro	7	NM_000391.3	н/д	135x

Клинический пример (продолжение)

И что на самом деле мы хотим подтвердить?

RESEARCH ARTICLE

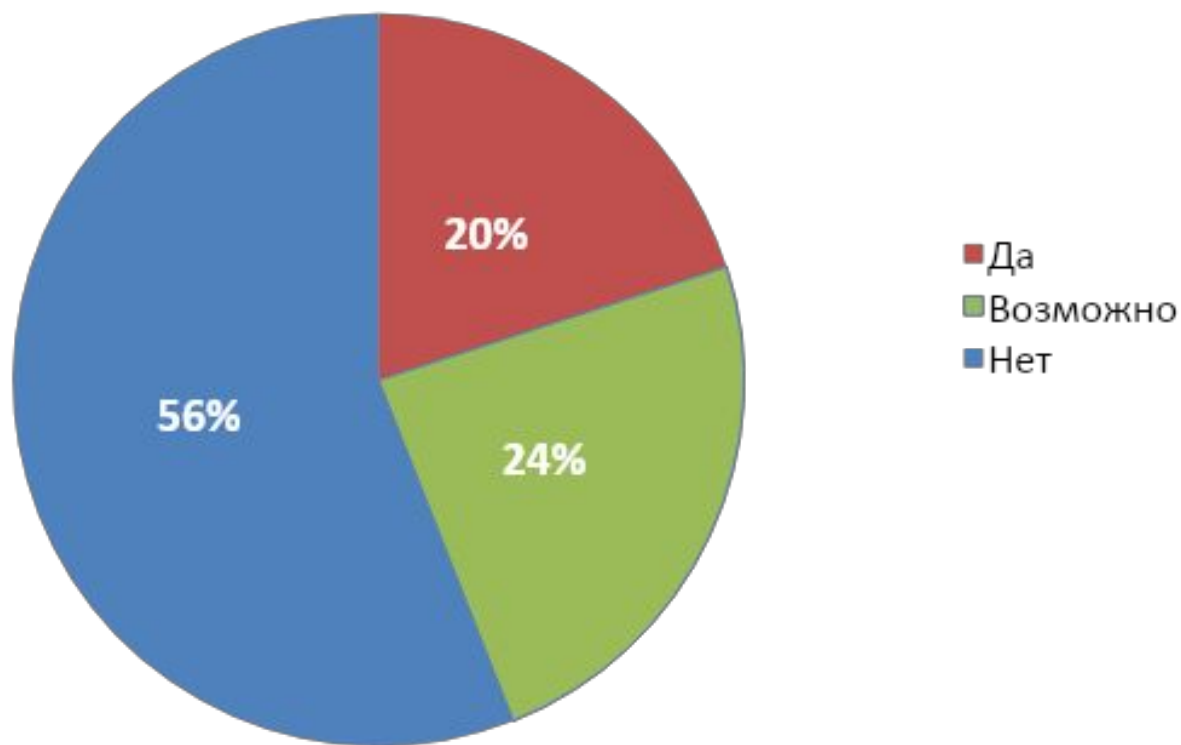
Human Mutation

Autosomal Recessive Spinocerebellar Ataxia 7 (SCAR7) is Caused by Variants in *TPP1*, The Gene Involved in Classic Late-Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis 2 Disease (CLN2 Disease)



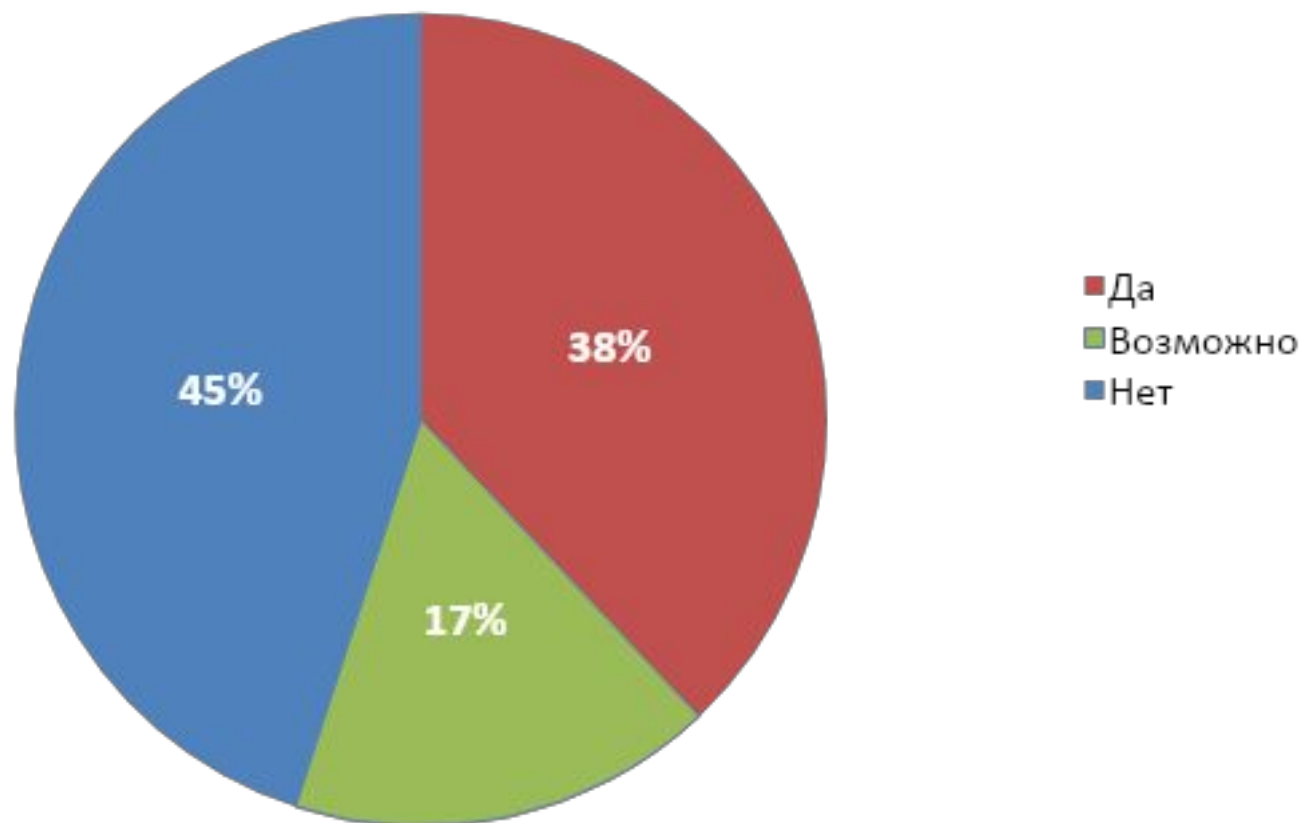
Yu Sun,^{1†} Rowida Almomani,^{1†} Guido J. Breedveld,² Gijs W.E. Santen,¹ Emmelien Aten,¹ Dirk J. Lefeber,^{3,4} Jorrit I. Hoff,⁵ Esther Brusse,⁶ Frans W. Verheijen,² Rob M. Verdijk,⁷ Marjolein Kriek,¹ Ben Oostra,² Martijn H. Breuning,^{1*} Monique Losekoot,¹ Johan T. den Dunnen,¹ Bart P. van de Warrenburg,³ and Anneke J.A. Maat-Kievit^{2*}

Панель “Умственная отсталость и расстройства аутистического спектра” (228 генов)



Всего 95
пациентов

Эффективность тестов на основе NGS у 1623 пациентов с подозрением на моногенную патологию



Ограничения метода

Нельзя обнаружить:

- мутации, приводящие к изменению числа копий генов
- экспансию тринуклеотидных повторов
- мутации в генах митохондриального генома
- мутации в некодирующих участках (интронах)
- однородительские дисомии
- различить мутации в гене и псевдогене (например, при спинальной амиотрофии)

Генерализованные эпилепсии раннего возраста с фебрильными судорогами +

- выделяют 9 генетических вариантов
- все продукты генов формируют структуру ионных и лиганд-зависимых каналов: натриевых и ГАМК
- манифестация заболевания с 6 мес. до 6 лет с фебрильных судорог. Затем - полиморфные судороги, которые могут быть как фебрильными, так и афебрильными
- гены всех вариантов картированы на хромосомах, однако идентифицированы только шесть
- **Таким образом эффективность секвенирования - 67%**

Хромосомные синдромы

- Причина пороков развития различных органов и систем
- Причина умственной отсталости, психических расстройств, эпилепсии
- Часто возникают вследствие носительства сбалансированных перестроек одним из родителей
- Являются серьезной медицинской и социальной проблемой
- Могут быть выявлены во время беременности
- Очень часто остаются недиагностированными даже после консультации врача-генетика

Диагностика хромосомных синдромов

- Хромосомные синдромы традиционно диагностировались при исследовании кариотипа с использованием дифференциальной окраски
- Частота хромосомных синдромов, выявляемых с помощью традиционных методов исследования кариотипа составляет 5-7 на 1000 новорожденных.
- **Но, на самом деле, их больше,** так как возможности человеческого глаза ограничены, следовательно не все структурные перестройки хромосом могут быть выявлены.
- Прежде всего это касается **микроделеций и микродупликаций.**

Интерпретация данных ХМА

© American College of Medical Genetics and Genomics

ACMG STANDARDS AND GUIDELINES

**Genetics
in Medicine**

ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision 2013

Sarah T. South, PhD^{1,2}, Charles Lee, PhD³, Allen N. Lamb, PhD^{1,2}, Anne W. Higgins, PhD⁴
and Hutton M. Kearney, PhD⁵; for the Working Group for the American College of Medical Genetics
and Genomics (ACMG) Laboratory Quality Assurance Committee

Базы данных OMIM, ISCA, DECIPHER, GeneReviews, литературные данные -PubMed

OMIM[®]
Online Mendelian Inheritance in Man[®]
An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders
Updated 2 November 2012

 **DECIPHER**
GRCh37

 **GeneReviews**
NCBI

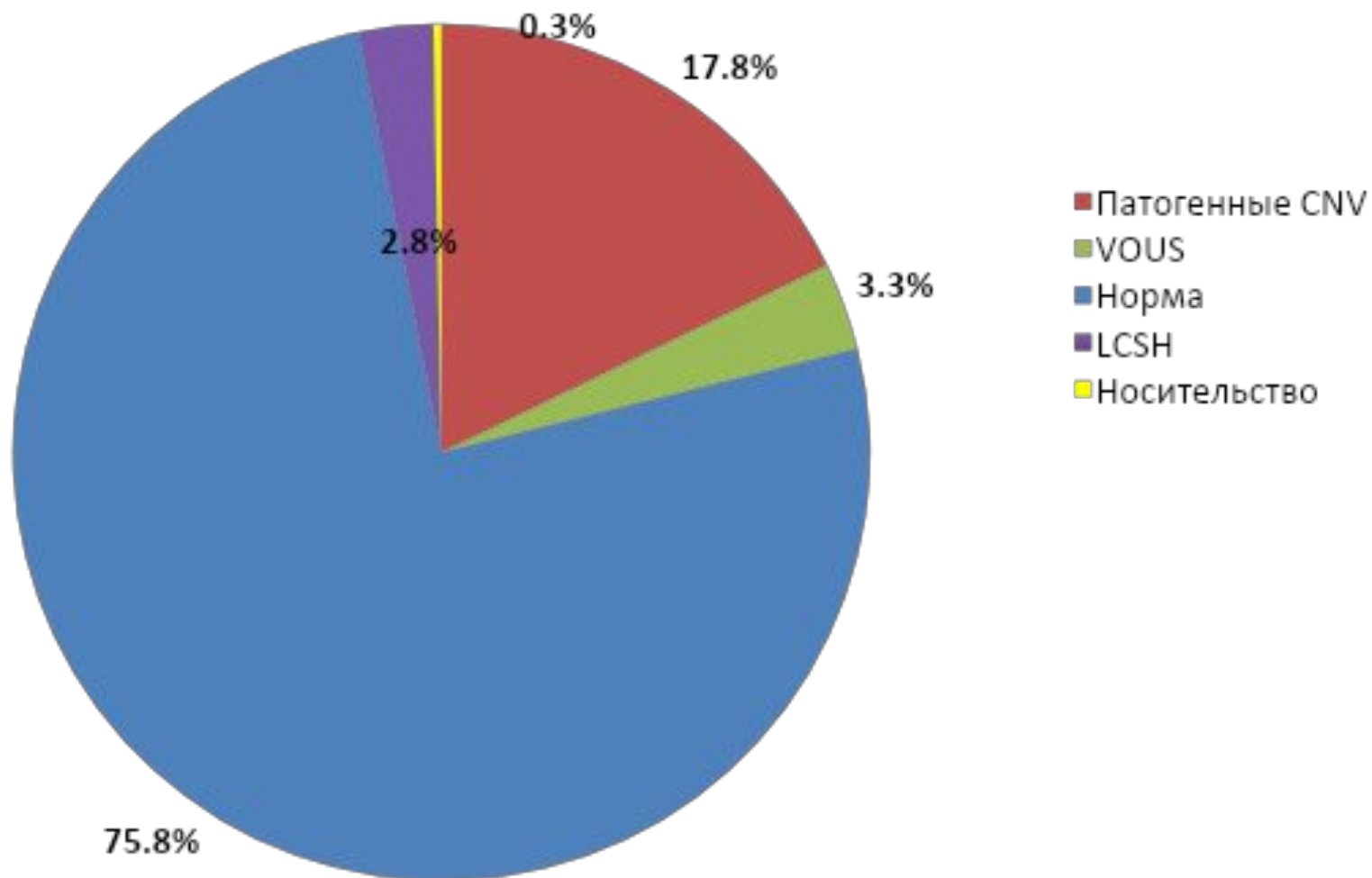
PubMed.gov
US National Library of Medicine
National Institutes of Health

Database of Genomic Variants

SFARIgene^{2.0}

ГЕНОМЕД

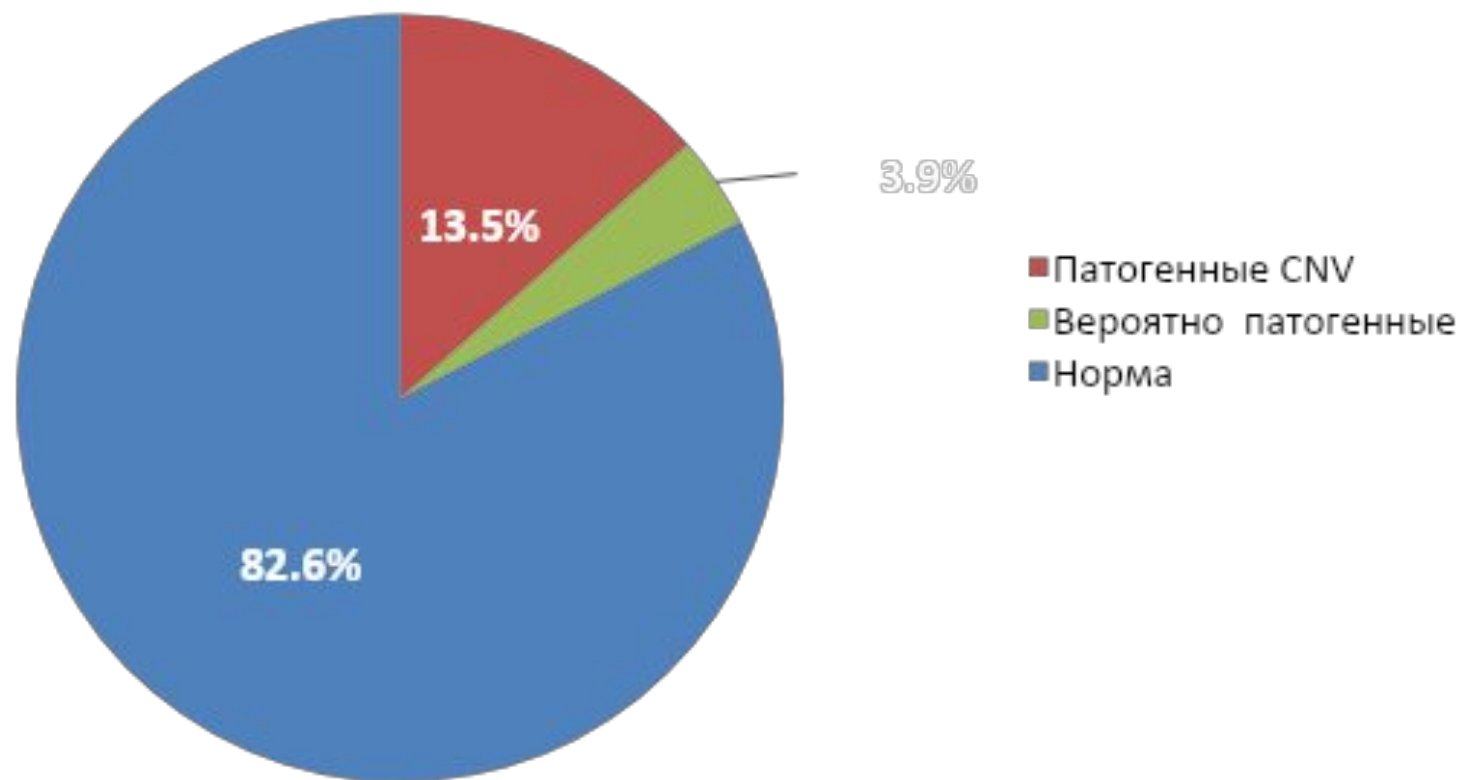
Диагностическая эффективность ХМА



Всего 3211 пациентов

Диагностическая эффективность ХМА

Всего обследовано 259 пациентов, в
направительном диагнозе которых была
указана эпилепсия



Клинический пример

Пациент Г., мальчик, 4

г.

Клиниче

Крипто

фокаль

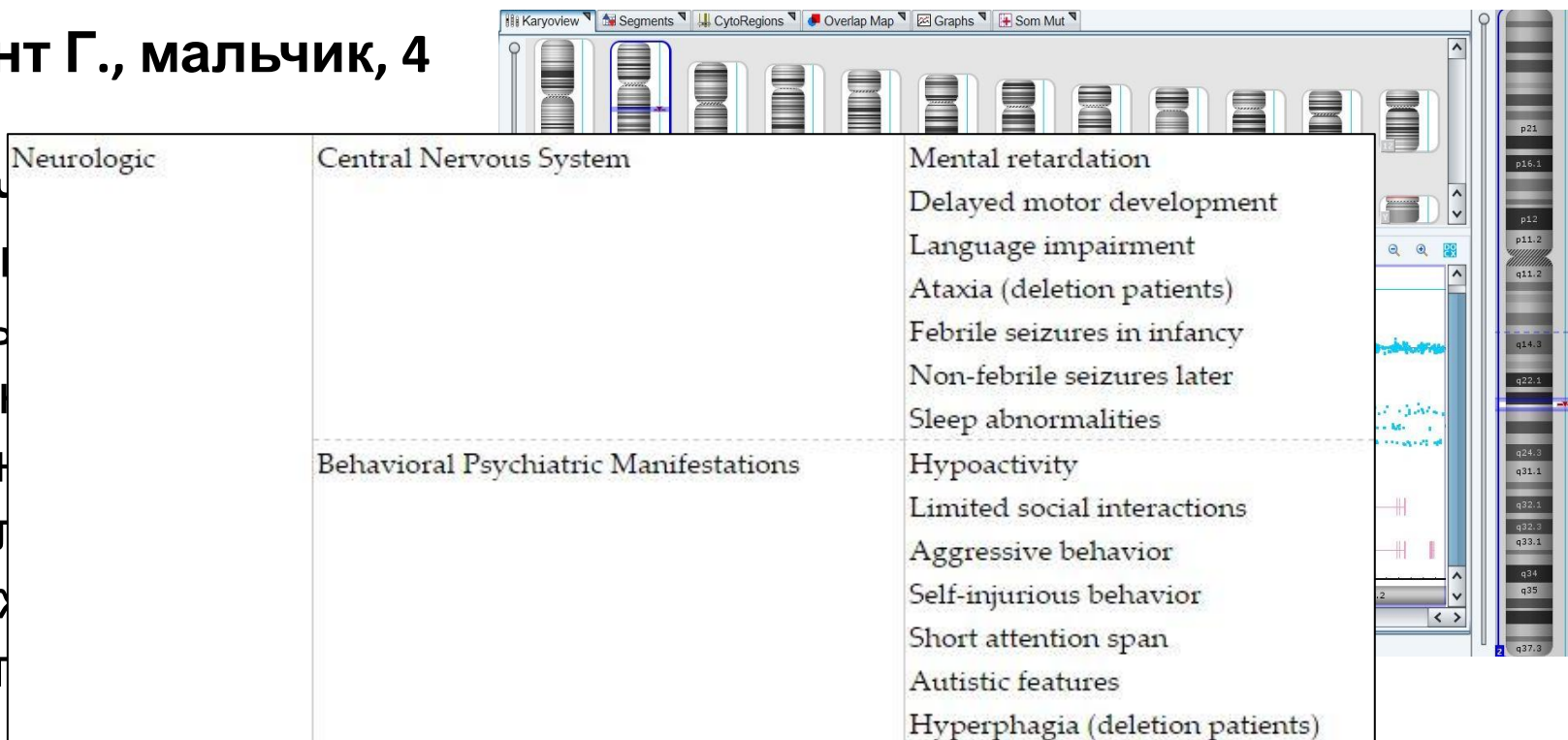
версив

вторичн

генерал

судорох

приступ



Аутосомно-доминантная умственная отсталость, тип 1 (OMIM: 156200) обусловлена гетерозиготными делециями гена *MBD5*. У пациентов с данным синдромом описаны как фебрильные, так и афебрильные судороги.

Показания к проведению ХМА

ХМА показан в качестве замены анализа кариотипа при:

- Подозрению на микроделеционный/микродупликационный синдром
- Множественных врожденных пороках развития и/или лицевых дизморфий
- Задержке развития (моторного, психоречевого)
- Расстройствах аутистического спектра
- Эпилепсии

НАСЛЕДСТВЕННЫЕ СИНДРОМЫ И ОСЛОЖНЕНИЯ АНЕСТЕЗИИ

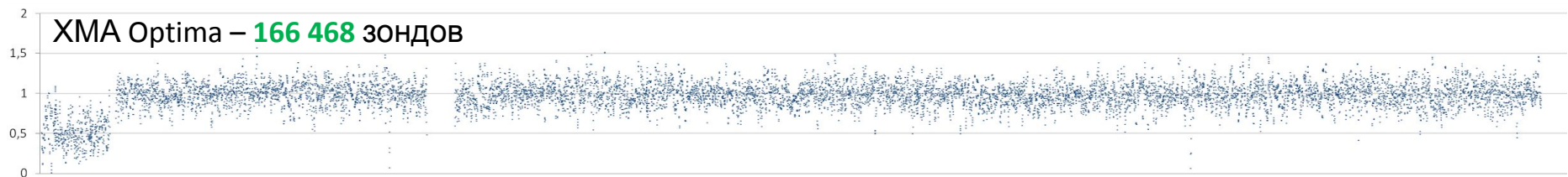
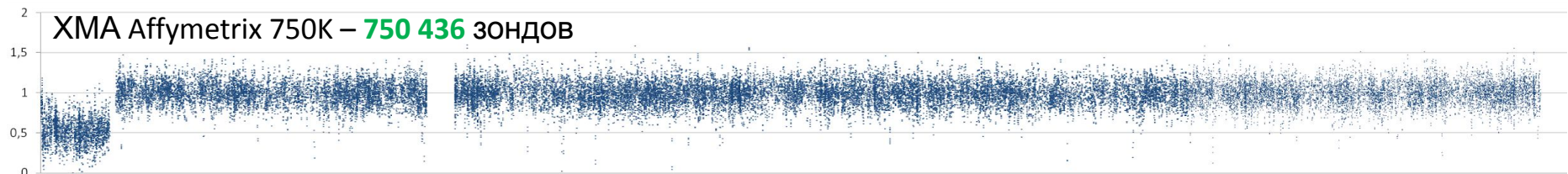
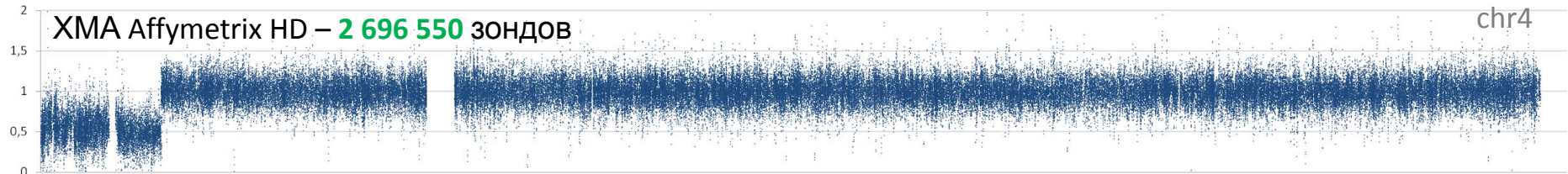
(Merlin G. Butler et al. «Specific Genetic Diseases at Risk for Sedation/Anesthesia Complications» *Anesth Analg* 2000;91:837–55)

Синдром	Возможные осложнения						
	Нарушение проходимости и дых. путей	Нарушение механики дыхания	Желудочный рефлюкс	Сердечно-сосудистые нарушения	Нервно-мышечные нарушения	Болезни печени	Болезни почек
Синдром Ангельмана					+		
Синдром Беквита-Видемана	+	+		+	+	+	+
Синдром делеции 3p25-pter	+			+	+		+
Синдром делеции 4q31-qter	+	+	+	+	+		+
Синдром делеции 9p22-pter	+	+		+	+		+
Синдром делеции 22q11.2	+	+		+	+		
Синдром дупликации 3q21-qter	+	+		+	+		+
Синдром дупликации 4p16.2-p15.1	+	+		+	+		+

Анализ CNV: ХМА различной плотности (и NGS?)

с. Вольфа-Хиршхорна (del4p; различные образцы),

chr4



Ограничения метода

- сбалансированные хромосомные перестройки (транслокации, инверсии)
- точковые мутации
- болезни экспансии тринуклеотидных повторов
- микроделеции/микродупликации, размер которых меньше разрешающей способности микроматрицы

Какой метод выбрать?



GeneReviews® [Internet].

► [Show details](#)

GeneReviews by Title

[GeneReviews Advanced Search](#) [Help](#)

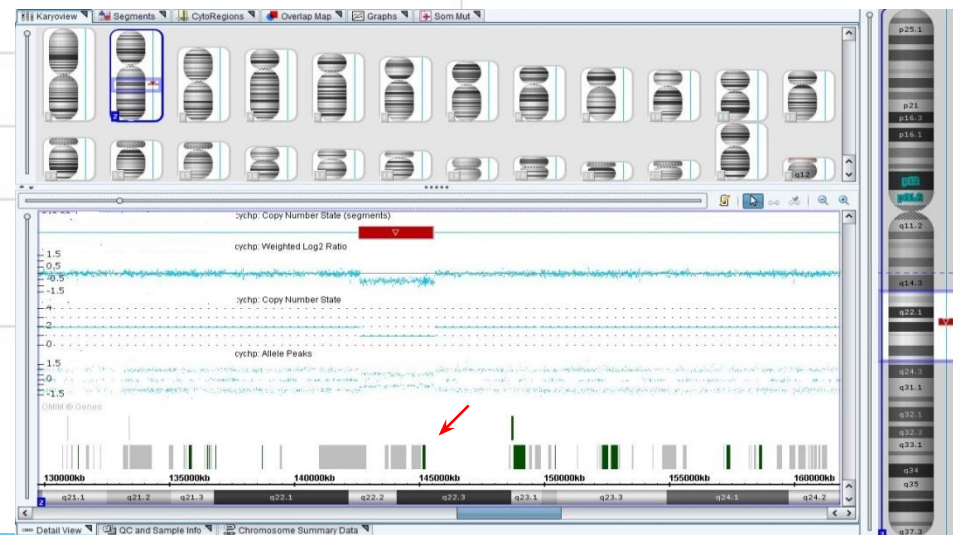
Mowat-Wilson Syndrome

Synonym: Hirschsprung Disease-Mental Retardation Syndrome

Margaret P Adam, MD, MS, FAAP, FACMG, Jessie Conta, MS, LGC, and Lora JH Bean, PhD, FACMG.

Summary of Testing Used in Mowat-Wilson Syndrome

Gene ¹	Test Method	Mutations Detected ²	Mutation Detection Frequency by Test Method ³
ZEB2	Cytogenetic analysis	Large-scale rearrangements	~2%
	Sequence analysis	Sequence variants ⁴	~81% ^{5,6}
	FISH analysis	Large deletions of ZEB2	~15% ⁷
	Deletion/ duplication analysis ⁸	Exonic or whole- gene deletions	~2% ⁹



Множественные врожденные аномалии развития. Задержка развития и аутизм без других характерных фенотипических признаков

ПРИЗНАКИ, ХАРАКТЕРНЫЕ ДЛЯ ГРУППЫ ЗАБОЛЕВАНИЙ (напр. наследственные эпилепсии, нервно-мышечные заболевания)

СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ФЕНОТИП



Хромосомный микроматричный анализ

ПАНЕЛИ ГЕНОВ

ТАРГЕТНЫЕ МЕТОДЫ



Секвенирование митохондриального генома



Полноэкзомное секвенирование трио



Как выбрать лабораторию?

Что хочет врач?

- Поставить диагноз назначив одно исследование

Чего хотят родители пациента?

- Вылечить ребенка
- Заплатить меньше
- Получить результат быстрее

Что предлагает лаборатория?

- Опыт (проведен анализ более 1000 пациентов)
- Качество (работа на оборудовании и реагентах экспертного уровня)
- Клиническая интерпретация
- Информационная поддержка врача и пациента

Знание генотипа - ключ к успешному лечению

Синдром	Лечение
Недостаточность биотинидазы	Биотин
Гипомагнеземия 1 типа	Препараты магния
Пиридоксин-зависимые судороги	Введение пиридоксаль-гидрохлорида

Сколько слов должно быть в направлении?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

проконсультирована с целью уточнения диагноза. У девочки множественные врожденные пороки развития: микрофтальм, микрокорнея, ВПС (ДМЖП), диспластичность пальцев рук, врожденный вывих тазобедренных суставов.

Проведенное исследование – хромосомный микроматричный анализ – исключил наличие микроделеционных синдромом, хромосомный дисбаланс по микроперестройкам хромосом. У девочки была обнаружена трисомия X хромосомы при цитогенетическом исследовании на первых месяцах жизни.

При коллегиальном осмотре отмечены пороки развития и фенотипические особенности девочки, которые позволяют обосновать диагноз синдром грима Кабуки.

Девочка нуждается в продлении инвалидности, наблюдении офтальмолога, кардиолога, ортопеда.

Данный синдром в подавляющем большинстве случаев относится к спорадическим случаям, повторный риск не превышает общепопуляционное значение. Следует помнить о возрастном риске хромосомной патологии (в данном случае он достигает 1.5%)

Сколько слов должно быть в направлении?

Выявлена ранее не описанная гетерозиготная мутация в 51 экзоне гена *KMT2D* (chr12:49416511G>T), приводящая к появлению сайта преждевременной терминации трансляции в 5400 кодоне (p.Tyr5400Ter, NM_003482.3).

Гетерозиготные мутации в гене *KMT2D*, нарушающие синтез полноразмерного белка, описаны у пациентов с синдромом Кабуки, тип 1 (OMIM: 147920). Мутация не зарегистрирована в контрольных выборках "1000 геномов", ESP6500 и ExAC. Поскольку мутация нарушает синтез полноразмерного белка, ее следует расценивать как вероятно патогенную.

Мифы и реальность

Расхожий миф: для проведения современных генетических исследований необходимо куда-то ехать...

это не так!



г. Нижний Новгород, Верхневолжская наб.
2Б

+7(986) 725-25-25

и другие города России

Заключение

Для правильного выбора генетического исследования имеет значение:

- Фенотип пациента
- Особенности клинической картины пациента
- Наличие признаков генетически гетерогенного заболевания
- Наличие МВПР
- Данные о частотах тех или иных молекулярных нарушений при предполагаемом синдроме

Заключение

Для правильной интерпретации данных, нужно:

- Направить пациента на консультацию генетика
- Сопоставить клинику и фенотип, описанные при выявленном варианте с наблюдающимися у пациента
- Использовать литературу и базы данных
- Использовать методы подтверждающей диагностики

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ

8-925-153-50-45

dr.kanivets@genomed.ru