

Hemoglobinopatilerde NIPT; Serbest fetal DNA'da Paternal Mutasyonların post PCR yöntemi olan HRM Analizi ile Saptanması



Dr. Ebru Dünder Yenilmez
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Adana

Sunu Akışı

- Tanım
- Günümüzde Kullanılan Prenatal Tanı Yöntemleri
- Maternal Fetal DNA ve Kullanım Alanları
- NIPT  alışmamız

Prenatal Tanı Nedir?

Ailede bir genetik kusurun varlığı veya bulunabilme riskine ilişkin yapılan işlemler bütünüdür.

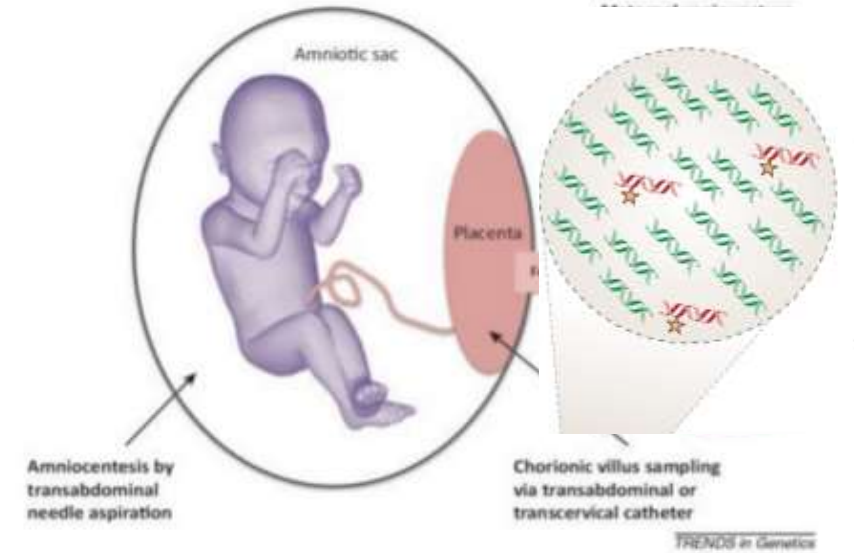


Amaç;

Ebeveynlere doğmamış bebeklerinin sağlığı ile ilgili ihtiyaçları olan bilgiyi vermektir.

Prenatal Tanı Testleri

- **İnvaziv**
 - Koriyonik Villus örneklemesi (CVS)
 - Amniyosentez
 - Kordosentez
- **İnvaziv Olmayan**
 - PGD
 - Maternal dolaşımda fetal hücreler
 - Maternal kanda serbest fetal DNA



İnvaziv Olmayan Prenatal Tanı (NIPD)  alışmaları

- Fetüste var olan ve annede bulunmayan alellerin tanımlanması
 - Fetal cinsiyet tayini
 - RHD negatif gebelerde fetal RhD genotiplemesi
 - Bazı paternal kalıtılan tek gen bozuklukları (2011)
 - Anöploidi taraması (2012)

Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood

H. Christina Fan^{*}, Yair J. Blumenfeld[†], Uriha Chitkara[‡], Louanne Hudgins[§], and Stephen R. Quake^{*†}

^{*}Department of Bioengineering, Stanford University and Howard Hughes Medical Institute, 715 Campus Drive, Clark Center, Room E386, Stanford, CA 94305; [†]Division of Maternal-Fetal Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, Stanford University, 300 Pasteur Drive, Room H1103, Stanford, CA 94305; [‡]Division of Medical Genetics, Department of Pediatrics, Stanford University, 300 Pasteur Drive, Stanford, CA 94305

Communicated by Leonard A. Rosenberg, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, August 22, 2008 (received for review July 11, 2008)

We directly sequenced cell-free DNA with high-throughput shotgun sequencing of reads and construction of fragments per chromosome.

Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma

Rossa W. K. Chiu^{1,2}, K. C. Allen Chan^{1,2}, Yuan Cao^{1,2}, Virginia Y. M. Lau^{1,2}, Wensi Zhang^{1,2}, Tak Y. Leung¹, Chris W. K. Zou¹, Qin Xia¹, Nancy B. Y. Tsui^{1,2}, Elena M. C. Loo^{1,2}, Benny C. Y. Zou¹, Tze K. Loo¹, Charles R. Cantor^{1,2}, and Y. M. Dennis Lo^{1,2*}

¹Centre for Research into Complexing Fetal Nucleic Acids, Li Ka Shing Institute of Health Sciences, Departments of ²Chemical Pathology and ³Obstetrics and Gynaecology, and ⁴Centre for Clinical Trials, The Chinese University of Hong Kong, Shatin, New Territories, Hong Kong SAR, China; ⁵Center for the Study of Biological Complexity and ⁶Department of Computer Science, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA 23298 and ⁷Qiagen, Inc., San Diego, CA

Noninvasive Prenatal Diagnosis of Monogenic Diseases by Targeted Massively Parallel Sequencing of Maternal Plasma: Application to β -Thalassemia

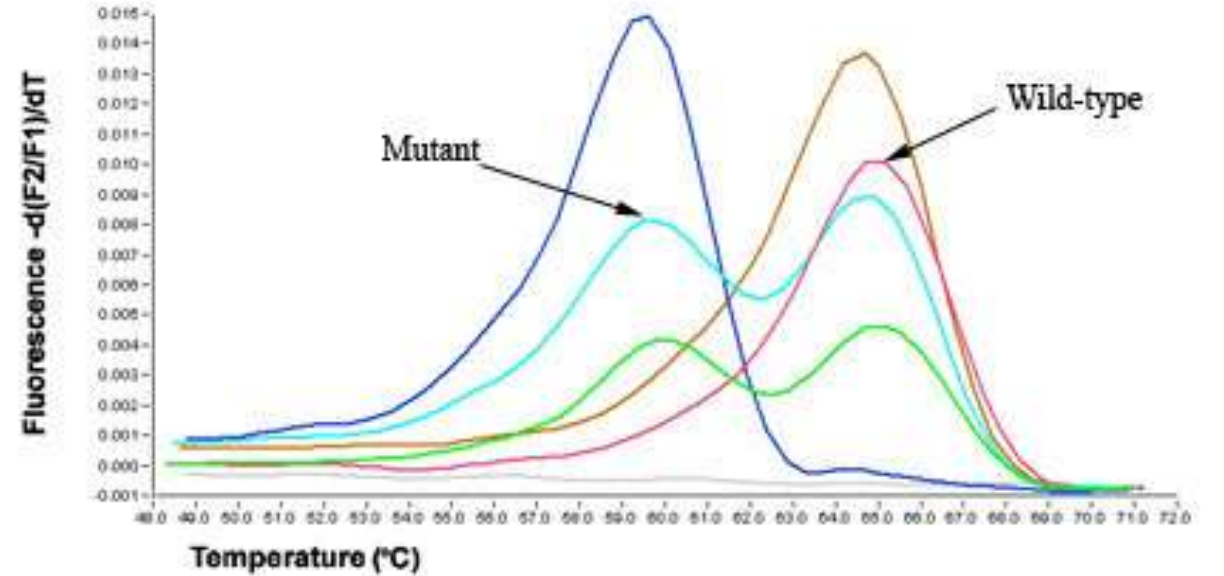
Kwan-Wood G. Lam,^{1,2} Peiyong Jiang,^{1,2} Gary J.W. Liao,^{1,2} K.C. Allen Chan,^{1,2} Tak Y. Leung,³ Rossa W.K. Chiu,^{1,2} and Y.M. Dennis Lo^{1,2*}

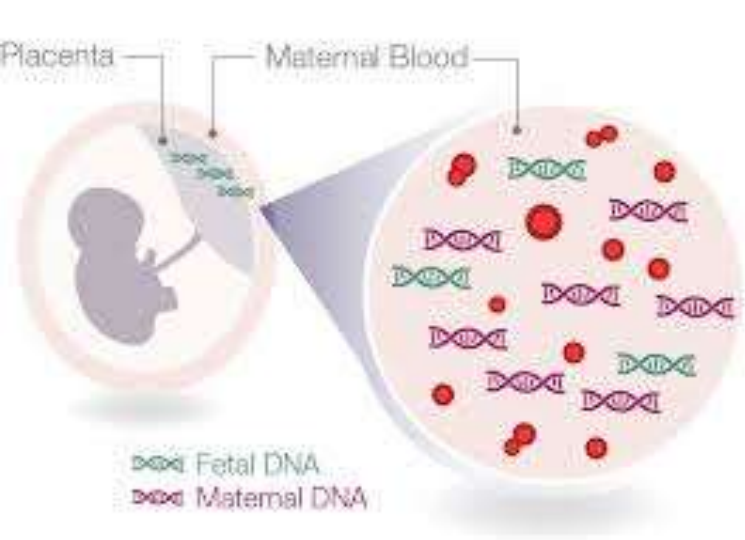
NIPT için alternatif yöntemler; HRM

- Yeni nesil sekanslamaya alternatif
- Uygulaması kolay
- Düşük cffDNA düzeylerinde çalışabilen
- Mutasyona özgü dizayn edilebilen

High Resolution Melting (HRM) - Erime eğrisi analizi

HRM; Amplifiye edilen DNA örneklerinin sıcaklık artışıyla birlikte çift zincirli DNA'dan tek zincirli DNA'ya dönüşümündeki ayrılma davranışının karakterize edilmesi esasına dayanır.





Çukurova Bölgesinde HbS ve Beta Talasemilerde cffDNA'da HRM Analizi ile Paternal Mutasyonların HRM ile Saptanması

ORIGINAL ARTICLE

Noninvasive prenatal diagnosis experience in the Çukurova Region of Southern Turkey: detecting paternal mutations of sickle cell anemia and β -thalassemia in cell-free fetal DNA using high-resolution melting analysis

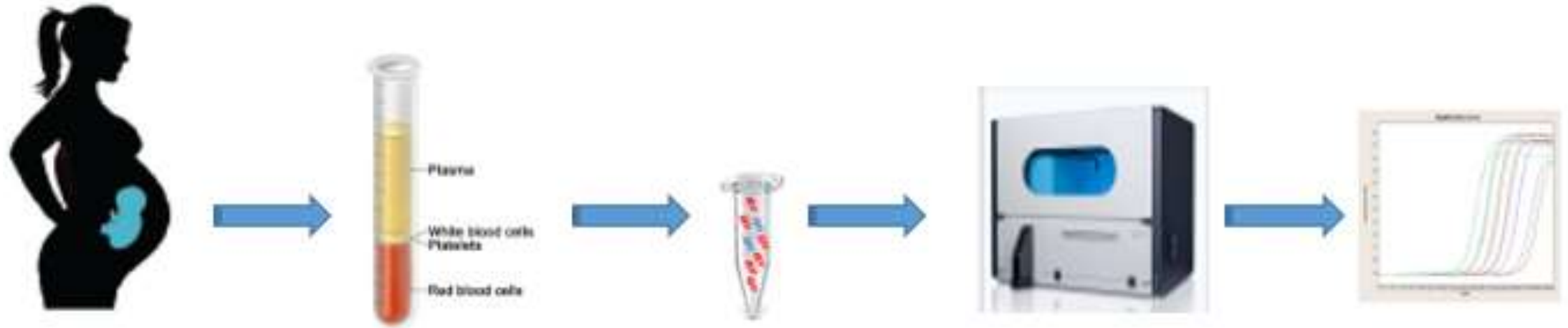
Ebru Dündar Yenilmez^{1*}, Abdullah Tuli¹ and I. Cüneyt Evrûke²

¹Çukurova University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry, Adana, Turkey

²Çukurova University, Faculty of Medicine, Department of Gynecology Obstetrics, Adana, Turkey

*Correspondence to: Ebru Dündar Yenilmez. Email: edundar@cu.edu.tr / ebru_dundar@yahoo.com

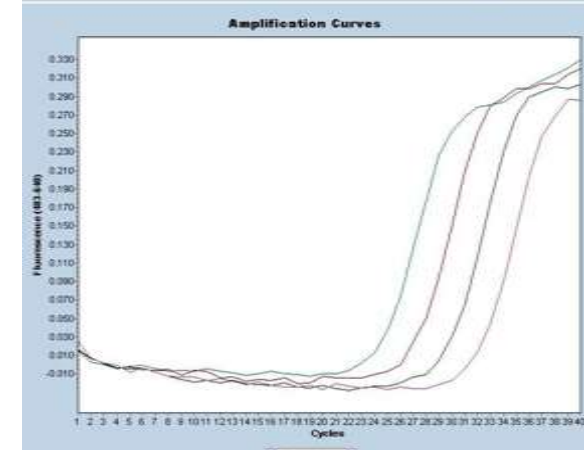
Örnek Hazırlama Süreci





Maternal Plazmada Cinsiyet Tayini

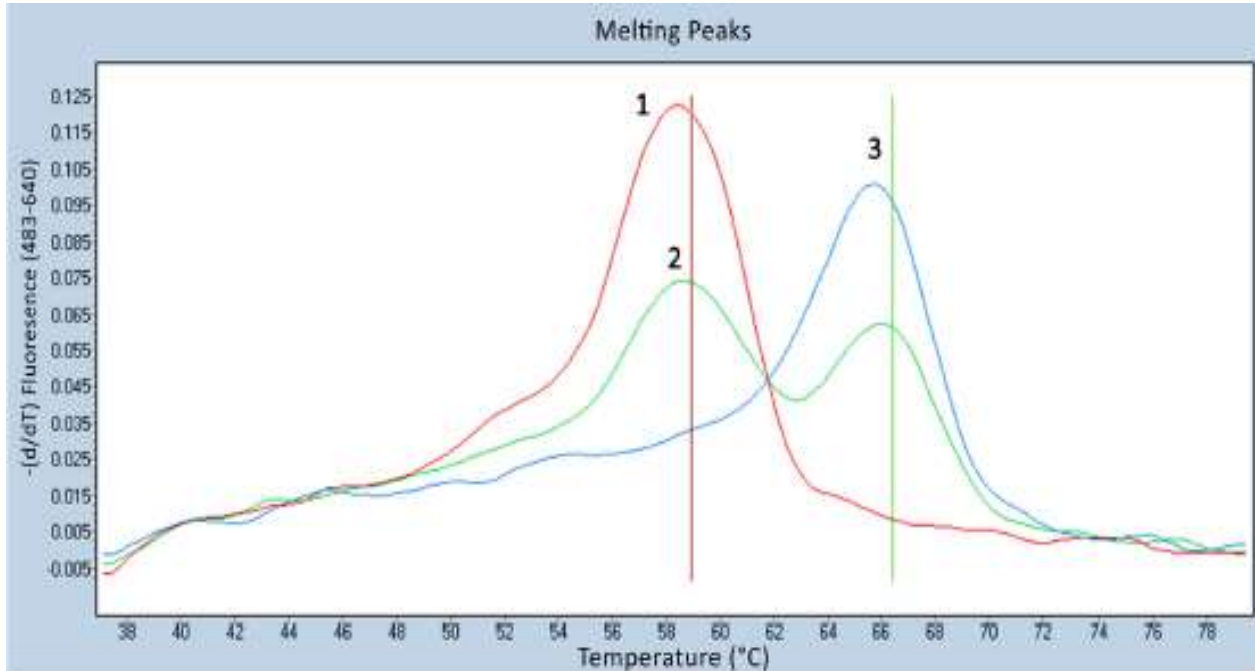
DYS14 geni
Real-Time PCR



Parameter	HbS carriers ($n = 57$)	β -Thalassemia carriers ($n = 32$)
	Range (mean $\pm$ SD)	Range (mean $\pm$ SD)
Age (years)	17–35 (24.8 $\pm$ 4.3)	16–38 (25.0 $\pm$ 4.9)
Week of pregnancy	7–29 (11.8 $\pm$ 4.1)	6–21 (11.3 $\pm$ 3.1)

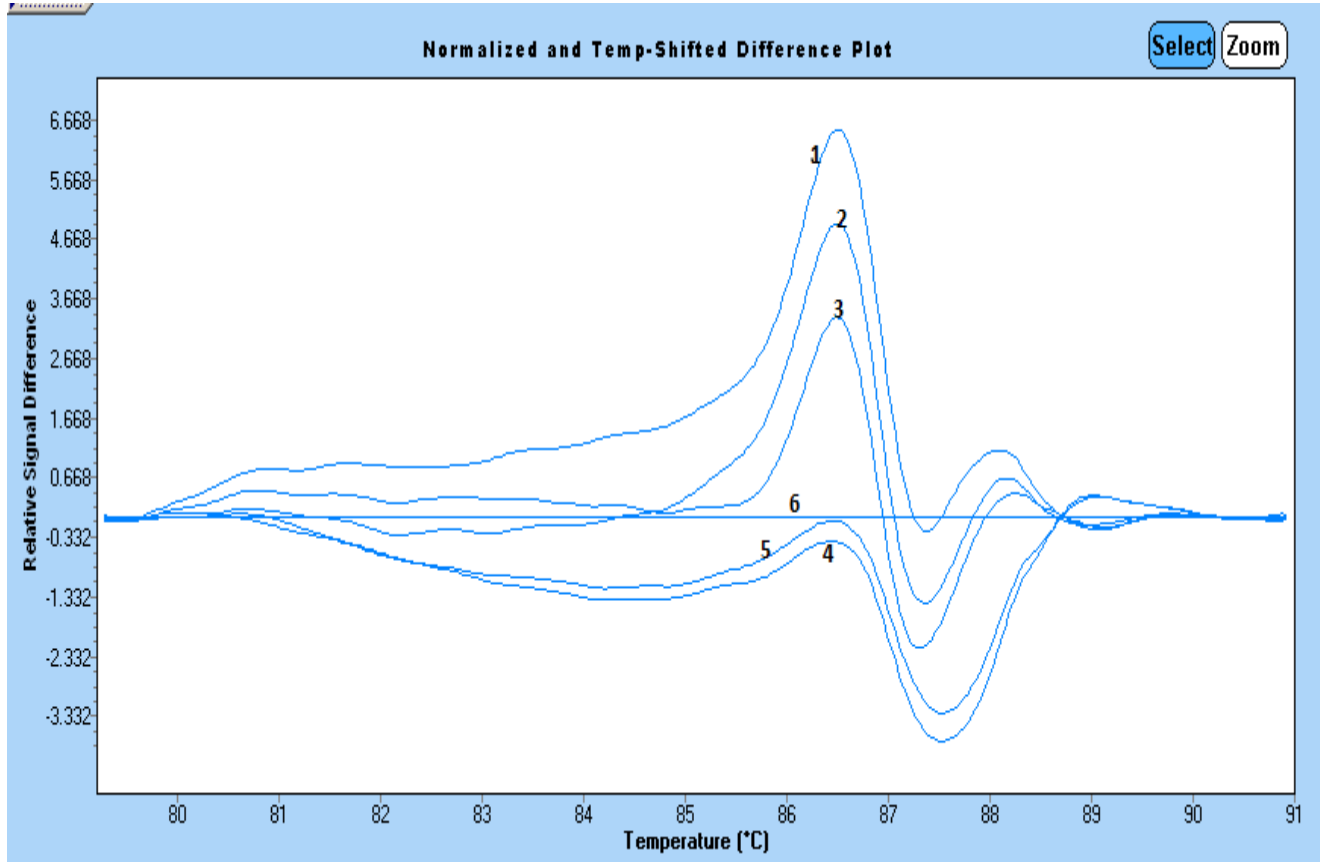
Genotype	Mother HbS carriers (n = 57)		Mother β -thalassemia carriers (n = 32)	
	CVS		CVS	
	Male	Female	Male	Female
HbS carriers	20	3	—	—
β -Thalassemia carriers	12	2	10	7
β -Thalassemia/HbS	3	—	—	—
HbS/HbS	5	2	—	—
Normal	2	8	9	2
β -Thalassemia/ β -thalassemia	—	—	4	—

HbS Genotiplemesi



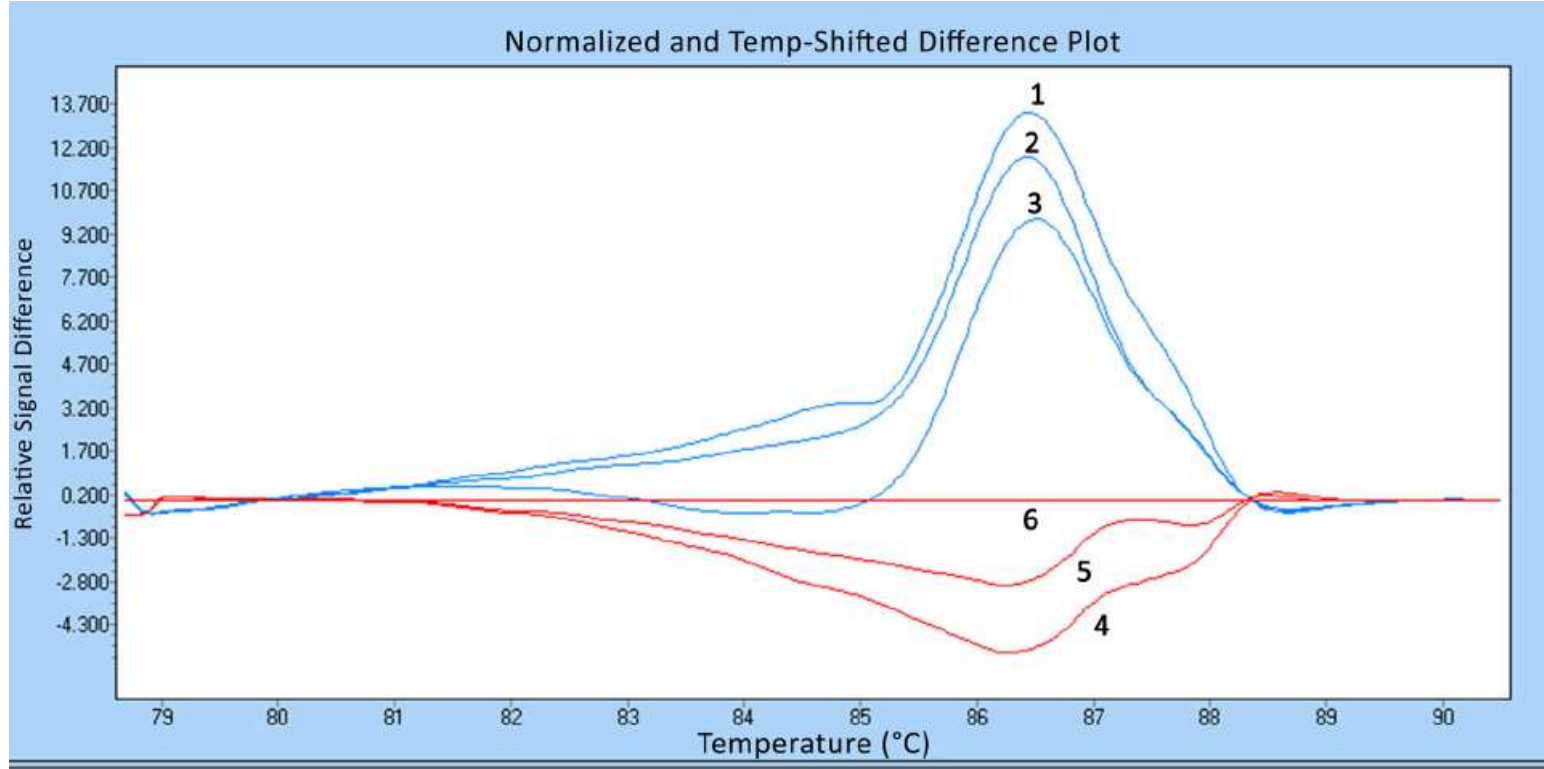
1. cfDNA A/A (WT); 2. Heterozigot cfDNA (A/S); 3. CVS (S/S)

Beta Talasemi (Paternal Mutasyon)



1. Baba IVSI-6/A; 2. CVS fetus (IVSI-6/A); 3. cffDNA IVSI-6/A; 4 ve 5. Homozigot kontroller (IVSI-6/ IVSI-6) 6. Kontrol (A/A).

Beta Talasemi (Paternal Mutasyon)



1. Baba -30/A; 2. CVS fetüs (-30/A); 3. cffDNA -30/A; 4 ve 5. Homozigot kontrol (-30/ -30)
6. Kontrol (A/A).

Sonuç

- Erken dönemde (7 hf) fetal DNA'da paternal mutasyonların HRM ile saptanması kolay uygulanabilir bir yöntemdir. Invaziv bir işleme olan ihtiyacı % 50 kadar azaltır.
- Maternal plazmada NIPD  alışmaları gelecekte diğ r tarama testlerinin yerini alma ve invaziv testlere olan ihtiyacın azalması yolunda hızla ilerlemektedir.



Teşekkürler..

New Perspectives in Prenatal Diagnosis of Sickle Cell Anemia

Ebru Dünder Yenilmez and Abdullah Tuli

