


**Karolinska
Institutet**

DNA sekvensning

Primär Immunbrist

Ren nyfikenhet eller?



Ola Winqvist
Professor, Överläkare

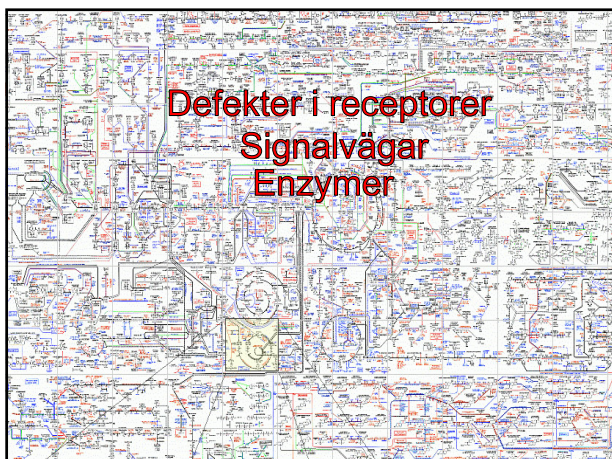

**Karolinska
Institutet**

Hela arvsmassan sekvensad 2002



MONOGENA SJUKDOMAR			
	1966	1986	2014
AUTOSOMALT DOMINANTA	837	2201	4056
AUTOSOMALT RECESSIVA	531	1420	4147
X-BUNDNA	119	286	680
	<u>1487</u>	<u>3907</u>	<u>9744</u>

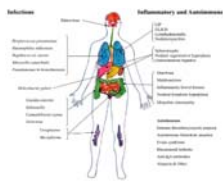
Primär Immunbrist: ca 300 kända idag



Tidiga, SCID



Alla åldrar
CVID



Gradvisa, progressiva



ADA

Identifiering av monogena sjukdomsgener

★ Kandidatgener: kunskap om proteindefekt (funktion)

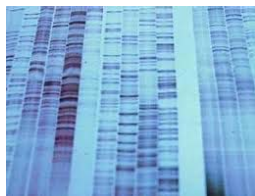
Kopplingsanalys: stora och/eller många familjer (position)

★ Massivt parallell DNA-sekvensning



Immunbrist sjukdomar: Kombination funktion av immunceller och genetik!

Kandidatgens sekvensning

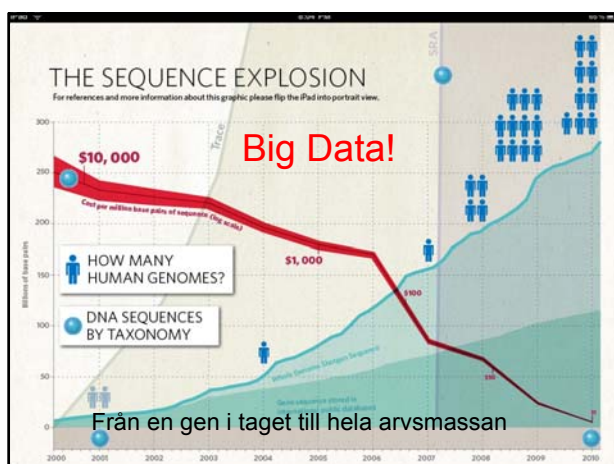


100 baspar/körning

2004:

Massivt Parallell DNA Sekvensanalys, MPS
Next Generation DNA Sequencing, NGS

Flera 100 miljarder baspar (100 Gbp) per analys!





THE NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

ORIGINAL ARTICLE

Transplantation Outcomes for Severe Combined Immunodeficiency, 2000–2009

Sung-Yun Pai, M.D., Brent R. Logan, Ph.D., Linda M. Griffith, M.D., Ph.D., Rebecca H. Buckley, M.D., Roberta E. Parrott, B.S., Christopher C. Dvorak, M.D., Neena Kapoor, M.D., Imelda C. Hanson, M.D., Alexandra H. Filipovich, M.D., Soma Jyonouchi, M.D., Kathleen E. Sullivan, M.D., Ph.D., Trudy N. Small, M.D., Lauri Burroughs, M.D., Suzanne Skoda-Smith, M.D., Ann E. Haight, M.D., Audrey Grizzle, M.P.H., Michael A. Pulsipher, M.D., Ka Wah Chan, M.D., Ramsay L. Fuleihan, M.D., Elie Haddad, M.D., Ph.D., Brett Loechele, M.D., Victor M. Aquino, M.D., Alfred Gillio, M.D., Jeffrey Davis, M.D., Alan Knutsen, M.D., Angela R. Smith, M.D., Theodore B. Moore, M.D., Marlis L. Schroeder, M.D., Frederick D. Goldman, M.D., James A. Connelly, M.D., Matthew H. Porteus, M.D., Ph.D., Qun Xiang, M.S., William T. Shearer, M.D., Ph.D., Thomas A. Fleisher, M.D., Donald B. Kohn, M.D., Jennifer M. Puck, M.D., Luigi D. Notarangelo, M.D., Morton J. Cowan, M.D., and Richard J. O'Reilly, M.D.

Därför




- **SCID**: 100%-ig mortalitet utan allogen stamcellstransplantation
- **HSCT** *ju förr desto bättre* i frånvaro av infektion
- Tx före 3,5 mån ålder utan infektion → 5-årsöverlevnad **94%**
- Tx efter 3,5 månaders ålder och med aktiv infektion → **50%**
- *Säkrare diagnostik möjliggör tidigare transplantation*

Därför

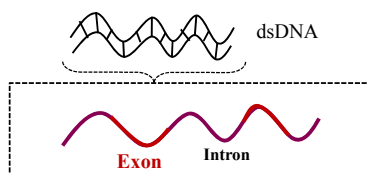
- Lågt antal T-celler kan ha andra orsaker
- Klinisk och cellulär bild ibland svårtolkad
- Vissa syndrom utvecklas progressivt
- Maternella T-celler kan dölja en SCID
- Vissa genetiska defekter medför strålningskänslighet → anpassning av konditionering inför transplantation
- Anlagstestning av familjemedlemmar



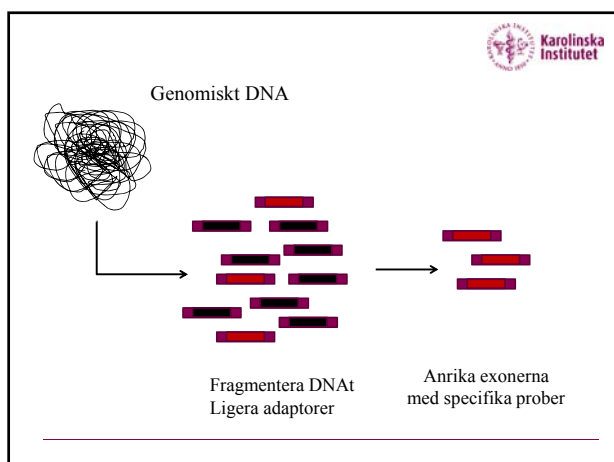
HUR?

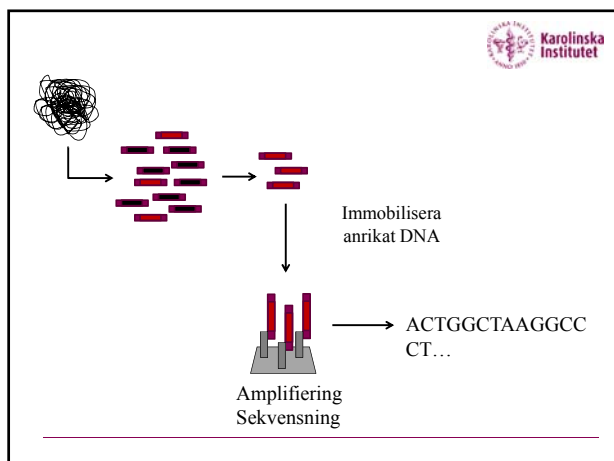


Exomsekvansning



c:a 180.000 **exon** (fördelade på 20.000 gener)
Proteinkodande regioner
<2% av det humana genomet





Klinisk exomsekvensning på SciLife

- Illumina HiSeq technology
 - Rapid run-mode = 120 Gb / körning tidsåtgång ≈ 27 timmar
 - 6-10 exom per körning
 - Täcker exoner och exon-introngränser
 - Sekvensdata jämförs med referensgenom för att identifiera "varianter"



Karolinska Institutet



SciLifeLab

Regeringen utlyser Strategiska Forskningsområden, SFO, 2009

Molecular Biosciences, Stockholm, ansökan 10 forskare, 3 universitet:

KTH: Mathias Uhlén, Hjalmar Brismar, Joakim Lundeberg
 KI: Anna Wedell, Juha Kere, Karl Tryggvason, Jussi Taipale
 SU: Gunnar von Heijne, Erik Sonnhammer, Britt-Marie Sjöberg

101 MSEK/år: Science for Life Laboratory etableras 2010

Fokus på tekniska plattformar



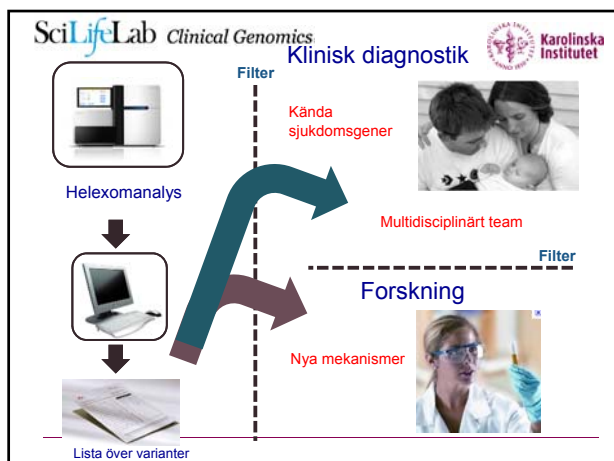




Klinisk helgenomsekvensering

Stora krav vad gäller:

- säkerhet
- kvalitet
- vilken information som efterfrågas
- snabb och säker medicinsk tolkning
- snabb omsättning i rätt vård





Klinisk helgenomsekvensering

Dramatisk klinisk nytta i utvalda patientgrupper!

Ett helt nytt landskap av monogena sjukdomar växer fram

Möjligheter att:

hitta och behandla patienter tidigt
kartlägga nya sjukdomsgrupper
studera sjukdomsmekanismer
utveckla nya behandlingar/läkemedel

upptäcka helt nya sjukdomar



≈20 000 gener sekvensas



Selekterad bioinformatisk analys av
300 gener kopplade till medfödd
immunbrist



Sekvensning vid misstanke om immunbrist

Sekvensning av 300 favoritgener

common gamma chain	ICOS
JAK3	TACI
ADA	CD19
RAG-1, RAG-2	Gp91
Artemis	Elastas 2
TLR-3	CD18
IRAK-4	C2
BTk	.
CD40	.
CD40L	.
NEMO	.
UNG	.

Analys i "SCOUT"



Analysjälpmedel som integrerar uppgifter om varje identifierad sekvensvariant:

- Tekniska data om körningen, kvalitetsmått
- Automatiserad mutationsanalys: "Rank score" bl.a. baserad på sekvensvariantens frekvens i referensgenom, typ av mutation (nonsense / missense / silent) och lokalisation (aminosyrans grad av konservering).
- Länkar till publika gen- och proteindatabaser, exv SwissProt, 1000G och OMIM.

Konfirmera fynd



- Litteratursökning: finns mutationen beskriven tidigare? Stämmer den med patientens fenotyp?
- Sangersekvensning för att konfirmera mutationen
- Validering : genuttryck (QT-PCR), cellulära analyser (exempelvis FASCIA, flödescytometri av lymfocyt-populationer, specialanalyser riktade mot den misstänkta defekten)

L.T. flicka född 2011



- 2½ år gammal flicka som *successivt* utvecklade en T-, B-, NK+ SCID
- Prov tas för genetisk diagnostik och skickas för exomsekvensning...

[illegible][illegible]

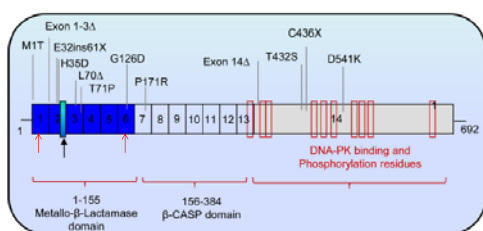
ARTEMIS (DCLRE1C) behövs för att tillverka T och B cells receptor

L.T. flicka född -2011



- Patientens DCLRE1C gener har två *missense* mutationer som ger upphov till aminosyraförändringar i Artemis-proteinet; en i exon 1 (D20H) och en annan i exon 6 (Q125P) – hon är en *compound heterozygote*
- Den ena mutationen återfinns hos flickans mamma och den andra hos pappan
- Mutationerna verifieras med Sangersekvensning
- Sangersekvensning av patientens lillasyster (f-2013)

Mutationer vid ARTEMIS-defekter



LT's mutationer: exon 1 (D20H) och i exon 6 (Q125P)

Undersökning av TCR Vβ repertoir



- Svag Vβ repertoir jmf kontroll och föräldrar
- Konfirmerar funktionell betydelse av compound heterozygot fyndet



A.Z. f-06

- Insjuknade vid 1½ års ålder i otit med feberkramp, därefter recidiverande otiter
- Tonsillektomerad vid 2 åå
- Debut av infektionsutlöst astma och eksem
- Upprepade pulmonella infektioner, ofta med *Moraxella C.* samt KNS).
- Dålig vikt- och längdtillväxt. Atelektaser.



A.Z. Lab

- Lågt IgA och IgG, normalt IgM, ...sedermera insatt på IVIg
- T-, B- och NK-celler i normalområdet
- Freiburg-panelen (FACS för B-cellssubpopulationer) visar mkt få switchade minnes B-celler
- Väsentligen normal granulocytfunktion
- Normal uppreglering av CD40L på T-celler efter aktivering (utförd vid Klinisk immunologi, Huddinge)
- Ingen mutation i AICDA påvisad (analys utförd av klinisk genetik i Umeå)



Prov skickat för WES...

Rank	Score	Chr	Gene	Transcript	CAZ	Gene association	Func. association
90	12.0	8	OK		0.0026	18.59	exonic
97	12.0	1	PRK322		0	13.53	splice
127	11.0	17	TAF11P110		0.0016	7.46	exonic
545	9.0	10	SL2NA		0.0004	4.201	exonic

Heterozygot Ala181Glu substitution i TACI

PID-listan (305 gener) filtrerad för exonic missense och splice site mutationer och på HPO-term HP:0004313 (Hypogammaglobulinemia)

Heterozygot Ala181Glu tillräckligt för att utveckla CVID



nature
genetics

Mutations in *TNFRSF13B* encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans

U Salzer¹, H M Chapel², A D B Webster³, Q Pan-Hammarström⁴, A Schmitt-Graeff⁵, M Schlesier¹, H H Peter¹, J K Rockstroh⁶, P Schneider⁷, A A Schäffer⁸, I Hammarström⁴ & B Grimbacher¹

The functional interaction of BAFF and APRIL with TNF receptor superfamily members BAFFR, TACI and BCMA is crucial for development and maintenance of humoral immunity in mice and humans. Using a candidate gene approach, we identified homozygous and heterozygous mutations in *TNFRSF13B*, encoding TACI, in 13 individuals with common variable immunodeficiency. Homozygosity with respect to mutations causing the amino acid substitutions S144Y and C164R abrogated APRIL binding and resulted in loss of TACI function, as evidenced by impaired proliferative response to IgM-APRIL co-stimulation and defective class switch recombination induced by IL-10 and APRIL or BAFF. Family members heterozygous with respect to the C164R mutation and individuals with sporadic common variable immunodeficiency who were heterozygous with respect to the amino acid substitutions A181E, S194Y and R202H had humoral immunodeficiency. Although signs of autoimmunity and lymphoproliferation are evident, the human phenotype differs from that of the *Tnfrsf13b*^{-/-} mouse model.

TACI

Transmembrane Activator

- Receptor för BAFF och APRIL som uttrycks på B-celler, med högst uttryck på CD27+ (minnes-) B-celler.
- Aa 181 sitter i den transmembranösa domänen av proteinet
- Ala181Glu heterozygoter har normalt uttryck av TACI, med normal ligand-bindande förmåga
- En musmodell med en ekvivalent mutation i mTACI (Ala144Glu) uppvisar försämrade NFκB-aktivering och ligand-inducerad receptor clustering (Lee et al. Blood. 2009;114:2254-2262).

TACI vid CVID

- Är muterad i 5-10% av patienter med CVID.
- Den exakta patogenetiska mekanismen är inte klarlagd
- Majoriteten av TACI-CVID-patienter är heterozygota för en mutation, men de CVID-associerade mutationerna återfinns i relativt hög 1-2% i en "frisk" befolkning
- Homozygoti eller compound heterozygoti för TACI-mutationer har dock bara rapporterats hos sjuka
- TACI-CVID har varierande svårighetsgrad, mutationsbärare kan vara alltifrån väsentligen besvärsfria till att ha svår infektionsproblematik
- I större CVID-kohorter har TACI-mutationer associerats med ökad risk för autoimmunitet och lymfoproliferation

Immunbrist vid defekt TLR-signalering



The image shows a fly on the left and a young child with blonde hair holding a teddy bear on the right. The background is a dark purple gradient.

Karolinska Institutet

1½ år gammal flicka



- Tidigare väsentligen frisk, föräldrarna från Bosnien.
- Patienten insjuknar akut med oklar mjukdelinfektion 29/9; misstanke på nekrotiserande fasciit; vid kirurgiskt ingrepp ses dock inte bild som överensstämmer med detta; vävnadsodling neg.



1½ år gammal flicka

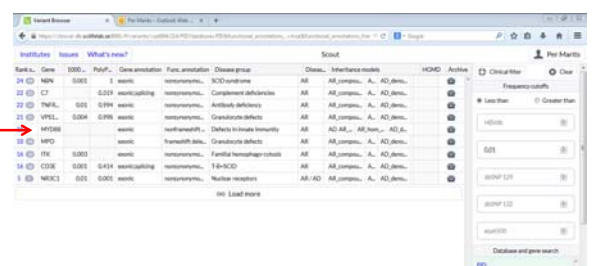


- Tidigare väsentligen frisk, föräldrarna från Bosnien.
- Patienten insjuknar akut med oklar mjukdelinfektion 29/9; misstanke på nekrotiserande fasciit; vid kirurgiskt ingrepp ses dock inte bild som överensstämmer med detta; vävnadsodling neg.
- Peroperativ blododling visar växt av *P. Aueruginosa*
- Utvecklar septisk bild med leversvikt; överförs till Astrid Lindgrens barnsjukhus för intensivvård
- Avlider efter 1 v

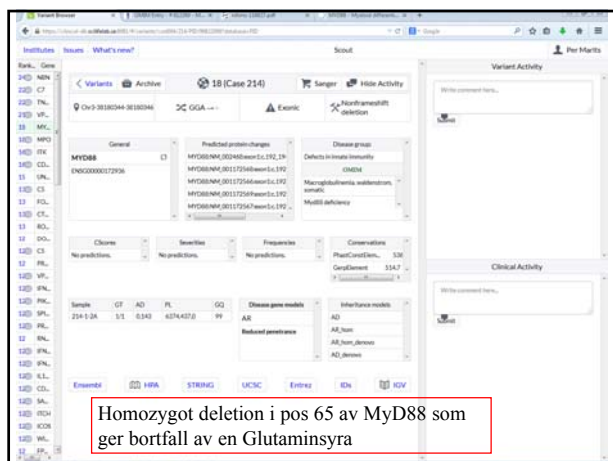
Immunologisk utredning

- Blodstatus: lätt lymphopeni ($1,8 - 2,8 \times 10^9 / L$), neutrofiler och monocyter i nedre delen av normalområdet.
- Ingen CRP-stegring (sent i förloppet eller uteblivet svar?)
- Normala – lätt förhöjda immunglobuliner (IgG, A och M)
- Granulocytfunktion (Phagoburst): Lätt sänkt svar på PMA (SI 5,8) inget svar på fMLP eller E.coli (SI 1,1)

Exomsekvansning



Rank	Gene	Chr	Pos	Ref	Alt	Func. annotation	Disease group	Class.	Interference models	HCMD	Archive
24	NRN	5	5001	T	GGC	missense	neuroanatomy	SCD syndrome	AR	AR, compo...	AR, AD, dem...
22	CD	1	5239	G	GGG	missense	neuroanatomy	Complement deficiency	AR	AR, compo...	AR, AD, dem...
22	FMF	10	5001	G	GGG	missense	neuroanatomy	Antibody deficiency	AR	AR, compo...	AR, AD, dem...
21	VPIL	5	5004	G	GGG	missense	neuroanatomy	Granulocyte defects	AR	AR, compo...	AR, AD, dem...
18	MYD88	2	5003	G	GGG	missense	neuroanatomy	Defects in innate immunity	AR	AR, AD, dem...	AR, AD, dem...
18	MYD	2	5003	G	GGG	missense	neuroanatomy	Granulocyte defects	AR	AR, compo...	AR, AD, dem...
14	FM	10	5003	G	GGG	missense	neuroanatomy	Familial hemophagocytosis	AR	AR, compo...	AR, AD, dem...
14	CD38	5	5001	G	GGG	missense	neuroanatomy	T-B-100	AR	AR, compo...	AR, AD, dem...
1	NRX1	5	5001	G	GGG	missense	neuroanatomy	Nuclear receptors	AR, AD	AR, compo...	AR, AD, dem...



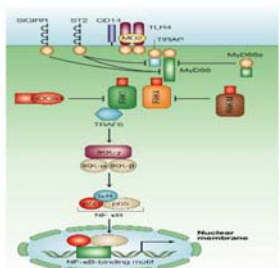
Rank	Gene	Chr	Pos	Ref	Alt	Func. annotation	Disease group	Class.	Interference models	HCMD	Archive
24	NRN	5	5001	T	GGC	missense	neuroanatomy	SCD syndrome	AR	AR, compo...	AR, AD, dem...
22	CD	1	5239	G	GGG	missense	neuroanatomy	Complement deficiency	AR	AR, compo...	AR, AD, dem...
22	FMF	10	5001	G	GGG	missense	neuroanatomy	Antibody deficiency	AR	AR, compo...	AR, AD, dem...
21	VPIL	5	5004	G	GGG	missense	neuroanatomy	Granulocyte defects	AR	AR, compo...	AR, AD, dem...
18	MYD88	2	5003	G	GGG	missense	neuroanatomy	Defects in innate immunity	AR	AR, AD, dem...	AR, AD, dem...
18	MYD	2	5003	G	GGG	missense	neuroanatomy	Granulocyte defects	AR	AR, compo...	AR, AD, dem...
14	FM	10	5003	G	GGG	missense	neuroanatomy	Familial hemophagocytosis	AR	AR, compo...	AR, AD, dem...
14	CD38	5	5001	G	GGG	missense	neuroanatomy	T-B-100	AR	AR, compo...	AR, AD, dem...
1	NRX1	5	5001	G	GGG	missense	neuroanatomy	Nuclear receptors	AR, AD	AR, compo...	AR, AD, dem...

Homozygot deletion i pos 65 av MyD88 som ger bortfall av en Glutaminsyra

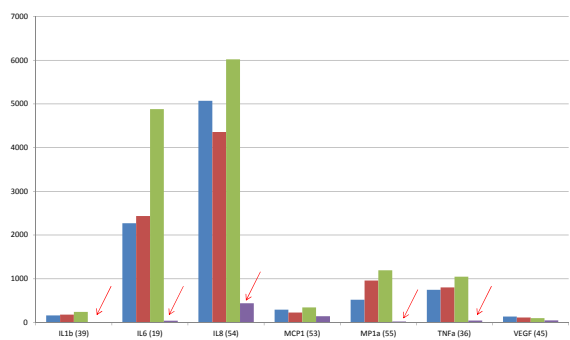
Relevans av Homozygot deletion i pos 65 av MyD88 ?



- Mutationen ligger i en domän som interagerar med IRAK-4
- Identisk klinisk bild vid di
- Hög förekomst av bakter hud, mestadels med *P. s*



Defekt Cytokinproduktion efter LPS-stimulering



Kompletterande utredning



- **Sangersekvensning** av föräldrar och syskon visar att båda föräldrarna samt patientens bror är heterozygota för varianten, medan system också är homozygot.
- **System** har också haft upprepade bakteriella infektioner och en del av hennes artrit har tydligen varit septiska



AS f -89

Her: Mor CVID

Svår tarmproblematik sedan barndomen

IBD liknande, ingen diagnos inkl. celiaki, IBD

Atypiska hudutslag

Ofta feberkänsla och Influensa liknande symptom
(ej verifierade)



Utredning

- T, B, NK normala
- Immunglobuliner vid nedre normalområdet
- Specifika Immunglobuliner ua
- Komplement ua
- Hb, SR, CRP, Diff, tot Eos ua

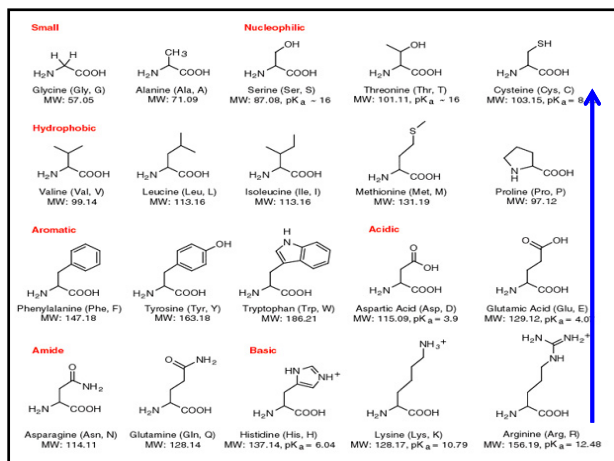
Olav Winquist

2015-09-03 50

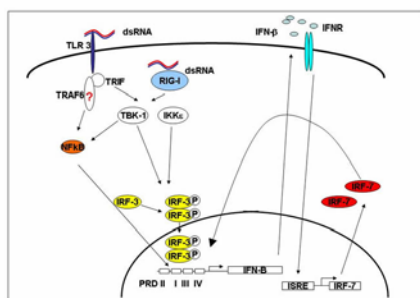


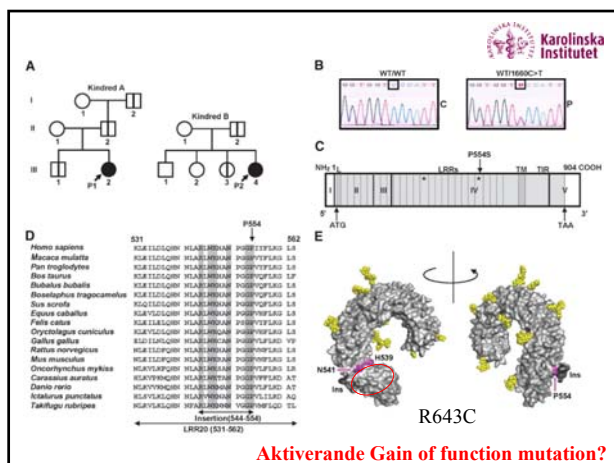
DNA sekvensning

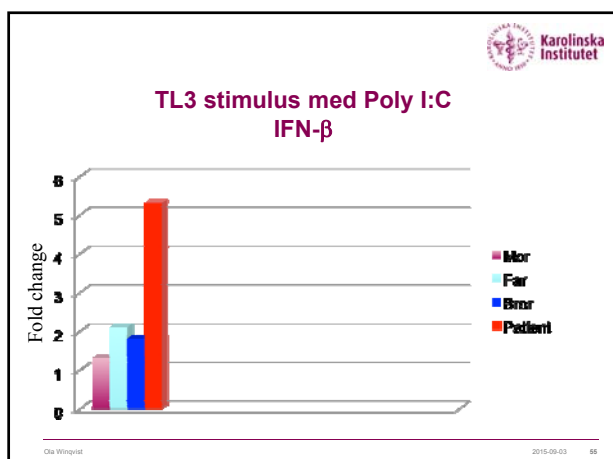
- Heterozygot polymorfism i TL3 R643C

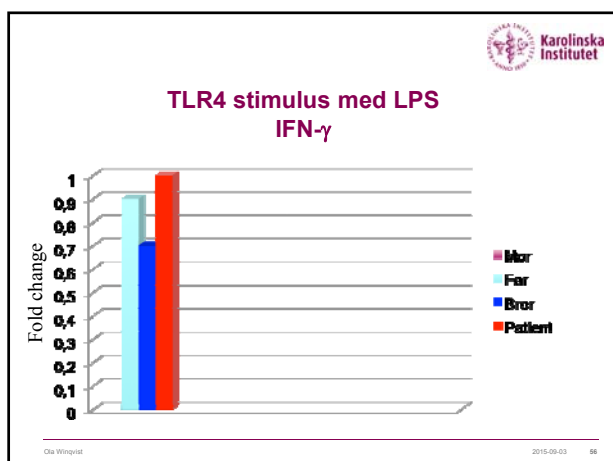


TL3

Herpes simplex encefalit
dsRNA







Karolinska
Institutet

TTC7A

- tetratricopeptide repeat domain 7A
- Kan orsaka tidig IBD
- Associerad med multipel intestinal atresi
- Ev. koppling med CVID
- Heterozygot
- Q724K
- Sitter i protein protein interaktionsdomän
- 9 introniska polymorfismer?? Heterozygota



Vet vi vad patienten lider av?

- Gain of function mutation i TL3 med IFN- β överproduktion vid infektioner med dsRNA virus
- TTC7A heterozygout bidragande till tarmproblem ev. koppling till CVID, kontakter med Freiburg



Hur många fall löser vi?

25 % av fallen löses direkt

25% suspekta Heterozygota polymorfismer eller Intron exon border polymorfismer

Endast 300 av 20 000 gener analyseras (1.5% av all gener)

Endast exon sekvens dvs 3 promille av genomet undersökt

Olav Winberg

2015-09-03 59



Hur blir vi bättre?

Inkluderar "grannar" enl Casanova

Hel genom sekvensning

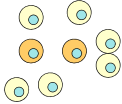
Funktionella analyser

Olav Winberg

2015-09-03 60

 Karolinska
Institutet

Immunbristutredning igår



Fenotypning
Funktionella analyser

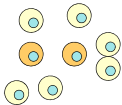
→ Val av kandidatgener
för sekvens

Ola Winquist 2015-09-03 61

 Karolinska
Institutet

Immunbristutredning imorgon

Fenotypning



→

Hel exom
Hel genom

↓

Sekvensning

↓

Funktionella riktade
analyser för att bekräfta diagnos

Ola Winquist 2015-09-03 62

Varför DNA sekvensning?



Tidig diagnos

Molekylär diagnos

Tidig behandling

Skräddarsydd behandling

Ola Winquist