



Curs de Genètica Aplicada a Medicina Fetal

Malalties monogèniques i el seu diagnòstic prenatal amb anàlisi mutacional, panell o seqüenciació de l'exoma

Dr. Ignacio Blanco

Coordinador,

Programa d'Assessorament i Genètica Clínica
Hospital Germans Trias i Pujol



Germans Trias i Pujol
Hospital
Institut Català de la Salut



Donat el caràcter i la finalitat exclusivament docent i eminentment il·lustrativa de les explicacions a classe d'aquesta presentació, l'autor s'acull a l'article 32 de la Llei de propietat intel·lectual vigent respecte de l'ús parcial d'obres alienes com ara imatges, gràfics o altre material contingudes en les diferents diapositives

Totes les imatges presentades s'inclouen com a cites necessàries per il·lustrar les explicacions d'aquesta classe



Malalties monogèniques

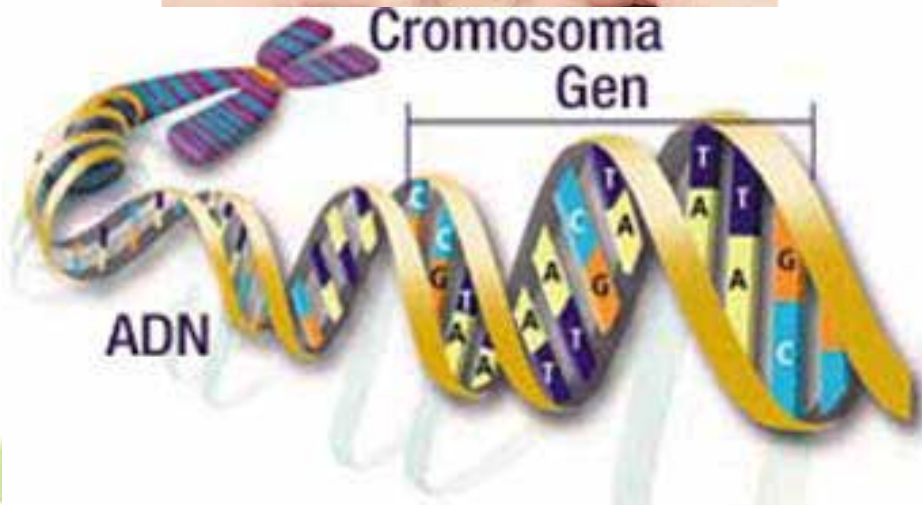


- La taxa de prevalença de **defectes congènits** (detectats prenatalment o en els primers dies de vida) de la població se situa en un **3,6%** del total de naixements.
- Els defectes congènits causats per una **anomalia cromosòmica** (monogènica) o per una **anomalia genètica (monogènica)**.



Protocol de diagnòstic prenatal d'anomalies congènites fetals

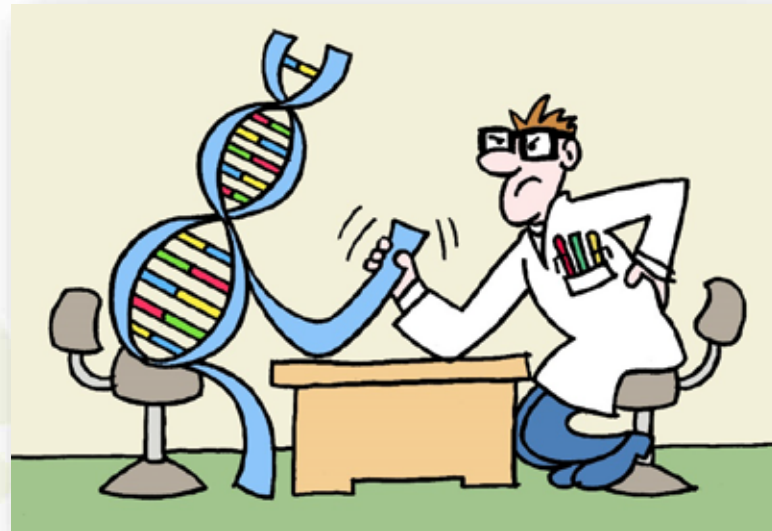
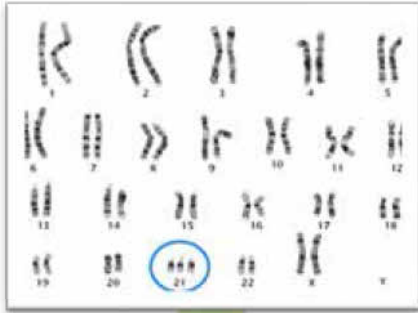
- maternitat
- infància
- adolescència



Malalties monogèniques



- La taxa de prevalença de **defectes congènits** (detectats prenatalment o en els primers dies de vida) de la població se situa en un **3,6%** del total de naixements.
- Els defectes congènits poden ser causats per una **anomalia cromosòmica** o per una **anomalia genètica (monogènica o poligènica)**.





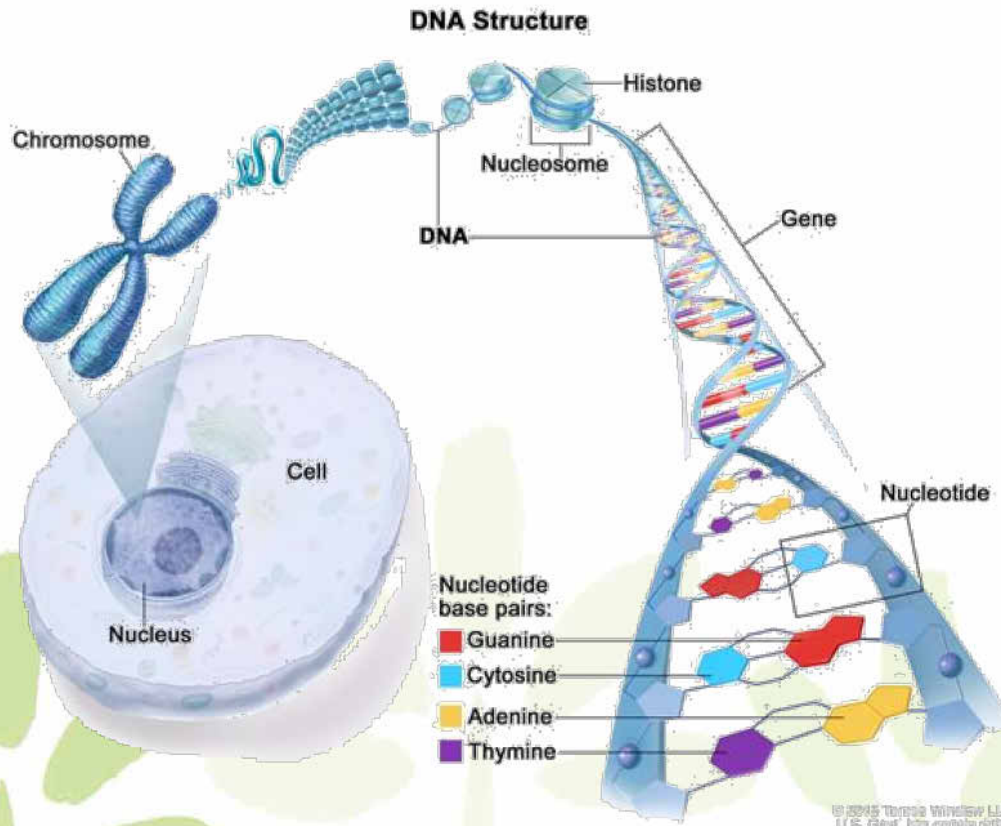
- La taxa de prevalença de **defectes congènits** (detectats prenatalment o en els primers dies de vida) de la població se situa en un **3,6%** del total de naixements.
- Els defectes congènits poden ser causats per una **anomalia cromosòmica** o per una **anomalia genètica (monogènica o poligènica)**.
- Quan s'identifiquen alteracions congènites fetals en l'ecografia prenatal, el cariotip i l'array revelen un diagnòstic fins a un **20 a 30%**, depenent del tipus de defecte estructural. Per la resta, una malaltia monogènica podria ser l'explicació necessària.



Malalties monogèniques



- Les **malalties hereditàries monogèniques** són aquelles produïdes per alteracions en la seqüència d'ADN d'un sol gen.



Malalties monogèniques



- Les **malalties hereditàries monogèniques** són aquelles produïdes per alteracions en la seqüència d'ADN d'un sol gen.
- Les malalties hereditàries monogèniques son més infreqüents que les malalties multifactorials però fins a la data s'han descrit més de **14.900** gens implicats amb malalties i **7.900 fenotips** (www.omim.gov).

5 YEARS
OMIM
Human Genetics Knowledge
for the World

OMIM®

Online Mendelian Inheritance in Man®

An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders

Updated January 27, 2017

Search OMIM for clinical features, phenotypes, genes, and more...

Advanced Search : OMIM, Clinical Synopses, Gene Map

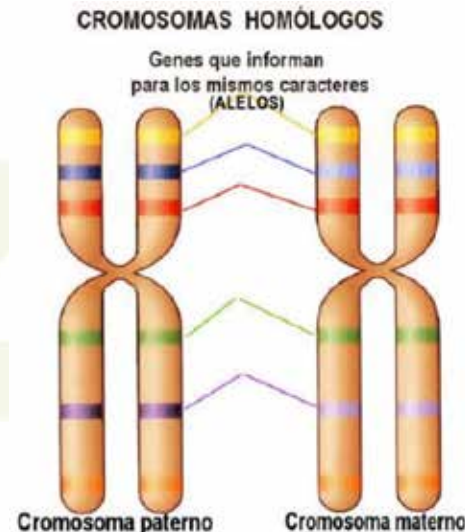
Need help? : Example Searches, OMIM Search Help, OMIM Tutorial

Mirror site : mirror.omim.org

Malalties monogèniques



- Les **malalties hereditàries monogèniques** són aquelles produïdes per alteracions en la seqüència d'ADN d'un sol gen.
- Les malalties hereditàries monogèniques son més infreqüents que les malalties multifactorials però fins a la data s'han descrit més de **14.900** gens implicats amb malalties i **7.900 fenotips** (www.omim.gov).
- Les mutacions poden estar presents en **un** o en els **dos al·lels**.



Malalties monogèniques



Inheritance Patterns

Autosomal recessive:

Involves a recessive allele on a non-sex chromosome

Autosomal dominant:

Involves a dominant allele on a non-sex chromosome

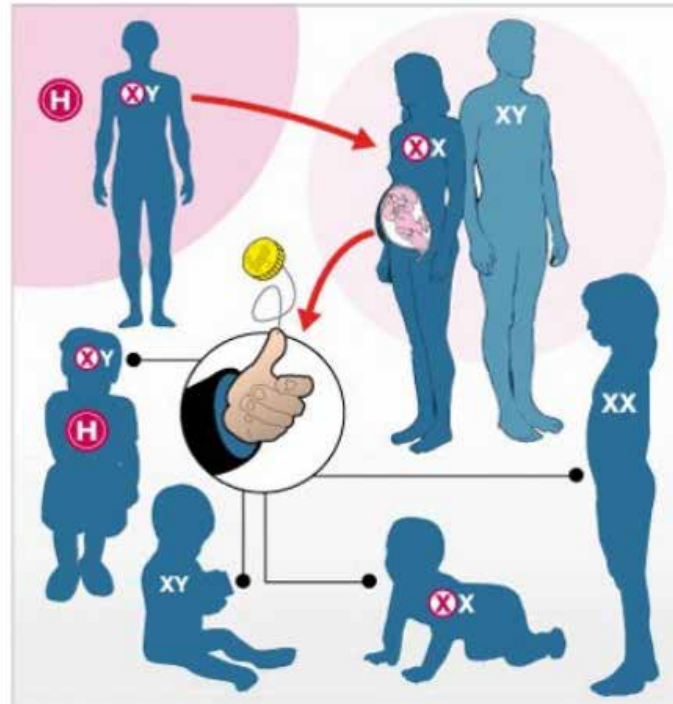
X-linked recessive:

Involves a recessive allele on the X-chromosome

X-linked dominant:

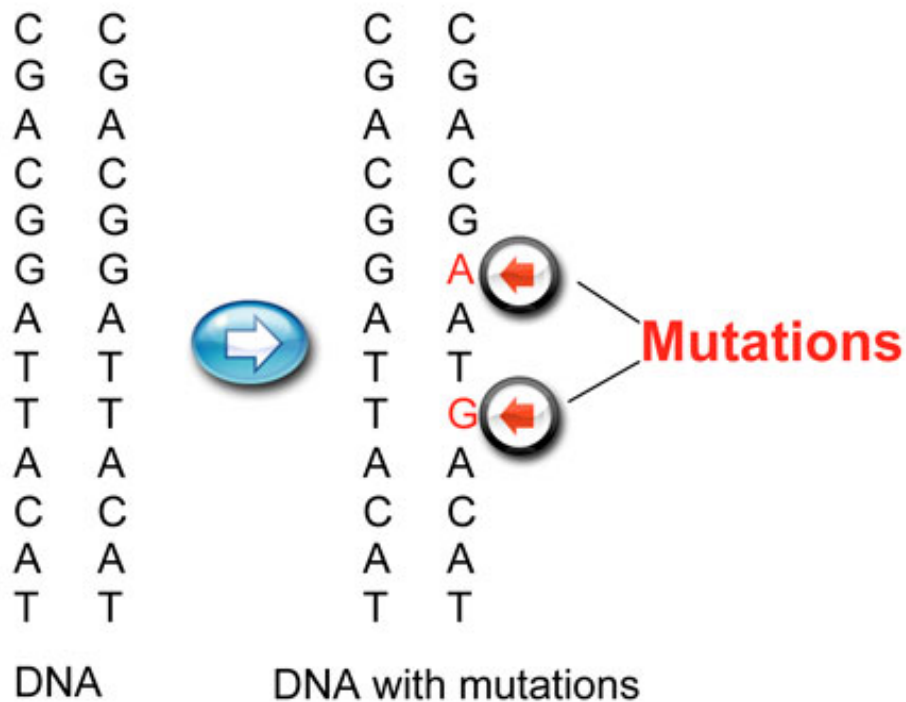
Involves a dominant allele on the X-chromosome

Y-linked: Involves an allele on the Y-chromosome



- Les malalties monogèniques, en general, es poden heretar mitjançant un **patró d'herència mendelià** (autosòmic dominant, autosòmic recessiu o lligat al sexe), encara que poden existir altres patrons.

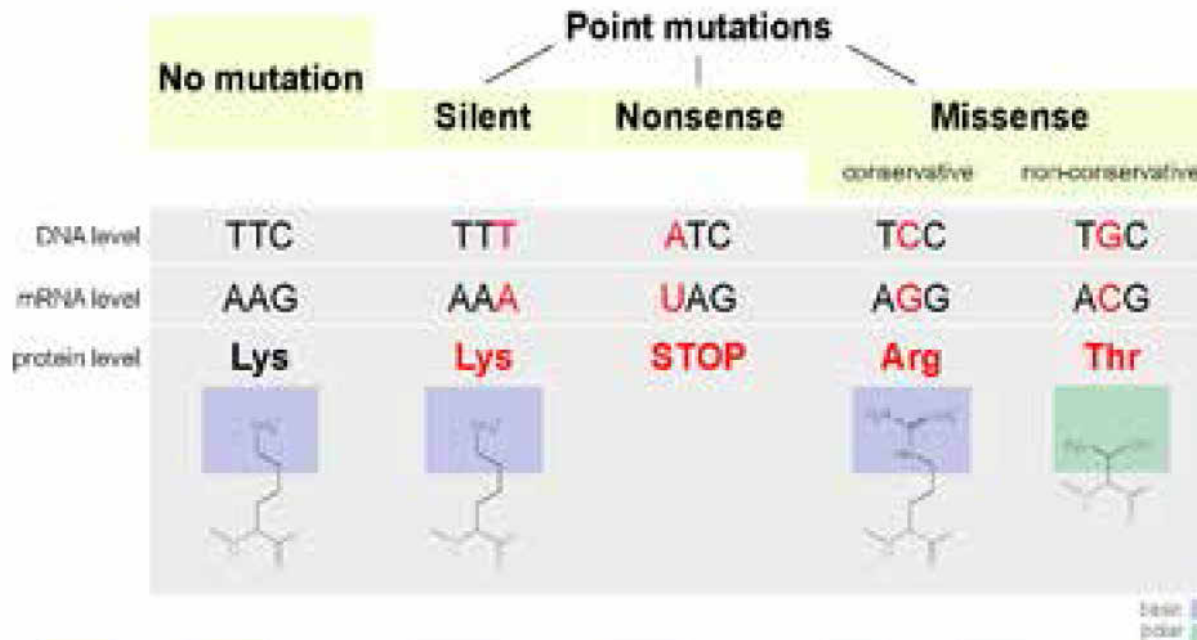
Malalties monogèniques - *Mutacions*



Malalties monogèniques - *Mutacions*



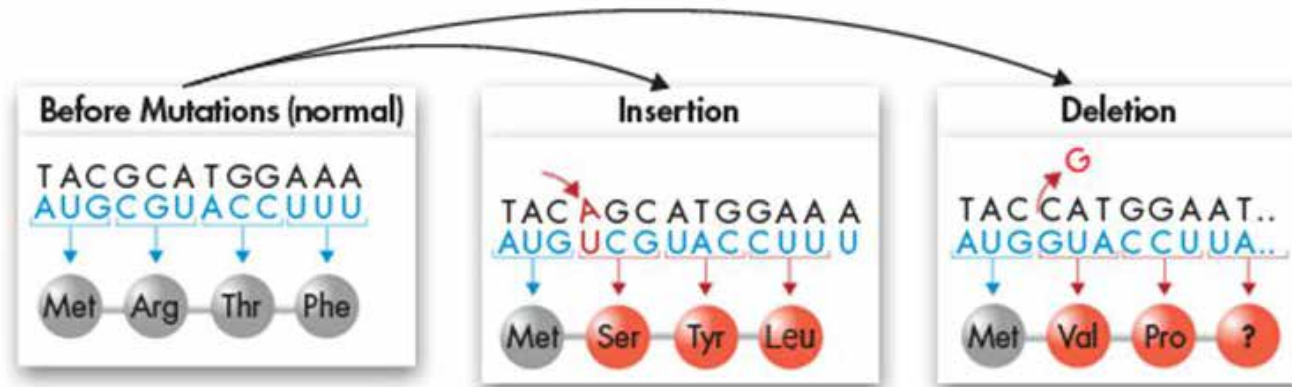
- Les principals tipus de mutacions en les **malalties hereditàries monogèniques**:
 - Mutacions puntuals (nonsense, missense, polimorfismes)



Malalties monogèniques - *Mutacions*



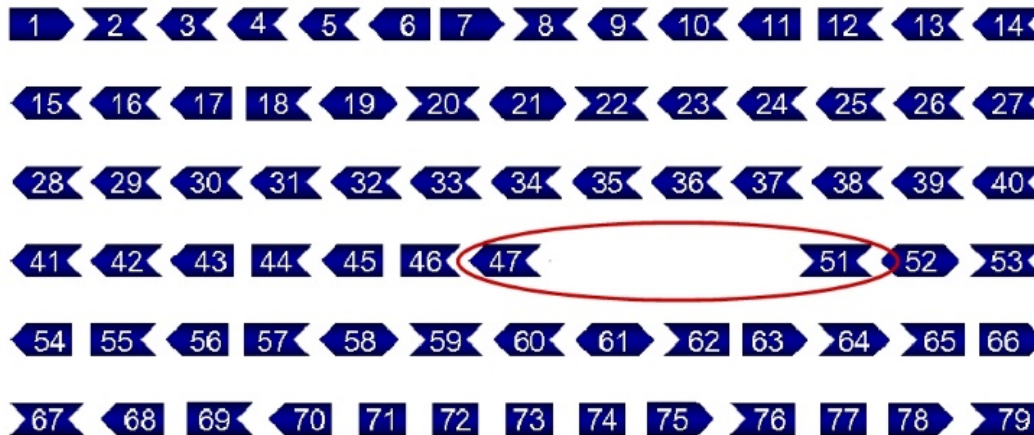
- Les principals tipus de mutacions en les **malalties hereditàries monogèniques**:
 - Mutacions puntuals (nonsense, missense, polimorfismes)
 - Mutacions *frameshift* (delecions, insercions)



Malalties monogèniques - *Mutacions*



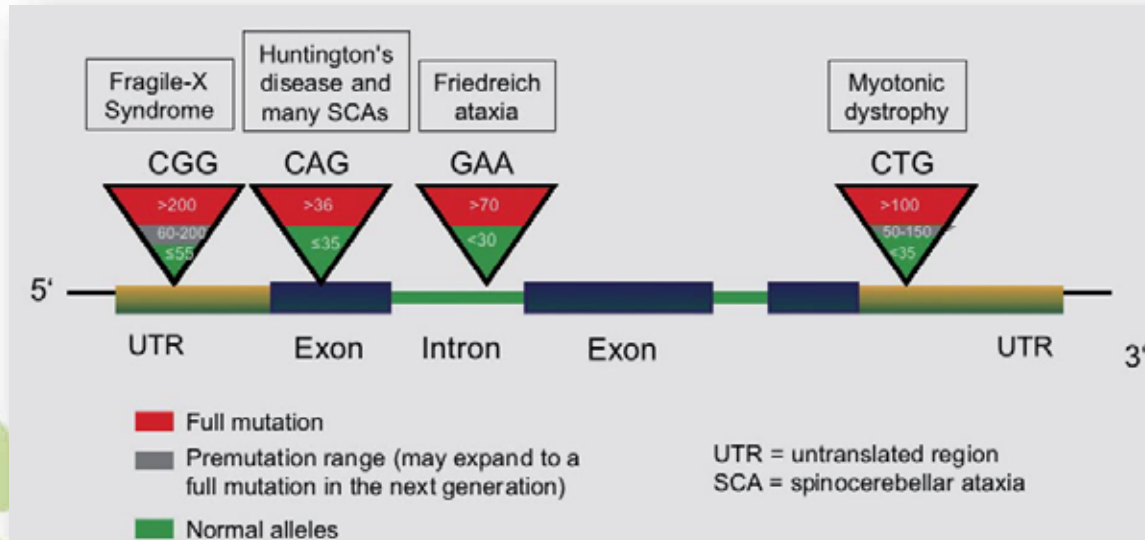
- Les principals tipus de mutacions en les **malalties hereditàries monogèniques**:
 - Mutacions puntuals (nonsense, missense, polimorfismes)
 - Mutacions *frameshift* (delecions, insercions)
 - Grans delecions o reordenaments.



Malalties monogèniques - *Mutacions*



- Les principals tipus de mutacions en les **malalties hereditàries monogèniques**:
 - Mutacions puntuals (nonsense, missense, polimorfismes)
 - Mutacions *frameshift* (delecions, insercions)
 - Grans delecions o reordenaments.
 - Expansions de triplets.





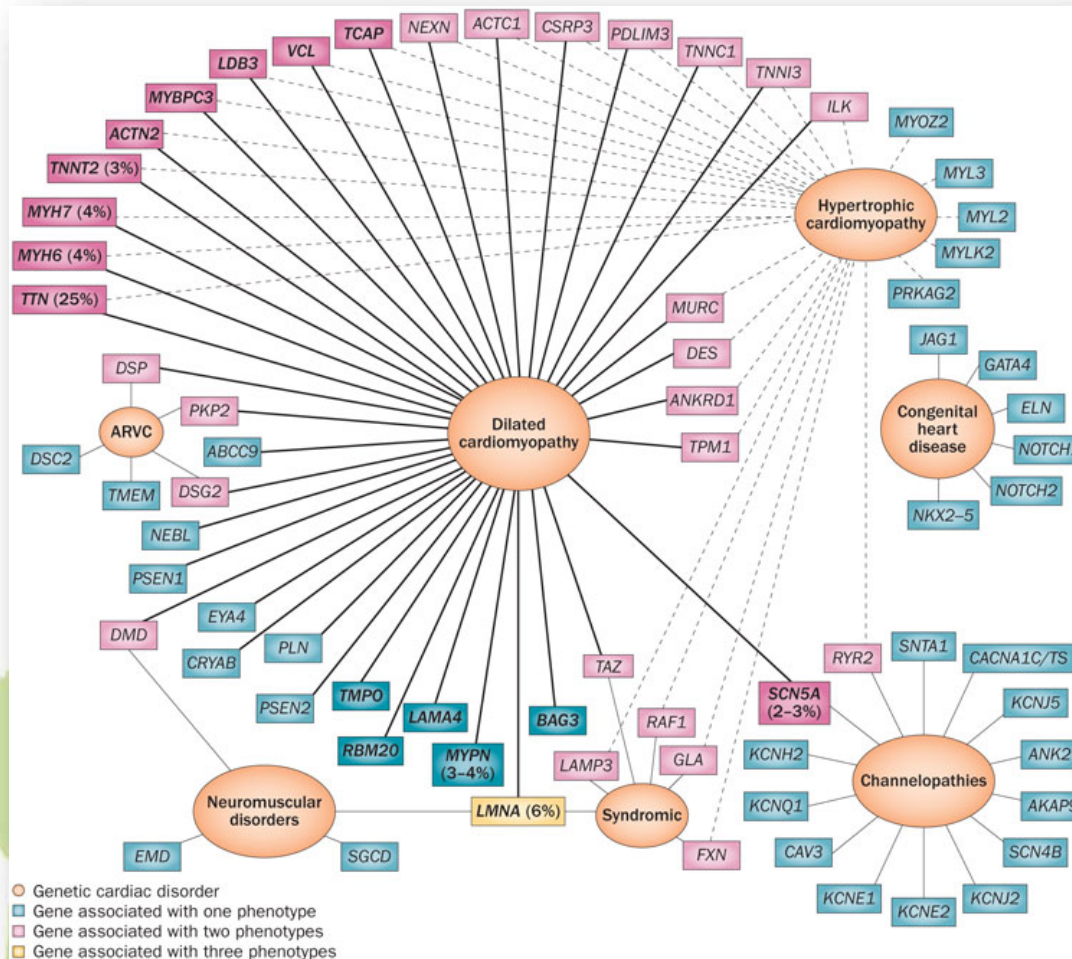
- És important tenir present diferents conceptes:



Malalties monogèniques - Mutacions



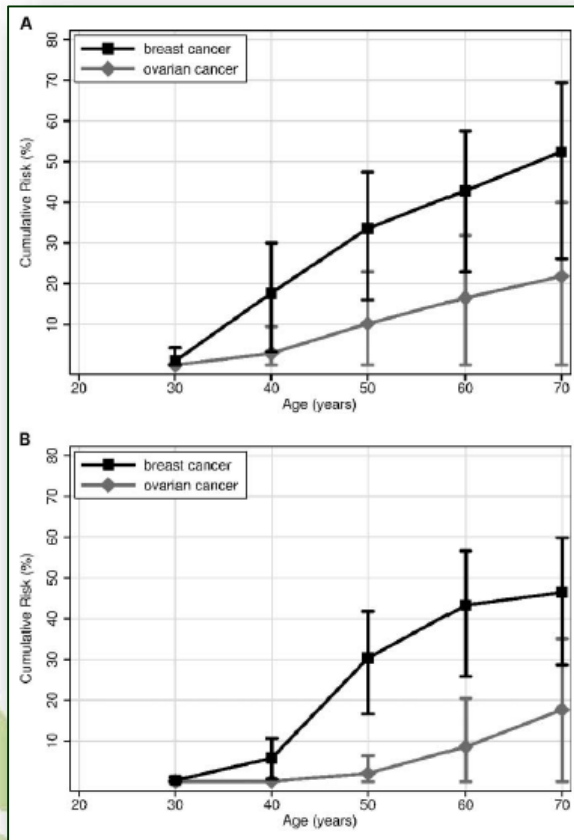
- És important tenir present diferents conceptes:
 - Heterogeneïtat genètica.



Malalties monogèniques



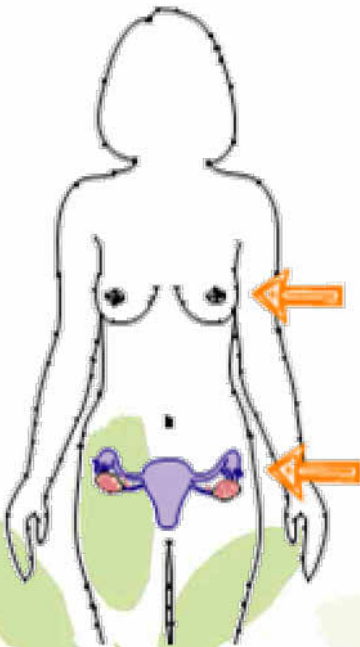
- És important tenir present diferents conceptes:
 - Heterogeneïtat genètica.
 - Penetrància variable.



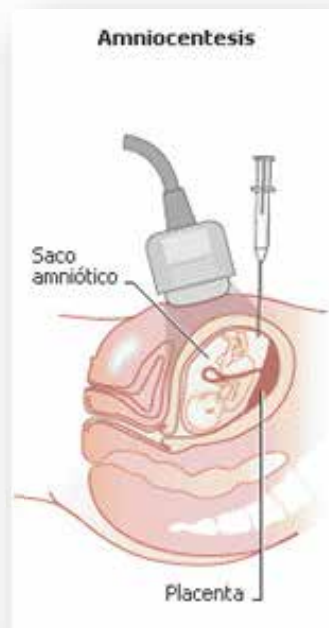
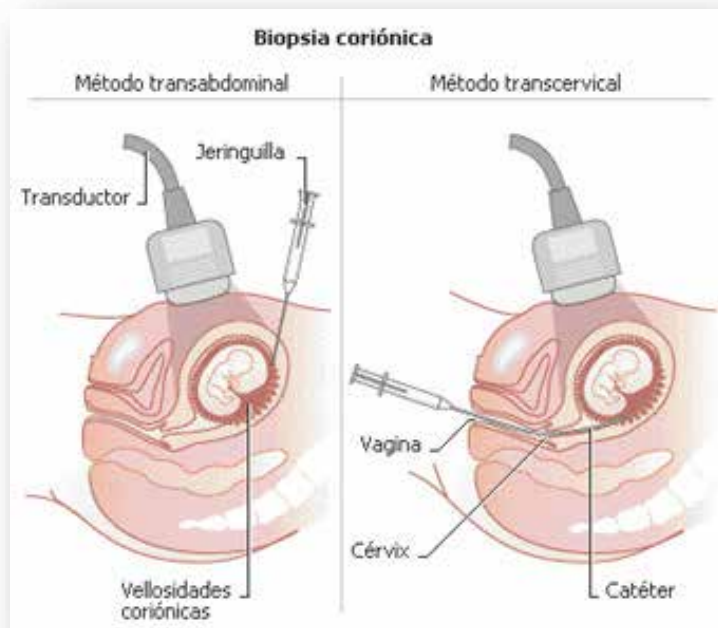
Malalties monogèniques



- És important tenir present diferents conceptes:
 - Heterogeneïtat genètica.
 - Penetrància variable.
 - Expressivitat variable.



Diagnòstic Genètic Prenatal





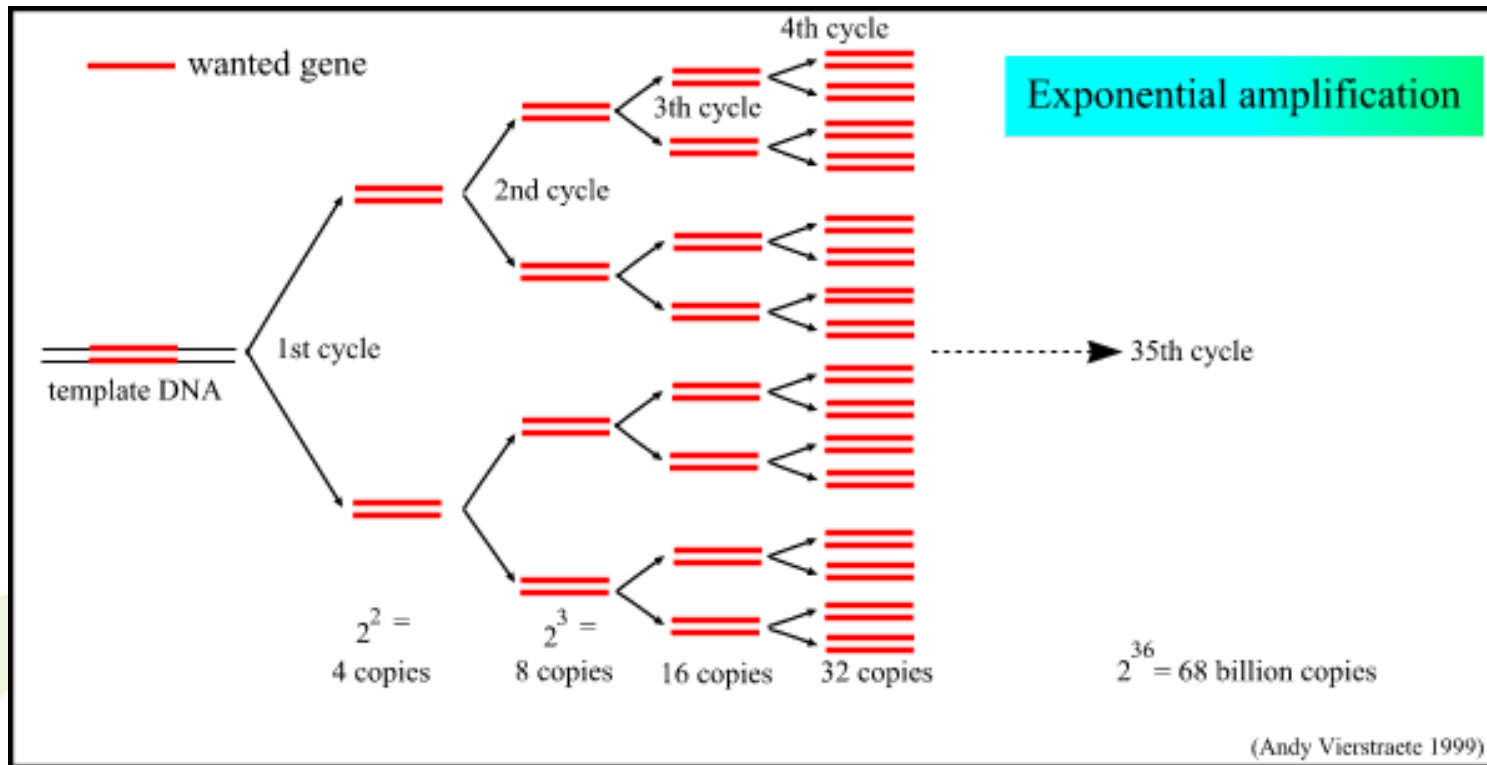
- Seqüenciació mètode Sanger (*seqüenciació clàssica*)





■ Seqüenciació mètode Sanger (*seqüenciació clàssica*)

Amplificació



Diagnòstic Genètic Prenatal - Seqüenciació



■ Seqüenciació mètode *Sanger* (seqüenciació clàssica)

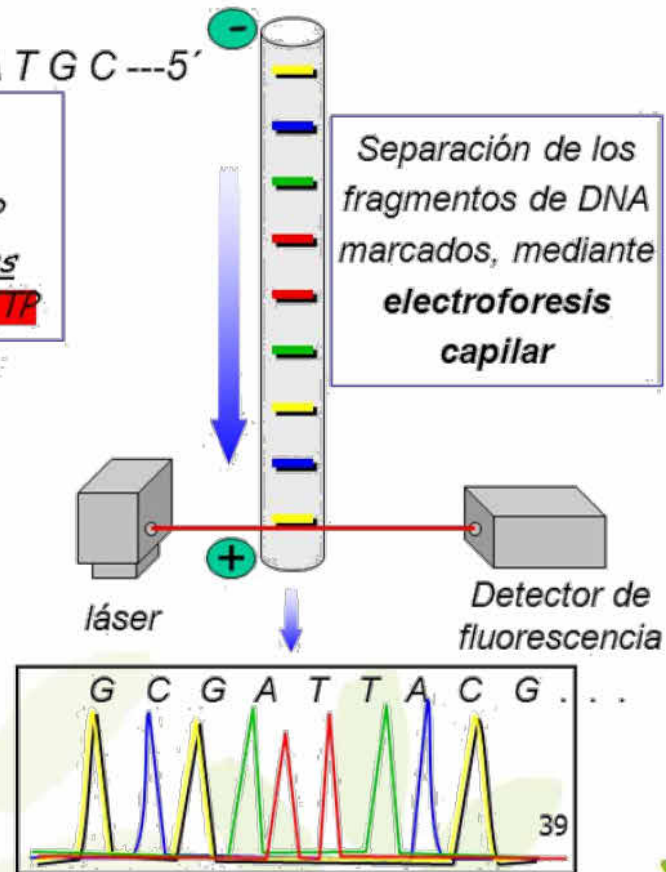
Amplificació → **Seqüenciació**

Oligo: 5'--CTTAA

Molde: 3'--GAATTCGCTAATGC---5'

- DNA polimerasa
- Nucleòtids
dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- Terminadores fluorescentes
ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP

5'--CTTAA**G**-3'
5'--CTTAA**C**-3'
5'--CTTAA**G**C**G**-3'
5'--CTTAA**G**C**G****A**-3'
5'--CTTAA**G**C**G**A**T**-3'
5'--CTTAA**G**C**G**A**T****T**-3'
5'--CTTAA**G**C**G**A**T****T****A**-3'
5'--CTTAA**G**C**G**A**T****T****A****C**-3'
5'--CTTAA**G**C**G**A**T****T****A****C****G**-3'





- Seqüenciació mètode *Sanger* (*seqüenciació clàssica*)

Amplificació → **Seqüenciació**

	SANGER
ESTRATEGIA	REACCIONES SEPARADAS PARA LOS DISTINTOS EXONES DE UN SOLO GEN
MUESTRAS	CLONES, AMPLICONES DE PCR
LONGITUD DE LA LECTURA	Kb
DATOS	UNA LECTURA/UNA MUESTRA
RESOLUCION	MUCHAS MOLÉCULAS EN LA MISMA LECTURA
VENTAJA	ELEVADA PRECISION
DESVENTAJA	CARO Y CONSUME TIEMPO





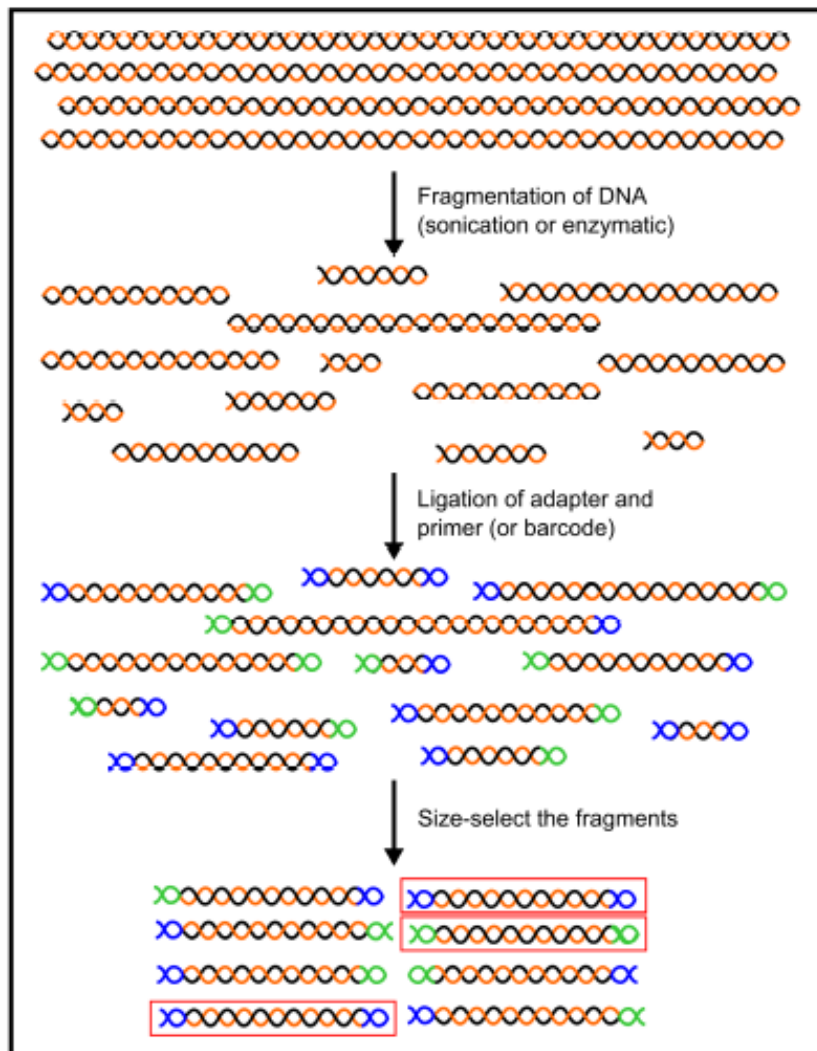
- Next Generation Sequencing





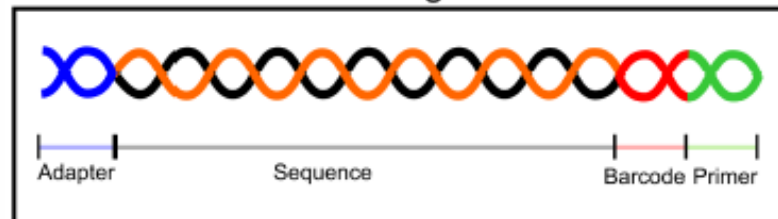
■ Next Generation Sequencing

Preparació de llibreries



Library preparation

Good fragments :



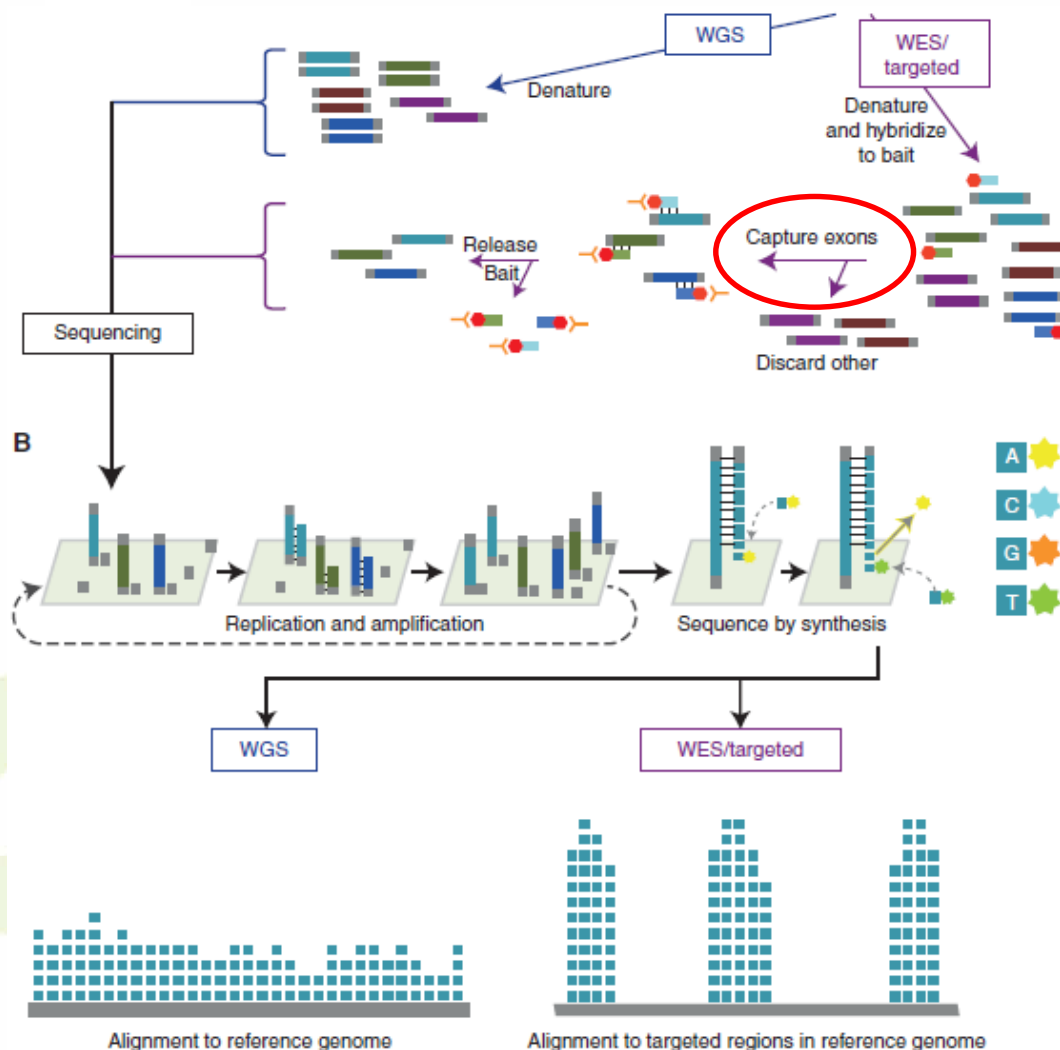


Next Generation Sequencing

Preparació de llibreries



Seqüenciació/alineació



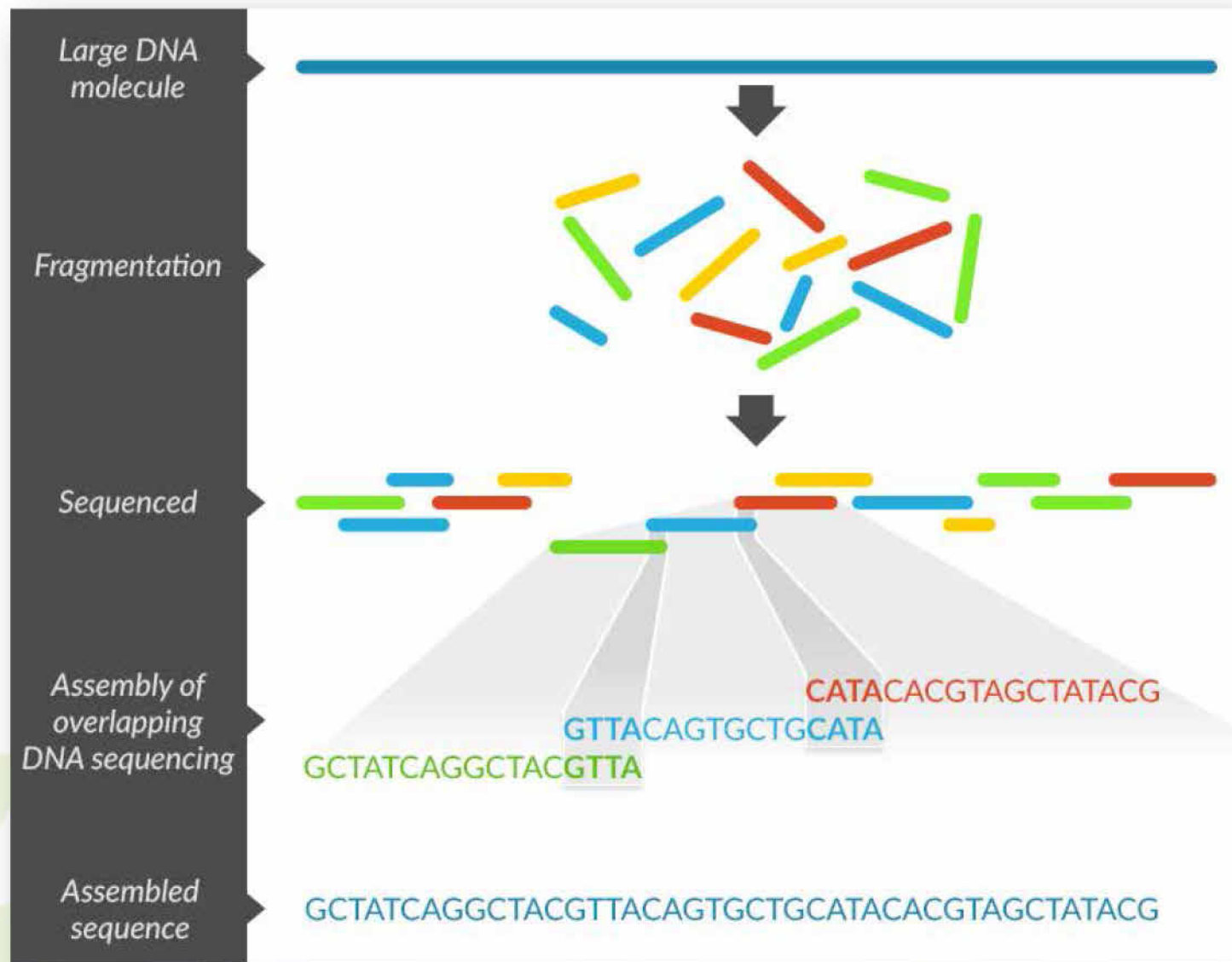
WGS: Whole Genome Sequencing

WES: Whole Exome Sequencing

Targeted: Dirigido (panels)



Diagnòstic Genètic Prenatal - Seqüenciació

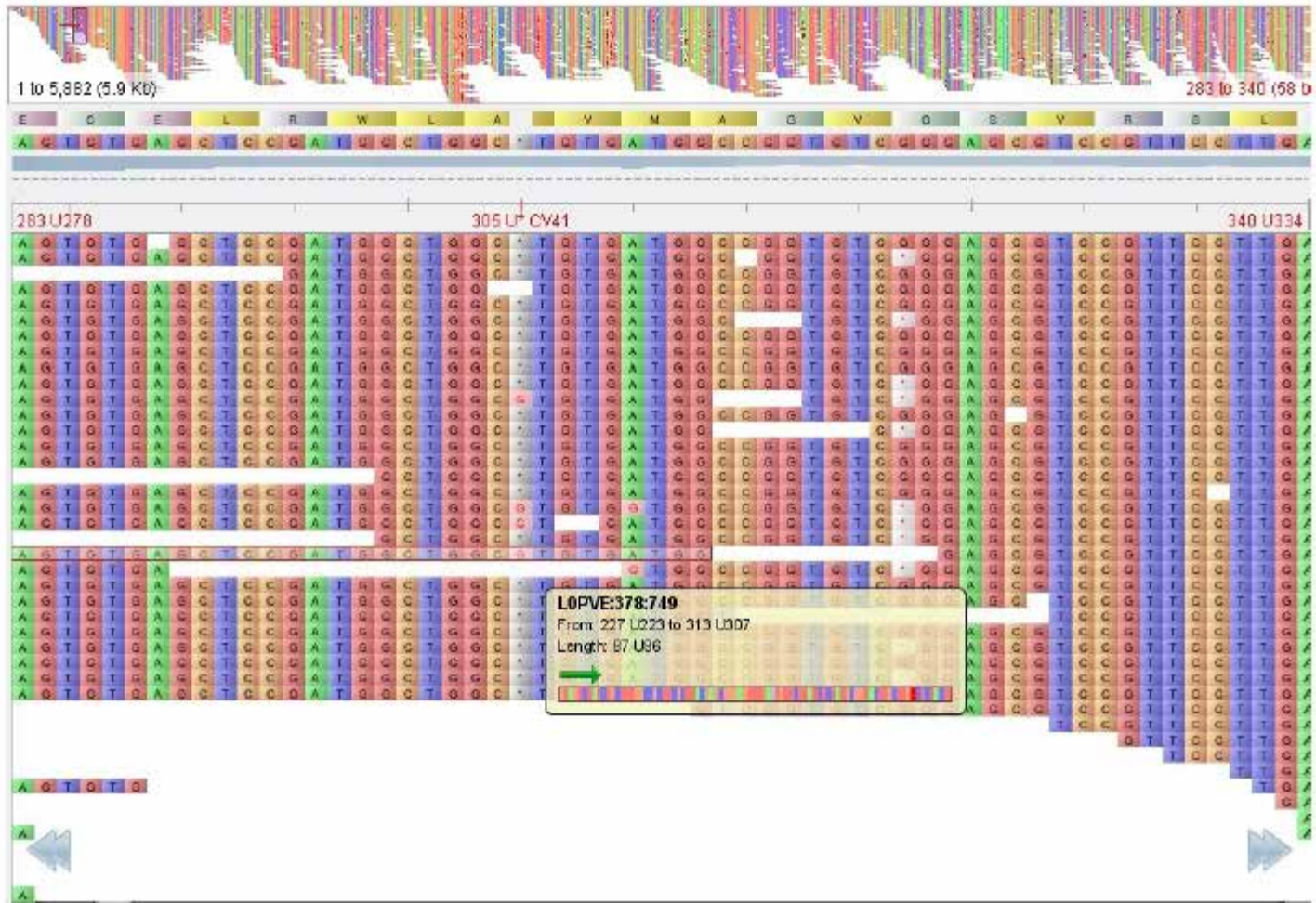


Diagnòstic Genètic Prenatal - Seqüenciació



Next Generation sequencing :

Assembly of the largest contig



Diagnòstic Genètic Prenatal - Seqüenciació



Next Generation sequencing :

Light blue : forward
dark blue : reverse sequence

118/



Diagnòstic Genètic Prenatal - Seqüenciació



Next Generation sequencing :

CV : coverage of a specific part



Cobertura, profunditat, repeticions

Diagnòstic Genètic Prenatal - Seqüenciació

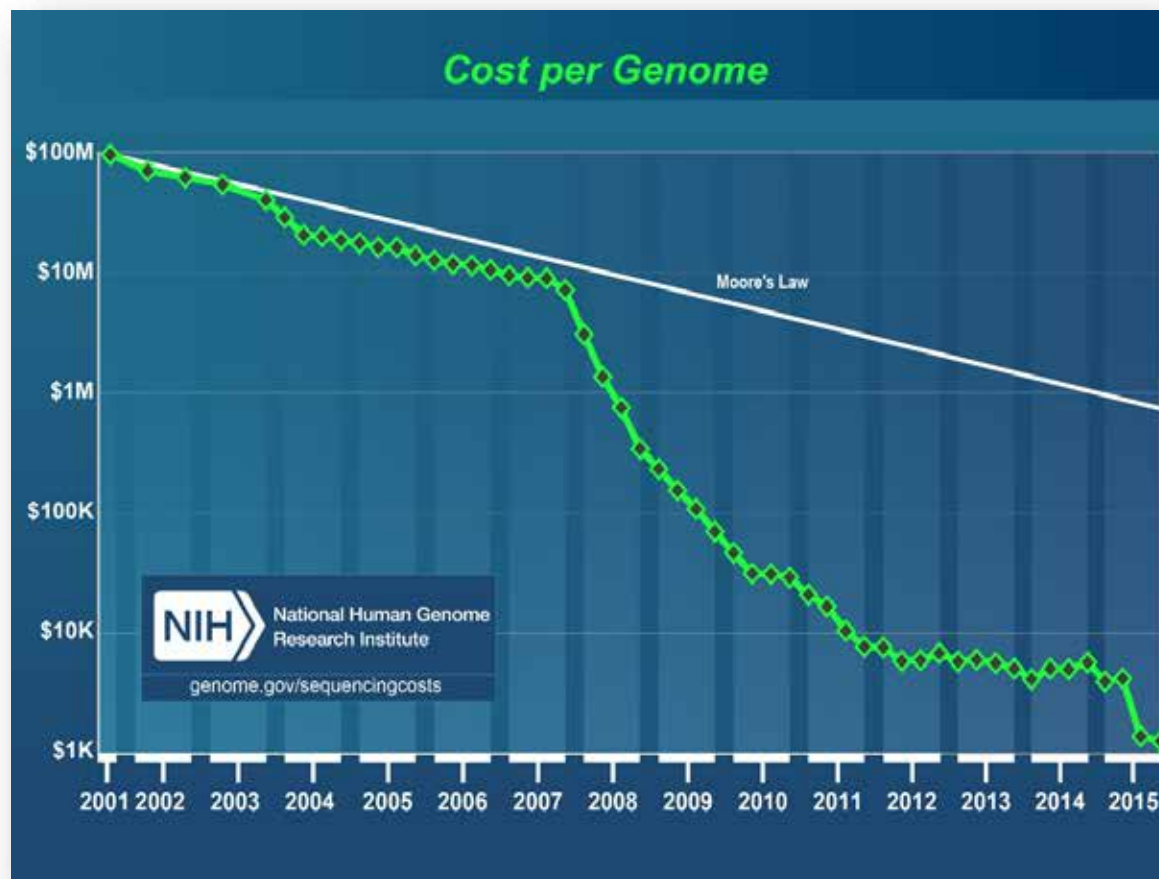


FIGURE 1: QUANTITATIVE ADVANCES SINCE THE HUMAN GENOME PROJECT (HGP)

	HGP Begins	HGP Ends	10 years after HGP
Genome Sequencing			
Cost to Generate a Human Genome Sequence	\$1 billion	\$10-50 million	\$3-5 thousand
Time to Generate a Human Genome Sequence	6-8 years	3-4 months	1-2 days
Human Genome Sequences	0	1	Thousands





Nuestra individualidad genética radica sólo en el 0,1% de nuestra secuencia de ADN:

- La secuencia del ADN de dos personas es un 99,9% idéntica.
- Cada 1,000 nucleótidos uno es diferente.
- En total hay 3 millones de nucleótidos diferentes.

Secuencia de ADN (variante 1)

```
...AGGTTCAGGCATCAGATTTCGCAATCGCTTG
AGCAATCGCTTGCAGATACGAAAGCTTATACC
TATGTCCTAGGTCAGTGTTTCAAAAAGTTTGT
TCCATAAAAAGTAACATTGTGCTGCAGGATTT
CTCAGACGGACCAGTTTGCTAAAGTACTCCGG
GTGTCTCCACAAAGCTTACATAGAATGTGAAG
CTTACAAAACTCATCAGACAAGAGATCATCTC
CTGGACTGAGTTTAAAACACAATTTGGAAA...
```

Secuencia de ADN (variante 2)

```
...AGGTTCAAGCATCAGATTTCGCAATCGCTTG
AGCAATCGCTTGCAGATACGAAAGCTTATACC
TATGTCCTAGGTCAGTGTTTCAAAAAGTTTGT
TCCATAAAAAGTAACATTGTGCTGCAGGATTT
CTCAGACGGACCAGTTTGCTAAAGTACTCCGG
GTGTCTCCACAAAGCTTACATAGAATGTGAAG
CTTACAAAACTCATCAGACAAGAGAAATCTC
CTGGACTGAGTTTAAAACACAATTTGGAAA...
```

Variants de significat incert

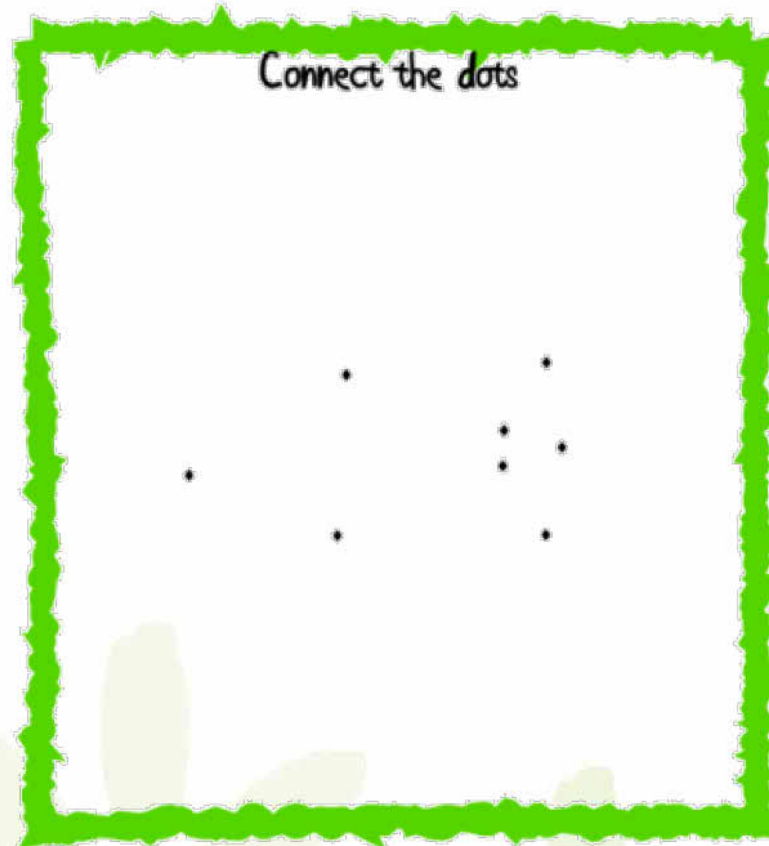
Troballes incidentals



Diagnòstic Genètic Prenatal - Seqüenciació



Sanger sequencing : simplified :

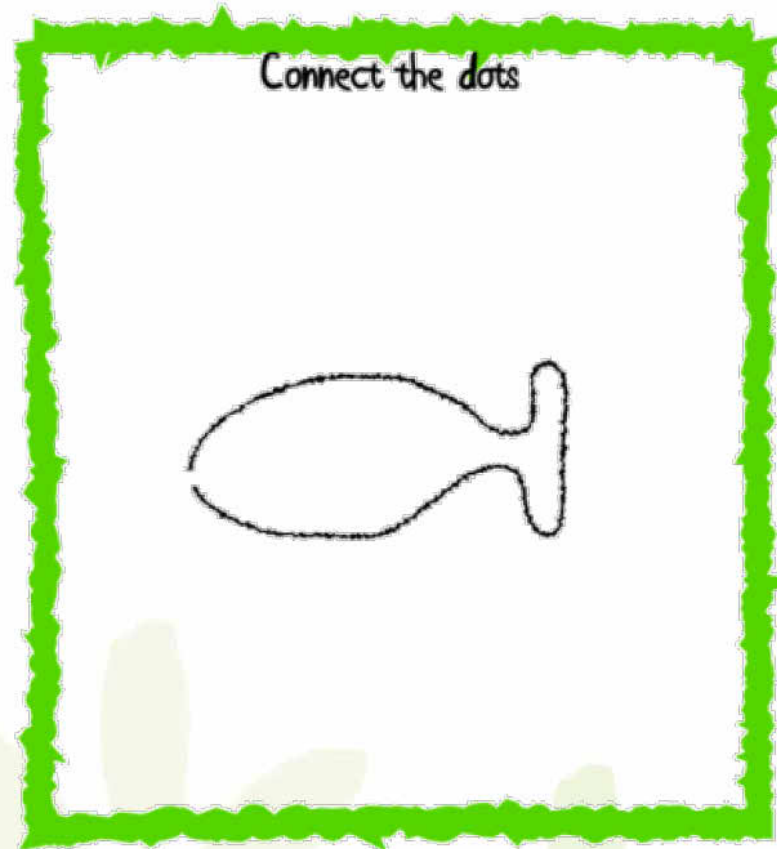


Germans Trias i Pujol
Hospital
Institut Català de la Salut

Diagnòstic Genètic Prenatal - Seqüenciació



Sanger sequencing : simplified :



Diagnòstic Genètic Prenatal - Seqüenciació



Next Generation sequencing : simplified :



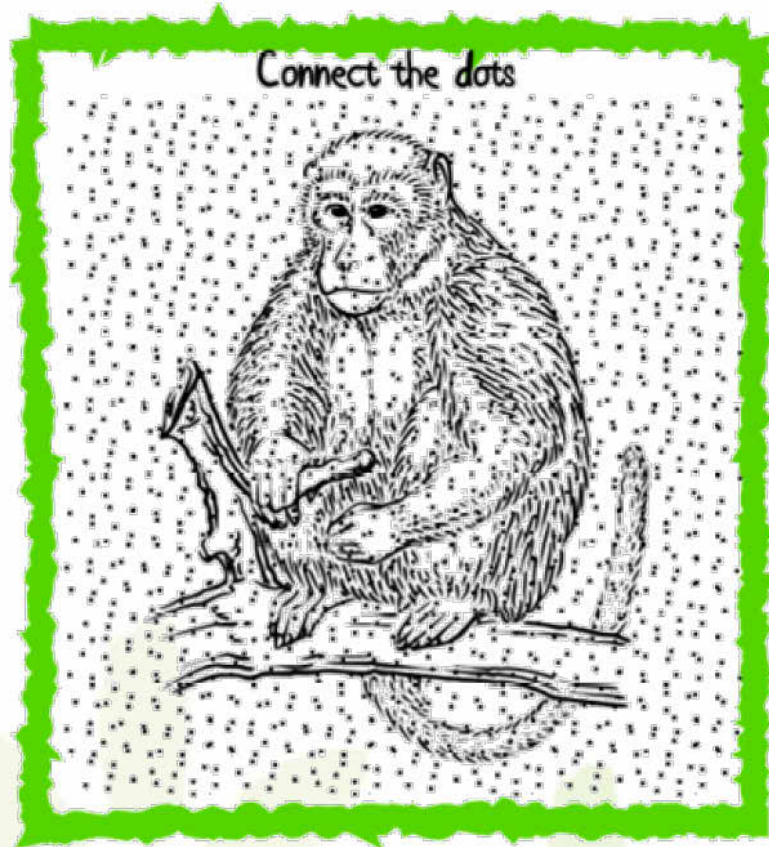
Impossible to assemble manually



Diagnòstic Genètic Prenatal - Seqüenciació



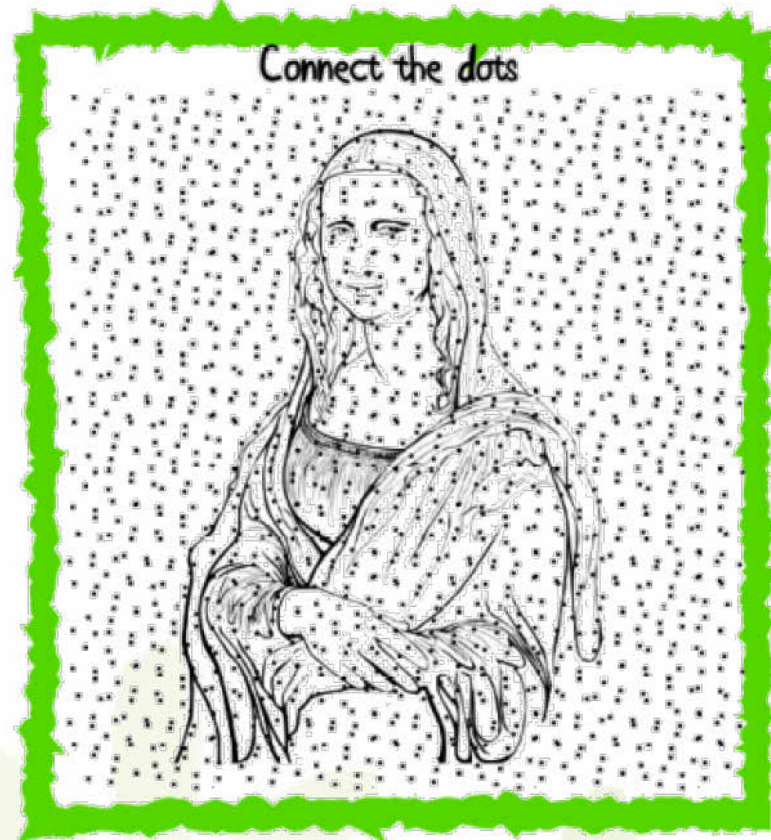
Next Generation sequencing : simplified :



Diagnòstic Genètic Prenatal - Seqüenciació



Next Generation sequencing : simplified :



Same dataset, different parameters



Diagnòstic Genètic Prenatal - Seqüenciació



	SANGER	NGS
ESTRATEGIA	REACCIONES SEPARADAS PARA LOS DISTINTOS EXONES DE UN SOLO GEN	UNA REACCIÓN PARA EL ANÁLISIS SIMULTÁNEO DE VARIOS GENES
MUESTRAS	CLONES, AMPLICONES DE PCR	LIBRERÍAS DE ADN, GENOMA COMPLETO
LONGITUD DE LA LECTURA	Kb	Gb
DATOS	UNA LECTURA/UNA MUESTRA	MILES O MILLONES DE LECTURAS/UNA MUESTRA
RESOLUCION	MUCHAS MOLÉCULAS EN LA MISMA LECTURA	UNA MOLÉCULAR POR LECTURA
VENTAJA	ELEVADA PRECISION	BUENA RELACIÓN COSTO/BENEFICIO, ANÁLISIS SIMULTÁNEO
DESVENTAJA	CARO Y CONSUME TIEMPO	ANÁLISIS DE GRAN CANTIDAD DE DATOS





- Malaltia monogènica amb mutació “familiar” coneguda prèviament.
- Sospita de malaltia monogènica sense mutació identificada prèviament.
 - *Tipus de mutació esperable*
 - *Heterogeneïtat genètica responsable de la malaltia*

***SEMPRE AMB UN ADEQUAT
ASSESSORAMENT GENÈTIC
PREVI I POSTERIOR***



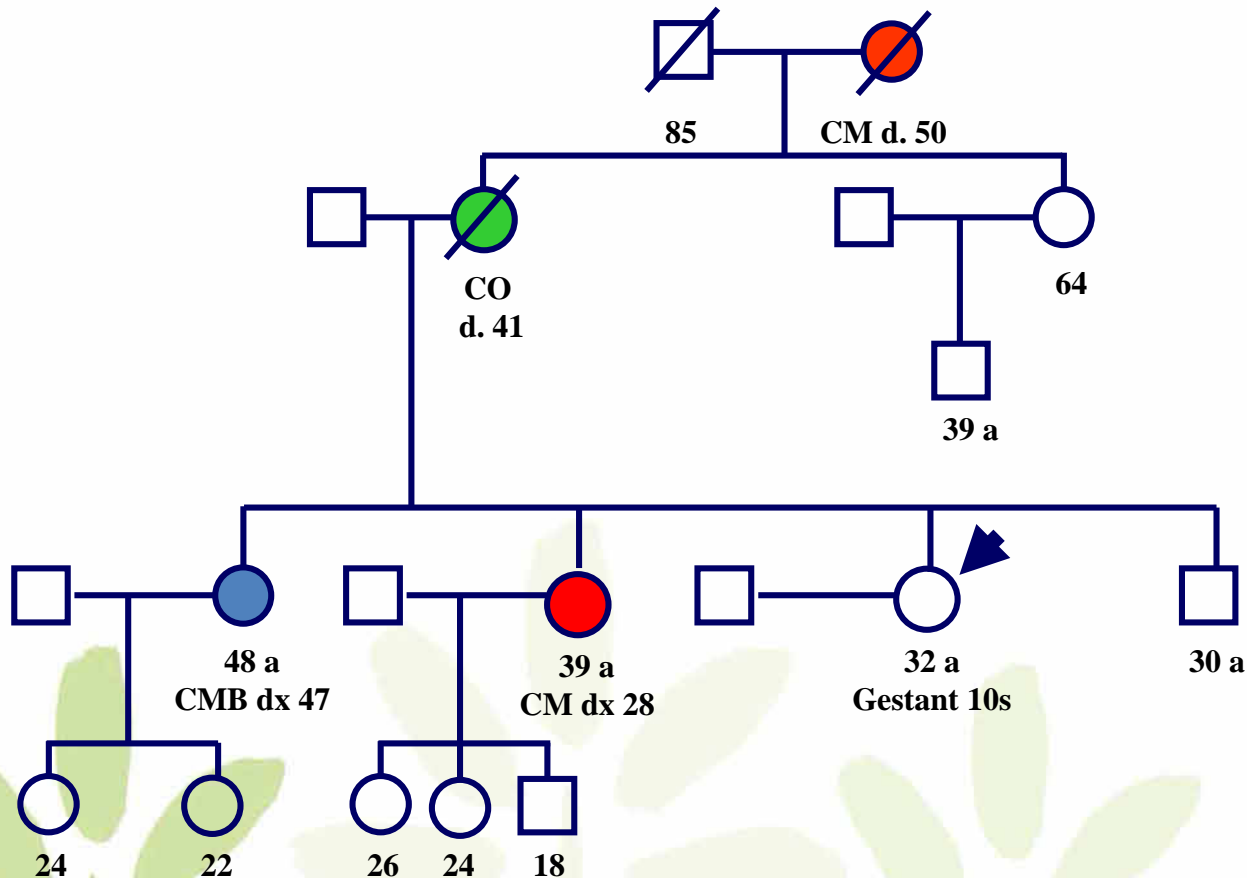
Diagnòstic Genètic Prenatal – Cas # 1



Diagnòstic Genètic Prenatal – Cas # 1



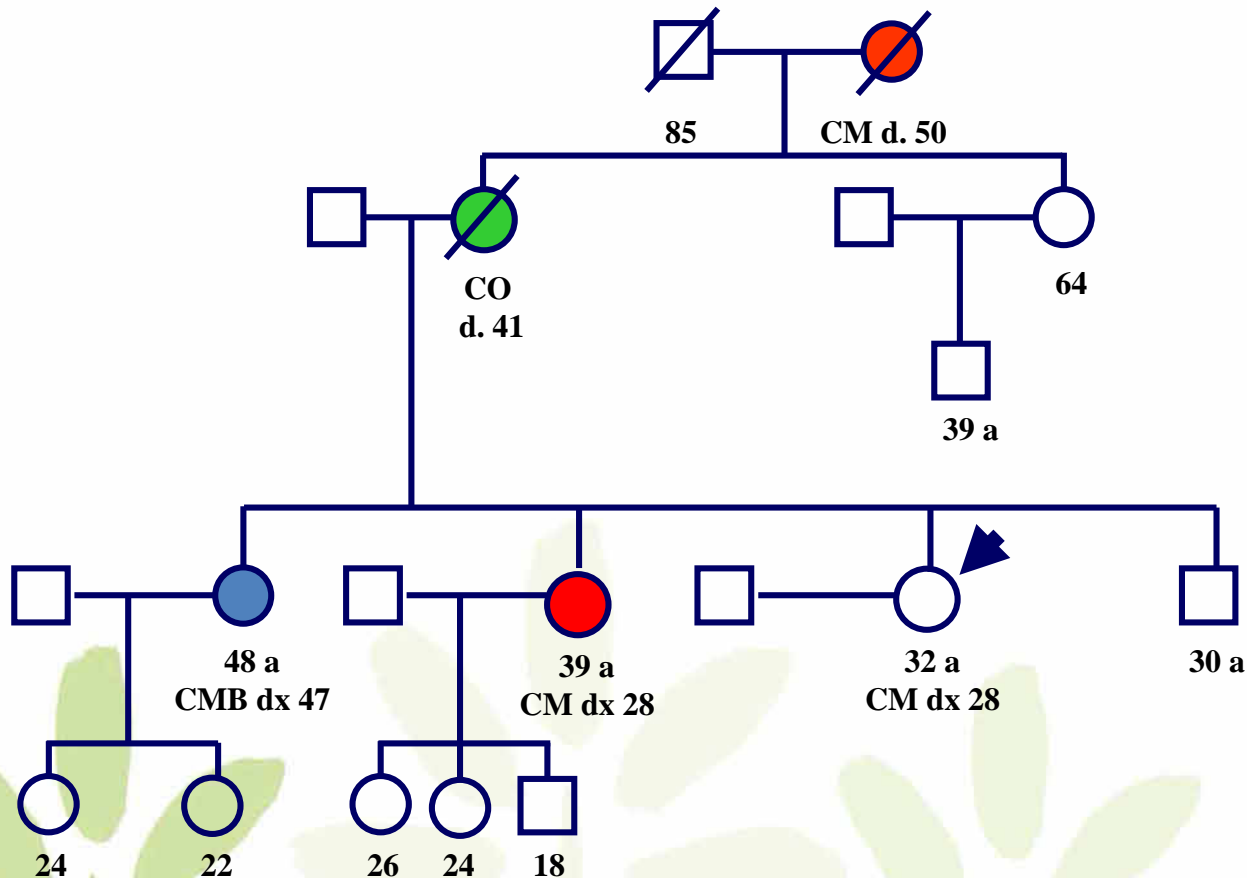
Gestant 10s sana portadora de mutació patològica en el gen *BRCA1*
(c.1687C>A; p.Gln563*)



Diagnòstic Genètic Prenatal – Cas # 1



Gestant 10s sana portadora de mutació patològica en el gen *BRCA1*
(c.1687C>A; p.Gln563*)



Diagnòstic Genètic Prenatal – Cas # 2



Gestant **16s** sana, cribratge combinat del primer trimestre 1:2.600. Als seus pares van morir joves en un accident de trànsit.

Acudeix a la consulta molt preocupada per que fa 48 hores han diagnosticat al seu germà de la **malaltia de Huntington**.

Ens pregunta per la possibilitat de fer un diagnòstic prenatal.

Diagnòstic Genètic Prenatal – Cas # 3



Dona gestant de 10s. Tant ella com la seva parella presenten antecedents genètics. Dona portadora de una translocació en equilibri: 46,XX,t(14:15)(q34.1;q.24). La seva parella pateix una Esclerosi Tuberosa i és portador d'una mutació puntual en el gen *TSC1* (*c.2672delA; p.Asn891Thrfs*).

Què els hi podem oferir?



Diagnòstic Genètic Prenatal – Cas # 4

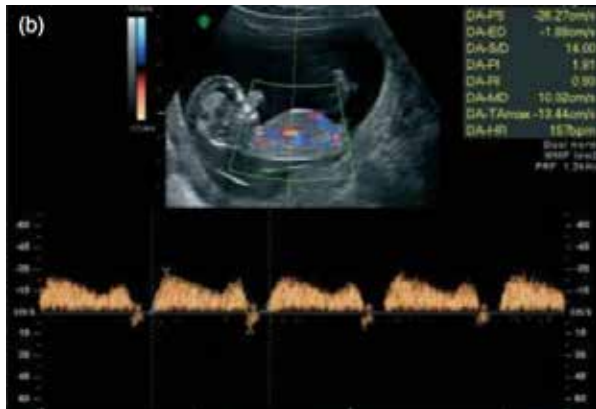


Dona gestant de 9s. La seva parella pateix una Malaltia de Charcot-Marie-Tooth greu amb duplicació del gen PMP22.

Podem oferir un diagnòstic genètic prenatal?



Diagnòstic Genètic Prenatal – Cas # 5



Dona de 25 a, gestant 12s, sense antecedents personals o familiars. Parella sana sense antecedents personal o familiars. Ecografia primer trimestre amb TN de 9,6 mm, os nasal hipoplàsic. Braquicefàlia, distensió dels sacs limfàtics yugulars i un defecte septal ventricular. Flux del ductus venós amb una ona a invertida. Array no informatiu.

Persisteixen les troballes ecogràfiques a les 16s.

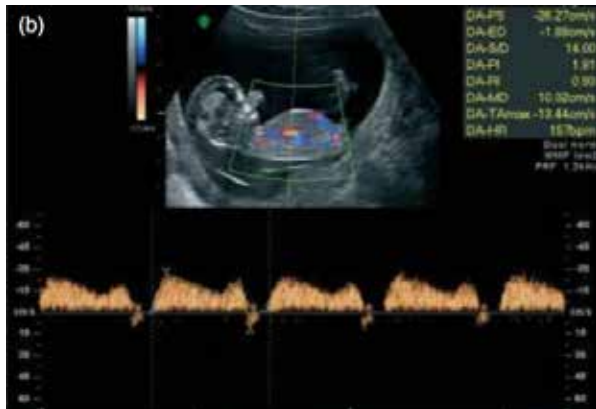
Podem oferir un diagnòstic genètic prenatal?

Diagnòstic Genètic Prenatal – Cas # 5



Panell de Rasopaties

Síndrome de Noonan



Mutació al gen *PTPN11* (c.124A>G; p.Thr42Ala)),







Germans Trias i Pujol
Hospital
Institut Català de la Salut