

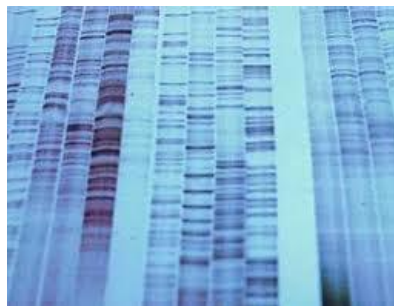
DNA sekvensning Primär Immunbrist

Genetik till varje pris?



Ola Winqvist
Professor, Överläkare

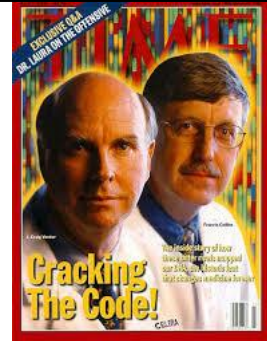
Kandidatgensekvensning



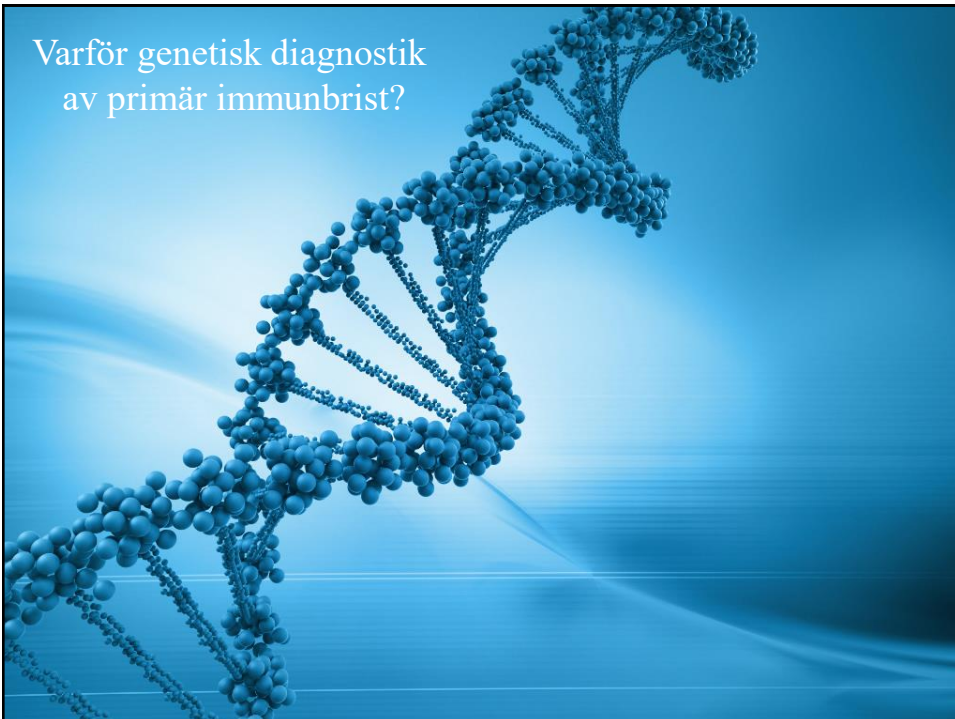
100 baspar/körning

Lite historia

- **1962:** Nobel priset till Watson och Crick för
– DNA molekylen.
- **2001:** The human genome project:
hela arvsmassan sekvenserad
- **2004:** Massivt Parallell Sequencing, MPS
Next Generation DNA Sequencing, NGS
"The sequence explosion"
Sekvensering av ett humant genom på 24 timmar!



Varför genetisk diagnostik
av primär immunbrist?



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

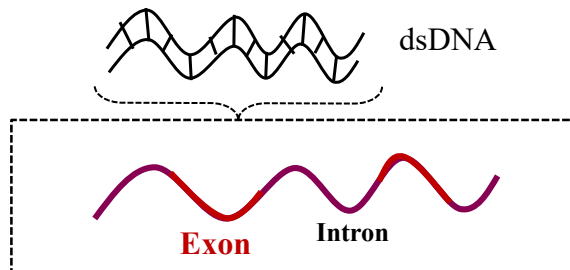


Klinisk exomsekvansning på SciLife

- Illumina HiSeq technology
 - Rapid run-mode = 120 Gb / körning tidsåtgång ≈ 27 timmar
 - 6-10 exom per körning
- Täcker exoner och exon-introngränser



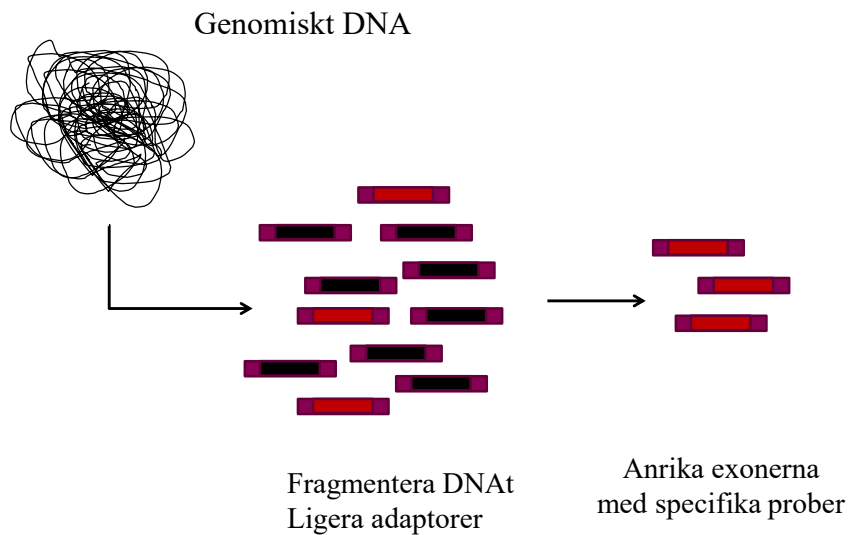
Exomsekvensning

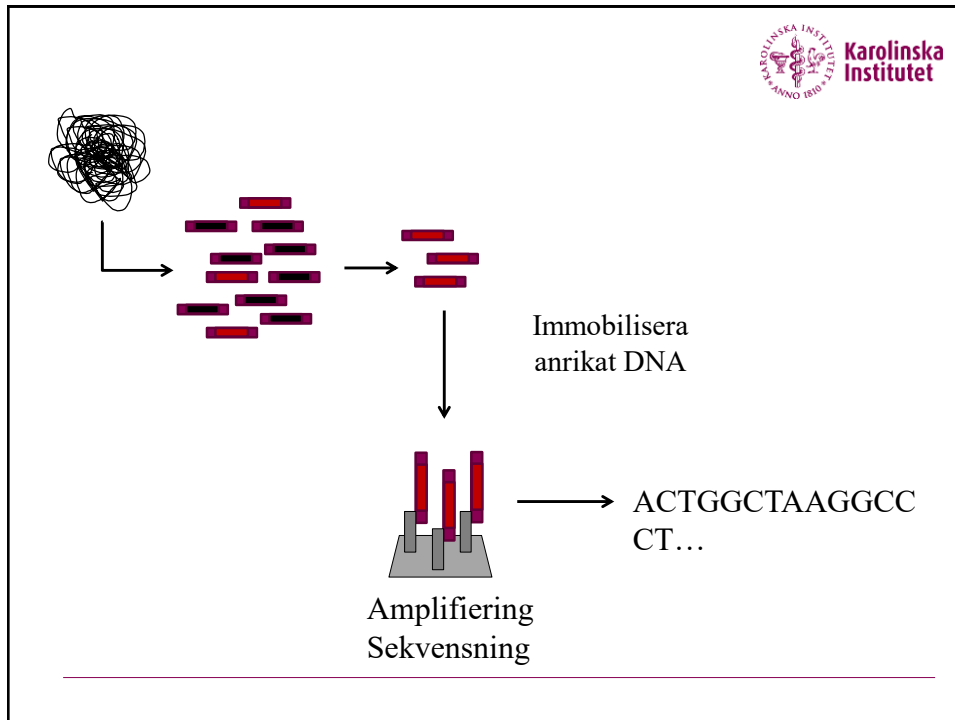


c:a 180.000 **exon** (fördelade på 20.000 gener)

Proteinkodande regioner

<2% av det humana genomet





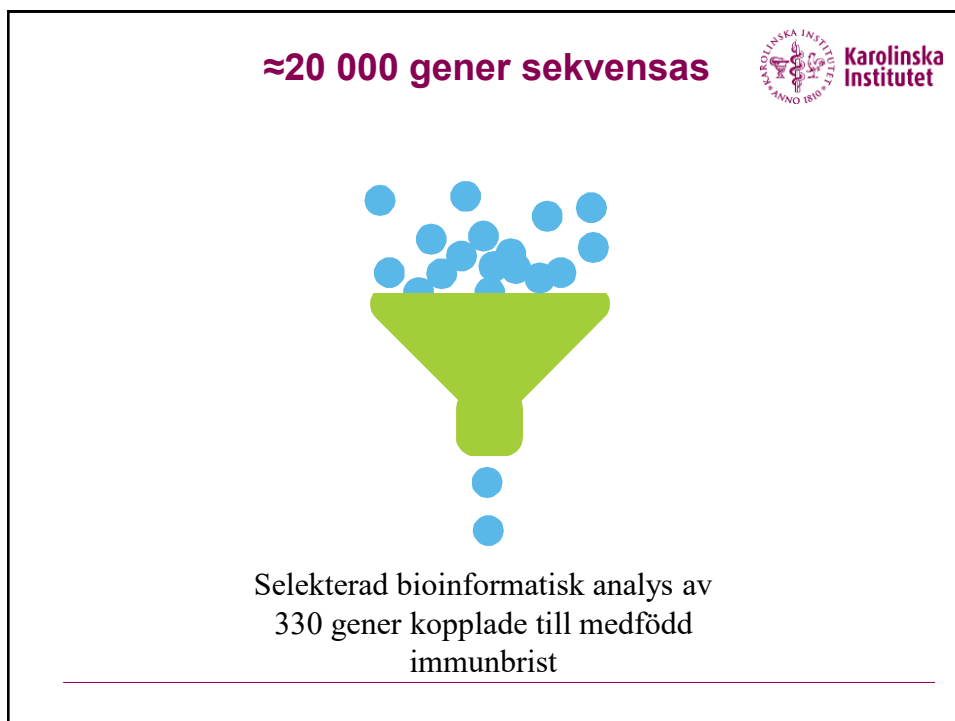
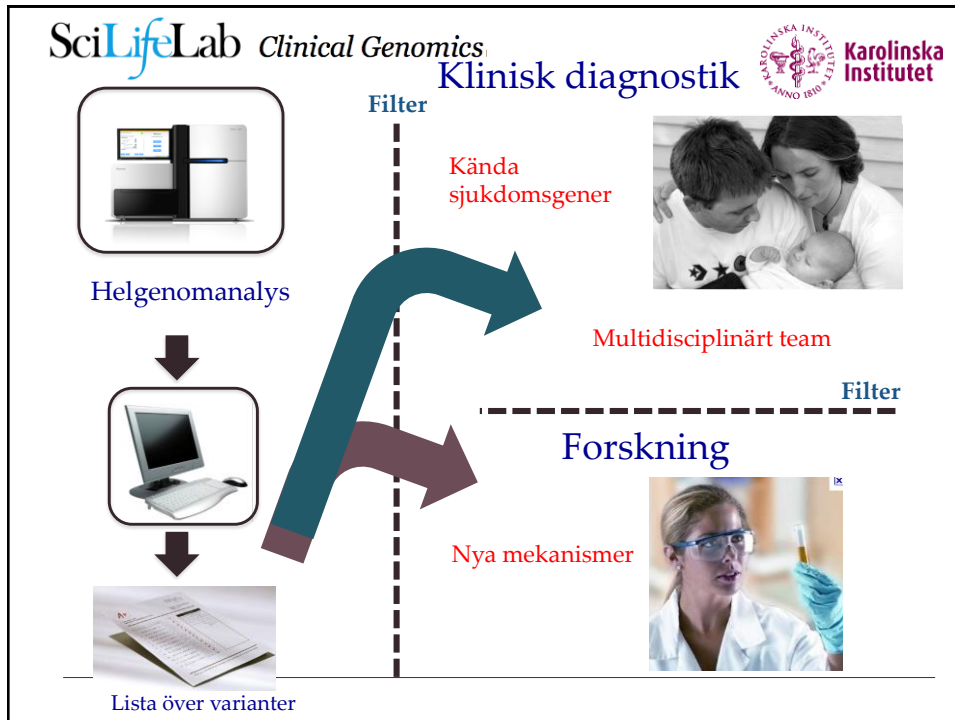
Klinisk helgenomsekvensering

Stora krav vad gäller:

- ✓säkerhet
- ✓Kvalitet
- ✓vilken information som efterfrågas
- ✓snabb och säker medicinsk tolkning

Sekvenseringen utförs av Clinical Genomics, SciLife Lab, Solna, som är SWEDAC ackrediterat enligt ISO/IEC 17025

Läkare på klinisk immunologi, Huddinge tolkar resultaten.



Sekvensning vid misstanke om immunbrist

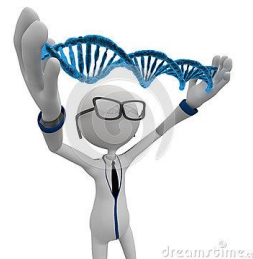
Sekvensning av 330 favoritgener

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

Analys i "SCOUT"

Analyshjälpmiddel som integrerar uppgifter om identifierade sekvensvarianter:

- Tekniska data om körningen, kvalitetsmått
- Automatiserad mutationsanalys: "Rank score" baserad på sekvensvariantens frekvens i referensgenom, typ av mutation (nonsense / missense / silent) och lokalisation (aminoasyrans grad av konservering)
- Länkar till publika gen- och proteindatabaser, exv SwissProt, 1000G och OMIM
- Sökning på **fenotyp** (HPO-termer) möjlig i senaste versionen



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)
-



Handläggning

- Prov på barnen och föräldrarna ankom till klinisk immunologi den **16:e juni**
 - Samtidigt påbörjas **HLA-typning** av barn och föräldrar
 - Prelsvar till kliniker avseende RAG1 den **23/6** (7 dagar)
 - Slutsvar efter konfirmerande sangersekvensering ges den **4/7** (18 dagar)
 - **Stamcellstransplantation** med modern som donator genomförs den **15/7**
-

Hur många fall löser vi?



25 % av fallen löses direkt

**25% suspekta Heterozygota polymorfismer
eller Intron exon border polymorfismer**

**Endast 330 av 20 000 gener analyseras
(1.5% av all gener)**

**Endast exon sekvens och introngränser
analyseras dvs 3 promille av genomet
undersökt**

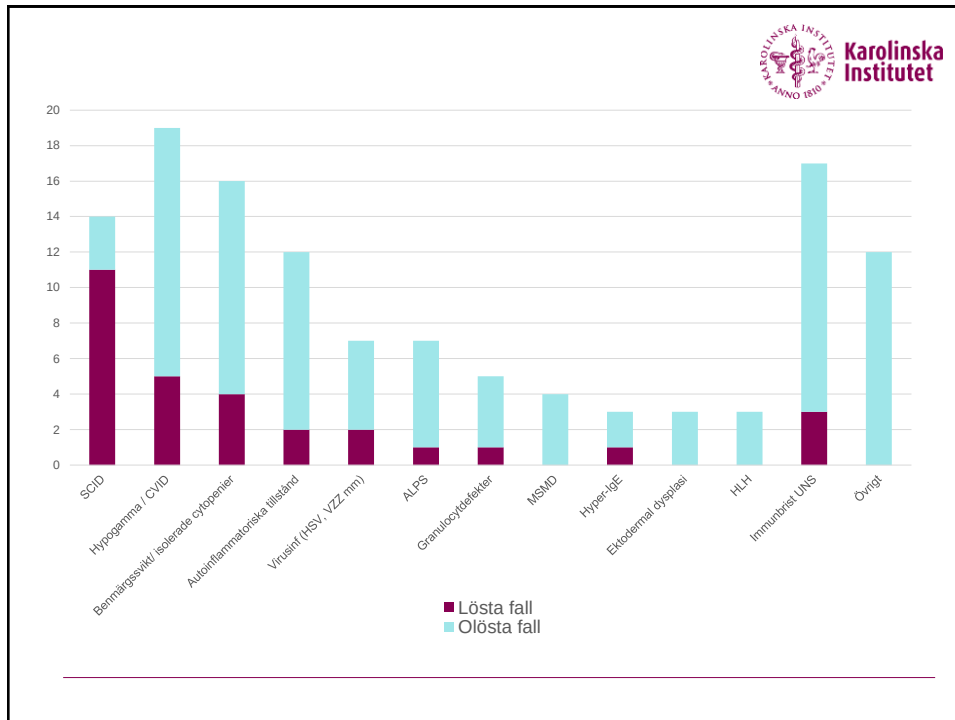
2017-09-21

19



Analyserade fall t.o.m. juni 2017

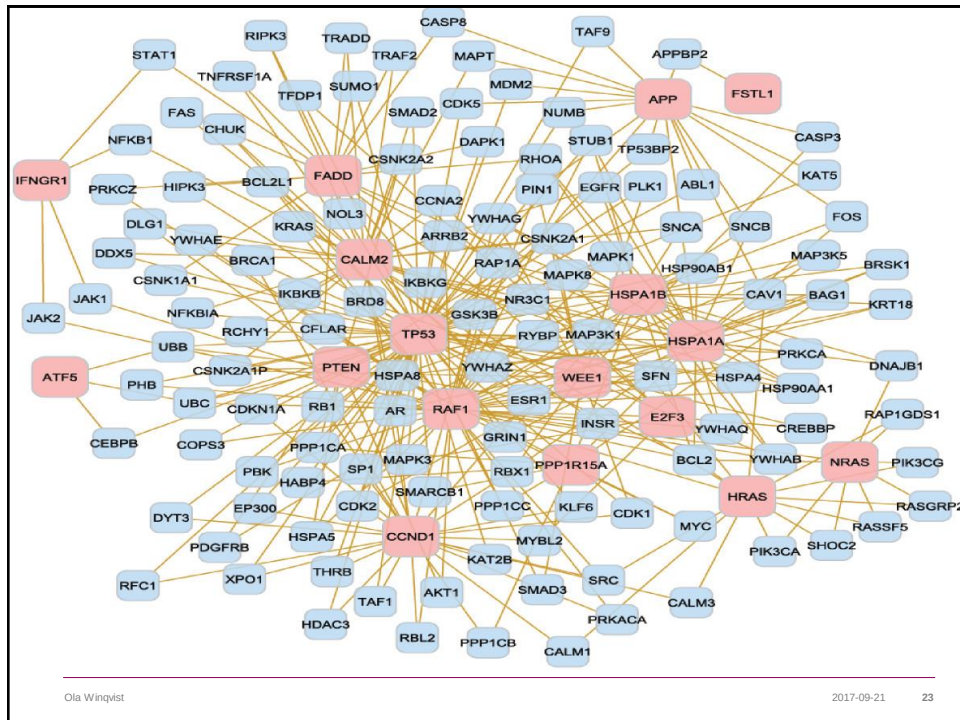
- 122 patienter (44 exom + 78 genom)
- 30 patienter med sjukdomsorsakande gen funnen (25%)
- 8 patienter med okonfirmerad kandidatgen (6,5%)
- 14 SCID-patienter varav 11 med verifierad genetisk diagnos (79%)



Hur blir vi bättre?



- Inkluderar "grannar" (PID-candidate genes)
 - Kompletterande lista med 3000 gener (Casanova et al)



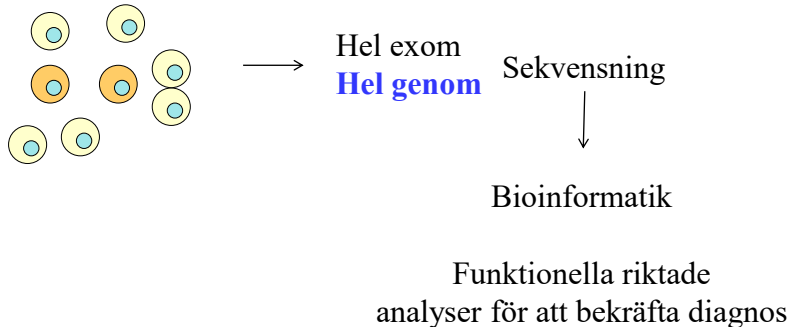
Hur blir vi bättre?



- Inkluderar "grannar" (PID-candidate genes)
 - Kompletterande lista med 3000 gener (Casanova et al)
 - Förutsätter nästan familjemedlemmar
 - Ändå mycket svårt att hitta dominanta mutationer
- Hel *genom* sekvensning
 - Högre sekvenskvalitet; bättre horisontell täckning
 - Möjligt att hitta intronvarianter
 - Nackdelar i kostnad; tidsåtgång samt datamängd
- Komplettering med CGH / annan strukturell analys
- Bättre funktionella analyser på protein- och cellnivå

Immunbristutredning imorgon

Selekterade patientfall
Fenotypning



Ola Winqvist

2017-09-21

25

Vad behöver vi?

ANAMNES (beskriv kortfattat på vilket sätt patientens immunförsvar är dåligt, ange infektioner och patogener om sådana odlats fram; beskriv också eventuella andra avvikande statusfynd):

HEREDITET (beskriv nedärvningsmönstret i detalj)

LÄKEMEDEL (pågående och avslutade samt upplevd effekt av dessa, ange gärna dos och tid):

IMMUNGLOBULINER

CELLPOPULATIONER LPK, TRC, T/B/NK etc

Komplement

ÖVRIGT (övrig information av intresse, t.ex. tidigare genetisk utredning, funktionella tester gjorda):

Ola Winqvist

2017-09-21

26

Vad behöver vi?

- 5 ml EDTA blod från patienten och *gärna* från hens föräldrar

Skickas till:

Klinisk Immunologi F79

Karolinska

Universitetssjukhuset,

Huddinge, ^{F-1}_{SEP} 141 86 Stockholm



DNA sekvensning till varje pris?

Tidig diagnos

Molekylär diagnos

Tidig behandling

Skräddarsydd behandling

Ola Winquist

2017-09-21 13:39