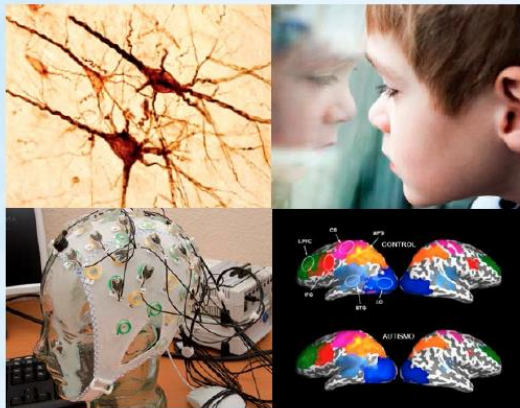


**Abordaje Multidisciplinar
de los
Trastornos del Neurodesarrollo
en la Infancia (XII)**

Organizado por:
Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria
irycis



Servicio de Pediatría. B. García Cuartero. Jefe de Servicio

3 y 4 de Noviembre de 2016

Salón de Actos. Planta 0 centro.
Hospital Universitario Ramón y Cajal

Directores:

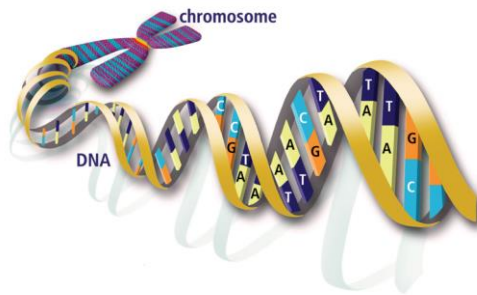
Dr. G. Lorenzo Sanz
Dr. A. Pedrera Mazarro
Dr. S. Rekarte García

Neurología infantil S. de Pediatría.
Servicio de Neurofisiología Clínica.
Servicio de Neurofisiología Clínica.

“Importancia de los estudios genéticos en los trastornos del espectro autista”

Dra. Sara Alvarez
Director Médico, NIMGenetics

Madrid, 3 de Noviembre 2016



Contenidos:

1. El Genoma: Herramientas genómicas
2. La arquitectura Genética del TEA
3. La Heredabilidad del TEA

1

El Genoma: Herramientas Genómicas

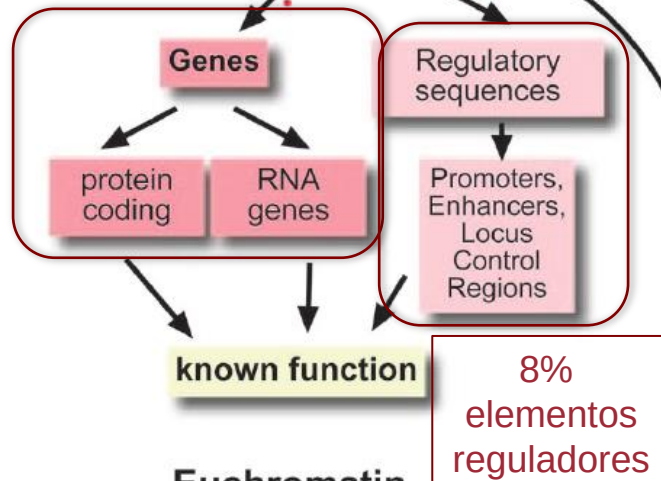
El 98% del Genoma NO codifica para proteínas ó RNA funcional

En el exoma se localizan el 85% de las alteraciones asociadas a enfermedades Mendelianas

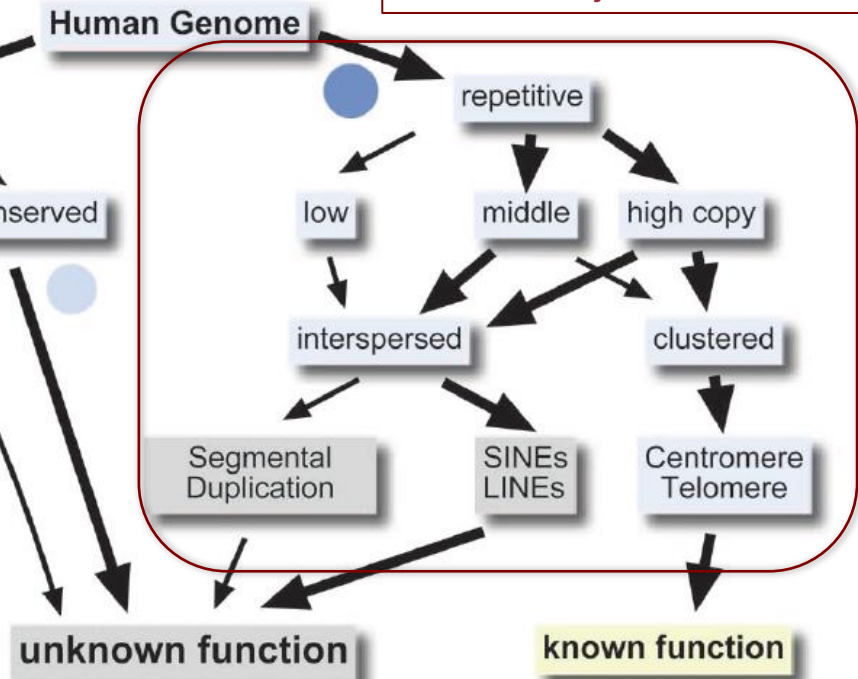
>50% elementos Repetitivos NO "junk DNA"



1.5%
región codificante



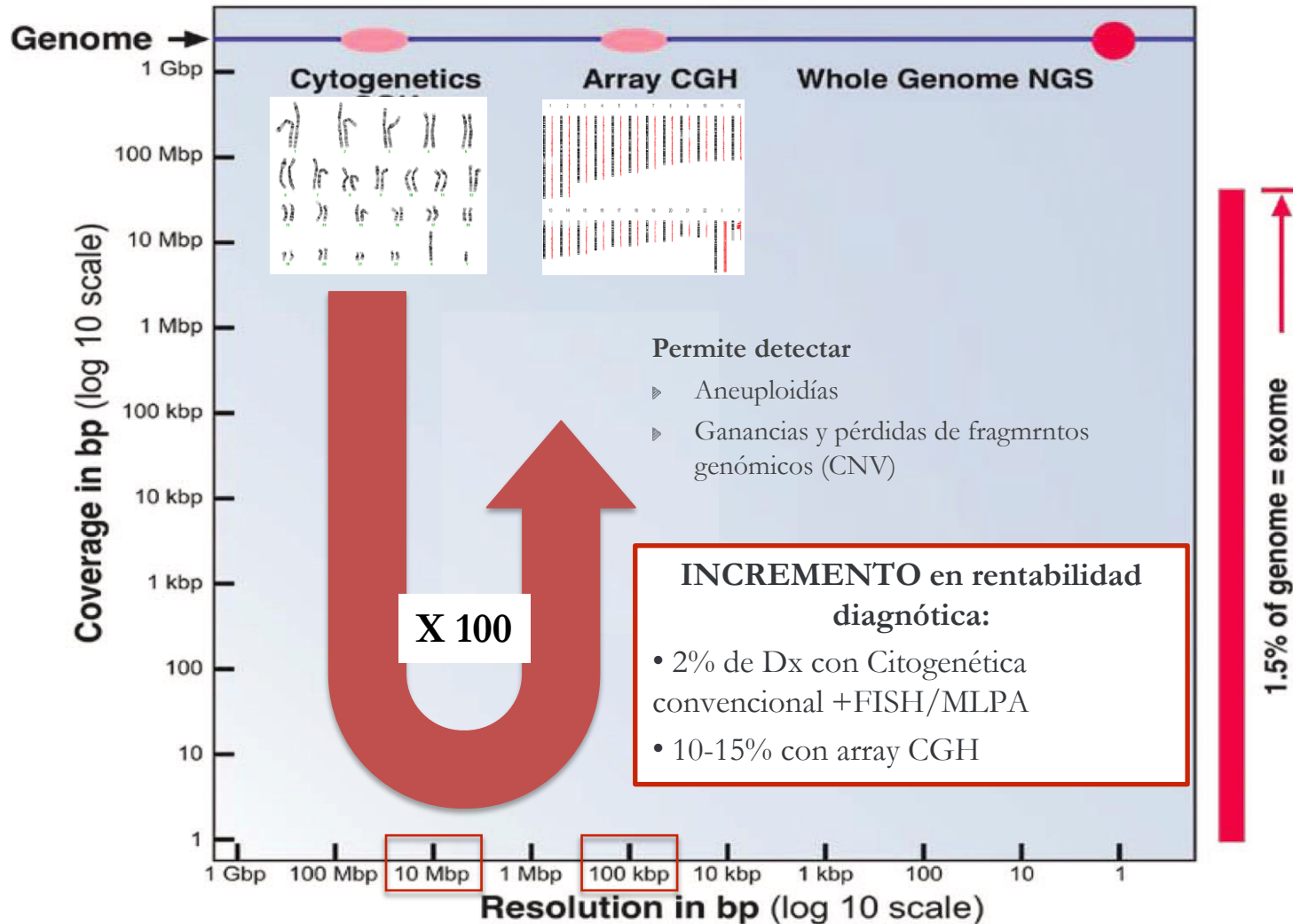
Euchromatin
transcriptionally active



Heterochromatin
transcriptionally inactive



Desarrollos de la Tecnología genómica dirigidos a un INCREMENTO EN LA RESOLUCION



¿Qué ofrece el array-CGH en neuropediatría?

La técnica de elección debería depender del objeto de análisis



Alteraciones de 10 Mb

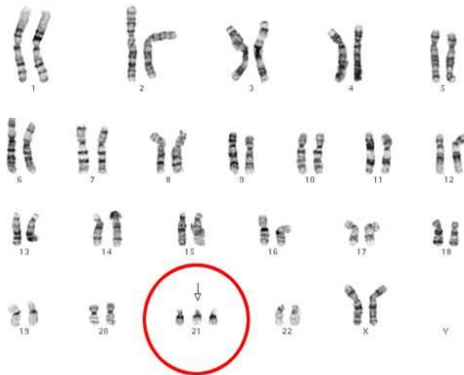


Alteraciones de cientos de Kb

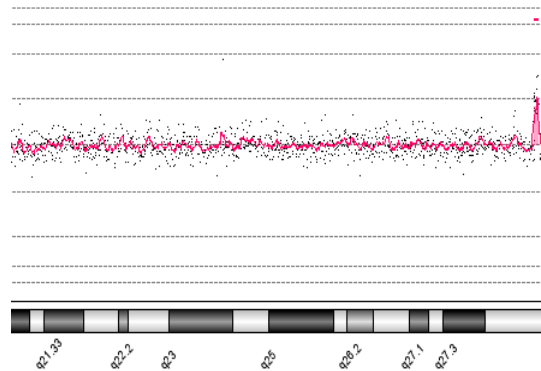
x



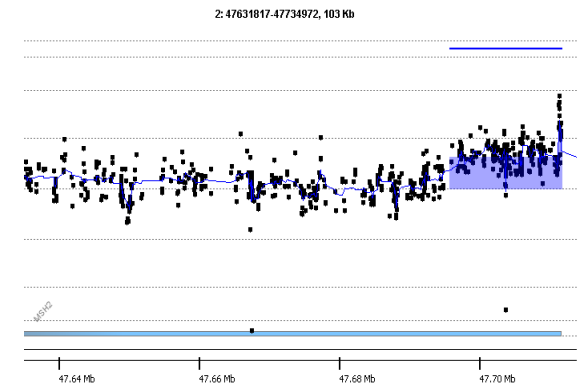
Alteraciones de unidades o decenas kb



Karyotype (+21)



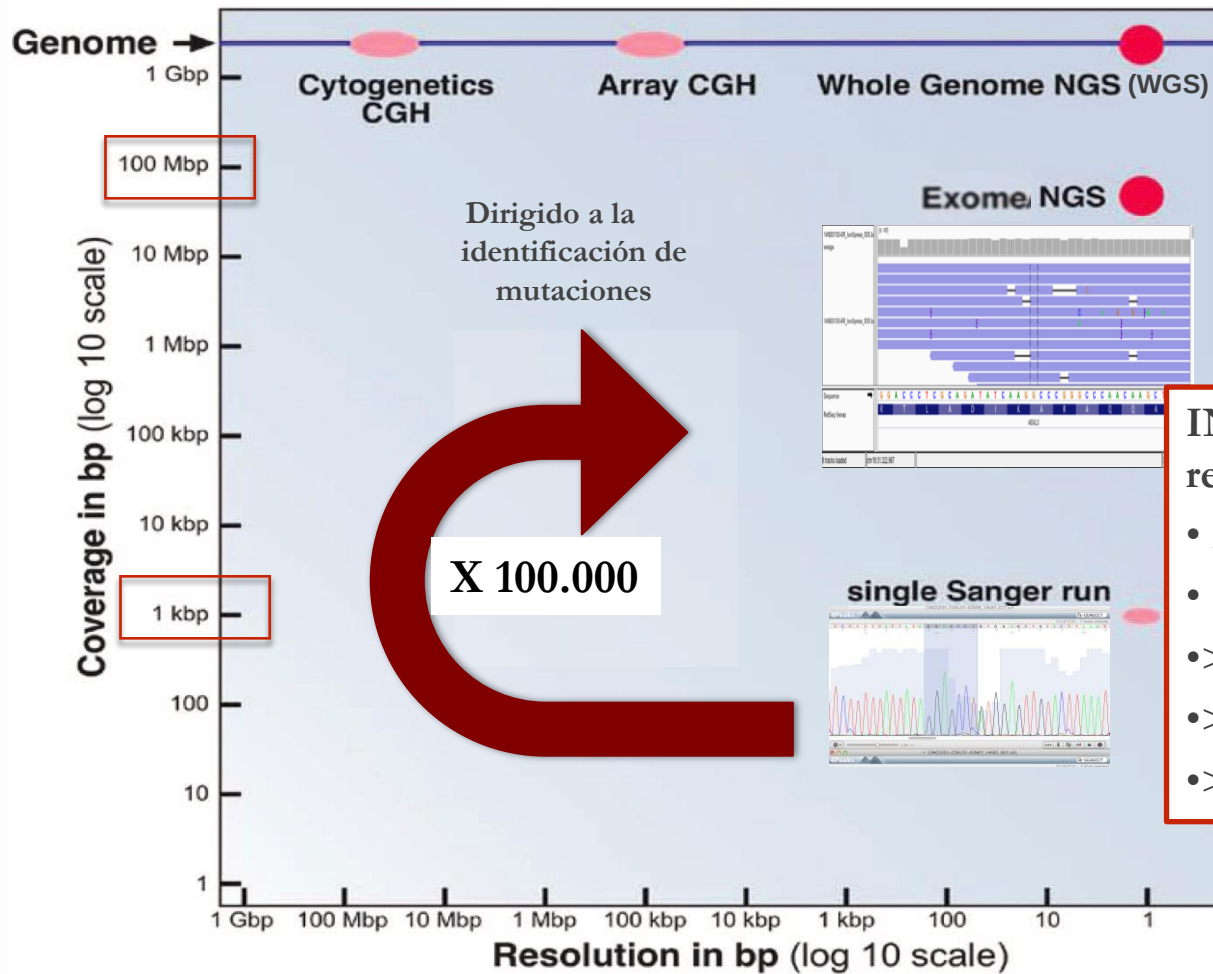
Array-CGH medium resolution
(del Xq28 ~500 kilobases)



Array-CGH high resolution
(dup MSH2 5kb)

Aumentando la resolución aumentamos el número de VNCs

Desarrollos de la Tecnología genómica dirigidos a un INCREMENTO EN LA COBERTURA



INCREMENTO en la rentabilidad diagnóstica

- 3-15% estudio de gen único
- 13-20% panel de NGS
- >20% Exoma dirigido
- >30% Exoma con análisis en Trios
- >40% Genoma Completo



SELECT
TARGETS



CONSTRUCT
LIBRARY



PREPARE
TEMPLATE

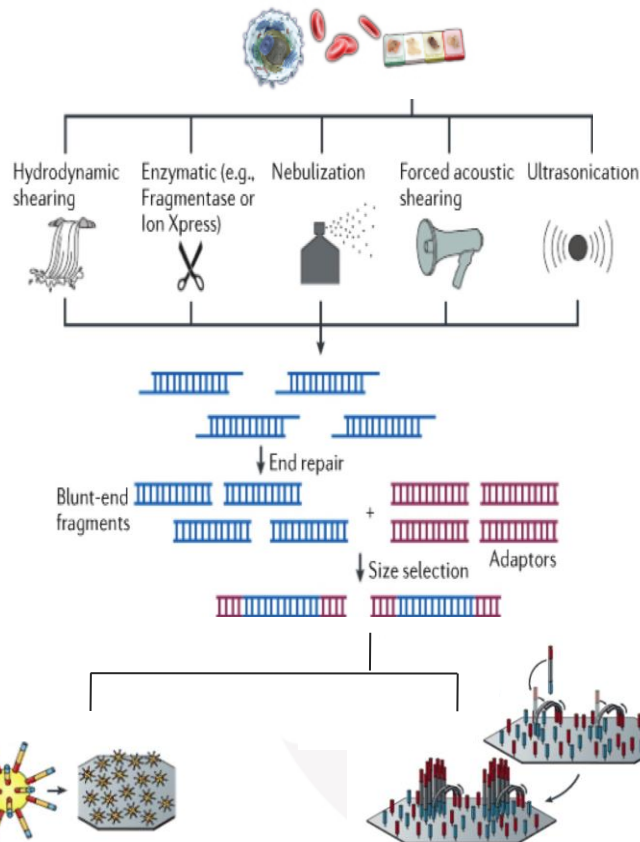


RUN
SEQUENCE

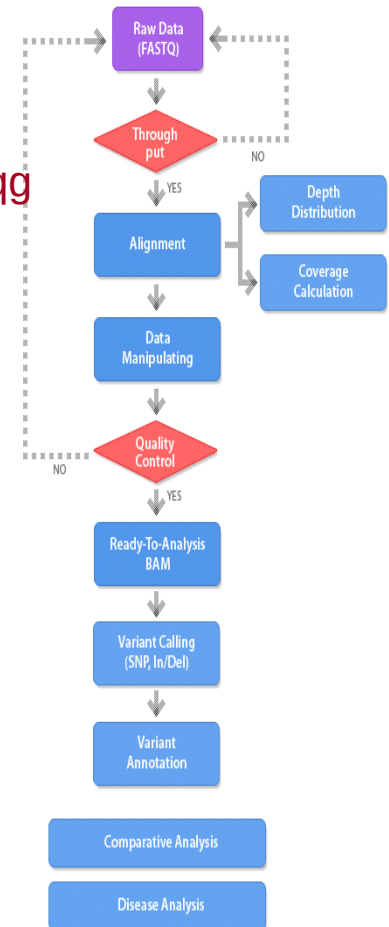


ANALYZE
DATA

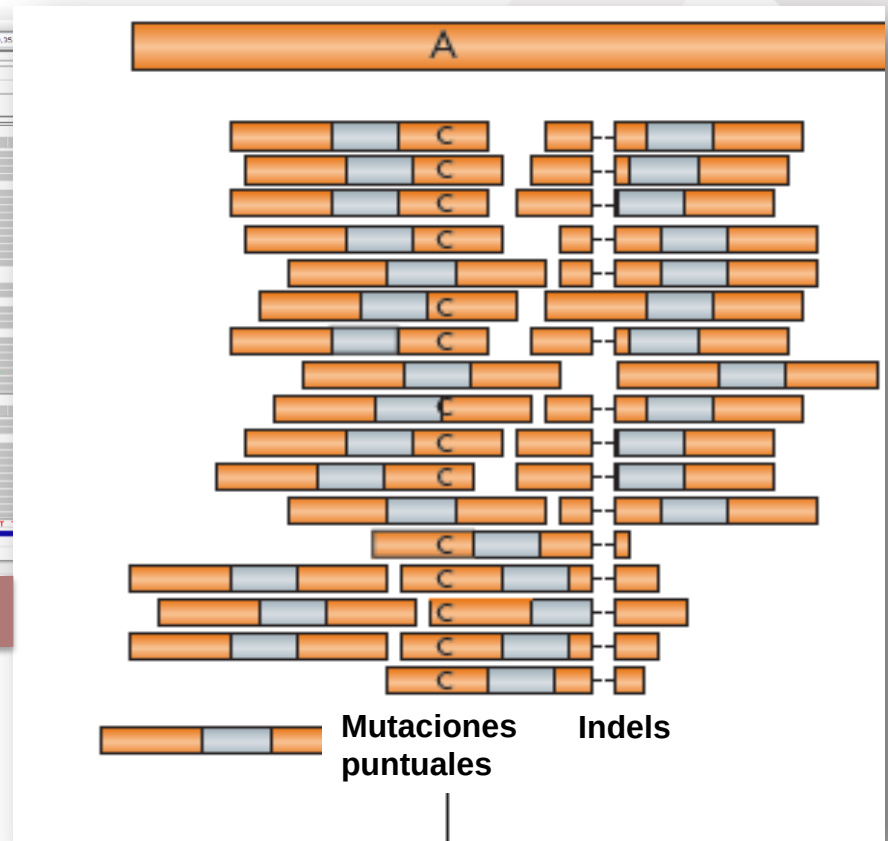
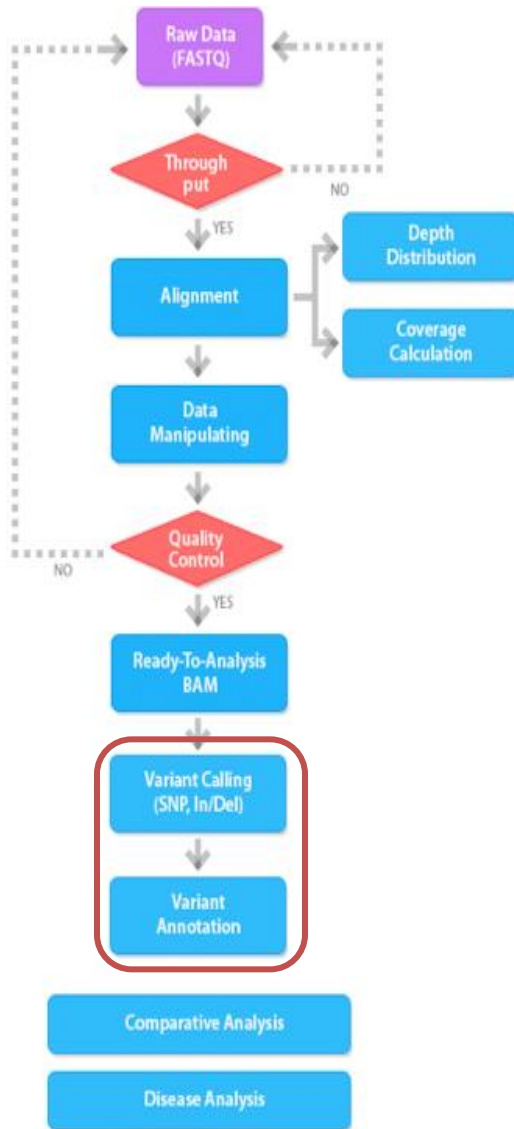
- ✓ Genoma
- ✓ Exoma
- ✓ Genes Target
- ✓ Transcriptoma
- ✓ Metiloma
- ✓ Epigenoma (Histonas)



- ✓ Illumina
- ✓ 454 Pyrosequ
- ✓ Helicos
- ✓ SOLiD
- ✓ Ion Torrent



Identificación de variantes en secuenciación masiva (NGS)

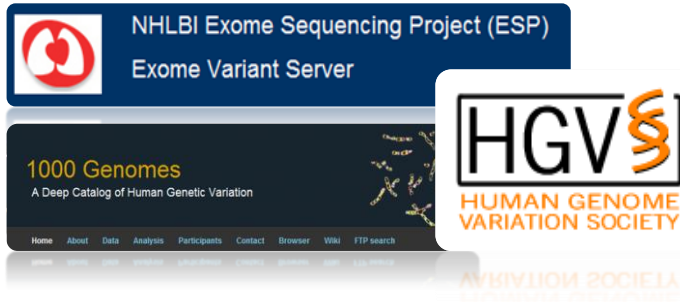


>40.000 Variantes

Filtrado y Clasificación de de variantes NGS

>40.000 Variantes

Filtrados en bases de datos de SNPs



400 a 700 Variantes

Filtrado en función de la Variante:

- Localización
- Efecto en la proteína
- Predictores
- Etc...

Filtrado en función del Fenotipo:

- Historia Clínica Detallada
- Acceso a Bases de datos profesionales
- Bases de datos propias
- Revisión de la literatura



Categorización DE MUTACIONES:

- ✓ Mutaciones Patogénicas
- ✓ Mutaciones de Significado Incierto (VUS)
- ✓ Mutaciones probablemente Benignas
- ✓ Mutaciones Benignas

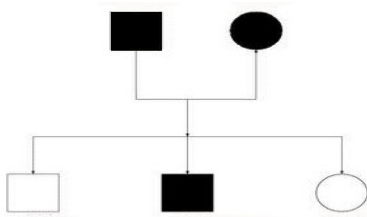


Variantes	Nº medio
"de novo"	1-2
Homocigotas	1-2
Heterocigotas compuestas	2-3
Hemicigotas	2-3

Aproximación al Diagnóstico Neuropediátrico basado en exomas

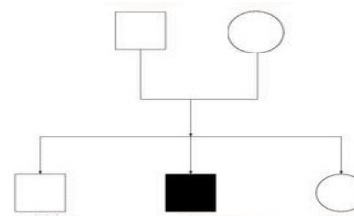
Análisis en Trios

- ✓ Ventaja: Identificación de mutaciones “de novo”
- ✓ Desventaja: Precio
- ✓ Dirigido a la **identificación de mutaciones GERMINALES “de Novo”** en enfermedades genéticas con presentación clínica variable e inespecífica y con elevada heterogenicidad genética.
- ✓ **Indicaciones:** Estudio de Retrasos del desarrollo, Autismo, etc..

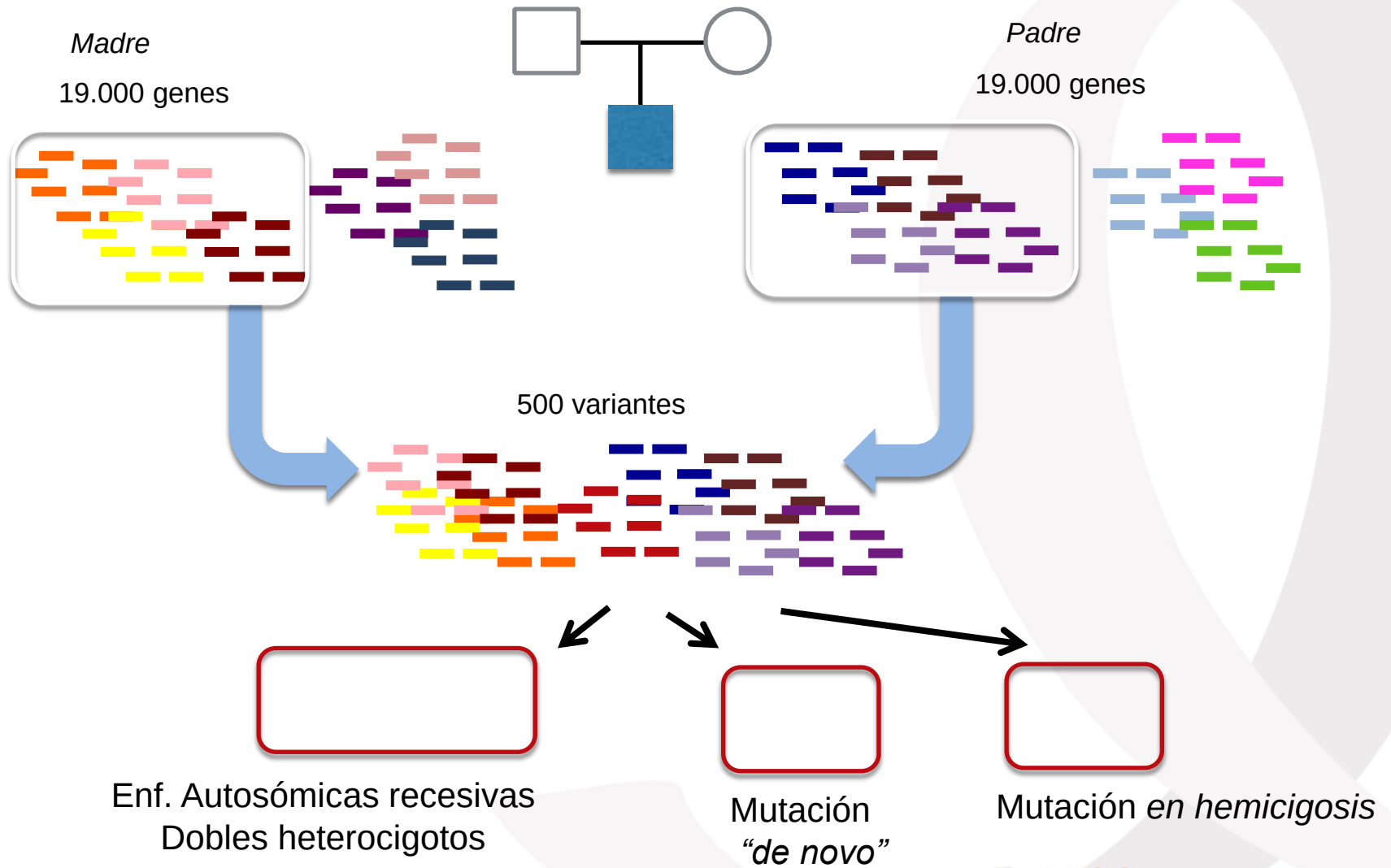


Análisis en Paneles Dirigidos

- ✓ Ventaja: Precio
- ✓ Desventaja: ¿mutaciones de novo?
- ✓ Dirigido al estudio de **múltiples genes en enfermedades con heterogenicidad genética**, para la identificación de mutaciones GERMINALES
- ✓ **Indicaciones:** Estudio de enfermedades Mendelianas con un diagnóstico preciso



Análisis en Trios



Pero antes.....El consentimiento Informado!!!!!!!

Debe Incluir:

- ✓ Objetivos, limitaciones y beneficios del estudio
- ✓ Información relativa a los hallazgos **INCIDENTALES** no relacionados con la indicación clínica de la prueba:
 - Aceptación obligatoria a recibir la información relativa a las patologías recogidas en la guía de la ACMG que incluyen cardiomiopatías, canalopatías, ó cáncer hereditario.
 - Actitud a seguir en el caso de identificar VUS no relacionadas con el fenotipo de la enfermedad ó variantes patogénicas en heterocigosis en enfermedades de HAR
- ✓ Estudios genéticos alternativos

de los genes y se comparan con los de personas sanas con objeto de identificar los cambios en el ADN relacionados con la condición médica del individuo estudiado. De esta forma se trata de identificar el ó los cambios en el ADN (a estos también se les conoce como mutaciones) implicados en el desarrollo de su condición médica ó la de su hijo.

En esta prueba, también se identificarán aquellos cambios en la secuencia del ADN cuya significación clínica no sea evidente (conocidas como variantes de significado incierto) y no estén recogidos como los cambios presentes en población sana (cambios polimórficos). En estos casos, se realizarán estudios predictivos de bioinformática para saber las posibles consecuencias a nivel de las proteínas de las variantes de significado incierto.

© American College of Medical Genetics and Genomics

ACMG POLICY STATEMENT

Genetics
in Medicine

ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing

Robert C. Green, MD, MPH^{1,2}, Jonathan S. Berg, MD, PhD³, Wayne W. Grody, MD, PhD⁴⁻⁶, Sarah S. Kalia, ScM, CGC¹, Bruce R. Korf, MD, PhD⁷, Christa L. Martin, PhD, FACMG⁸, Amy L. McGuire, JD, PhD⁹, Robert L. Nussbaum, MD¹⁰, Julianne M. O'Daniel, MS, CGC³, Kelly E. Ormond, MS, CGC¹¹, Heidi L. Rehm, PhD, FACMG^{2,12}, Michael S. Watson, PhD, FACMG¹³, Marc S. Williams, MD, FACMG¹⁴ and Leslie G. Biesecker, MD¹⁵

New Integrated Medical Genetics

2

Arquitectura Genética del TEA

Protocolos y algoritmos del uso de la citogenómica en neuropsiquiatría

© 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

Table 4 Template for the clinical genetic diagnostic evaluation of autism spectrum disorder

First tier

Three-generation family history with pedigree analysis
Initial evaluation to identify known syndromes or associated conditions
Examination with special attention to dysmorphic features
If specific syndromic diagnosis is suspected, proceed with targeted testing
If appropriate clinical indicators present, perform metabolic and/or mitochondrial testing (alternatively, consider a referral to a metabolic specialist)
Chromosomal microarray: oligonucleotide array-comparative genomic hybridization or single-nucleotide polymorphism array
DNA testing for fragile X (to be performed routinely for male patients only)*

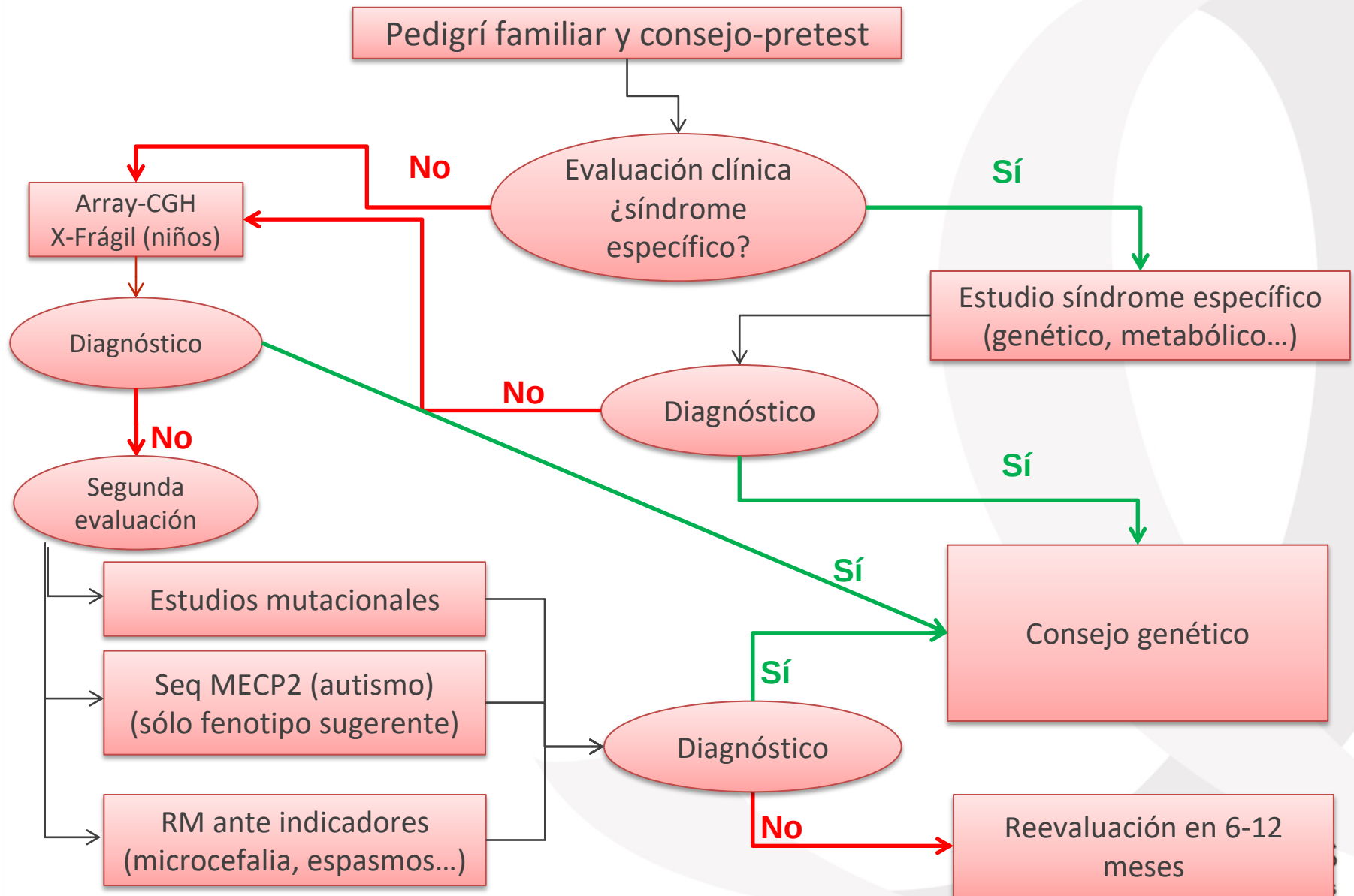
Second tier

MECP2 sequencing to be performed for all females with ASDs
MECP2 duplication testing in males, if phenotype is suggestive
PTEN testing only if the head circumference is >2.5 SD above the mean
Brain magnetic resonance imaging only in the presence of specific indicators (e.g., microcephaly, regression, seizures, and history of stupor/coma)

ASD, autism spectrum disorder; *MECP2*, methyl-CPG-binding protein 2; *PTEN*, phosphatase and tensin homolog.

*DNA testing for fragile X in females if indicators present (e.g., family history and phenotype).

Protocolos y algoritmos del uso de la citogenómica en neuropediatría



Arquitectura Genética en el TEA

Síndromes genéticos relacionados con el TEA (10%)

Alt. Cromosómicas (5%):

- Trisomía 21
- Sdr de Turner
- dup (15)(q11q13)
- Etc..

Enf. Mendelianas (3%):

- X-fragil (1-2%)
- Esclerosis tuberosa (1%)
- S. Rett (0.5%)
- Etc..

Sdr. de delección de genes contiguos (2%):

- S. Williams-Beuren
- S. Sotos
- S. Phelan-McDermid
- Etc.

Caracterizados por presentar Fenotipos con:

- Otras alteraciones neurológicas:
 - discapacidad intelectual
 - Epilepsia
 - etc..
- Malformaciones asociadas
- Facies característica

Fenotipo

Varón de 14 años, discapacidad intelectual, ausencia del habla, trastorno obsesivo, posible trastorno generalizado del desarrollo.



Cariotipo Normal

X-Frágil Normal



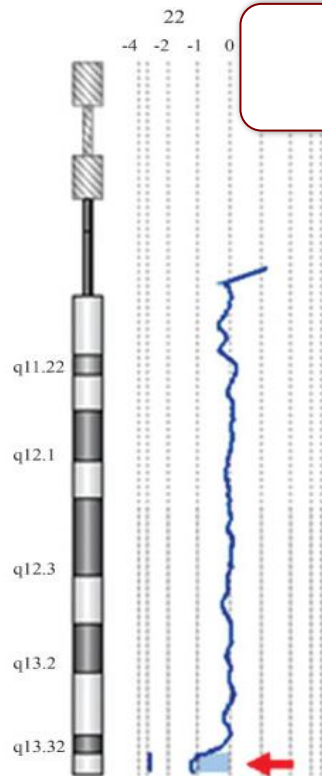
CGH array

The American Journal of Human Genetics 86, 749–764, May 14, 2010

ARTICLE

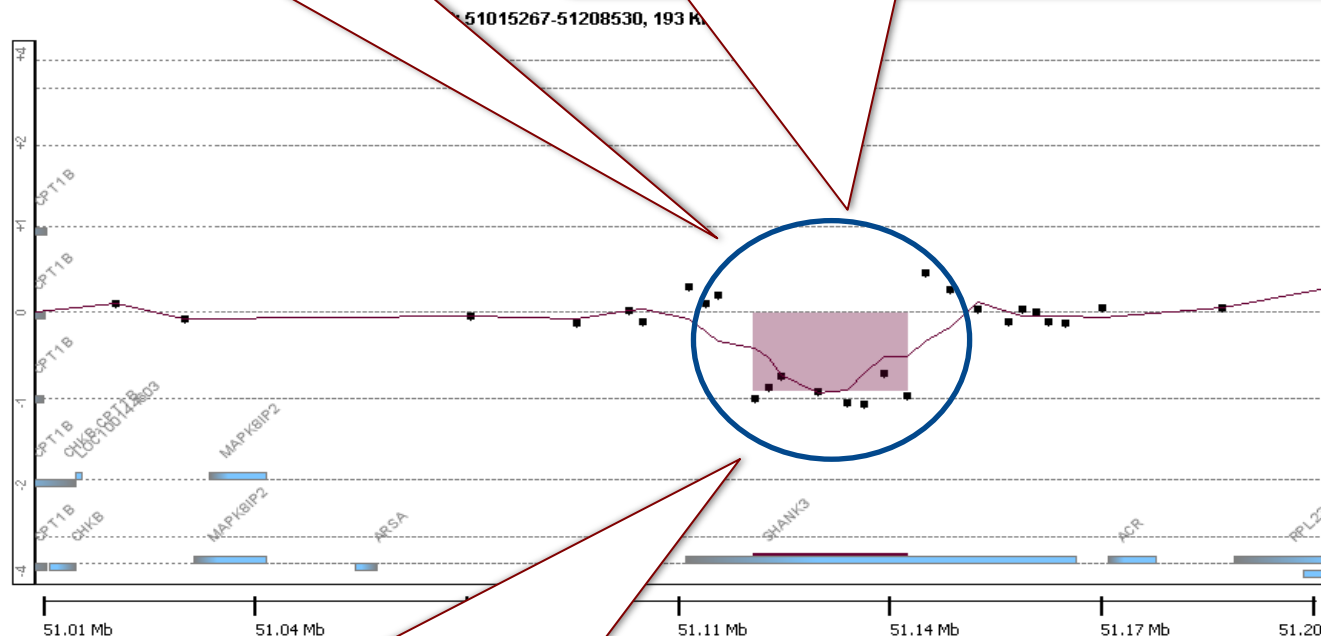
Consensus Statement: Chromosomal Microarray
Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals
with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies

Consenso
para la Implementación
de los Arrays [CGH y SNP-arrays]
en la **Genética Clínica**



Delección 22q13.33
20 Kb (exones 8-17 *SHANK3*)

Diagnostico:
Sdr. Phelan McDermid (OMIM#606232)
"de novo"



Presentación Clínica: retraso del lenguaje severo, problemas comportamentales (hiperactividad, explosiones agresivas) e hipotonía. Pueden aparecer dismorfias faciales y en algunos casos, sobrecrecimiento.



Arquitectura Genética en el TEA

Síndromes genéticos relacionados con el TEA (10%)

Alt. Cromosómicas (5%)

Enf. Mendelianas (3%)

Sdr. de delección de genes contiguos (2%)

TEA No Sindrómico

Variantes de baja frecuencia

VNCs (5%)
Desde 1 gen a <1 Mb

CGH

MLPA

Heredadas

De Novo

Asociadas a **penetrancia incompleta:**

- Presente en progenitor sano ó con afectación leve
- ¿Segundo evento genético?
- El tamaño y el contenido génico determina el riesgo de predisposición

Asociadas a **penetrancia completa y expresividad variable:**

- Ligadas a X
- Autosómicas Recesivas

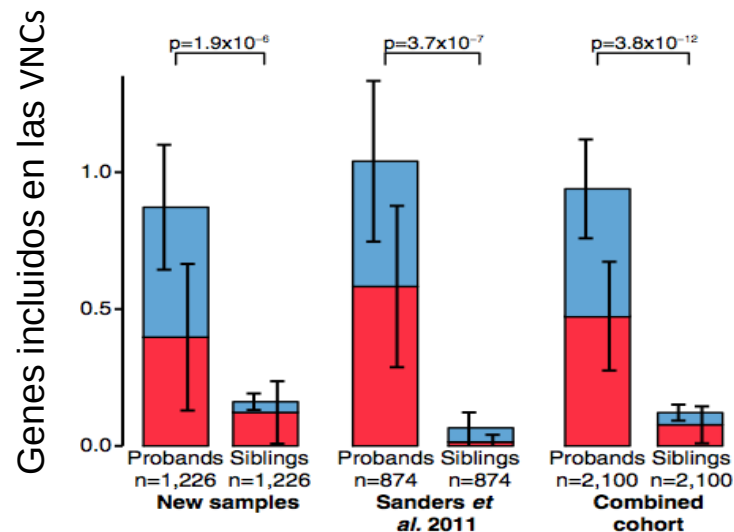
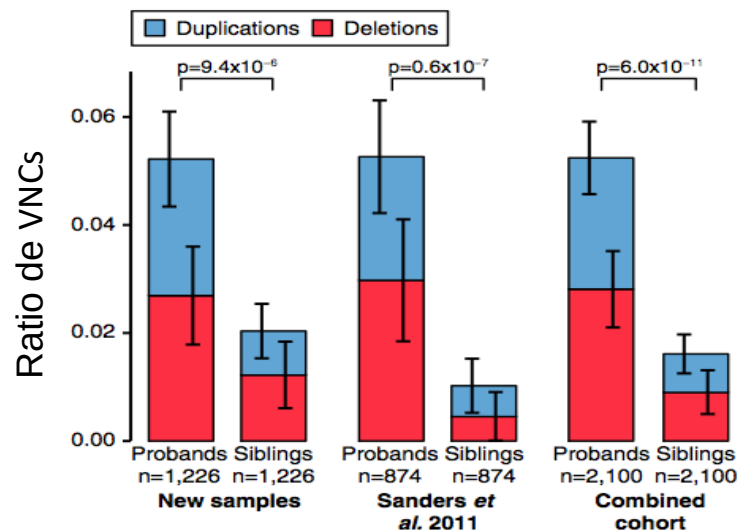
No está presente en los progenitores

N=10.220 individuos (2591 familias)

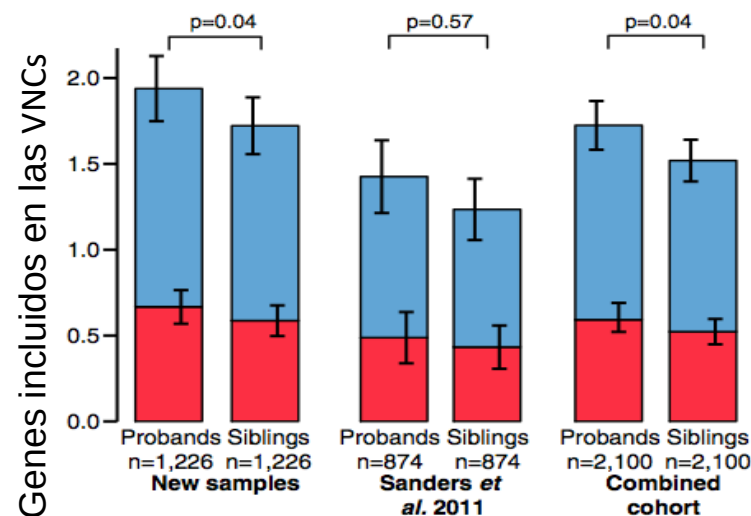
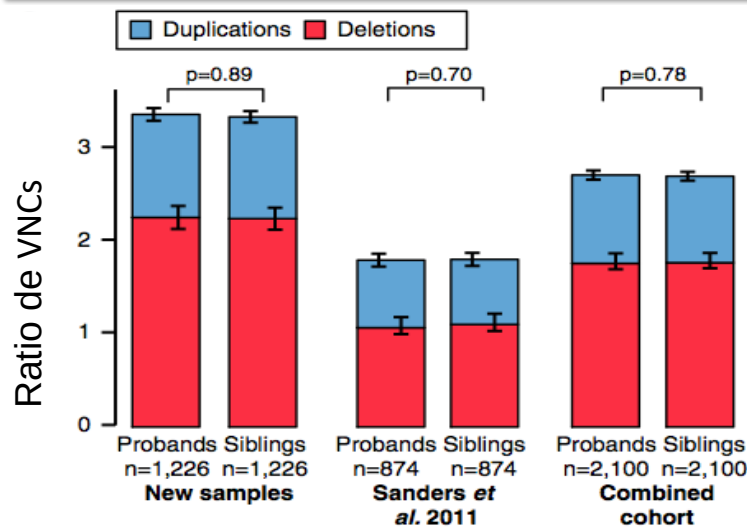
AGP: Autism Genome Project

SSC: Simons Simplex Collection

Las VNCs “de novo” se asocian a TEA



Las VNCs de baja frecuencia heredadas muestran una leve asociación con TEA



N=10.220 individuos (2591 familias)

- AGP: Autism Genome Project
- SSC: Simons Simplex Collection

Las VNCs de novo recurrentes permiten identificar 8 regiones genómicas asociadas a predisposición a TEA

Table 2. Regions with Multiple dnCNVs in the SSC and AGP (FDR ≤ 0.1)

Band	Location (hg19)	dnCNVs (del/dup)	RefSeq Genes	Genes ^a	p Value (Corrected)	q Value (FDR)
➤ 1q21.1	chr1:146,467,203-147,801,691	9 (1/8)	13	–	6×10^{-9}	2×10^{-9}
➤ 2p16.3	chr2:50,145,643-51,259,674 ^b	8 (7/1)	1	<i>NRXN1</i>	1×10^{-7}	4×10^{-8}
➤ 3q29	chr3:195,747,398-196,191,434	4 (4/0)	7	–	0.07	0.02
➤ 7q11.23	chr7:72,773,570-74,144,177	5 (1/4)	22	–	0.005	0.0008
➤ 7q11.23	chr7:72,773,570-73,158,061 ^c	6 (1/5)	10	–	0.0002	0.00003
➤ 7q11.23	chr7:73,978,801-74,144,177 ^c	6 (1/5)	2	<i>GTF2I, GTF2IRD1</i>	0.0002	0.00003
➤ 15q11.2-13.1	chr15:23,683,783-28,446,765	10 (0/10)	13	–	$<1 \times 10^{-10}$	$<1 \times 10^{-10}$
➤ 15q12	chr15:26,971,834-27,548,820 ^d	11 (0/11)	3	<i>GABRA5, GABRB3, GABRG3</i>	$<1 \times 10^{-10}$	$<1 \times 10^{-10}$
➤ 15q13.2-13.3	chr15:30,943,512-32,515,849	5 (3/2)	7	–	0.005	0.0008
➤ 16p11.2	chr16:29,655,864-30,195,048	19 (12/7)	27	–	$<1 \times 10^{-10}$	$<1 \times 10^{-10}$
➤ 22q11.21	chr22:18,889,490-21,463,730	8 (4/4)	45	–	1×10^{-7}	4×10^{-8}
➤ 22q13.33	chr22:51,123,505-51,174,548	4 (4/0)	1	<i>SHANK3</i>	0.07	0.02

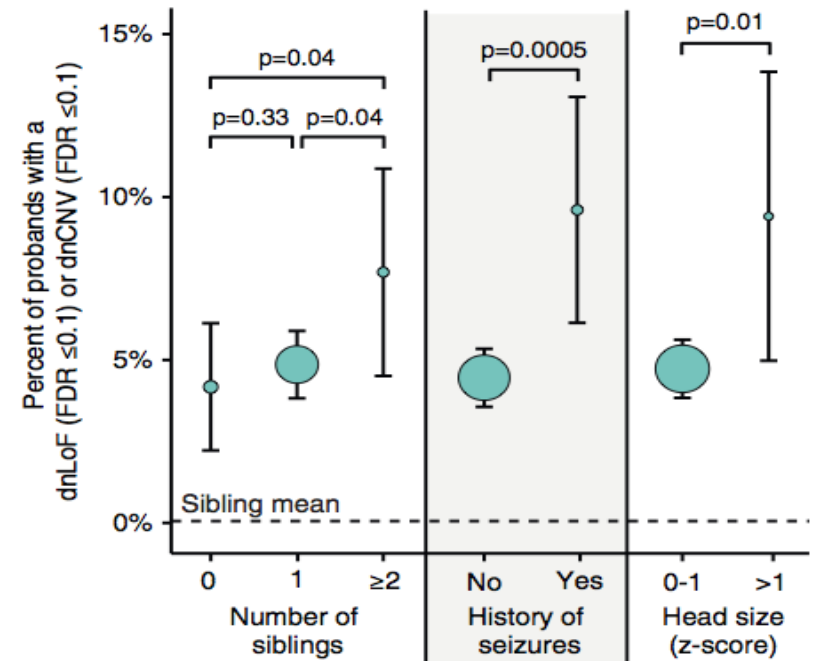
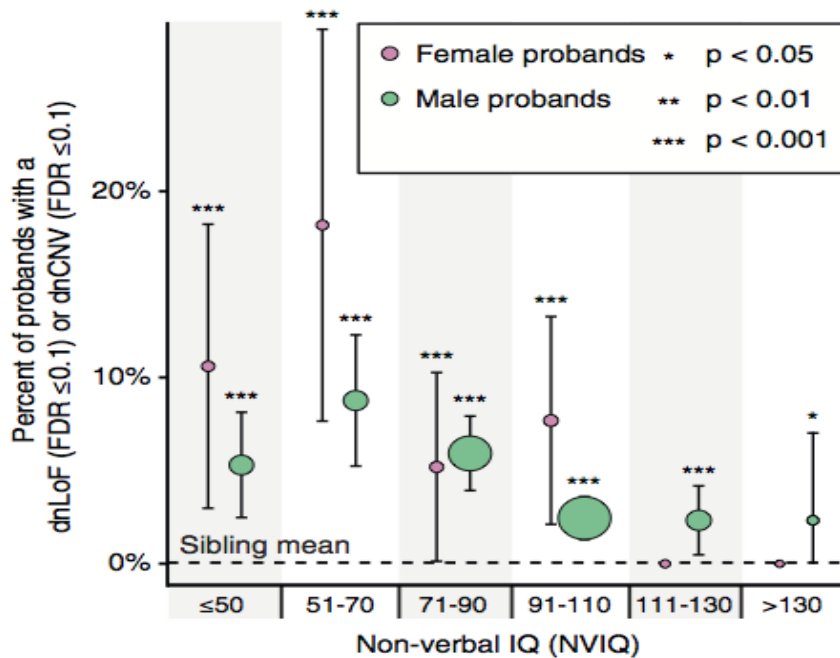
^aWhere ≤ 3 genes are present they are listed to clarify the genomic location.

^bEight dnCNVs overlap at least one exon of this gene.

^cThese are the regions of intersection between two atypical dnCNVs and the Williams-Beuren Syndrome locus (see [Figure S5](#)).

^dThis is the region of intersection between an atypical dnCNV and the 15q11.2-13.1 locus (see [Figure 6F](#)).

Fenotipo asociado a las mutaciones de novo



NO asociación con:

- Edad materna/paterna elevada
- Retraso en el desarrollo

Utilidad clínica limitada:

“...a pesar de la asociación entre el CINV y la presencia de mutaciones de novo, un bajo CINV no garantiza la presencia de una variante de novo un alto CINV no excluye la posible asociación con una variante de novo.”

Fenotipo

Varón de 7 años, autismo no sindrómico.



Cariotipo Normal

X-Frágil Normal



Array 180K Normal



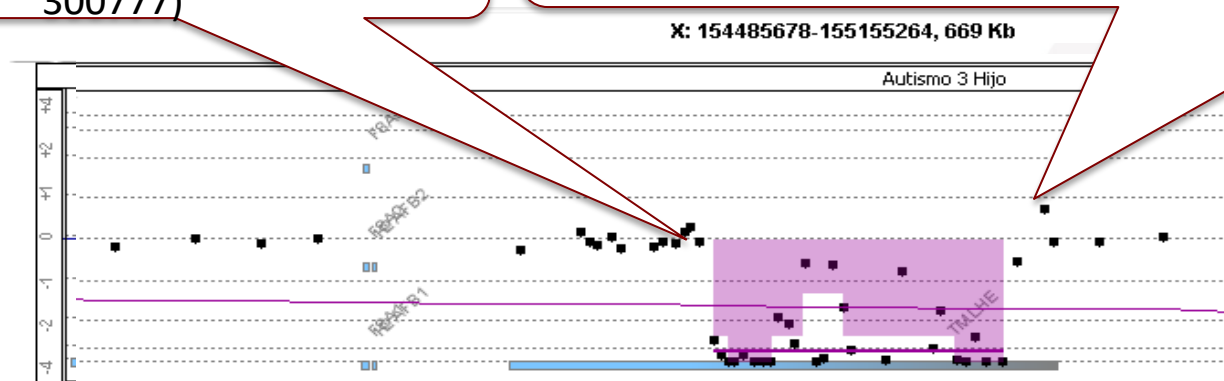
CGH array de diseño específico

Array 180K de diseño específico

Delección hemicigota Xq28 de 70 Kb
Exon 2 del gen *TMLHE* (OMIM *
300777)

Diagnostico:
Susceptibilidad a autismo ligada al X 6 (#300872)

Probando
Array 180K-
Autismo



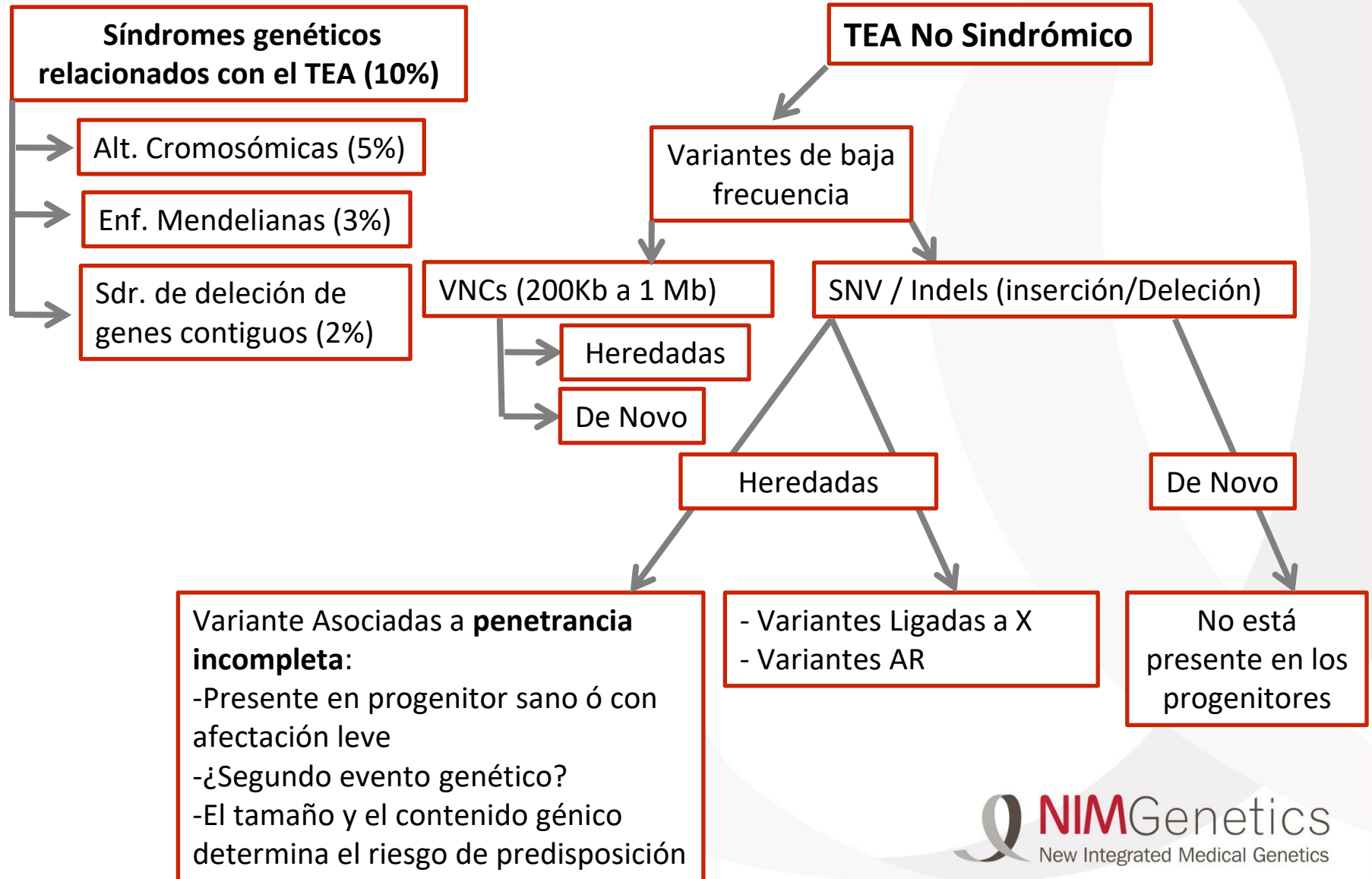
Presentación Clínica:

- Discapacidad intelectual/retraso del desarrollo
- Trastorno espectro autista (incluyendo Asperger)
- Expresividad variable

Human Molecular Genetics, 2011, Vol. 20, No. 22 4360-4370
doi:10.1093/hmg/ddr363
Advance Access published on August 24, 2011

Use of array CGH to detect exonic copy number variants throughout the genome in autism families detects a novel deletion in *TMLHE*

Arquitectura Genética en el TEA



LETTER

doi:10.1038/nature10945

De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism

Stephan J. Sanders¹, Michael T. Murtha¹, Abha R. Gupta^{2*}, John D. Murdoch^{1*}, Melanie J. Raubeson^{1*}, A. Jeremy Willsey^{1*}, . Walker¹, Gordon T. Ober¹, Robert D. Bjornson⁵, Lifton⁴, Murat Günel⁷,

LETTER

doi:10.1038/nature10989

Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of *de novo* mutations

Brian J. O’Roak¹, Laura Vives¹, Santhosh Girirajan¹, En Joshua D. Smith¹, Emily H. Turner¹, Ian B. Stanaway¹, Elhanan Borenstein^{1,3,4}, Mark J. Rieder¹, Deborah A.

nature
genetics

Excess of rare, inherited truncating mutations in autism

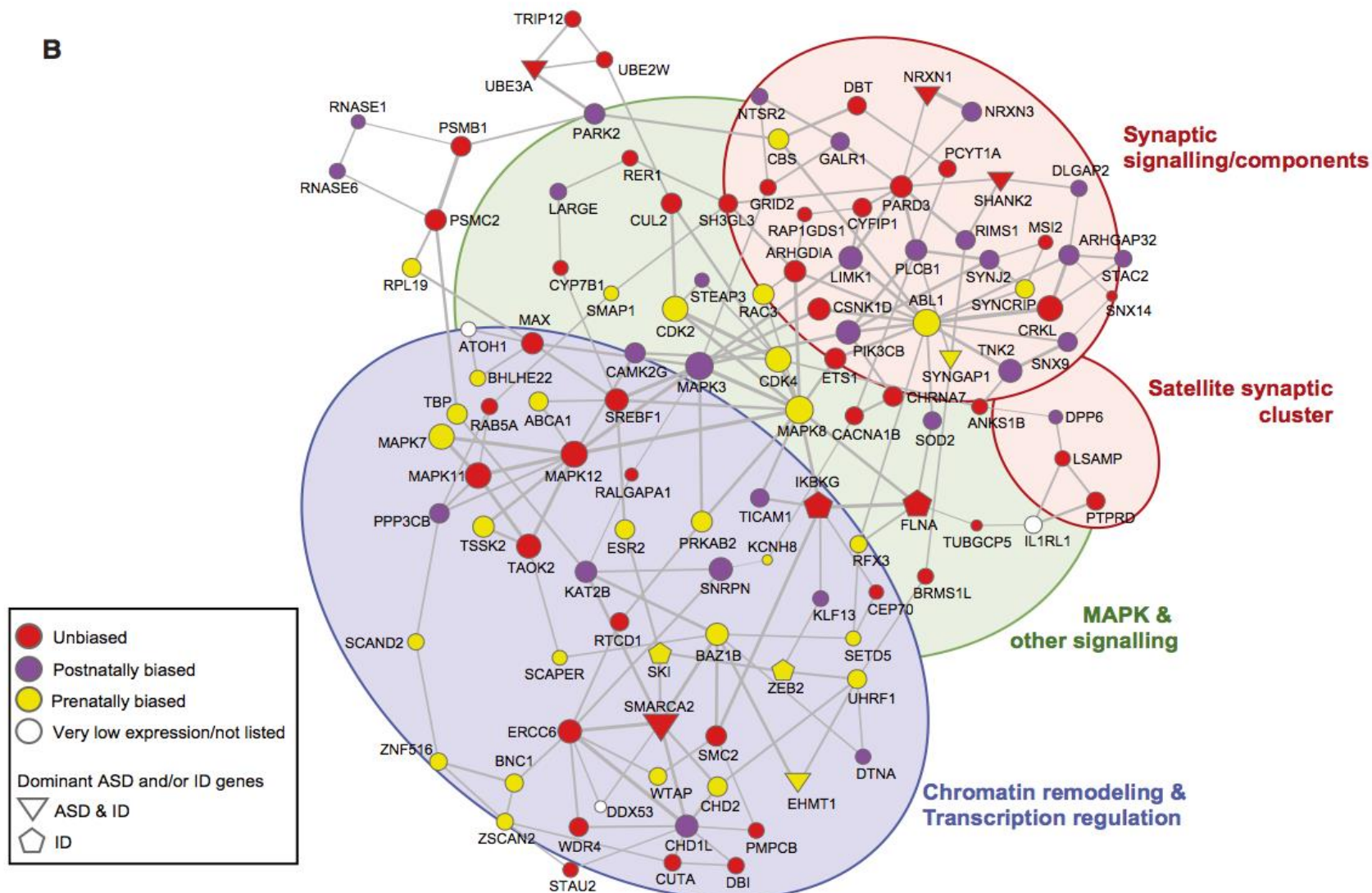
Niklas Krumm^{1,5}, Tychele N Turner^{1,5}, Carl Baker¹, Laura Vives¹, Kiana Mohajer¹, Kali Witherspoon¹, Archana Raja^{1,2}, Bradley P Coe¹, Holly A Stessman¹, Zong-Xiao He³, Suzanne M Leal³, Raphael Bernier⁴ & Evan E Eichler^{1,2}

To assess the relative impact of inherited and *de novo* variants on autism risk, we generated a comprehensive set of exonic single-nucleotide variants (SNVs) and copy number variants (CNVs) from 2,377 families with autism. We find that private, inherited truncating SNVs in conserved genes are enriched in probands (odds ratio = 1.14, $P = 0.0002$) in comparison to unaffected siblings, an effect involving significant maternal transmission bias to sons. We also observe a bias for inherited CNVs, specifically for small (<100 kb), maternally inherited events ($P = 0.01$) that are enriched in CHD8 target genes ($P = 7.4 \times 10^{-3}$). Using a logistic regression model, we show that private truncating SNVs and rare, inherited CNVs are statistically independent risk factors for autism, with odds ratios of 1.11 ($P = 0.0002$) and 1.23 ($P = 0.01$), respectively. This analysis identifies a second class of candidate genes (for example, *RIMS1*, *CUL7* and *LZTR1*) where transmitted mutations may create a sensitized background but are unlikely to be completely penetrant.

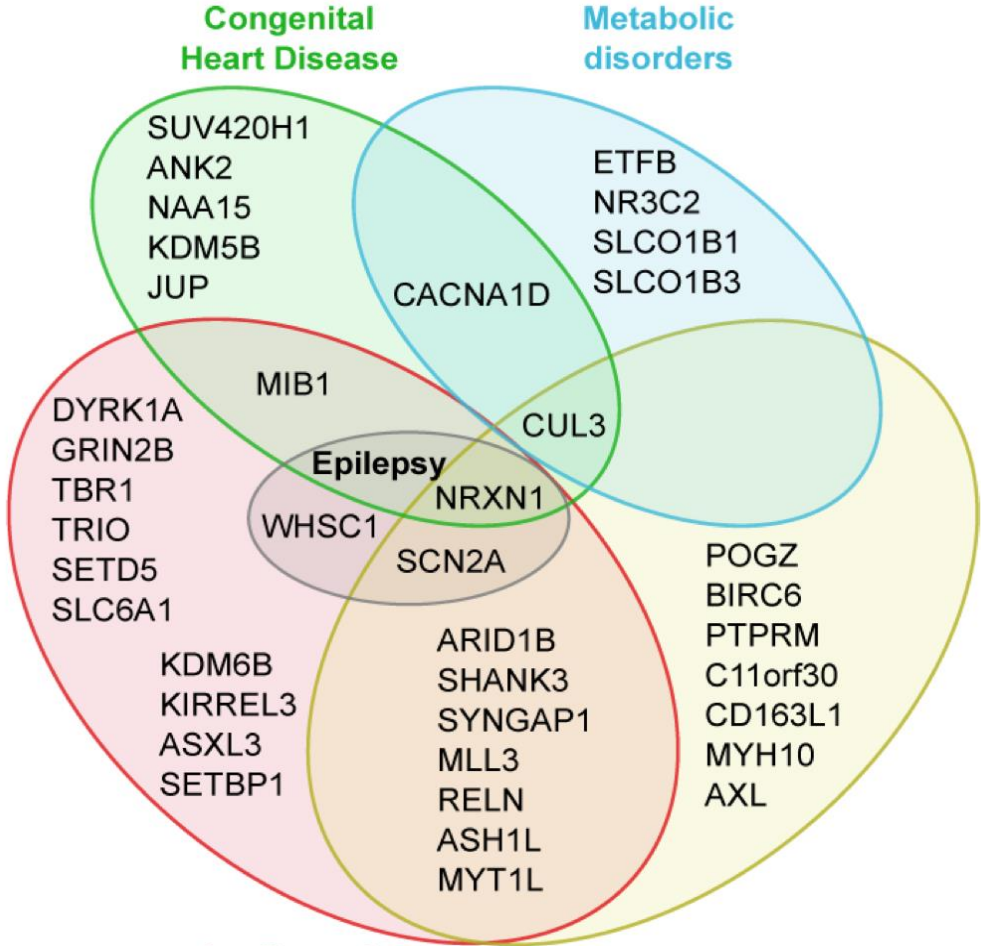
Las Técnicas de secuenciación masiva aceleran y simplifican el diagnóstico Genético

- 1.- Permiten analizar simultáneamente **múltiples genes** incluidos en el diagnóstico diferencial a un coste y en un tiempo que se acerca al del estudio de un gen único.
- 2.- Facilitan **el análisis de genes previamente no analizados** por tecnologías convencionales
- 3.- Permiten identificar genes no incluidos en el diagnóstico diferencial. La posibilidad de **“echar la red”** es especialmente importante en:
 - En enfermedades raras ó con alteraciones en genes de reciente identificación
 - En presentaciones clínicas parciales ó atípicas

Los genes asociados a TEA están implicados en la sinapsis,
la transcripción y la regulación de la cromatina



Los genes asociados a TEA están implicados en diversos trastornos de origen genético



Las pequeñas VNCs de novo (<200Kb) y las mutaciones de pérdida de función de novo se concentran en los mismos genes.

Los genes incluidos en Las grandes VNCs (>200Kb <1MB) y los identificados con mutaciones de novo son distintos

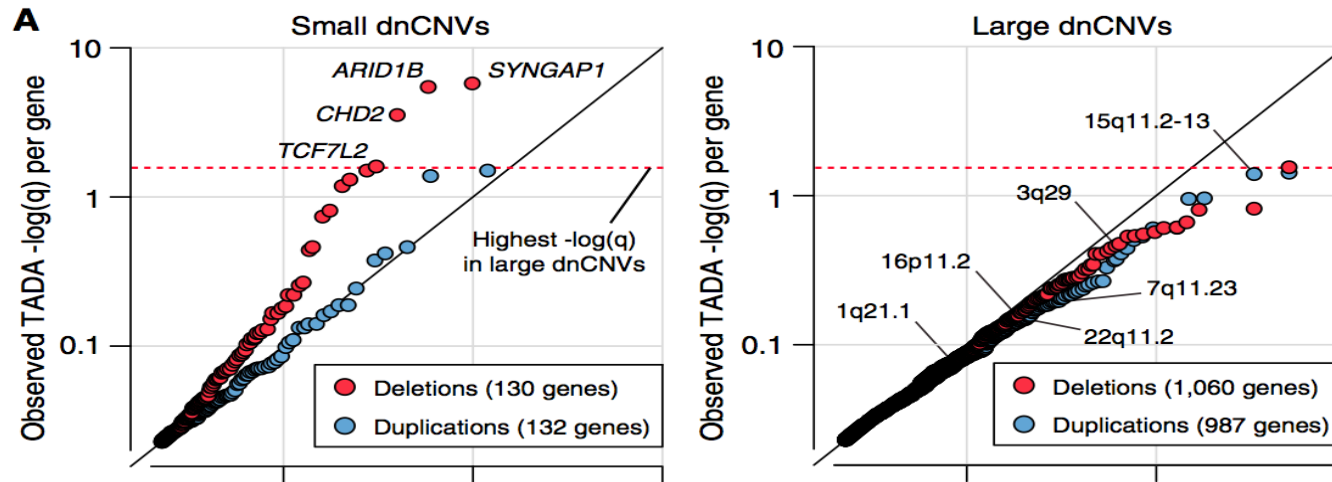


Table 4. Integrating Small De Novo Deletions in TADA Identified 65 ASD Genes

dnLoF Count	FDR $\leq$ 0.01	0.01 < FDR $\leq$ 0.05	0.05 < FDR $\leq$ 0.1
≥ 2	ADNP, ANK2, ARID1B , ASH1L, CHD2 , CHD8, CUL3, DSCAM, DYRK1A, GRIN2B, KATNAL2, KDM5B, KMT2C , NCKAP1, POGZ, SCN2A, SUV420H1, SYNGAP1 , TBR1, TCF7L2 , TNRC6B , WAC	BCL11A, FOXP1, GIGYF1, ILF2, KDM6B, PHF2, RANBP17, SPAST, WDFY3	DIP2A, KMT2E
1	NRXN1 , PTEN, SETD5 , SHANK2 , SHANK3 , TRIP12	DNMT3A, GABRB3, KAT2B , MFRP, MYT1L, P2RX5	AKAP9, APH1A, CTTNBP2, ERBB2IP, ETFB, INTS6, IRF2BPL, MBD5 , NAA15, NINL, OR52M1, PTK7, TRIO, USP45
0	–	MIB1, SLC6A1, ZNF559	ACHE, CAPN12, NLGN3

Genes with a small de novo deletion are in bold. FDR, false discovery rate.

El 10% de los TEA presenta alteraciones genéticas “de novo”
en regiones ó genes previamente implicados en trastornos del
neurodesarrollo

Category of de novo mutation	Percent of cohort with a mutation				Percent of cases with a mutation contributing to ASD risk (95% CI)		
	Proband			Siblings	Proband		
	All	Male	Female		All	Male	Female
Deletions	3.1%	2.7%	6.0%	1.0%	2.2% (1.1%–3.2%)	1.8% (0.8%–2.5%)	5.0% (2.3%–8.4%)
Duplications	2.7%	2.7%	2.8%	0.8%	1.9% (1.2%–2.6%)	1.9% (1.0%–3.0%)	2.0% (0.2%–4.3%)
All CNVs	5.8%	5.3%	8.7%	1.7%	4.1% (2.6-5.7%)	3.6% (2.3%–4.9%)	7.0% (3.2%–11.4%)
Nonsense	5.9%	6.0%	5.0%	2.8%	3.1% (1.4-4.4%)	3.2% (1.8%–4.9%)	2.2% (0.0%–6.2%)
Splice Site	2.4%	1.9%	6.0%	1.1%	1.3% (0.5-2.3%)	0.7% (0.0%–1.5%)	4.8% (1.5%–8.8%)
Frameshift	7.8%	7.7%	8.7%	4.8%	3.0% (1.2-4.8%)	2.9% (1.2%–4.4%)	3.9% (0.2%–7.5%)
All LoF	15.4%	14.9%	18.8%	8.5%	6.9% (4.9-8.9%)	6.4% (3.9%–8.8%)	10.3% (6.3%–16.2%)
All LoFs and CNVs	20.6%	19.7%	26.6%	10.1%	10.5% (7.8-13.1%)	9.6% (6.8%–12.0%)	16.6% (11.4%–22.6%)

En mujeres con TEA se observa una
mayor acumulacion de variates de novo
¿Efecto protector?

Original Investigation

Molecular Diagnostic Yield of Chromosomal Microarray Analysis and Whole-Exome Sequencing in Children With Autism Spectrum Disorder

Positive Results	Essential Group	Equivocal Group	Complex Group	P Value for 3-Group Comparison
CMA, No./total No.	7/168	4/37	13/53	<.001
% (95% CI)	4.2 (1.7-8.4)	10.8 (3.0-25.4)	24.5 (13.8-38.3)	
WES, No./total No.	2/64	2/7	4/24	.02
% (95% CI)	3.1 (0.0-10.8)	28.6 (3.7-71.0)	16.7 (4.7-37.4)	
CMA and/or WES, No./total No.	4/64	2/7	9/24	.001
% (95% CI)	6.3 (1.7-15.2)	28.6 (3.7-71.0)	37.5 (18.8-59.4)	

Alteraciones Dismorfológicas ó microcefalia

Tammimies K et al. JAMA. 2015 Sep 1;314(9):895-903.

Fenotipo:

Niña de 3 años y 4 meses de edad que sufre un cuadro de retraso cognitivo y comportamiento autista con esterotipias. fenotipo que recuerda en algunos aspectos al del Síndrome de Williams, aunque no se enmarcarían en ese cuadro respecto al fenotipo conductual.

AF: una hermana gemela que presenta el mismo fenotipo



Cariotipo Normal

FISH de la región causal de los Síndromes de Angelman / Prader-Willi NEGATIVO

Estudio mediante MLPA de deleciones subteloméricas NEGATIVO

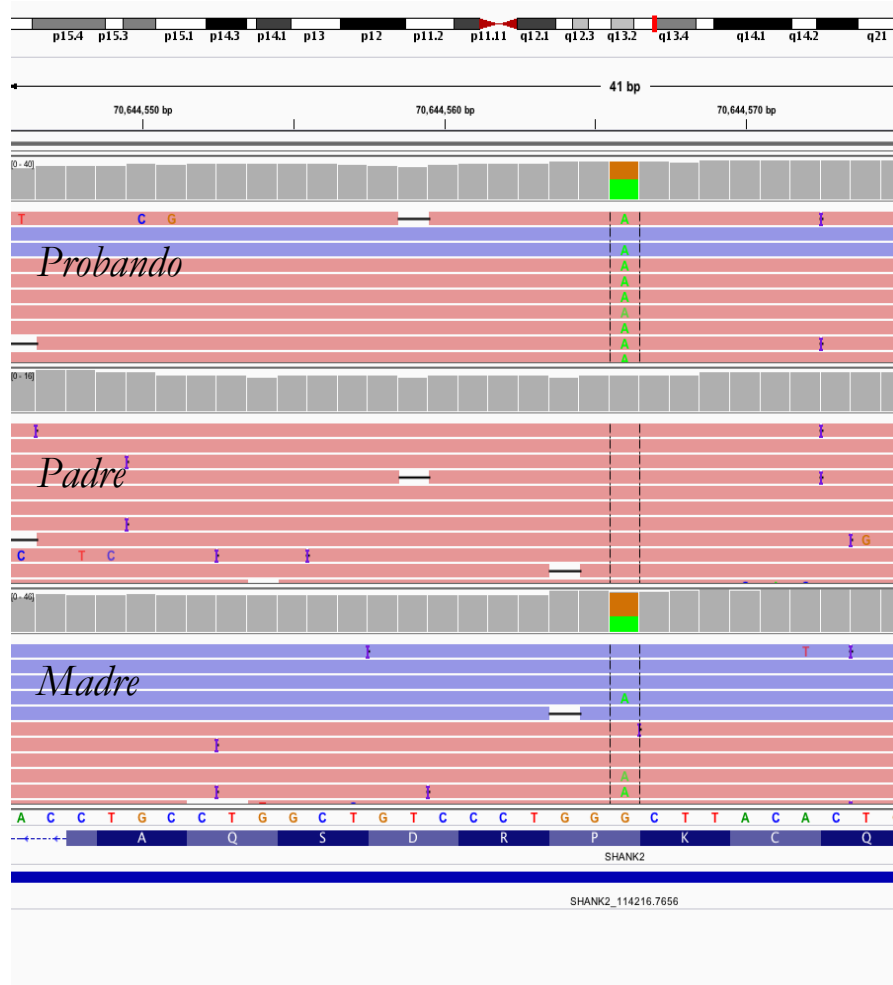
Síndrome de Rett: mutaciones y deleciones/duplicaciones en el gen MECP2 NEGATIVO

Array 180K Autismo NORMAL

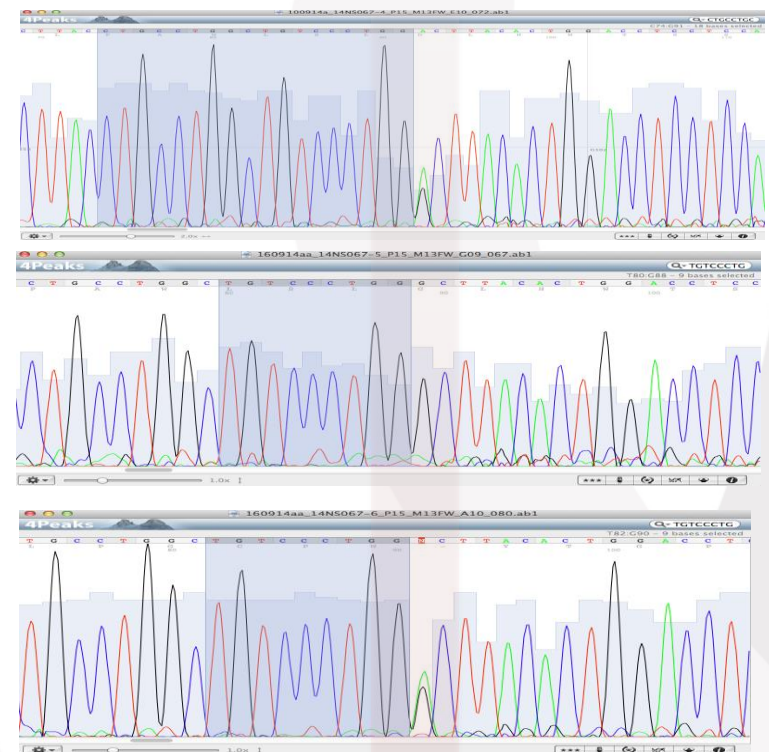


Exoma Trio

Visualización en IGV



Validación Sanger



Variant Predictors

SIFT	PolyPhen2	LRT	MutationTaster	Mutation Assessor	FATHMM
D	D	N	N	H	D

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS GENETICS

Genetic and Functional Analyses of *SHANK2* Mutations Suggest a Multiple Hit Model of Autism Spectrum Disorders

PLoS Genetics (2012); 8(2): e1002521nature
genetics

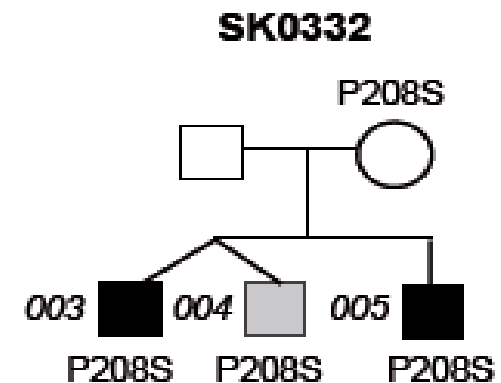
Mutations in the *SHANK2* synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation

Simone Berkel¹, Christian R Marshall², Birgit Weiss¹, Jennifer Howe², Ralph Roeth¹, Ute Moog³, Volker Endris¹, Wendy Roberts⁴, Peter Szatmari⁵, Dalila Pinto², Michael Bonin⁶, Angelika Riess⁶, Hartmut Engels⁷, Rolf Sprengel⁸, Stephen W Scherer^{2,9} & Gudrun A Rappold¹

Nat Genet. 2010 Jun;42(6):489-91.

Inherited and *de novo* *SHANK2* variants associated with autism spectrum disorder impair neuronal morphogenesis and physiology

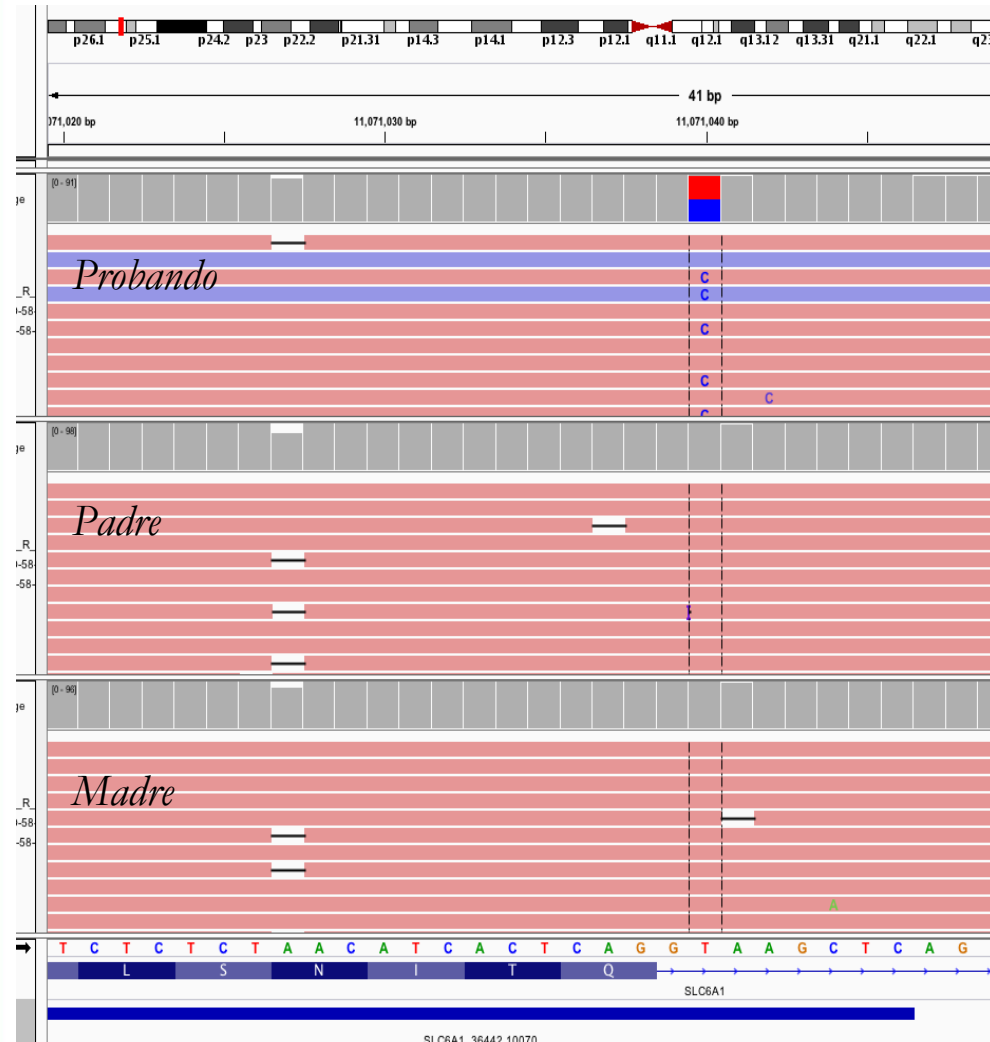
Simone Berkel¹, Wannan Tang³, Mario Treviño³, Miriam Vogt⁴, Horst Andreas Obenhaus³, Peter Gass⁴, Stephen Wayne Scherer^{5,6}, Rolf Sprengel³, Gerhard Schratt^{2,7} and Gudrun Anna Rappold^{1,2,*}

Human Molecular Genetics, 2012, Vol. 21, No. 2 344–357

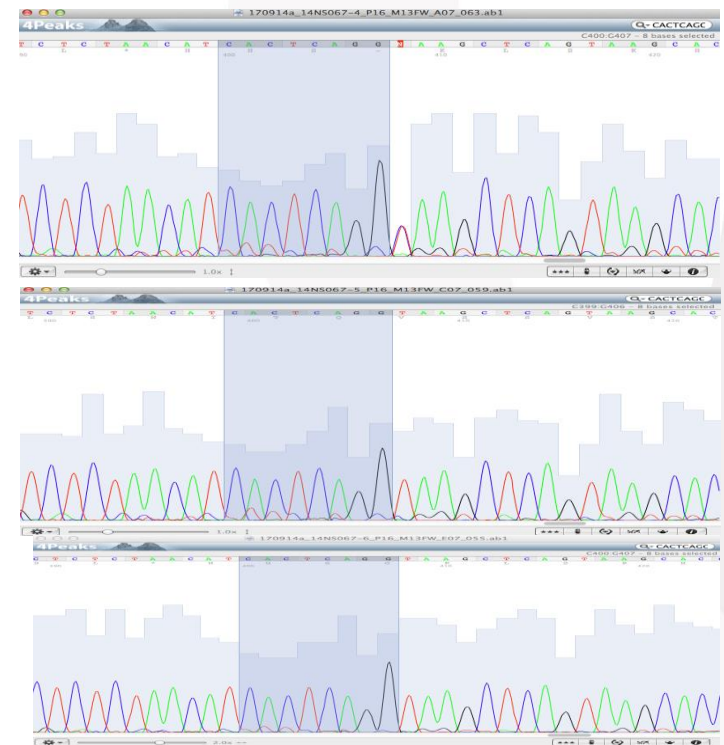
14NS0067 (ASD)

SLC6A1 (c.1323+2T>C) "de novo" mutation

Visualización en IGV



Validación Sanger



Predictores de Splicing

Donor Sites

	SSF [0-100]	MaxEnt [0-12]	NNSPLICE [0-1]	GeneSplicer [0-15]	HSF [0-100]
<i>Threshold</i>	≥ 70	≥ 0	≥ 0.4	≥ 0	≥ 60
Exon 12 - c.1278					= 66.62
Exon 12 - c.1303					= 67.43
Exon 12 - c.1323 N	94.22 $\Rightarrow$ 91.79 (-2.6%)	9.88 $\Rightarrow$ —	1.00 $\Rightarrow$ —	13.12 $\Rightarrow$ —	97.82 $\Rightarrow$ —
Intron 12 - c.1323+9		= 5.59	= 0.79	8.32 $\Rightarrow$ 9.17 (+10.2%)	= 80.52

Natural Splice Site

LETTER

doi:10.1038/nature10945

De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism

Stephan J. Sanders¹, Michael T. Murtha¹, Abha R. Gupta^{2*}, John D. Murdoch^{1*}, Melanie J. Raubeson^{1*}, A. Jeremy Willsey^{1*}, A. Gulhan Ercan-Sencicek^{1*}, Nicholas M. DiLullo^{1*}, Neelroop N. Parikshak³, Jason L. Stein³, Michael F. Walker³, Gordon T. Ober¹, Nicole A. Teran¹, Youeun Song¹, Paul El-Fishawy¹, Ryan C. Murtha¹, Murim Choi⁴, John D. Overton⁴, Robert D. Bjornson⁵, Nicholas J. Carriero³, Kyle A. Meyer⁶, Kaya Bilguvar¹, Shrikant M. Mane⁸, Nenad Sestan⁶, Richard P. Lifton⁴, Murat Günel⁷, Kathryn Roeder⁹, Daniel H. Geschwind³, Bernie Devlin¹⁰ & Matthew W. State¹

Nature. 2012 Apr 4;485(7397):237-41

Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study

Anita Rauch*, Dagmar Wieczorek*, Elisabeth Graf*, Thomas Wieland*, Sabine Ende, Thomas Schwarzmayr, Beate Albrecht, Deborah Bartholdi, Jasmin Beygo, Nataliya Di Donato, Andreas Dufke, Kirsten Cremer, Maja Hempel, Denise Horn, Juliane Hoyer, Pascal Joset, Albrecht Röpke, Ute Moog, Angelika Riess, Christian T Thiel, Andreas Tzschach, Antje Wiesener, Eva Wohlbeber, Christiane Zweier, Arif B Ekici, Alexander M Zink, Andreas Rump, Christa Meisinger, Harald Grallert, Heinrich Sticht, Annette Schenk, Hartmut Engels, Gudrun Rappold, Evelin Schröck, Peter Wieacker, Olaf Riess, Thomas Meitinger, André Reist, Tim M Strom

Lancet. 2012 Nov 10;380(9854):1674-82.

3p25.3 Microdeletion of GABA Transporters *SLC6A1* and *SLC6A11* Results in Intellectual Disability, Epilepsy and Stereotypic Behavior

Nicola Dikow,^{1*} Bianca Maas,² Stephanie Karch,² Martin Granzow,¹ Johannes W.G. Janssen,¹ Anna Jauch,¹ Katrin Hinderhofer,¹ Christian Sutter,¹ Susanne Schubert-Bast,² Britt Marie Anderlid,³ Bruno Dallapiccola,⁴ Nathalie Van der Aa,⁵ and Ute Moog¹

¹Institute of Human Genetics, Heidelberg University, Heidelberg, Germany²Center for Child and Adolescent Medicine Pediatric Neurology, Heidelberg University Hospital, Heidelberg, Germany³Institution of Molecular Medicine and Surgery, CMM, Karolinska Institutet and Department of Clinical Genetics, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden⁴Ospedale Pediatrico Bambino Gesù—IRCCS Roma, Italy⁵Department of Medical Genetics, Antwerp University Hospital and University of Antwerp, Antwerp, Belgium

Manuscript Received: 2 May 2014; Manuscript Accepted: 10 August 2014

Am J Med Genet A. 2014 Dec;164A(12):3061-8.

Mutations in the GABA Transporter *SLC6A1* Cause Epilepsy with Myoclonic-Atonic Seizures

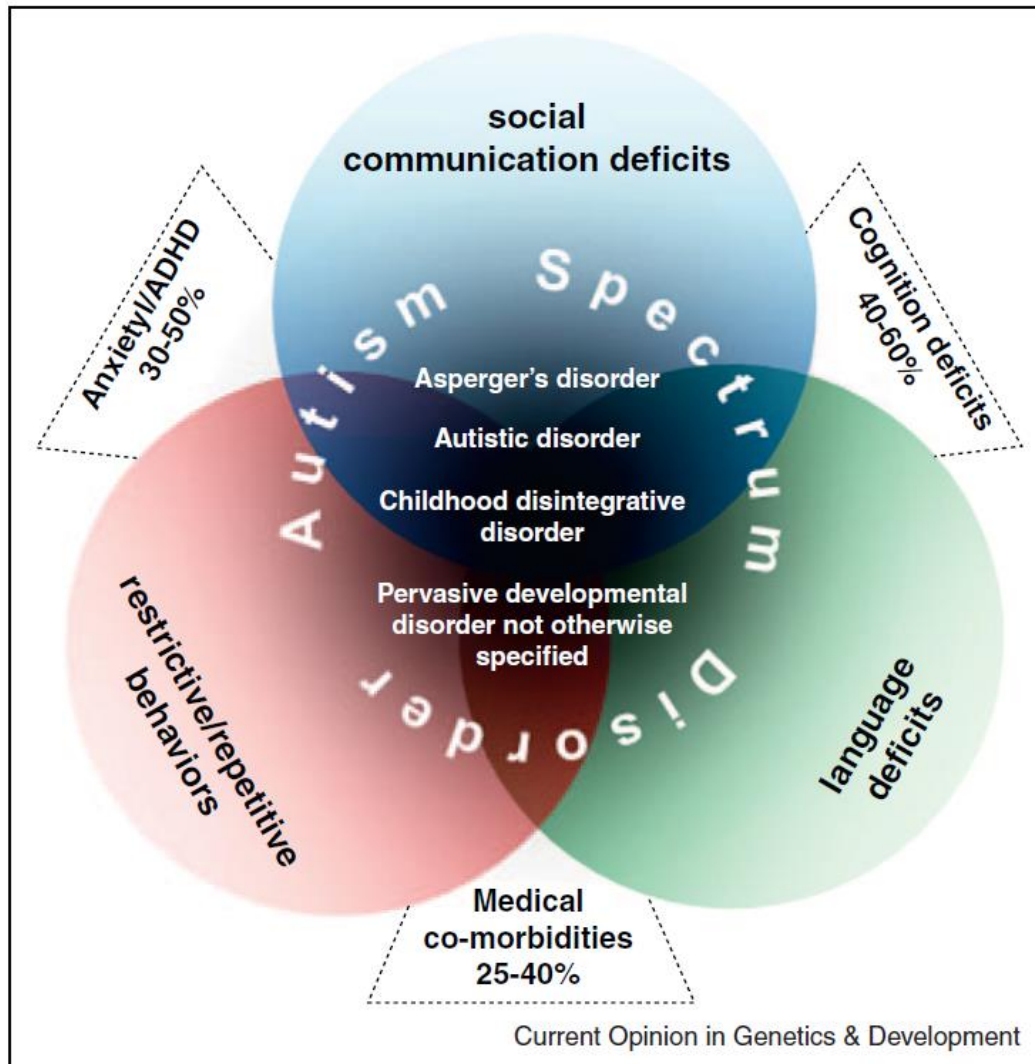
Gemma L. Carvill,¹ Jacinta M. McMahon,² Amy Schneider,² Matthew Zemel,¹ Candace T. Myers,¹ Julia Saykally,¹ John Nguyen,¹ Angela Robbiano,³ Federico Zara,³ Nicola Specchio,⁴ Oriano Mecarelli,⁵ Robert L. Smith,⁶ Richard J. Leventer,^{7,8,9} Rikke S. Møller,^{10,11} Marina Nikanorova,¹⁰ Petia Dimova,¹² Albena Jordanova,^{13,14,15} Steven Petrou,¹⁶ EuroEPINOMICS Rare Epilepsy Syndrome Myoclonic-Astatic Epilepsy & Dravet working group, Ingo Helbig,^{17,18} Pasquale Striano,¹⁹ Sarah Weckhuysen,^{13,14,20} Samuel F. Berkovic,² Ingrid E. Scheffer,^{2,7,16,21,*} and Heather C. Mefford^{1,21,*}

The American Journal of Human Genetics 96, 808–815, May 7, 2015

3

La Heredabilidad del TEA

Trastorno del espectro autista (TEA): Entidad compleja clínica y genéticamente



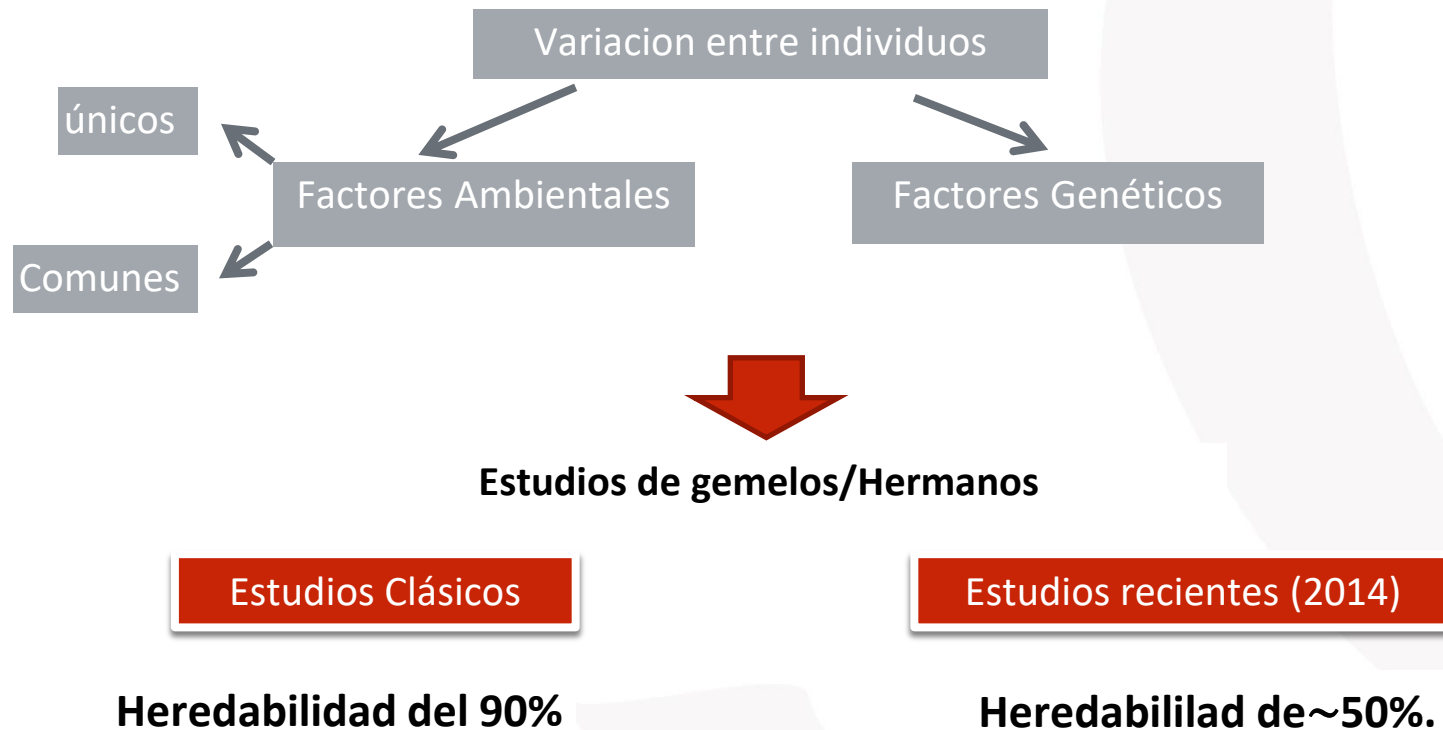
- Trastorno altamente Heterogéneo
- **Alta Prevalencia (>1%) de la población**
- Relación Hombre/Mujer 4:1
- **Alta heredabilidad**
- **Presentación clínica caracterizada por**
 - Dificultad en la Interacción social
 - Deficit comunicación verbal y no verbal
 - Comportamientos o intereses repetitivos

Adicionalmente, esos trastornos pueden asociarse a:

- alteraciones neurológicas (epilepsia, esquizofrenia ó deficit intelectual)
- manifestaciones clínicas (pej: dismorfias ó problemas gastrointestinales)
- Trastornos del comportamentales (ansiedad, TDAH y otras complicaciones médicas complejas asociadas)

Definición

Proporción de la variación de un rasgo fenotípico entre los individuos de una población que en un momento determinado puede ser atribuible a diferencias genéticas.



Estudios de gemelos/Hermanos más grande realizado

Registro de todos los niños suecos nacidos entre 1982 y 2007 asociado al registro de todos los niños diagnosticados de TEA antes de los 10 años

1.6 millones de familias con al menos dos hijos:

- 5,799,875 parejas de primos
- 2,642,064 Hermanos de padre y madre
- 432,281 hermanos de madre
- 445,531 hermanos de padre
- 37,570 Mellizos y Gemelos

14,516 casos de TEA

5,689 (39%) de Trastorno autista

Características del Estudio:

- Estudio Homogeneo que permite estimar el riesgo de recurrencia
- Controla factores como:

Edad Materna

Antecedentes Psiquiatricos en la familia

Ratio Niños/Niñas

Exposición ambiental a factores únicos (NO a factores comunes)

Una heredabilidad estimada del 50% sugiere que los factores genéticos explican el 50% del riesgo

Table 2. Autism Spectrum Disorder and Autistic Disorder Heritability

Models, Terms Included ^b	Model Comparison Measures				Estimated Variance (95% CI) ^a				
	No. of Parameters in the Model	-2 LL	Diff -2 LL	P Value ^c	Additive Genetic ^d	Dominant Genetic	Environment		Total Genetic ^e
							Shared	Nonshared	
Autism spectrum disorder									
Full model ^f	14	143 910	NA	NA	0.33 (0.00-0.55)	0.16 (0.00-0.59)	0.05 (0.00-0.17)	0.46 (0.24-0.65)	0.49 (0.21-0.75)
Excluding the dominant genetic term	13	143 910	0.7	.41	0.42 (0.19-0.55)	NA	0.04 (0.00-0.15)	0.54 (0.45-0.66)	0.42 (0.19-0.55)
Excluding the shared environment term	13	143 911	0.8	.38	0.44 (0.24-0.55)	0.13 (0.00-0.51)	NA	0.43 (0.23-0.55)	0.57 (0.45-0.77)
Excluding the additive genetic term	13	143 913	3.0	.08	NA	0.45 (0.18-0.71)	0.14 (0.07-0.20)	0.41 (0.21-0.62)	0.45 (0.18-0.71)
Additive genetic + nonshared environment	12	143 911	1.2	.55	0.50 (0.45-0.56)	NA	NA	0.50 (0.44-0.55)	0.50 (0.45-0.56)
Dominant genetic + nonshared environment	12	143 934	23.8	<.001	NA	1.00 (1.00-1.00)	NA	0.00 (0.00-0.00)	1.00 (1.00-1.00)
Shared + nonshared environment term	12	143 923	13.3	.001	NA	NA	0.24 (0.21-0.26)	0.76 (0.73-0.79)	NA
Nonshared environment term only	11	144 178	268.8	<.001	NA	NA	NA	1.00 (1.00-1.00)	NA

Abbreviations: Diff -2 LL, 2 * difference in log-likelihood between the model and the full model; NA, not applicable; -2 LL, -2 * log-likelihood.

^a The 95% CIs are 2-sided.

^b All models adjusted for sex and birth cohort.

^c P value for the testing the hypothesis: the parameters not in the model but in the full model are all equal to zero.

^d Additive genetic indicates narrow-sense heritability, which only includes the additive genetic component.

^e Total genetic indicates broad-sense heritability, which includes both the additive and the dominant genetic.

^f Full model includes terms for additive genetic, dominant genetic, shared environment, and nonshared environment (usually referred to as an ACDE model).

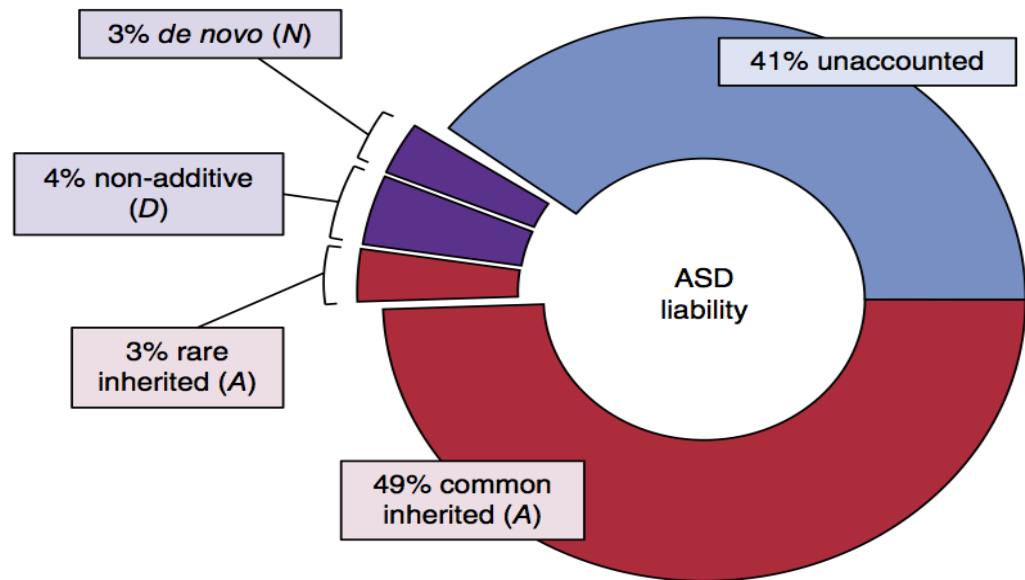
Most genetic risk for autism resides with common variation

Trent Gaugler¹, Lambertus Klei², Stephan J Sanders^{3,4}, Corneliu A Bodea¹, Arthur P Goldberg⁵⁻⁷, Ann B Lee¹, Milind Mahajan⁸, Dina Manaa⁸, Yudi Pawitan⁹, Jennifer Reichert^{5,6}, Stephan Ripke¹⁰, Sven Sandin⁹, Pamela Sklar^{6-8,11,12}, Oscar Svantesson⁹, Abraham Reichenberg^{5,6,13}, Christina M Hultman⁹, Bernie Devlin², Kathryn Roeder^{1,14} & Joseph D Buxbaum^{5,6,8,11,15,16}

Estudio de 531.906 SNPs

N=3046 individuos

- 466 con TEA
- 2580 controles



Most genetic risk for autism resides with common variation

Trent Gaugler¹, Lambertus Klei², Stephan J Sanders^{3,4}, Corneliu A Bodea¹, Arthur P Goldberg⁵⁻⁷, Ann B Lee¹, Milind Mahajan⁸, Dina Manaa⁸, Yudi Pawitan⁹, Jennifer Reichert^{5,6}, Stephan Ripke¹⁰, Sven Sandin⁹, Pamela Sklar^{6-8,11,12}, Oscar Svantesson⁹, Abraham Reichenberg^{5,6,13}, Christina M Hultman⁹, Bernie Devlin², Kathryn Roeder^{1,14} & Joseph D Buxbaum^{5,6,8,11,15,16}

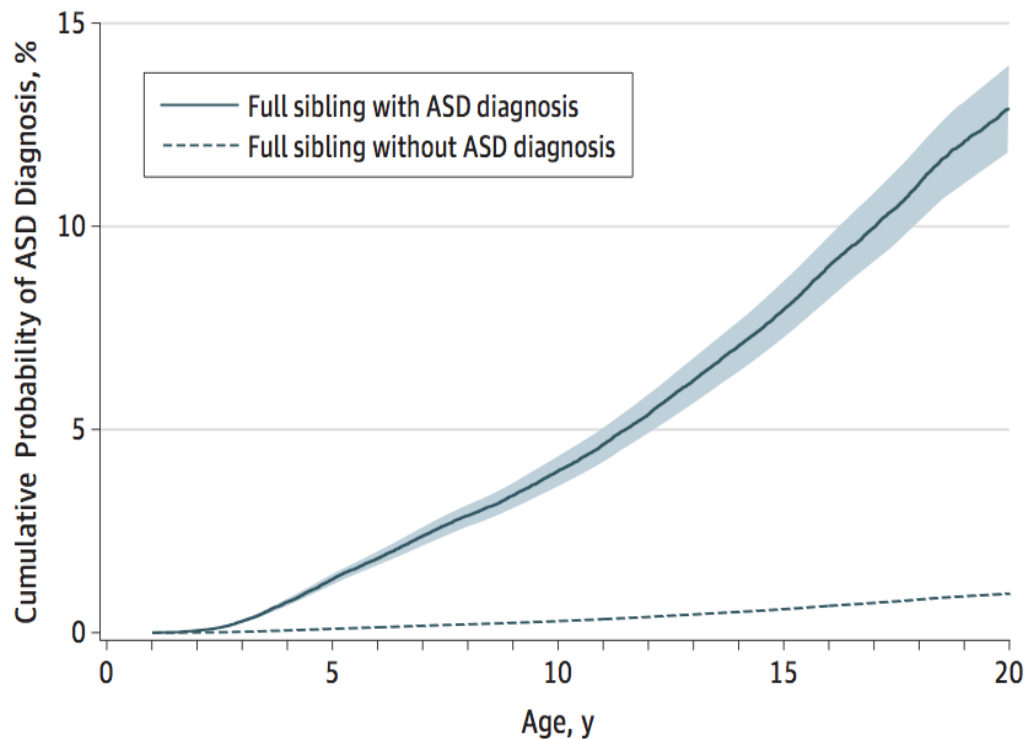
La mayor parte del riesgo genético para el autismo proviene de versiones de genes que son comunes en la población (SNPs) y no de variantes raras o erróneas (mutaciones)

La variación genética probablemente representa aproximadamente el 60 por ciento de la responsabilidad del autismo, con variantes comunes que comprenden la mayor parte de su arquitectura genética

«A pesar de que cada una ejerce sólo un efecto pequeño individualmente, estas variaciones comunes en el código genético suman un impacto sustancial en su conjunto»

Las mutaciones “de novo” contribuyen a un modesto 2,6% del riesgo total.

Figure 1. Age-Cumulative Probabilities for ASD Diagnosis in Siblings With a Full Sibling With ASD and in Siblings With a Full Sibling Without an ASD Diagnosis



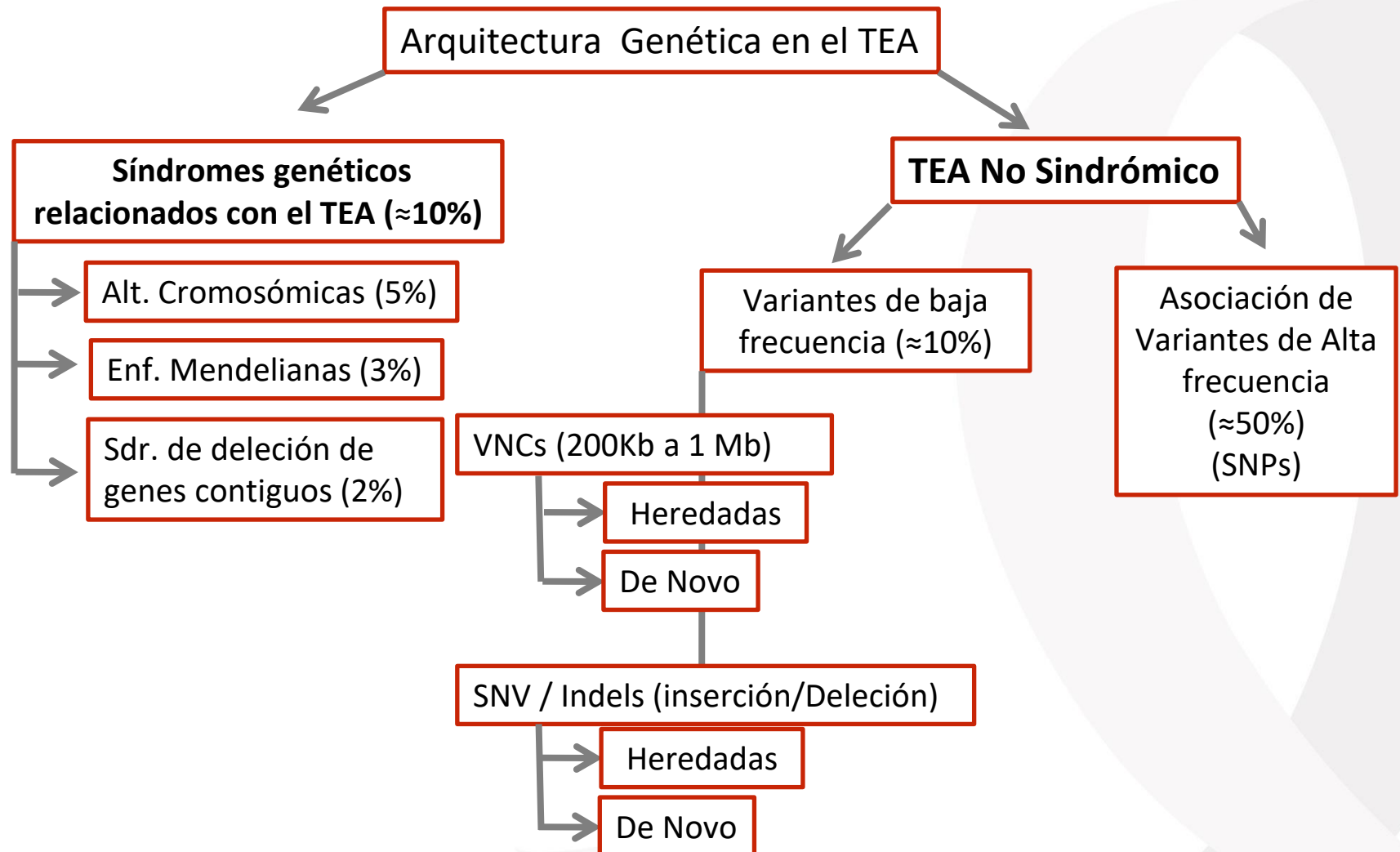
RRR Hermano de padre y madre = 10.3

RRR en Hermano de madre = 3.3

RRR en Hermano de padre = 2.9

RRR en primos = 2

Riesgo de la población general = 1%



¿Qué hacer con toda esta información? El consejo genético



Un diagnóstico de Certeza tiene consecuencias tanto para el paciente como para sus familias

- ✓ **AL MEDICO RESPONSABLE** una **intervención clínica definida**: seguimiento, tratamientos, procedimientos diagnósticos basados en el conocimiento de la enfermedad
- ✓ **A LOS PADRES** les reduce la **ansiedad** y permite establecer **un riesgo de recurrencia más ajustado para futuros embarazos**.
- ✓ **AL PACIENTE** una **atención médica dirigida** con posibilidades de acceso a nuevos fármacos, evitando procedimientos diagnósticos innecesarios, ofreciéndole una explicación del curso de su enfermedad (pronóstico, riesgos asociados, etc..)

Juan Cruz Cigudosa
Director Científico

Javier Suela
Director Técnico



Laboratorio de NGS:

Javier Botet
Paolo Maietta
M^o del Mar Peña Vila-Belda
Irene Díez
Mónica Martínez García
David Rodríguez
Noelia Sánchez
Gema

Laboratorio de Genómica:

Maria Calvente
Francisco Martínez
Miguel Ángel Grillo
Laura San Román Suero
Gloria Calderita

Parque Científico de Madrid
Faraday, 7 (Campus de Cantoblanco)
28049 Madrid

Tel. 91 804 7760
M. 647 426 518

www.nimgenetics.com
info@nimgenetics.com