

8. Međunarodni naučni skup

Specijalna edukacija
i rehabilitacija

DANAS

ZBORNIK RADOVA
PROCEEDINGS

8th International Scientific
Conference - Special education
and rehabilitation today

BEOGRAD 2014.

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET ZA SPECIJALNU EDUKACIJU I REHABILITACIJU
UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF SPECIAL EDUCATION AND REHABILITATION

VIII međunarodni naučni skup
**SPECIJALNA EDUKACIJA I
REHABILITACIJA DANAS**

Beograd, 07–09. novembar 2014.

Zbornik radova

The Eight International Scientific Conference
**SPECIAL EDUCATION AND
REHABILITATION TODAY**

Belgrade, November, 07-09, 2014

Proceedings

Beograd, 2014.
Belgrade, 2014

SPECIJALNA EDUKACIJA I REHABILITACIJA DANAS
Zbornik radova
SPECIAL EDUCATION AND REHABILITATION TODAY
Proceedings

VIII međunarodni naučni skup
Beograd, 7-9. 11. 2014.
The Eighth International Scientific Conference
Belgrade, 07-09. 11. 2014.

Izdavač / Publisher:
Univerzitet u Beogradu – Fakultet za specijalnu edukaciju i rehabilitaciju
University of Belgrade – Faculty of Special Education and Rehabilitation
11000 Beograd, Visokog Stevana 2
www.fasper.bg.ac.rs

Za izdavača / For Publisher:
prof. dr Jasmina Kovačević, dekan

Glavni i odgovorni urednik / Editor-in-chief:
prof. dr Mile Vuković

Urednici / Editors:
prof. dr Jasmina Kovačević
prof. dr Dragana Maćešić-Petrović

Kompjuterska obrada teksta - Computer word processing:
Biljana Krasić

Zbornik radova Proceedings će biti publikovan
u elektronskom obliku CD.
Proceedings will be published in electronic format CD.

Tiraž / Circulation: 200

ISBN 978-86-6203-061-0

PRIMENA NOVE GENERACIJE METODA ZA SEKVENCIRANJE DNK (NEXT GENERATION SEQUENCING) U RANOJ DIJAGNOSTICI NASLEDNIH POREMEĆAJA

Ivana Novaković^{*2}, Jasmina Maksić¹

¹Univerzitet u Beogradu – Fakultet za specijalnu edukaciju i rehabilitaciju

²Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

U cilju rane dijagnostike i prevencije naslednih poremećaja, proteklih decenija su na raspolaganju bile različite metode. Analize genetičkog materijala su se kretale od klasične citogenetičke obrade kariotipa radi uočavanja numeričkih i strukturnih aberacija hromozoma, do najfinijih ispitivanja za detektuju genskih mutacija na molekularnom nivou. Poslednjih godina razvijaju se potpuno nove metode za brzu, efikasnu i dostupnu analizu naslednog materijala, koje su poznate kao “next generation sequencing” (NGS) ili nova generacija metoda za sekvenciranje DNK. Ove metode omogućavaju ispitivanje ne samo pojedinačnih gena ili delova gena nego i većeg broja segmenata, sve do kompletne nasledne osnove tj. čitavog genoma čoveka. Primena ovakvog pristupa dovodi do prave tihe revolucije u medicinskoj genetici i disciplinama sa kojima ona saraduje, nagoveštavajući promenu u konceptu dijagnostike naslednih poremećaja. U prenatalnoj dijagnostici NGS je već našla primenu u potpuno neinvazivnoj detekciji najčešćih hromozomskih aberacija (Daunov, Edvardsov, Patau sindrom, aberacije polnih hromozoma) analizom fetalnih ćelija prisutnih u krvi majke. Test NIFTY već je dostupan i trudnicama u našoj sredini. U postnatalnom periodu NGS se koristi za ispitivanje odabranih panela gena, ili, po potrebi, čitavog genoma/egzoma, sve sa ciljem što efikasnije dijagnostike pre svega monogenetskih, ali i oligogenetskih i poligenetskih bolesti.

Predlaže se čak da analiza kompletnog genoma postane deo neonatalnog skrininga, ali za sada to nije prihvaćeno. Nesumnjivo je da rezultati NGS donose veliki napredak medicinsko – genetičkoj praksi, ali i rađaju nove etičke dileme u oblasti rane detekcije naslednih poremećaja i intervencije kod ovih stanja.

Ključne reči: nasledni poremećaji, dijagnostika i intervencija, nove metode

UVOD

Poslednje decenije obeležene su burnim razvojem molekularne genetike, i njenom primenom u svim biomedicinskim i srodnim disciplinama. Osamdesetih godina prošlog veka identifikovani su prvi geni odgovorni za monogenetske bolesti čoveka

* novivana@eunet.rs

(cistična fibroza, Dišenova mišićna distrofija) i razvijena je metoda PCR (lančana reakcija polimerizacije DNK), kao i automatsko sekvenciranje metodom po Sangeru. To je bio uvod u devedese godine, koje su obeležene realizacijom Projekta genoma čoveka, kao do sada najvećeg internacionalnog naučnog projekta. Sa početkom novog milenijuma objavljena je prvokompletna verzija humanog genoma, i dobijni podaci su potom povezani sa brojnim fiziološkim karakteristikama i patološkim stanjima kod čoveka. Danas znamo za više od 4000 gena koji su odgovorni za pojedine monogenske poremećaje (poremećajuslovljeni mutacijom u jednom genu), a za većinu od njih postoje razvijeni testovi za prenatalnu ili postnatalnu dijagnostiku. U oblasti poligenskih tj. multifaktorskih poremećaja, koji nastaju u sadejstvu nasledne osnove i spoljašnjih činilaca, intenzivno se proučavaju genetički markeri podložnosti, sa idejom rane identifikacije rizika i prevencije poremećaja. Narastajuća znanja iziskujui nove metode za analizu naslednog materijala. Osnovni zahtev je da te metode budu tehnički i ekonomski dostupne što širem krugu zainteresovanih, a da sa druge strane obezbede integrativno sagledavanje velikog broja gena i njihovih međusobnih interakcija (Novaković et al., 2013).

Upravo na toj ideji započeo je razvoj nove generacije metoda za sekvenciranje DNK, poznatih kao "next generation sequencing" (NGS). Generalno, sekvenciranjem se određuje primarna struktura tj. tačan redosled nukleotida u molekulu DNK. Gotovo četiri decenije koristi se pomenuta metoda sekvenciranja po Sangeru, koja se odlikuje izvarednom preciznošću, ali se može primeniti na segmene DNK realativno male dužine (ispod 1000bp). To je čini pogodnom za analizu pojedinačnih gena ili delova gena, ali ne i većih celina nasledne osnove. Imajući u vidu da je veličina humanog genoma tri milijarde baznih parova, njegovo sekvenciranje za pojedinu osobu bi potrajalo mesecima. Nove metode se zasnivaju na ideji o paralelnom sekvenciranju velikog broja segmenata DNK (masovno paralelno sekvenciranje) i potom bioinformatičkom povezivanju dobijenih podataka. NGS ne bi bo moguć bez izuzetno razvijene tehničke i informtičke podrške. Upravo se obilje generisanih informacija pokazalo kao jedno od glavnih potencijalnih „uskih grla“ ali i izazova ove metodologije (Schuster, 2008). Tokom proteklih nekoliko godina više kompanija je ponudilo platforme za NGS, koje se zasnivaju na različitim idejama i biohemijskim principima. Neki od aparata koji su trenutnoaktuelni su Ion Torrent (Life sci. Technology), HiSeqi MiSeq (Illumina), ali je tržište izuzetno dinamično i živo. Napomenućemo da su među pionirima NGS pristupa eminentni i svetski priznati molekularni biolozi R. Drmanac i R. Crkvenjakov, obojica potekli sa Beogradskog univerziteta.

Principi primene NGS metodologije u medicinskoj genetici

Korak po korak došlo se do granice snova, da je moguće sekvenciranje jednog humanog genoma uraditi za par dana, po ceni nižoj od 5000 evra. U međuvremenu razvili su se različiti pravci primene NGS. Pored analize čitavog genoma, predla-

že se i analiza samo protein-kodirajućih regiona, tj. egzoma. Budući da egzom čini svega 1% naše nasledne osnove, ovakav pristup se čini racionalnim i opravdanim u mnogim slučajevima (Rabbani et al., 2014). Razvijene su i baterije za istovremeno sekvenciranje određenog seta gena – tzv. genski paneli. Paneli mogu da budu koncipirani šire ili uže, prema problematici tj. prema difrencijalno dijagnostičkim opcijama. Poslednjih meseci afirmisao se panel koji sadrži 4813 gena, tj. sve gene koji su sada direktno povezani sa određenim kliničkim feotipovima („klinički egzom“).

NGS i monogeniski poremećaji

Metodologija NGS omogućava analizu gena za koje se već zna da su odgovorni za pojedine monogeniske bolesti, ali i identifikaciju novih odgovornih gena i njihovih mutacija. Za svaku promenu detekovanu NGS metodom neophodna je potvrda klasičnim sekvenciranjem po Sangeru, ali je procenat lažno pozitivnih nalaza izuzetno nizak. Jedan od dobrih primera primene NGS su poremećaji sluha, koji su u 50-60% slučajeva genetički uslovljeni. Kod nesindromske gluvoće nasleđivanje je uglavnom autozomno recesivno (80% porodica), i mada mutacije načešće pogađaju gene za koneksin 26 i koneksin 30, poznato je više od 60 odgovornih gena. Sindromska gluvoća postoji u okviru više od 400 sindroma, od kojih je najčešći Penderton sindrom. Objavljen je veći broj radova sa rezultatima sekvenciranja čitavog egzoma u porodica sa gluvoćom, i do sada je ovom metodom identifikovano više od 15 novih gena kako za sindromske tako i za nesindromske slučajeve (Rabbani et al., 2014). U jednom istraživanju su analizirani egzomi 20 porodica sa autozomno recesivnom gluvoćom koje su bile negativne na koneksin 26 mutacije. Kod 12 porodica nađeno je 12 retkih homozigotnih mutacija u drugim genima, što je potvrdilo opravdanost ovog pristupa (Diaz-Horta et al., 2012). Oblast mentalne retardacije je takođe veliko polje za primenu NGS. Pored detekcije mutacija u već poznatim genima i kod sindromskih i kod nesindromskih formi, sekvenciranje celog egzoma je dovelo do identifikacije oko 25 novih odgovornih gena (Rabbani et al., 2014).

Navešćemo i sopstveno iskustvo u analizi čitavog genoma kod porodice iz Srbije sa idiopatskom kalcifikacijom bazalnih ganglija (IKBG, Farov sindrom). Zahvaljujući međunarodnoj saradnji, kod naše porodice i kod još 5 porodica iz različitih regiona sveta otkrivene su mutacije u genu za trombocitni faktor rasta (PDGFB), koji do tada nije povezan sa IKBG. Funkcionalne analize genske ekspresije su potvrdile ulogu PDGFB u patogenezi bolesti (Keller et al, 2013).

NGS i hromozomske aberacije

Na izgled neočekivano, NGS metodologija je našla primenu i u detekciji hromozomskih aberacija. Već je postala realnost prenatalna detekcija hromozomskih aberacija analizom fetalnih ćelija koje su prisutne u krvi majke. Metoda NGS omogućava otkrivanje najčešćih hromozomskih aberacija (trizomija 21, 18 i 13, aneuploidije

polnih hromozoma) ovom potpuno neinvazivnom metodom. Komercijalnim testovi kao što je NIFTY dostupni su trudnicama i u našoj sredini, sa napomenom da se sama analiza vrši u inostranim centrima. Rezultat se dobija u roku od 10-ak dana, a analize se (za sada) u našoj zemlji plaćaju. Objavljena su iskustva preko 900 prenatalnih dijagnostika koje su urađene paralelno NIFTY testom i klasičnom kariotipizacijom nakon amniocenteze (Jiang et al., 2012). Za trizomije autozoma senzitivnost NIFTY testa je bila 100% a specifičnost 99,9%, a za aneuploidije polnih hromozoma senzitivnost je iznosila 85,7% a specifičnost 99,9%. U detekciji trizomije hromozoma 21 i 13 postignuto je apsolutno poklapanje NIFTY i standardne metode, dok su nađeni pojedinačni lažno pozitivni nalazi trizomije 18 i lažno negativne monozomije X hromozoma. U svakom slučaju, pozitivan nalaz NIFTY testa mora da se potvrdi klasičnom analizom kariotipa. Takođe, napominjemo da NIFTY nije u potpunosti pouzdan kod višeplođnih trudnoća.

ZAKLJUČAK

Nesumnjivo je da rezultati NGS donose veliki napredak medicinsko – genetičkoj praksi, ali i rađaju nove etičke dileme u oblasti rane detekcije naslednih poremećaja i intervencije kod ovih stanja. Predlaže se čak da analiza kompletnog genoma postane deo neonatalnog skrininga, ali za sada to nije prihvaćeno.

LITERATURA

- Diaz-Horta O, Duman Foster J, Sirmaci A, Gonzalez M, Mahdih N et al. (2012): Whole-exome sequencing efficiently detects rare mutations in autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *PlosOne*, 7:e50628.
- Jiang, F., Ren, J., Cheng, F., Zhou, Y., Xsie, J., Dan, S. et al. (2012). Noninvasive Fetal Trisomy (NIFTY) test: an advanced noninvasive prenatal diagnosis methodology for fetal autosomal and sex chromosomal aneuploidies. *MBC Medical Genomics*, 5, 57-67.
- Keller, A., Westenberger, A., Sobrido, MJ., García-Murias, M., Domingo, AR., Sears, RL. et al. (2013). Mutations in the gene encoding PDGF-B cause brain calcifications in humans and mice. *Nature Genetics*, 45, 1077-1082.
- Novakovic, I., Maksimovic, N., Pavlovc, A., Zarkovic, M., Rovcanin, B., Mirkovic, D. i sar. (2014). An introduction to molecular genetic diagnostics. *Journal of Medical Biochemistry*, 33, 3-7.
- Rabbani, B., Tekin, M., Mahdich, N. (2014). The promise of whole genome sequencing in medical genetics. *Journal of Humna Genetics*, 59, 5-15.
- Schuster, S. (2008). Next generation sequencing transforms today's biology. *Nature Methods*, 5, 16-18.

IMPLEMENTATION OF THE NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS) METHODS IN EARLY DIAGNOSIS OF HERITABLE DISEASES

Summary

In order to early diagnostics and prevention of hereditary disorders, past decades have been brought different methods. Analysis of genetic material ranged from classical cytogenetic karyotype analysis for processing numerical and structural chromosomal aberrations, by most sophisticated examination of minor gene mutation on molecular level. In recent years develop completely new methods for rapid, efficient and publicly available analysis of inheritance material, that are known as the “next” generation sequencing” (NGS). These methods allow for examination not only individual genes or parts of genes but also a larger number of segments, all up to complete inherited basis i.e. the entire human genome research. Implementation of this approach leads to genuine silent revolution in medical genetics and disciplines with which it cooperate, suggesting a change in the concept of hereditary disorders diagnosing. In prenatal diagnostics NGS has already found application in completely noninvasive detection of chromosomal aberrations (Down, Edwards, Patau syndrome, sex chromosomes aberration) by analysis of fetal cells present in mother’s blood. Such tests (i.e. NIPT) are already available and for pregnant women in our country. In postnatal period NGS is used for the examination of selected genes by gene panels, or, if necessary, the entire genome/exome research, all with the aim as efficient diagnostics primarily monogenic, but oligogenic and polygenic diseases also. It is proposed that the analysis of even complete genome become part of neonatal screening, but for now it is not accepted yet. It is undeniable that the results of NGS make a great progress in medical – genetic practice, but gained new ethical dilemmas in the field of early detection of hereditary disorders and intervention in these situations.

Key words: hereditary disorders, diagnosis and intervention, new methods