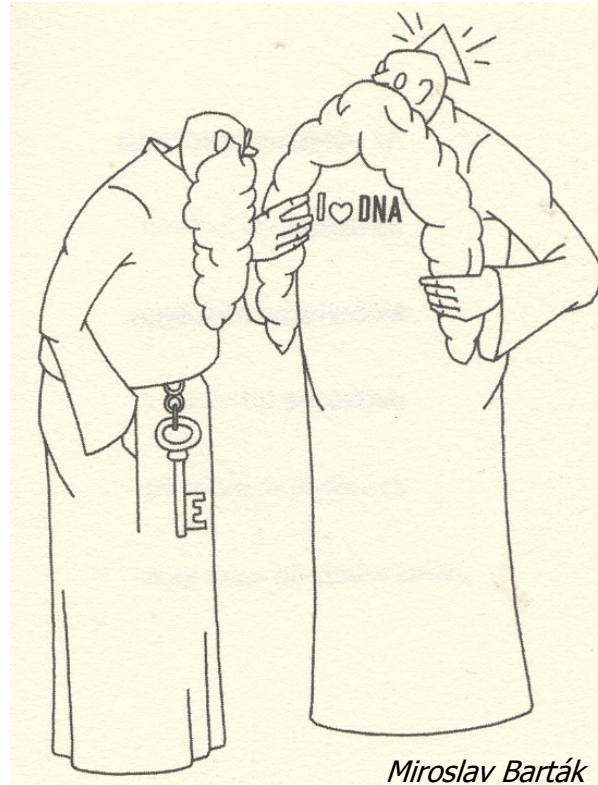


Klinická genetika



Michael Doubek

Proč klinická genetika

➤ **úloha genomu v diagnostice, terapii a prevenci**

= aplikace v klinické praxi

**Do praxe ale mohu aplikovat jen to, co znám
a na co myslím**

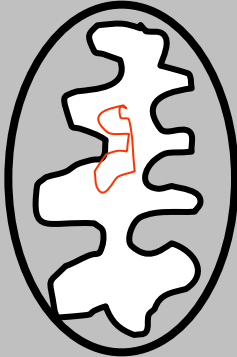
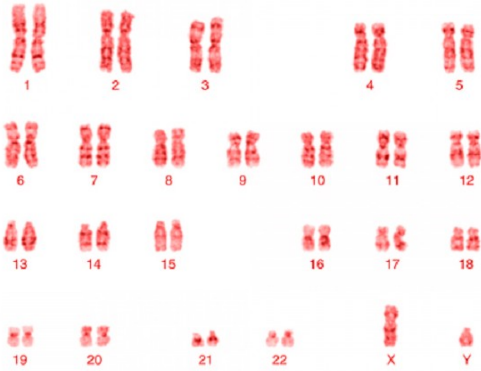
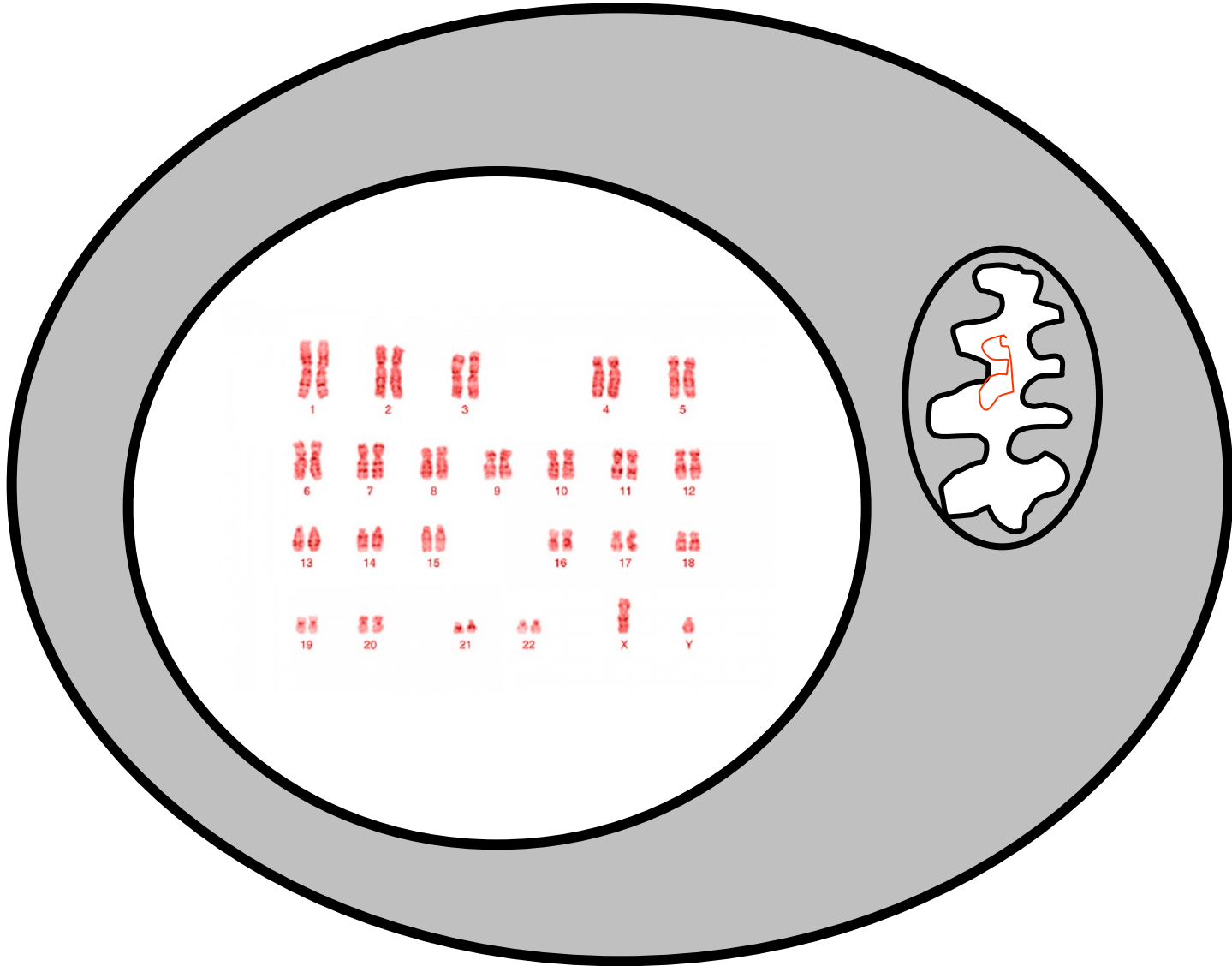
Co byste už měli znát

- **Co je to gen**
 - **geny strukurní a funkční**
 - **housekeepngové geny**
 - **exprese genů**
 - **exony, introny, netranskribované oblasti, promotory**
- **Informační makromolekuly**
- **Transkripce, sestřih, translace**
- **Chromozomy**

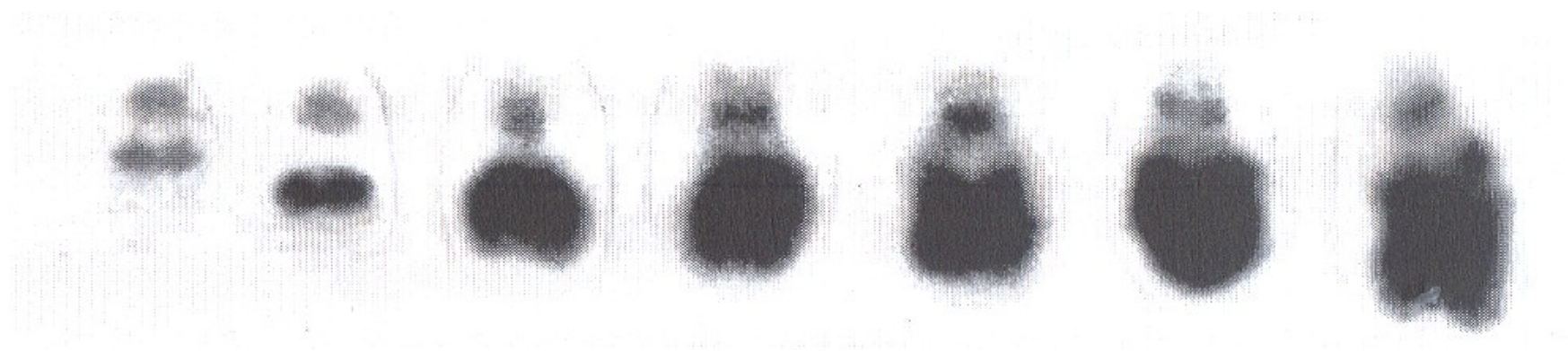
Co je to DNA?



**studený líh + sůl + saponát na nádobí
> 1 m DNA**









Churchill College a The Eagle Pub
Watson + Crick + Wilkins + Franklinová



?

Použití výsledků
bez svolení
Eugneika
IQ černochů



Churchill College a The Eagle Pub
Watson + Crick + Wilkins + Franklinová

Pojmy

- **Genetika**
- **Genom**
- **Genomika**

Pojmy

- **Genetika**
- **Genom**
- **Genomika**

Veškerá DNA
v buňce/organismu

Pojmy

- **Genetika**
- **Genom**
- **Genomika**

Genom je víc než součet
genů

Pojmy

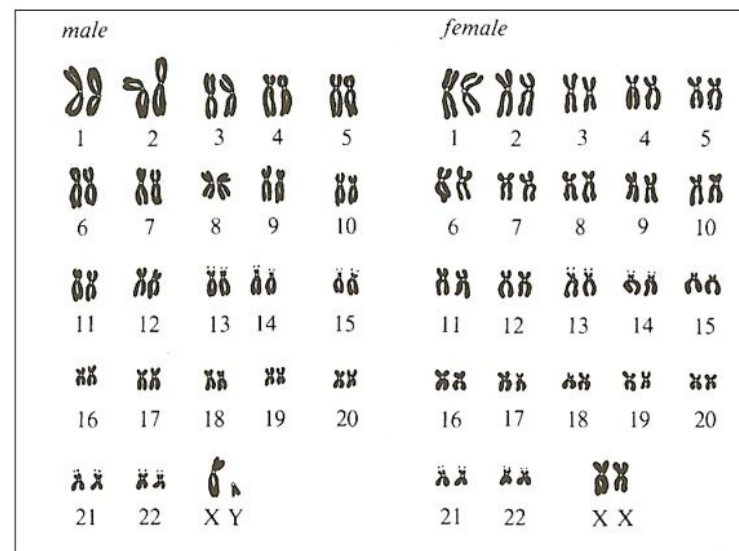
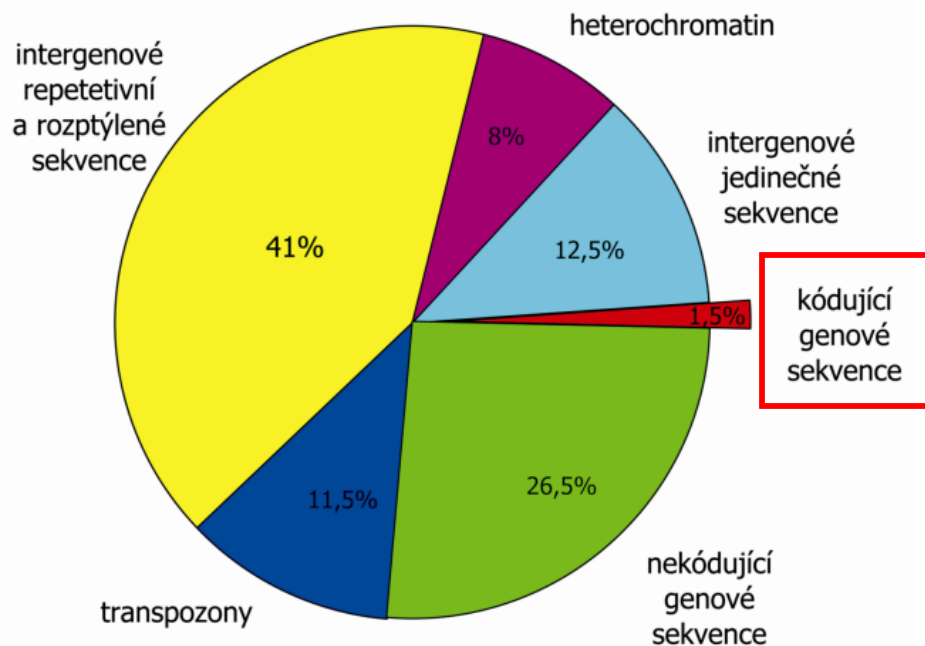
- **Genetika**
- **Genom**
- **Genomika**

- Strukturní
(DNA, chromozomy)
- Funkční
(RNA, genová exprese)
- Komparativní

Pojmy

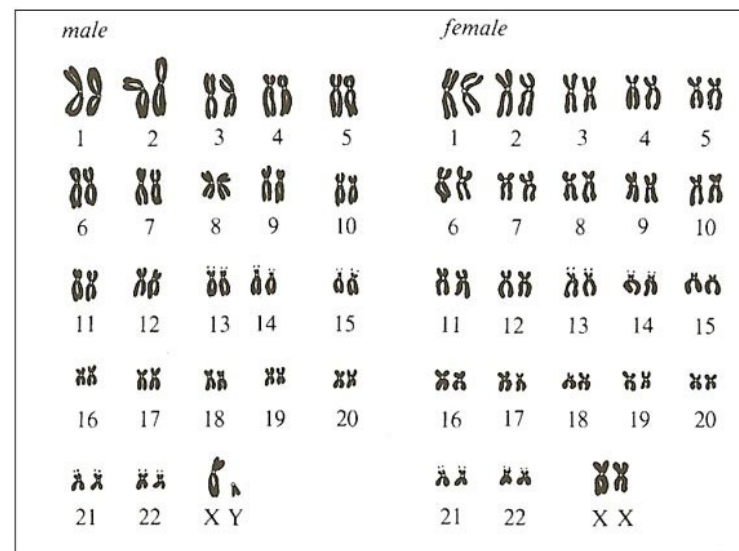
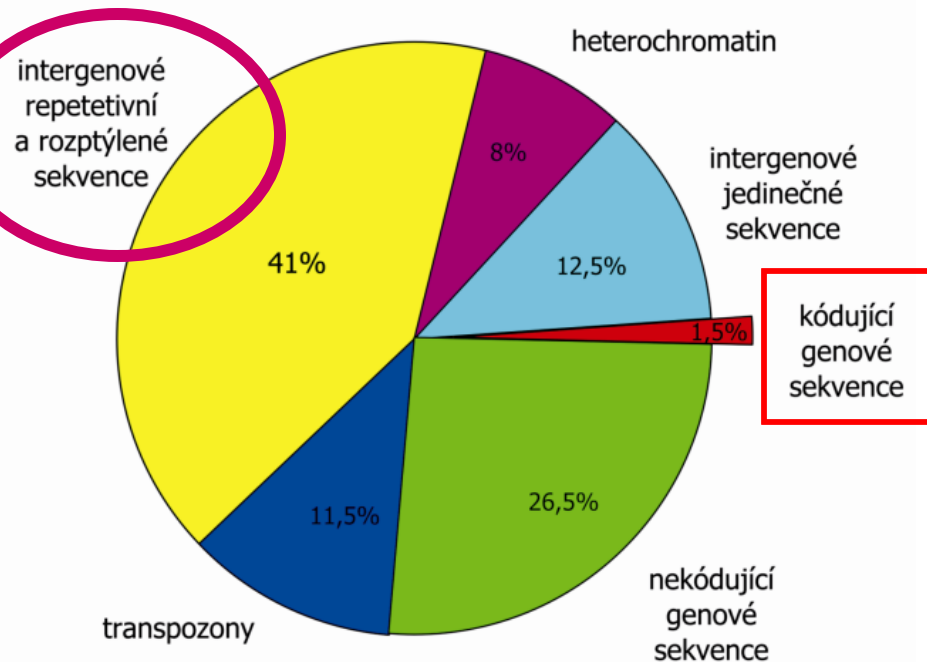
- **Genetika**
- **Genom**
- **Genomika**
- **Mikrobiom**
- **Transkriptom**

Co je to genom?



**Lidský genom:
3,2 x 10⁹ bp,
cca 20 tis. genů**

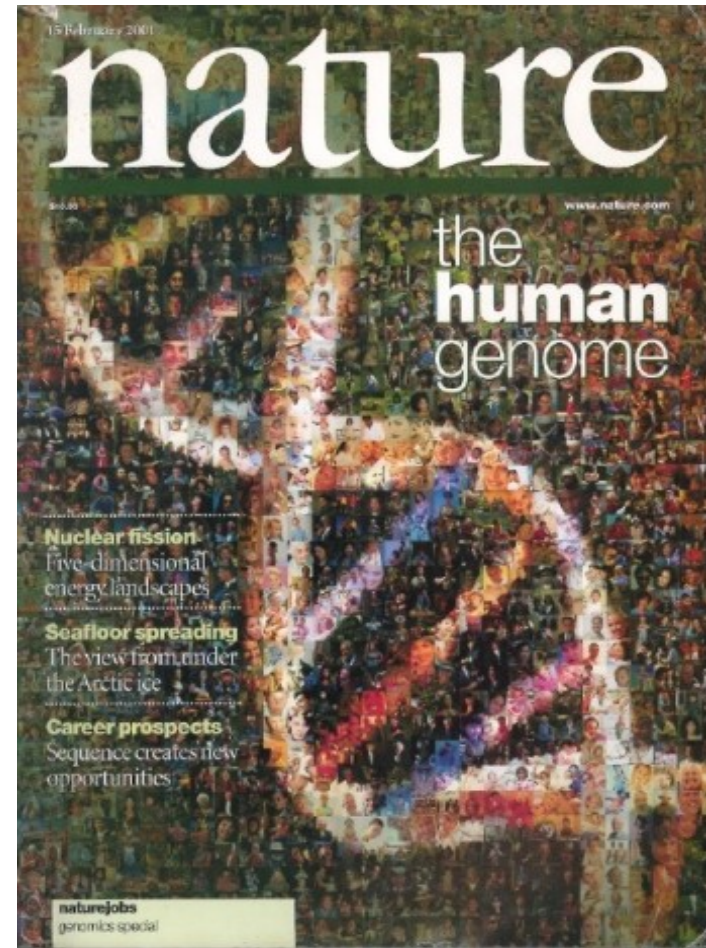
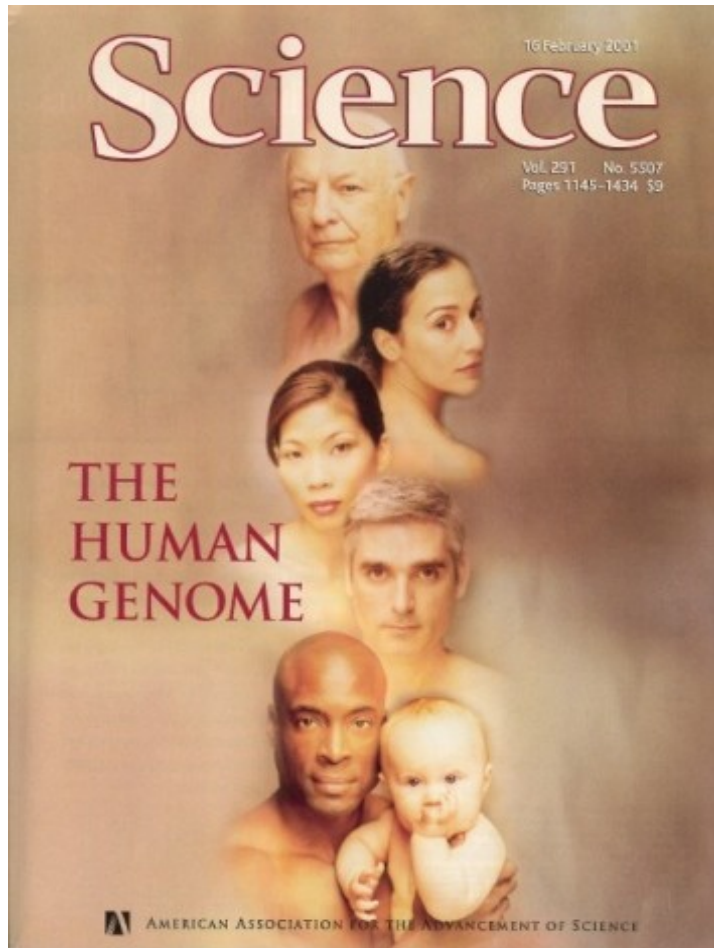
Co je to genom?



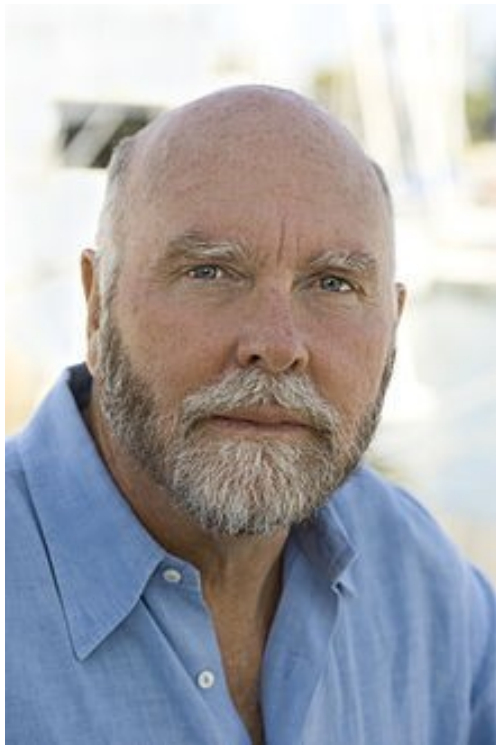
Variabilita genomu

- Nukleotidové polymorfismy
 - Single Nucleotide Polymorphisms - SNP
- Změny v počtu kopií genetického materiálu
 - Copy Number Variations – CNV
 - Short Tandem Repeats – STR (2-5)

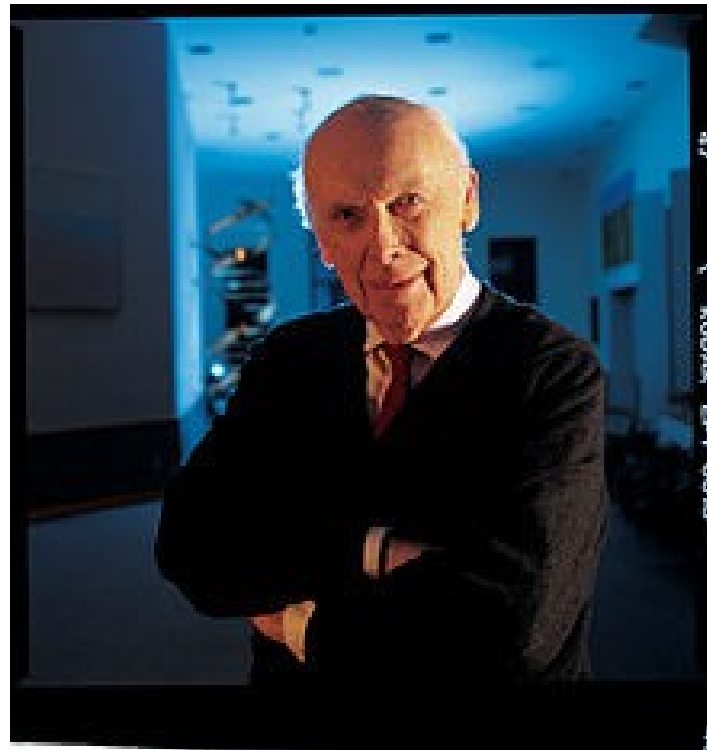
**Lidský genom:
3,2 x 10⁹ bp,
cca 20 tis. genů**



Publikování sekvence lidského genomu v roce 2001

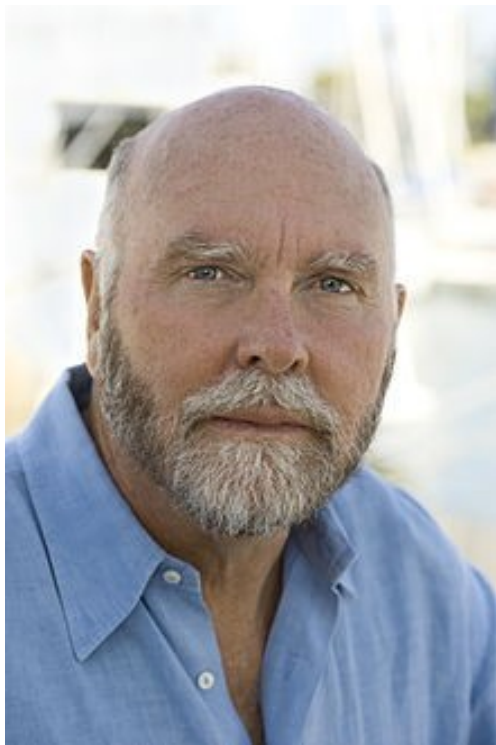


C. Venter

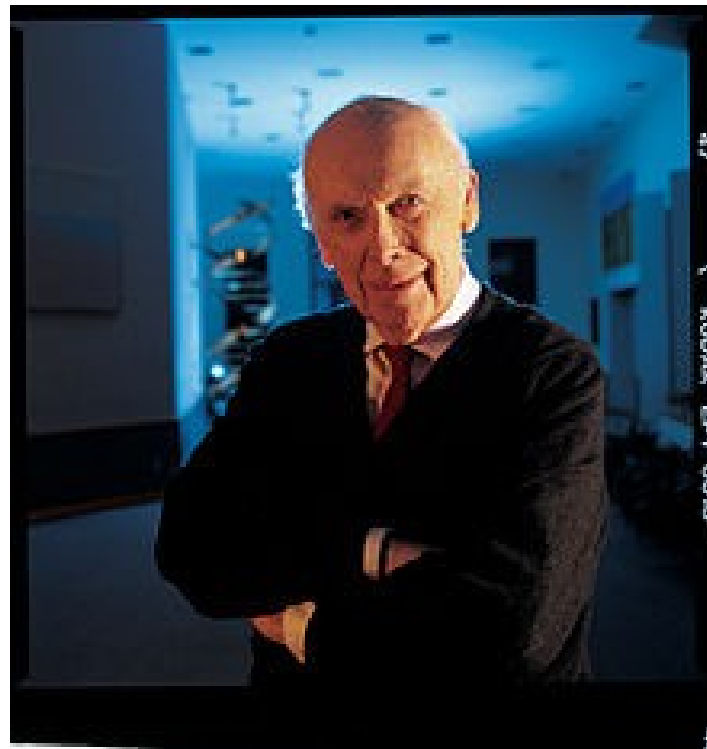


J. D. Watson

Publikování sekvencí individuálního lidského genomu 2007 a 2008



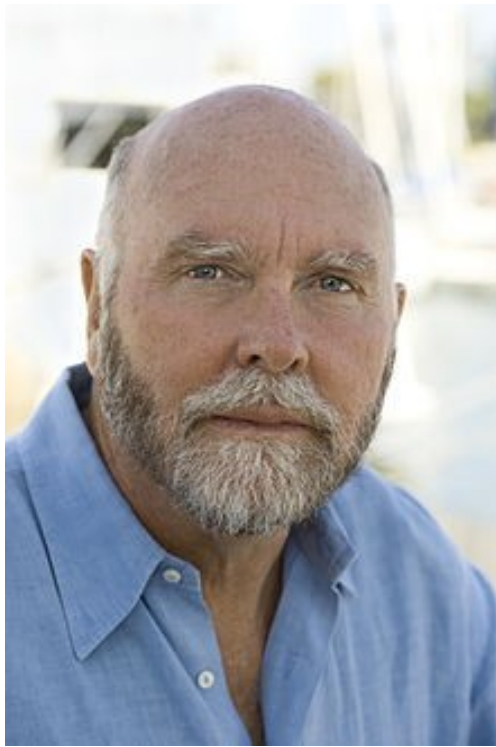
C. Venter



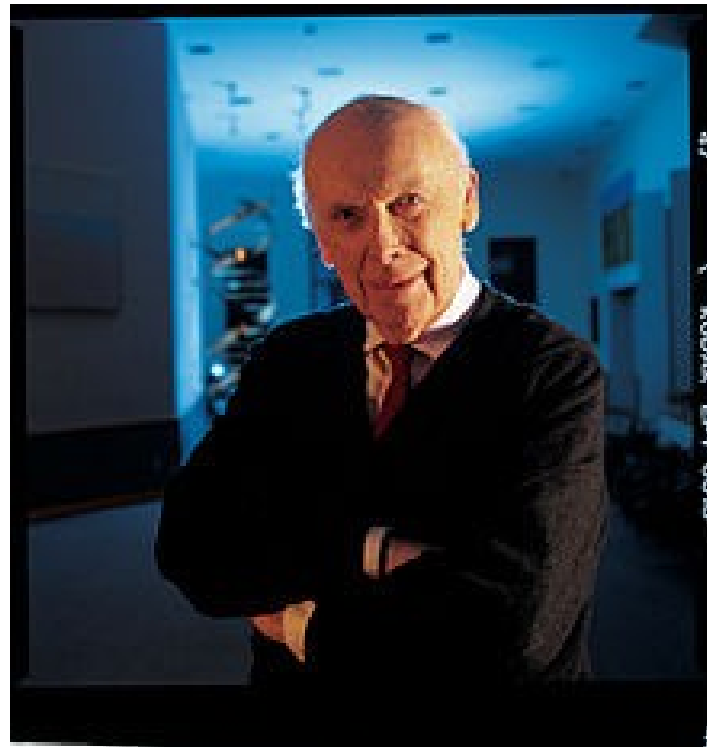
J. D. Watson

Publikování sekvencí individuálního lidského genomu 2007 a 2008

Rozdíl v 7648 záměnách aminokyselin



C. Venter

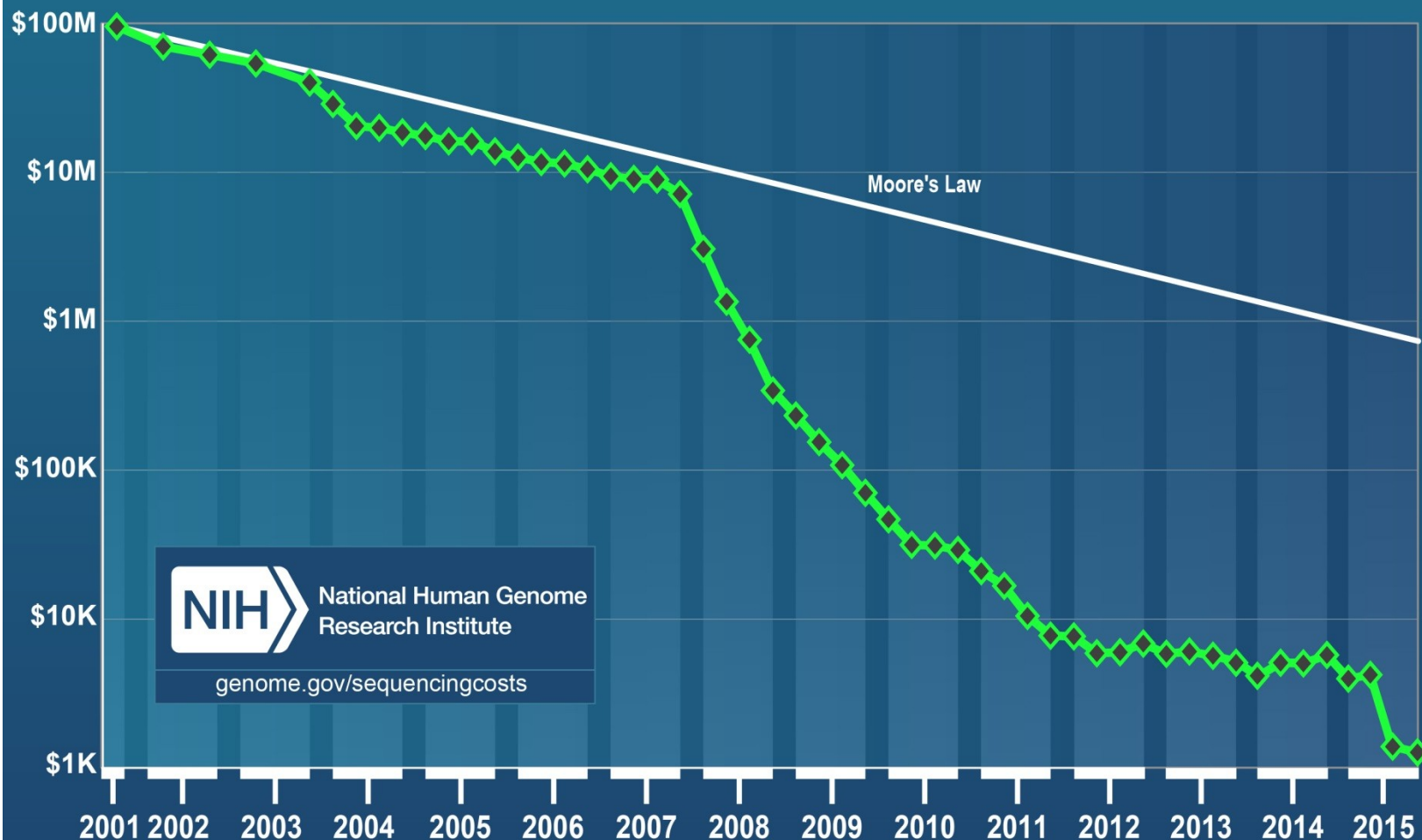


J. D. Watson

**Publikování sekvencí individuálního lidského genomu
2007 a 2008**

1000 genomů publikováno v roce 2010

Cost per Genome



Mooreův zákon (1965): „Počet tranzistorů, které mohou být umístěny na integrovaný obvod, se při zachování stejné ceny zhruba každých 18 měsíců zdvojnásobí.“

Postgenomická éra

- **Genomy byly popsány**
- **Probíhají anotace genomů**

Genetika dnes

Od fenotypu ke genotypu



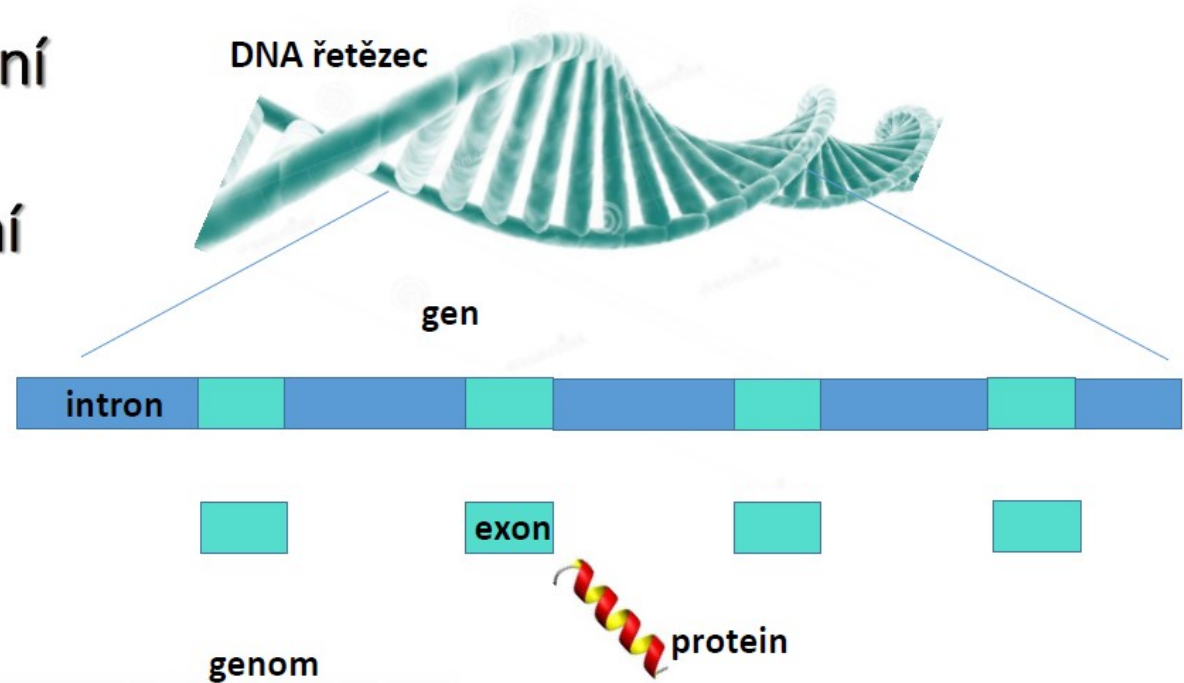
Od genotypu k fenotypu

Moderní metody analýzy genomu

Genomové sekvenování vs. Exomové sekvenování

- lidský **genom**
= $3.2 \cdot 10^9$ bp
~ 20 000 genů

- **Exom** = < 2 % lidského genomu
obsahuje ~ 85 % známých mutací podmiňujících onemocnění



všechny exony= exom
< 2 % celého genomu



NGS – flexibilita

genom



3 200 000 000 bp
30 x čtení

exom



20 000 genů
100 x čtení

vybrané geny nebo
„hot-spot“ místa –
diagnostické panely



< 100 genů
≥ 1000 x čtení

Sekvenování Genomu



Genomová DNA



.... TATGCGATGCGTATTTTCGAAA

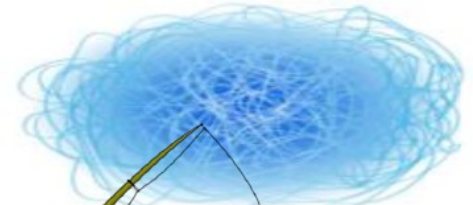
Referenční sekvence



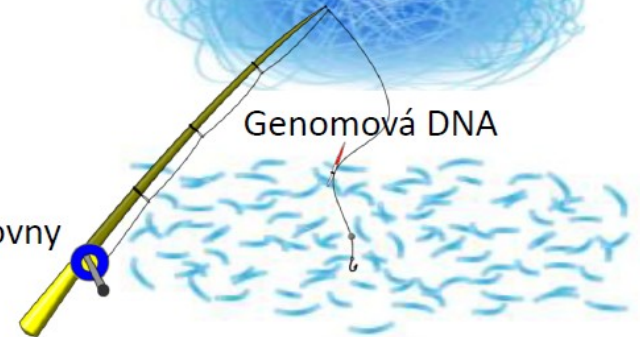
„lámání“ genomu
na menší úseky

Obohacení knihovny

Sekvenování Exomu



Genomová DNA



Získáme miliony
jednotlivých čtení

.... TATGCGATGCGTATTTTCGAAA

Srovnání získaných čtení s
referenční sekvencí

Odvození původní sekvence a
identifikace rozdílů ve
srovnání s referencí

Referenční sekvence



Mutace vs. variabilita lidského genomu

Mutace vs. variabilita lidského genomu

- každá 1000. báze může být mutovaná: 3.2 milionu variant
- jeden člověk má průměrně 0.5 milionu variant
- při analýze exomu (2 % genomu) získáme desítky tisíc variant

Která varianta je ta, která způsobí nemoc?

Mutace vs. variabilita lidského genomu

- každá 1000. báze může být mutovaná: 3.2 milionu variant
- jeden člověk má průměrně 0.5 milionu variant
- při analýze exomu (2 % genomu) získáme desítky tisíc variant

Která varianta je ta, která způsobí nemoc?

Mutace
vs. polymorfismus

Frekvence vzniku
mutací je
 $1,1 - 1,3 \times 10^{-8}$

Mutace vs. variabilita lidského genomu

Mutace spontánní vs. indukované

Genové vs. chromozomové

Mutace měnící smysl – missense

Mutace beze smyslu – nonsense (terminační triplet)

Mutace se stejným smyslem – same sense

Posuvné mutace – frameshift

Mutace vs. variabilita lidského genomu

Single nucleotide polymorphisms (SNPs)

cgcgcggcctcctccttggtg**c**catcctggtcctcctaaaccacctggac

cgcgcggcctcctccttggtg**t**catcctggtcctcctaaaccacctggac

Insertions/deletions (indels)

cgcgcggcctcctccttggtggccatcctggtcctcctaaaccacctggac

cgcgcggcctcctccttggtg-----ctggtcctcctaaaccacctggac

Mutace vs. variabilita lidského genomu

Mikrosatelity (STR)

cgcgcggcctcctccttggtgg**cacacacacaca**catcctggtcctcctaaaccacctgga

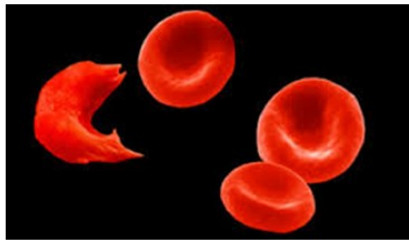
cgcgcggcctcctccttggtgg**cacacacaca**catcctggtcctcctaaaccacctgga

Copy number variants (CNV)

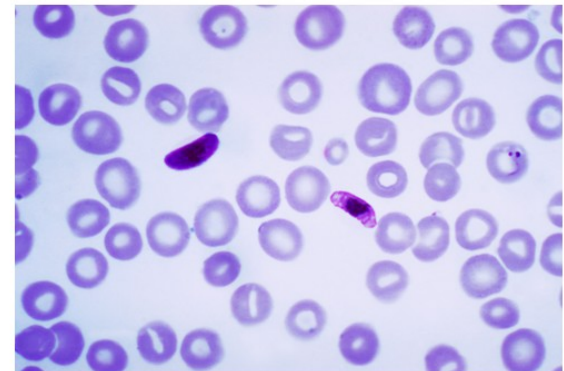
>1 kb – 1Mgb

Mutace vs. variabilita lidského genomu

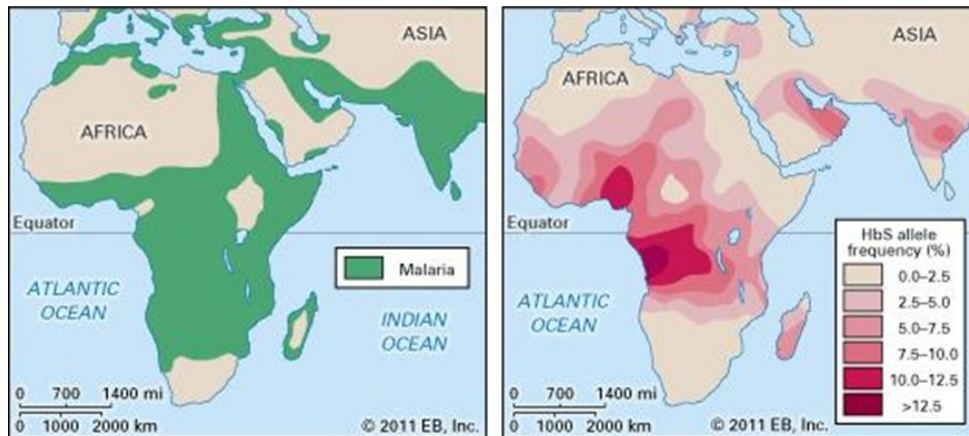
Příklad z praxe: srpkovitá anemie



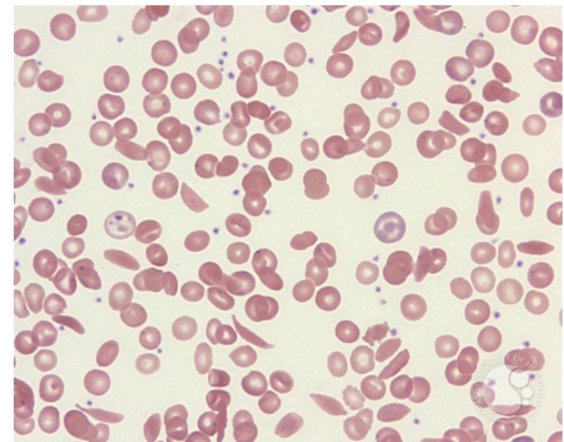
P. falciparum



Korelace mezi srpkovitou anemií a malárií

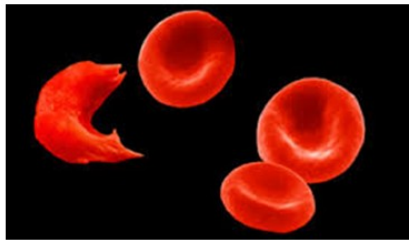


Periferní krevní nátěr u srpkovité anemie



Mutace vs. variabilita lidského genomu

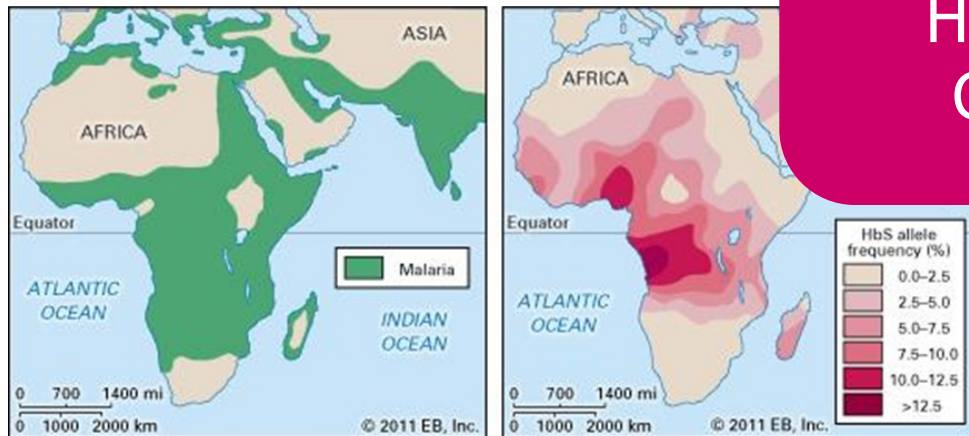
Příklad z praxe: srpkovitá anemie



P. falciparum



Korelace mezi srpkovitou anemií a malárií



A dále:
Leidenská mutace f. V
Hemochromatóza
Cystická fibróza



anemie

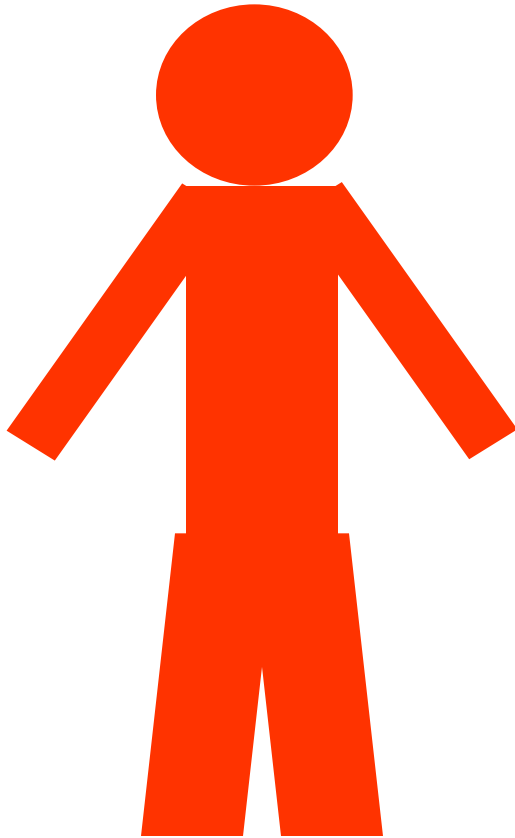
Pozitivní mutace



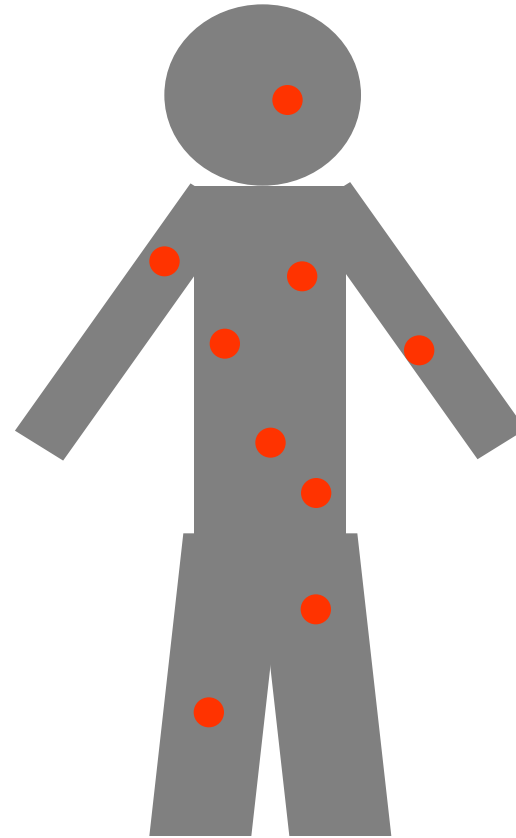
mutace

Germinální vs. somatická mutace

Germinální vs. somatická mutace



Germinální mutace



Somatická mutace

Kolik lidí žilo na naší planetě?

Kolik lidí žilo na naší planetě?

➤ Na zemi žilo přes 100 miliard lidí

Year	Population	Births per 1,000	Births Between Benchmarks
50,000 B.C.	2	-	-
8000 B.C.	5,000,000	80	1,137,789,769
1 A.D.	300,000,000	80	46,025,332,354
1200	450,000,000	60	26,591,343,000
1650	500,000,000	60	12,782,002,453
1750	795,000,000	50	3,171,931,513
1850	1,265,000,000	40	4,046,240,009
1900	1,656,000,000	40	2,900,237,856
1950	2,516,000,000	31-38	3,390,198,215
1995	5,760,000,000	31	5,427,305,000
2011	6,987,000,000	23	2,130,327,622

*Carl Haub:
How Many People
Have Ever Lived on Earth?
2011*

Jsme Homo sapiens?

Jsme Homo sapiens?



Denisované, 41 000 let.
mtDNA



Jsme Homo sapiens?



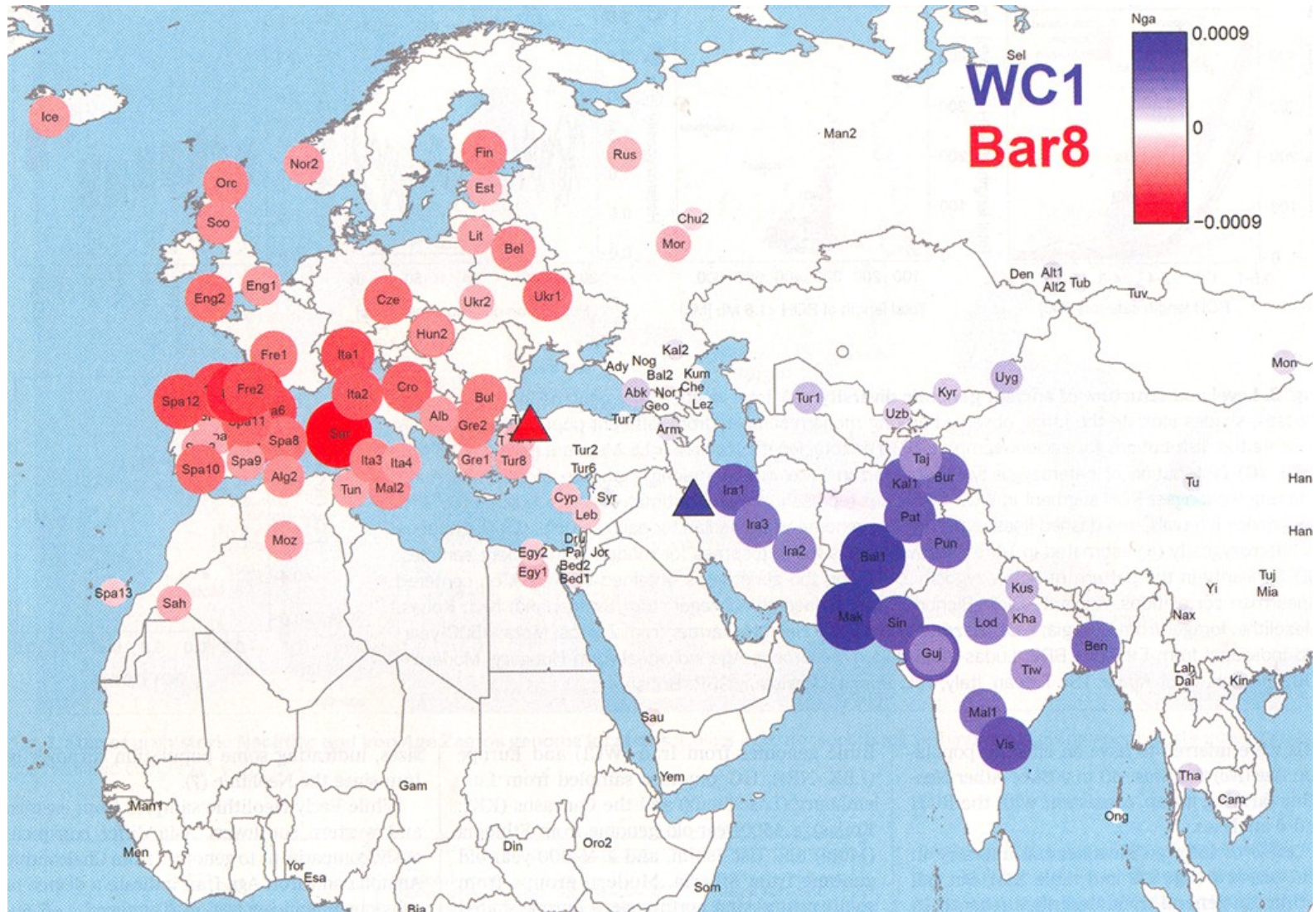
V Evropě 1 – 3 % genomu
Některé nemoci neandrtálské – deprese,
kožní nemoci?

Analýza pravěkých genomů

Genom z mladší doby kamenné a doby železné - Zagros, Irán



Dva pravěké genomy u dnešních lidí



Slavné pravěké genomy

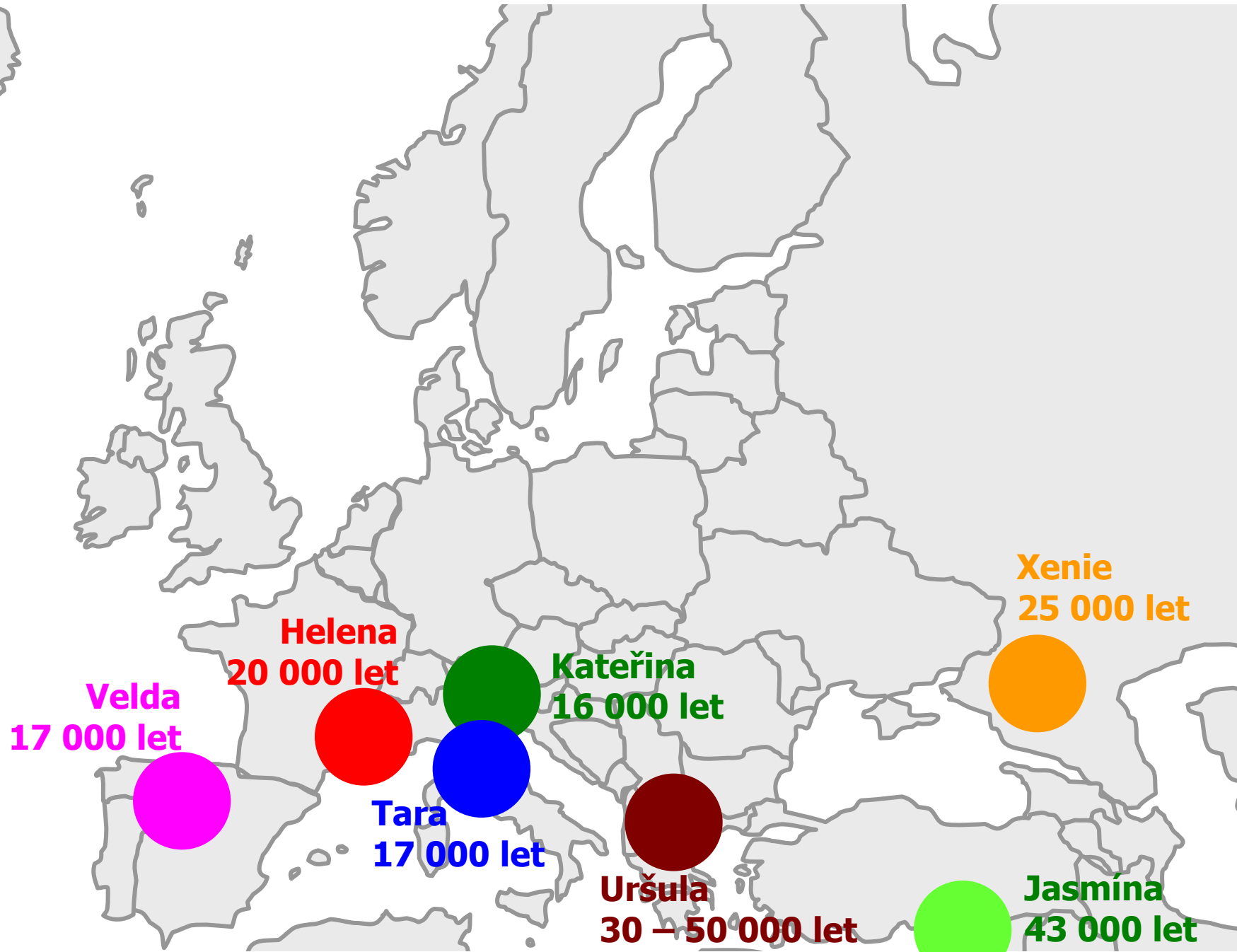
Ötzi

Cheddarský muž



Původ podle mitochondriální DNA

Sedm dcer Evinných



Sedm dcer Eviných

- **mitochondriální Eva (před 140 000 lety v Etiopii)**
- **7 hlavních mitochondriálních haplotypů v Evropě**
- **29 haplotypů na celém světě**

- **vyšetření není tak přesné ve srovnání s dalšími metodami, mitochondriální DNA je si na celém světě velmi podobná**

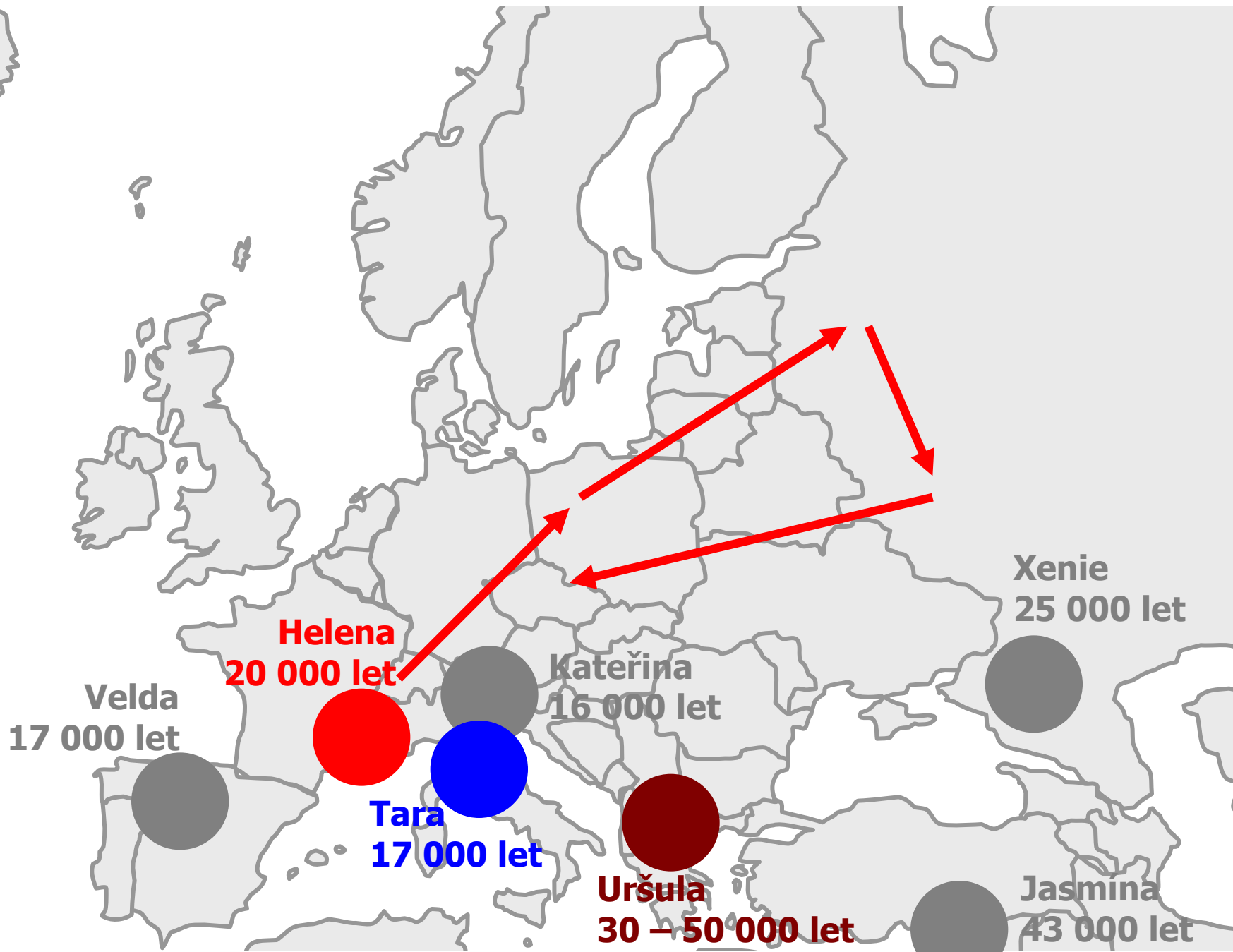
Potomci součastnic mitochondriální Evy ale mohou žít

Bryan Sykes, 2004

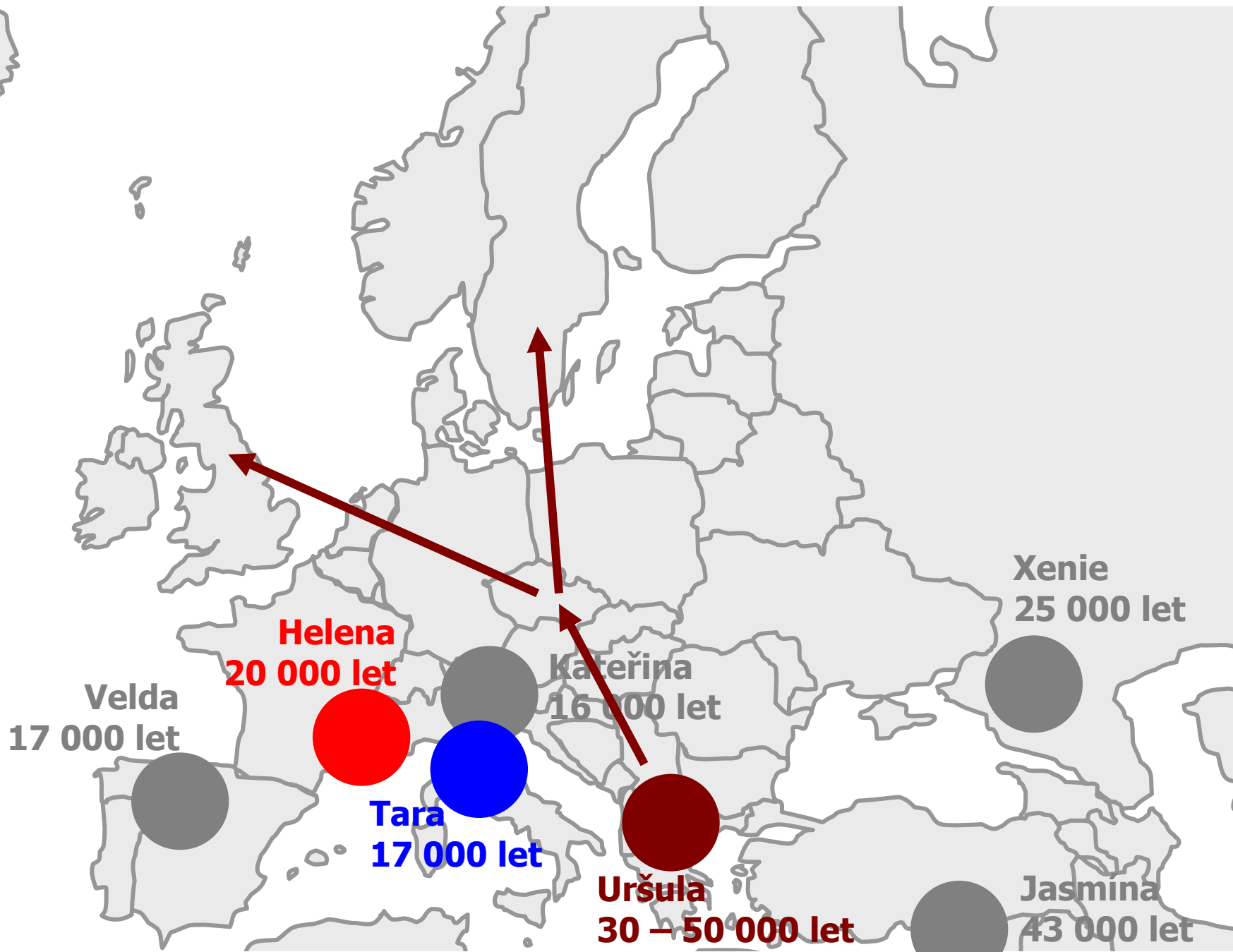
Sedm dcer Eviných u nás

- **Helena 42 % (dominují linie z Polska a evropské části Ruska)**
- **Uršula 18 % (dnes žijí hlavně v Británii a Skandinávii)**
- **Tara 13 %**
- **Jasmína 10 %**
- **Kateřina 6 % (Aškenázové)**
- **Velda 4 %**
- **Xenie 3 %**

Sedm dcer Evinných po době ledové



Sedm dcer Evinných po době ledové



Úloha genomu při vzniku nemoci

- **Mendelovsky dědičná onemocnění 8 %**
- **Multifaktoriální 90 %**
- **Ostatní 2 %**

Úloha genomu při vzniku nemoci

➤ **Mendelovsky dědičná onemocnění 8 %**

➤ **Multifaktoriální 90 %**

➤ **Ostatní 2 %**

=> Genetické pozadí hraje téměř vždy roli při vzniku nemoci

Typy dědičnosti

Typy dědičnosti

Mendelovská dědičnost
(monogenní; jeden gen, jeden znak)

Vázaná na pohlavní chromozomy

Polygenní
(více genů malého účinku, jeden znak)

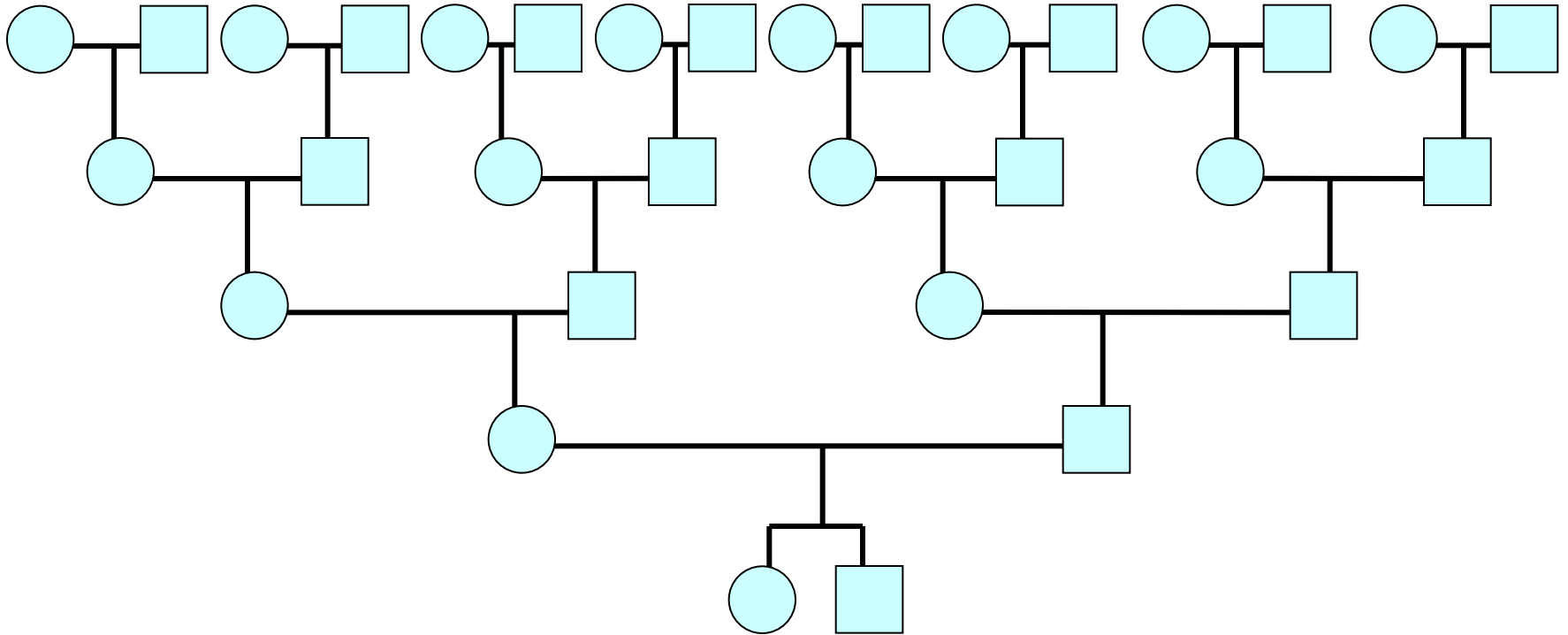
Mitochondriální dědičnost

Role prostředí (zevní faktory)

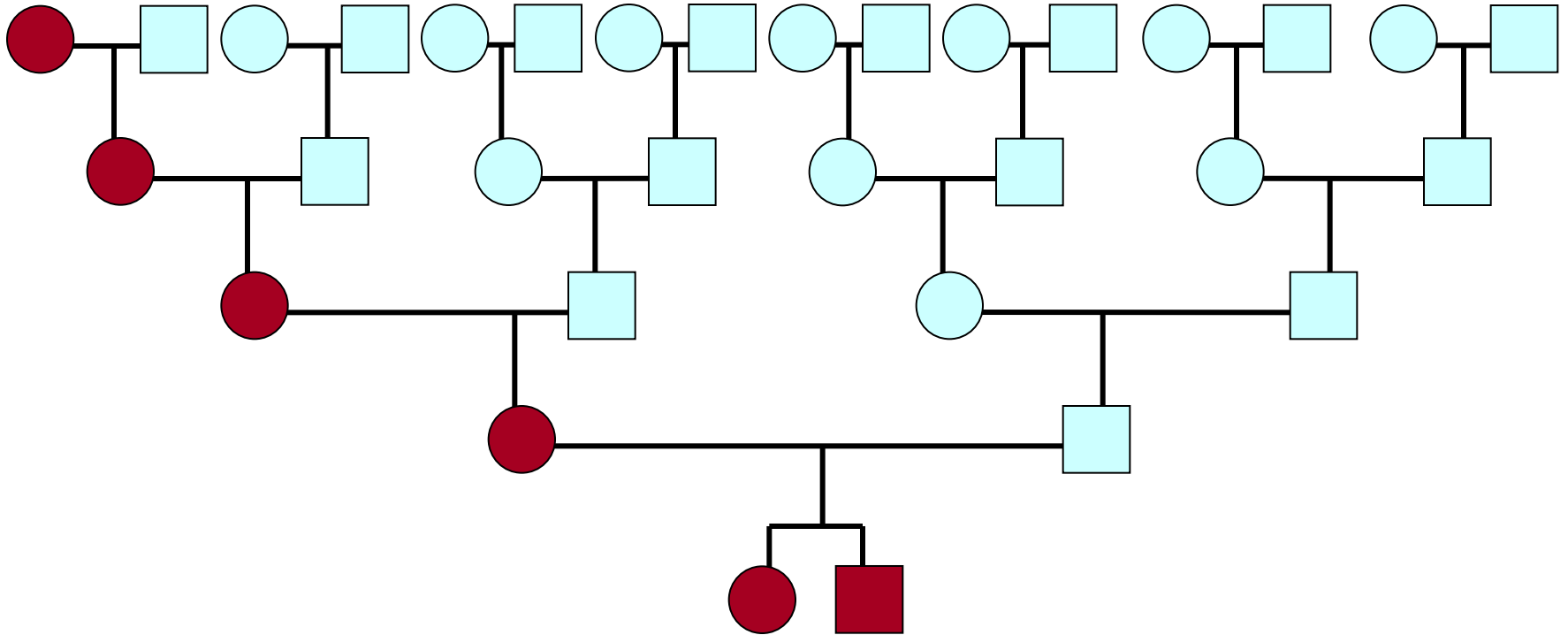
Jaký je postup při pátrání po dědičnosti nemocí?

- **Rodinné studie (rodokmeny, studium dvojčat, podíl nadějí „odds ratio“, relativní riziko)**
- **Zjišťování výskytu nemoci v populaci**
- **Molekulárně biologické metody**
- **Vazebné analýzy a funkční testy**

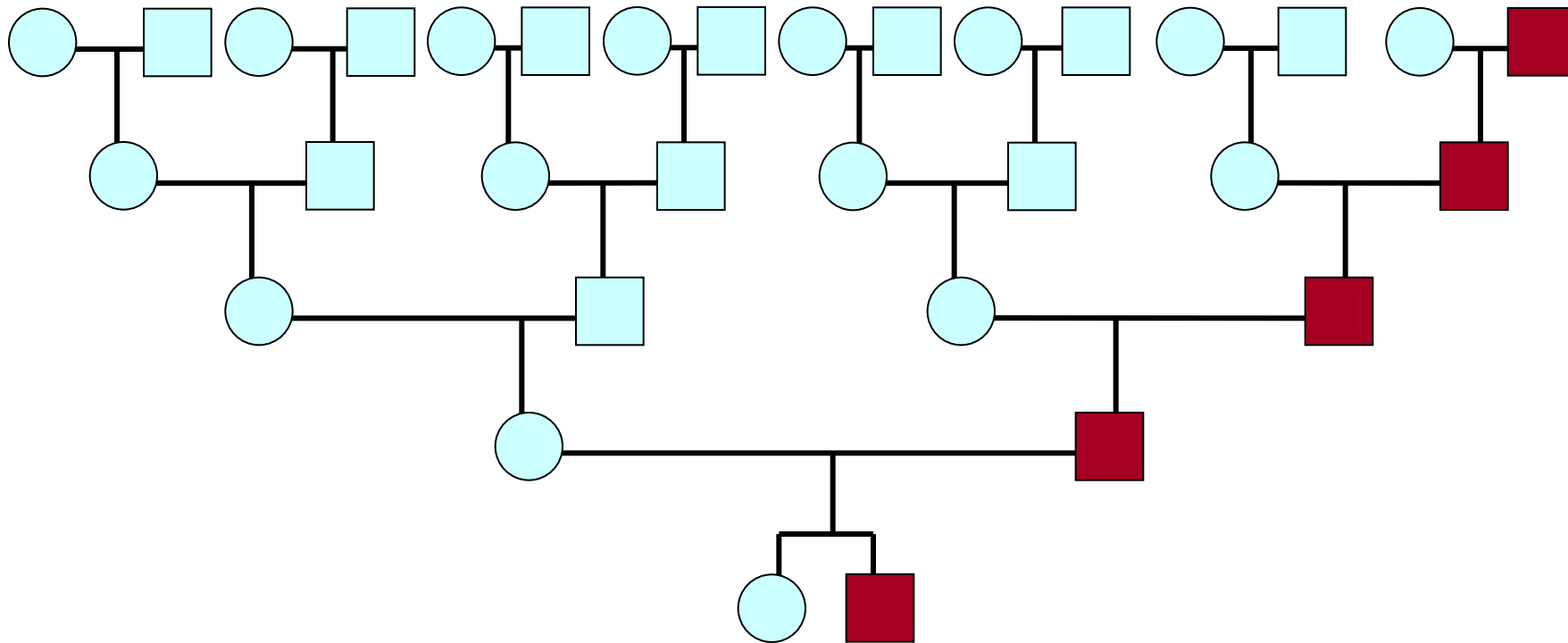
Rodokmen



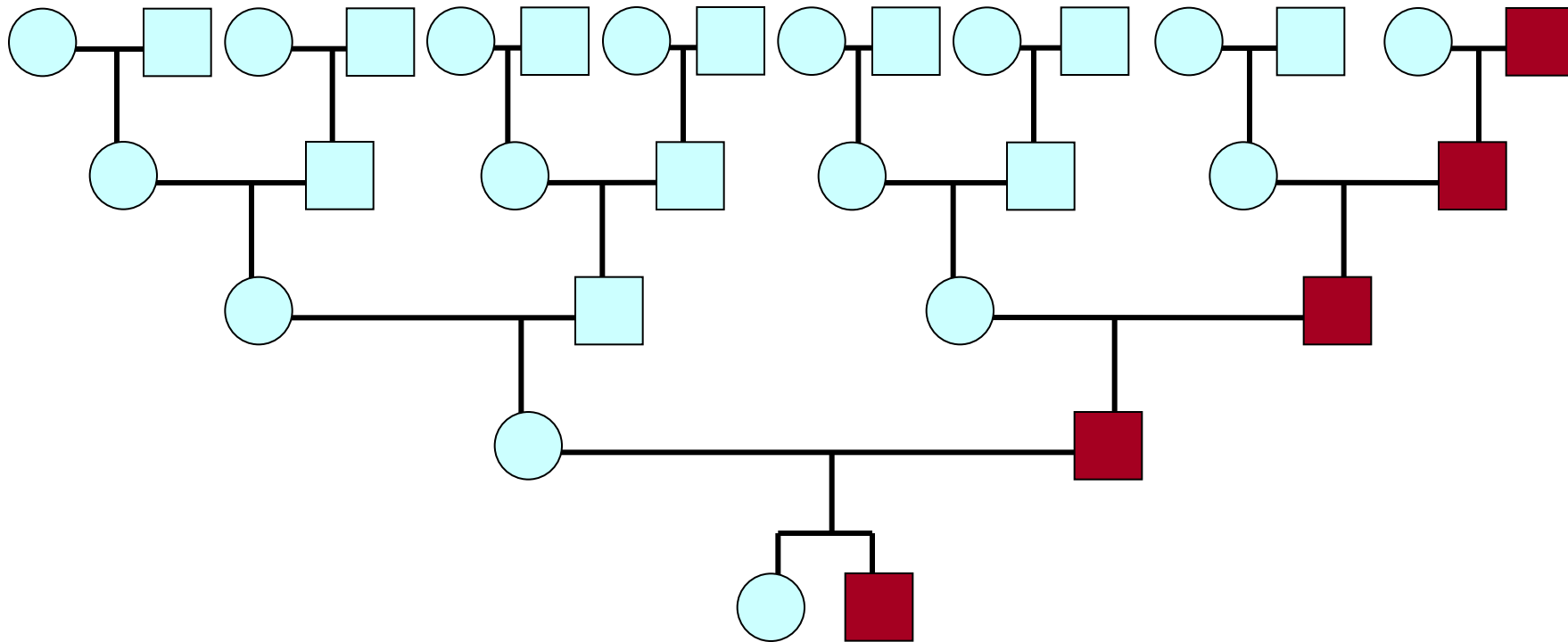
Mitochondriální dědičnost



Dědičnost chromozomu Y

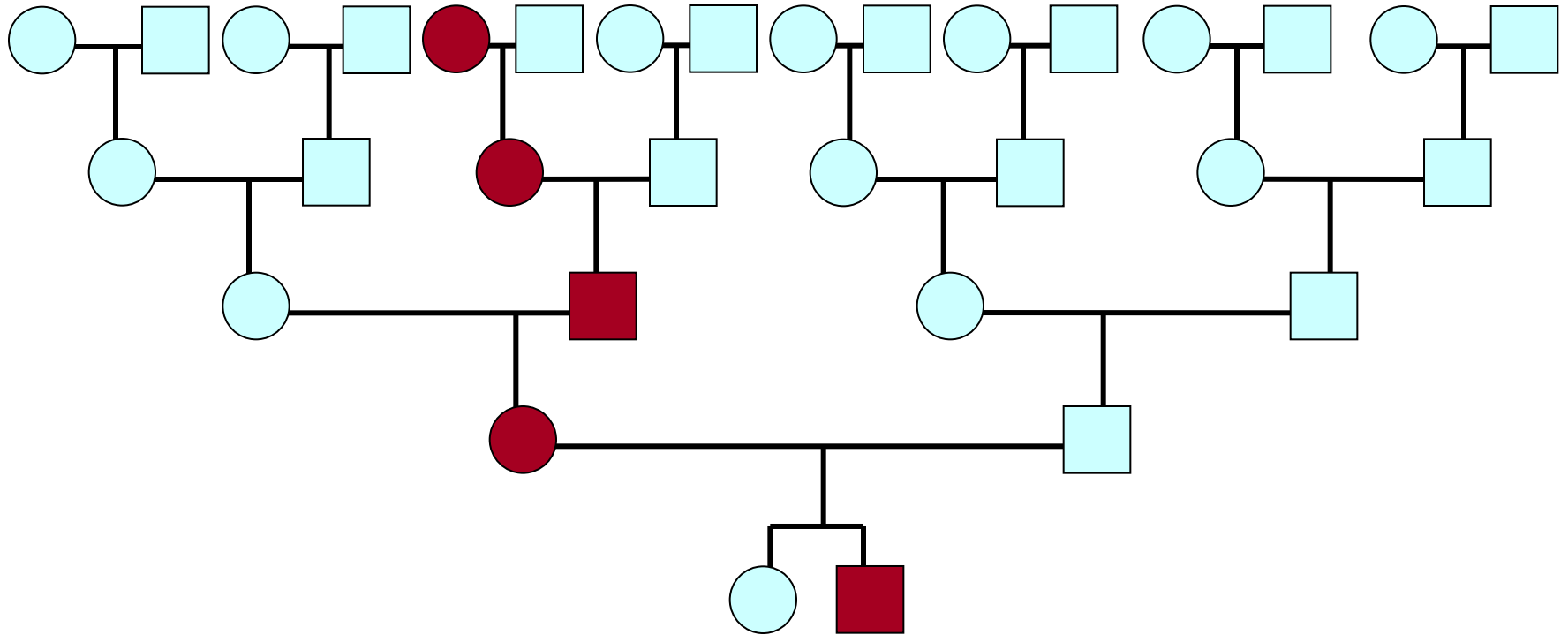


Dědičnost chromozomu Y

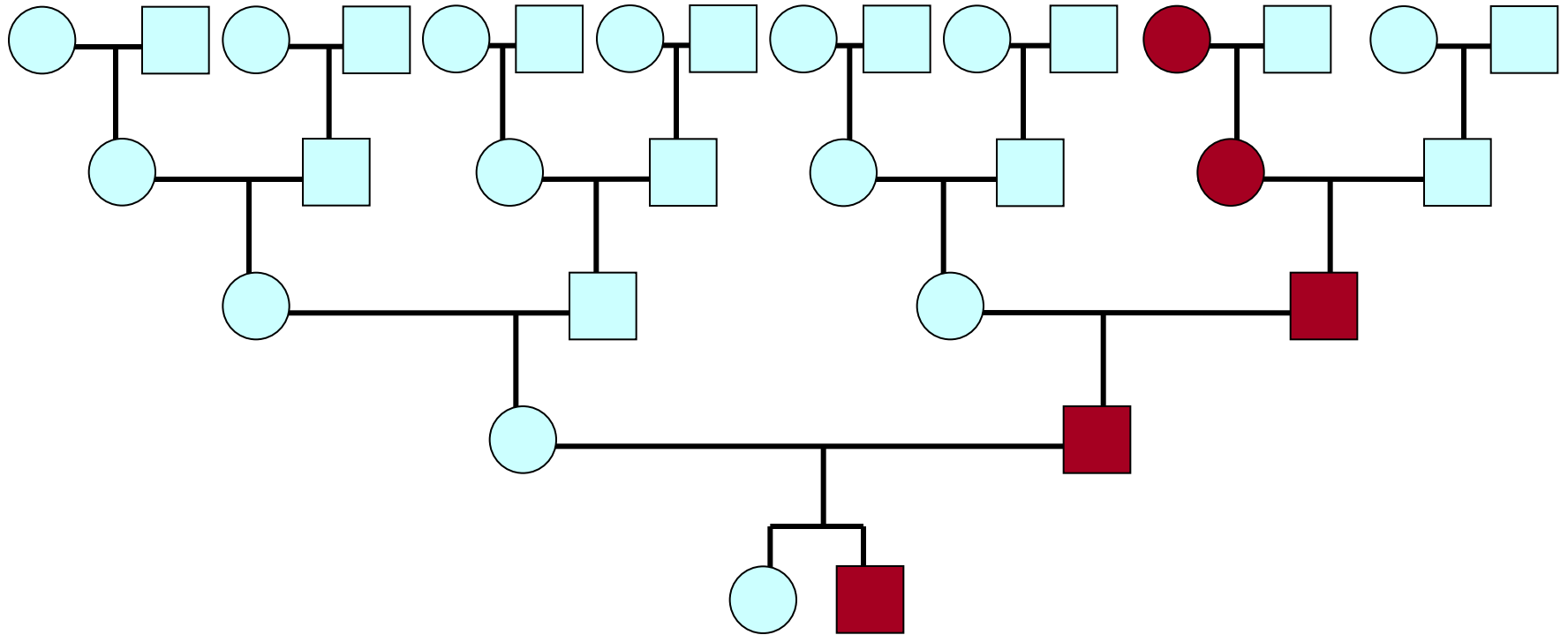


Co dědíme jako chromozom Y?

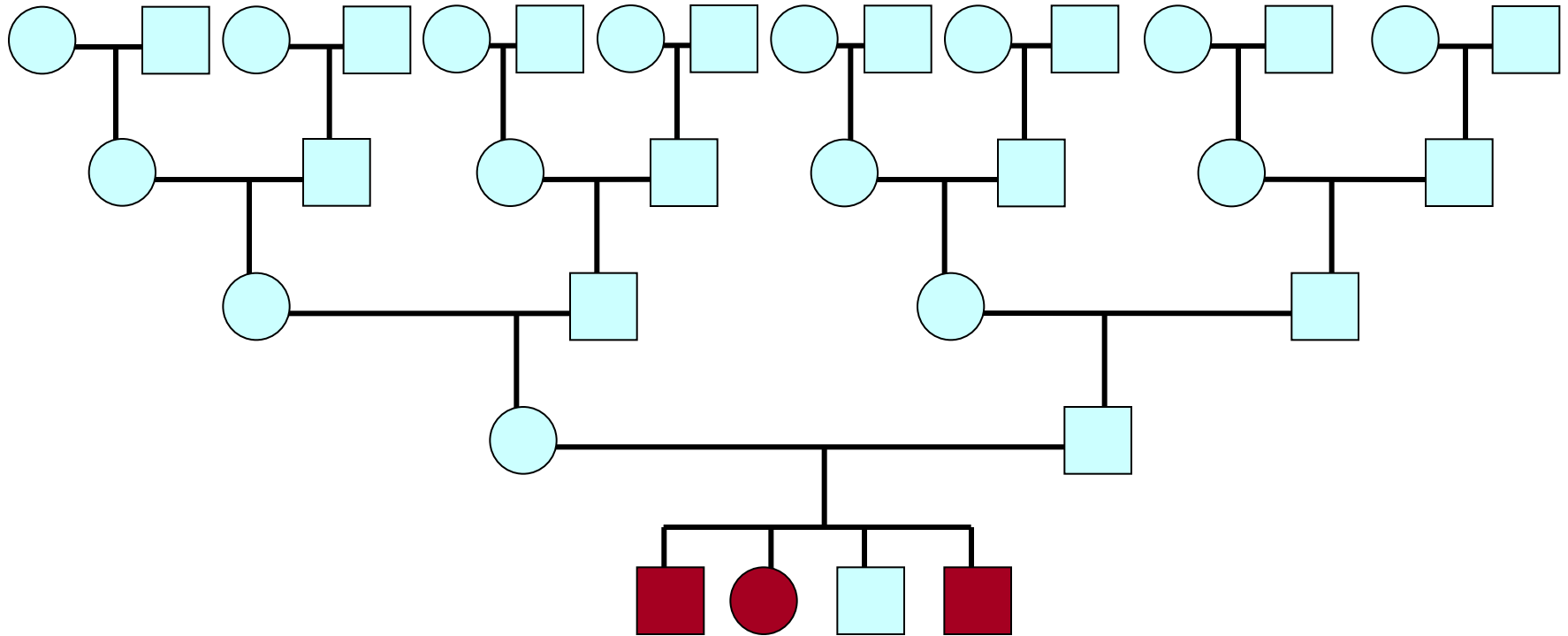
Dědičnost autozomální dominantní



Dědičnost autozomální dominantní



Dědičnost autozomální recesivní



Zevní faktory



Monogenní nemoci

Kolik máme monogenně dědičných nemocí?

≈ 1 000

≈ 10 000

≈ 100 000

Kolik máme monogenně dědičných nemocí?

≈ 1 000

≈ 10 000

≈ 100 000

Kolik máme monogenně dědičných nemocí?

≈ 1 000

≈ 10 000

≈ 100 000

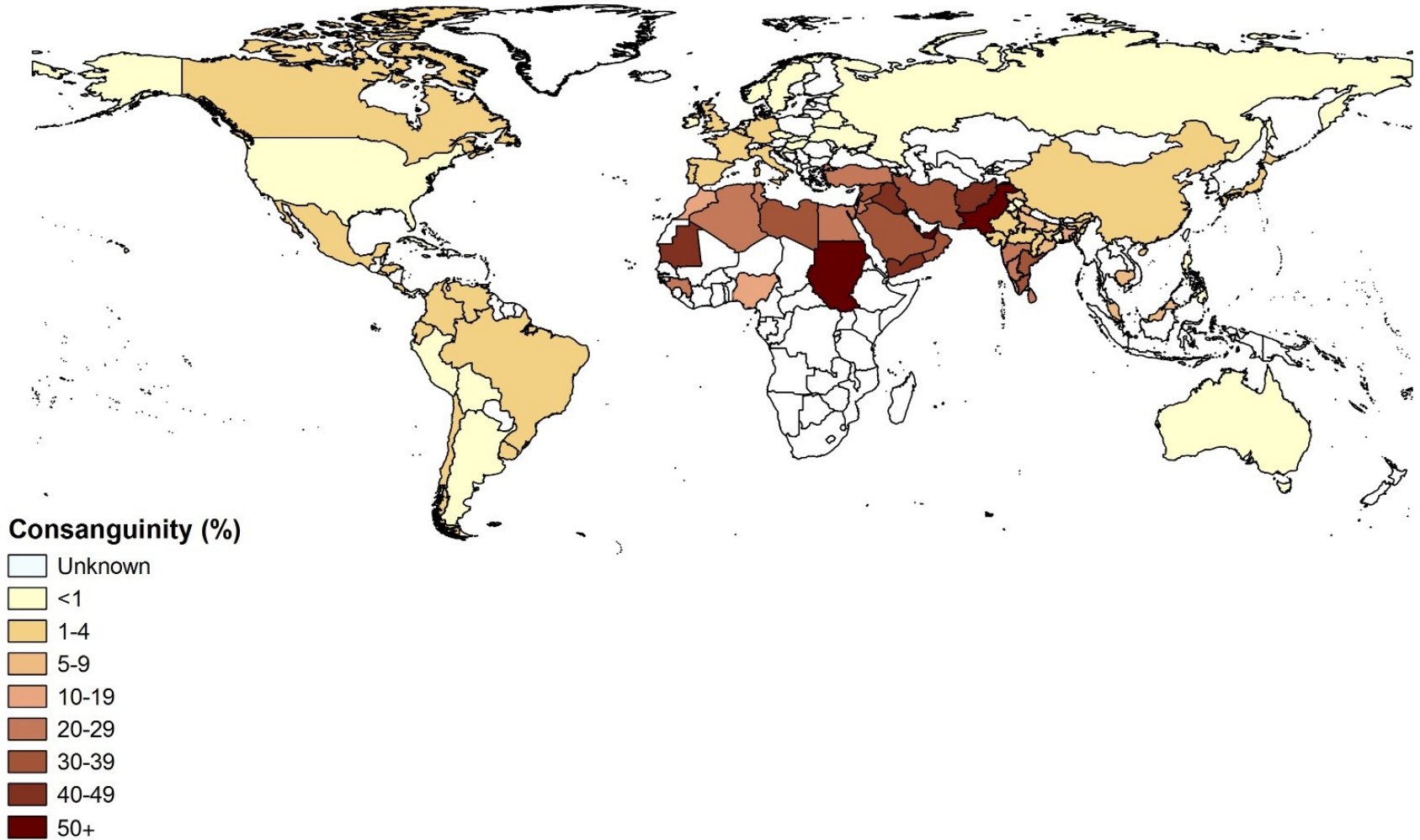
Recesivní nemoci

- **hemochromatóza (1:10)**
- **mutace faktoru V Leiden (1:20)**
- **cystická fibróza (1:25)**
- **spinální muskulární atrofie (1:40)**
- **hluchota**
- **rakovina prsu a vaječníků**

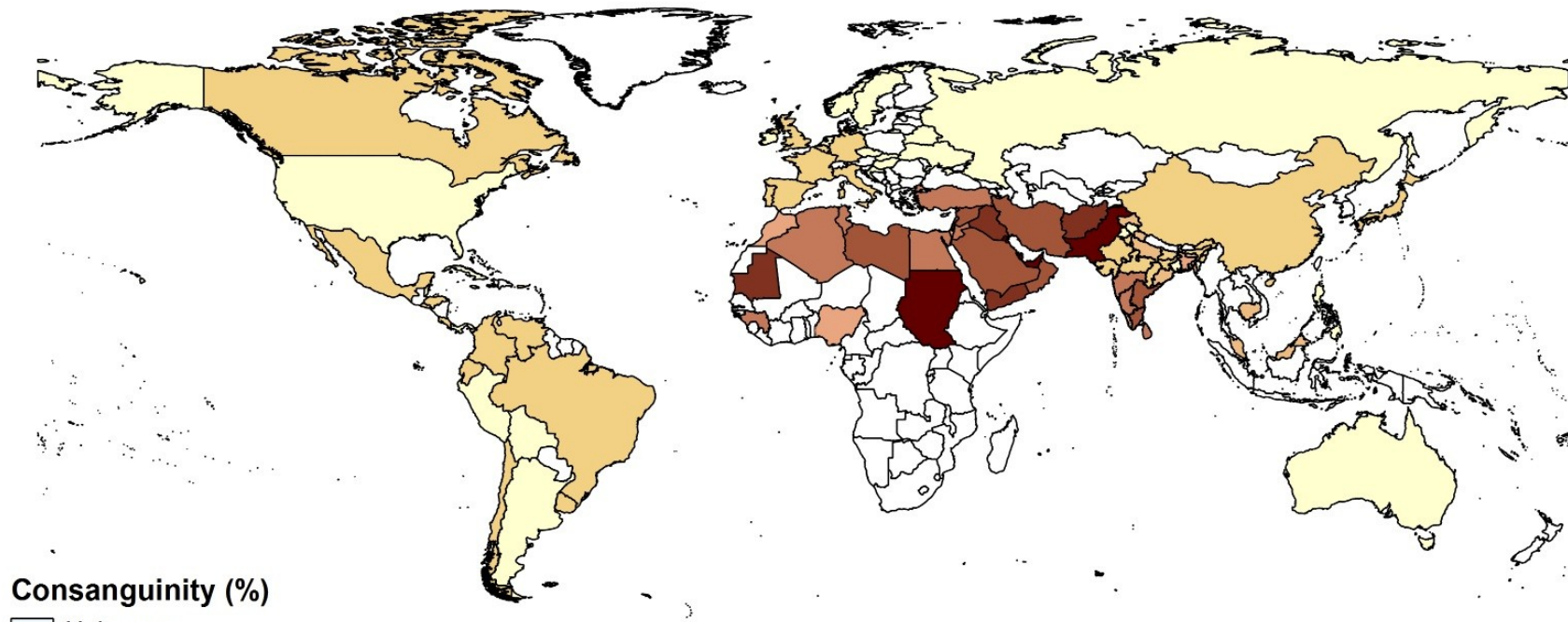
Původ podle typů mutací genů

- **efekt zakladatele**
- **malé uzavřené populace (Aškenázové, frankofonní Kanad'ané, Island, okolí jezera Maracaibo...)**
- **sňatky příbuzných**

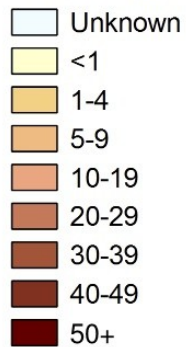
Mapa konsangvinity



Mapa konsangvinity



Consanguinity (%)



**Povinné genetické testování partnerů:
Bahrajn
Saúdská Arábie
(Island)**

České genetické nemoci

Syndrom Nijmegen breakage, syndrom Seemanové, NBS

NBS1 gen pro nibrin na 8q21

Heterozygoti 1:130-150

Společný předek

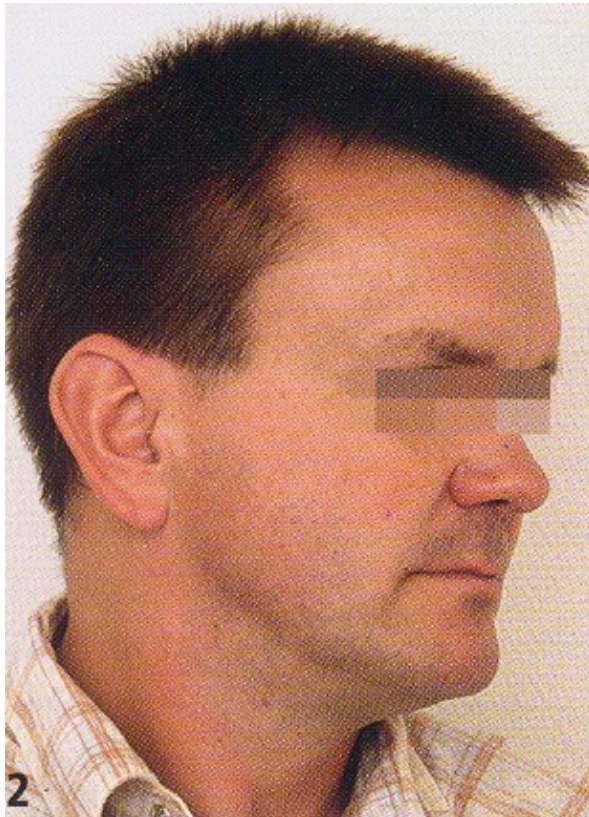


*Seemanová,
1985*

Česká dysplázie

COL2A1 gen

typický obličej, ploché nohy, porucha
růstu 3. a 4. prstu na nohou

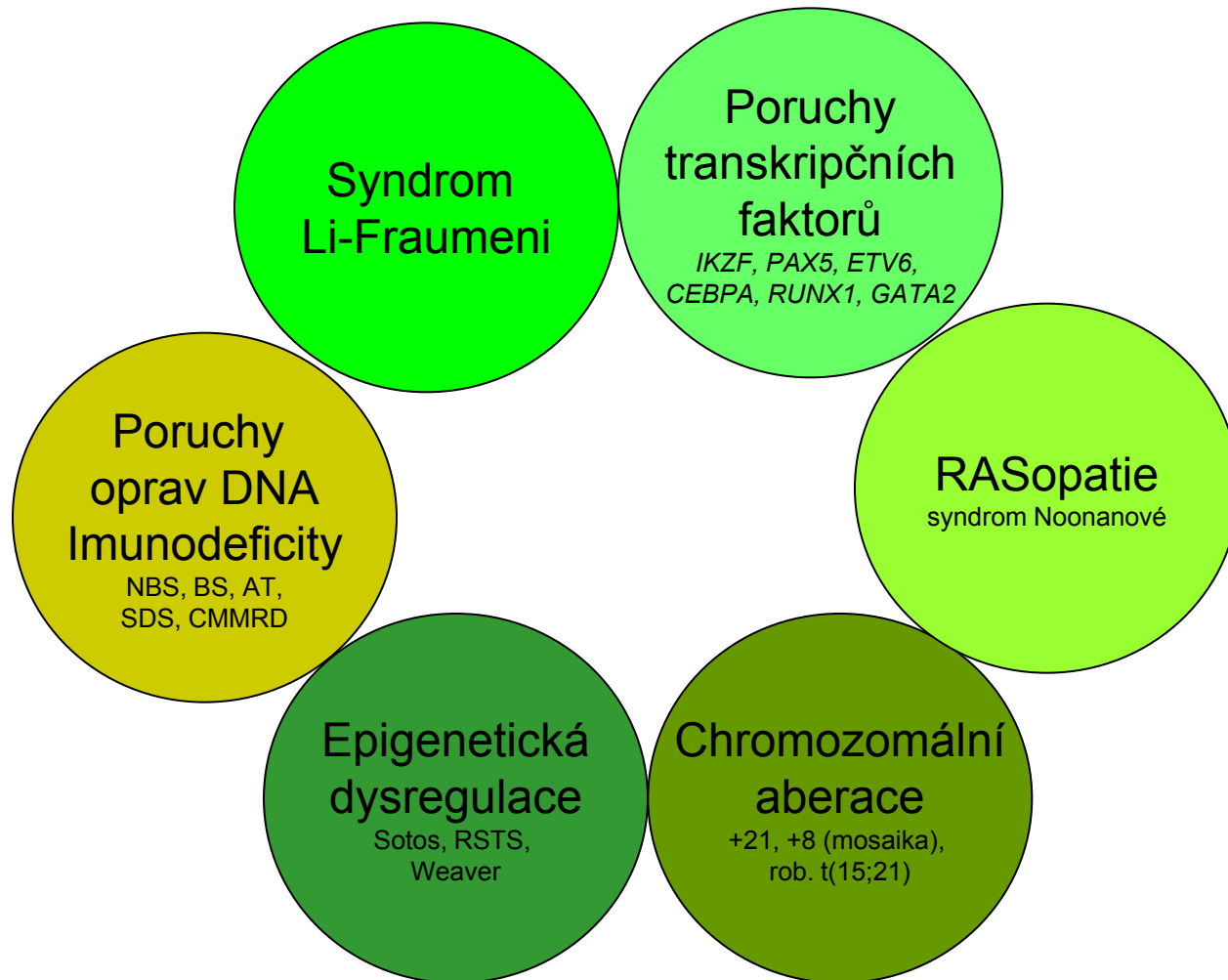


Jak objevujeme genetické nemoci?

Molekulárně biologické metody

- **Analýzy známých genů a jiných sekvencí DNA**
- **Srovnání zdravých a nemocných členů rodiny**
- **Hledání nových změn a „nových“ genů**
- **Ověření funkčními testy**

Změny DNA a nemoci



➤ **geny i nekódující oblasti**

Studium dvojčat

- **Genetické vs. negenetické vlivy**
 - **MZ dvojčata 100 % shodných alel**
 - **DZ dvojčata/sourozenci 50 % shodných alel**

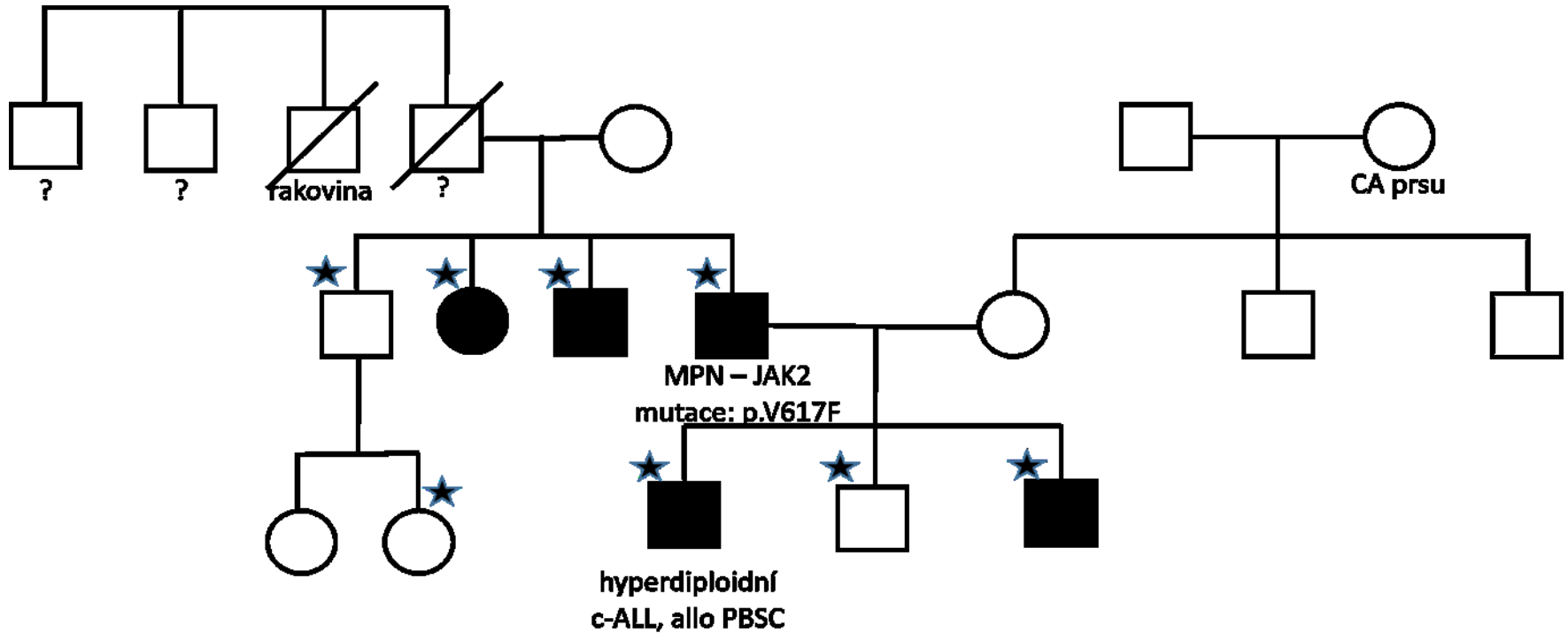
Role genetických vlivů (konkordance MZ a DZ dvojčat):

cukrovka, schizofrenie, lupénka, rozštěpy rtů, roztroušená skleróza

Jsou si jednovaječná dvojčata zcela geneticky podobná?

Příklad z praxe

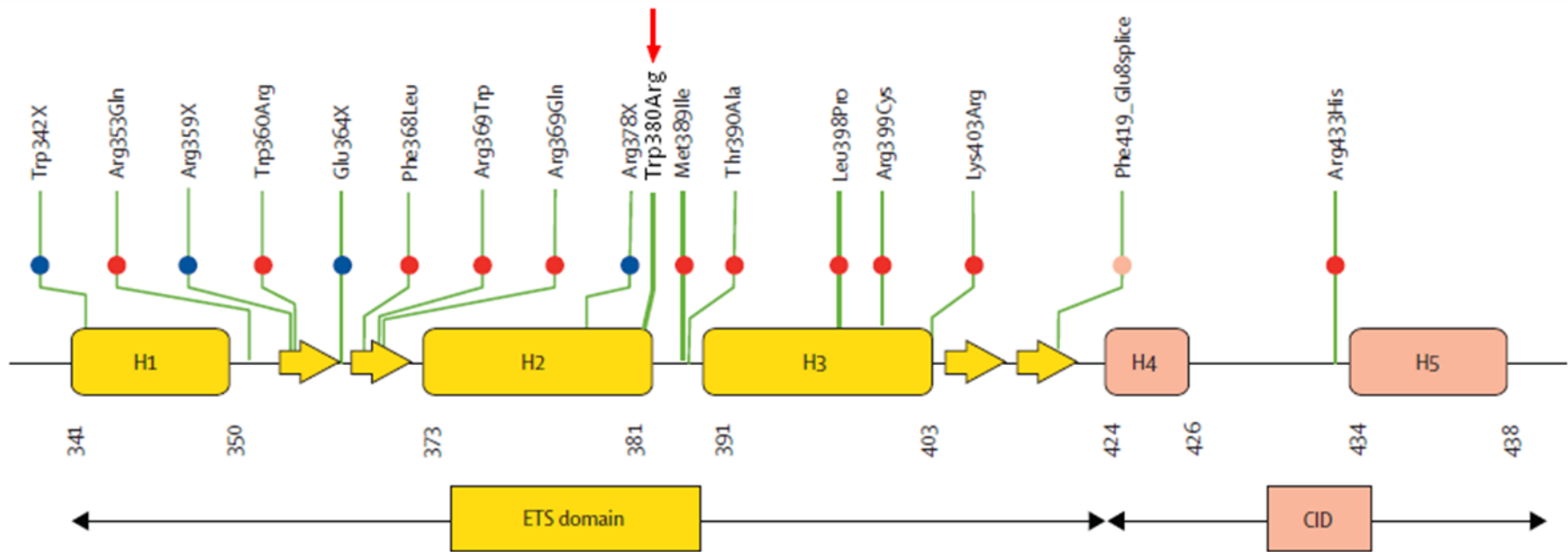
Příklad z praxe



★ vyšetřené vzorky

ETV6

- Exomové sekvenování - srovnáním exomu zdravých a nemocných členů rodiny nalezena varianta genu *ETV6*: p.W380R



Upraveno podle: Moriyama et al., 2015

Bioinformatická a biostatistická analýza

- mapování na referenční sekvenci (BWA-mem)
- vytvoření dvou souborů variant (Samtools mpileup):

1. skupina – probandi s nemocí
2. skupina – probandi bez nemoci

vyloučení populačních (a rodinných) variant (VarScan):
vybrány varianty přítomné pouze ve skupině trombocytopenie

identifikace potenciálně kauzálních variant:

anotace variant Annovarem;

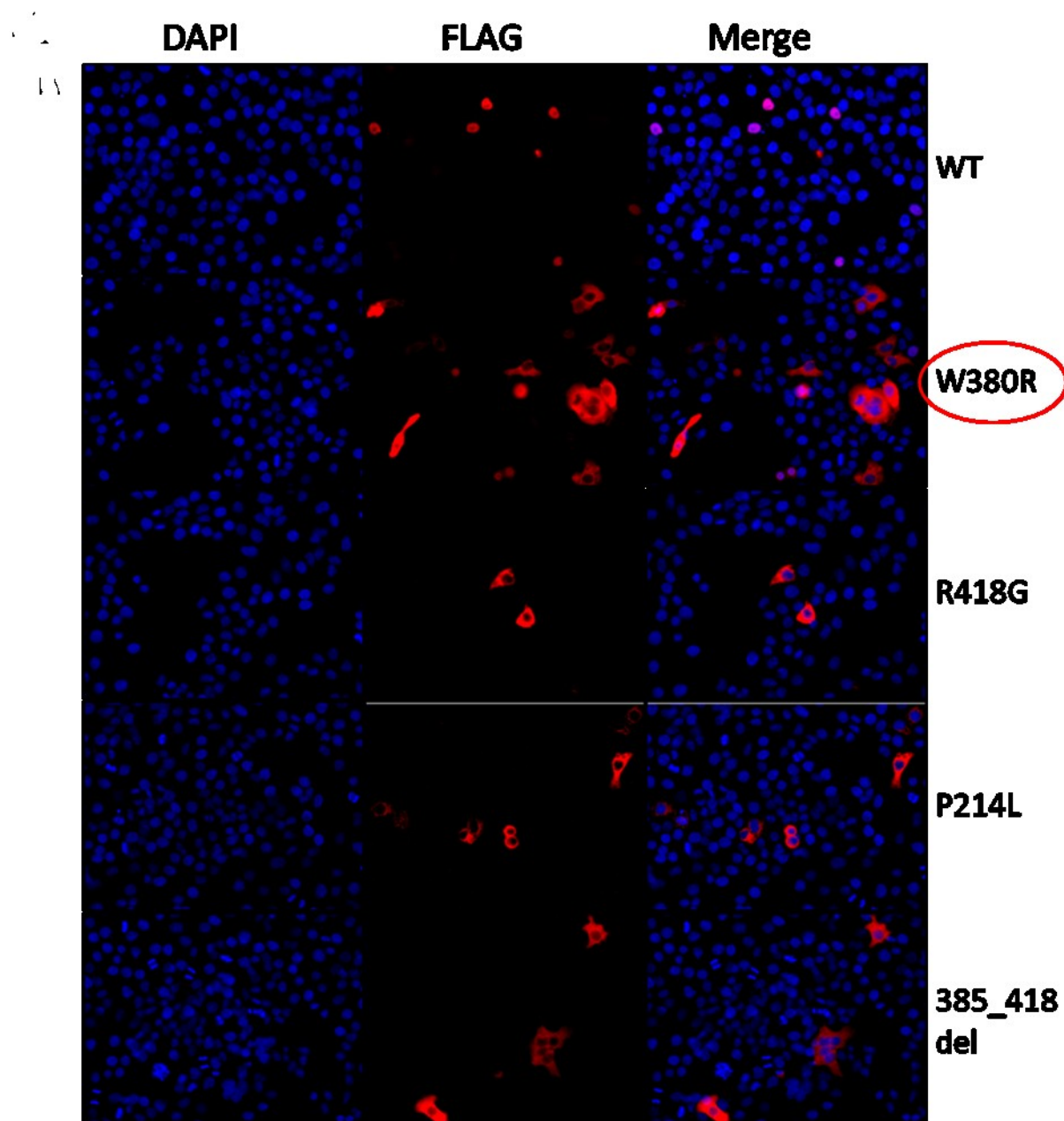
filtry: coverage > 20

ponechány varianty v exonech, ncRNA exonic, downstream a
upstream

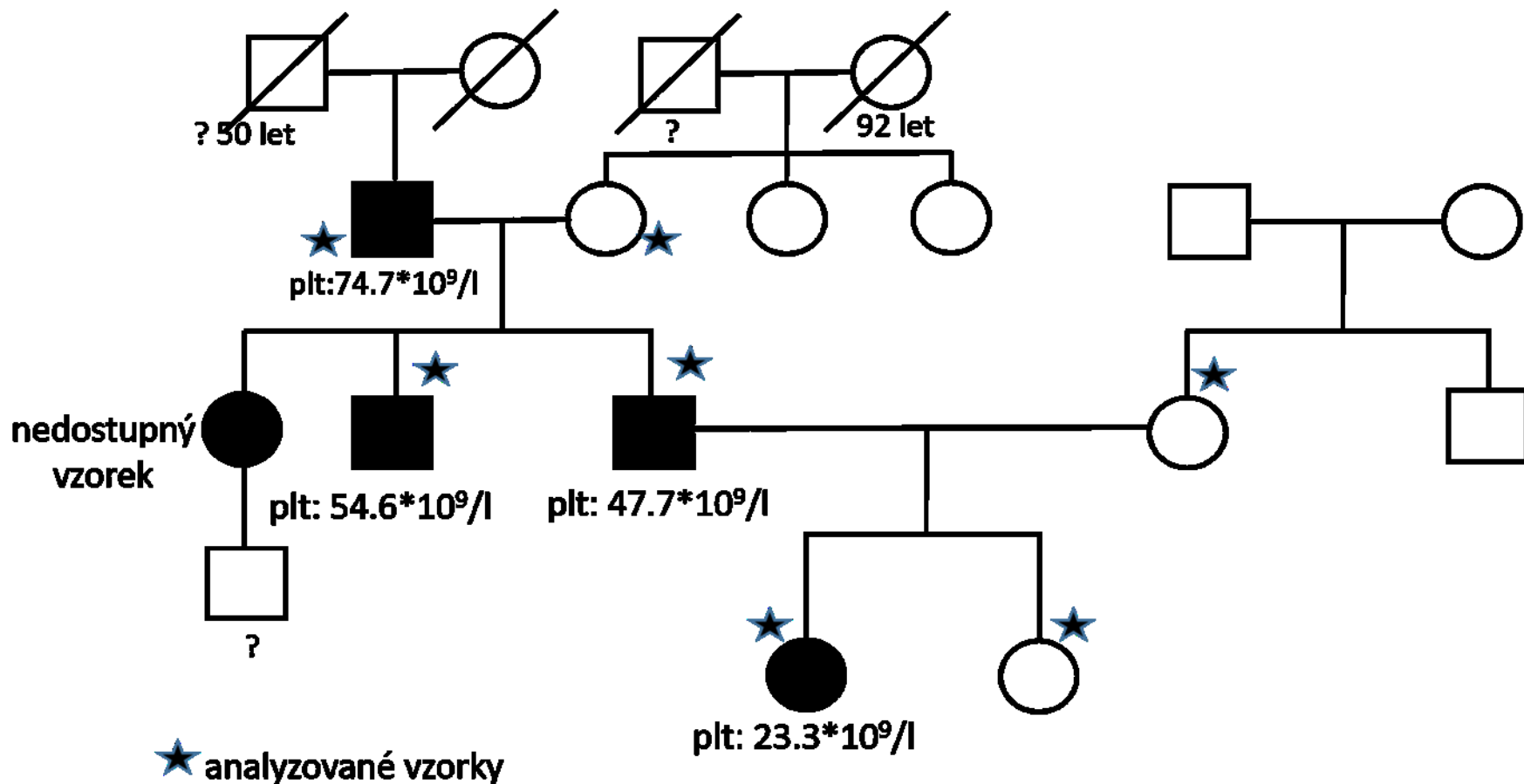
vynechány synonymní mutace

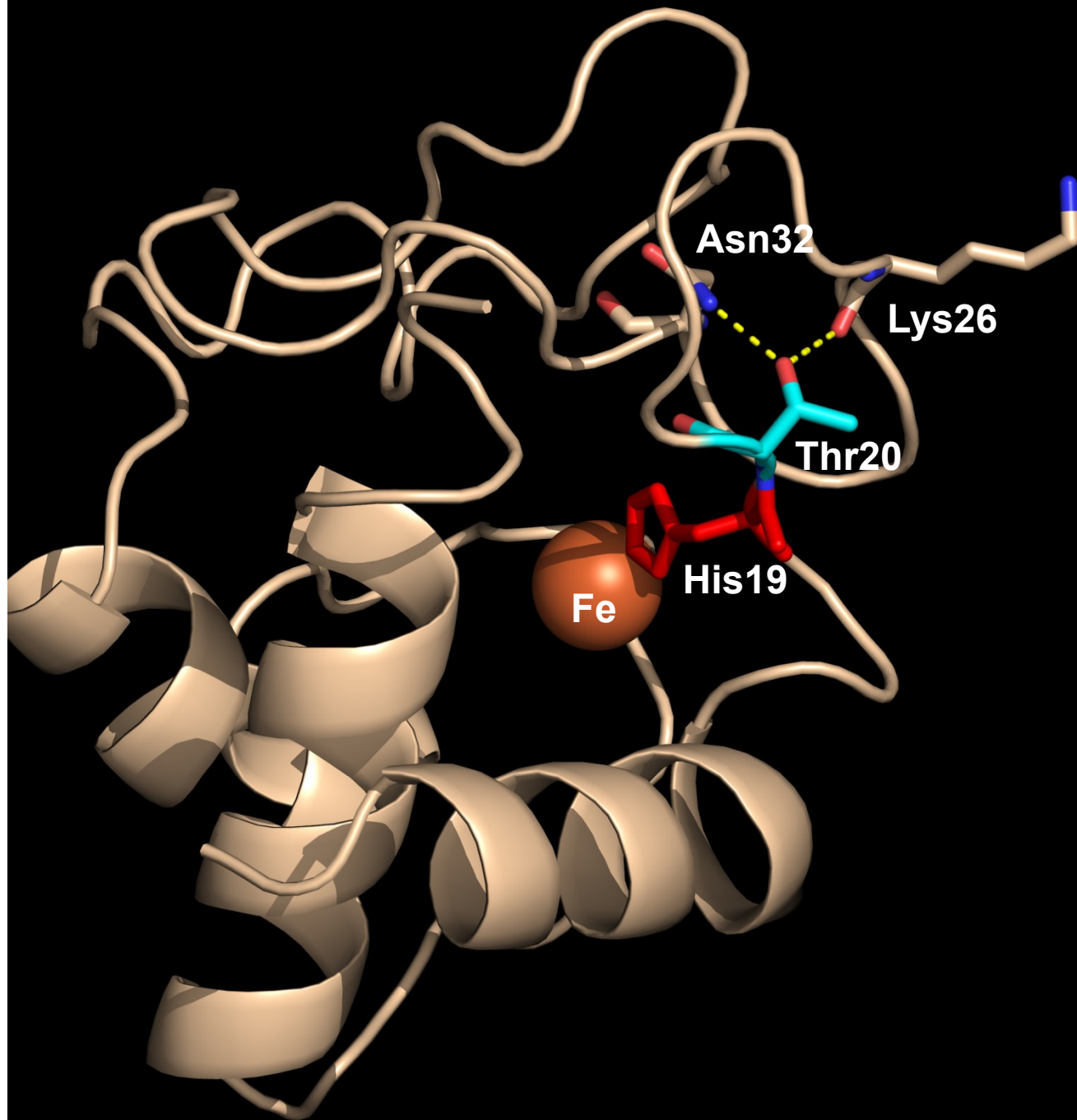
odstraněny varianty anotované v dbSNP dtb. s rsXXXXX ID

Funkční analýza
ETV6:
fluorescenční
mikroskopie



CYCS, exon2, p.T20I





**CYCS:
p.T20I**



Co by měl umět klinický genetik?

- **Komplexní vyšetření**
- **Indikace analýz genů**
 - celoexomové sekvenování
 - celogenomové sekvenování
 - funkční testy
- **Interpretace výsledků**
(od praktických lékařů až po klinické genetiky)
- **Návrh léčebných nebo preventivních opatření s ohledem na přání nemocných a etické aspekty**

Co by měl umět klinický genetik?

- **Komplexní vyšetření**
- **Indikace analýz genů**
 - celoexomové sekvenování
 - celogenomové sekvenování
 - funkční testy
- **Interpretace výsledků**
(od praktických lékařů až po klinické genetiky)
- **Návrh léčebných nebo preventivních opatření s ohledem na přání nemocných a etické aspekty**

ANALYZOVAT INFORMACE JAKO CELEK
- CELEK JE VÍC NEŽ SOUHRN ČÁSTÍ

Proč tedy genetika?

- **Diagnostika nemocí
(vč. prenatální, preimplantační, genetické
poradenství)**
- **Terapie – farmakogenetika a farmakogenomika,
imunogenetika**
- **Prevence**
- **Genová terapie, editování genomu**

Proč tedy genetika?

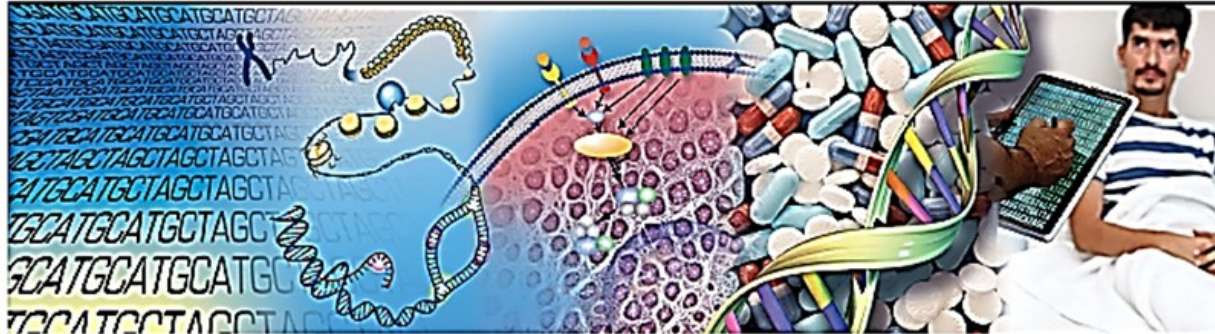
Understanding
the structure of
genomes

Understanding
the biology of
genomes

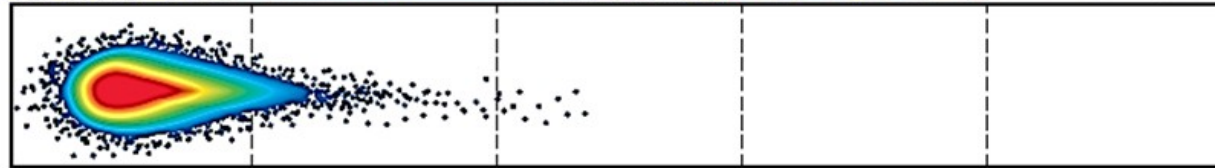
Understanding
the biology of
disease

Advancing
the science of
medicine

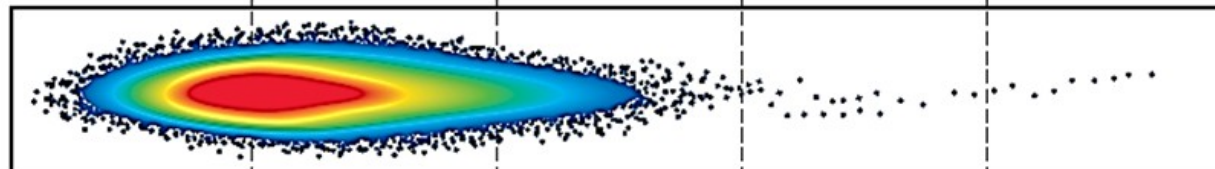
Improving the
effectiveness of
healthcare



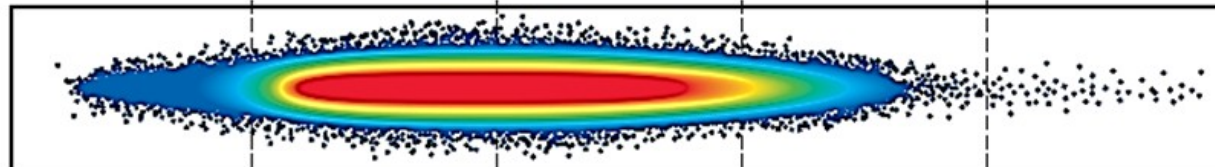
1990–2003
Human Genome Project



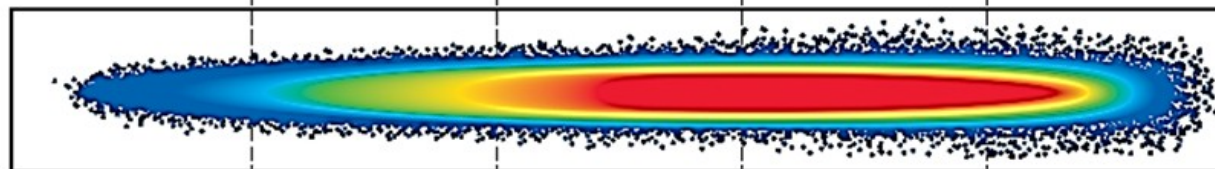
2004–2010



2011–2020



Beyond 2020



Co vás čeká v tomto předmětu

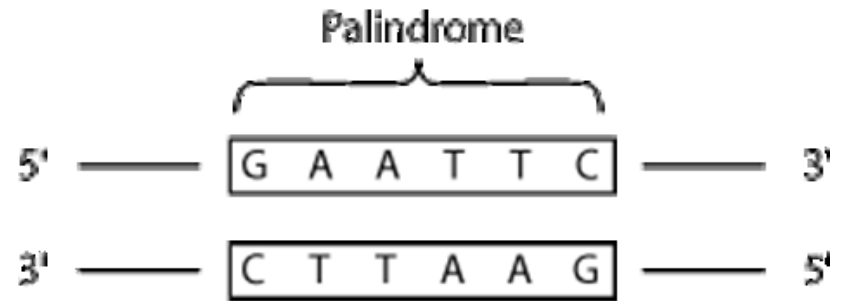
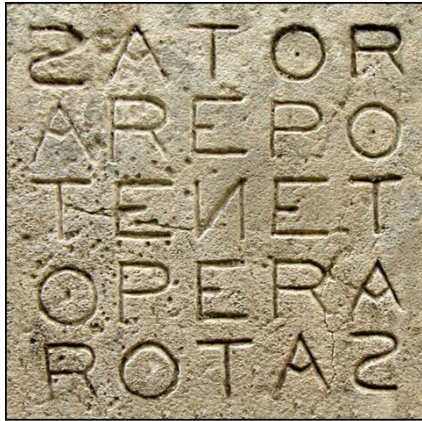
- **Monogenní nemoci (CF)**
- **Chromozomální aberace**
- **Genetika nádorových nemocí**
- **Genetika krevních nemocí, genetika neuromuskulárních nemocí**
- **Genetické syndromy**
- **Forensní genetika**
- **Genetika v reprodukční medicíně**
- **Onemocnění s komplexní dědičností**
- **Terapie a výhled do budoucnosti**

Co vás čeká v tomto předmětu

- **Monogenní nemoci (CF)**
- **Chromozomální aberace**
- **Genetika nádorových nemocí**
- **Genetika krevních nemocí, genetika neuromuskulárních nemocí**
- **Genetické syndromy**
- **Forensní genetika**
- **Genetika v reprodukční medicíně**
- **Onemocnění s komplexní dědišností**
- **Terapie a výhled do budoucnosti**

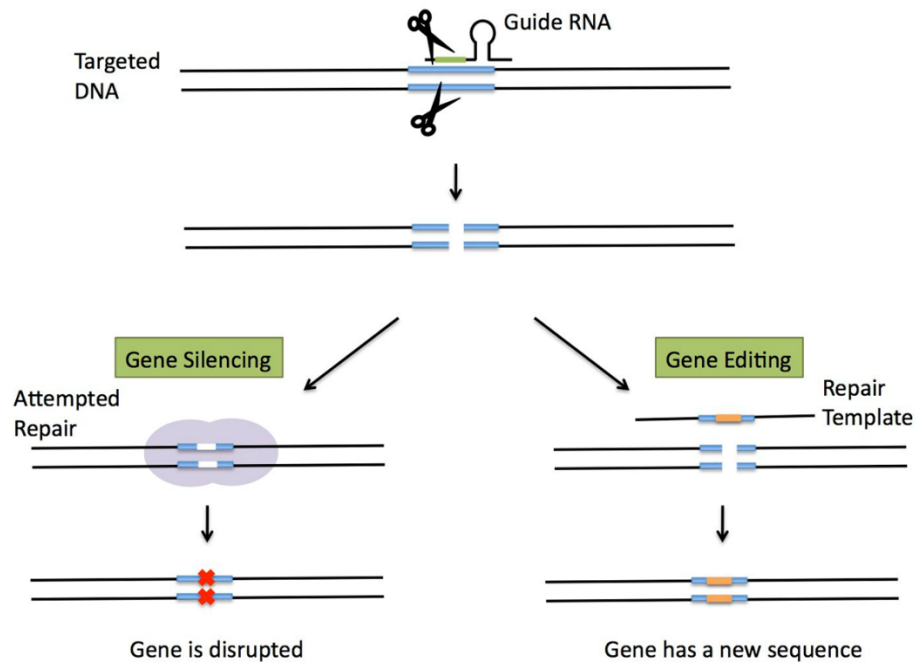
Inikace, klinické využití i etické aspekty!

CRISPR-Cas9

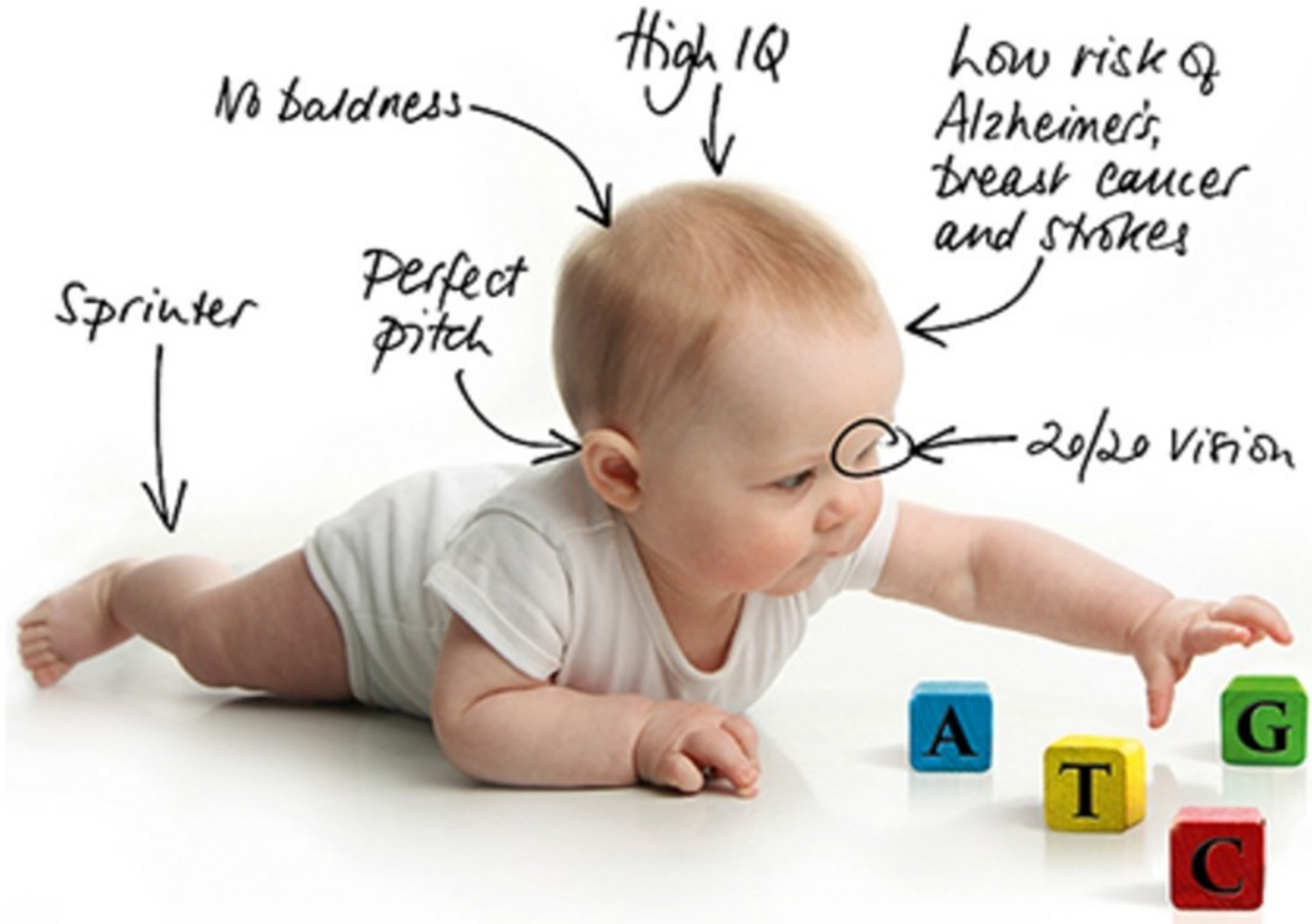


MCAT-Review.org

Pompeii, 79AD



Děti na objednávku?



Přípitek genetiků

Přípitek genetiků

AŽ do DNA!