

Genetické testovanie už pred narodením?

Laco Rampášek



UNIVERSITY OF
TORONTO



Computational
Biology
Lab

Computer Science
UNIVERSITY OF TORONTO

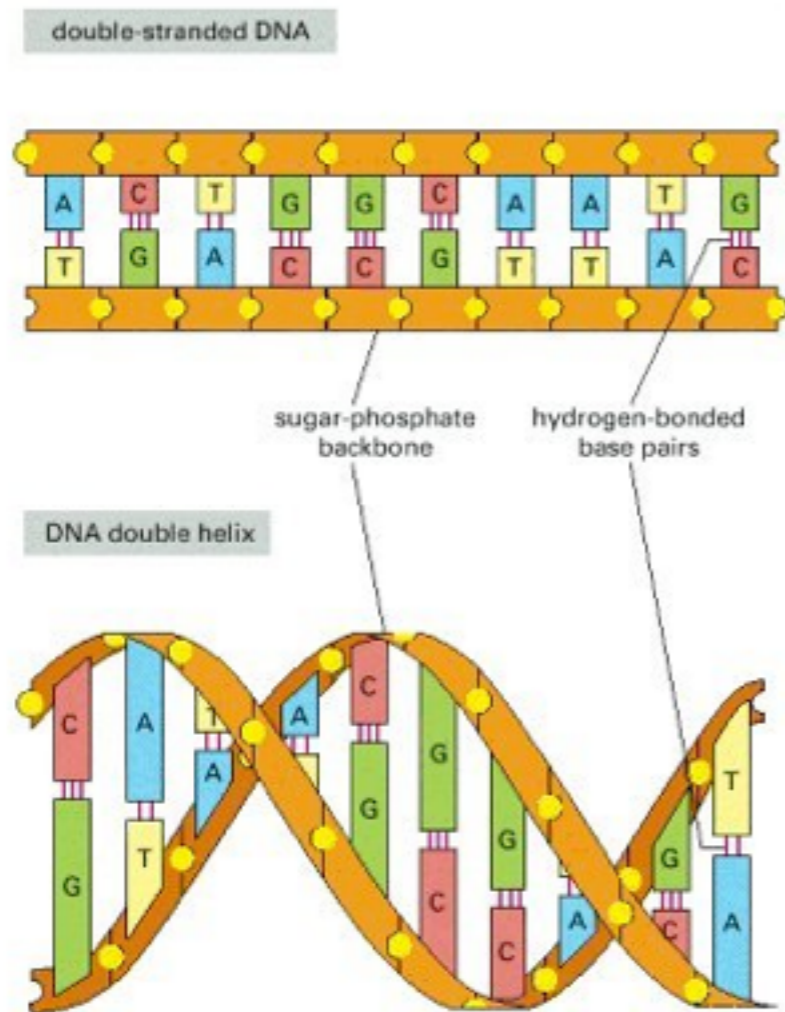
Čo nás čaká

1. Bleskovo niečo o genetike
2. Rozdiel medzi testovaním a diagnostikovaním
3. Neinvazívne testovanie pred narodením (NIPT)
4. Invazívne metódy v skratke
5. Budúcnosť a morálne otázky

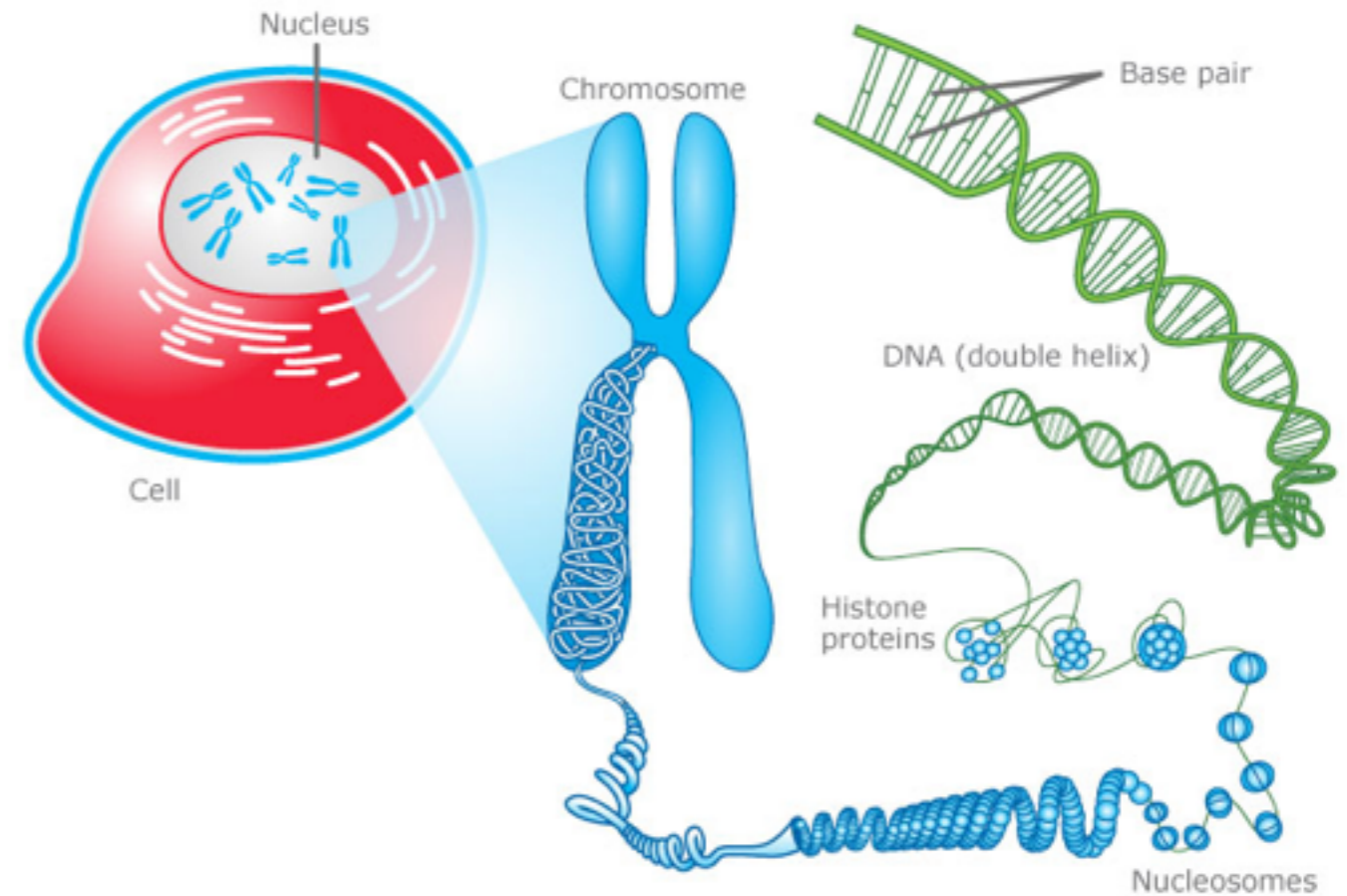
Úvod - Bleskovo niečo o genetike

Genóm člověka

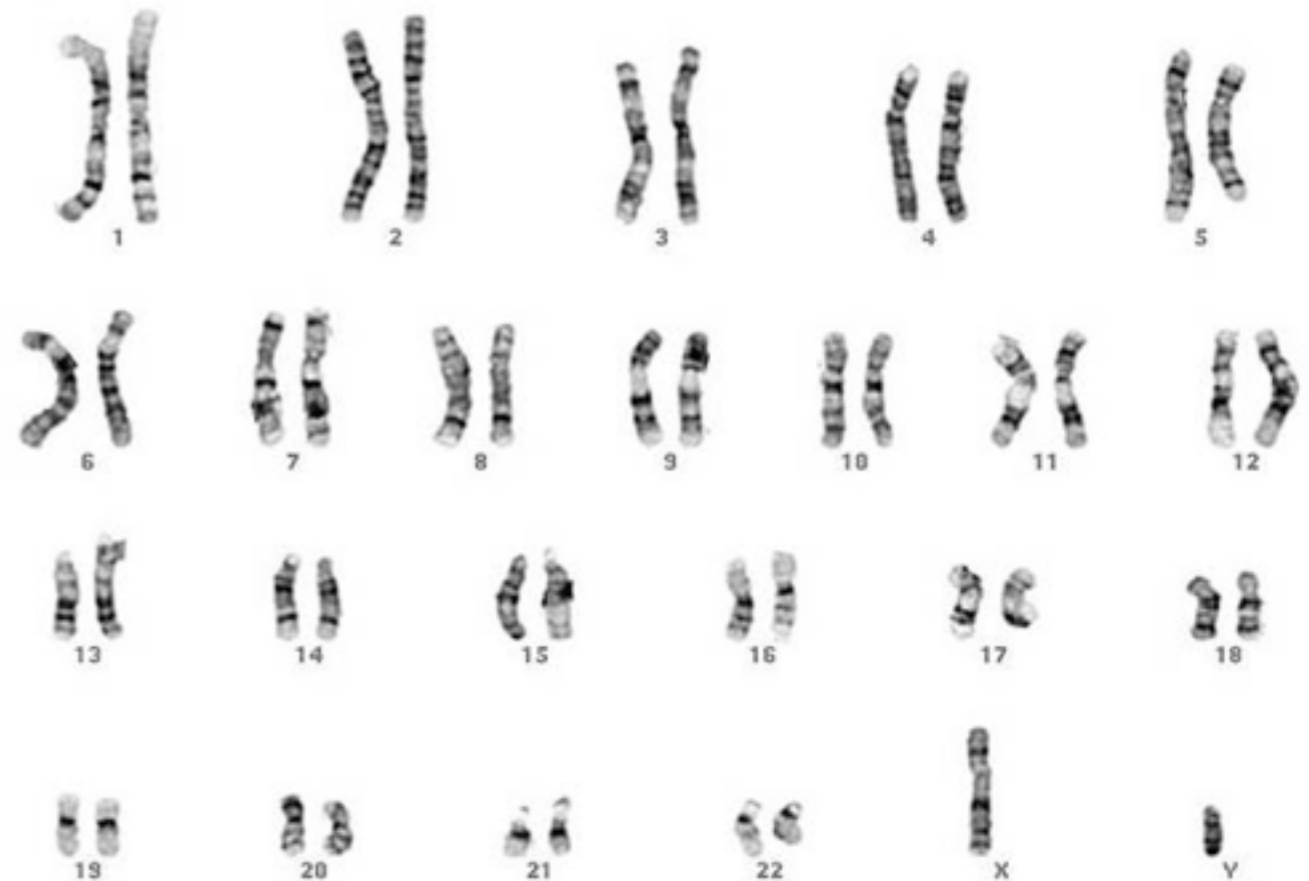
- 22 párov chromozómův + XX alebo XY
- spolu ~3 miliardy báz (x2)
báza = nukleotid = {A, C, G, T}



©2007-2011 The University of Waikato | www.sciencelearn.org.nz

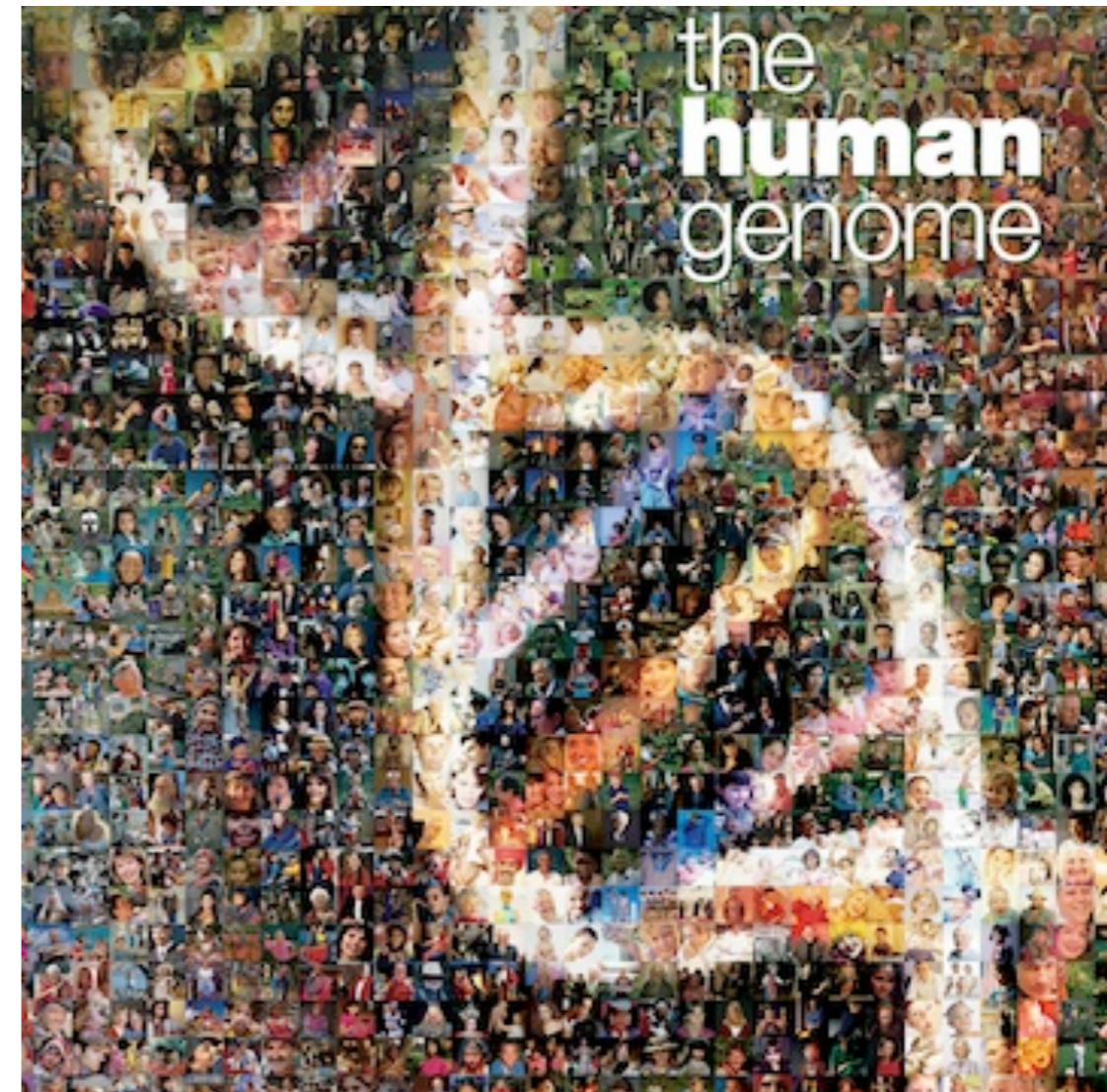


Human male G-bands



Referenčný genóm

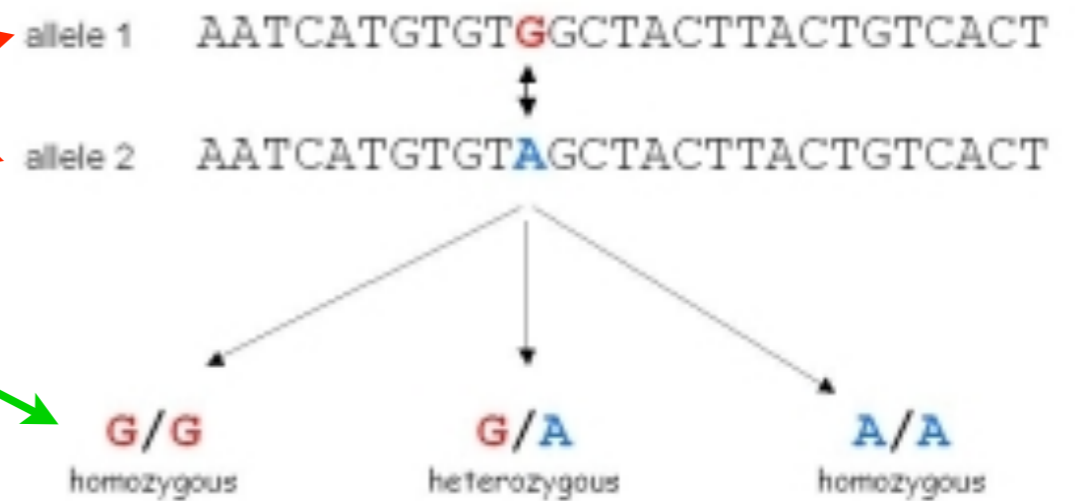
- Referenčný genóm = genóm (virtuálneho) priemerného človeka
- Human Genome Project
 - prvá kompletná verzia v 2003/4
 - 14 rokov a \$3 miliardy
- Stále sa aktualizuje, najnovšia verzia je GRCh38 (aka hg20) z decembra 2013
- WGS dnes stojí okolo \$1000
- Osekvenované DNA sa zarovnáva a porovnáva voči referenčnému genómu



Čo nás robí jedinečnými

- Single Nucleotide Polymorphism (**SNP**):

- miest rovná
 - veľká hodnota tzv. r
- jeden človek má:
- dva haplotypy**
- a jeden **genotyp**

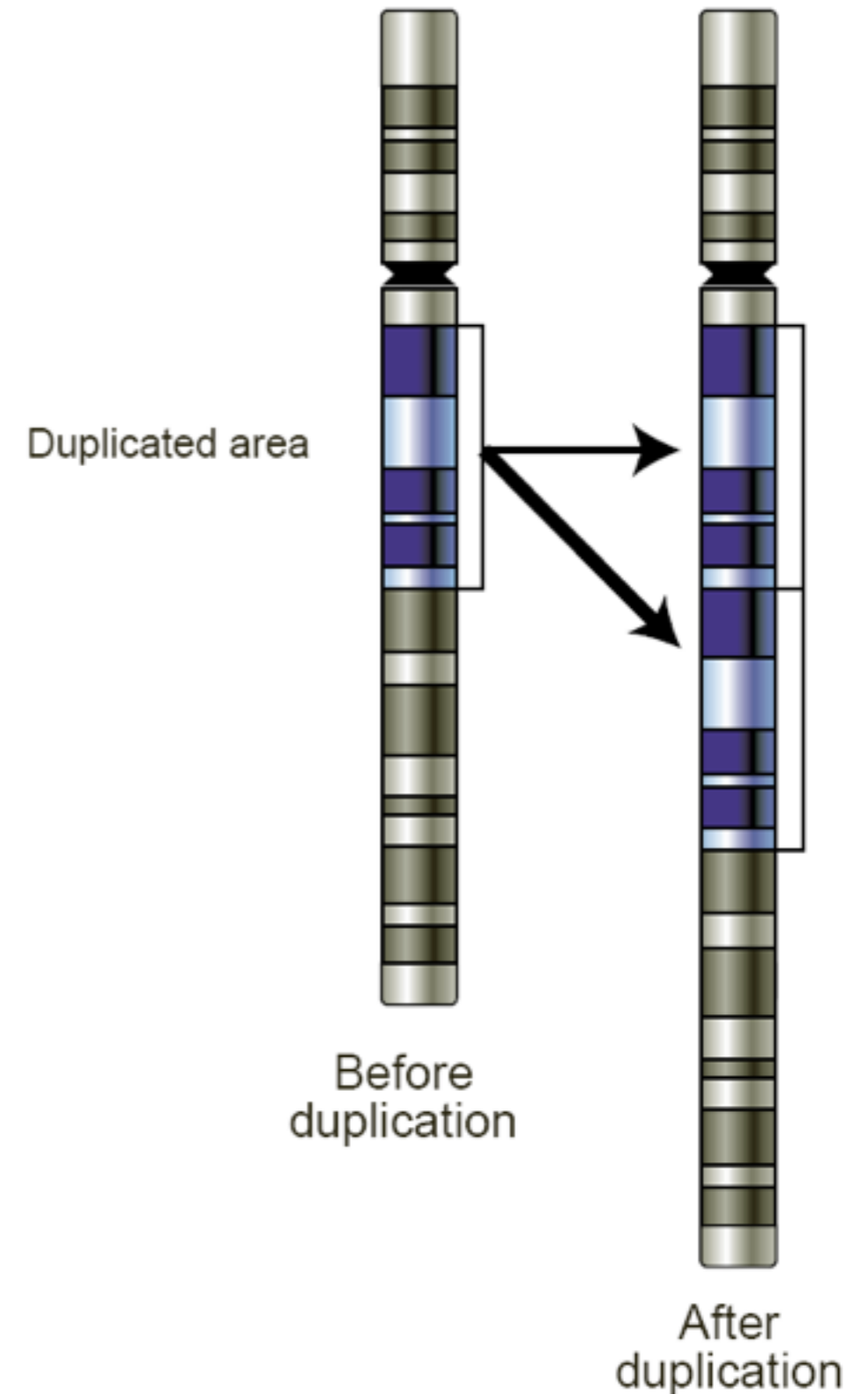


- niečo výše 60 miliónov známych SNPov
- rozdiel medzi dvoma ľuďmi je zväčša v **2-3 miliónoch SNPov** (0.1%)



Čo nás robí jedinečnými (2)

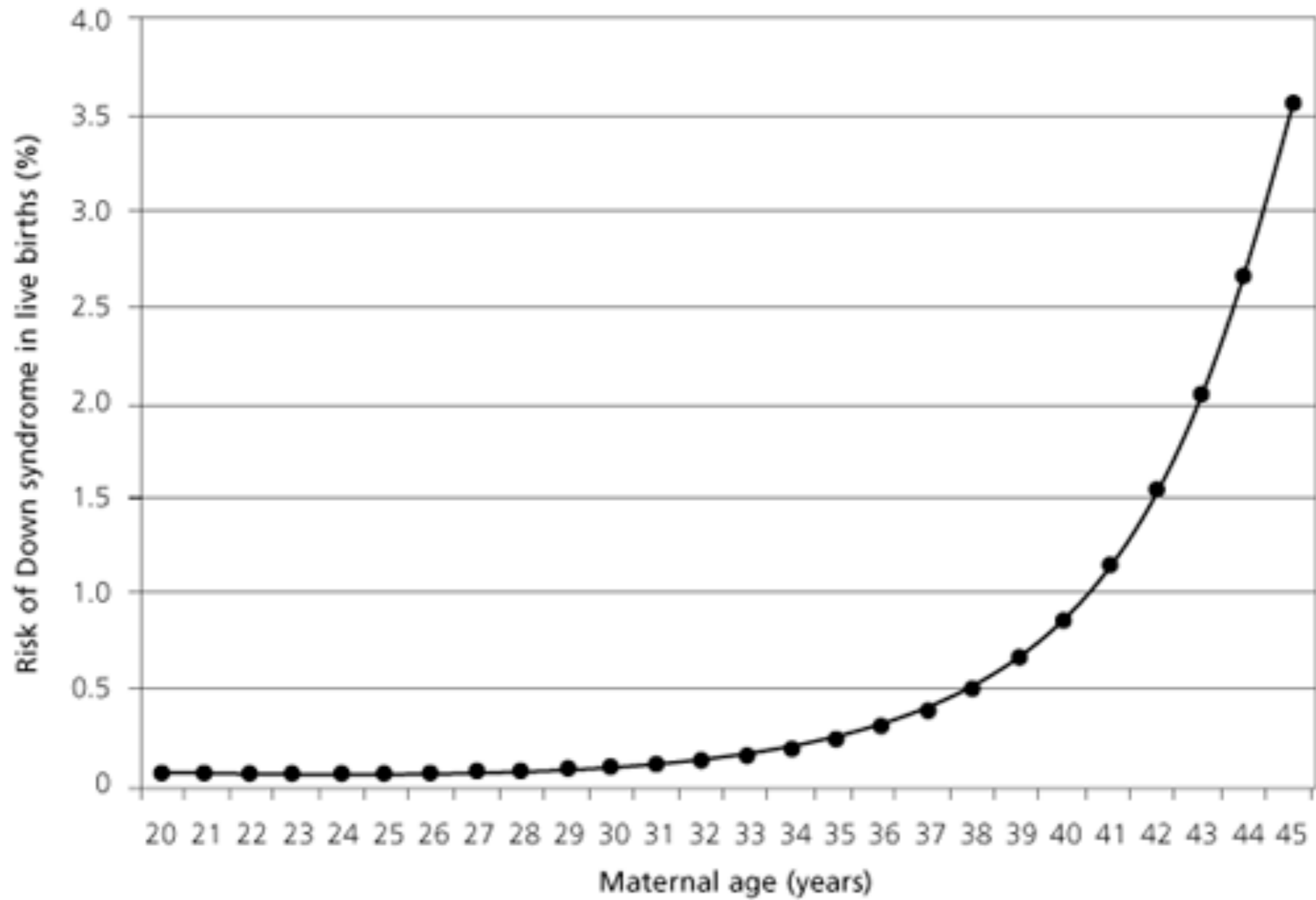
- Structural Variation (SV):
 - inzercie, duplikácie, delécie, translokácie či inverzie častí chromozómov
- Copy Number Variation (**CNV**): zvlášť meno pre inzercie, duplikácie, a delécie
- odhaduje sa že 12% ľudskej DNA sú CNV veľkosti 1kb až niekoľko Mb



Genetické poruchy a choroby (veľmi približne)

- Abnormality v genóme:
 - **bodové mutácie a/alebo “zlé” kombinácie SNPov**
 - **štrukturálne zmeny, najmä CNV**
- Dedičné vs. *de novo*
- Často sa **nedá** povedať že konkrétna sada mutácií \Leftrightarrow konkrétne ochorenie
- Najjednoduchšie sú choroby dedené Mendelianskou dedičnosťou ktoré postihujú naraz len jeden gén (napr. Cystická fibróza)
- Mnoho chorôb má však veľmi zložitý mechanizmus (napr. rakovina)
- Prostredie je dôležitý faktor spolu s epigenetikou

Downov syndróm



Rozdiel medzi testovaním a diagnostikovaním

Preventívne testovanie (screening)

- Chceme zistiť poruchy predtým ako sa prejavia
- Aj za cenu “false positives”, t.j. zdravému človeku povieme že je chorý
- Nechceme však “false negatives”, čiže chorému človeku povedať že je zdravý
- Chceme aby takýto test bol dostupný a relatívne lacný
- Pozitívne nálezy idú na **diagnostický test**

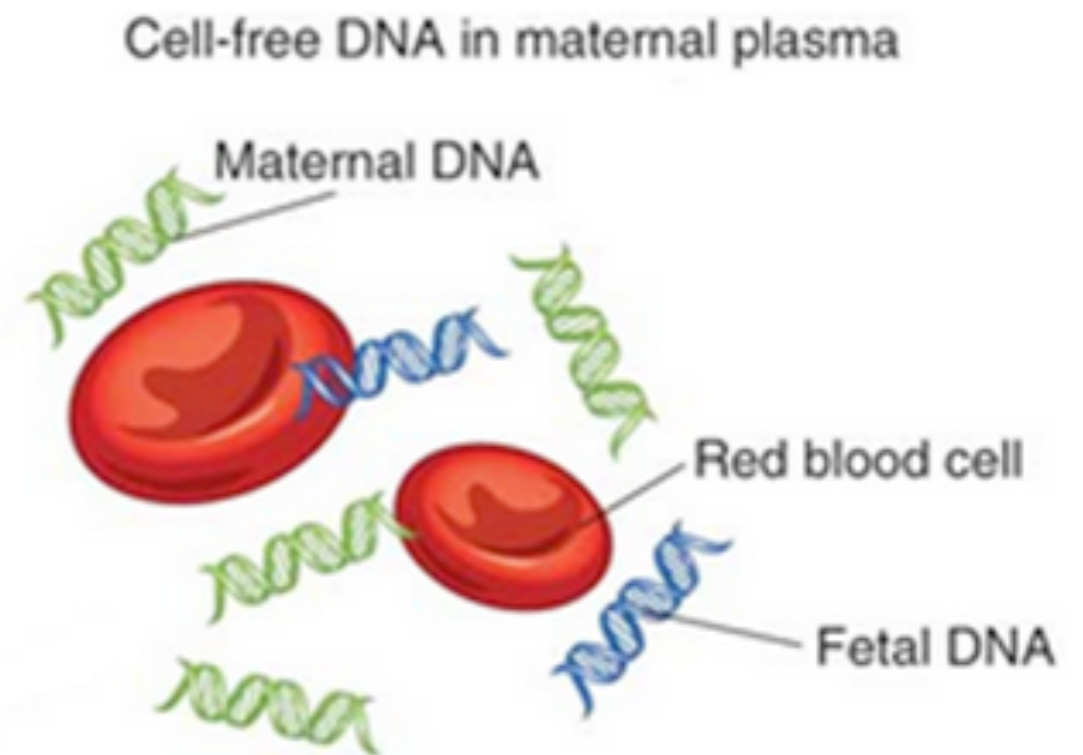
Diagnostický test

- Mal by byť úplne presný a bez chýb
- Obvykle má nejaké praktické nevýhody:
cena, invazívna procedúra, vedľajšie účinky/riziká

Neinvazívne testovanie pred narodením (NIPT)

Prehľad

- Stačí vzorka matkinej krvi (+ niekedy aj DNA otca)
- V plazme plávajú krátke zlomky mimobunkovej DNA, cell-free DNA [Lo, 1997]
- Obyčajne **10%** týchto fragmentov je DNA plodu
- Tento pomer závisí najmä od
 - štádia tehotenstva (od 10 týždňa zväčša už dostatočne veľa)
 - a nepriamo úmerne od telesnej hmotnosti matky



Cell-based NIPT

- V krvnom obehu matky sú aj celé bunky s DNA plodu
- Je ich však veľmi málo (do 50 buniek na celú ampulku krvi)
- Žiadna spoľahlivá metóda separujúca tieto bunky zatiaľ nie je (a asi tak skoro ani nebude)

Metódy využívajúce mimobunkovú DNA

- Začalo sa testovaním Downovho syndrómu, prvé dve publikácie vyšli v 2008
- Pokračovalo sa ďalšími aneuploidiami = súhrnný názov pre nesprávny počet chromozómov (Downov syndróm = tri kópie chr21 = trizómia T21)
- Veľmi rýchly nástup komerčných testov, klinické testy sa začali už v 2011/2
- 2013 - prvé metódy pre CNV veľkosti aspoň 5-10Mb

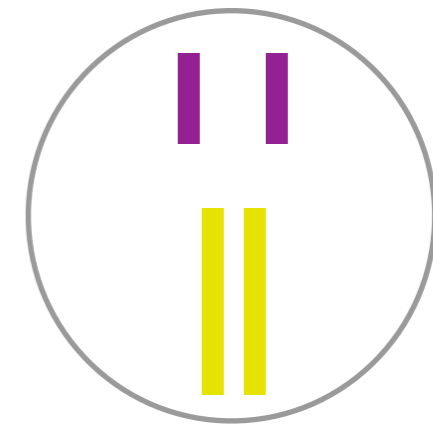
Ako zistiť T21 - relatívny pomer chromozómov

- Relatívny pomer chromozómov 21:1

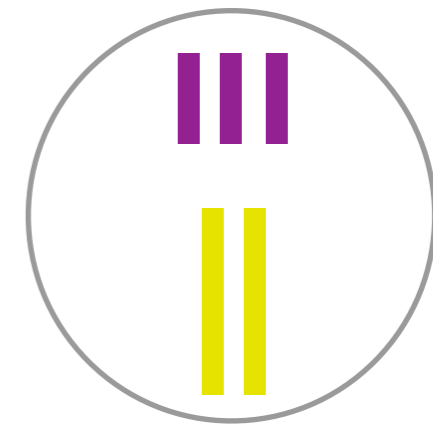
	normálne	trizómia 21
v placente	1:1	3:2
v plazme	1:1	1.05:1

10% plodová DNA
90% matkina DNA

normálna bunka



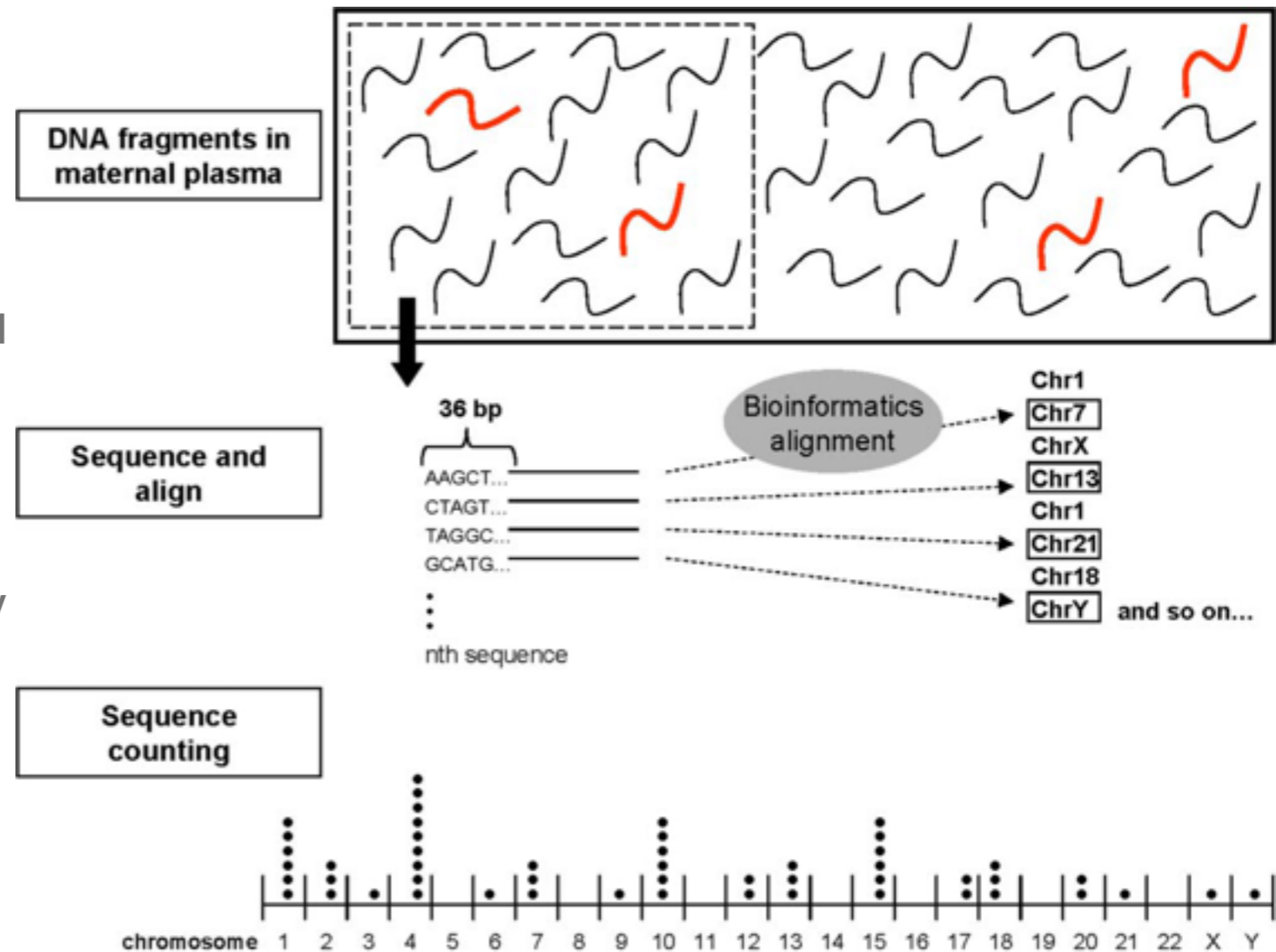
T21 bunka



chr21
chr1

Mass Parallel Sequencing mimobunkovej DNA z plazmy

- Princíp je jednoduchý:
 - sekvenujeme veľa krátkych fragmentov DNA
 - zarovnávame k referenčnému genómu a zistujeme okiaľ fragment pochádza
- Potrebujeme aspoň 10 miliónov takýchto fragmentov



Iná možnosť: pozrieť sa na distribúciu SNP aliel

- SNP pozícia je taká, že tam máme buď variant A alebo B
- Zdravý človek má 2 kópie, preto 3 možné genotypy:
A / A **A / B** **B / B**
- Ak má človek A / B, tak polovica fragmentov ktoré prekrývajú tento SNP by mala mať A a druhá polovica B
- Rovnaký princíp ako predtým, ale teraz sa pozeráme na na **počty fragmentov podporujúce rôzne alely** na jednom mieste a nie na počty fragmentov z rôznych chromozómov

Príklady

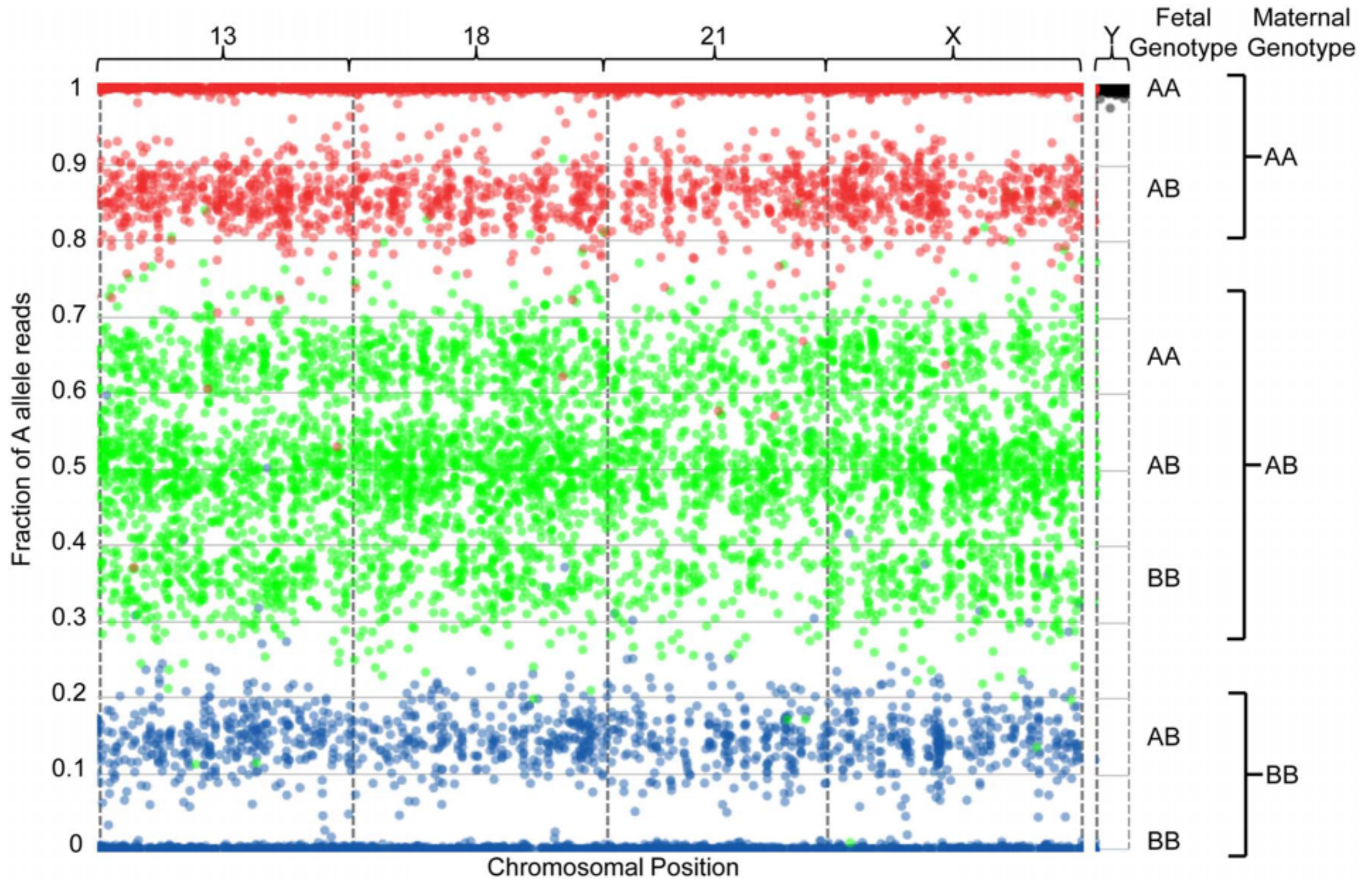
- Pekné ilustrácie z tohto článku (máj 2014):

Non-Invasive Prenatal Detection of Trisomy 13 Using a Single Nucleotide Polymorphism- and Informatics-Based Approach

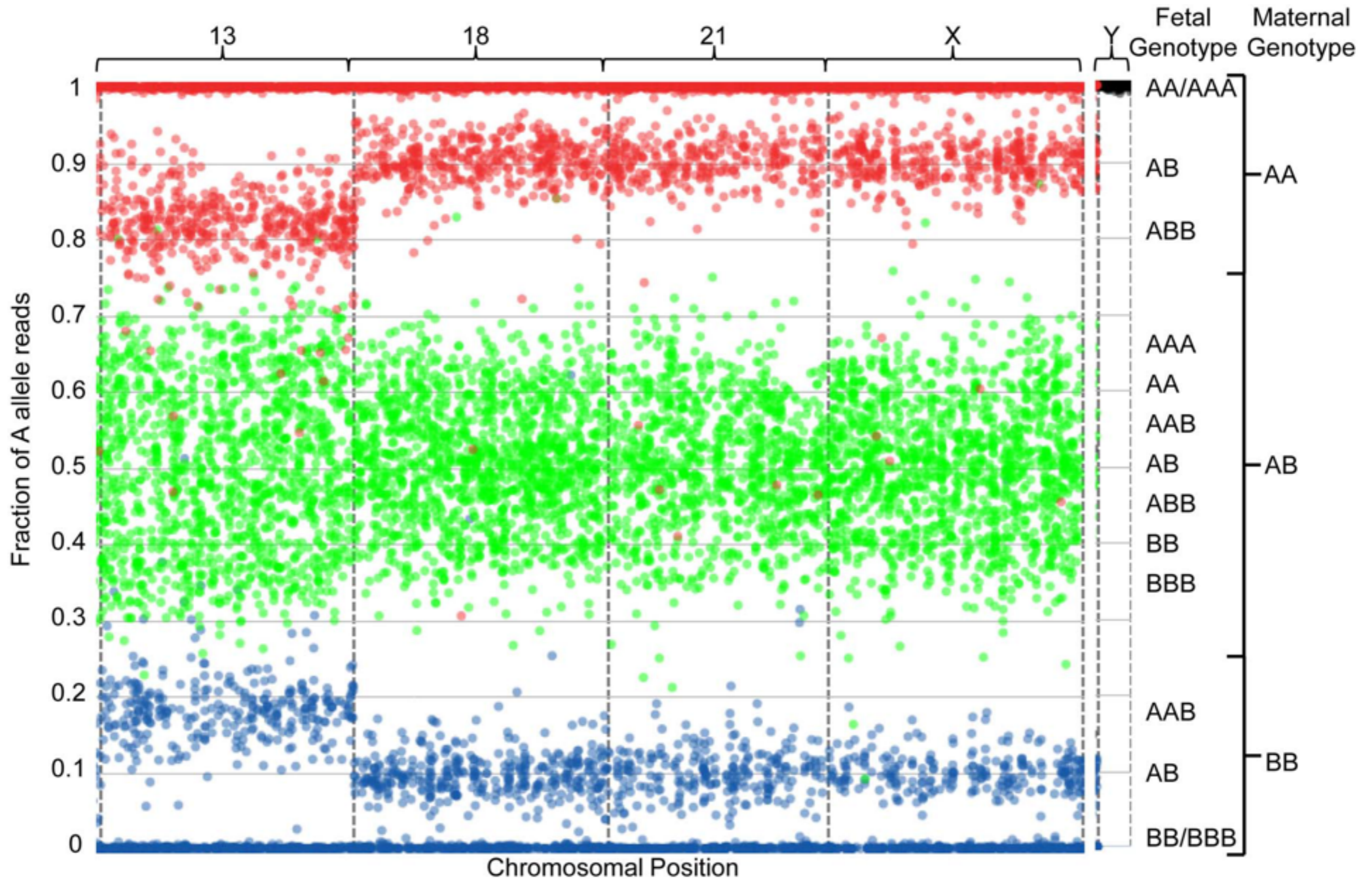
Megan P. Hall¹, Matthew Hill¹, Bernhard Zimmermann¹, Styrmir Sigurjonsson¹, Margaret Westemeyer², Jennifer Saucier², Zachary Demko², Matthew Rabinowitz^{1*}

¹ Department of Research and Development, Natera Inc., San Carlos, California, United States of America, ² Department of Genetic Counseling, Natera Inc., San Carlos, California, United States of America

Normálne dedenie



T13 otcovho chromozómu



Distribúcia SNP aliel

- Reálne sú tie “pásky” oveľa bližšie pri sebe
- Dá sa použiť na genotypovanie plodu, aj na detekciu CNV



Noninvasive Whole-Genome Sequencing of a Human Fetus

Jacob O. Kitzman *et al.*

Sci Transl Med 4, 137ra76 (2012);

DOI: 10.1126/scitranslmed.3004323

- btw, firmy samozrejme nepovedia ako presne to robia

Spol'ahlivosť dnešných testov

- Dnes viacero firiem, ktoré vedia naraz otestovať pre viacero porúch
- Pre Downov syndróm je senzitivita nad 99% a false positive rate niekde okolo 0.1% až 1%
- Pre ostatné trizómie trocha horšie
- Vždy len screening test
- cena: okolo \$1500

Od celých chromozómov ku kratším CNV

- Ten istý princíp ale v menších regiónoch
- Treba osekvenovať viac fragmentov a robiť prefíkanejšiu normalizáciu počtu zarovnaných readov
- Ešte nie sú dostupné komerčné celo-genómové testy na kratšie CNV (ale je pár testov na zameraných na konkrétne poruchy ako napr. DiGeorge, Cri du Chat)
- Čoskoro ale bude

Naša metóda

BIOINFORMATICS

2014, pages i1–i7
doi:10.1093/bioinformatics/btu292

Probabilistic method for detecting copy number variation in a fetal genome using maternal plasma sequencing

Ladislav Rampášek¹, Aryan Arbabi¹ and Michael Brudno^{1,2,3,*}

¹Department of Computer Science, University of Toronto, Toronto M5S 2E4, ²Centre for Computational Medicine and

³Genetics and Genome Biology, Hospital for Sick Children, Toronto M5G 1L7, Canada

- Kombinujeme oba typy signálov:
 1. pomery SNP aliel
 2. pokrytie regiónov fragmentami

Naša metóda - pomery SNP aliel

- Videli sme že:
 - ak poznáme matkin a otcov genotyp, počet možností genotypu plodu je relatívne malý
 - ak poznáme aj matkine a otcove haplotypy, vieme určiť ako by vyzerali haplotypy plodu za predpokladu istého vzoru dedičnosti
- Chceme určiť najpravdepodobnejší vzor dedičnosti pre každý SNP: $L(\text{model} \mid \text{data}) = P(\text{data} \mid \text{model})$

Naša metóda - pomery SNP aliel

$$L(\text{model} \mid \text{data}) = P(\text{data} \mid \text{model})$$

- Túto pravdepodobnosť modelujeme ako:
 - multivariačné normálne rozdelenie
- problémom je šum a skreslenia

Naša metóda - pokrytie regiónov fragmentami

- Pozeráme sa na neprekrývajúce sa regióny okolo jednotlivých SNPov
- Vieme určiť pravdepodobnosť počtu kópií regiónu v genóme plodu:
 - 1 kópia = delécia
 - 2 kopie = normálne dedenie
 - 3 kópie = duplikácia

Naša metóda - všetko dokopy

- Pre každý SNP máme spočítané oba signály
- Všetky SNPy spojíme dokopy pomocou skrytého markovovského modelu (HMM)
- Vypočítame tak najpravdepodobnejší vzor dedenia **vzhľadom na celý chromozóm**, nie len lokálne

Naša metóda - výsledky

- Máme len simulované data sety
- senzitivita pre CNV dlhšie ako 3Mb je nad 95% s 0% false positive rate pre 13% prímes a 78x priemerné pokrytie pri sekvenovaní
- pre kratšie CNV je to horšie, záleží ale veľmi aj od typu CNV (či región ktorý sa vymazal/zduplikoval je od otca alebo matky)

Invazívne metódy v skratke

Invazívne metódy

- Odoberá sa tekutina z okolia plodu (amniocentéza)
- Alebo bunky z krčku maternice (CVS)
- Riziko cca 1:500 až 1:200 že takáto metóda spôsobí potrat alebo degeneráciu vo vývoji
- Získa sa ale čistá plodová DNA takže sa dajú robiť štandardné genetické testy s diagnostickou kvalitou
- Po pozitívnom NIPT náleze sa vždy robí amnio pre potvrdenie diagnózy

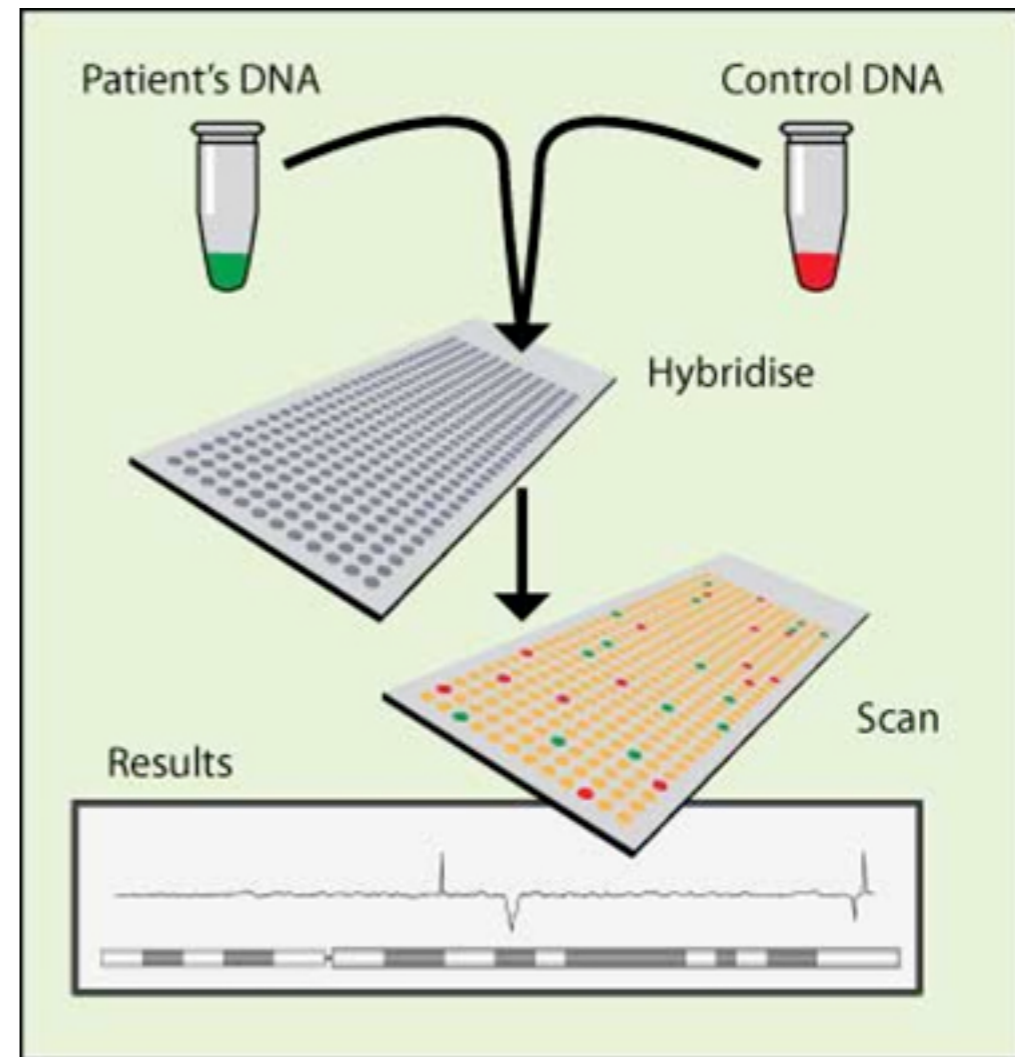
Obvyklé testy

- **Karyotype a chromosome banding**
 - už v 80' rokoch, rozlíšenie nad 7-10Mb
 - stále sa ale používa



Obvyklé testy

- **Chromosomal Microarray Analysis (CMA)**
 - štandard dneška, rozlíšenie nad 0.5Mb
 - automatizovaný komplexný test



Ako to je v praxi

Ako to je v praxi

- Riziko chromozomálnych porúch rapídne rastie vo veku po 35
- Preto ženám po 35 sa robí NIPT preventívne
- Ak NIPT má pozitívny nález alebo na ultrazvuku je niečo podozrivé -> robí sa amniocentéza
- Kratšie CNV spôsobujúce rôzne syndrómy však nekorelujú s vekom -> v budúcnosti bude NIPT ponúkané každej žene

Budúcnosť a morálne otázky

Už dnes

- Už dnes je prakticky možné určit kompletný genotyp a všetky väčšie CNV plodu len z krvi matky
- Hoci je to ešte drahé a nie plne klinicky otestované
- V nie ďalekej budúcnosti to však bude možné v celoplošnom merítku - **technológia bude lacnejšia a NIPT nemá vedľajšie účinky a dá sa robiť už v prvom trimestri tehotenstva**

Problémy (nie všetky sú nové)

- Čo všetko má matka právo vedieť a urobiť?
...napr. “chcem modrookú dcéru”
- Tendencie rodičov selektovať pohlavie dieťaťa tu už je dlho, takto by to mohlo nabrat' ešte väčší rozmer
- Poistovne - budú môcť odmietnuť nadštandardné poistenie na základe prenatalných testov?
- Ako správne naložiť s takýmito vedomosťami?
(každá žena má ale právo testy odmietnuť)

Ďakujem za pozornosť !

Laco Rampášek