

- 版权声明 本网受著作权人委托，在此严正声明：披露演讲内容目的在于传递交流学术思想，并不代表本网赞同其观点和对其真实性负责。未经本网授权，禁止任何媒体、网站或个人在未经 本网书面授权的情况下违法转载、摘编、翻录或其它形式使用 本网公开披露的演讲内容。违反上述声明者，本网将追究 其相关法律责任。刊播后如有作品内容、版权和其它问题请 联系010-68479567。

基因组时代对儿童内分泌疾病的 临床实用进展和复杂遗传咨询

张巍博士 FACMG

2018-11-30

全国《儿科遗传代谢内分泌疾病诊疗新进展》学习班暨高峰论坛

“前” 基因组时代的技术革新推动临床进步

➤ Human Genome Project in 2003

➤ 人类基因组测序 *Nature* 2004; 431 (7011): 931-945.

➤ Phase I HapMap project in 2005

➤ 人类基因组单倍型, *Nature* 2005: 437(7063):1299-1320

➤ Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) project in 2007

➤ 人类基因组的1%的功能区, *Nature* 2007; 447(7146):799-816

➤ 1000 Genomes Project in 2008

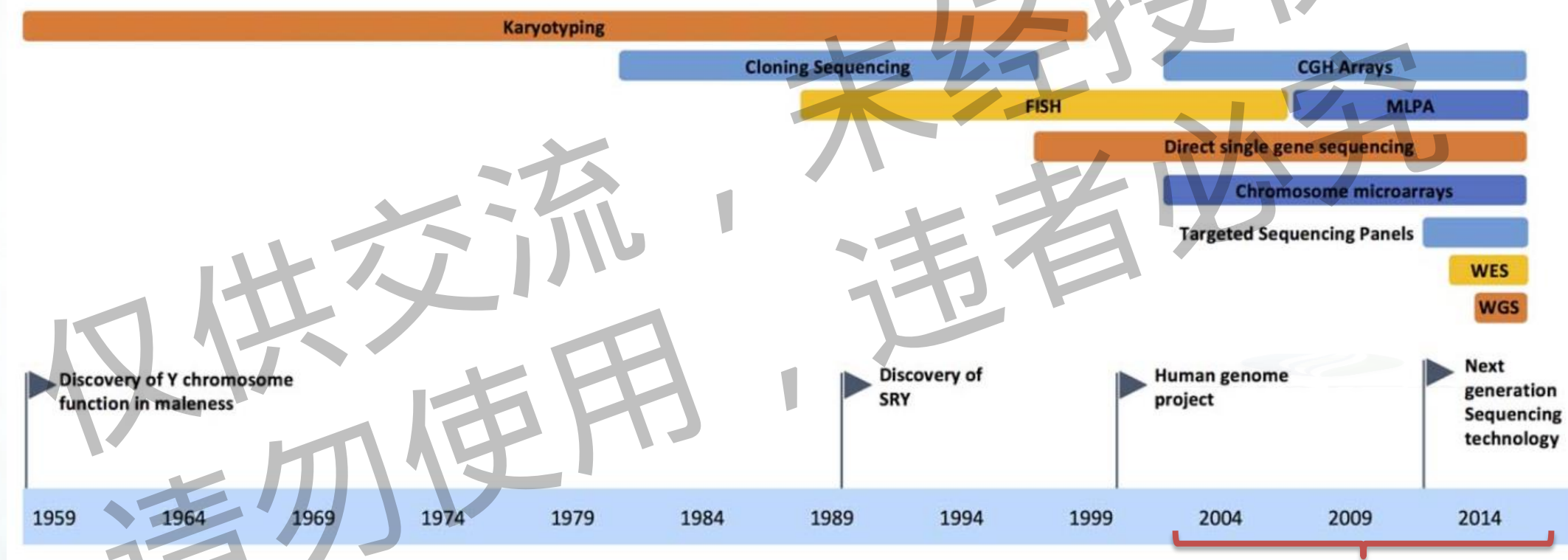
➤ 千人基因组, *Science* 2008; 319(5863):395

➤ Whole Exome Sequencing for clinical diagnosis in 2013

➤ 贝勒医学院的临床全外显的临床诊断应用, *N Engl J Med.* 2013 369(16):1502-11



“前” 基因组时代的技术革新推动临床进步

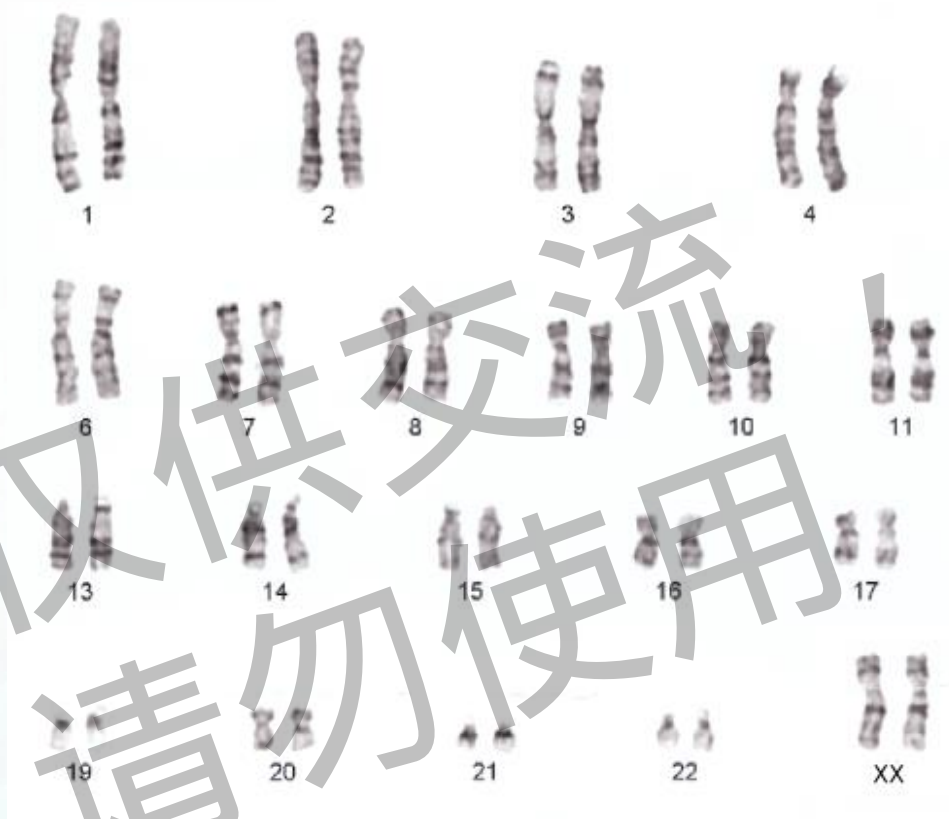


BIRTH DEFECTS RESEARCH (PART C) 108:337–350 (2016)



通过个性化的诊断和咨询实现精准医学

儿童内分泌疾病的遗传病因学



- 人类基因组
 - 30亿个碱基对
 - 2万个基因



儿童内分泌疾病的遗传病因学



外显子

内含子

可以解读的基因编码区

- 对于编码区有研究充分
- 对于内含子研究还欠缺

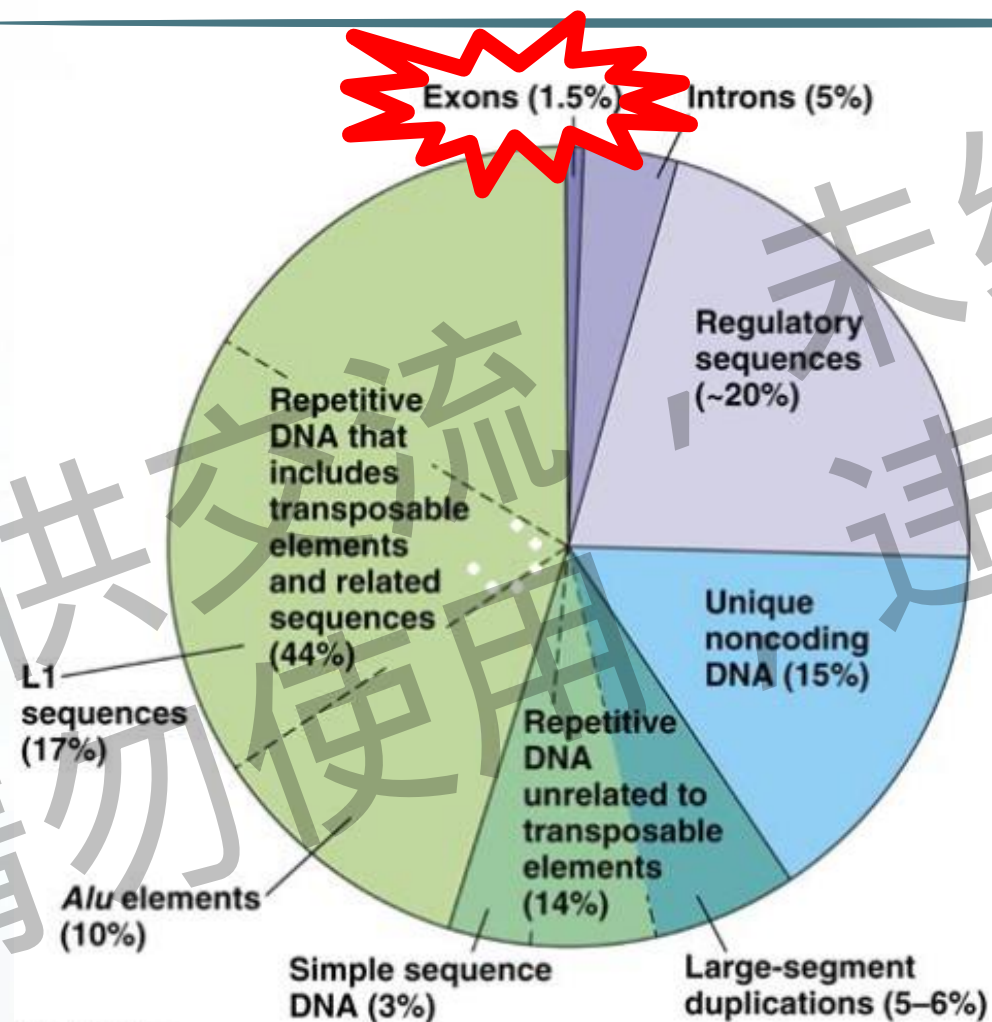


外显子

内含子



儿童内分泌疾病的遗传病因学



➤ 2万个基因编码区占基因组1.5%

© 2011 Pearson Education, Inc.



通过个性化的诊断和咨询实现精准医学

儿童内分泌疾病的遗传病因学

OMIM Gene Map Statistics

OMIM Morbid Map Scorecard (Updated November 27th, 2018) :

Total number of phenotypes* for which the molecular basis is known	6,306
Total number of genes with phenotype-causing mutation	4,001
* Phenotypes include (1) single-gene mendelian disorders and traits; (2) susceptibilities to cancer and complex disease (e.g., BRCA1 and familial breast-ovarian cancer susceptibility, 113705.0001 , and CFH and macular degeneration, 134370.0008); (3) variations that lead to abnormal but benign laboratory test values ("nondiseases") and blood groups (e.g., lactate dehydrogenase B deficiency, 150100.0001 and ABO blood group system, 110300.0001); and (4) select somatic cell genetic disease (e.g., GNAS and McCune-Albright syndrome, 139320.0008 and IDH1 and glioblastoma multiforme, 147700.0001 .)	

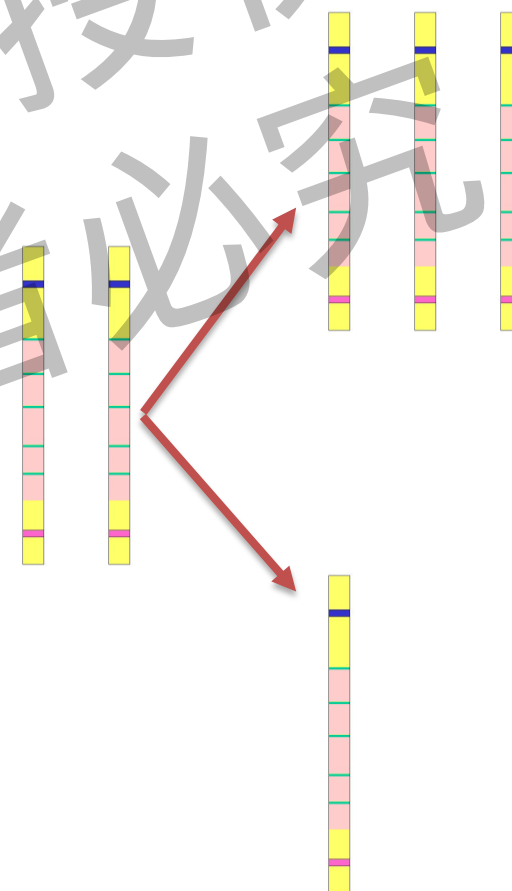
可以解读的基因编码区占基因组 ~0.4% !



儿童内分泌疾病的遗传病因学

➤ 建立基因/基因组变异与疾病结果的对应关系

- 每个基因两个拷贝-一个母亲来源-一个父亲来源
- 影响已知致病基因正常功能的变异类型
 - 数目的多少

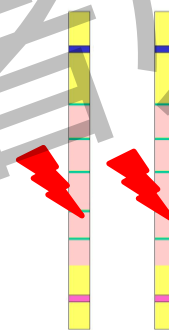


儿童内分泌疾病的遗传病因学

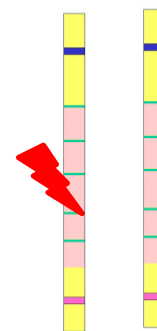
➤ 建立基因/基因组变异与疾病结果的对应关系

- 每个基因两个拷贝-一个母亲来源-一个父亲来源
- 影响已知致病基因正常功能的变异类型

➤ 点突变



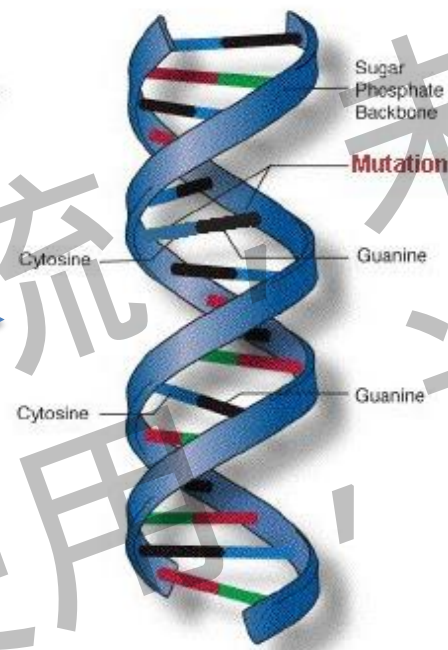
常染色体隐性



常染色体显性



临床基因组检测面临的问题



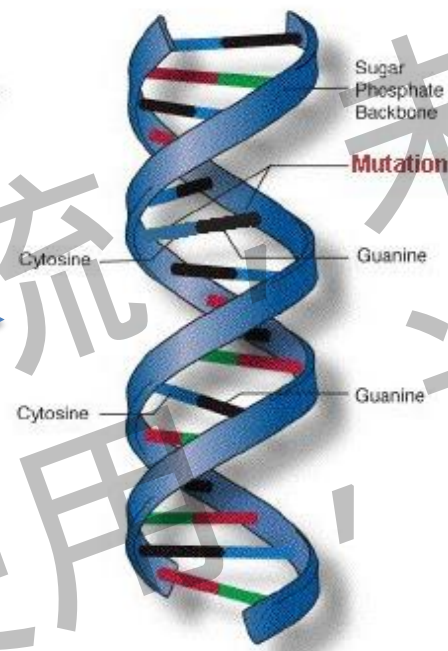
- 染色体数目异常
- CNV
- 点突变SNV
- UPD

“前”基因组时代对遗传疾病的理解



通过个性化的诊断和咨询实现精准医学

临床基因组检测面临的问题



检测技术：

➤ 核型

➤ 芯片

➤ 测序

- 染色体数目异常
- CNV
- 点突变SNV
- UPD

单基因 基因包 医学外显 全外显 全基因组

检测项目：



“前”基因组时代对遗传疾病的理解



通过个性化的诊断和咨询实现精准医学

临床基因组检测面临的问题



性腺发育异常								
性染色体DSD	46,XY DSD				46, XX DSD			
	睾丸发育不良	雄激素异常			卵巢发育异常	雄激素过量		
		合成	功能	其他		胎儿	胎儿胎盘	产妇
45, X Turner综合征与变异	完全性腺发育不良	LH-受体突变	雄激素不敏感综合征	男性性腺发育相关综合征 (泄殖腔异常)	性腺发育不良	3β-羟化类固醇脱氢酶2 (HSD3B2)	芳香酶缺乏 (CYP19)	黄体瘤
		Smith-Lemli-Optiz综合征	药物和环境调制	苗勒管综合征	睾丸DSD (SRY+, dupSOX9, RSP01)	21-羟化酶缺乏症	氧化还原酶 (POR) 基因检测	雄激素药物
47, XXY Klinefelter综合征及变异	部分性腺发育不良	SaRT基因突变		睾丸消失综合征	两性畸形DSD	p450氧化还原酶 (POR)		子宫异常 (MODYS)
45, X/46XY 混合型性腺发育障碍(MGD)	性腺退化	胆固醇侧链裂解酶 (CYP11A1)		单纯性尿道下裂 (CX或f6)		11-β-羟化酶缺乏症 (CYP11B1)		阴道闭锁 (KcKusic-Kaufman)
染色体卵巢两性畸形DSD	两性畸形DSD	3β-羟化类固醇脱氢酶2 (HSD3B2)		先天性腺功能减退		糖皮质激素受体基因突变		唇粘连
46,XX/46,XY(嵌合体)		17α-羟化类固醇脱氢酶(HSD17B3)		隐睾症 (INSL3,GREAT)				
		5α-还原酶2 (SRD5A2)		环境影响				



临床基因组检测面临的问题

➤ 基因致病性的相关性

- 已知致病基因 ~4000
- 未知功能的基因 ~16,000

OMIM Gene Map Statistics

OMIM Morbid Map Scorecard (Updated November 27th, 2018) :

Total number of phenotypes* for which the molecular basis is known	6,306
Total number of genes with phenotype-causing mutation	4,001

* Phenotypes include (1) single-gene mendelian disorders and traits; (2) susceptibilities to cancer and complex disease (e.g., BRCA1 and familial breast-ovarian cancer susceptibility, [113705.0001](#), and CFH and macular degeneration, [134370.0008](#)); (3) variations that lead to abnormal but benign laboratory test values ("nondiseases") and blood groups (e.g., lactate dehydrogenase B deficiency, [150100.0001](#) and ABO blood group system, [110300.0001](#)); and (4) select somatic cell genetic disease (e.g., GNAS and McCune-Albright syndrome, [139320.0008](#) and IDH1 and glioblastoma multiforme, [147700.0001](#).)

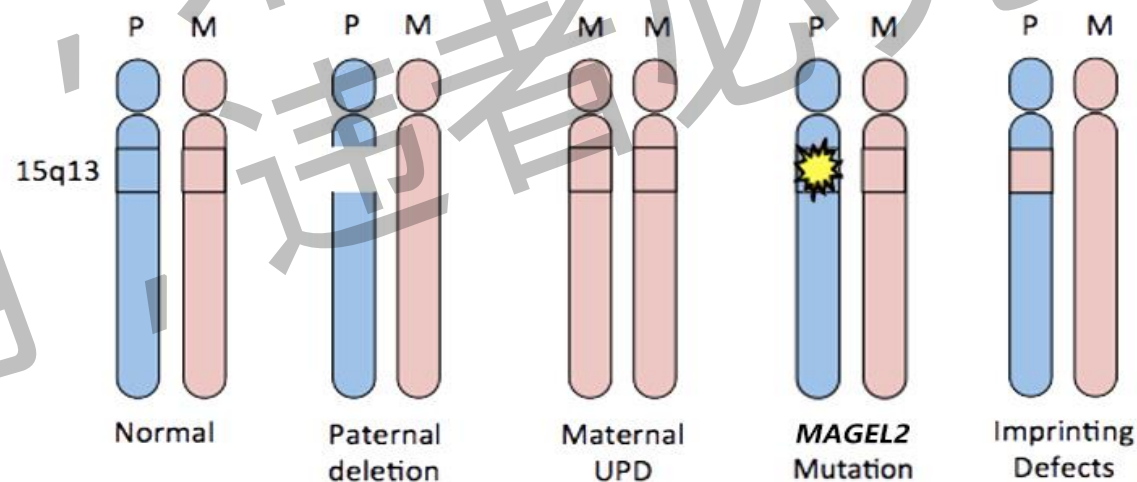


临床基因组检测面临的问题

➤ 致病突变类型和机制

- 染色体数目异常
- 拷贝数异常CNV
- 点突变SNV
- UPD

Prader-Willi syndrome: Genetic mechanisms



临床基因组检测面临的问题

➤ 致病突变类型和机制

- 染色体数目异常
- 拷贝数异常CNV
- 点突变SNV
- UPD

Sexual
Development

Review Article

Sex Dev
DOI: 10.1159/000481896

Published online: November 17, 2017

The Role of Copy Number Variants in Disorders of Sex Development

Brittany Croft^{a,c} Thomas Ohnesorg^a Andrew H. Sinclair^{a,d}

^aMurdoch Children's Research Institute, ^bThe Hudson Institute of Medical Research, ^cDepartment of Molecular and Translational Science, Monash University, and ^dDepartment of Paediatrics, University of Melbourne, Melbourne, VIC, Australia

Gene	CNV	Maximum region altered (hg19)	Phenotype	Karyotype	Technique	Reference
<i>CNVs affecting coding sequences</i>						
DMRT1	deletion	Chr9: 883,300–918,342	ambiguous genitalia	46,XY	array CGH	Ledig et al. [2012]
	deletion	case 35: Chr9: 280,055–1,101,607	GD	46,XY	array CGH	Ledig et al. [2010]
	deletion	case 44: Chr9: 762,747–865,979	GD	46,XY		
	deletion	ID 9: Chr9: 366,238–625,238	GD	46,XY	array CGH	Tannour-Louet et al. [2010]
	deletion	ID 12: Chr9: 366,238–10,140,000	GD	46,XY		
	deletion	ID 13: Chr9: 10,001–6,795,000	GD	46,XY		
	deletion	patient 2: 11.5 Mb within 9p24	GD	46,XY	MLPA, array CGH	Barbaro et al. [2009]
FGF9	duplication	Chr13: 21,143,874–21,174,184	ambiguous genitalia	46,XX	array CGH	Chiang et al. [2013]
NR0B1	deletion	ChrX: 30,273,443–30,356,096	ambiguous genitalia, OT	46,XX	array CGH	Dangle et al. [2017]
	duplication	ChrX: 30,107,611–30,391,622	X-linked adrenal hypoplasia congenita	46,XY	array CGH	Rojek et al. [2016]
	duplication	ChrX: 30,221,851–30,992,418	CGD	46,XY	microarray	White et al. [2011]
	duplication	800 kb Xp21.2	partial GD	46,XY	MLPA	Barbaro et al. [2008]
	duplication	634 kb Xp21.2	GD	46,XY	array CGH	Barbaro et al. [2007]
	duplication	case 52: ChrX: 30,260,141–30,989,178	GD	46,XY	array CGH	Ledig et al. [2010]
NR5A1	deletion	0.24 Mb of 9q33.3	ambiguous genitalia	46,XY	array CGH	Harrison et al. [2014]
	deletion	Chr9: 127,251,113–127,487,356	ambiguous genitalia	46,XY	array CGH	Harrison et al. [2013]
	deletion	Chr9: 125,944,826–127,483,435	CGD	46,XY	array CGH	Brandt et al. [2013]
	deletion	9q33.3, located 125.94–126.9 Mb from the p telomere	GD	46,XY	array CGH	van Silfhout et al. [2009]
	deletion	3.07 Mb 9q33.3q34.11	OT	46,XY	array CGH	Schlaubitz et al. [2007]
RSPO1	deletion	2.7 kb loss of exon 4	CGD	46,XX	targeted PCR	Parma et al. [2006]



通过个性化的诊断和咨询实现精准医学

临床基因组检测面临的问题

➤ 分析方式

1. 孟德尔遗传分析 (AD, AR, XL)

2. 非孟德尔遗传分析

新发突变！！

Study		Publication date	Site	Number of subjects	Age (mean or median)	Diagnosis rate (%)	De novo mutation (%)
Soden	Sci Trans Med	Oct-14	CMH	100	7	47	51
Srivastava	Ann Neurol	Oct-14	JHU	78	9	41	56%
Yang	JAMA	Nov-14	Baylor	1756	6	27	49
Lee	JAMA	Nov-14	UCLA	520	<18	26	50
Wright	Lancet	Dec-14	UK	1133	6	27	62



临床基因组检测面临的问题

► 技术所限

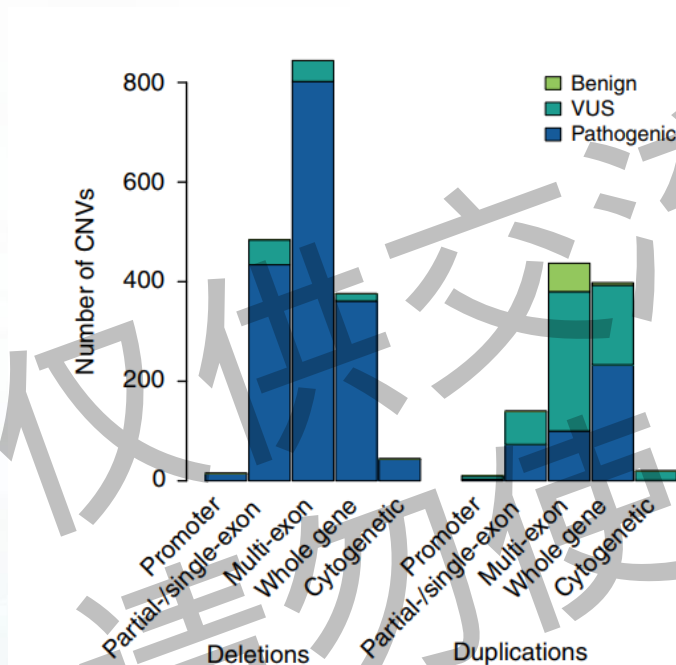
突变长度	1bp~50bp点突变	50bp~200bp大片段	200bp~100kb拷贝数	100kb~5Mb拷贝数	5Mb~整条染色体
传统检测	一代测序	一代测序 /MLPA	<i>X</i>	CMA	CMA/核型
常规二代测序	全外	<i>X</i>	<i>X</i>	CNV-Seq	CNV-Seq

突变类型检测的“死区”



临床基因组检测面临的问题

技术所限



Results: Our analysis identified 2844 intragenic CNVs in 384 clinically tested genes. CNVs were observed in 1.9% of the entire cohort but in a disproportionately high fraction (9.8%) of individuals with a clinically significant result. CNVs accounted for 4.7–35% of pathogenic variants, depending on clinical specialty. Distinct patterns existed among CNVs in terms of copy number, location, exons affected, clinical classification, and genes affected. Separately, analysis of de-identified data for 599 genes unrelated to

© The Author(s)

Open

ARTICLE | Genetics
in Medicine

Prevalence and properties of intragenic copy-number variation in Mendelian disease genes

Rebecca Truty, PhD¹, Joshua Paul, PhD¹, Michael Kennemer, MS¹, Stephen E. Lincoln, BS¹, Eric Olivares, PhD¹, Robert L. Nussbaum, MD, FACMG^{1,2} and Swaroop Aradhya, PhD, FACMG¹



通过个性化的诊断和咨询实现精准医学

临床基因组检测面临的问题

➤ 技术所限

© American College of Medical Genetics and Genomics

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

Genetics
in Medicine

Measuring coverage and accuracy of whole-exome sequencing in clinical context

Sek Won Kong, MD^{1,2}, In-Hee Lee, PhD^{1,2}, Xuanshi Liu, PhD^{1,2}, Joel N. Hirschhorn, MD, PhD^{2,3} and Kenneth D. Mandl, MD, MPH^{1,2,4}

Purpose: To evaluate the coverage and accuracy of whole-exome sequencing (WES) across vendors.

Methods: Blood samples from three trios underwent WES by three vendors. Relative performance of the three WES services was measured for breadth and depth of coverage. The false negative rates (FNRs) were estimated using the segregation pattern in each trio.

Results: Mean depth of coverage for all genes was 189.38.3 for the three vendor services. Fifty-five of the 56 genes in the American College of Medical Genetics and Genomics 56 genes, but 63 pharmacogenes, were 100% covered at 10× in at least nine individuals for all vendors; however, there was substantial interindividual variability. For the two vendors with mean depth of coverage > 120×, analytic positive predictive values (aPPVs)

Conclusion: The current standard of 120× coverage for clinical WES may be insufficient for consistent breadth of coverage across the exome. Ordering clinicians and researchers would benefit from vendors' reports that estimate sensitivity and aPPV, including depth of coverage across the exome.

Genet Med advance online publication 12 April 2018

Key Words: breadth of coverage; depth of coverage; false negatives; pharmacogenomics; whole-exome sequencing



通过个性化的诊断和咨询实现精准医学

临床基因组检测面临的问题



准确度

整体费用

时间

检测项目：



通过个性化的诊断和咨询实现精准医学

临床案例 一

➤ 临床表现

➤ 女孩，2岁

➤ 肝功能异常、凝血功能异常，新生儿肺炎入院，

➤ 伴房间隔缺损

➤ 家族史

➤ 无

➤ 基因检测

➤ 项目选择？



临床案例 一

➤ 临床表现

➤ 女孩，2岁

➤ 肝功能异常、凝血功能异常，新生儿肺炎入院，

➤ 伴房间隔缺损

➤ 家族史

➤ 无

➤ 基因检测

➤ 高精度临床外显 *PLN1*（孩子+父亲+母亲 高精度临床相关致病基因检测）



临床案例 一

➤ 检测结果和解读

1. 检测到 *AGL* 基因复合杂合变异，分别遗传自送检者的父亲和母亲（均为杂合状态）

AGL 基因编码糖基化酶，参与糖原降解。相关疾病为糖原累积症Ⅲ型，是常染色体隐性遗传。临床表现主要为婴幼儿肝肿大，低血糖，高脂血症，肝转氨酶升高，进行性肌无力等。



临床案例 一

➤ 检测结果和解读

1. 检测到 *AGL* 基因复合杂合变异，分别遗传自送检者的父亲和母亲（均为杂合状态）
2. 根据拷贝数和相关 *SNP* 位点分析，且送检者染色体数目结果与 46, *XY* 吻合。



临床案例 一

➤ 检测结果和解读

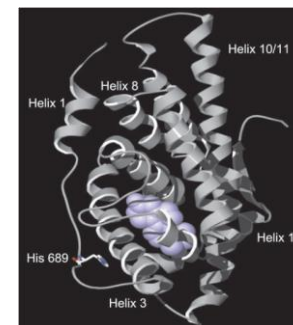
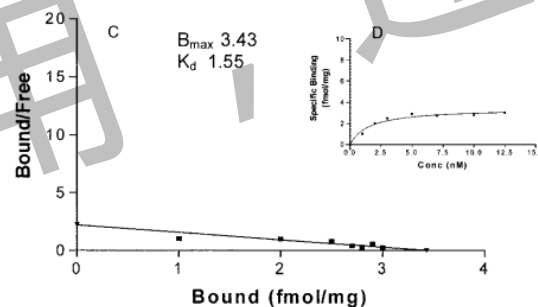
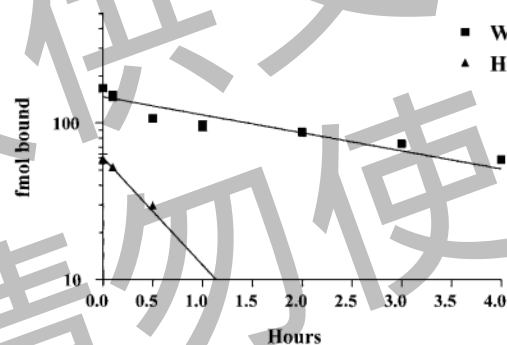
1. 检测到 *AGL* 基因复合杂合变异，分别遗传自送检者的父亲和母亲（均为杂合状态）
2. 根据拷贝数和相关 *SNP* 位点分析，且送检者染色体数目结果与 46, *XY* 吻合。
3. 同时，还检测到 *AR* 基因半合变异 *c.2 ***C>G (p.H***2)*，同时测序数据显示送检者父母没有携带这个变异，这个变异可能是新发的。



临床案例 一

► 检测结果和解读

AR 基因半合变异在临床患者中发现，其外生殖器为女性外观，核型为 46, XY，临床症状主要为正常的乳房发育，但超声显示无子宫和输卵管。



Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 87(9):4378–4382



临床案例 一

➤ 遗传咨询

1. 需要结合送检者的临床表现、血糖、肝功能和相关血浆的氨基酸质谱检测结果，评估 *AGL* 基因的临床相关性。
2. 建议腹部B超检查。
3. 对于新发变异，不能排除送检者母亲存在体细胞或生殖腺嵌合的可能性，建议选择定点变异高精度检测。



临床案例 一

致病突变类型和机制

- 染色体数目异常
- CNV
- 点突变SNV
- UPD

核型分析
先证者核型分析



CMA芯片
先证者+父亲+母亲



全外显分析方案
先证者低深度二代
父亲+母亲一代验证或低深度二代

高精度临床外显 *Plus*



临床案例 一

致病突变类型和机制

- 染色体数目异常
- CNV
- 点突变SNV
- UPD

核型分析
先证者核型分析



CMA芯片
先证者+父亲+母亲



全外显分析方案
先证者低深度二代
父亲+母亲一代验证或低深度二代

分步流程，对于每个突变类型单独检测，
不能全面评估患者的独立突变机制

高精度临床外显 *Plus*

一步到位，完整评估患者的多种致病类型



以临床应用为中心的基因组检测

➤ 基因致病性的相关性

➤ 已知致病基因，病人花的每一分钱都用在数据解读！

➤ 未知功能的基因

➤ 致病突变类型和机制

➤ 染色体数目异常

➤ CNV

➤ 点突变SNV

➤ UPD

➤ 检测模式

1. 先证者+父亲+母亲 高精度二代

➤ 分析方式

1. 孟德尔遗传分析 (AD, AR, XL)

2. 非孟德尔遗传分析

➤ 技术优化

1. 50bp-200kp 拷贝数检测



简单的基因/基因组疾病，**不**简单的遗传咨询

未经授权
仅供交流，违者必究
请勿使用



临床案例 二

➤ 临床表现

➤ 女孩，8个月

➤ 肌张力低，哭声弱，深浅反射减弱，

➤ 腭弓高，反复肺炎

➤ 家族史

➤ 无

➤ 基因检测

➤ 高精度临床外显_{plus}（孩子+父亲+母亲 高精度临床相关致病基因检测）



临床案例 二

➤ 检测结果和解读

- 未检测到与此疾病相关基因的编码区的致病突变。但通过拷贝数和相关 SV 的分析，送检者结果与46, XY 核型吻合，发现 X 染色体上 $p22.1-22.3$ 区域发生26Mb拷贝数重复，
- 同时数据显示送检者父母没有携带这个变异，这个变异可能是新发的。
- 临床表现有核型为 XY 的个体出现性反转，卵巢发育，性腺发育不全，智力异常



临床案例 二

➤ 遗传咨询与建议：

- 需要医生结合送检者的临床症状及家族史进行解读，此项目只报告与疾病相关的致病基因和突变。
- 建议相关亲属进行相应定点变异检测，以评估遗传风险。
- 可根据临床情况考虑进行高分辨率核型分析。



临床案例 三

➤ 临床表现

➤ 男孩，4岁

➤ 皮肤黑，消瘦，*ACTH*升高，皮质醇、17-羟皮质类固醇下降，

➤ 临床考虑原发性肾上腺皮质功能减退症

➤ 家族史

➤ 无

➤ 基因检测

➤ 高精度临床外显_{plus}（孩子+父亲+母亲 高精度临床相关致病基因检测）



临床案例 三

➤ 检测结果和解读

- 未检测到与疾病相关基因的编码区的致病突变。但是根据测序数据覆盖深度和 NP 位点的分析，发现 $NR0B1$ 基因全基因拷贝数缺失(4.7Kb)。



临床案例 三

➤ 检测结果和解读

- 这个 *NR0B1* 基因全基因缺失在多个先天性肾上腺发育不全的临床病例中被报道过 (*PMID: 7609262, 22764912*)。到目前为止，这个变异在我们的参考人群基因数据库中没有报道。
- 依据美国 *ACMG* 变异分类指南，这个变异为“*4*类-致病变异”

➤ 遗传咨询与建议：

- 需要医生结合送检者的临床症状及家族史进行解读，此项目只报告与疾病相关的致病基因和突变。
- 建议相关母系亲属进行相应定点变异检测，以评估遗传风险。



基因组时代对临床遗传专业提出超高的要求

对临床医生要求：

- 全面理解染色体疾病、基因/基因组疾病、代谢疾病和线粒体疾病
- 制定合理准确的遗传咨询方案
- 跟进前沿的治疗和管理方案
- **临床+科研**转化的能力

对临床遗传专科医生要求：

- 全面理解染色体疾病、基因/基因组疾病、代谢疾病和线粒体疾病
- 更精准、更全面、周期更短、性价比更高的临床适用的基因组检测方案
- 了解前沿的基因/基因组疾病信息
- **临床+科研**转化的能力





感谢关注

—— 专业·专注·专科 ——

