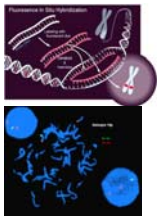
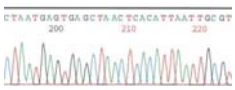
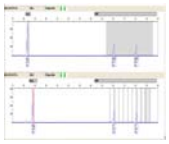
Molekylærgenetiske og cytogenetiske metoder innen diagnostikk



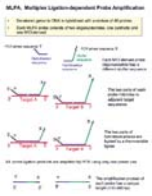
FISH
- påvisning av fravær/tilstedeværelse av spesifikke sekvenser
- informasjon om plassering
- avhengig av celler i deling



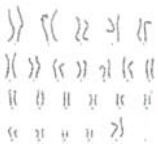
Sangers sekvensering
- enkeltbasemutasjoner
- små delesjoner/insersjoner
- begrenset av primerplassering



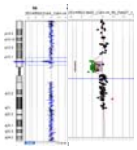
Fragmentanalyse
- Fragmentlengder (ekspansjoner)
- Semikvantitativ - trisomier



MLPA
- delesjoner/duplikasjoner
- begrenset av probeplassering



Karyotyping
- påvisning av store strukturelle feil >5-10Mb
- påvisning av numeriske feil
- avhengig av celler i deling



Array CGH
- påvisning av delesjoner/duplikasjoner > 10 kb - hele genomet
- ser ikke balanserte kromosomfeil eller triploidi

High throughput sequencing
- exome: påvisning av SNV og indels
- genome: potensiale til å påvise "alt"

→ Målrettet analyse for trisomi 21

→ ?

DiGeorge syndrom/velocardiofacialt syndrom/22q11.2 delesjonssyndrom

- et mikrodelesjonssyndrom
- forårsaket av en delesjon på kromosom 22q11.2 eller mutasjoner i TBX1
- delesjon kan også påvises med MLPA eller FISH

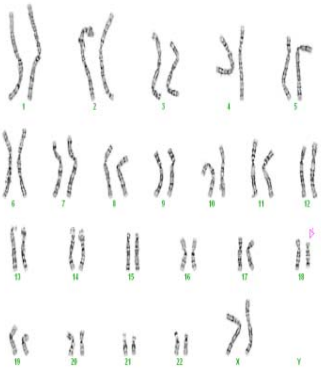
Number of Entries in OMIM (Updated May 31st, 2016) :

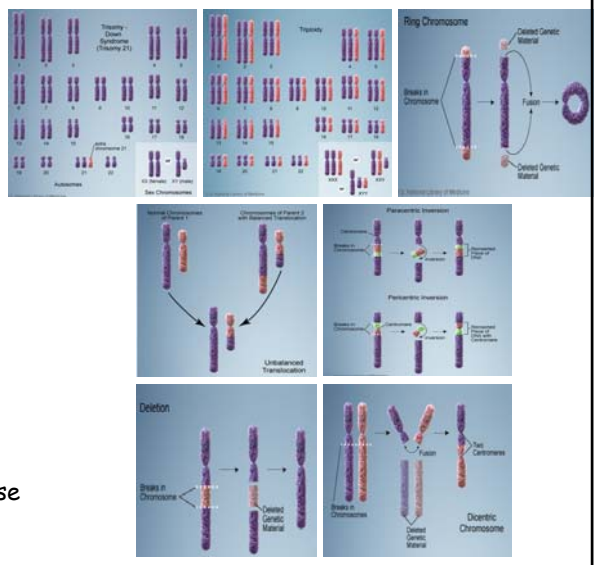
Prefix	Autosomal	X Linked	Y Linked	Mitochondrial	Totals
* Gene description	14,493	705	48	35	15,281
+ Gene and phenotype, combined	80	2	0	2	84
# Phenotype description, molecular basis known	4,400	303	4	29	4,736
% Phenotype description or locus, molecular basis unknown	1,492	125	5	0	1,622
Other, mainly phenotypes with suspected mendelian basis	1,691	112	2	0	1,805
Totals	22,156	1,247	59	66	23,528

4562 i oktober 2015

Molekylærgenetisk diagnose kan være en utfordring hvis fenotypen er vanskelig å gjenkjenne

Karyotyping





- ser på kromosomer i metafase
- avhengig av celler i deling
- påvisning av numeriske feil
- påvisning av store strukturelle feil (>5-10Mb)

1 gen – 0,1 Mb

Mikromatrise/array-basert comparative genomic hybridization (aCGH) "molekylær karyotyping"

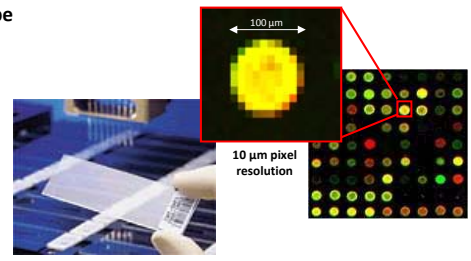
- DNA-basert screening-metode
- Detekterer kopitallsvarianter (copy number variations = CNVs)
  => delesjoner (loss) og duplikasjoner (gains) i hele genomet
- Resolusjon: enkeltgener/ekson
- Rask (resultat etter 1-2 dager)
- Krever 200-500 ng DNA fra blod, vev, morkakeprøve, fostervannsprøve, munnslimhinne, formalinfiksert parafininnstøpt vev++

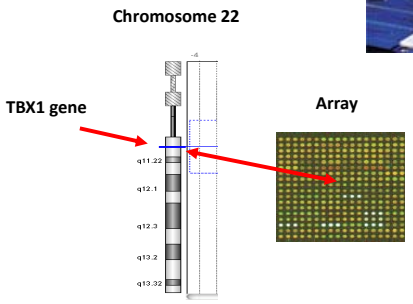
Mikromatrisen/arrayet

- ordnet mønster av spotter festet på et fast underlag (f.eks en glass slide)

Hver spot inneholder :

- **enkeltrådet DNA (oligonukleotid) = probe**
- **kjent sekvens**
- **kjent kromosom lokalisering**
- **kjent posisjon på mikromatrisen**

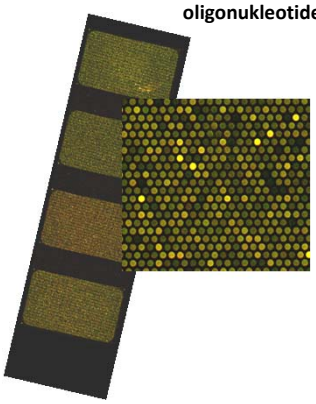


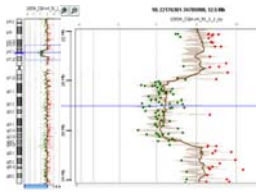


Agilent aCGH Human microarrays

Agilent Technologies

Kommersiell aCGH mikromatrise med in situ syntetiserte oligonukleotider (60-mer)





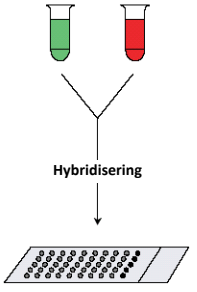
Ulike formater:		Resolusjon
180k CNV	probe spacing 13 kb	50 kb
400 k CNV	probe spacing 5 kb	20 kb
1M CNV	probe spacing 2 kb	6 kb
1M custom	flere pr. ekson	ekson
400k CNV + SNP		20 kb/5Mb
180k CNV + SNP		75 kb/5Mb

1 gen – 100 kb

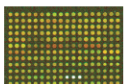
Array-basert Comparative Genomic Hybridization

TEST (pasient) / KONTROLL (referanse)

- 500 ng DNA fra test og kontroll kuttes med AluI/RsaI
- merkes vha. Exo-Klenow og Cy5-dUTP og Cy3-dUTP



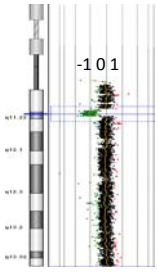
Scanning



Dataanalyse

- Røde signal: mer fra pasient enn referanse
- Grønne signal: mindre fra pasient enn referanse
- Gule signal: like mye av hver

Beregne ratioer mellom test / kontroll



Ratioer gjøres om til log2-verdier:

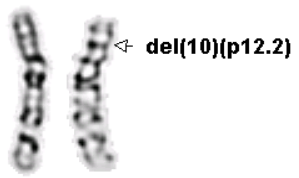
0: normal (2 kopier)

-1: heterozygot delesjon (1 kopi)
>-2: homozygot delesjon (0 kopier)

+0.58: duplikasjon (3 kopier)
+1: triplikasjon (4 kopier)

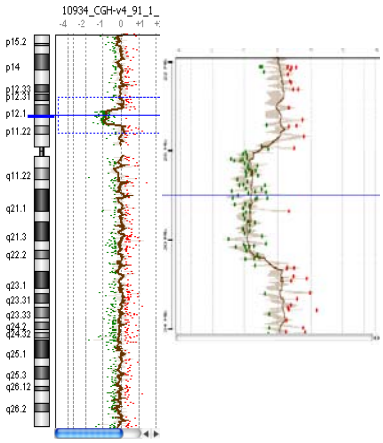
Resultatene plottes ift. lokaliseringen langs kromosomene (Agilent Workbench/CGH Analytics)

Karyotyping



Resolusjon 5-10 Mb

aCGH



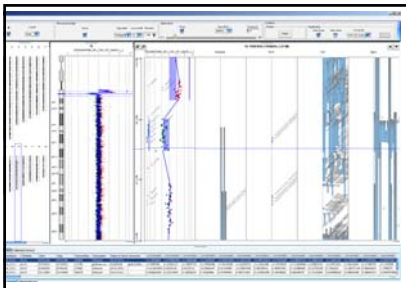
Resolution < 0,01 Mb

Genomet 3000 Mb
Kromosom 1 249 Mb
Kromosom 21 47 Mb

Rapport

Chr	Cytoband	Start	Stop	#Probes	Amp	Del	pval	Gene Names	Variation_hg19	Decipher_hg19	Egne funn_hg19	kb
252206025661_S01_CGH_1010_Sep10_1_2												
chr1	p31.1	72768855	72795480	3	0,797649	0,000000	1,12E-09		Variation_[illegible]	[illegible]_1005, Variation_1006, Variat		26,625
chr1	p31.1	74499987	74701780	15	0,576008	0,000000	4,13E-26	LRRIQ3, FPGT, [illegible]				201,793
chr1	q44	248727929	248785562	6	0,877831	0,000000	6,27E-20	OR2T34, OR[illegible]	[illegible]17, Variation_0263, Variatior	D11-3890, DC		57,633
chr2	p22.3	34702930	34727088	3	0,000000	-0,656776	8,33E-08		[illegible]_1574, Variation_2375, Variatior	D08-0666		24,158
chr4	q13.2	69392545	69462438	6	0,777130	0,000000	8,99E-19	UGT2[illegible], [illegible]	Variation_1082, Variation_1083, Variation_1084, Variat			69,893
chr5	q32 - q33.*	149776356	150459548	59	0,573053	0,000000	3,49E-97	T[illegible]CD	Variation_3580, Variation_7	Deafness (TCOF1)		683,192
chr6	p25.3	266079	402075	11	0,383072	0,000000	4,8[illegible]	DUSP22, IR	Variation_0070, Variation_0071, Variatior	D08-4870		135,996
chr6	p21.32	32480027	32521929	3	0,000000	-3,572 115	[illegible]	HLA-DRB5,	Variation_3603, Variation_4493, Variation_4767, Variat			41,902
chr6	q14.1	78979172	79023328	3	0,622688	0,000000	[illegible]E-07		Variation_0290, Variation_1130, Variatior	D11-5938		44,156
chr7	p14.1	38296176	38376560	7	0,000000	-0,[illegible]	6,92E-11	TARP	Variation_0332, Variation_1724, Variation_2691, Variat			80,384
chr11	q11	55377910	55468619	9	0,531720	0,000000	2,70E-14	OR4P4, OR	Variation_0308, Variation_0419, Variatior	D11-1377		90,709
chr12	p13.2	11221333	11256467	3	0,880089	0,000000	7,30E-10	PRR4, PRH	Variation_3875, Variation_6960, Variatior	D11-3890		35,134
chr14	q11.2	19376762	20427242	15	[illegible]	-0,456616	6,79E-17	OR11H12, I	Variation_0316, Variation_0812, Variation_2174, Variat			1050,48
chr14	q11.2	22554846	22952279	[illegible]	[illegible]	-0,290785	3,81E-17		Variation_0333, Variation_3039, Variation_4829, Variat			397,433
chr14	q32.33	106531557	106[illegible]	[illegible]	0,000000	-0,643047	7,68E-07		Variation_0317, Variation_0772, Variatior	D12-0035, D1		27,546
chr16	p11.2	32573808	33[illegible]	8	0,405038	0,000000	1,36E-06	TP53TG3B,	Variation_0195, Variation_[illegible]16p11.2-p12.2	Microdeletio		811,991
chr17	p12	13742876	14[illegible]	23	0,527133	0,000000	3,56E-26	CDRT15P, [illegible]	Variation_31[illegible]	Charcot-Mari[illegible] HNPP ()	Q09-1191, D[illegible]	412,847
chr19	p12	2060[illegible]	[illegible]0719006	6	0,000000	-0,672612	1,25E-11		Variation_1520, Variation_3183, Variation_4070, Variat			111,146
chr20	p13	[illegible]	3842914	20	0,251038	0,000000	9,05E-09	GFRA4, AD	Variation_44048, Variation_67638, Variat	D11-6748		202,789
chr21	p11.2	[illegible]32936	10867000	18	0,000000	-0,391393	9,59E-16	LOC100132	Variation_5151, Variation_5152, Variation_5153, Variat			1034,064
chr22	q1[illegible]	24347959	24390254	5	0,760028	0,000000	3,09E-13	LOC391322	Variation_3238, Variation_7	Microduplication (22q11.2)		42,295

Ofte >20 CNVs – hvem er viktig???



Vurdering av aCGH resultat

Nukleotid-posisjon

↓

Hvilke gener ligger i området?
Hvilken funksjon har disse genene?
Er noen av disse genene relatert til sykdom?
Passer det med kliniske funn?

↓

Søke i syndrom databaser
Er det rapportert om tilsvarende avvik?

↓

Søke i databaser for kopivariasjon
Er det rapportert som normalvariasjon?

↓

Er CNVen årsak til sykdom ...eller ikke..?

Generelle databaser

Ensembl	www.ensembl.org
OMIM, PubMed	www.ncbi.nlm.nih.gov

Kopitallsdatabaser - normal:

Database of Genomic Variants:
http://projects.tcag.ca/variation/

Syndrom databaser:

DECHIPHER	https://decipher.sanger.ac.uk/
Clinvar	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar
GeneTests	www.genetests.org/
ECARUCA	http://ecaruca.net
Unique	www.rarechromo.org

Google norsk (bokmål)

Mest sannsynlig et patogent avvik hvis:

- Samme avvik, eller overlappende, er rapportert å forårsake en sykdom/syndrom/ fenotype
- Genfunksjon til gener involvert i avviket passer med pasientens sykdomsbilde
- Avviket er *de novo*
- Avviket er en delesjon
- Avvik ligger i et genrikt område
- Avvik ikke rapportert som en normal CNV (mye usikkerhet rundt dette)
- Avviket har en størrelse på >0.5 Mb (selv avvik på flere Mb kan være normale)

En god klinisk beskrivelse er HELT nødvendig for korrekt tolkning av funnets betydning

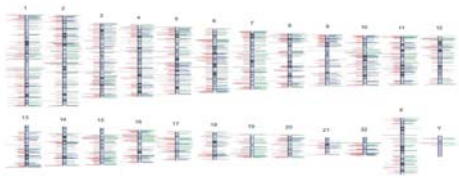
Kopitallsvarianter (CNVs)

- Et segment av DNA som er >1kb og tilstede i et variabelt kopitall sammenliknet med et referansegenom
- Nå definert som >20 basepar
- Bidrar til normal variasjon mellom individer
- Omfatter 5-10% av genomet
- Kan ha **klinisk relevans eller ikke**

❖ Er årsak til en rekke genetiske sykdommer/syndromer
  - ❖ 5-20% av barn med forsinket utvikling/psykisk utviklingshemming, ASD eller medfødte misdannelser

❖ Kan være forbundet med sårbarhet for sykdom/syndromer

❖ Kan representere benigne forandringer i normalbefolkningen

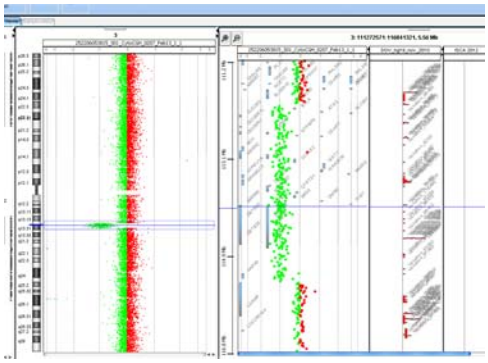


Map of CNVs by chromosome

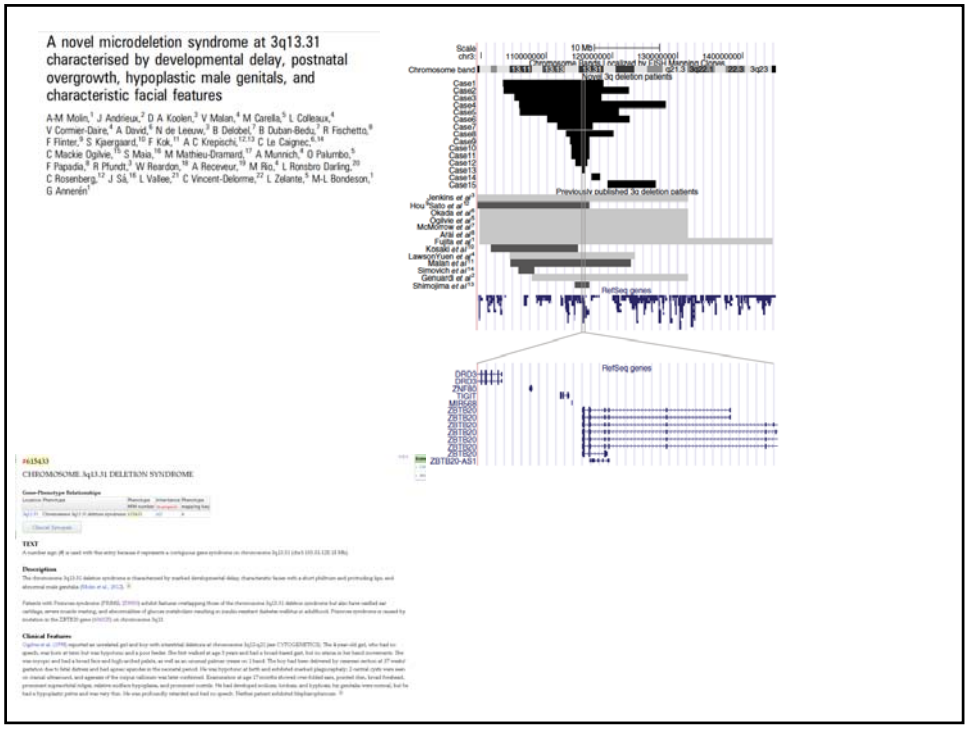
2009: 38.000 CNVs >100 bp

Jente med autisme og PU, makrocefal, storvokst
Grove ansiktstrekk, bred neserot

Rekvireres: aCGH, fragilt X, Sotos syndrom, di George syndrom



3 Mb delesjon på kromosom 3



A novel microdeletion syndrome at 3q13.31 characterised by developmental delay, postnatal overgrowth, hypoplastic male genitals, and characteristic facial features

A-M Molin,[1] J Andrieux,[2] D A Koolen,[3] V Malan,[4] M Carella,[5] L Colleaux,[4] V Cormier-Daire,[6] A David,[2] N de Leeuw,[3] B Delobel,[7] B Duban-Bedu,[7] R Fischetto,[8] F Flinter,[9] S Kjaergaard,[10] F Kok,[11] A C Krepischi,[12,13] C Le Caignec,[6,14] C Mackie Ogilvie,[15] S Maia,[16] M Mathieu-Dramard,[17] A Munnich,[4] G Palumbo,[5] F Papadia,[8] R Pfundt,[3] W Reardon,[18] A Receveur,[19] M Rio,[4] L Ronsbro Darling,[20] C Rosenberg,[12] J Sá,[16] L Vallee,[21] C Vincent-Delorme,[22] L Zelante,[5] M-L Bondeson,[1] G Annerén[1]

#615433
CHROMOSOME 3q13.31 DELETION SYNDROME

Gene-Phenotype Relationships

TEXT

Description

Clinical Features

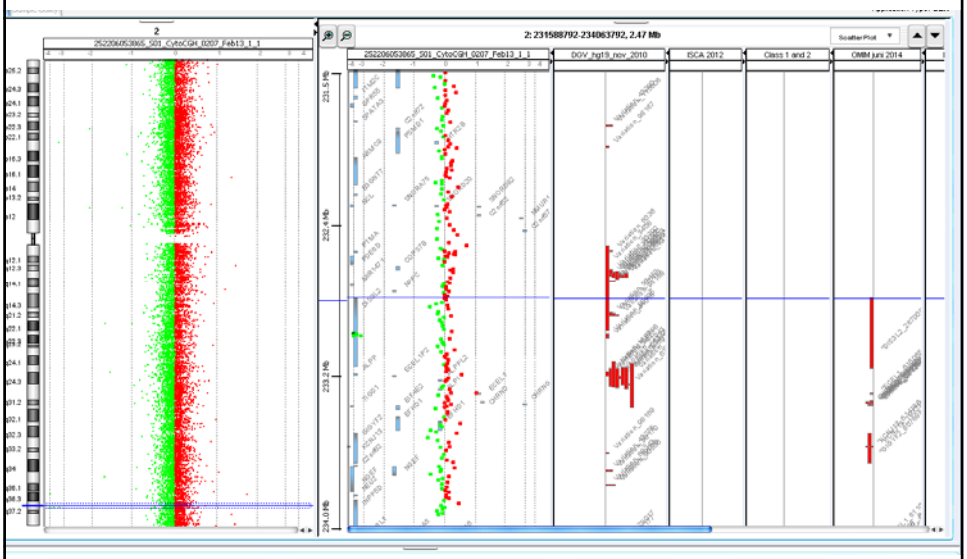
3q13.31 mikrodelesjonssyndrom

Figure 2 Photographs of cases 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12, and 15. Physical characteristics of note are short philtrum, protruding lips with full lower lips and tented upper lips, hypertelorism, and antimongoloid slanted eyes present in several cases.

Nyfødt, stort barn, store hender, stor tunge, VSD, store nyrer ved ultralyd
Hypoglykemi initialt, påfallende hypoton

Mistanke om Beckwith-Wiedemann syndrom

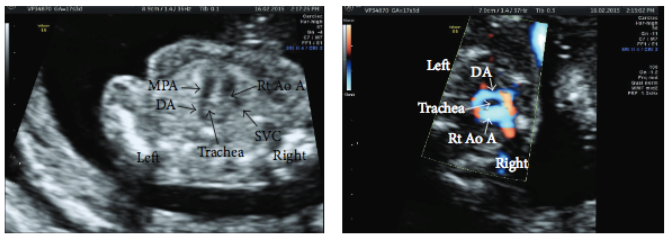
15 kb homozygot delesjon – omfatter ekson 9 i DIS3L2



Perlman syndrom – et autosomalt recessivt overvekstsyndrom med likheter med Beckwith-Wiedemann syndrom. Høy risiko for Wilms tumor.

- aCGH kan påvise aneuploidier og store ubalanserte kromosomforandringer man før behøvde kromosomanalyser for, CNVer forbundet med syndromer, samt mindre CNVer forbundet med enkeltgensykdommer
- aCGH har økt det diagnostiske utbyttet fra 5% (karyotyping) til 15-20% for barn med forsinket utvikling/psykisk utviklingshemming, ASD eller medfødte misdannelser
- Bruk av aCGH på fødte individ har lært oss at vi er helt avhengig av "knagger å henge på", god beskrivelse av fenotypen, for å kunne tolke funn
- Varianter av usikker betydning er en stor utfordring – mer kunnskap/deling av data nødvendig
- Er vi klare til å innføre aCGH i prenatal-diagnostikk?

Ultralyd av hjertet til foster med Di George syndrom



(a) (b)

FIGURE 1: Fetal echocardiography at 17 weeks' gestation. Two-dimensional gray-scale (a) and high definition color Doppler (b) images in three-vessel and trachea view. The right aortic arch (Rt Ao A) and ductus arteriosus (DA), forming classic "U" shape. MPA, main pulmonary artery; SVC, superior vena cava.

Ved mistanke om Di George etter UL, kan man foreta en målrettet MLPA-analyse

Utfordring: hjertefeil er et uspesifikt tegn + i prenataldiagnostikk er man avhengig av rask avklaring

DiGeorge syndrom

Delesjon på kromosom 22q11.2 (eller mutasjoner i TBX1)

Forekomst: 1 per 3000-4000 levendefødte barn (12-20 nye pr. år)

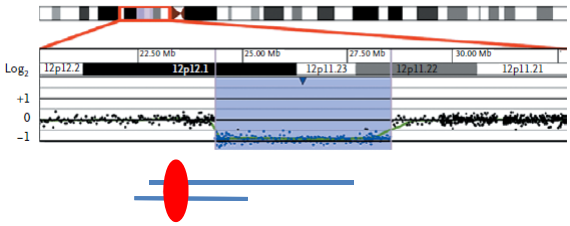
90% av tilfellene er nyoppståtte, 10% er nedarvet
Store individuelle variasjoner i fenotype

Klassiske symptomer:
- karakteristiske ansiktstrekk (avlang ansiktsform med økt øyeavstand, små avvik i ytterørene, smale nesevinger, korte øyenvipper og flate kinnben)
- ulike former for hjertefeil (75%)
- leppe/ganespalte etc. (70%)
- PU/lærevansker (70-90%)
- nedsatt immunforsvar (75%)

Andre: misdannelser i nyrer og urinveier (30%), lavt kalsiumnivå i nyfødtperioden (50%), hypotoni, autismespekterforstyrrelser (20%), ADHD, døvhet, epilepsi, skjelettmisdannelser

Flere likhetstrekk med bla. Charge syndrom, Smith-Lemli-Opitz syndrom, Alagille syndrom, Goldenhar syndrom

Funn av uklar betydning



Anta funn av CNV som delvis overlapper med et funn hos to pasienter med svært alvorlig fenotype.

Hjertefeil eneste påvist UL

De kausale genene er ukjente.

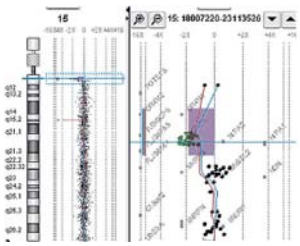
Kan vi uten videre anta at foster vil utvikle de samme komplikasjonene?

Hvis genene som forårsaker fenotypen sitter distalt, vil det kunne bety at vi har mistolket/overtolket betydningen av funnet

Sårbarhetsregioner

(susceptibility loci)

Vi kjenner flere CNVer som er forbundet med sårbarhet for ulike tilstander.
Årsaken til at ikke alle som bærer varianten blir syke (redusert penetrans), kan være at det trengs flere tilleggsfaktorer (SNV på andre allelet, kombinasjon av CNVer, varianter i andre gener, miljøfaktorer, epigenetiske faktorer) for at sykdommen kommer til uttrykk. Disse faktorene er i stor grad ukjente.



Ex.: 450 kb delesjon på 15q11.2

Assosiert med autisme, ADHD, PU, språkvansker

Flere er nedarvet fra friske foreldre eller foreldre med mildere symptom

Penetranseestimat: 10%

Utfordringer ift. prenataldiagnostikk:

Er funnet kausalt?

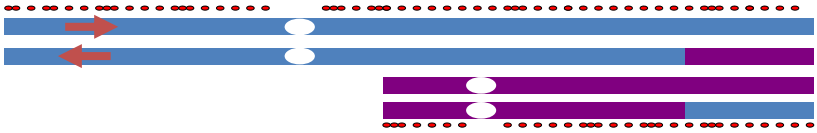
- Funn som ikke tidligere er beskrevet med samme fenotype?
- Genene som er involvert har ingen entydig relasjon til fenotypen?
- Stor duplikasjon, men ingen relevante gener i regionen?
- CNVen ligger et stykke unna et relevant gen, uklart om det påvirker genuttrykket?
- CNVen er nedarvet – er det redusert penetrans, recessiv sykdom?
- CNVen omfatter en sårbarhetsregion?

Skal vi rapportere alt? Ønsker foreldre å vite alt?

- Risiko for autisme, bærertilstander, kreftrisiko, sykdommer som utvikles i voksen alder

.....ser til internasjonale anbefalinger (ikke VUSer som ikke kan relateres til potensiell fenotype, lavpenetrante sårbarhetsområder, recessive CNVs, etc.)

Begrensninger med metoden



- avvik mindre enn resolusjonsgraden (i dag 5-50kb)
- balanserte avvik - balanserte translokasjoner eller inversjoner
- uniparental disomi (UPD) – kopinøytral
- triploidi – tre kopier av alle kromosom
- hvor i genomet duplikasjoner (ekstra kopier) er lokalisert
- lavgradig mosaikk (<ca. 20%)

Fremdeles avhengig av kromosomanalyser/FISH

….. eller hel-genom sekvensering…..

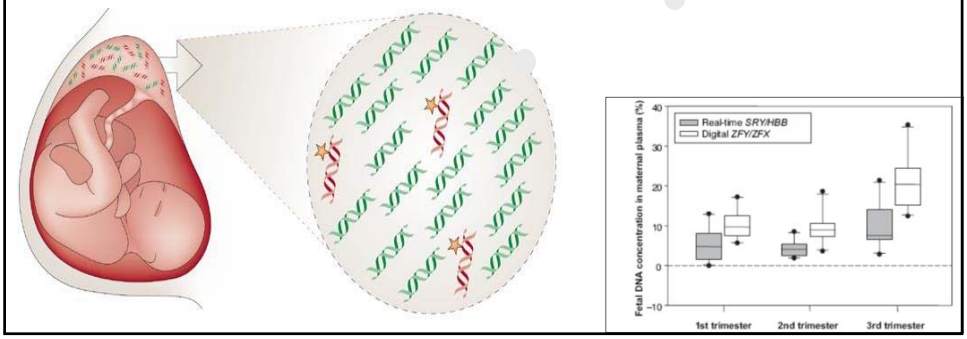
Non-invasive prenatal testing (NIPT) ved analyse av cellefritt føtalt DNA (cffDNA) i maternelt plasma

Nye metodar (foster-DNA frå blodprøve)

Bioteknologirådet legg vekt på at dei som skal få fosterdiagnostikk, bør få tilgang til den beste metoden fordi presis og tidleg diagnostikk er ein fordel. NIPT (undersøking av foster-DNA frå ein blodprøve av den gravide) bør kunne nyttast for å undersøkje fosteret etter dei kriteria som til ei kvar tid gjeld for fosterdiagnostikk. Dersom det er aktuelt å ta abort, er det betre at det skjer tidleg enn seint i svangerskapet.

Cellefritt føtalt DNA

Første gang beskrevet av Lo YM et al. i 1997
cffDNA er korte biter av føtalt DNA, ca. 150 bp
cffDNA frigis etter trophoblast apoptose i placenta
cffDNA er detekterbart i plasma fra ca. 5 uker ut i svangerskapet,
-> ikke-detekterbart få timer etter fødsel (t1/2=15 min)
cffDNA utgjør ca. 10% av fritt DNA i maternelt plasma



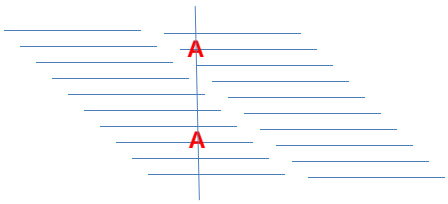
Applikasjoner

- Kjønnsbestemmelse ved risiko for X-bundne sykdommer (påvise SRY fra Y-kromosom vha. enkel markøranalyse, ev. sekvensere)
- RhesusD genotyping i RhD-negative mødre
- Påvisning/eksklusjon av paternelle mutasjoner
- Påvisning av aneuploidier (trisomi 13/18/21)
- Påvisning av kopitallvarianter

Merk: cellefritt føtalt DNA kan ikke isoleres fra mors sirkulerende DNA
Derfor enklere å påvise noe som ikke allerede finnes hos mor (Y-kromosom, mutasjon arvet fra far), enn noe som også finnes i mors DNA

Påvisning/ekskludering av mutasjon fra far

Sekvenser på kromosom 3

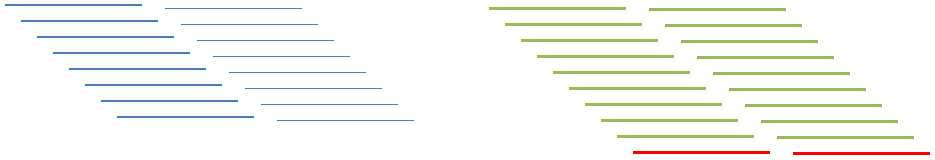


Benyttes bla. til å undersøke om foster har arvet en mutasjon i CFTR fra far
Fravær indikerer at fosteret ikke har arvet fars allel, og er frisk (enten WT normal eller bærer)

Normal prøve

Sekvenser på kromosom 3

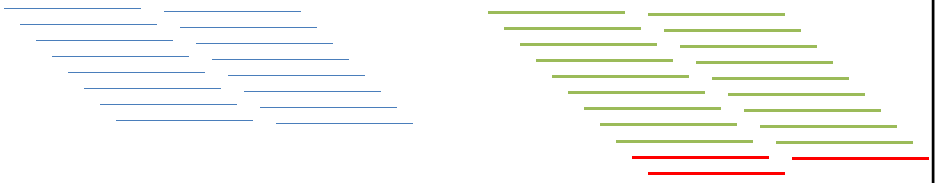
Sekvenser på kromosom 21



Prøve med trisomi 21

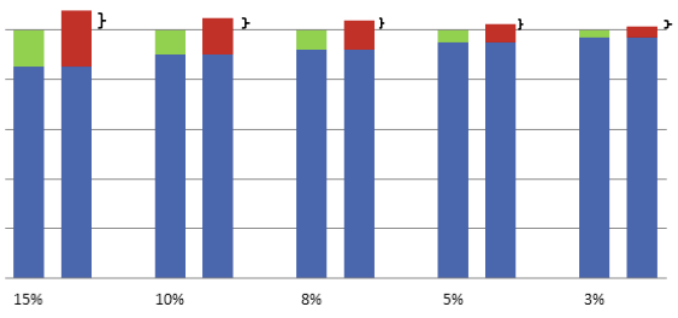
Sekvenser på kromosom 3

Sekvenser på kromosom 21



Antall sekvenserte fragment av et kromosom er et mål på mengde DNA, normalisert vs. andre
En prøve med trisomi 21 vil ha 5% flere reads enn en normalprøve (hvis fraksjon ff er 10%)

Føtal fraksjon påvirker sensitiviteten i metoden



"Fraction of cfDNA that is fetal is a key component, with trisomy becoming easier to detect at higher fetal fractions" (Norton, et al. 2013)

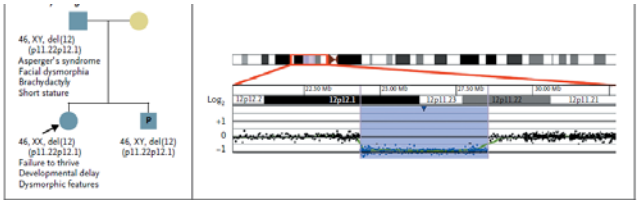
NIPT for aneuploidi
Trisomi 13, trisomi 18, trisomi 21

Company	Approach
illumina verifi prenatal test	Whole Genome
SEQUENOM®	Whole Genome
natera Conceive. Deliver.	Targeted Sequencing
Ariosa	Targeted Sequencing
BerryGenomics 贝瑞和康	Whole Genome
华大基因 BGI	Whole Genome

	N	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI
T21	500	99.9%	96-100	99.8%	98.7-100
T18	501	97.4%	86.2-99.9	99.6%	98.5-100
T13	501	87.5%	61.7-98.5	>99.9%	99.2-100

Bedre treffsikkerhet enn dagens KUB (kombinert ultralyd og blodprøve) tenker man vil føre til færre invasive tester (fostervannsprøve eller morkakeprøve)
Disse invasive testene har en abortrisiko på ca. 0,5%

Påvisning av kopitallsvarianter

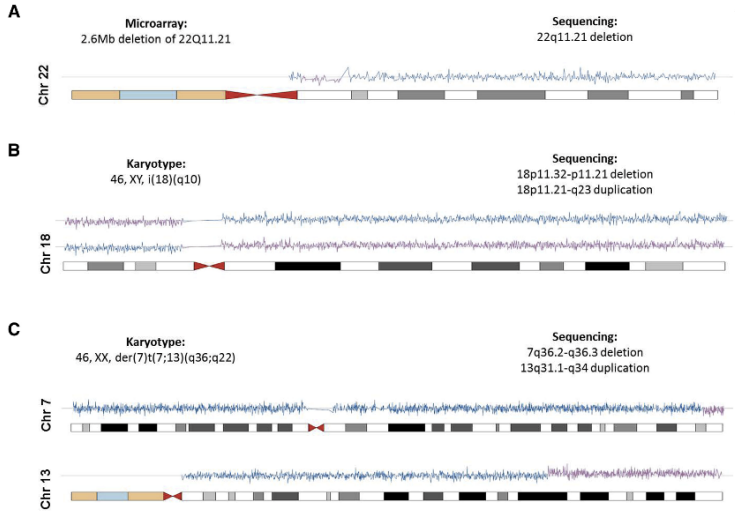


Peters D et al. N Engl J Med 2011

Prøve med mikrodelesjon chr12

Sekvenser på kromosom 3

Sekvenser på kromosom 12



A, Chromosome (Chr) 22 ideogram showing sequencing-based detection of 22q11.21 deletion (DiGeorge syndrome) that was confirmed by karyotype and microarray. **B**, Chr 18 ideogram for sample with karyotype 46, XY, i(18)(q10). **C**, Chr 7 and 13 ideograms for sample with karyotype 46, XX, der(7)t(7;13)(q36;q22).

Lefkowitz et al. Clinical validation of genomewide cell-free DNA testing. Am J Obstet Gynecol 2016.

Table 2 Sensitivity and specificity of non-invasive prenatal testing (NIPT) in detecting copy number variants (CNVs) > 1 megabase (Mb) in cases found to have a positive result by chromosomal microarray analysis of fetal sample

CMA-positive sample	*Sensitivity (% (n/N))*	*Specificity (% (n/N))*
CNV > 5 Mb	90.9 (10/11)	95.0 (95/100)*
CNV < 5 Mb	14.3 (1/7)	100 (99/99)

Biologiske kilder til falske positive/negative resultat

- Placenta mosaikk -> funn representerer ikke fosteret (1% av invasive tester)
- Multiple foster/vanishing twin (med kromosomforandring: antakelig 0,11%)
- Maternell mosaikk