

Autisms un mūsdienu ģenētiskie pētījumi

Dr.med.Daiga Bauze
MĢPDK
VSIA BKUS

05.11.2016



VSIA "Bērnu klīniskā universitātes slimnīca"

Autiskā spektra traucējumi

Autiskā spektra traucējumi (AST) ir kompleksi, heterogēni psihomotorās attīstības traucējumi ar agrīnu sākumu līdz trīs gadu vecumam

Raksturīga simptomu triāde:

- sociālās mijiedarbības traucējumi;
- komunikācijas traucējumi;
- stereotipiski uzvedības modeļi

Bērnam savlaicīgi nediagnosticēti AST var izraisīt smagu invalidizāciju



Prevalence



AST prevalences rādītāju izmaiņas uz 10 000 bērniem pasaulē

(Wing *et al.*, 1976; Bryson *et al.*, 1988; Honda *et al.*, 1996; Fombonne, 2002; Fombonne *et al.*, 2006; Tantom and Girgis, 2008; Fombonne, 2008; Mattila *et al.*, 2011; Elsabbagh *et al.*, 2012)



Prevalence

- AST skar visas iedzīvotāju grupas, neatkarīgi no to etniskās, rasiskās vai sociālās piederības
- AST diagnosticē 4.5 reizes biežāk zēniem (1 no 42), nekā meitenēm (1 no 189)
- Pētījumos Eiropā, Āzijā un Ziemeļamerikā - vidējā prevalence ir 1 – 2%
- Pēc pēdējo gadu epidemioloģisko pētījumu datiem, AST konstatē 1 no 68 bērniem

(Deborah et al, 2016)



Pārmantošanas risks

- Dvīņu pētījumos konstatēts, ka konkordance MZ dvīņiem ir 36 - 95%, bet DZ dvīņiem 0-31%
- Ģimenē , kurā ir bērns ar AST, atkārtotās risks ir 2-18%
- Vecāku vecums ir AST riska faktors

(Deborah et al, 2016)



AST etioloģiskais iedalījums

- Multifaktoriāls traucējums, kura attīstībā iesaistīti vienlaicīgi vairāki gēni, mijiedarbībā ar ārējās vides faktoriem (*R.Muchle et al., 2004*)
- 15% gadījumos - viena no galvenajām, agrīnām monogēno slimību pazīmēm, kas veido sindromālo AST (*Folstein and Rosen-Sheidley, 2001*)

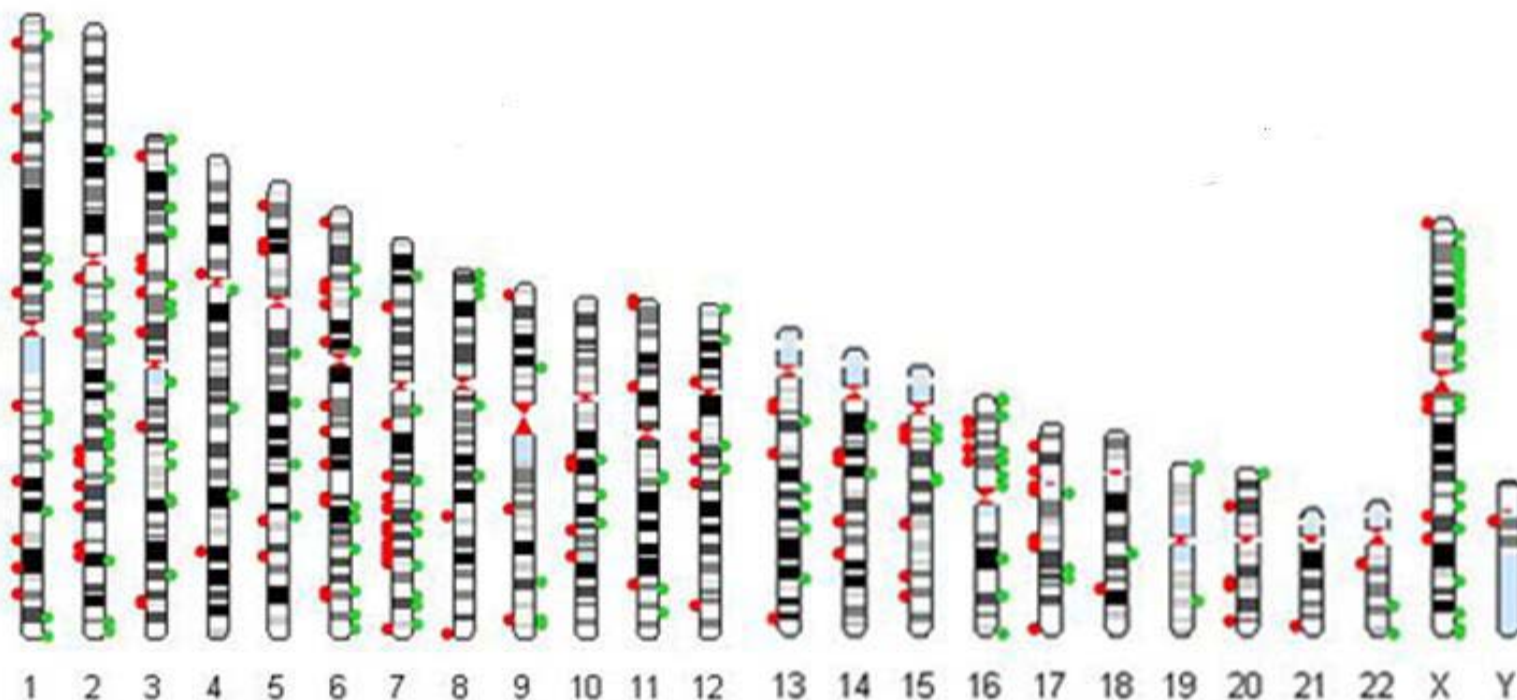


AST etioloģiskais iedalījums

- 5% hromosomu submikroskopiskas pārkārtošanās un *AutDB* datu bāzē aprakstītas 487 *de novo* un pārmantoti CNV (*Sebat et al.*, 2007, Betancur, 2011, *autDB*, 2016)
- 85% gadījumos nesindromālie jeb idiopātiskie AST, kuru cēlonis nav zināms (*Gillberg and Coleman* 1996; *Lintas and Persico*, 2009)



AST kandidātģēni



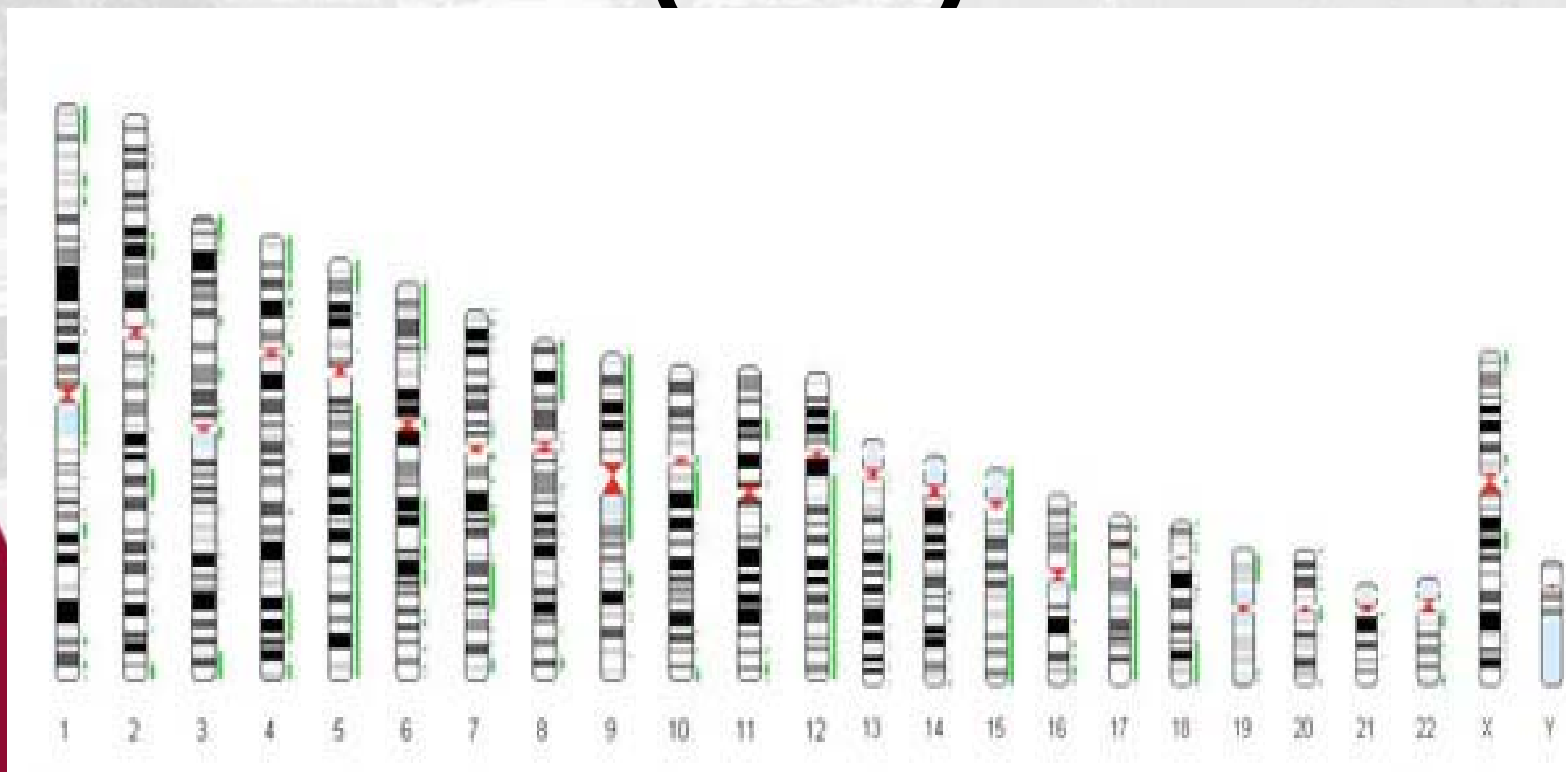
Sarkanā krāsā – retās slimības un sindromi, kuri izpaužas ar AST

Zaļā krāsā – pārējie AST kandidātģēni

Zināmi 845 ģēni, kas var izraisīt AST



AST kopiju skaita varianti (CNV)



Aprakstītas 487 pārmantotas un *de novo* CNV

autDB, 2016



AST ģenētiskā konsultēšana

© American College of Medical Genetics and Genomics

ACMG PRACTICE GUIDELINES

**Genetics
in Medicine**

Clinical genetics evaluation in identifying the etiology of autism spectrum disorders: 2013 guideline revisions

G. Bradley Schaefer, MD¹ and Nancy J. Mendelsohn, MD²; for the Professional Practice and Guidelines Committee



VSIA "Bērnu klīniskā universitātes slimnīca"

Ģenētiskā diagnostika

Pacientu izmeklēšana, ja ir aizdomas par:

1. Hromosomālu patoloģiju
2. Monogēnu patoloģiju
3. Metabolu patoloģiju
4. Mitohondriālu patoloģiju

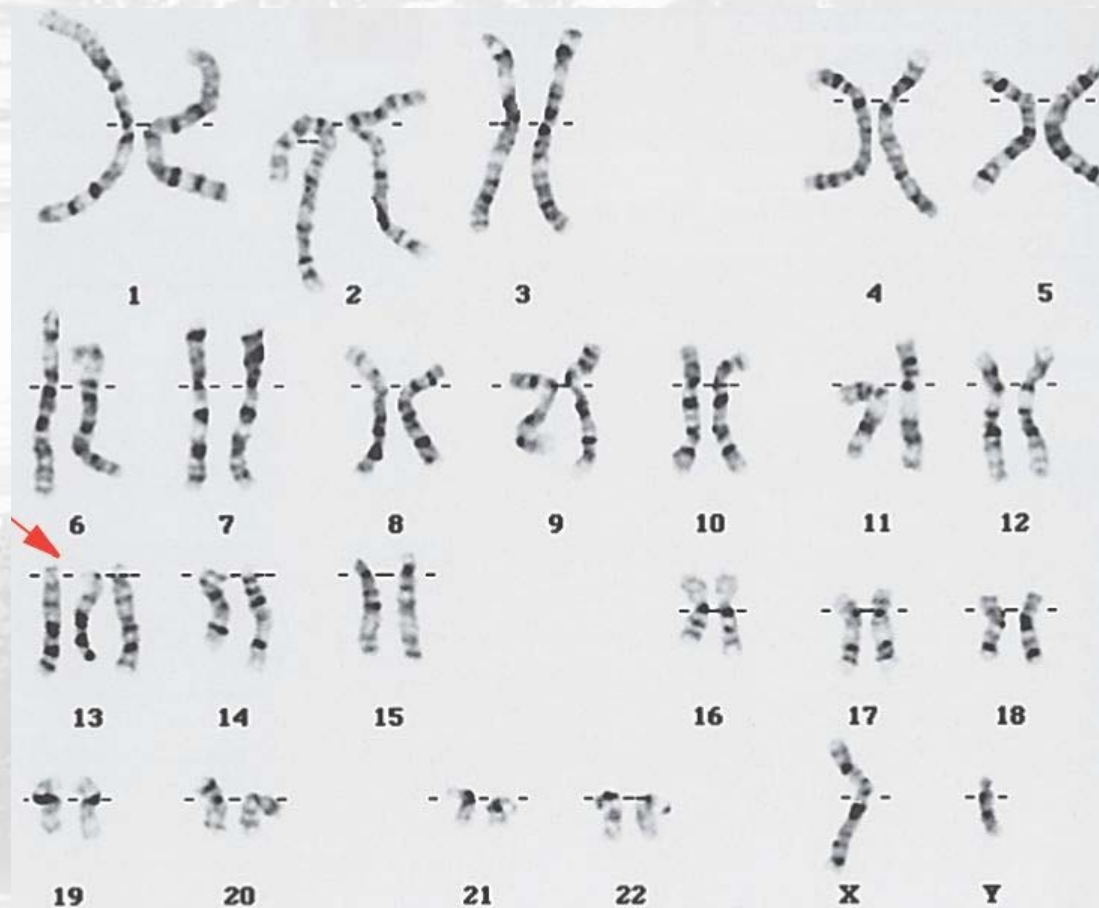


Diagnosticās metodes

1. Citoģenētiskā
2. Molekulārā
3. Bioķīmiskā



Kariotips

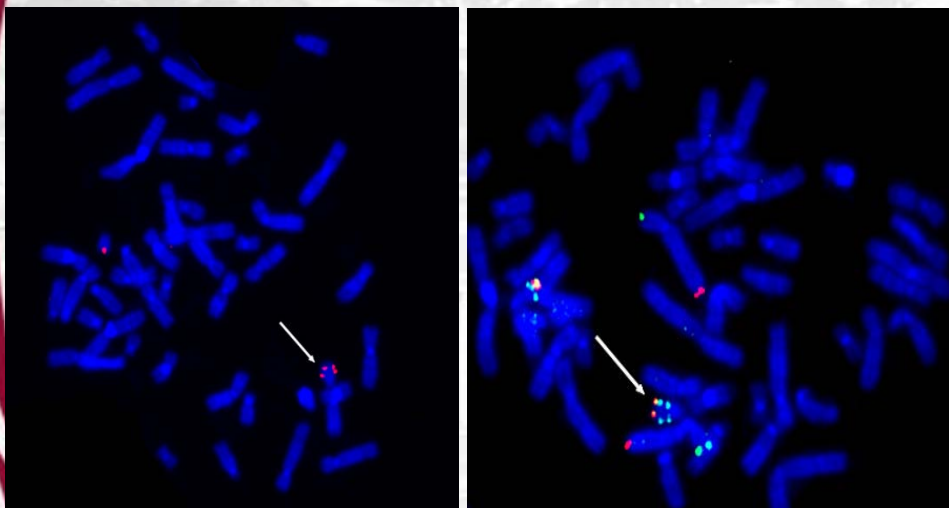


13. hromosomas trisomija

<http://bio3400.nicerweb.com/Locked/media/ch08/trisomy-13.html>



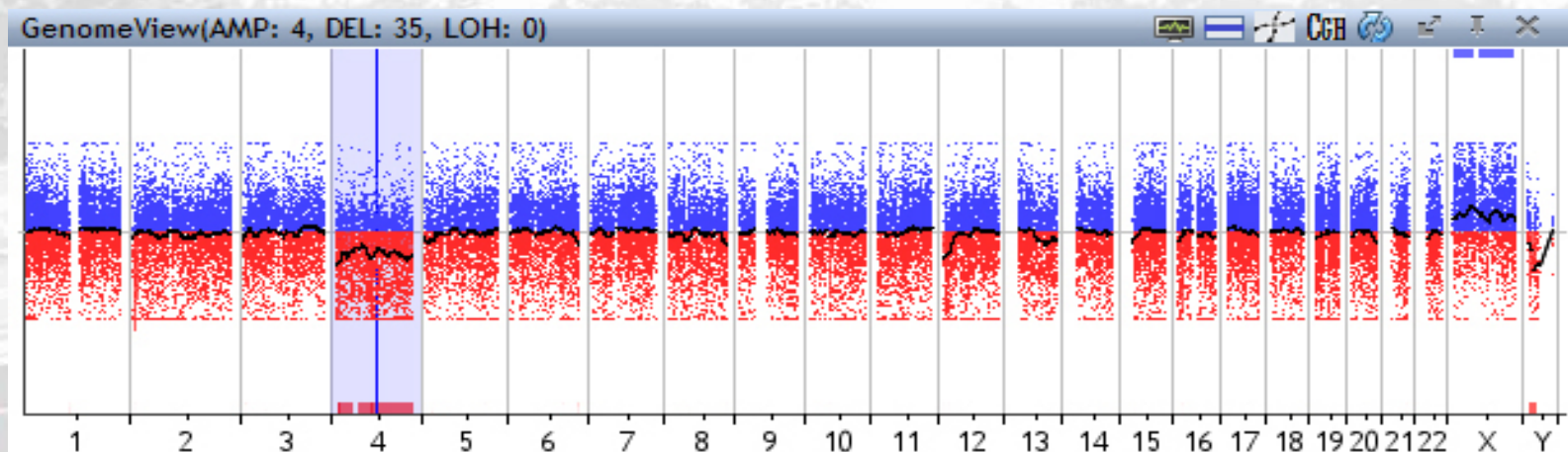
FISH



21.hromosomas strukturālas izmaiņas



aCGH



4.hromosomas delēcija

Rezultāts:

Atradne	Interpretācija
arr[hg19]10q11.21(45212898-45359483)x3	Reģions nesatur proteīnus kodējošus gēnus.
arr[hg19]12p11.22(30233736-30243473)x1	Reģions nesatur proteīnus kodējošus gēnus.
arr[hg19]15q14(34933216-34963958)x1	Reģions nesatur proteīnus kodējošus gēnus.
arr[hg19]15q26.3(102349683-102364833)x3	Reģions skar <i>OR4F6</i> un <i>OR4F15</i> gēnus.
arr[hg19]17q12(34618594-34628791)x1	Reģions skar <i>CCL3L1</i> gēnu.

Patogēnas izmaiņas *CCL3L1* gēnā

Rezultāts:

Atradne	Interpretācija
arr[hg19]8q24.23(137679805-137894507)x1	Reģions nesatur proteīnus kodējošus gēnus.
arr[hg19]8p21.2(25510851-25598401)x1	Reģions nesatur proteīnus kodējošus gēnus.
arr[hg19]19p12(201492909-20730485)x1	Reģions satur <i>ZNF682</i> , <i>ZNF90</i> , <i>ZNF486</i> , <i>ZNF737</i> gēnus.

Slēdziens: Atrastās izmaiņas ir aprakstītas praktiski veseliem kontroles grupas indivīdiem.
Informācijas par to ietekmi uz fenotipu nav.



Molekulārā diagnostika

1. Monogēnu slimību diagnostika izmantojot PCR, Sangerā sekvenēšanu, u.c. metodes

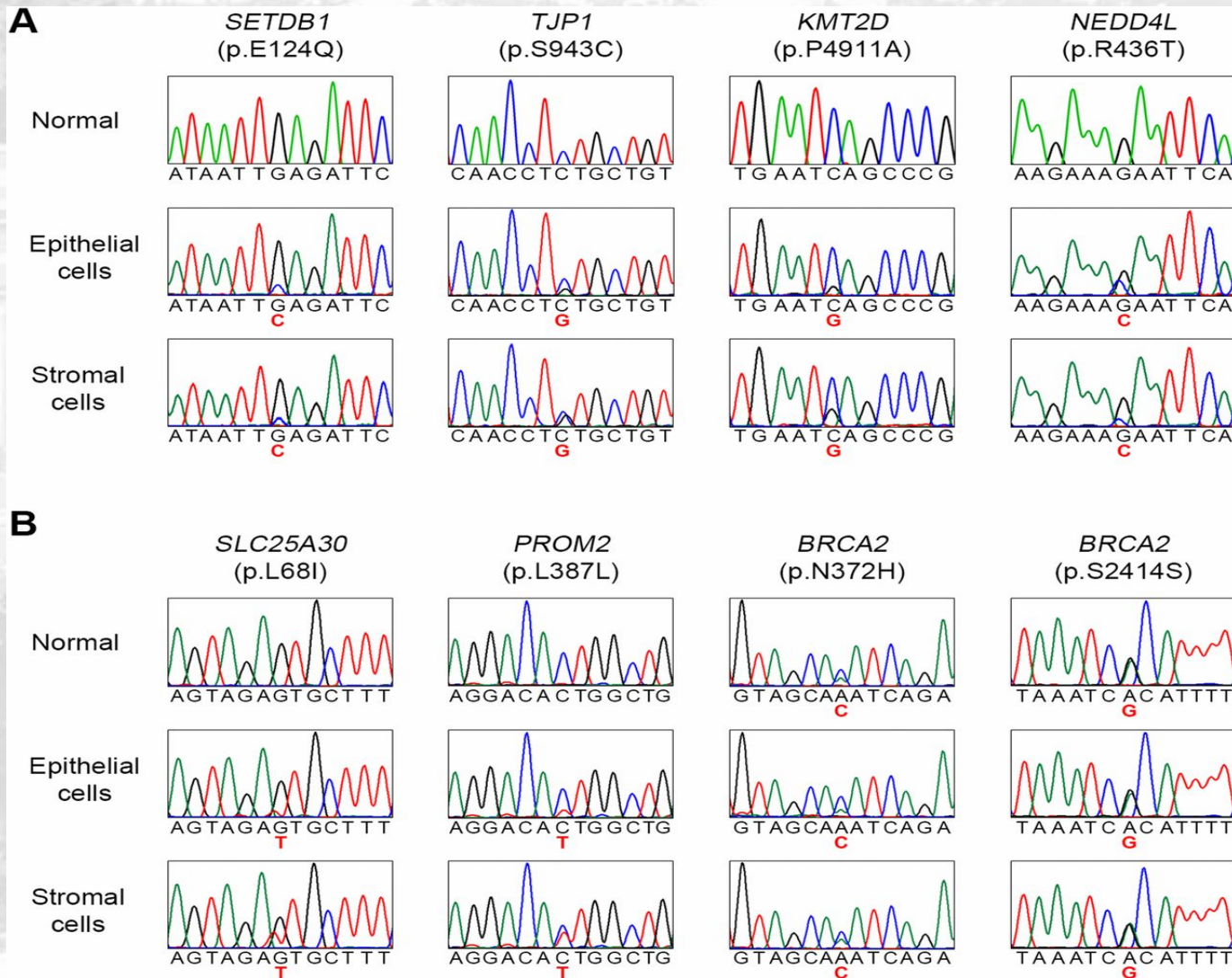
2. Jaunākās paaudzes genoma sekvenēšana (NGS)

- pilna eksoma sekvenēšana trīs ģimenes locekļiem

- slimību izraisošo gēnu paneļu analīze delēciju/duplikāciju noteikšana (tiek vienlaicīgi analizēti līdz pat 100 – 1000 iespējamie gēni, kuri var būt saistīti ar patoloģiju)



NGS



NGS

Indication Order

Unclassified defect of innate immunity, frequent bacterial infections

Molecular Genetic Diagnostics: *STAT1*, *IRAK4*, *MYD88*, *CARD9*, *CXCR4*, *TMC6*, *TMC8*, *NFKBIA*, *APOL1*, *MCM4*, *TRAF3IP2*, *IL17F*, *IL17RA*, *TIRAP*, *TRAF3*, and *UNC93B1*

RESULTS:

- Detection of one variant of unknown significance in the gene *CXCR4*.
- Detection of one additional variant in the gene *TMC6*.

Gene	Variant	Zygosity	Heredity	MAF (%)	<i>in silico</i> Prediction	Classification
<i>CXCR4</i>	c.153T>A; p.=	het.	AD	0.04	splice effect	unknown significance



Bioķīmiskā diagnostika

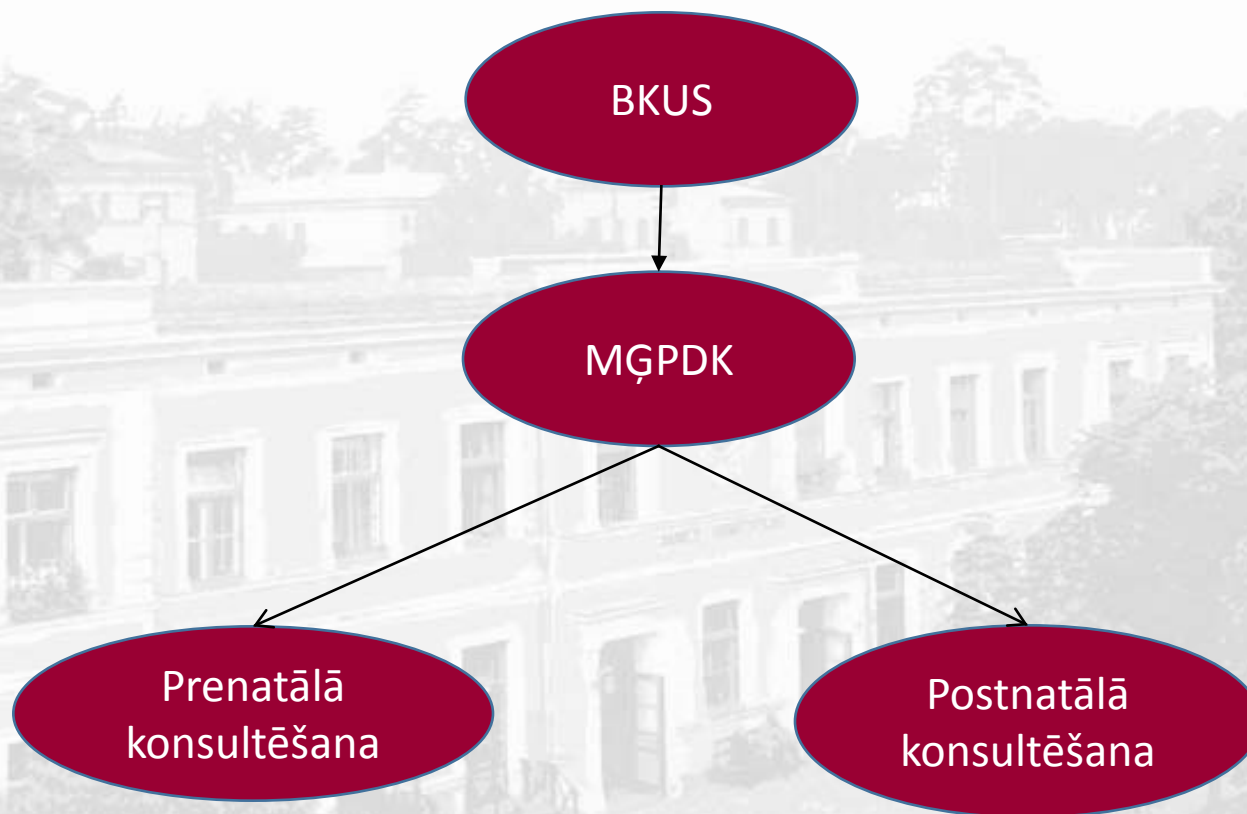
- Aminoskābju spektrs asinīs, urīnā, lumbālpunktātā
- Organisko skābju spektrs urīnā
- Mukopolisaharīdu, oligosaharīdu, ogļhidrātu spektrs urīnā
- Purīnu, pirimidīnus spektrs urīnā
- Transferīna izoelektriskā fokusēšana urīnā
- Karnitīnu un acilkarnitīnu spektrs asinīs

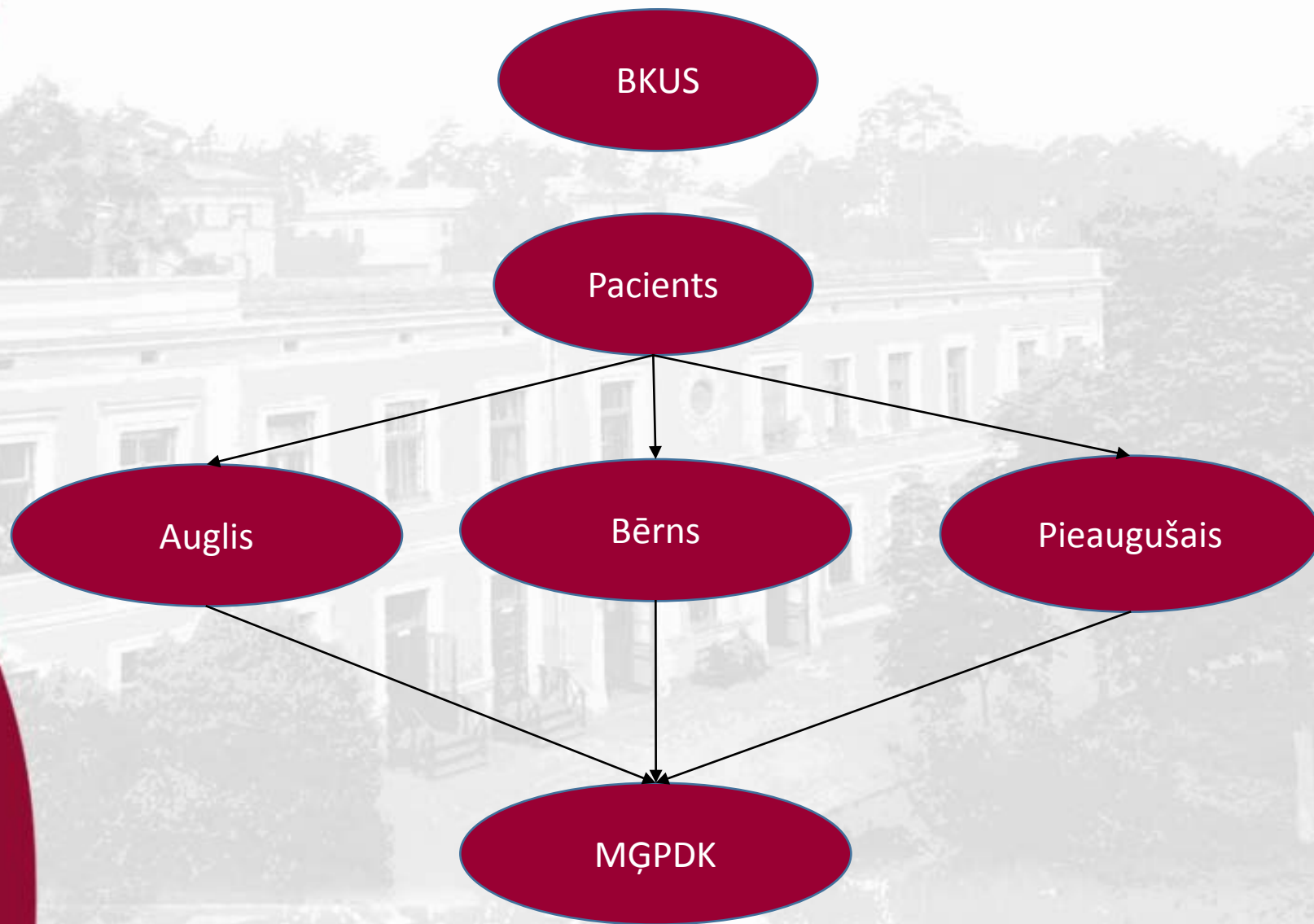


Diagnostikas process

1. Precīza diagnoze – pacientam pirms ģenētiskās konsultēšanas ir jābūt izmeklētam, daudzpakāpju izvērtēšana
2. Svarīga ir primārās aprūpes speciālista sadarbība ar klīnisko ģenētiķi saistībā ar pacienta izmeklēšanu un novērošanu dinamikā
3. Ģimenes konsultēšana







MGPDK

- Veic ģenētisko slimību prenatalo un postnatālo diagnostiku tajā skaitā jaundzimušo un grūtnieču izmeklēšanu, ģenētiskas patoloģijas savlaicīgai atklāšanai
- Nodrošina ģenētiskās izmeklēšanas procesa pēctecību no augļa un jaundzimušā sijājošas diagnostikas, līdz galīgās diagnozes noteikšanai

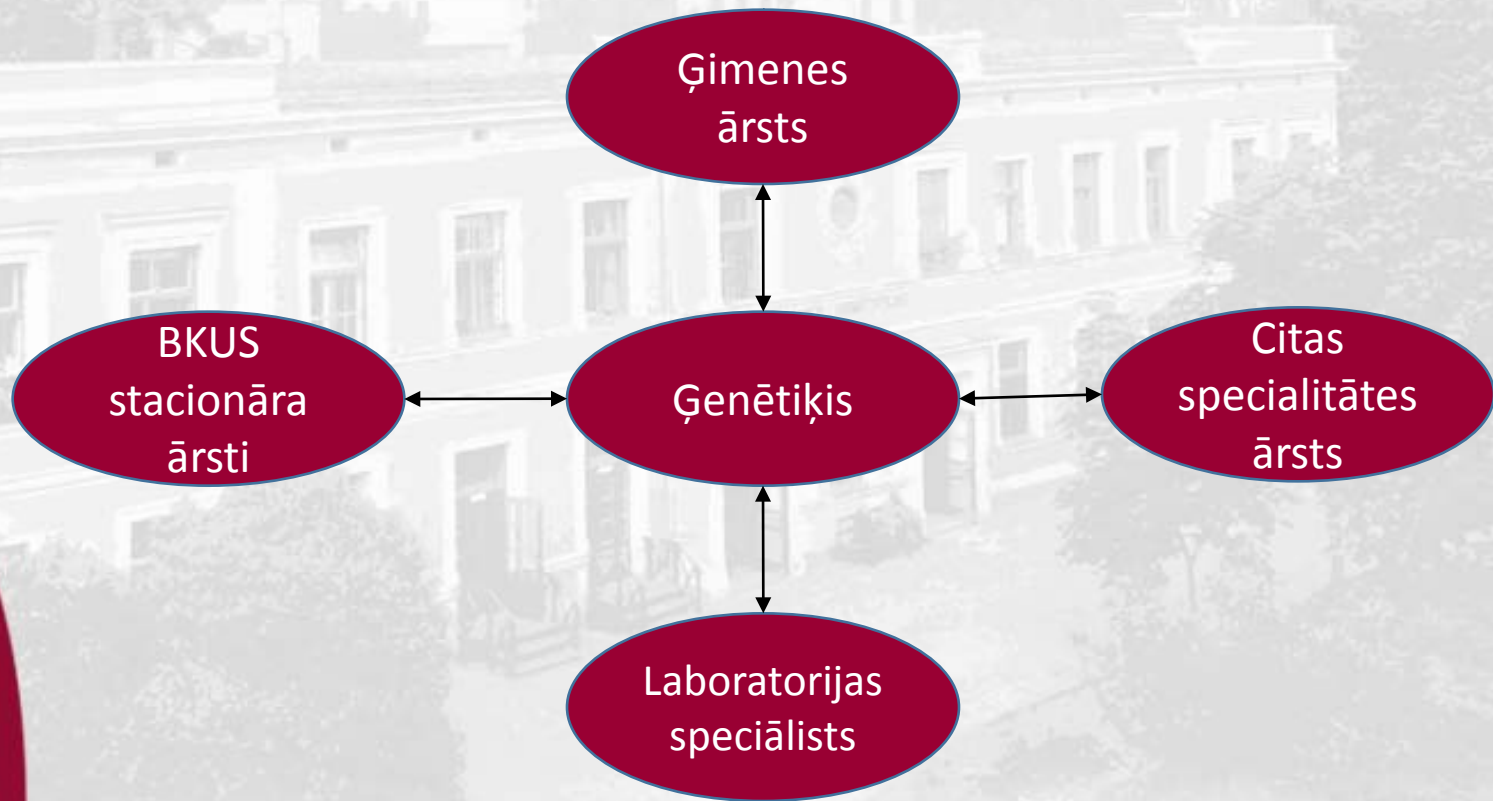


MĢPDK

- Sniedz kolēģiem, pacientiem un ģimenei ārstēšanas un aprūpes rekomendācijas
- Novēro pacientu ar iedzimtām ģenētiskām patoloģijām dinamiskā
- Organizē multidisciplināru konsīlijus, lai lemtu par pacienta izmeklēšanas procesa tālāku taktiku un iespējamās medikamentozās ārstēšanas atbilstību diagnostiskajiem kritērijiem



Speciālistu sadarbība



Darba mērķis (2014)

Atrast nesindromālo AST attīstības ģenētiskos riska faktorus, izmantojot klīnisko datu, antropometrisko mērījumu un molekulārās ģenētikas datu analīzi, noteikt raksturīgo fenotipu un izvērtēt medikamentozās terapijas iespējas ar farmakoģenētikas metodi



Darba uzdevumi

1. Izveidot pētījuma AST pacientu paraugkopu un iegūto antropometrisko mērījumu, citoģenētisko, bioķīmisko un molekulāro izmeklējumu informāciju iekļaut speciāli izveidotā anketā
2. Analizēt fenotipiskos, antropometriskos parametrus AST pacientiem



Darba uzdevumi

3. Veikt četru ģenētisko marķieru asociācijas analīzi autiskā spektra traucējumu pacientiem
4. Noteikt (CYP) P450 grupas marķiera *CYP2D6* alēļu *CYP2D6*4*, *CYP2D6*41* saistību ar otrās paaudzes antipsihotiskā līdzekļa risperidona efektivitāti un blaknēm
5. Sindromāla AST gadījumam veikt pilnu eksoma sekvenēšanas analīzi

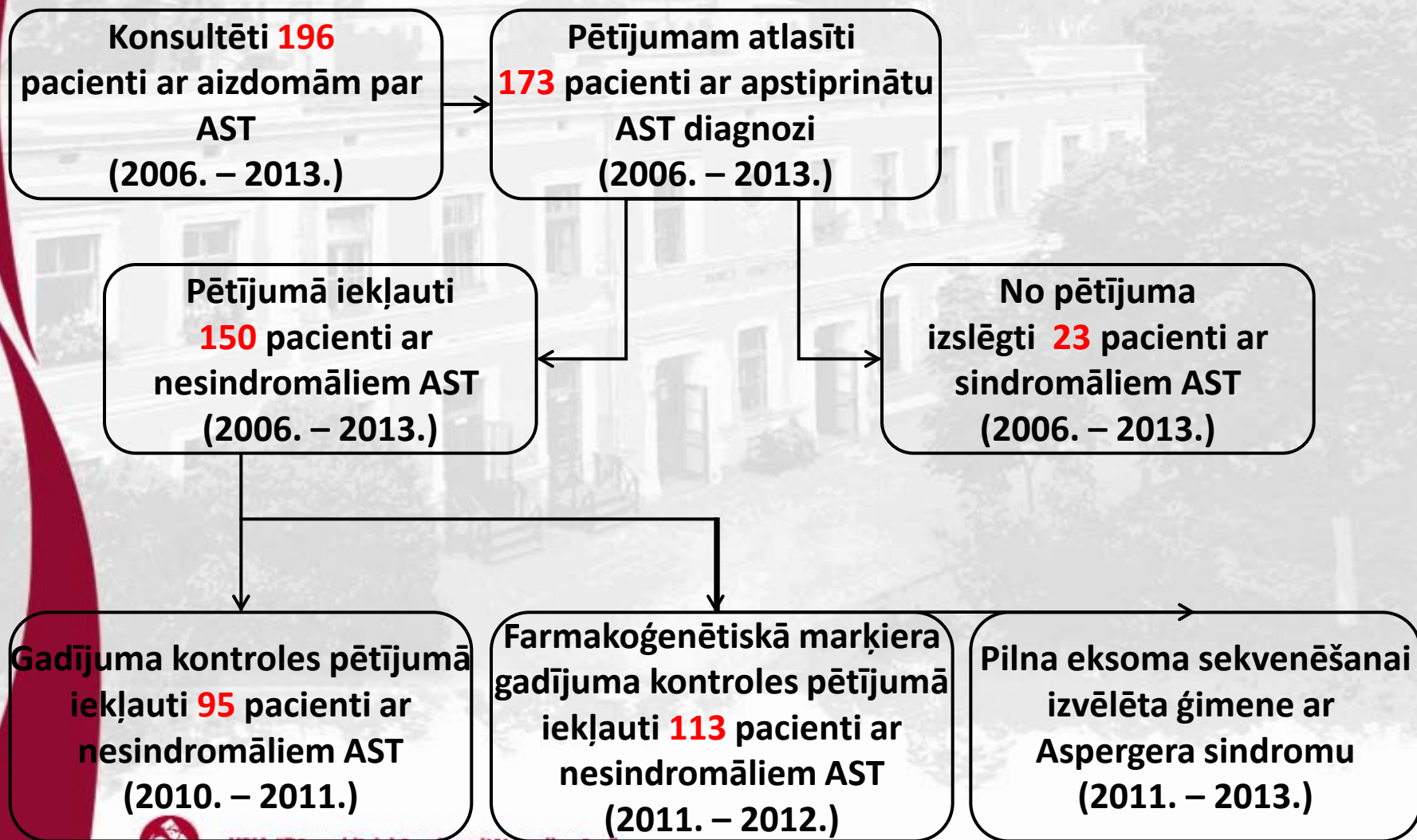


Darba izstrāde

- **Pacientu atlase**
 - VSIA BKUS Bērnu psihiatrijas un Medicīniskās ģenētikas klīnikās no 2006.-2013, atbilstoši AST diagnostiskajiem kritērijiem un skalām
- **Kontroles grupa**
 - Pēc nejaušas atlases principa iekļautas 190 potenciāli veselas, savstarpēji neradniecīgas personas no Valsts iedzīvotāju genoma datubāzes Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā
- **Veikts četrās secīgās fāzēs**

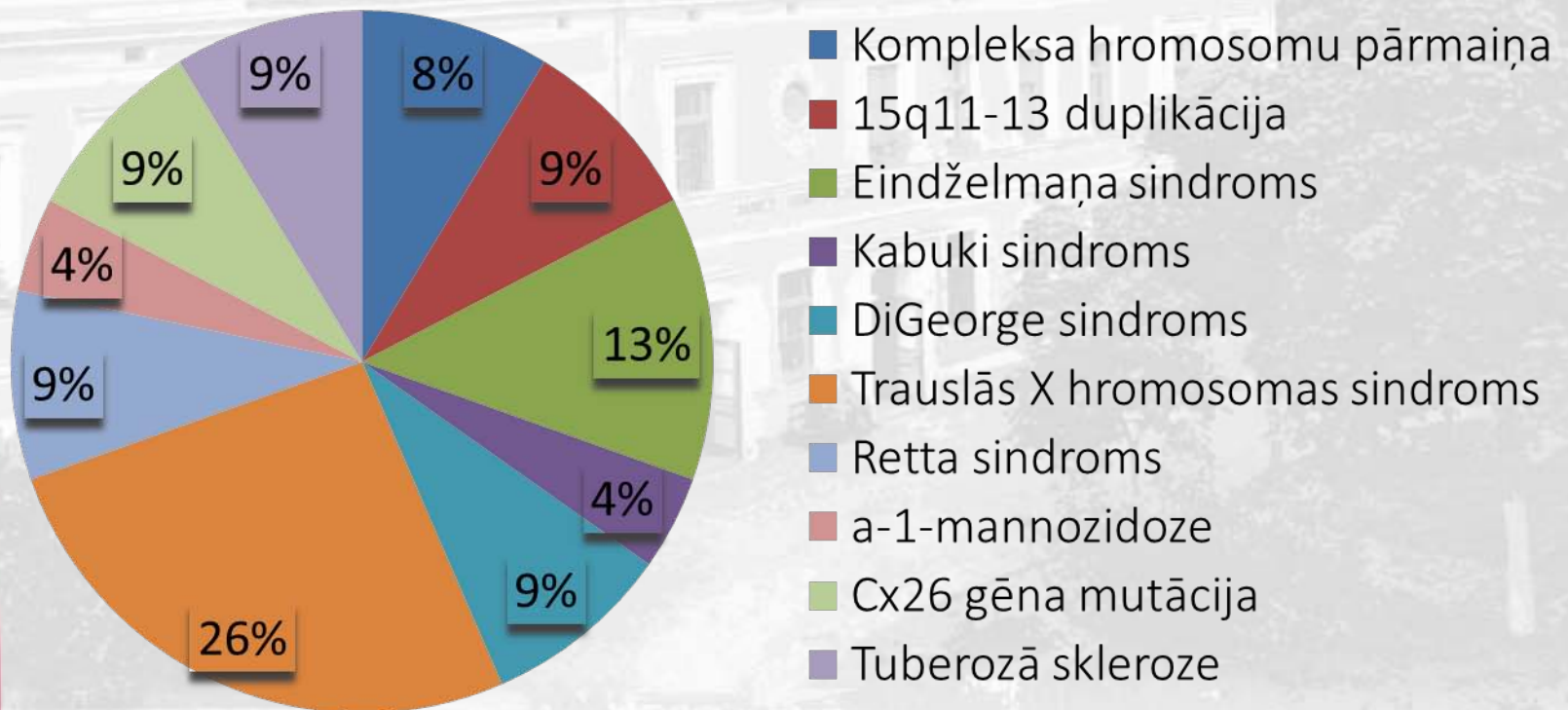


AST pacientu atlasē algoritms



Rezultāti

Sindromālie, no pētījuma izslēgtie AST (13,29%)



Sindromālo AST pacientu procentuālais sadalījums pa diagnozēm



Rezultāti

Nesindromālie AST, kas veidoja pētījuma grupu

n = 150

Vid. vecums = **8,1**
(SD = 3,15)

Zēni

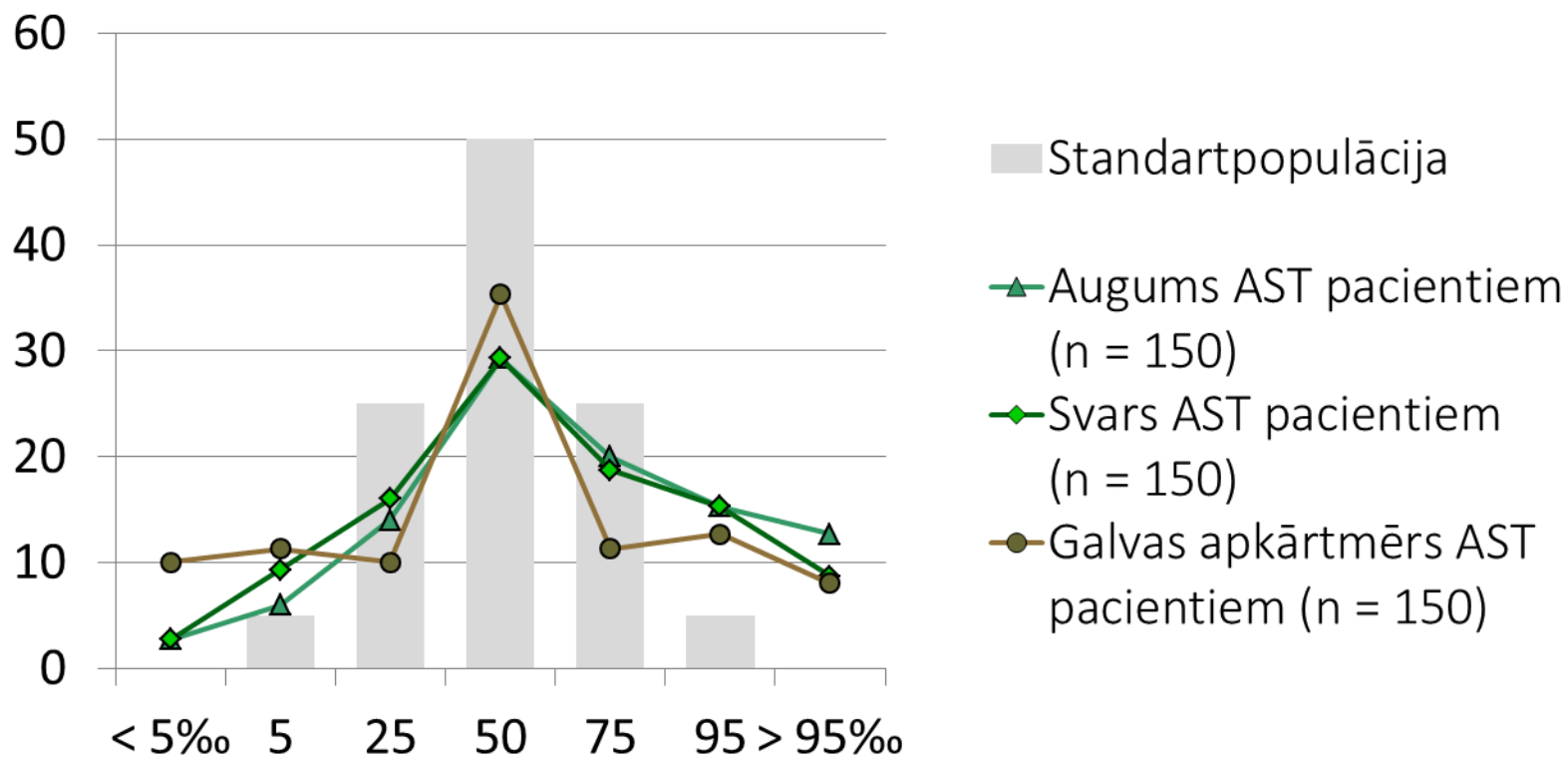
n = **121** (88,66%)
Vid. vecums = **7,9**
(SD = 2,82)

Meitenes

n = **29** (19,33%)
Vid. vecums = **8,4**
(SD = 4,24)



Antropometrisko mērījumu rezultāti



AST pacientu un standartpopulācijas antropometrisko mērījumu procentuālās attiecības sadalījums



AST blaknes

Garīgās atpalcības (80,66%):

n = 29 (18,66%), normāls intelekts (IQ > 70)

n = 77 (51,33%), viegla (IQ 50 - 69)

n = 34 (22,66%), vidēji smaga (IQ 35 - 49)

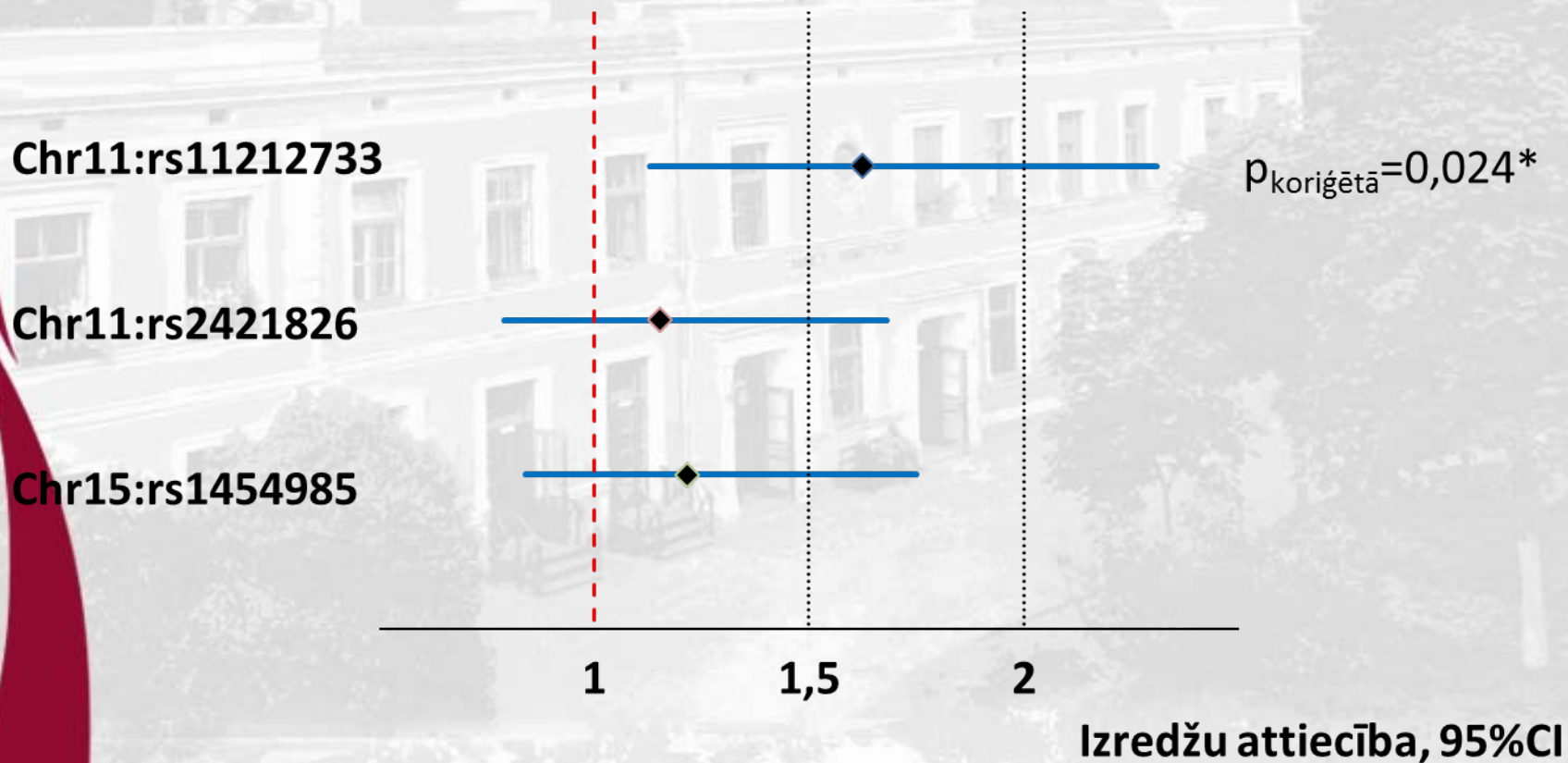
n = 10 (6,66%), smaga (IQ 24 - 30)

Epilepsija lēkmes 5,33%, biežāk
pacienti grupā ar smagu garīgu
atpalcību ($p = 0,009$)

Ekspresīvās un receptīvās valodas
traucējumi 98,66%



SNP alēļu gadījuma kontroles asociācijas rezultāti



Attēlota statistiski nozīmīga izredžu attiecība rs11212733 (11q22.3)
ģenētiskajam polimorfismam



VSIA "Bērnu klīniskā universitātes slimnīca"

*p vērtība koriģēta pēc Bonferoni

SNP alēļu gadījuma kontroles asociācijas rezultāti

EXPH5 ir proteīnu – kodējošais gēns, nav iesaistīts neiroloģiskajos procesos, tam nav ievērojamas nozīmes AST attīstībā
(Kondo et al., 2006)

DDX10 gēns kodē RNS helikāzi, iesaistīts daudzos šūnas procesos, kas saistītas ar sekundārām RNS strukturālām izmaiņām
(Savitsky et al., 1996)



Farmakoģenētika

Risperidona biotransformāciju aknās nodrošina vienlaicīgi vairāku P450 grupas marķieru darbība

Šajā pētījumā tika analizēts tikai viens marķieris - *CYP2D6*, bet antipsihotisko medikamentu metabolizācijā nozīme ir arī *CYP3A* un *CYP1A2* (Rodriguez-Antona et al., 2009)



Farmakoģenētika

Kopš 2012.gada
pasaulē tiek
piedāvāts
komerciāli
pieejams
farmakoģenētisks
tests, lai izvērtētu
individuālu reakciju
uz risperidona
terapiju



VSIA "Bērnu klīniskā universitātes slimnīca"



ANTIPSYCHOTIC AND
ANTIDEPRESSIVE
PHARMACOGENETICS

ADAPTING PSYCHOTROPIC DRUGS AND
THE DOSE TO THE PATIENT



www.cgngenetics.com

USA AND CANADA ONLY
info@cgngenetics.com
Tel: +1 973 623 1264
Toll Free: 1-877-242-6229

SPAIN ONLY
clientes@cgngenetics.com
Tel: +34 91 426 11 44

OTHER COUNTRIES
info@cgngenetics.com
Tel: +353 223 589 900

REDE PME inovação

Health Cluster Portugal
Plataforma de Competências de Saúde

ON2

ER

ANAB

certificação
acreditada
IFAC

CLIA

External Quality Assessments

- United Kingdom National External Quality Assessment Scheme in Clinical Cytogenetics, since 1995
- Grupo Espanhol e Português - International Society of Forensic Genetics, since 1997
- Control de Calidad de la Asociación Española de Diagnóstico Prenatal, since 2001
- European Molecular Genetics Quality Network, since 2002
- Quality Control for Molecular Diagnostics, since 2003
- Cystic Fibrosis European Network, since 2004
- Cytogenetics European Quality Assessment, since 2006
- Fetal Medicine Foundation, since 2008

www.cgngenetics.com

Farmakoģenētika

30 AST pacienti medikamentozā terapijā lietoja otrās paaudzes antipsihotisko līdzekli risperidonu vidējā devā 0,6 mg/dn (SD = 0,56)

Grupu veidoja 23 zēni un septiņas meitenes vecumā no četriem līdz 15 gadiem (vidējais vecums 7,16 gadi)



Farmakoģenētika

Blaknes

Septiņiem pacientiem (23.33%) - blaknes,
veikta terapijas korekcija

Pieciem pacientiem (16,6%) –
hiperprolaktinēmija

Vienam pacientam (3,33%) - svara
pieaugums

Vienam pacientam (3,33%) - bradikardija

Neiroloģiskie simptomi netika konstatēti
nevienam no AST pacientam



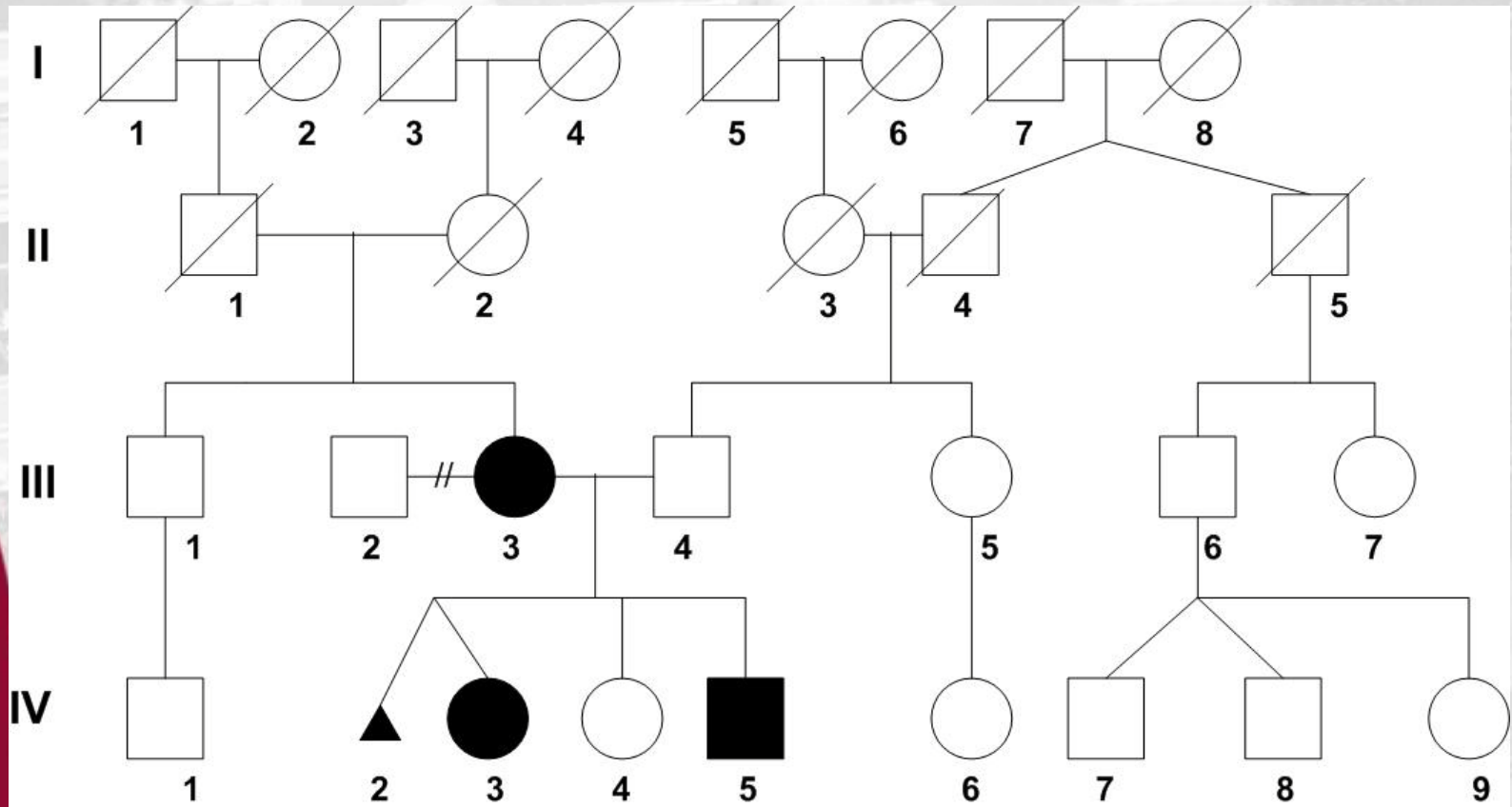
Farmakoģenētika

Analizēto *CYP2D6*4*, *CYP2D6*41* genotipu polimorfismam nav asociācijas ar terapijas efektivitāti un blaknēm, tie nav pietiekoši informatīvi risperidona efektivitātes un blakņu izvērtēšanai

Lai gan *CYP2D6* tiek uzskatīts par svarīgāko, tomēr visu biotransformācijā iesaistīto marķieru mijiedarbībai ir lielāka nozīme, nekā izolēta marķiera analīzei



Çimene ar Aspergera sindromu



Eksoma analīzes rezultāti

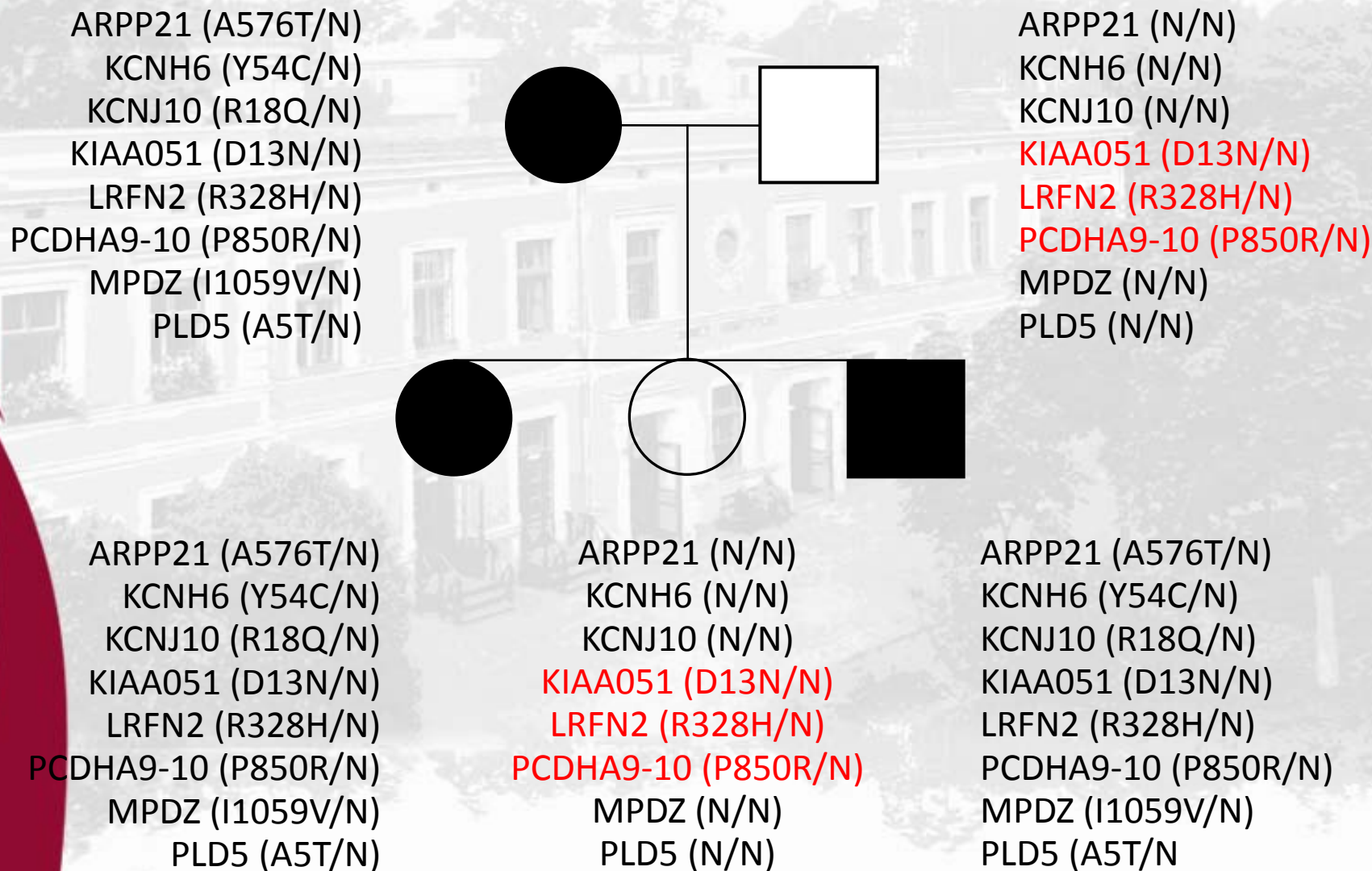
Izmantojot uz pierādījumiem balstītas datubāzes, atrastas iespējami patogēnas izmaiņas astoņos gēnos, kuri ekspresējas CNS:

***ARPP21, KCNH6, KCNJ10, KIAA051,
LRFN21, PCDH9-10, MPDZ, PLD5***

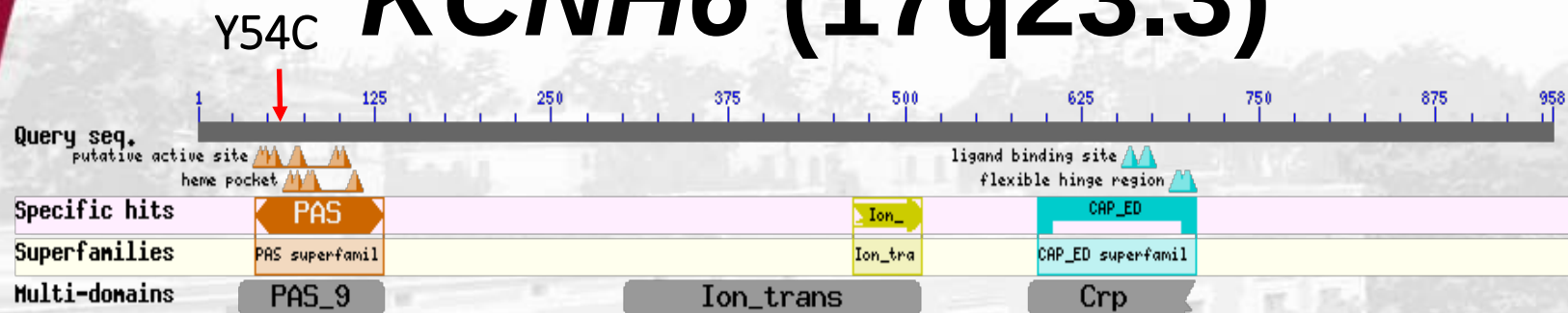
Veikta variantu resekvenēšana pēc Sangera metodes visiem ģimenes locekļiem



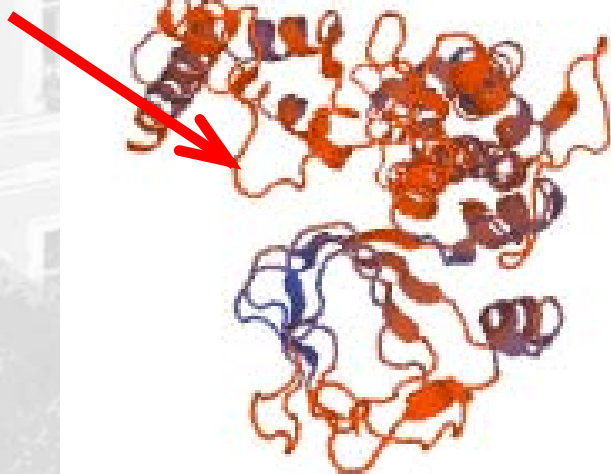
Resekvenēšanas rezultāti



KCNH6 (17q23.3)



Norma



Y54C



laundabīga

KCNH6 (*potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 6*). Tā kodētais proteīns ir saistīts ar ERG (*Ether-A-Go-Go-related gene 2*), kas nosaka uzvedību Kālija kanālu regulators, nodrošina K⁺ jonu transportu, regulē membrānu potenciālu sinaptisko transmisiju

Transmembrānu domēns (PAS)



VSIA "Bērnu klīniskā universitātes slimnīca"

sift, 2013, polyphen, 2013, ncbi, 2014, swissmodel, 2014

Secinājumi

1. Izveidota labi aprakstīta autiskā spektra traucējumu paraugkopa, kuras dati iekļauti speciāli šim pētījumam izveidotā anketā. Konstatēts, ka dažādas pakāpes garīgās atpalcības biežums ir 80,66%, epilepsijas lēkmju biežums ir 5,33%, valodas traucējumi 98,66%.

Epilepsijas lēkmes biežāk novērotas pacientiem ar smagu garīgu atpalcību ($p = 0,009$)



Secinājumi

2. Analizējot antropometrisko mērījumu datus, autiskā spektra traucējumu pacientiem **vērojams palielināts galvas apkārtmērs un lielāks svars**, salīdzinājumā ar standartpopulāciju
3. Atrasta **statistiski ticama asociācija ar autiskā spektra traucējumiem un SNP rs11212733 ($p = 0,024$)**, kurš lokalizēts 11q22.3 lokusā starp *DDX10* un *EXPH5* gēniem, kuri būtu iespējamie autiskā spektra traucējumu kandidātgēni



Secinājumi

4. Citohromgrupas (CYP) P450 grupas marķiera *CYP2D6* alēļu *CYP2D6*4* T, *CYP2D6*41* T biežums nav atšķirīgs autiskā spektra traucējumu pacientu un kontroles grupā.

Netika atrasta saistība autiskā spektra traucējumu medikamentozā terapijā lietotā otrās paaudzes antipsihotika risperidona blaknēm ar citohromgrupas (CYP) P450 marķiera *CYP2D6* alēlēm *CYP2D6*4* T, *CYP2D6*41* T, pētītie marķieri nav informatīvi



Secinājumi

5. Ģimenei ar Asperģera sindromu veikta pilna eksoma sekvenēšana, izmantojot autosomāli dominantās pārmantošanas tipa modeli, atlasīti potenciālo kandidātģenu varianti, no kuriem, pēc Sangerģ sekvenēšanas, izmantojot modelēšanas metodi, **identificēts patogēns *KCNH6* ģēna variants**, kurš varētu būt iespējamais autiskā spektra traucēģumu kandidātģens



Paldies!



BKUS
MĢPDK



BMC



Autisma centrs



Paldies par uzmanību!



Always
Unique
Totally
Interesting
Sometimes
Mysterious

