



Metody reprodukční genetiky

Rostislav Navrátil

Neplodnost

- ❖ WHO: „failure to achieve a pregnancy after 12 months or more of regular unprotected sexual intercourse“ (cca 15%)
 - ❖ Primární neplodnost
 - ❖ Sekundární neplodnost
- ❖ více než 25% žen v trvalém partnerském vztahu se neúspěšně snaží otěhotnět dva roky
- ❖ více než 10 % žen dokonce pět let
- ❖ neplodnost se za posledních 20 let kontinuálně zvyšuje

WHO data:

<https://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/perspective/en/>



Příčiny neplodnosti

❖ Žena:

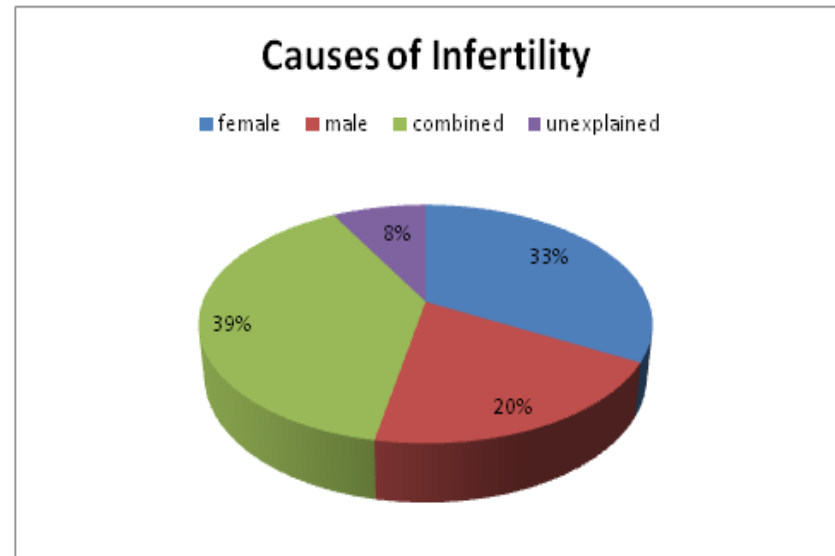
- ❖ nejčastěji věk > 35 let
- ❖ endometrióza
- ❖ neprůchodnost reprodukčních cest
- ❖ hormonální problémy

❖ Muž:

- ❖ špatný spermiogram
- ❖ špatná životospráva
- ❖ neprůchodnost reprodukčních cest

❖ Kombinovaná příčina

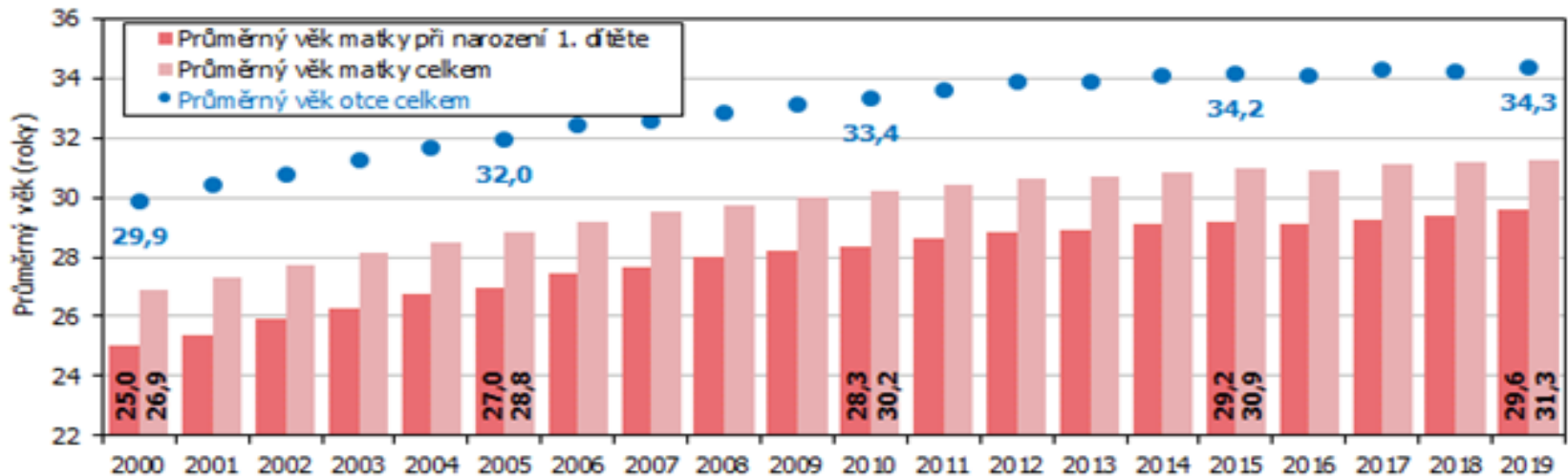
- ❖ výše zmíněné/imunogenetika

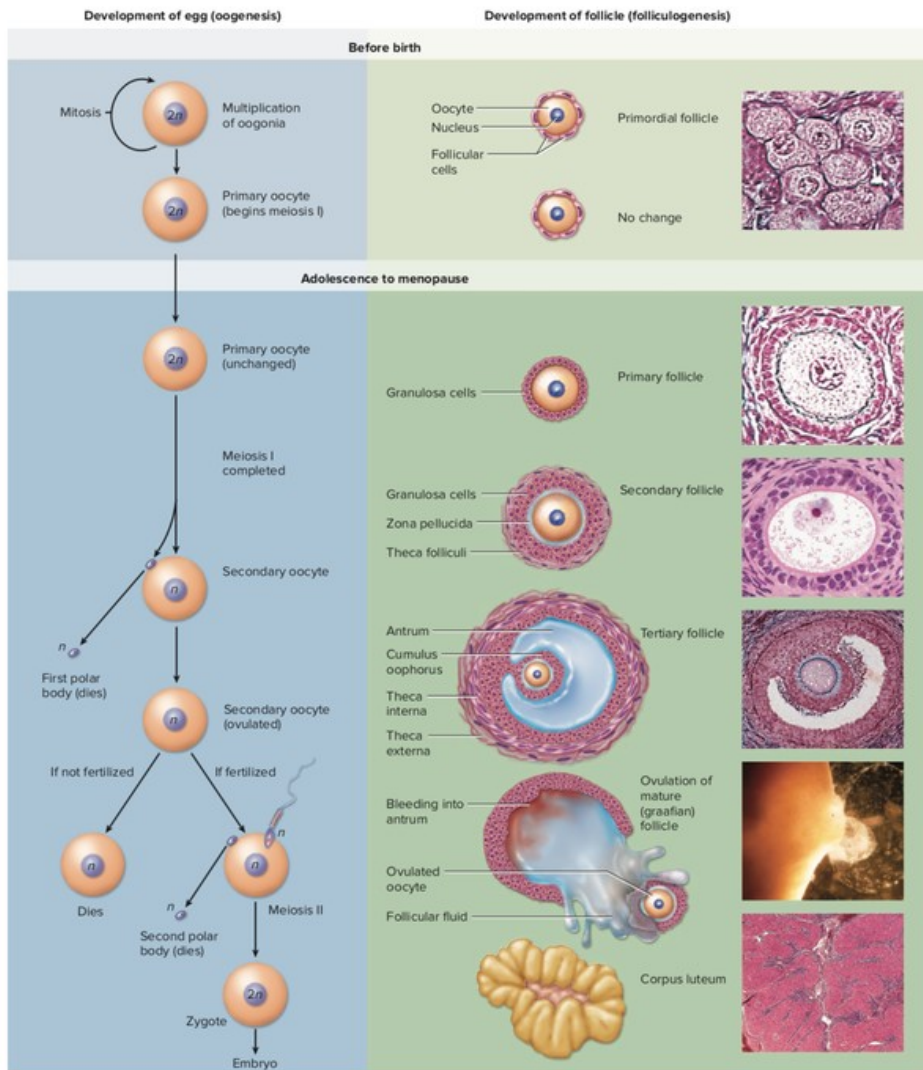


Trend dnešní doby

Jihomoravský kraj

- ❖ Průměrný věk **prvorodičky**/**matky**/**otce** v době porodu
 - ❖ 2000: 25 let 26,9 let 29,9 let
 - ❖ 2005: 27 let 28,8 let 32 let
 - ❖ 2010: 28,3 let 30,2 let 33,4 let
 - ❖ 2015: 29,2 let 30,9 let 34,2 let
 - ❖ 2019: 29,6 let 31,3 let 34,3 let



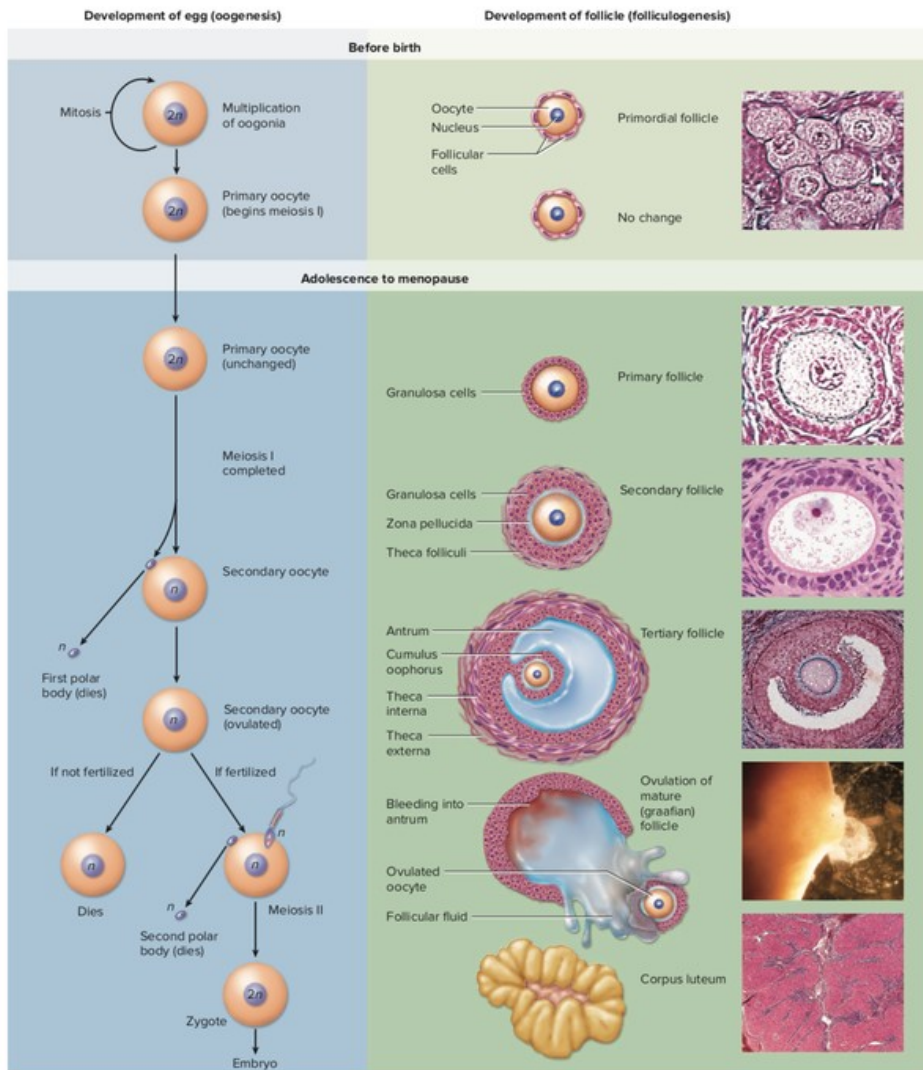


Na věku matky záleží

Zastavení meiotického dělení před narozením až do začátku menstruačního cyklu (puberta-menopauza)

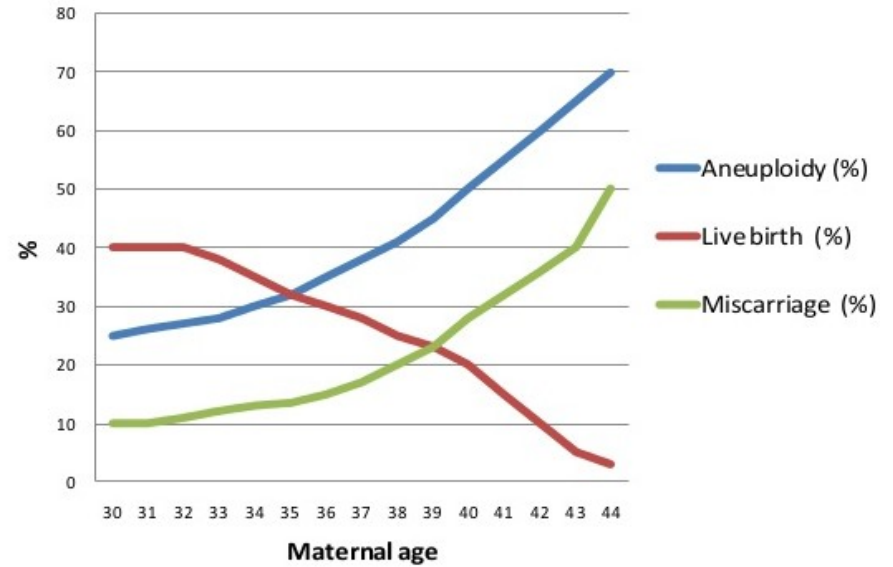


FIGURE 28.11 Oogenesis (Left) and Corresponding Development of the Follicle (Right). AP®
 (1, 2: © Ed Reschke/Getty Images; (3: © McGraw-Hill Education/AI Telsler, photographer; (4: © Ed Reschke/Getty Images; (5: © Petit Format/Science Source



Na věku matky záleží

Oocyte aneuploidy and maternal age



Aneuploidie v oocyty a následně v embryu vedou k nižší úspěšnosti otěhotnění a vyšší četnosti potratů i rizika narození dítěte s chromozomovou vadou

FIGURE 28.11 Oogenesis (Left) and Corresponding Development of the Follicle (Right). AP®
 (1, 2): © Ed Reschke/Getty Images; (3): © McGraw-Hill Education/AI Telsler, photographer; (4): © Ed Reschke/Getty Images; (5): © Petit Format/Science Source

Léčba neplodnosti v na IVF klinice

Vstupní konzultace

- anamnéza
- rozvaha
- základní vyšetření
- hormonální profil
- spermogram

Metody asistované reprodukce

- hormonální stimulace
- odběr oocytů a spermií
- oplození (ICSI, PICSI)
- kultivace embryí
- Biopsie embrya

Embryotransfer

- Čerstvý embryotransfer
- Kryoembryotransfer
- Skladování zbylých embryí pohlavních buněk

Léčba neplodnosti v na IVF klinice

Vstupní konzultace

- anamnéza
- rozvaha
- základní vyšetření
- hormonální profil
- spermigram

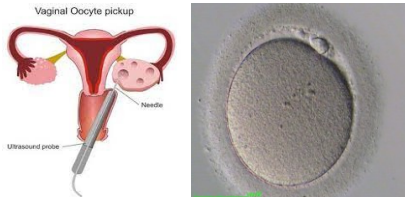
Metody asistované reprodukce

- hormonální stimulace
- odběr oocytů a spermií
- oplození (ICSI, PICSI)
- kultivace embryí
- Biopsie embrya

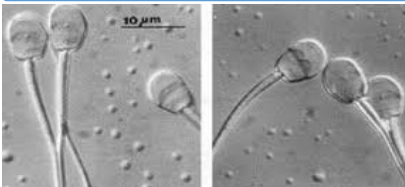
Embryotransfer

- Čerstvý embryotransfer
- Kryoembryotransfer
- Skladování zbylých embryí pohlavních buněk

Odběr oocytů



Odběr spermií



Léčba neplodnosti v na IVF klinice

Vstupní konzultace

- anamnéza
- rozvaha
- základní vyšetření
- hormonální profil
- spermigram

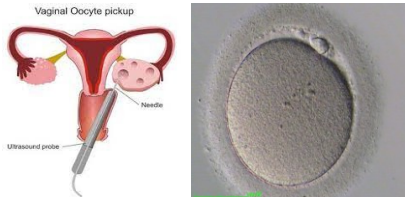
Metody asistované reprodukce

- hormonální stimulace
- odběr oocytů a spermií
- oplození (ICSI, PICSI)
- kultivace embryí
- Biopsie embrya

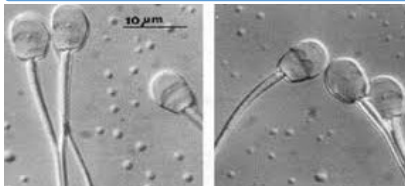
Embryotransfer

- Čerstvý embryotransfer
- Kryoembryotransfer
- Skladování zbylých embryí pohlavních buněk

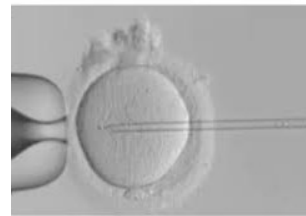
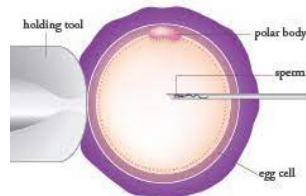
Odběr oocytů



Odběr spermií



Oplození oocytu (ICSI)



Léčba neplodnosti v na IVF klinice

Vstupní konzultace

- anamnéza
- rozvaha
- základní vyšetření
- hormonální profil
- spermigram

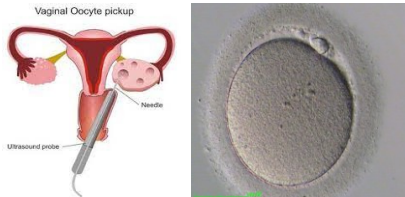
Metody asistované reprodukce

- hormonální stimulace
- odběr oocytů a spermií
- oplození (ICSI, PICSI)
- kultivace embryí
- Biopsie embrya

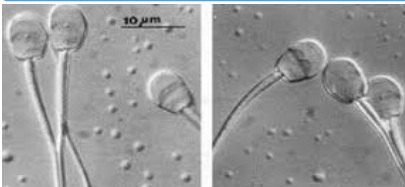
Embryotransfer

- Čerstvý embryotransfer
- Kryoembryotransfer
- Skladování zbylých embryí pohlavních buněk

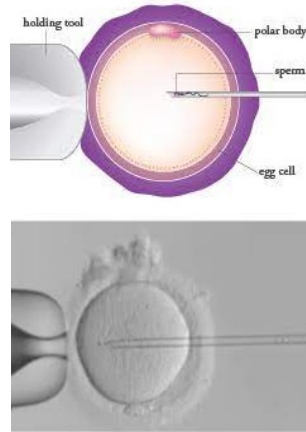
Odběr oocytů



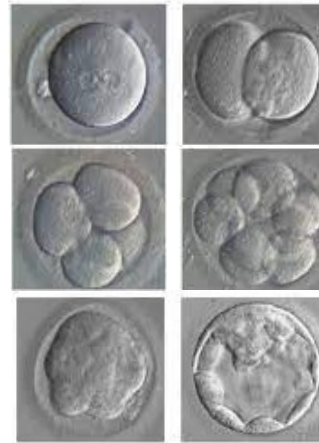
Odběr spermií



Oplození oocytu (ICSI)



Vývoj embrya



Léčba neplodnosti v na IVF klinice

Vstupní konzultace

- anamnéza
- rozvaha
- základní vyšetření
- hormonální profil
- spermigram

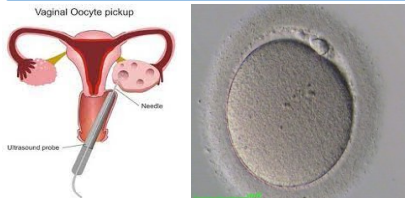
Metody asistované reprodukce

- hormonální stimulace
- odběr oocytů a spermií
- oplození (ICSI, PICSI)
- kultivace embryí
- Biopsie embrya

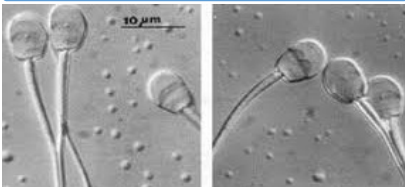
Embryotransfer

- Čerstvý embryotransfer
- Kryoembryotransfer
- Skladování zbylých embryí pohlavních buněk

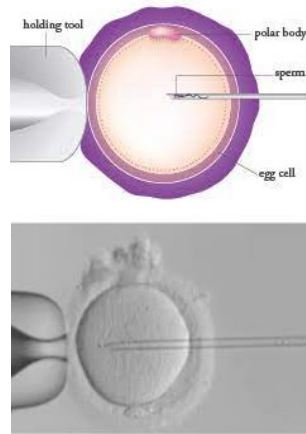
Odběr oocytů



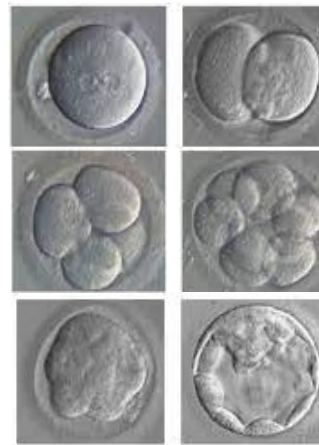
Odběr spermií



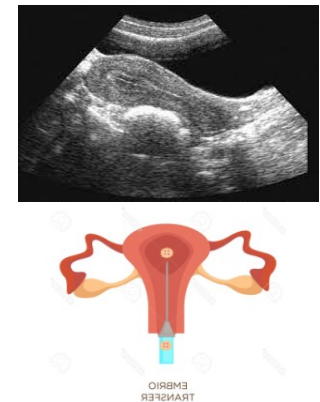
Oplození oocytu (ICSI)



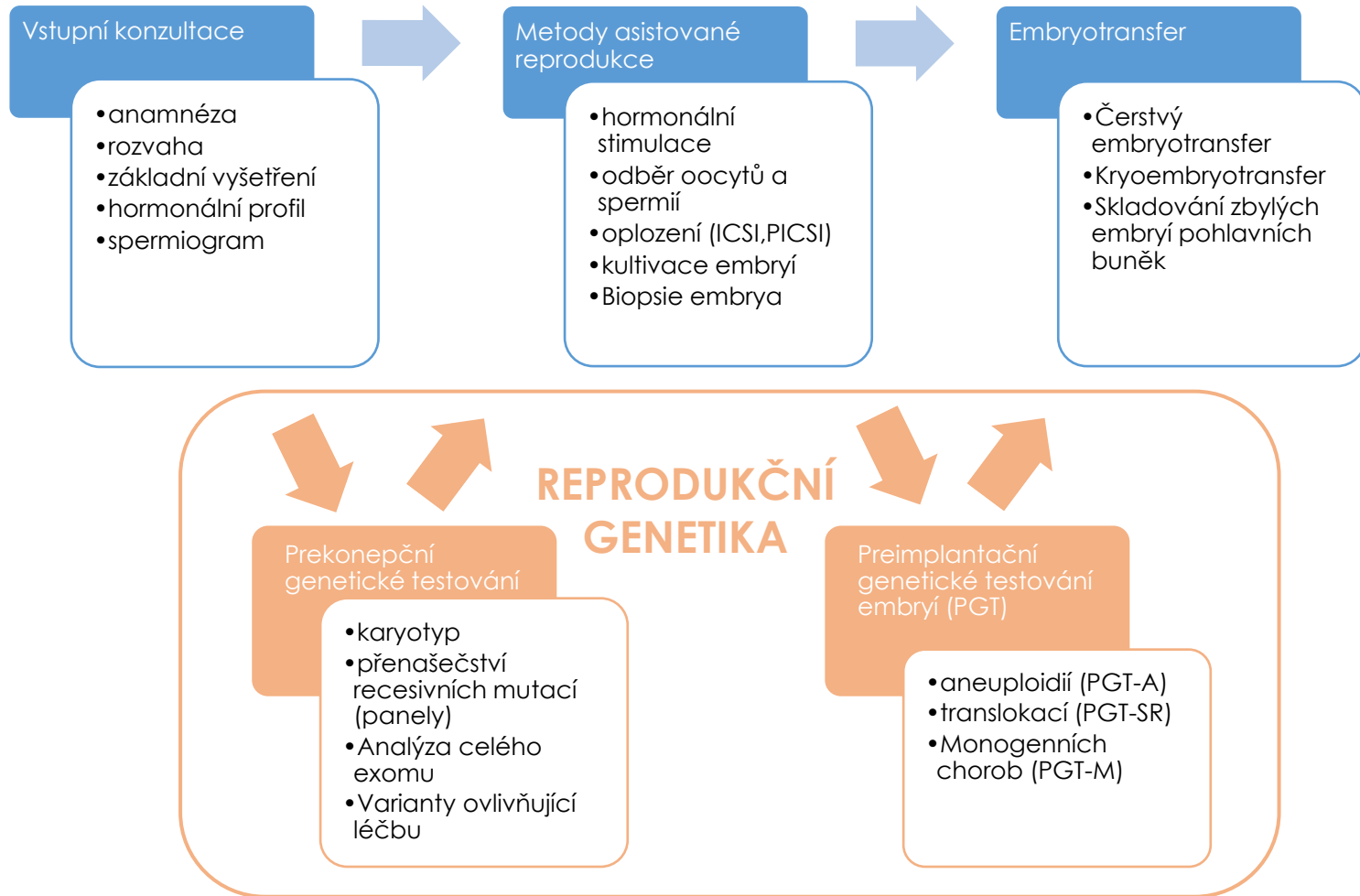
Vývoj embrya



embryotransfer

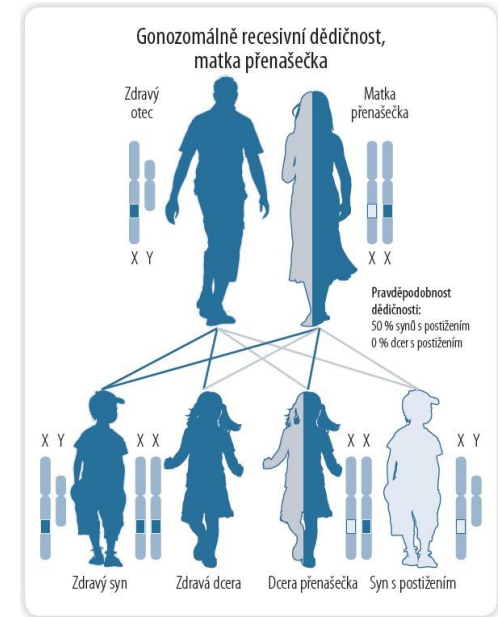
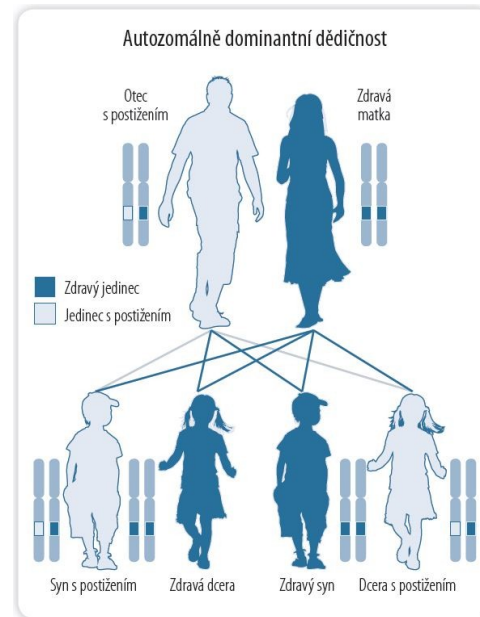
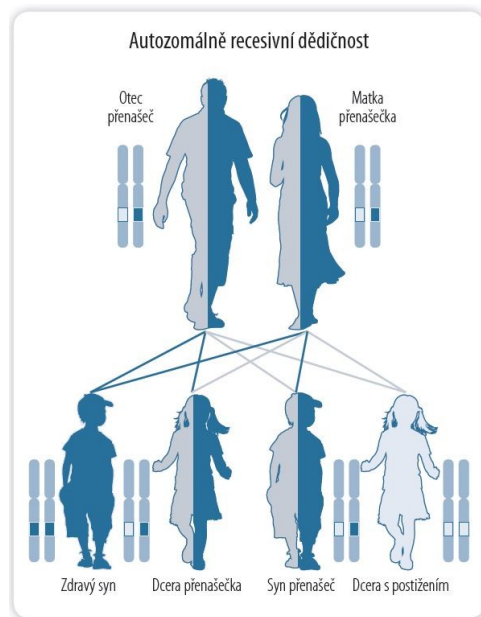


Léčba neplodnosti v na IVF klinice



Reprodukční genetik

- ❖ Cíl 1: zjistit a zároveň snížit riziko přenosu genetické zátěže do další generace
- ❖ Cíl 2: předejít těhotenským ztrátám a komplikacím



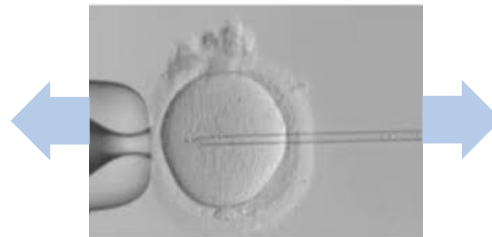
Reprodukční genetik

Prekoncepční

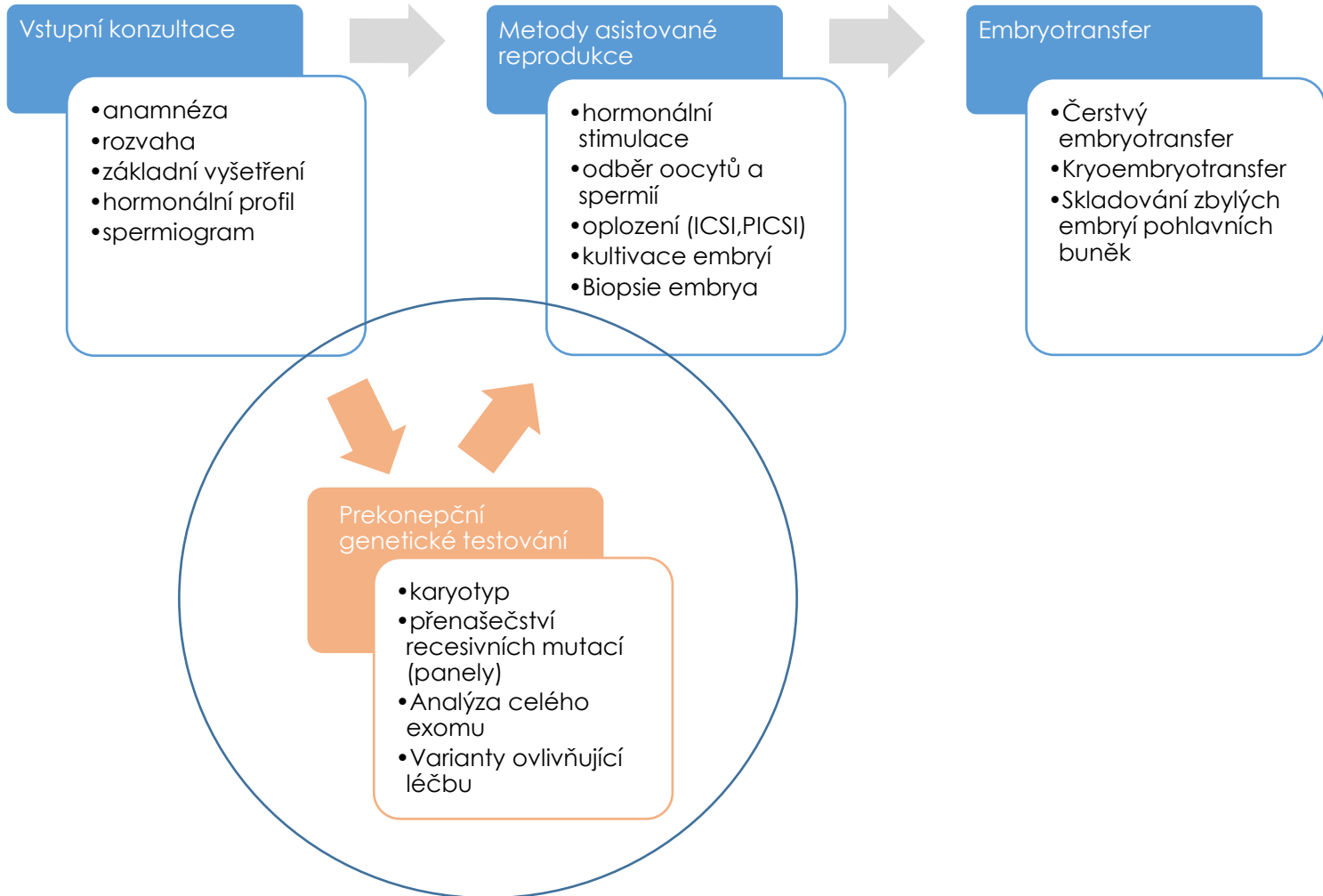
- ❖ Karyotyp
- ❖ Přenašečství
recesivních mutací
(panely, exom)

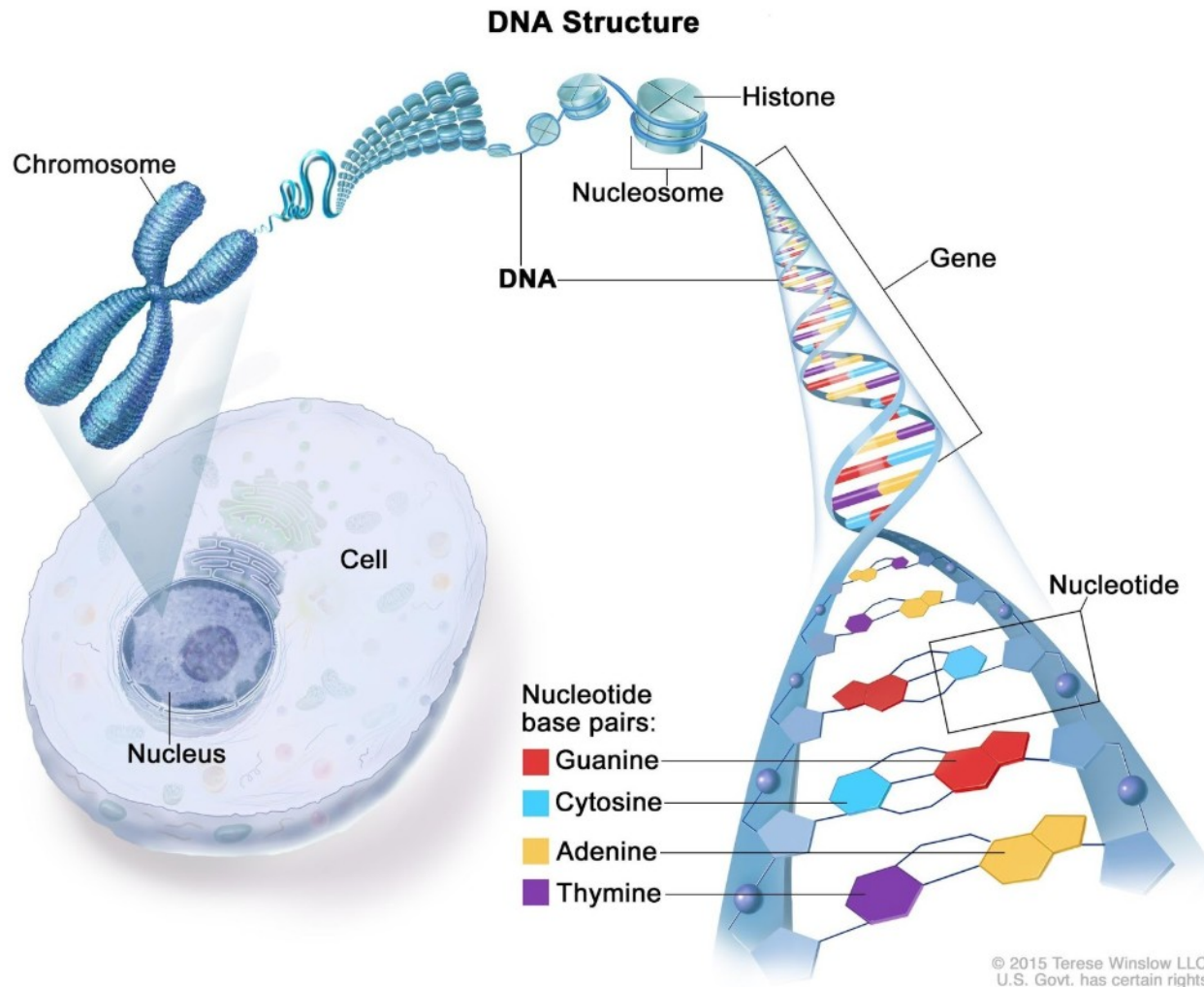
Preimplantační

- ❖ PGT-A
- ❖ PGT-SR
- ❖ PGT-M

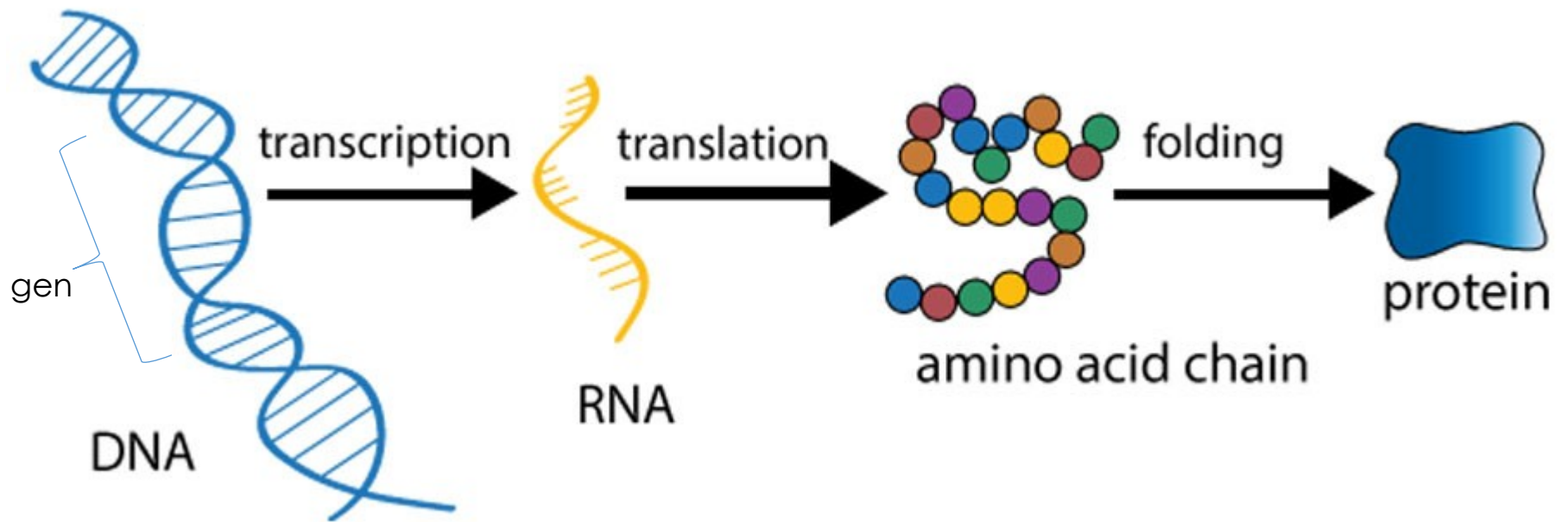


Prekoncepční testování – Kdy?





- Genetický kód = sekvence nukleotidů G, C, A, T
- V jedné buňce cca 3,2 miliardy bází (3 metry DNA)



- 2 % DNA je kódujících
- 20 000 – 25 000 protein kódujících genů
- Mutace = záměna nukleotidové báze → záměna aminokyseliny
→ změna funkce proteinu → projev onemocnění

Mutace

Genové

- Na úrovni genů
- Bodové (substituce, delece, inserce)
- CNV (delece, duplikace)
- Expanze

Genomové

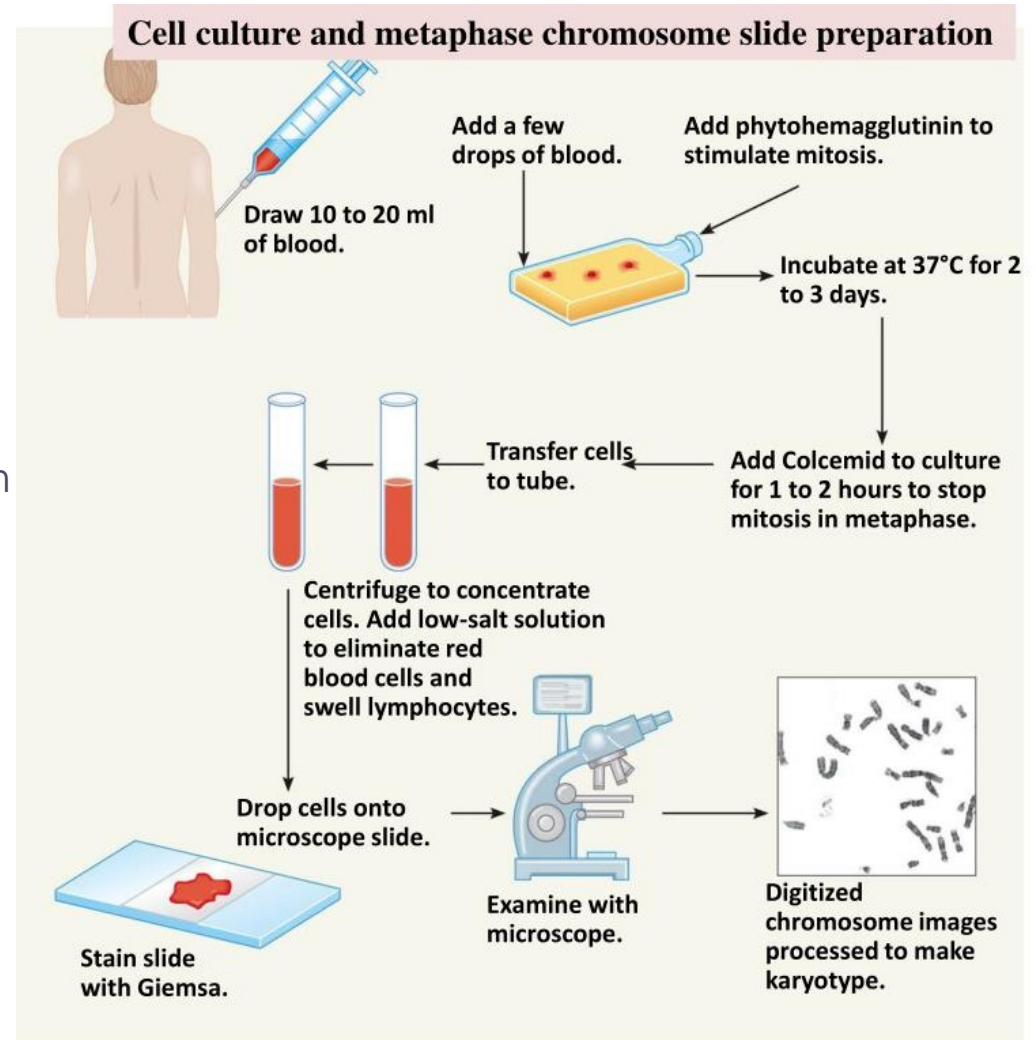
- Na úrovni chromozomů
- Translokace
- Inverze
- Delece/duplikace
- Aneuploidie
- Polyploidie

Genové mutace – molekulární genomika

Genomové mutace – (molekulární) cytogenomika

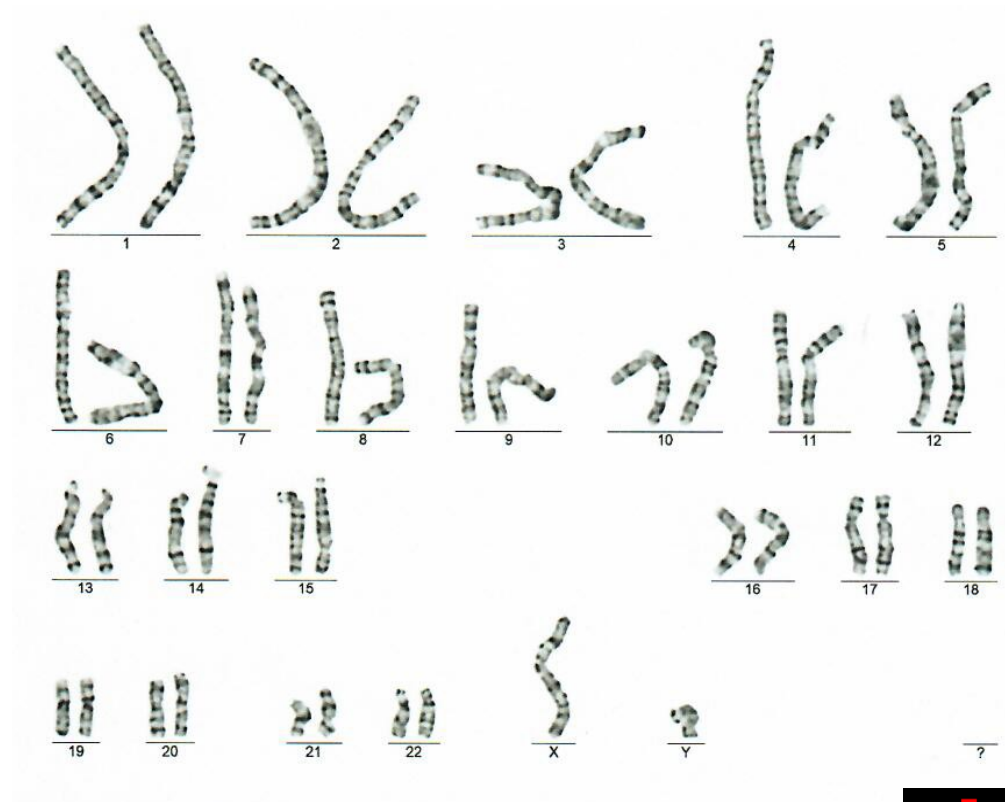
Prekoncepční testování - karyotyp

- ❖ Cytogenetické vyšetření
- ❖ G pruhování chromozomů
 - ❖ Kultivace buněk
 - ❖ Zastavení v mitóze (Kolchicin)
 - ❖ Hypotonie a fixace buněk
 - ❖ Působení trypsinu („natrávení“)
 - ❖ Obarvení Gyemsovým barvivem
 - ❖ Hodnocení pod mikroskopem



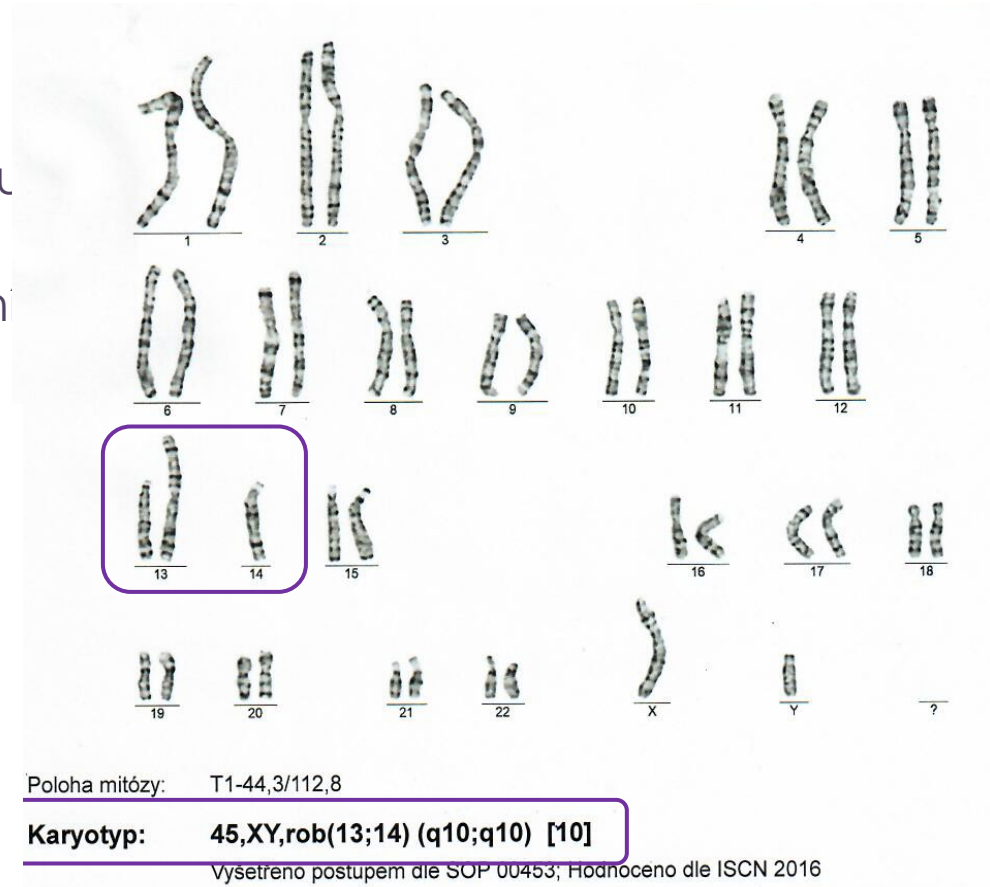
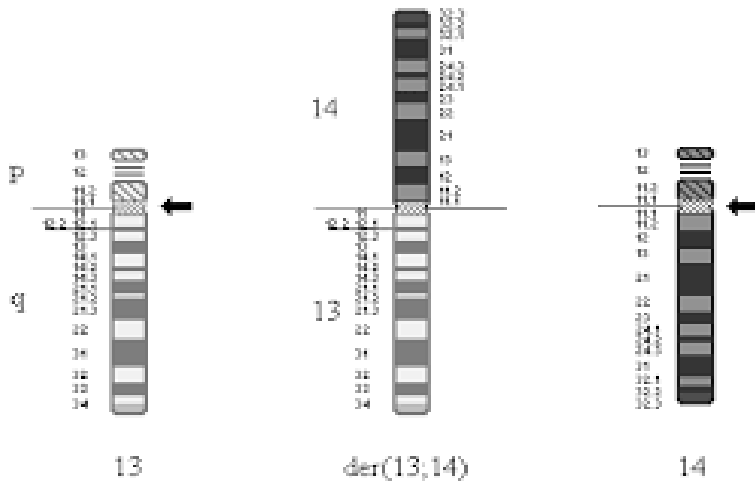
Prekoncepční testování - karyotyp

- ❖ Ověření správného počtu chromozomů u jedince z periferní krve
- ❖ 46,XX vs 46,XY
- ❖ Patologické nálezy u pacientů IVF nejčastěji reciproké translokace, Robertsonské translokace, inverze, mozaicismus pohlavních chromozomů
- ❖ Rozlišení cca 5-10Mb



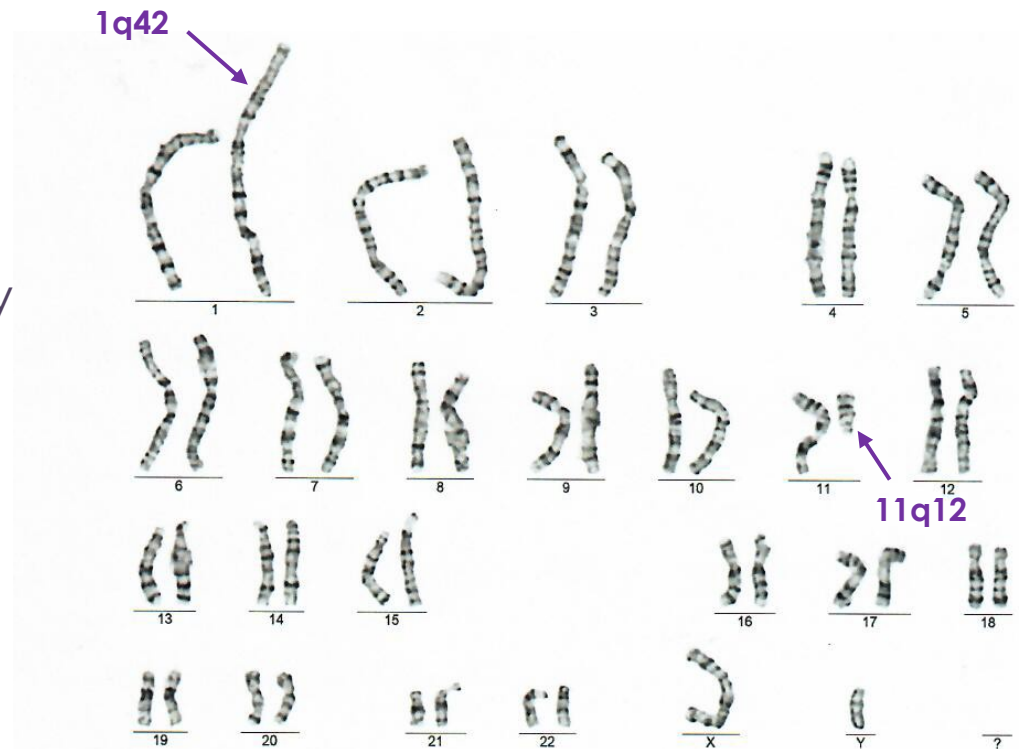
Karyotyp – Robertsonské translokace

- ❖ Fúze dvou akrocentrických chromozomů
- ❖ Jedinec beze změny fenotypu
- ❖ Snížená fertilita: nepravidelné rozchody v meiotickém dělení



Karyotyp – reciproká translokace

- ❖ Reciproká výměna dvou telomerických částí chromozomů
- ❖ Jedinec většinou beze změny fenotypu (možnost vzniku fúzních genů)



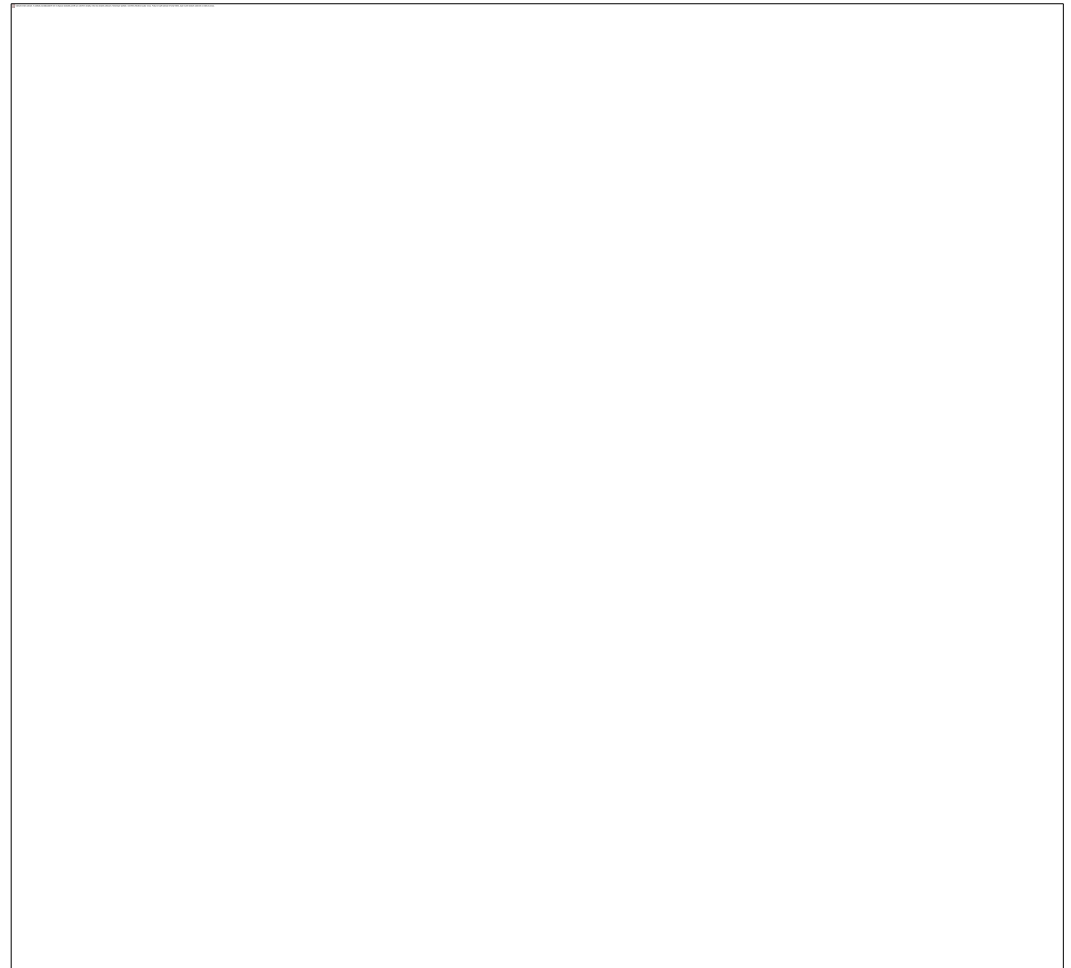
Poloha mitózy: V1-42,5/100,5

Karyotyp: 46,XY,t(1;11)(q42;q12) [10]

Vyšetřeno postupem dle SOP 00453; Hodnoceno dle ISCN 2016

Karyotyp – reciproká translokace

- ❖ Reciproká výměna dvou telomerických částí chromozomů
- ❖ Jedinec většinou beze změny fenotypu (možnost vzniku fúzních genů)
- ❖ Snížená fertilita: nepravidelné rozchody v meiotickém dělení

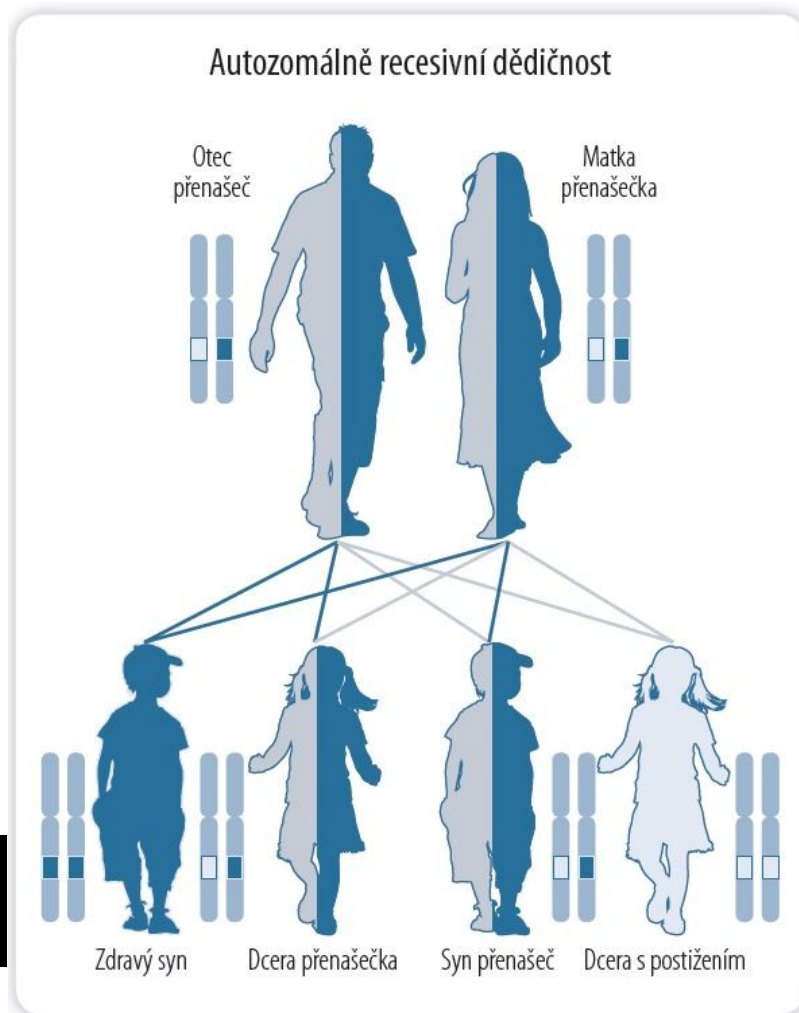


Prekoncepční testování přenašečství recesivních mutací

- ❖ Každý jsme přenašečem cca **1-5** patogenních recesivních mutací
- ❖ Obecně platí riziko zhruba **1,7-5:1000*** narození potomka s recesivním onemocněním
- ❖ Riziko narození potomka s genetickou zátěží v případě dvou přenašečů je **25%**
- ❖ **Prekoncepční testování → snížení rizika narození postiženého potomka**



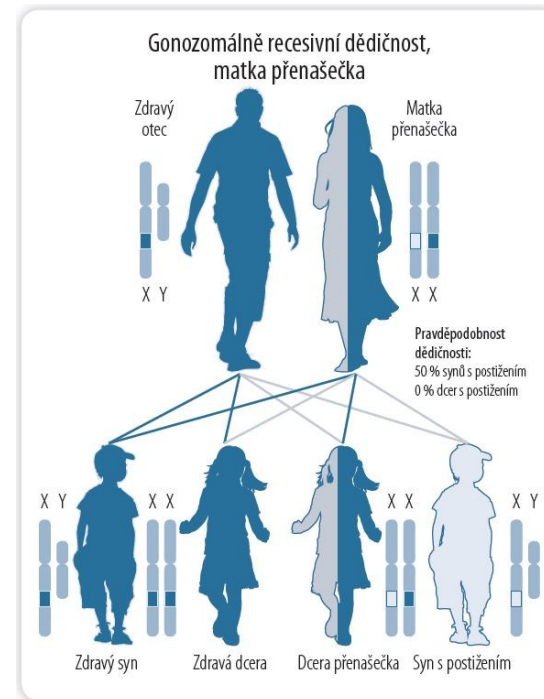
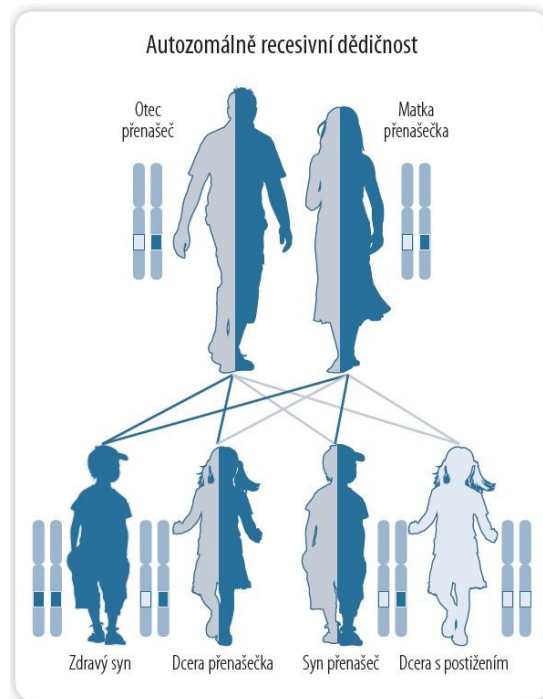
*Baird, P. A., Anderson, T. W., Newcombe, H. B. & Lowry, R. B. Genetic disorders in children and young adults: a population study. *Am. J. Hum. Genet.* **42**, 677–693 (1988)



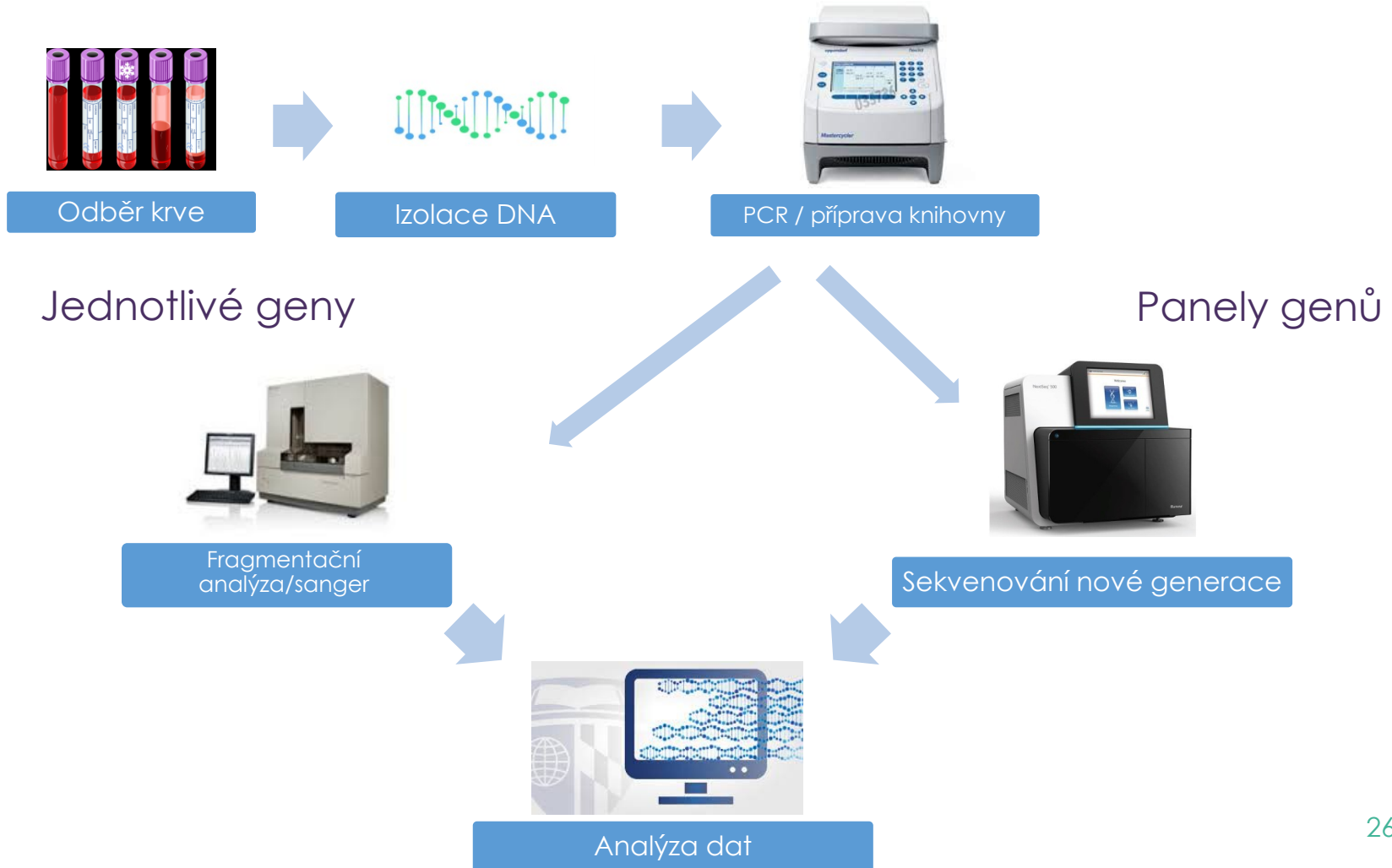
Rozšířené testování panelu recesivních mutací

Carrier panels

- Testování většího množství genů (desítky až exom)
- Převážně geny s **autozomálně recesivní** dědičností (CF, SMA, GJB2...)
 - Oba partneři přenašeči – zvýšené riziko
- **X – vázané** geny (DMD, F8)
 - Partnerka heterozygot – zvýšené riziko

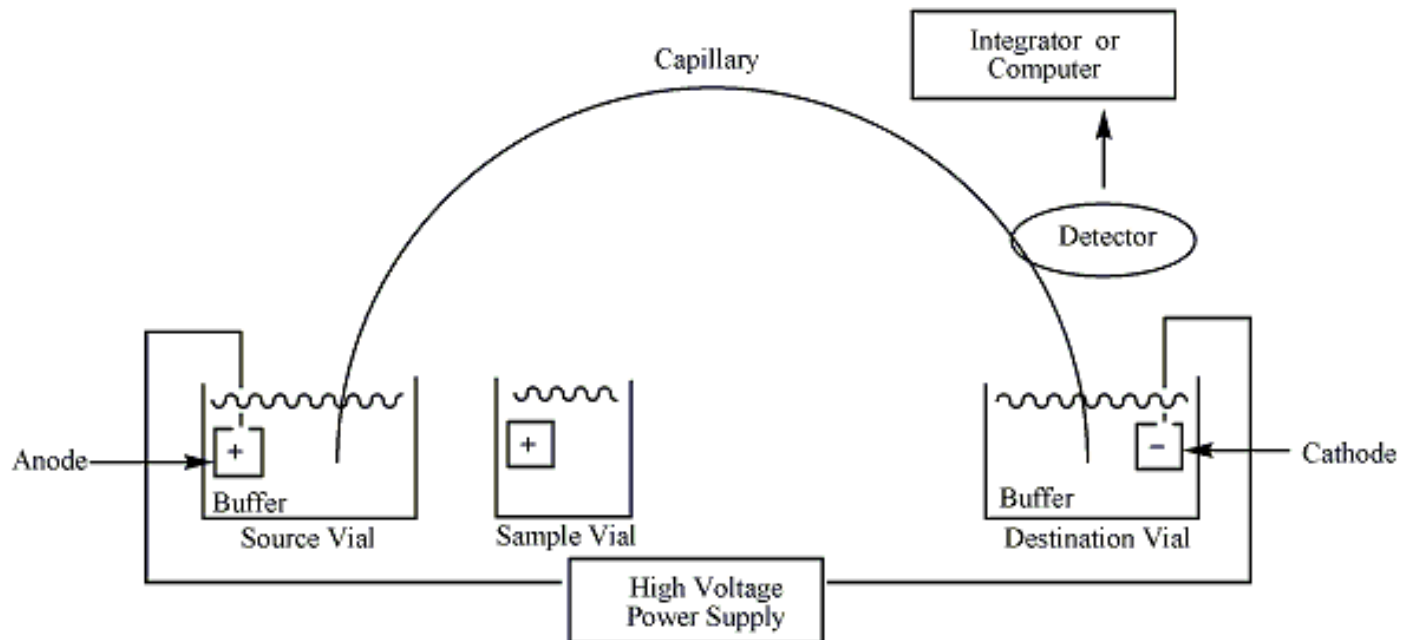


Molekulární prekoncepční testování - postup



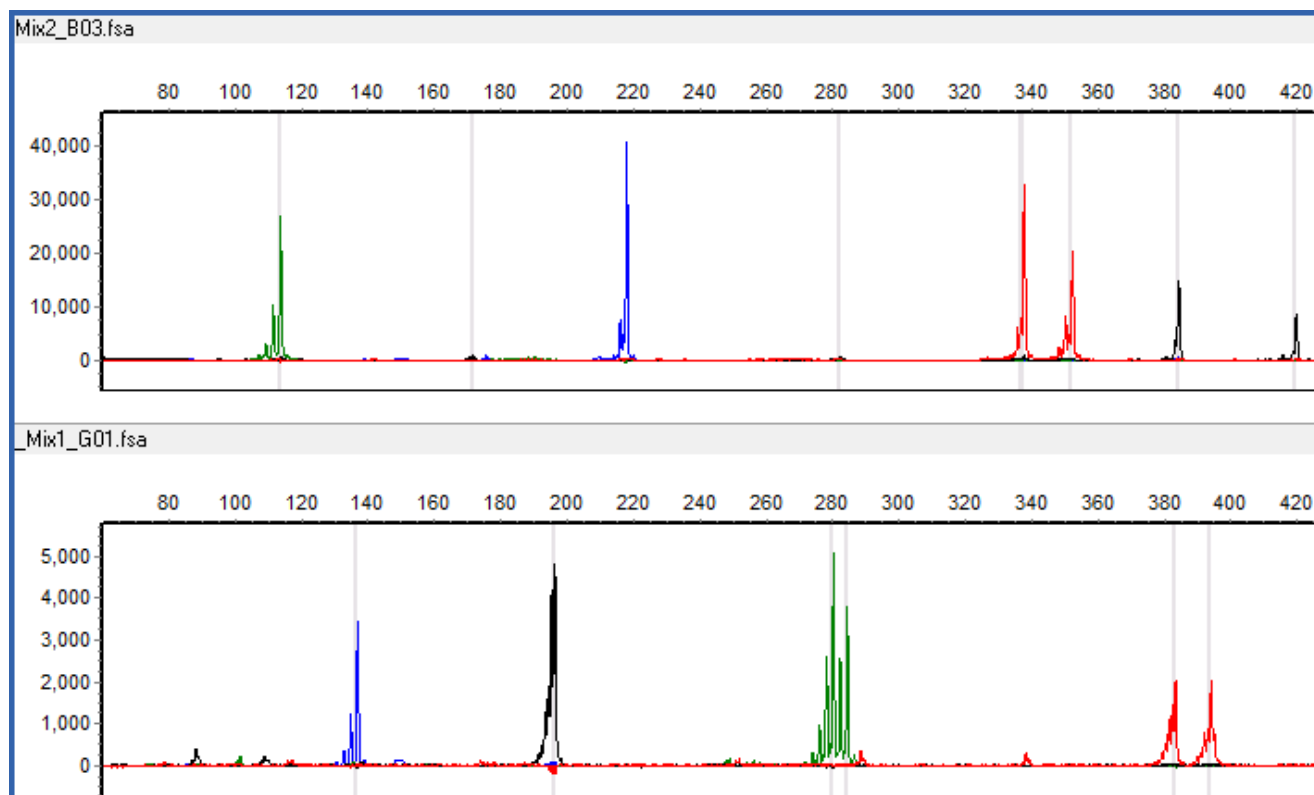
Vyšetření jednotlivých genů a mutací pomocí kapilárové elektroforézy

- Pomocí specifických fluorescenčně značených PCR primerů je během amplifikace odlišena mutace od wild type varianty
- Fragменты jsou separovány v kapilárách naplněných polymerem pomocí elektrického proudu dle své velikosti (kratší jede rychleji)
- Na konci kapiláry detektor odečítá fluorescenční signály -- > PC analýza



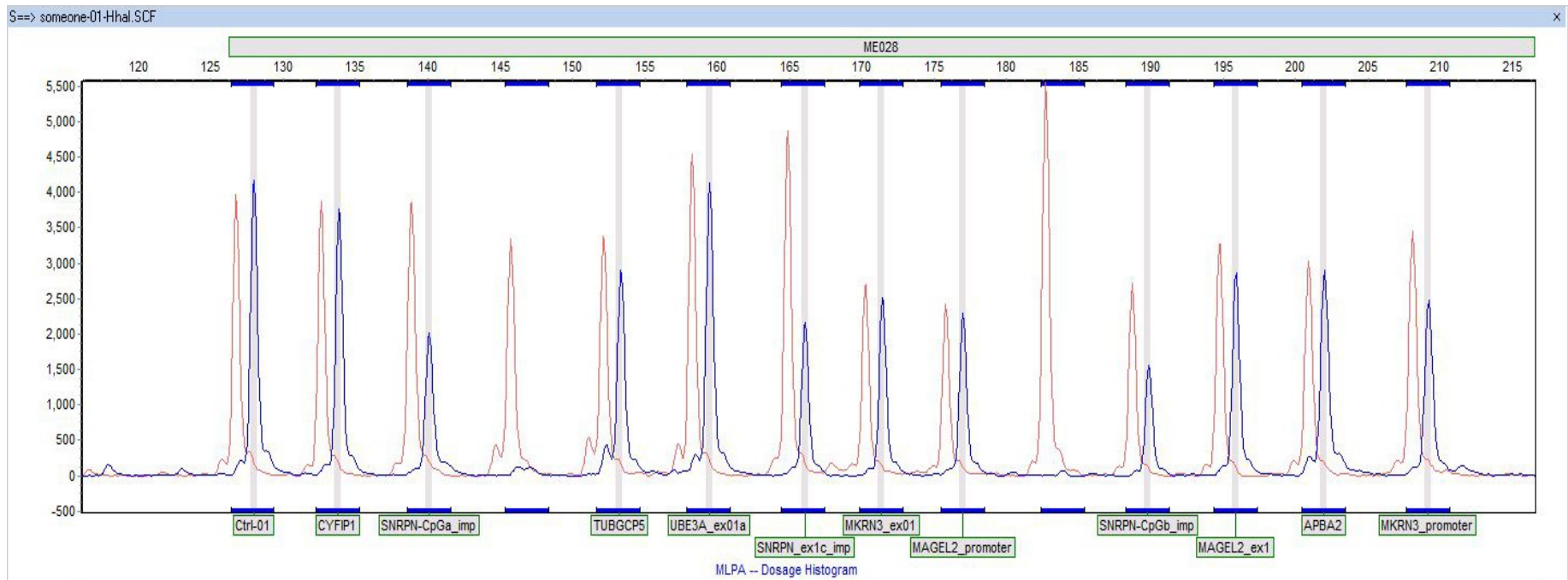
Vyšetření jednotlivých genů a mutací pomocí kapilárové elektroforézy

- Aplikace 1: detekce bodových mutací – přítomnost signálu
- Využití: detekce mutací v genech CFTR (Elucigene), TM, AZF



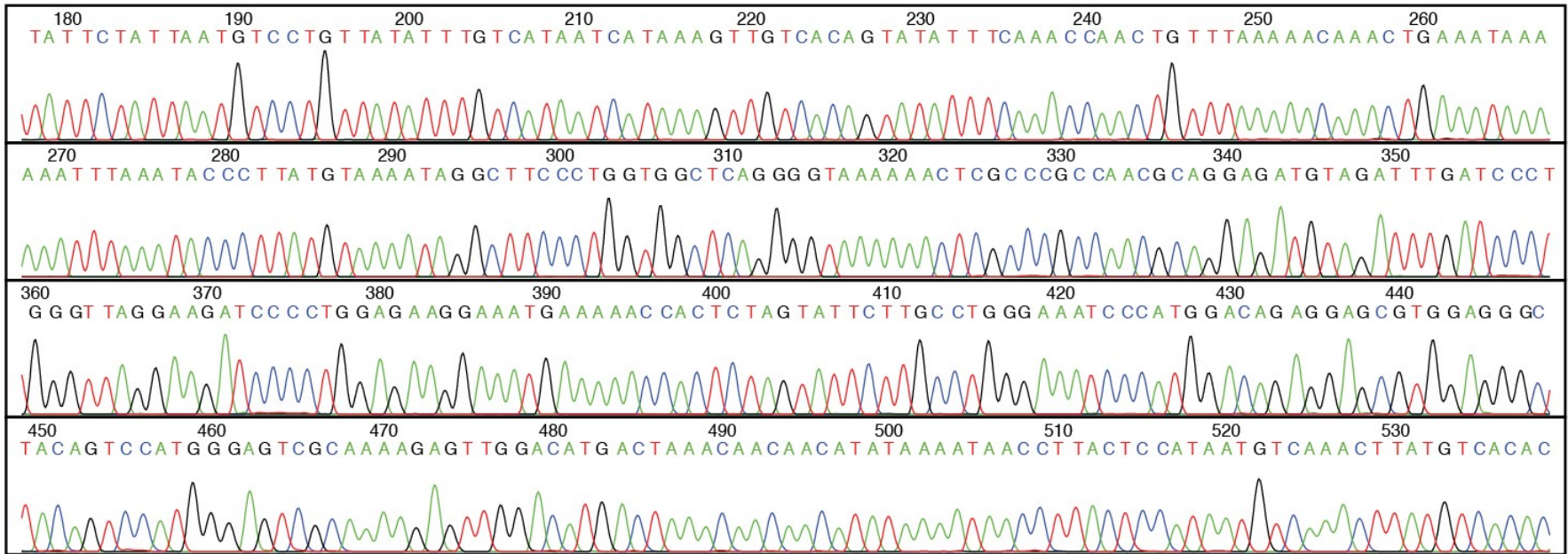
Vyšetření jednotlivých genů a mutací pomocí kapilárové elektroforózy

- Aplikace 2: detekce variant v počtu kopií (CNV) – intenzita signálu
- Využití: detekce delecí exonu 7 a 8 v genu SMN1



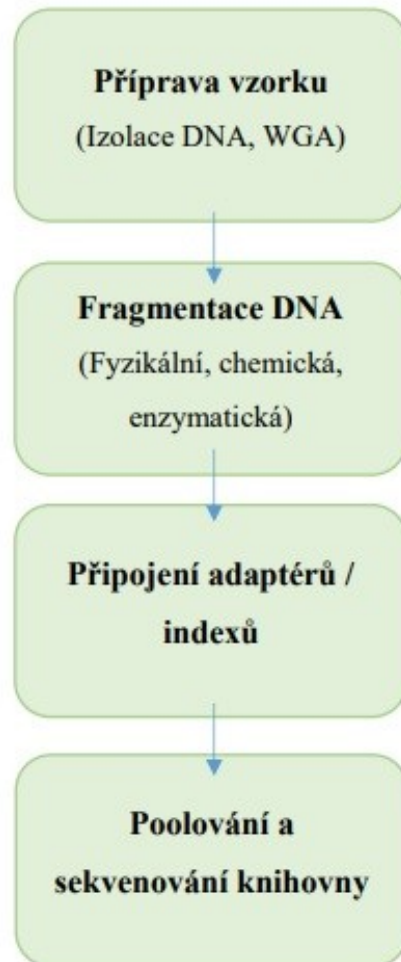
Vyšetření jednotlivých genů a mutací pomocí kapilárové elektroforézy

- Aplikace 3: Sangerovo sekvenování



To zase jindy...

Prekoncepční testování pomocí NGS (Next Generation Sequencing)



Pro přípravu sekvenační knihovny je použita izolovaná DNA nebo amplifikát po celogenomové amplifikaci.

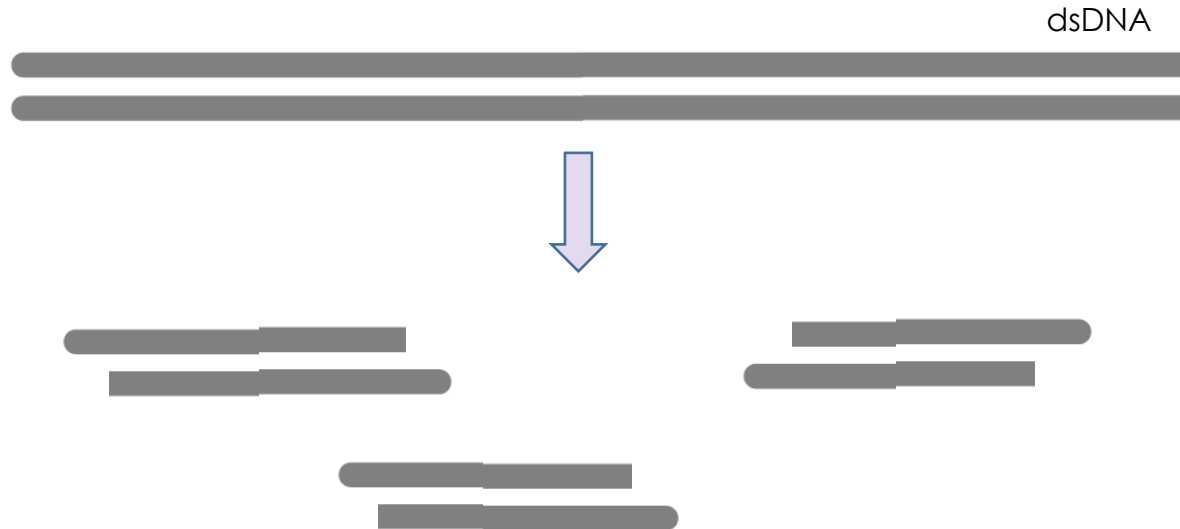
DNA je nejprve fragmentována na požadovanou délku.

K fragmentům DNA jsou připojeny specifické několikanukleotidové sekvence, pomocí kterých jsou přečtené sekvence přiřazeny k příslušným vzorkům.

Všechny vzorky jsou smíchány (poolovány) do jedné zkumavky a společně sekvenovány.

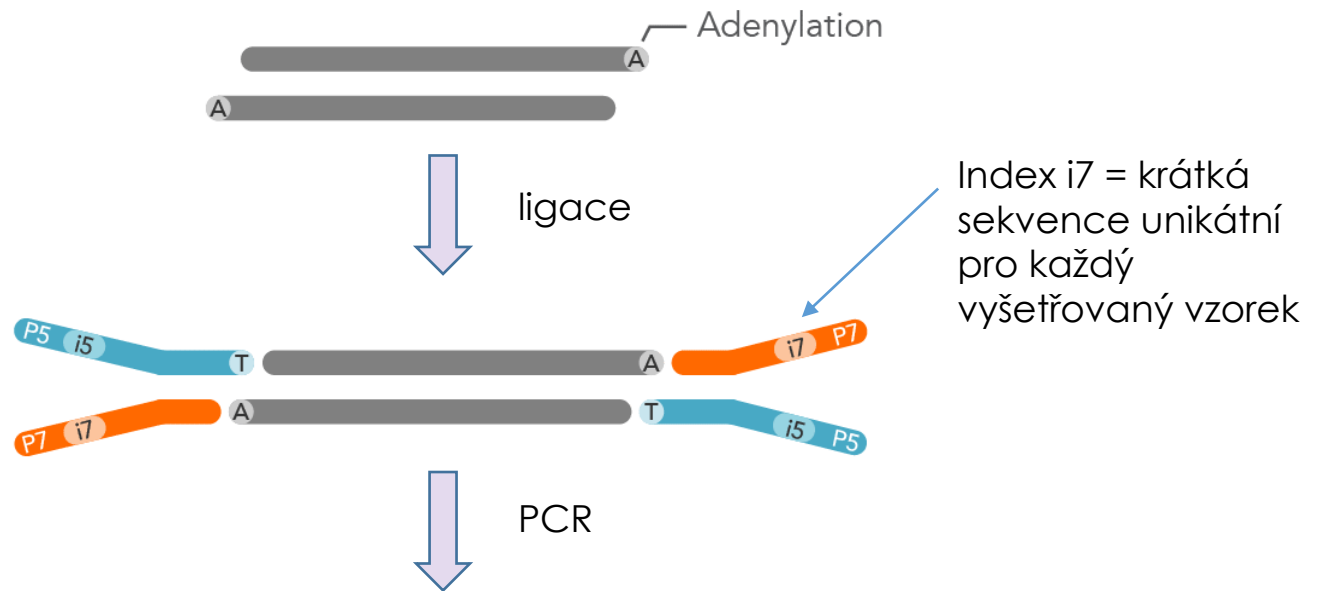
Prekoncepční testování pomocí NGS (Next Generation Sequencing)

- Fragmentace DNA
 - Enzymatická: transponáza vytváří ds zlomy v DNA
 - Fyzikální: sonikace, nebulizace
 - Chemická: OH* radikál



Prekoncepční testování pomocí NGS (Next Generation Sequencing)

- Připojení adaptorů/indexů
 - Oprava konců
 - Adenylace konců polymerázou
 - Ligace adaptorů (indexů) = unikátní barcode



Prekoncepční testování pomocí NGS (Next Generation Sequencing)

- Poolování a sekvenování
 - Poolování = smíchání vzorků
 - Přečištění knihovny na magnetických kuličkách
 - Ředění

1) SBS sekvenování Illumina



Miseq

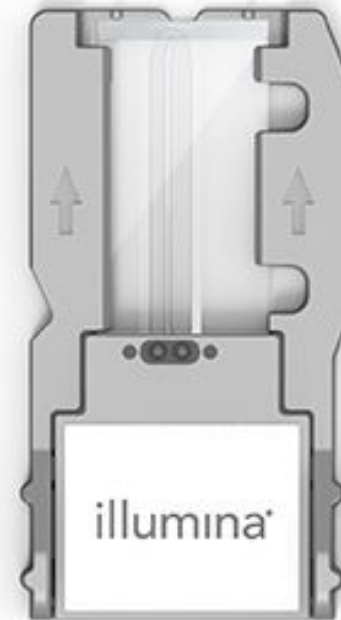


Nextseq

Next Generation Sequencing (NGS)

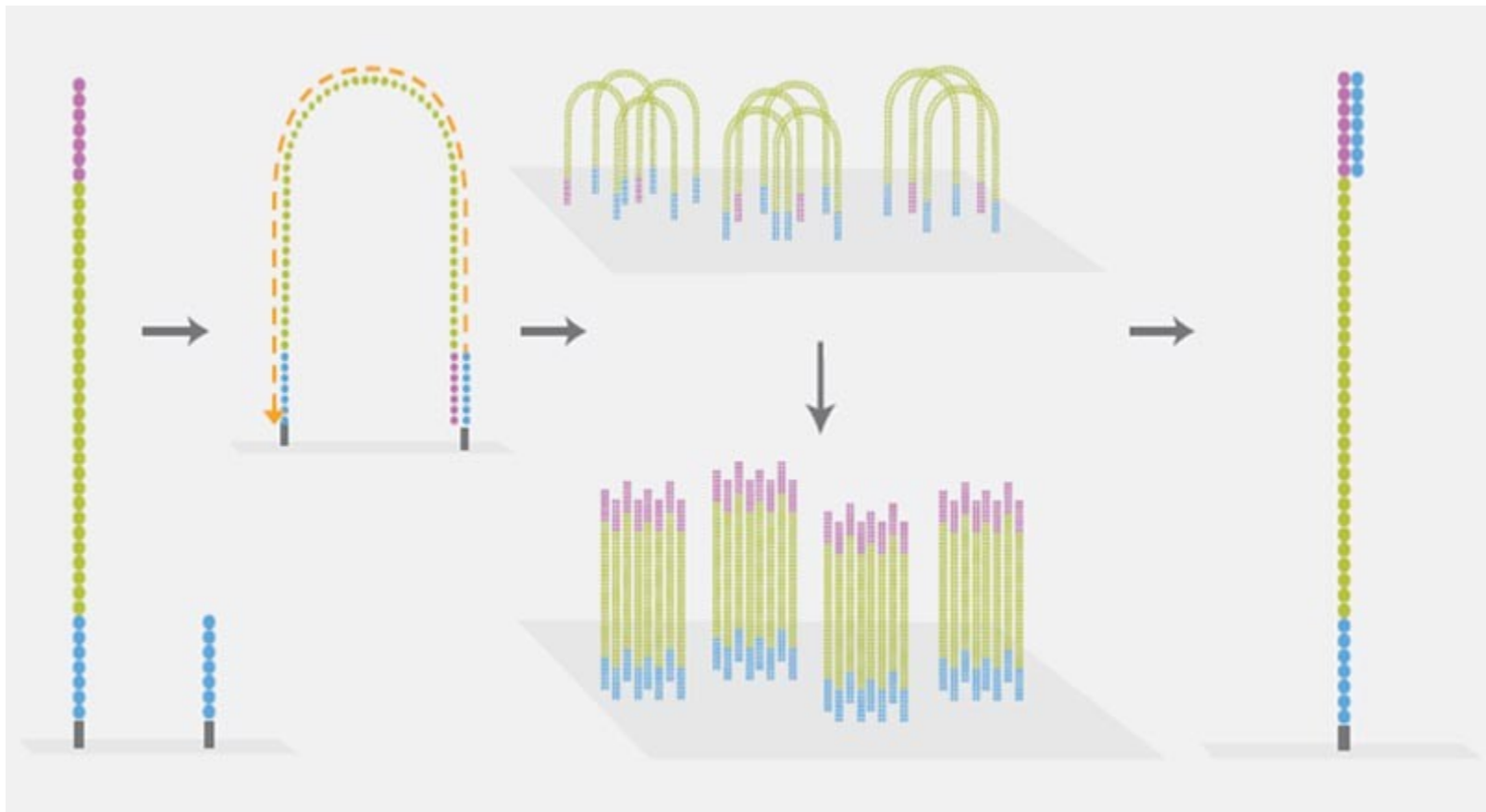
1) SBS sekvenování Illumina

- a) Přidání sekvenační knihovny do sekvenační cartridge
- b) Cartridge + flowcell + pufr do přístroje



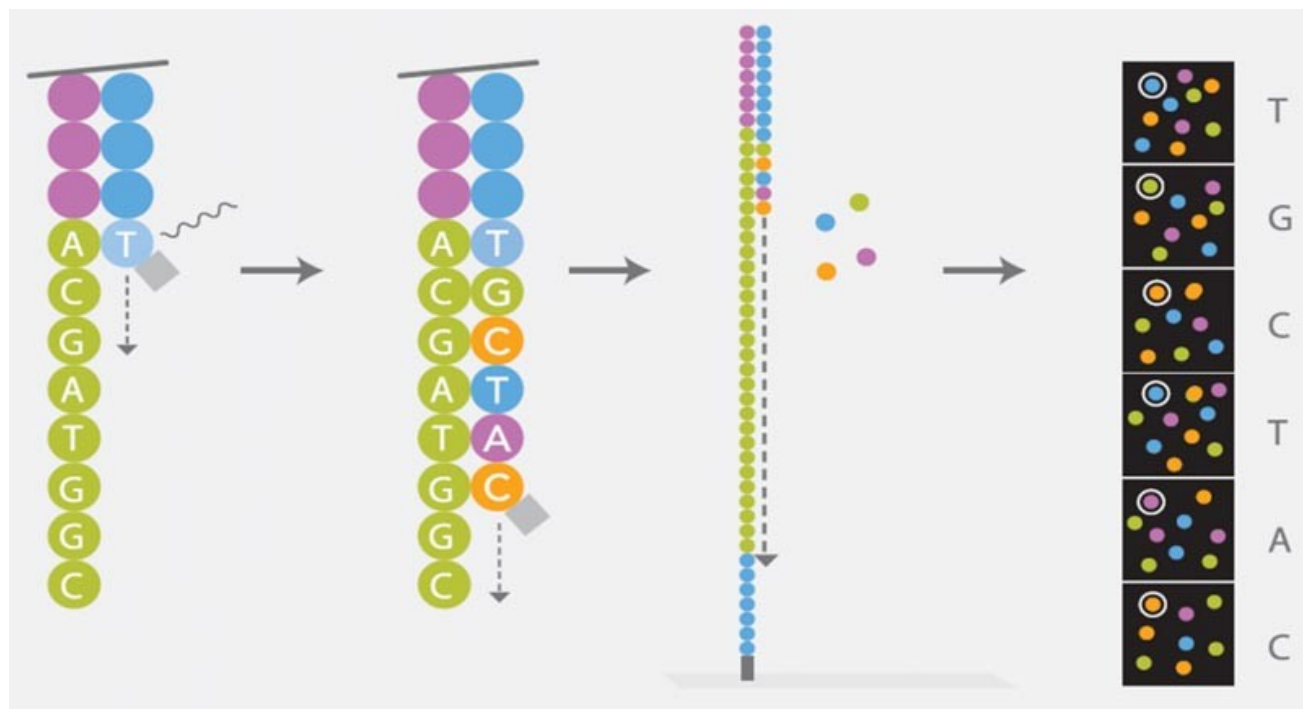
Next Generation Sequencing (NGS)

- 1) SBS sekvenování Illumina
 - c) Sekvenace syntézou



Next Generation Sequencing (NGS)

- 1) SBS sekvenování Illumina
 - c) Sekvenace syntézou



Demultiplex
na základě
indexů

↓

Hrubá
sekvence ve
formátu fasta

Next Generation Sequencing (NGS)

Vyhodnocení sekvenačních dat

1. Mapování na referenční genom
 - Hrubá sekvence je mapována na referenční mezinárodní genomovou sekvenci (př. hg38) → vzniká soubor .bam
2. Variant calling
 - Varianty, které se liší oproti referenčnímu genomu, jsou reportovány jako SNV (mutace, polymorfismus) → vzniká soubor .vcf
3. Anotace nalezených variant a jejich reporting
 - Bioinformatické softwary – SeqPilot, Varsome, Congenica
 - *In silico* prediktory – SIFT, PolyPhen
 - Dostupné mezinárodní databáze variant – ClinVar, CFTR2
 - Predikční algoritmy a guidelines – ACMG rules

Report patogenní varianty

Výsledky panelu recesivních mutací:

Gen:	Mutace:	Referenční sekvence:	Zygozita:	Omim:
CFTR	c.1521_1523delCTT (p.Phe508del)	NM_000492.3	heterozygot	*602421
Onemocnění:	Dědičnost:	Prevalence přenašečů:	Senzitivita testu:	Omim:
Cystická fibróza	AR	1:40 (střední Evropa)	> 97%	#219700

Popis onemocnění:

Mutace v genu CFTR ovlivňují tvorbu, strukturu a stabilitu iontových kanálů. Tyto změny způsobují poruchu transportu chloridových iontů, což má za následek špatnou distribuci vody na povrchu buněk žláz. Ve výsledku jsou nevíce postiženy právě žlázové orgány jako plíce nebo slinivka břišní. Obstrukce dýchacích cest způsobená vysokou viskozitou hlenu v plicích vede k typickým příznakům Cystické fibrózy.

V případě negativního výsledku při použití stejného testu u partnera je reziduální riziko přenašečství nejvýše 1:1340 a riziko narození postiženého potomka nejvýše 1:5360.

Příloha protokolu

Příloha: seznam vyšetřovaných genů

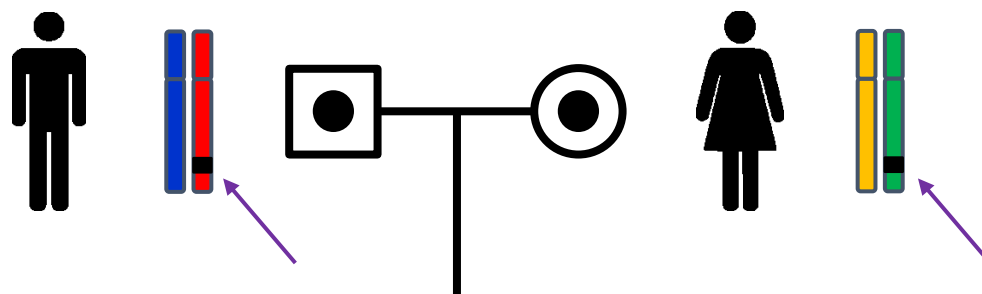
Gen:	<u>Omim</u> genu:	Senzitivita testu:	Prevalence přenašečů:	Reziduální riziko přenašečství při negativním výsledku testu:
ABCA3	*601615	>95%	1:30 (střední Evropa)	<1:600
ABCA4	*601691	>95%	1:30 (střední Evropa)	<1:600
ABCC6	*603234	>90%	1:112 (střední Evropa)	<1:1120
ABCC8	*600509	>95%	1:112 (střední Evropa) 1:7800 (<u>Ashkenazi</u>)	<1:1120 (střední Evropa), <1:44 (<u>Ashkenazi</u>)
ACADM	*607008	>95%	1:65 (střední Evropa)	<1:1300
ACADS	*606885	>95%	1:110 (střední Evropa)	<1:2200
ACADVL	*609575	>95%	1:100 (střední Evropa)	<1:2000
AGL	*610860	>95%	1:70 (střední Evropa)	<1:1400
AGXT	*604285	>95%	1:140 (střední Evropa)	<1:2800
ALDOB	*612724	>95%	1:70 (střední Evropa)	<1:1400
ALPL	*171760	>95%	1:270 (střední Evropa) 1:150 (Kanada)	<1:3000
AR	*313700	>95%	1:5000 (střední Evropa) žen přenašeček	<1:100000
ARSA	*607574	>95%	1:100 (střední Evropa)	<1:2000
ASL	*608310	>95%	1:130 (střední Evropa)	<1:2600
ASPA	*608034	>95%	1:40 (<u>Ashkenazi</u>)	<1:800 (<u>Ashkenazi</u>)
ASS1	*603470	>95 %	1:110 (střední Evropa)	<1:2200
ATM	*607585	>95%	1:100 (střední Evropa)	<1:2000
ATP7B	*606882	>95%	1:90 (střední Evropa)	<1:1800
BCKDHA	*608348	>95%	1:320 (celosvětově)	<1:6400

Prekoncepční testování AR mutací

Příklad gen CFTR

Partner (přenašeč)

Partnerka (přenašečka)



Cíl: prospektivně snížit riziko narození potomka s genetickým onemocněním

Výsledek: oba partneři jsou přenašeči mutace v genu CFTR

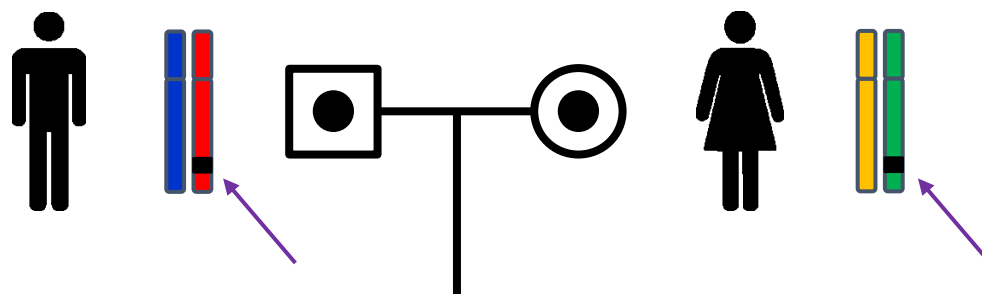
Závěr: riziko narození potomka s cystickou fibrózou 25 %

Prekoncepční testování AR mutací

Příklad gen CFTR

Partner (přenašeč)

Partnerka (přenašečka)



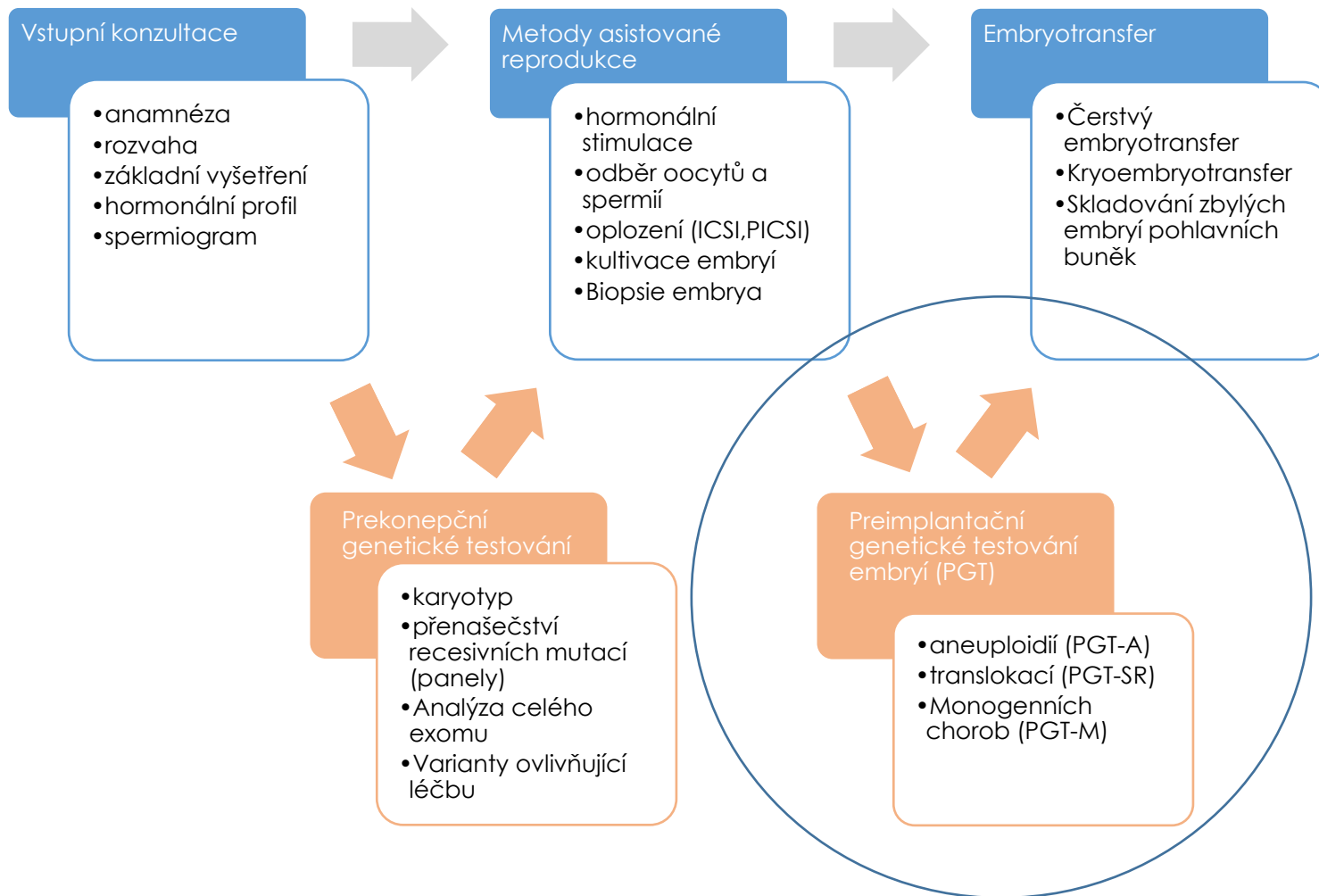
Cíl: prospektivně snížit riziko narození potomka s genetickým onemocněním

Výsledek: oba partneři jsou přenašeči mutace v genu CFTR

Závěr: riziko narození potomka s cystickou fibrózou 25 %

Preimplantační
genetické
testování

Preimplantační testování – Kdy?



Preimplantační genetické testování embryí (PGT)

Přehled

- ❑ Vyšetření embryí před zavedením do dělohy matky
 - ❑ Vždy spojeno s IVF cyklem
 - ❑ (nutná) biopsie embrya (den 5/6)
-
- ❖ **PGT-A** = Preimplantační genetické testování **aneuploidií**
všechny chromozomy, segmentální aneuploidie, mozaicismus
 - ❖ **PGT-SR** = Preimplantační genetické testování **strukturních aberací**
nositelé balancovaných chromozomových aberací – translokace, inserce
 - ❖ **PGT-M** = Preimplantační genetické testování **monogenních chorob**
genetická zátěž v rodině (dominantní, recesivní X-vázané genetické onemocnění)



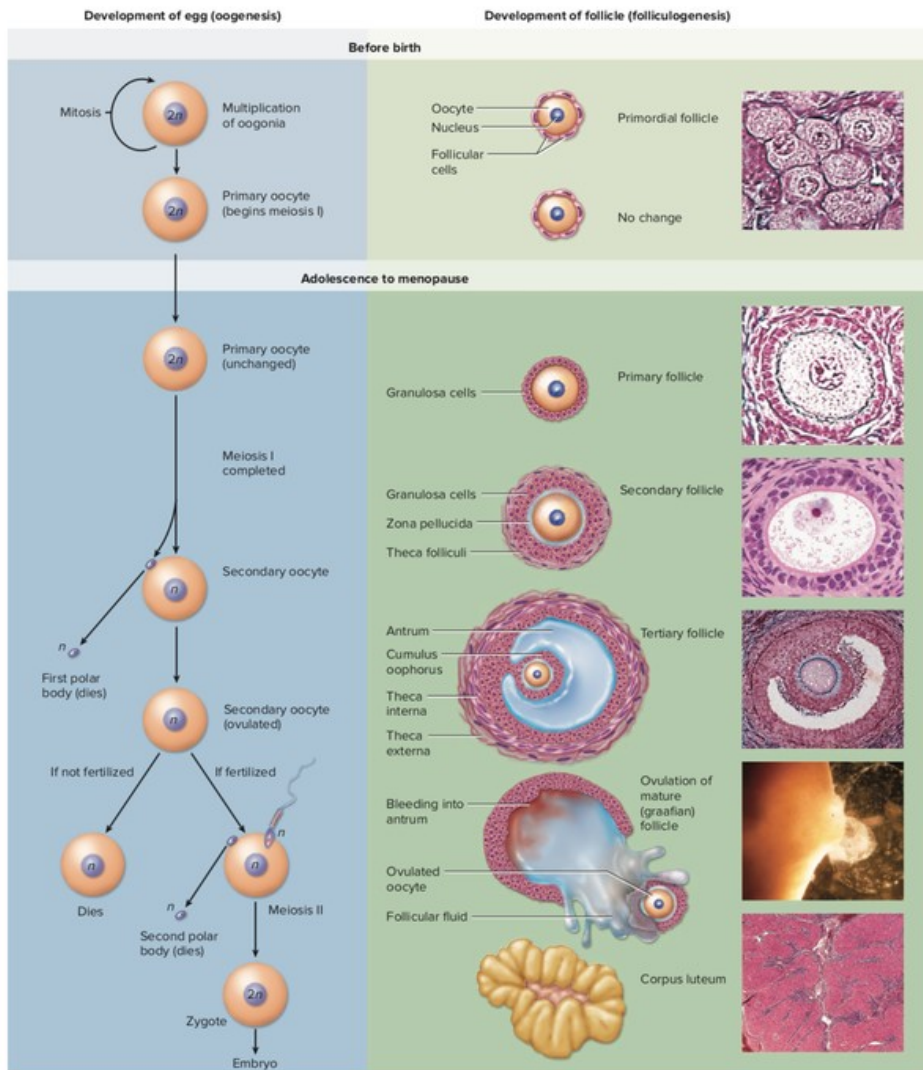
Preimplantační genetické testování embryí (PGT)

Indikace

Dle společnosti lékařské genetiky (SLG):

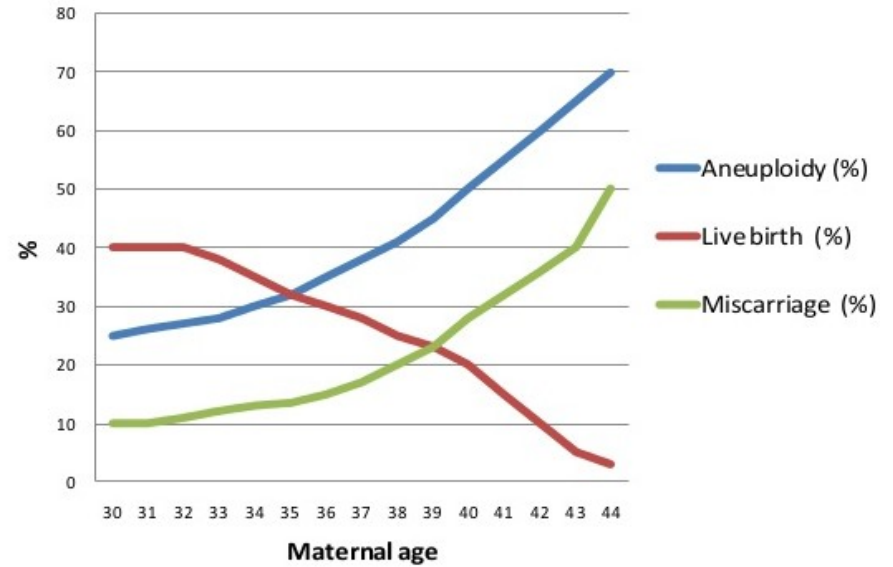
- ❖ 1. Vyšší věk ženy – nad 35 let v době očekávaného porodu
- ❖ 2. Opakované neúspěchy předchozích cyklů asistované reprodukce – min. 2×
- ❖ 3. Opakované potrácení po vyloučení ostatních možných příčin – min. 2×
- ❖ 4. Početní gonosomové aberace a malé gonosomové mozaiky detekované z periferní krve – nad 10%
- ❖ 5. Andrologický faktor (např. Azoospermie) nebo použití spermií získaných metodou MESA/TESE v asistované reprodukci
- ❖ 6. Porod nebo potrat dítěte (plodu) s chromosomovou aneuploidií
- ❖ 7. Chemoterapie nebo radioterapie u jednoho či obou partnerů v anamnéze





Na věku matky záleží

Oocyte aneuploidy and maternal age



Aneuploidie v oocyty a následně v embryu vedou k nižší úspěšnosti otěhotnění a vyšší četnosti potratů i rizika narození dítěte s chromozomovou vadou

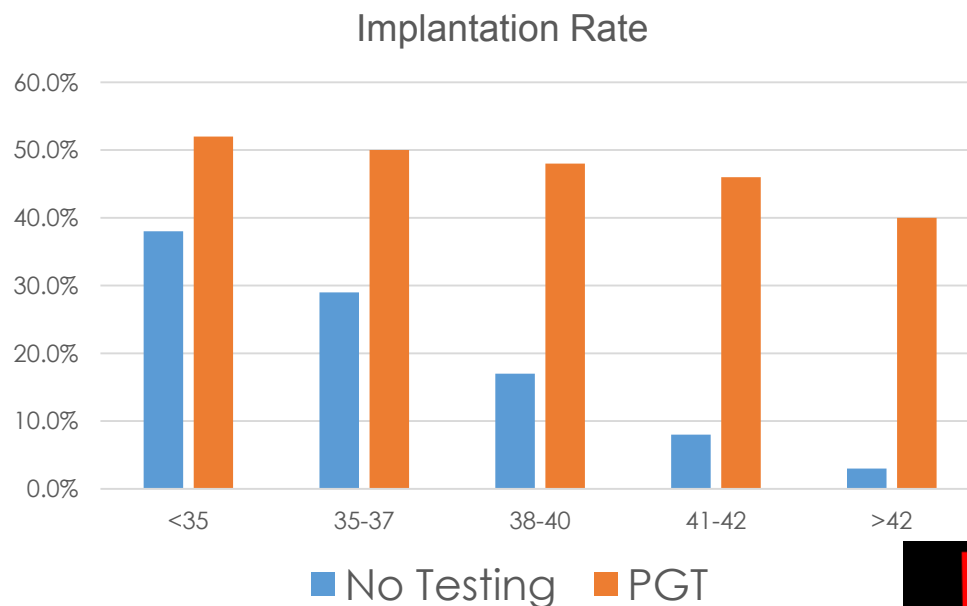
FIGURE 28.11 Oogenesis (Left) and Corresponding Development of the Follicle (Right). AP|R
 (1, 2): © Ed Reschke/Getty Images; (3): © McGraw-Hill Education/AI Telsler, photographer; (4): © Ed Reschke/Getty Images; (5): © Petit Format/Science Source

Preimplantační genetické testování aneuploidií (PGT-A) Proč ?

Výběr **euploidního** embrya k transferu do dělohy:

👍 Vyšší úspěšnost implantace embrya

- US CDC/SART Reporting
- Live births per embryo transfer
- N = 400,147 embryos transferred

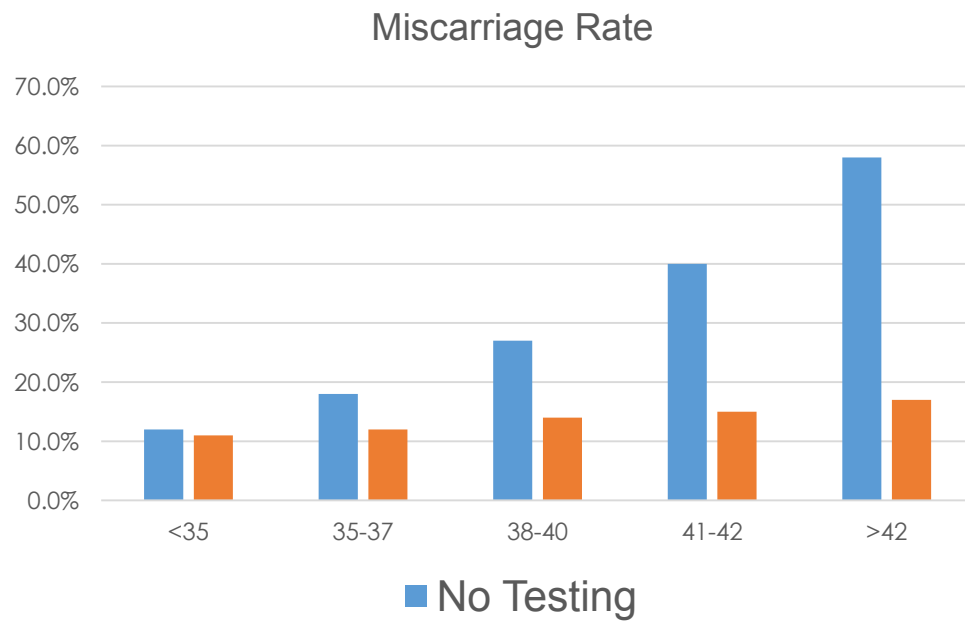


Preimplantační genetické testování aneuploidií (PGT-A) Proč ?

Výběr **euploidního** embrya k transferu do dělohy:

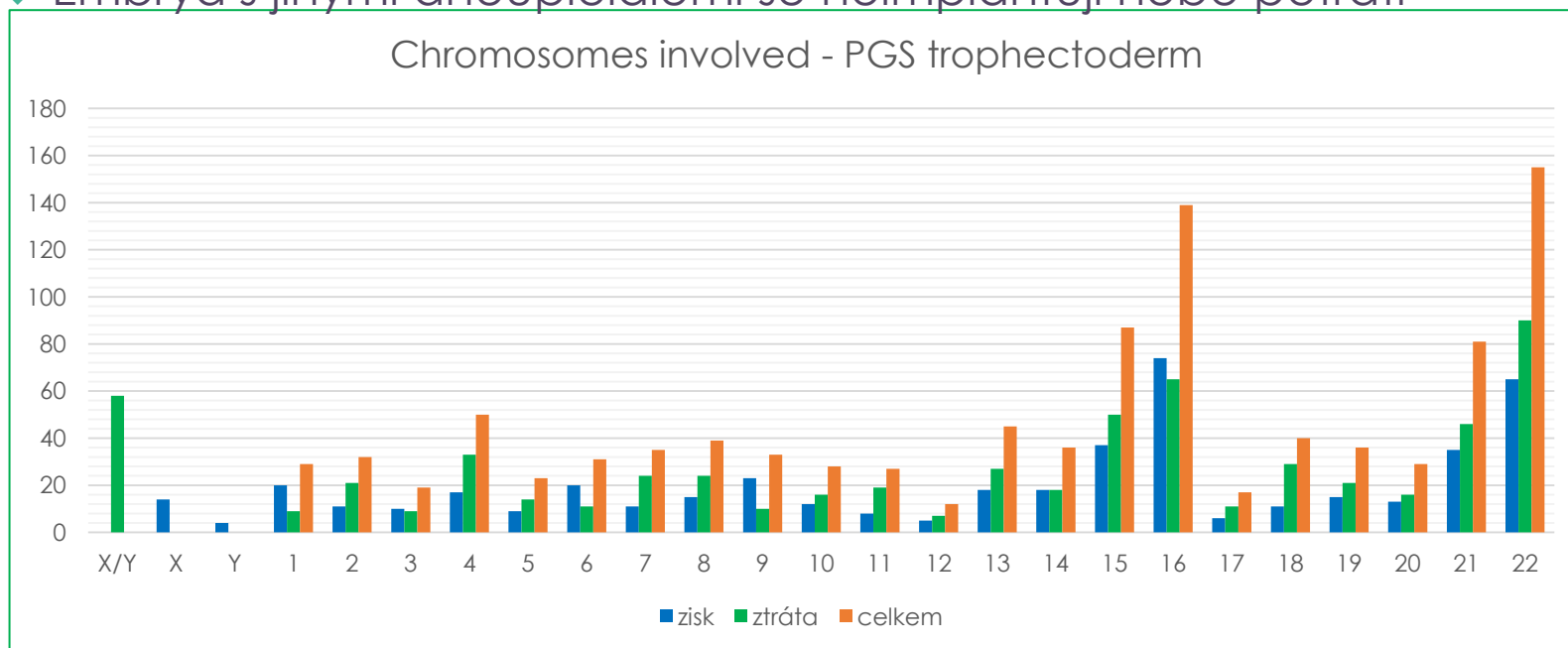
- 👍 Vyšší úspěšnost implantace embrya
- 👍 Výrazně nižší riziko potratu
- 👍 Zkracuje (a tím i zlevňuje) léčbu u starších pacientek

- US CDC/SART Reporting
- Clinical miscarriage rate
- N = 78,357 clinical pregnancies



Preimplantační genetické testování aneuploidií (PGT-A) Proč ?

- ❖ V embryích je možné odhalit aneuploidie **všech chromozomů**
- ❖ Trizomie 13, 18, 21 a gonozomové aneuploidie jsou špičkou ledovce
- ❖ Embrya s jinými aneuploidie se neimplantují nebo potratí



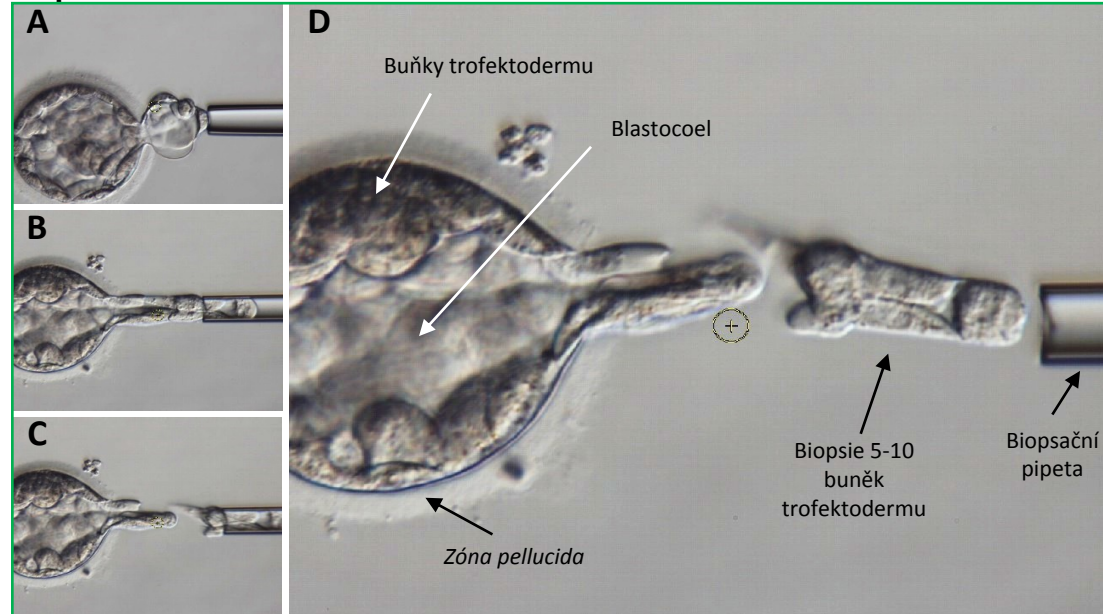
Preimplantační genetické testování (PGT) Materiál

- ❖ Dříve: biopsie polových tělísek, biopsie blastomer
- ❖ Dnes: biopsie 5-10 buněk **trofektodermu**

- ✓ Extraembryonální původ trofektodermu
- ✓ Oproti biopsii blastomery zvyšuje implantační potenciál (1)
- ✓ Detekce mozaicismu (nižší falešná pozitivita i negativita)
- ✓ Nižší poměr nevyšetřených embryí (cca 1-3% selhání amplifikace)
- ✓ Vyšetřena pouze embrya, která se nezastavila ve vývoji

- ✓ Nelze provést čerstvý embryotransfer (nevýhoda?)

Biopsie trofektodermu

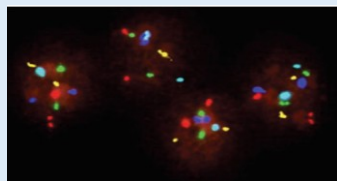


(1) Scott Jr, R.T., Upham, K.M., Forman, E.J., Zhao, T., Treff, N. R., 2013b. Cleavage-stage b

iopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. Fertility and sterility

Vývoj PGT

PGT-A 1.0



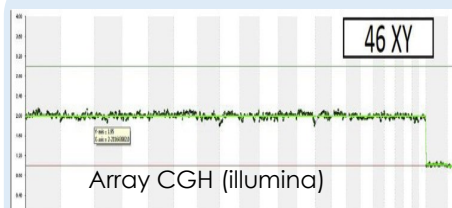
Fluorescenční In Situ Hybridizace (FISH)

Biopsie dvou blastomer D3

1995

≤ 12 chromozomů

PGT-A 2.0

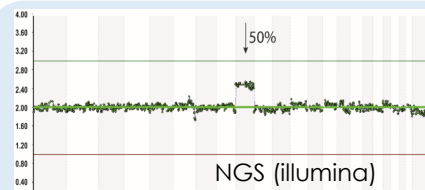


Array CGH

Biopsie D5/6 Trofektodermu
Odložený transfer

2008

PGT-A 3.0

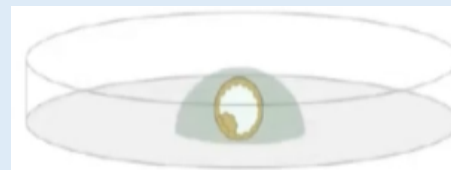


Detekce mozaicismu pomocí NGS

2013

Sekvenování nové generace (Trofektodermu)

Neinvazivní chromozomový screening (NICS)



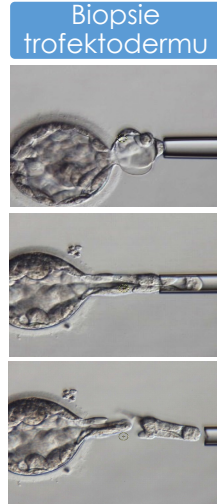
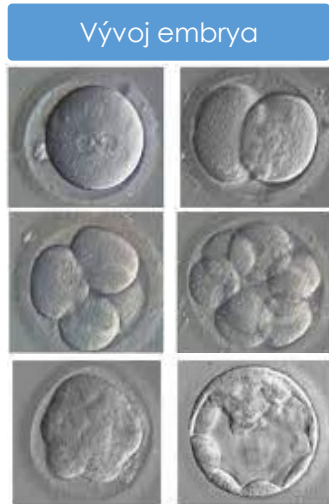
Biopsie kultivačního média

2019

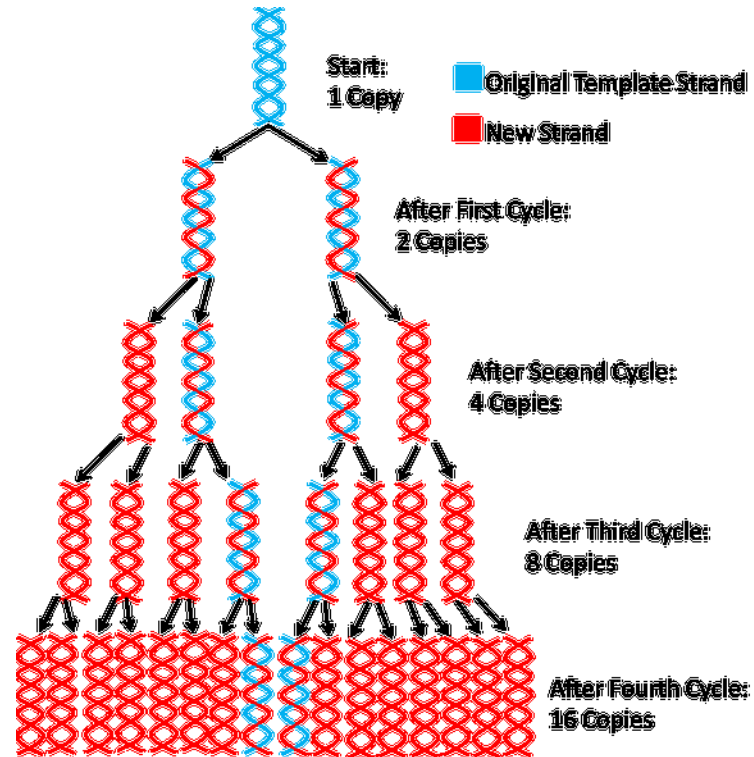
Sekvenování nové generace (biopsie kultivačního média)

24 chromozomů

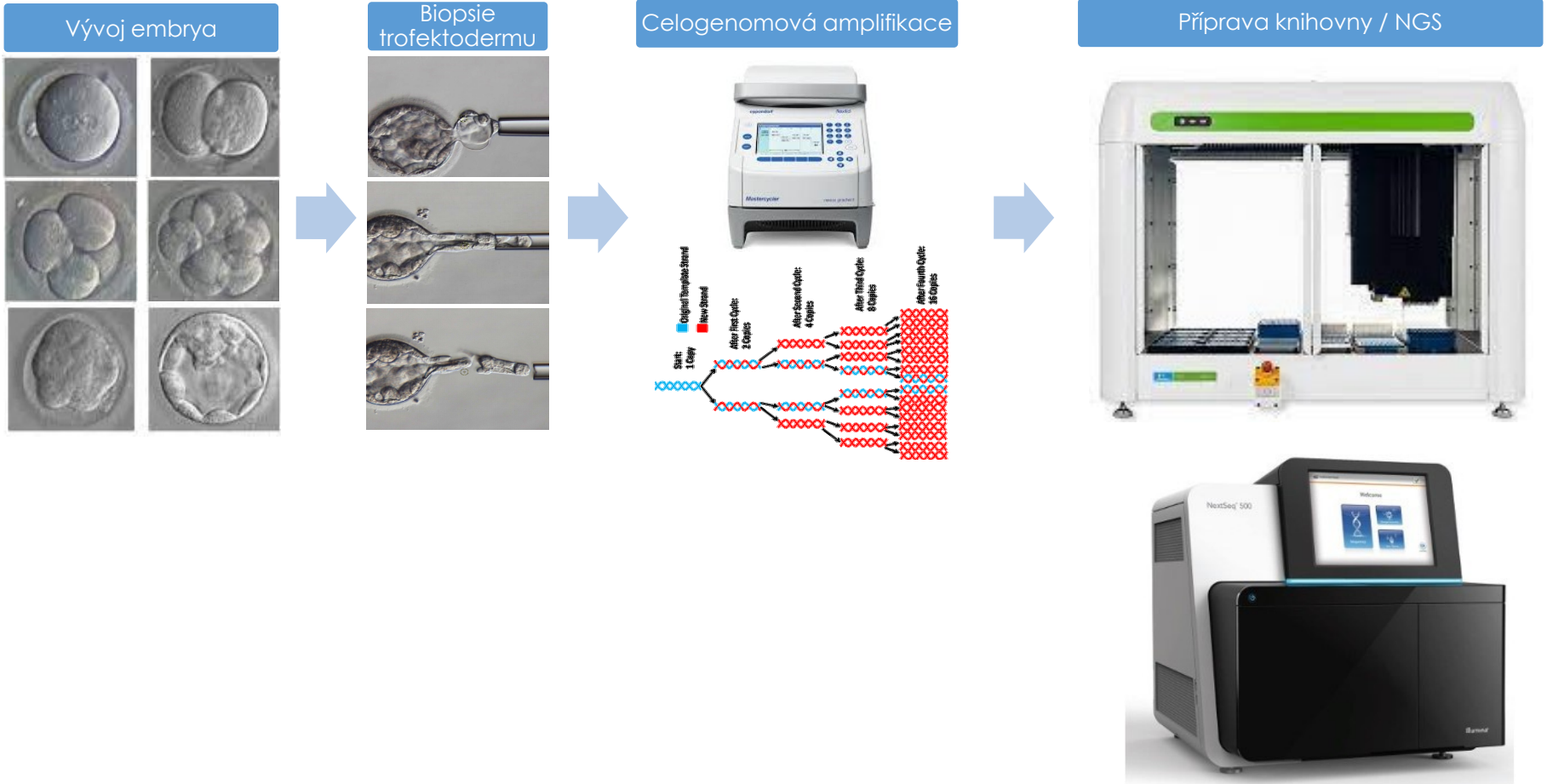
Preimplantační genetické testování aneuploidií (PGT-A) Jak?



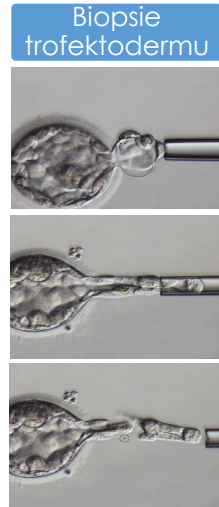
Celogenomová amplifikace



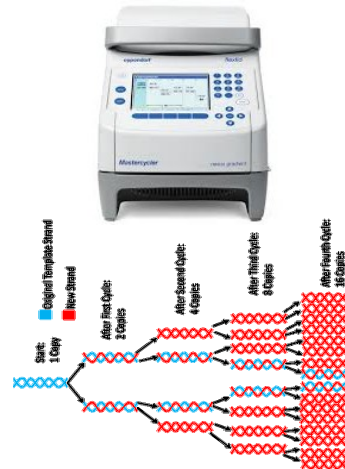
Preimplantační genetické testování aneuploidií (PGT-A) Jak?



Preimplantační genetické testování aneuploidií (PGT-A) Jak?



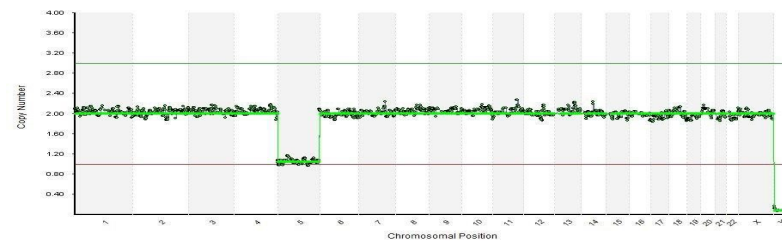
Celogenomová amplifikace



Příprava knihovny/ NGS

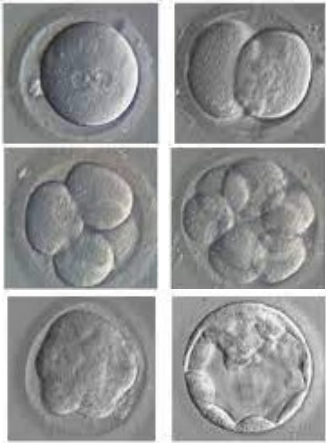


Výběr vhodného embrya / vyhodnocení dat

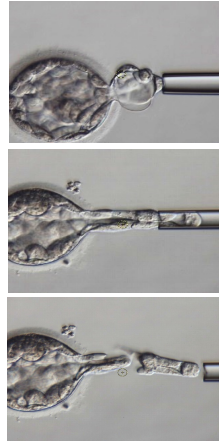


Preimplantační genetické testování aneuploidií (PGT-A) Jak?

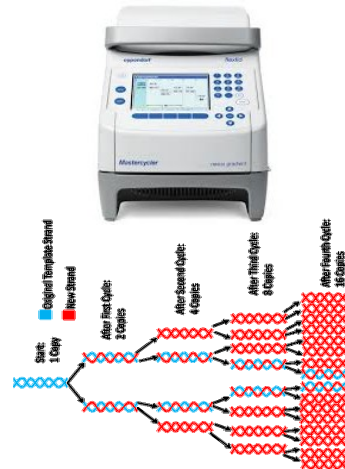
Vývoj embrya



Biopsie trofektodermu



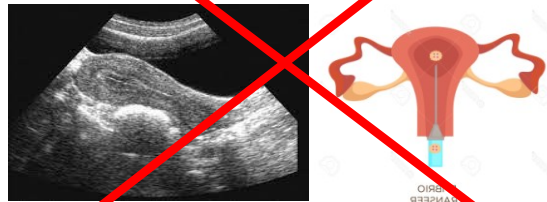
Celogenomová amplifikace



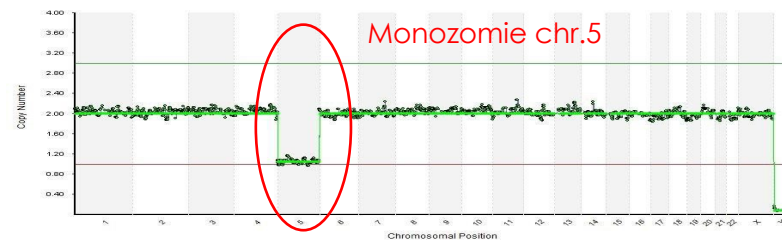
Příprava knihovny/ NGS



~~embryotransfer~~



Výběr vhodného embrya / vyhodnocení dat



Preimplantační genetické testování aneuploidií (PGT-A) Jak?

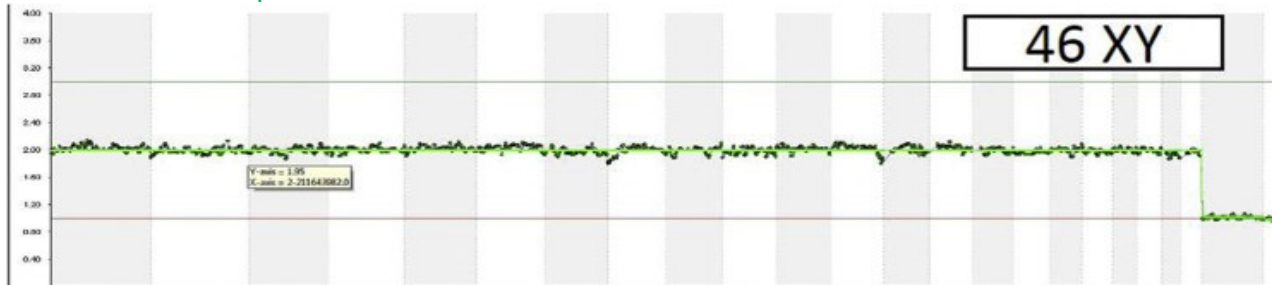
Sekvenace a softwarové hodnocení stručně:

- ❖ Příprava sekvenační knihovny a NGS probíhá obdobně jako u prekoncepčního testování
- ❖ Nezajímají nás sekvence a jednotlivé mutace
- ❖ Zajímají nás pouze pokrytí (kolikrát je osekvenována určitá oblast) na určitou velikostní jednotku genomu (bin)
- ❖ Software zprůměruje pokrytí sekvencí v určité oblasti a sjednotí je do jednoho bodu v grafu (bin = např. 1Mb)
- ❖ Výsledkem je graf počtu kopií jednotlivých binů rozmístěných po celém genomu
- ❖ Poloviční pokrytí binů na chromozomu oproti zbytku = ztráta (monozomie)
- ❖ Vyšší pokrytí binů na chromozomu oproti zbytku = zisk (trizomie)

❖ Euploidní profil (46, XY)

Prioritně doporučeno k transferu

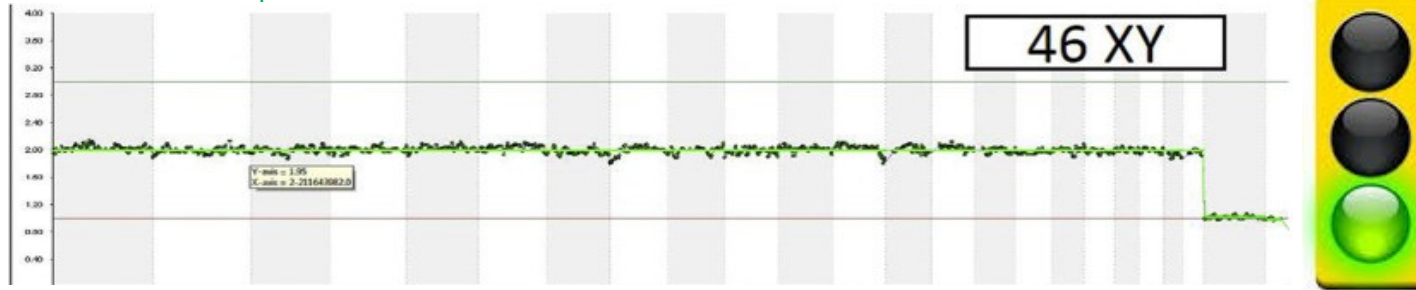
PGT-A výsledky



❖ Euploidní profil (46, XY)

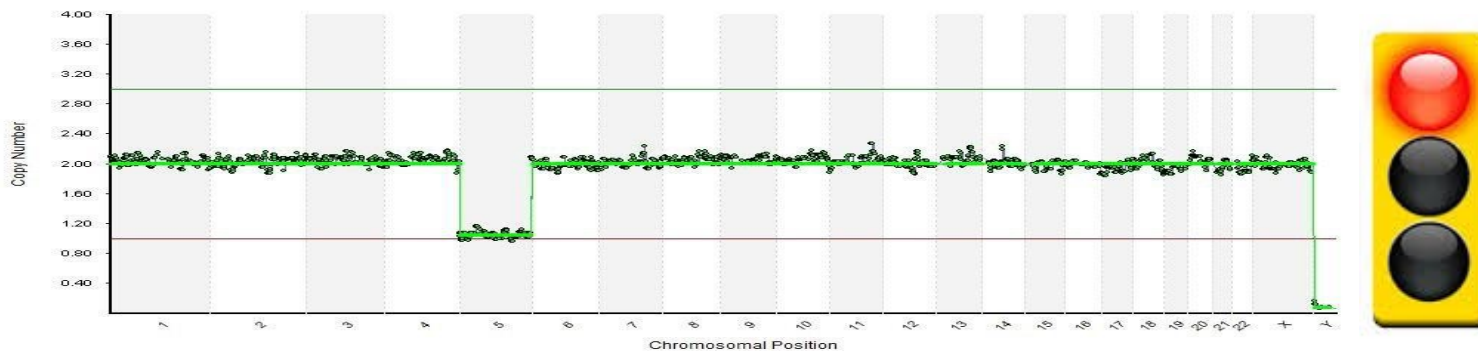
PGT-A výsledky

Prioritně doporučeno k transferu



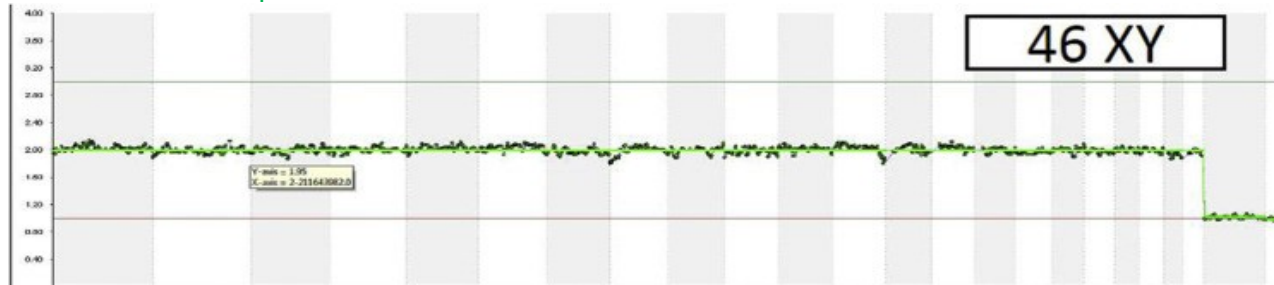
❖ Aneuploidní profil (monozomie chr. 5)

Nedoporučeno k transferu



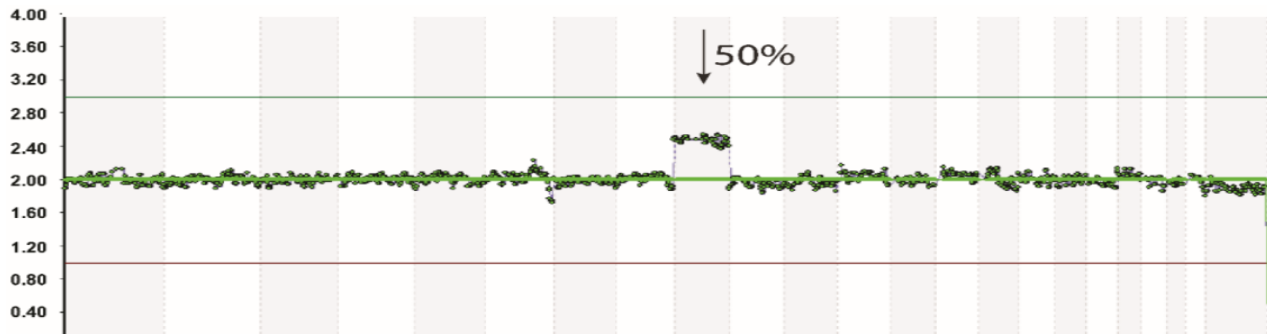
❖ Euploidní profil (46, XY)

Prioritně doporučeno k transferu



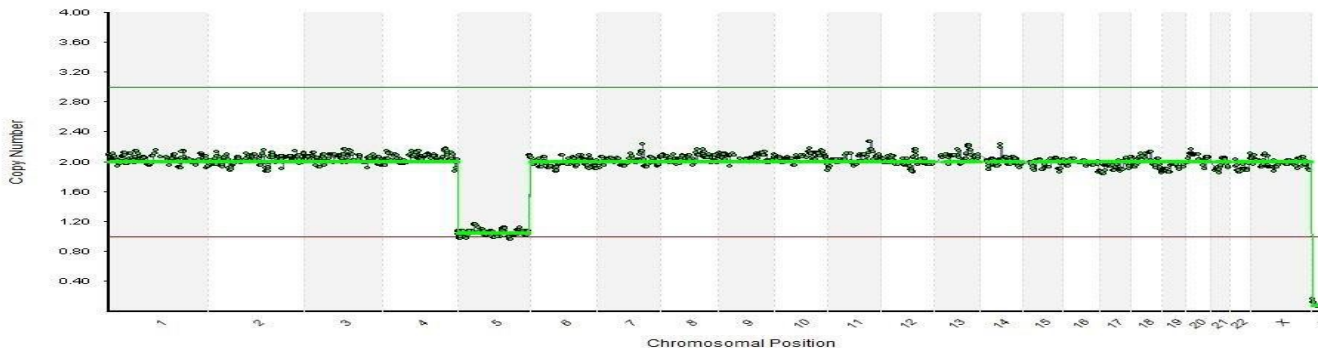
❖ Mozacistní profil (50% mozaika trizomie chr. 9)

Doporučeno k transferu po konzultaci s klinickým genetikem



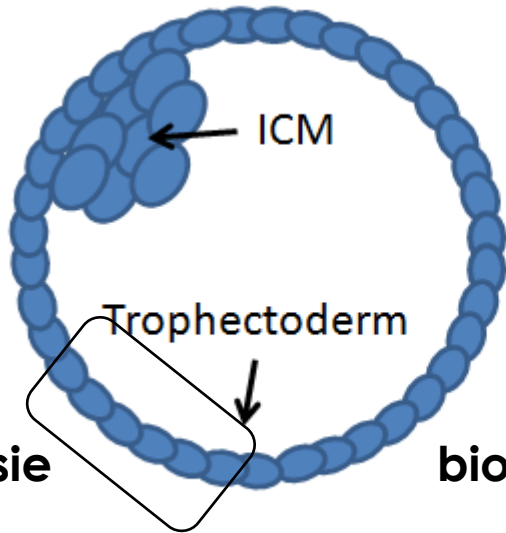
❖ Aneuploidní profil (monozomie chr. 5)

Nedoporučeno k transferu

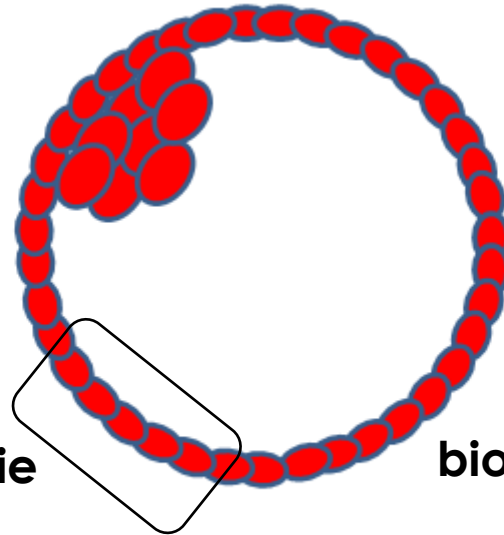


PGT-A výsledky

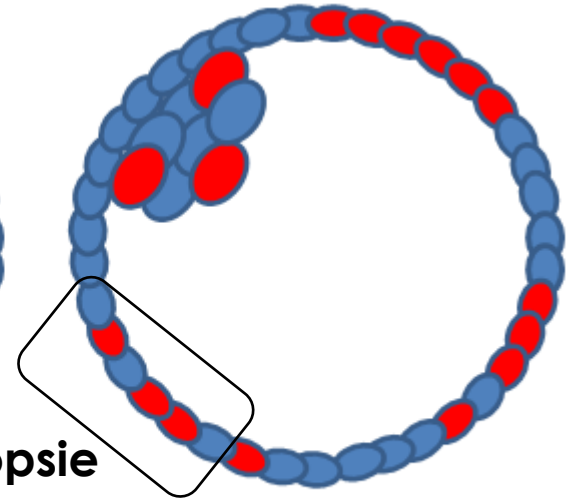
Euploidní vs Aneuploidní vs Mozacistní



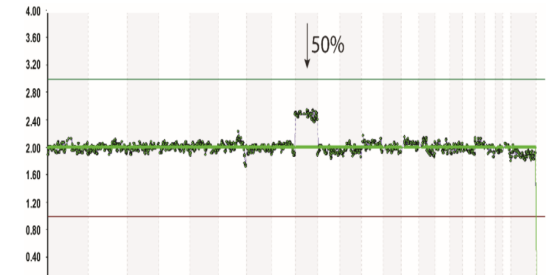
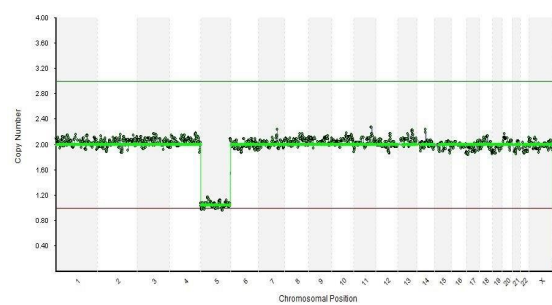
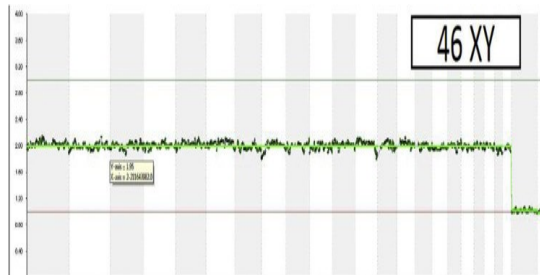
Euploid (all normal cells)



Aneuploid (all abnormal)

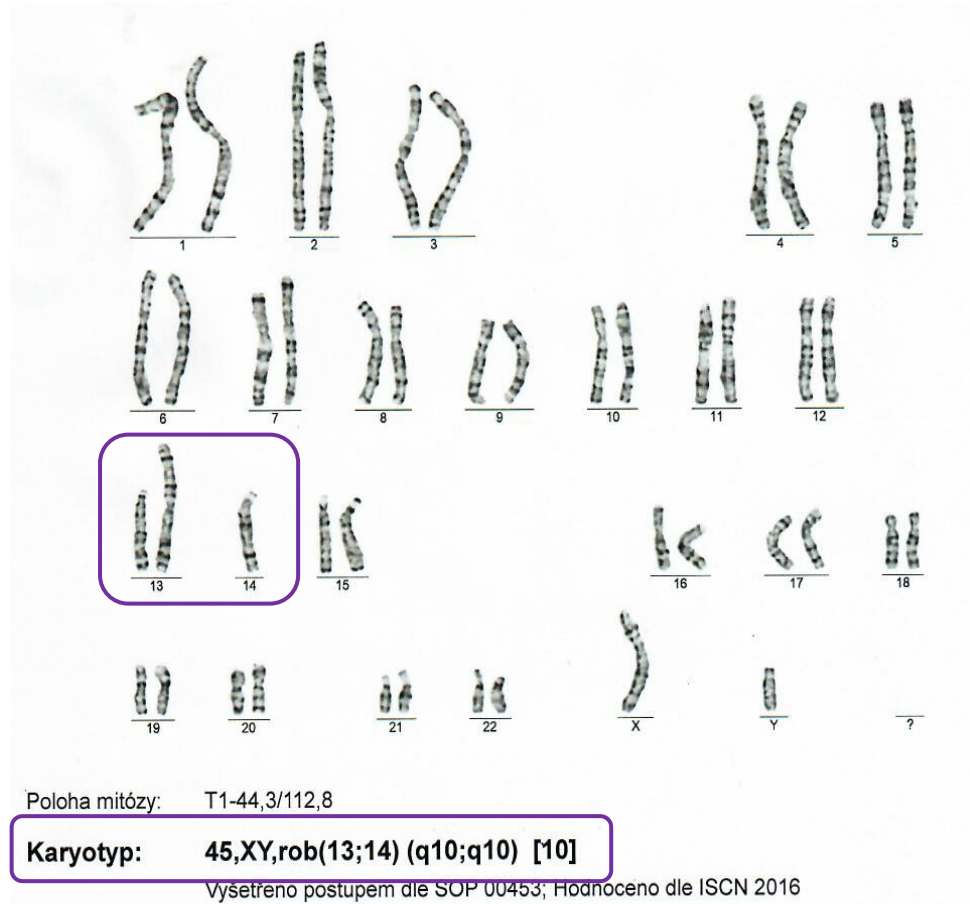
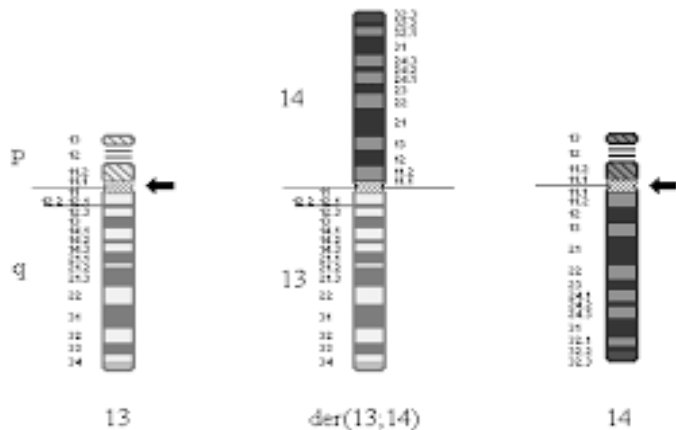


Mosaic (mix of both)



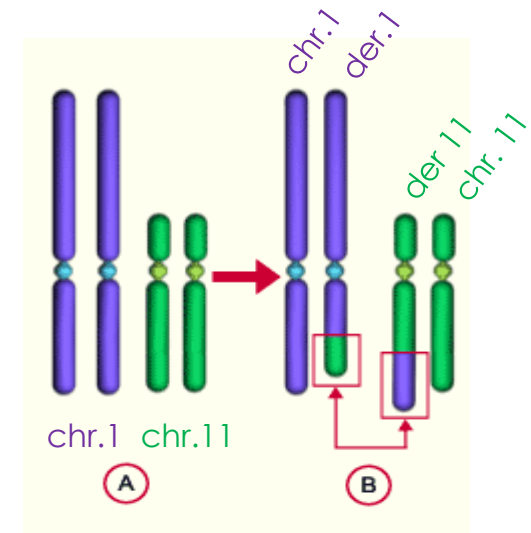
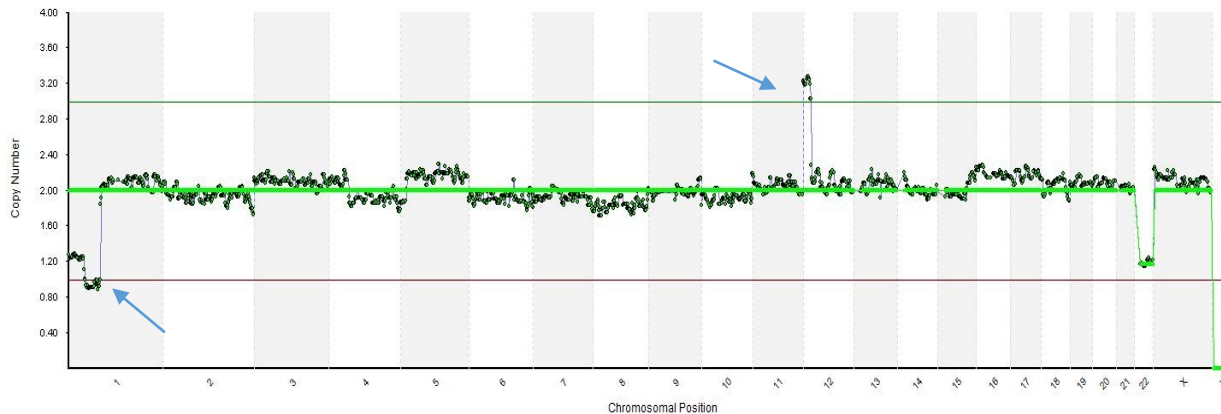
Preimplantační genetické testování strukturních aberací (PGT-SR)

- ❖ Princip identický jako PGT-A
- ❖ Rozdílná indikace k vyšetření: přítomnost strukturní aberace
- ❖ Nejčastěji reciproké a robertosnské translokace

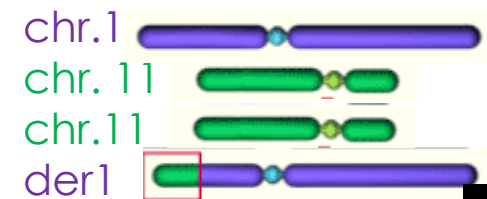


Preimplantační genetické testování strukturních aberací (PGT-SR)

- ❖ Princip identický jako PGT-A
- ❖ Rozdílná indikace k vyšetření: přítomnost strukturní aberace u pacienta
- ❖ Rozlišení cca 5Mb
- ❖ Detekce segmentálních aneuploidií



Chromozomy v embryu:



Preimplantační genetické testování monogenních chorob (PGT-M)

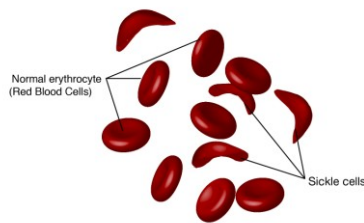
Dominantní dědičnost

- Znak se projeví v heterozygotním stavu
- Většinou „Gain of function“ mutace
- Znak přítomný v každé generaci
- 50% riziko pro potomky
- Huntingtonova choroba
- NF1, BRCA1/2, achondroplazie, polydaktilie



Recesivní dědičnost

- Znak se projeví „až“ v homozygotním stavu
- Většinou „Loss of function“ mutace
- Přenašeči (heterozygoti) bez příznaků
- Znak se objevuje bez předchozího výskytu v rodině případě „náhodně nebo obgeneraci“ (platí hlavně pro X-vázané onemocnění)
- Dva přenašeči mají 25% riziko pro potomky
- CFTR, SMA, HBB

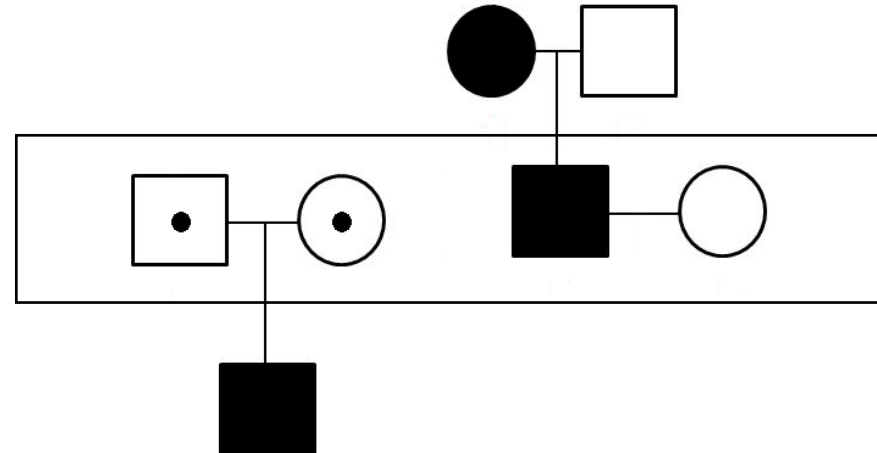


Preimplantační genetické testování monogenních chorob (PGT-M)

PGT-M

- ❖ Výběr **embrya bez kauzální mutace + euploidní**
- ❖ Primárním důvodem léčby není (většinou) neplodnost!
- ❖ Výběr embrya bez kauzální mutace je vždy spojen s IVF cyklem
- ❖ Na rozdíl od prenatální diagnostiky není nutné podstupovat rozhodnutí o případném ukončení těhotenství

Nejčastější situace



Preimplantační genetické testování monogenních chorob (PGT-M)

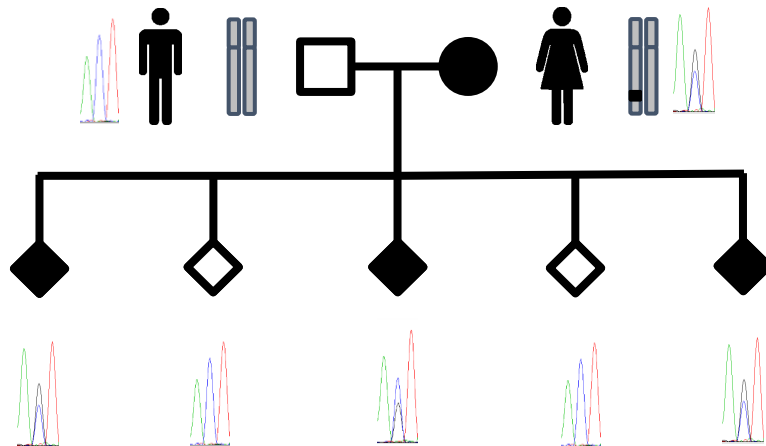
❖ Indikace (společnost lékařské genetiky):

1. Strukturní chromosomové aberace (balancované či robertsonská translokace, ev. závažné inverze) – indikace k PGT-SR
2. Monogenně podmíněné nemoci s rizikem postižení plodu (indikace k PGT-M) :
 - a) Autosomálně recesivní choroby (např. spinální muskulární atrofie, cystická fibróza)
 - b) Autosomálně dominantní choroby
 - ➡ - S častým nástupem (např. dominantní skeletální dysplázie, neurofibromatóza, Marfanův syndrom apod.)
 - ➡ - S pozdním nástupem klinických příznaků (např. myotonická dystrofie, polycystóza ledvin dospělého typu, Huntingtonova chorea, nádory s hereditární dispozicí, např. ca. prsu a ovarií, familiární adenomatózní polypózu - FAP)
 - c) Choroby vázané na pohlaví (Duchenneova/Beckerova svalová dystrofie, hemofilie, syndrom fragilního chromosomu X apod.)
 - ➡ d) Vyšetření pohlaví u chorob vázaných na pohlaví, kde není možná přímá diagnostika
 - ➡ e) HLA typizace embrya v přísně indikovaných případech, kdy je v rodině dítě, se závažnou chorobou (např. leukémií), které vyžaduje transplantaci buněk kostní dřeně s maximální shodou v HLA znacích.

Preimplantační genetické testování monogenních chorob (PGT-M)

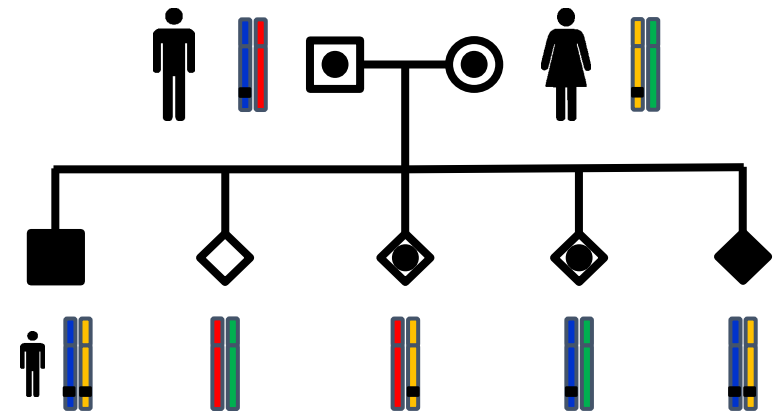
Přímá diagnostika v embryích

- V embryu sledujeme konkrétní místo mutace a díváme se zda je mutace přítomna či nikoliv
- Bez nutnosti referenčního vzorku
- **Allele drop-out (ADO)**



Nepřímá diagnostika v embryích

- V embryu sledujeme více okolních markerů (značek), které jsou ve vazbě s mutací
- **Potřeba vyšetřit rodiče a referenční vzorek** (rodinný příslušník s mutací/bez mutace)
- **Diagnosticky spolehlivější**



Metody PGT-M

❖ Přímá detekce mutace – Sangerovo sekvenování (riziko ADO)

❖ Nepřímá vazebná analýza

❖ Pomocí STR markerů: již se tolik nepoužívá

vyžaduje zdlouhavou přípravu pro každý jednotlivý případ
detekci aneuploidii je nutno provést jiným testem

❖ Pomocí SNP markerů: metoda **Karyomapping**

univerzální čipová technologie umožňující PGT-M pro jakékoliv onemocnění

není nutná specifická příprava pro jednotlivé případy

kombinuje také PGT-A

vysoká cena

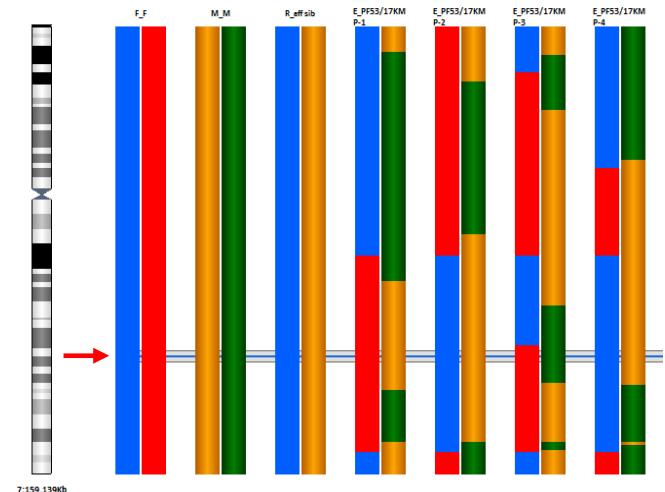
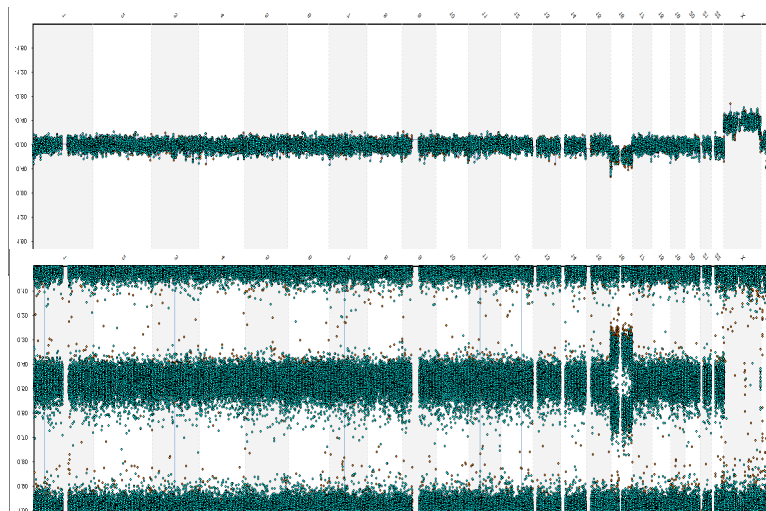
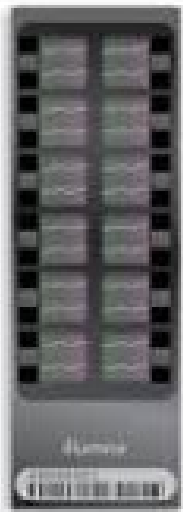
❖ Pomocí NGS: detekce SNP markerů je provedena pomocí NGS

stejný princip jako Karyomapping jen jiná technologie

není univerzální pro všechny geny (prozatím)

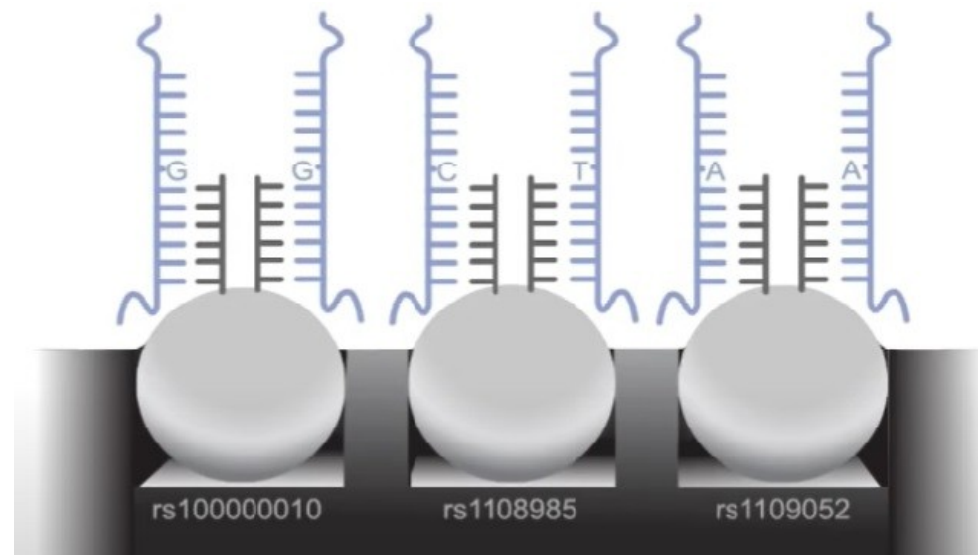
PGT-M metodou Karyomapping

- ❖ Metoda založena detekci a analýze SNP variant v lidském genomu
- ❖ Nepřímá vazebná analýza
- ❖ 300 000 SNP po celém genomu (každý SNP 19x redundance)
- ❖ Vytváří „karyomapu“ zděděných parentálních haplotypů v embryích
- ❖ **Univerzální nástroj** pro PGT-M jakékoliv nemoci se známou kauzální mutací
- ❖ **Detekce aneuploidií** (PGT-M a PGT-A v jednom testu)
 - ❖ Určení původu aneuploidií (maternální vs. paternální původ)
 - ❖ Meiotická chyba prvního vs. druhého vs. Mitotický chyba
- ❖ Detekce všech crossing-overů v embryu, rozpoznání konsangvinních vztahů



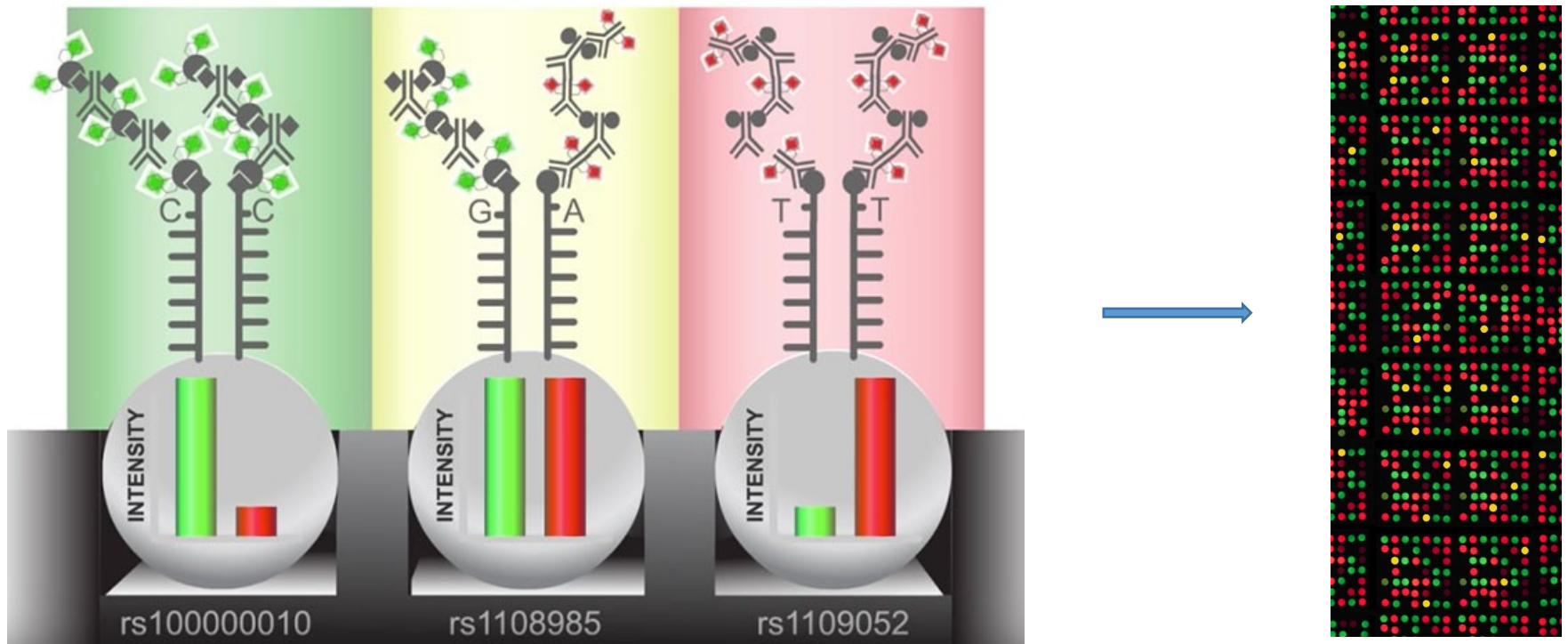
SNP array

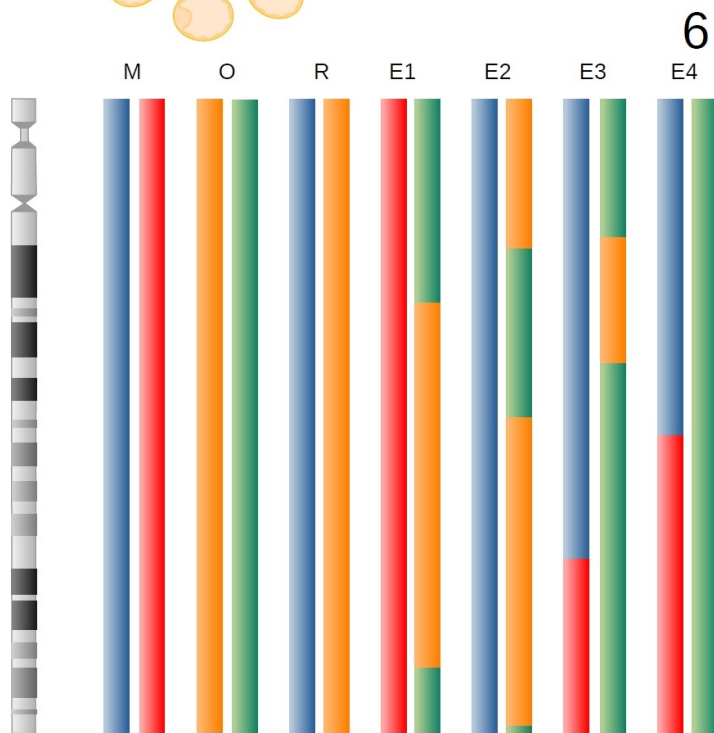
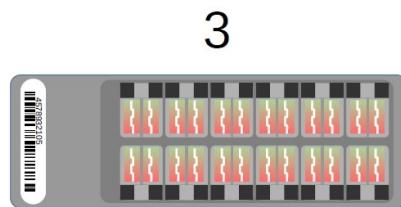
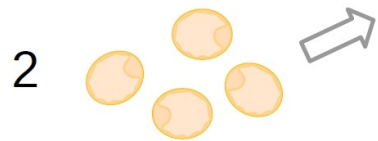
- SNP array – čipová technologie umožňující současnou detekci velkého množství SNP
- Workflow:
 1. Fragmenta a amplifikace DNA
 2. Hybridizace DNA na kuličky se sondami



SNP array

- Workflow:
 1. Fragmenta a amplifikace DNA
 2. Hybridizace DNA na kuličky se sondami
 3. Přidání fluorescenčně značeného dNTP a amplifikace signálu
 4. Skenování signálů ve skeneru





5

Identifikace vzorku	Otec	Matka	Dítě	Embryo 1	Embryo 2	Embryo 3
rs4797697	AB	AA	AB	AB	AA	BB
rs1061599	AB	AB	AB	AA	BB	AA
rs8094221	BB	BB	AB	BB	BB	BB
rs672856	AA	AB	AA	AA	AA	AB
rs9950805	AA	AA	AB	AA	AA	AA
rs12606185	AA	AA	AA	AA	AA	AA
rs600449	AA	AA	AA	AA	AA	AA
rs12373326	AB	AB	AB	AA	BB	AA
rs577454	AB	AB	BB	BB	AB	AB
rs652504	AB	BB	BB	AA	BB	AB
rs8098928	AA	AA	AB	AA	AA	AA
rs11080970	AB	AB	AB	BB	AA	BB
rs11875451	AA	AA	AA	AA	AA	AA
rs4308028	AB	AB	AB	AA	BB	AA
rs620837	AA	AB	AA	AA	AA	BB
rs11659263	BB	AB	AB	AB	BB	AB

Karyomapping

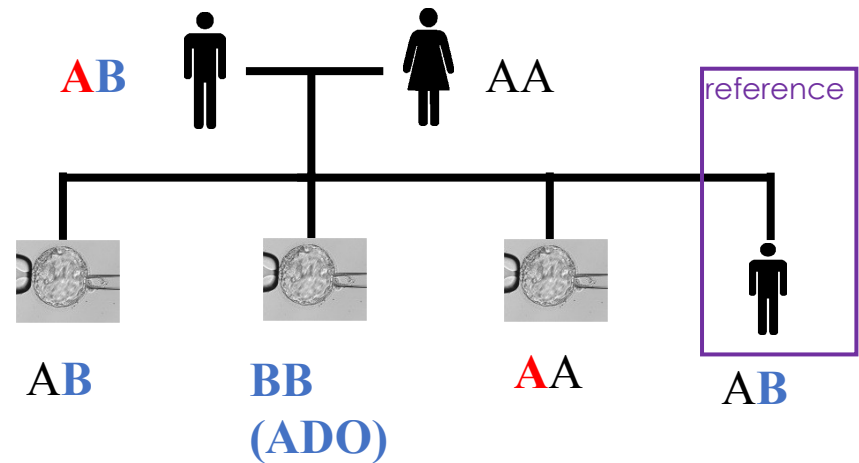
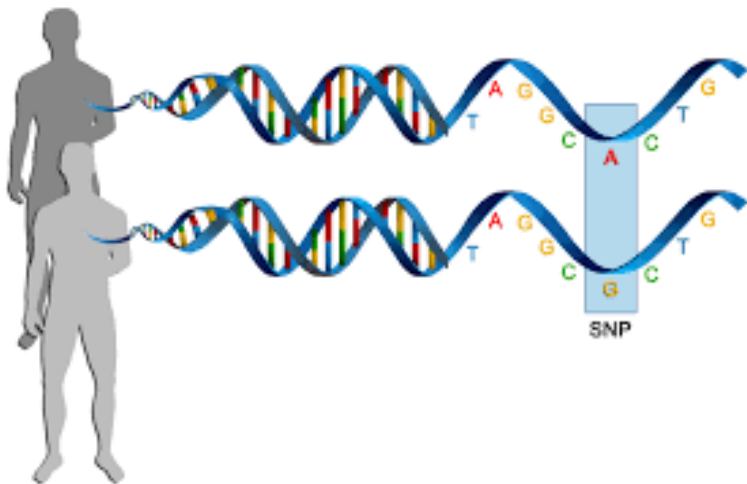
Co je to SNP aneb Mendelistická dědičnost ve velkém

- SNP = jednonukleotidový polymorfismus
 - Záměna jedné báze za jinou (=mutace)
 - Běžná varianta v populaci (\neq mutace)
 - Frekvence v populaci $>1\%$ (\neq mutace)
 - Cca 1 SNP na 1000 bází



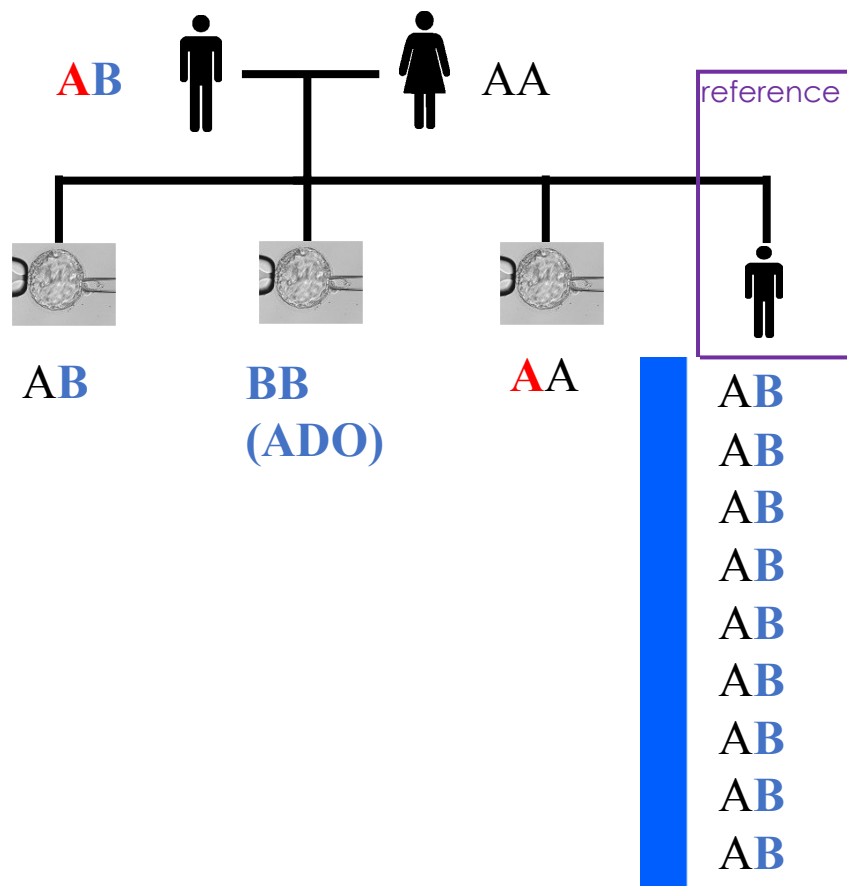
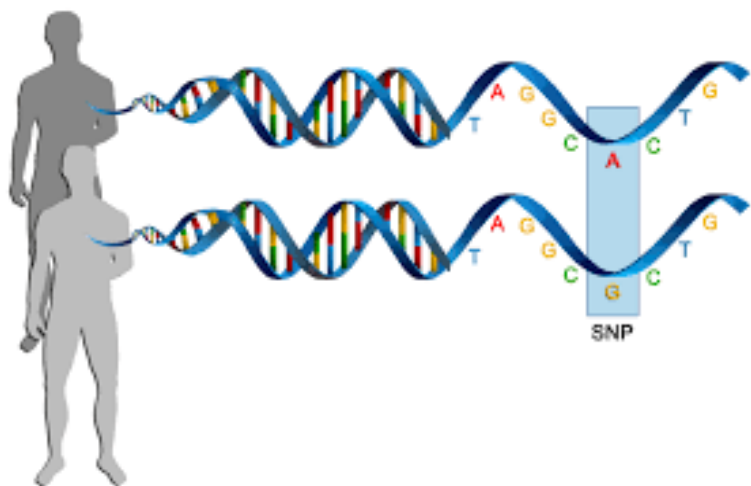
Karyomapping

Co je to SNP aneb Mendelistická dědičnost ve velkém



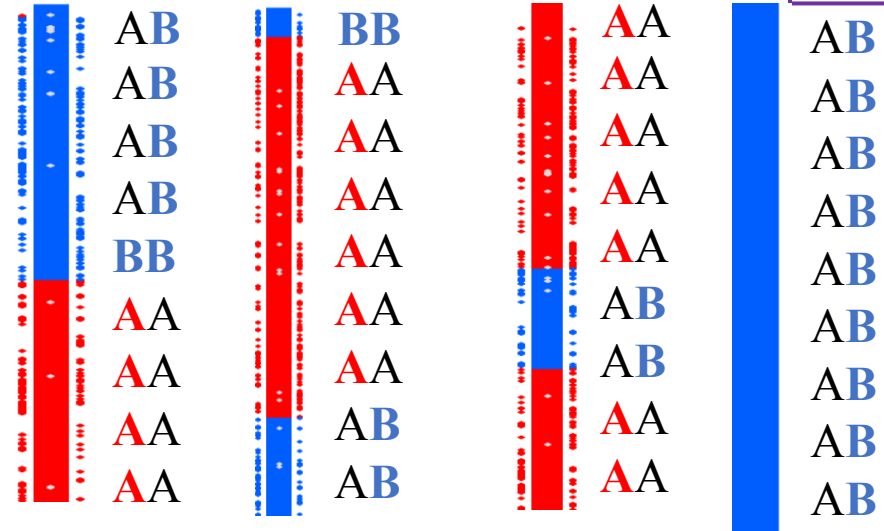
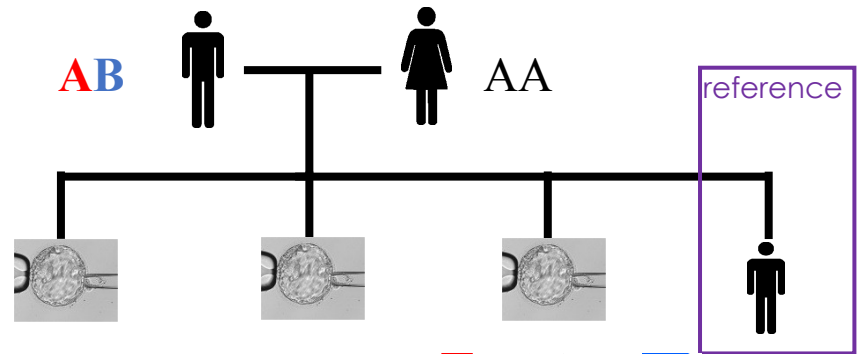
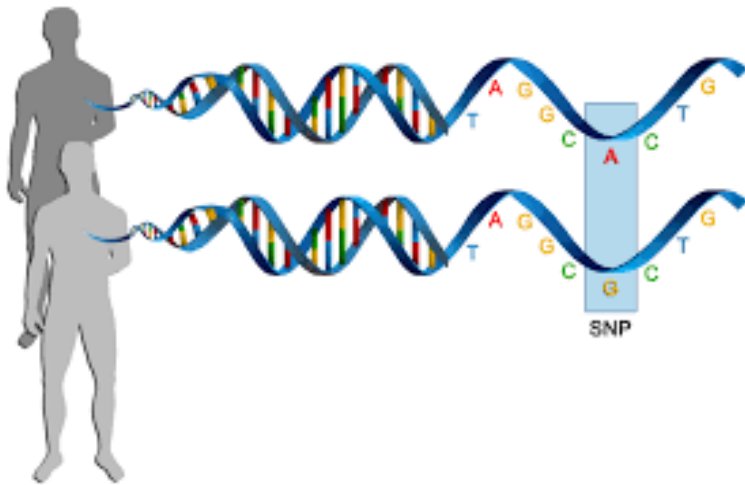
Karyomapping

Co je to SNP aneb Mendelistická dědičnost ve velkém



Karyomapping

Co je to SNP aneb Mendelistická dědičnost ve velkém

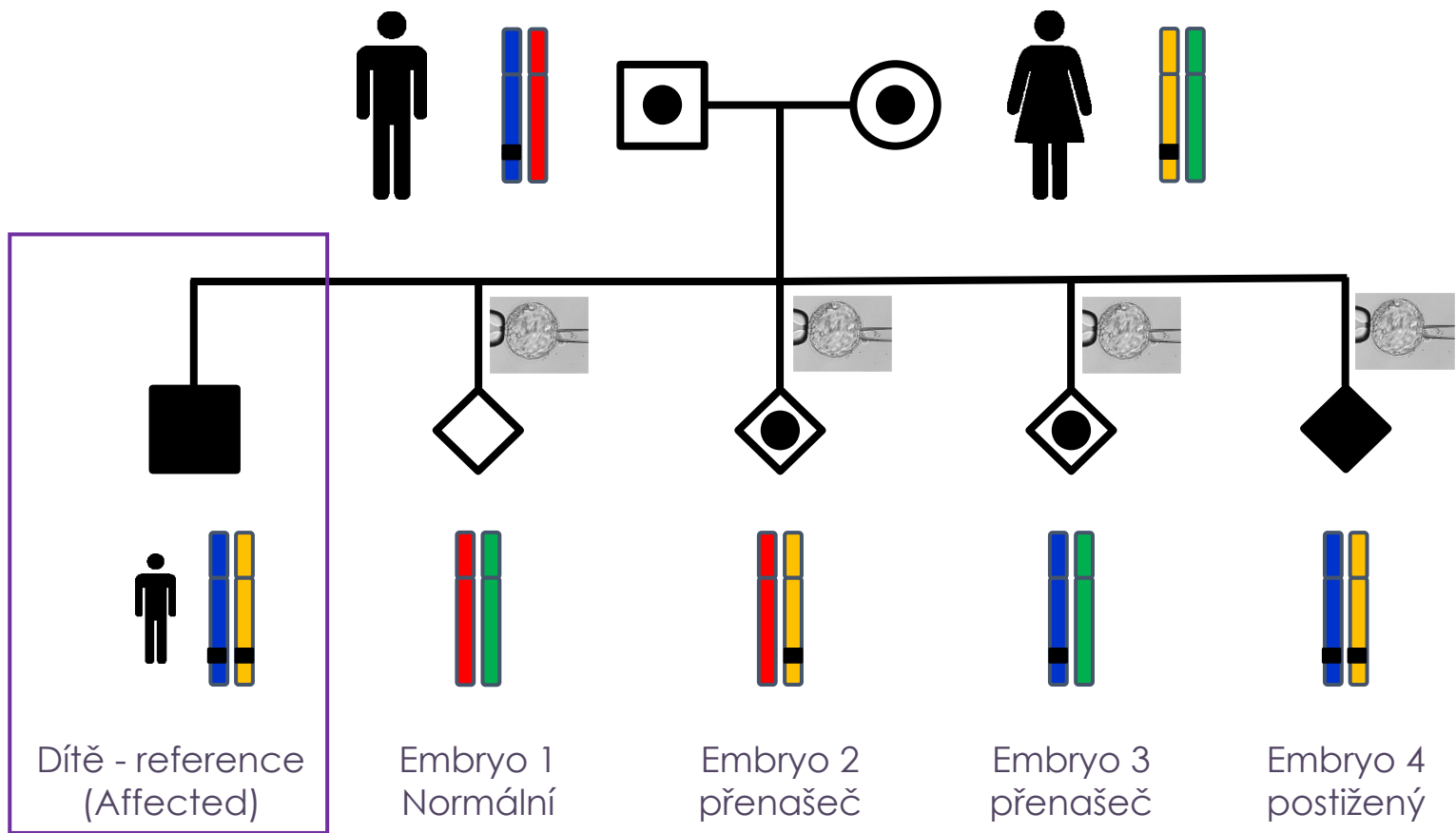


300 000x
SNP v každém vzorku
=
„karyo-mapping“

Karyomapping- autozomálně recesivní příklad

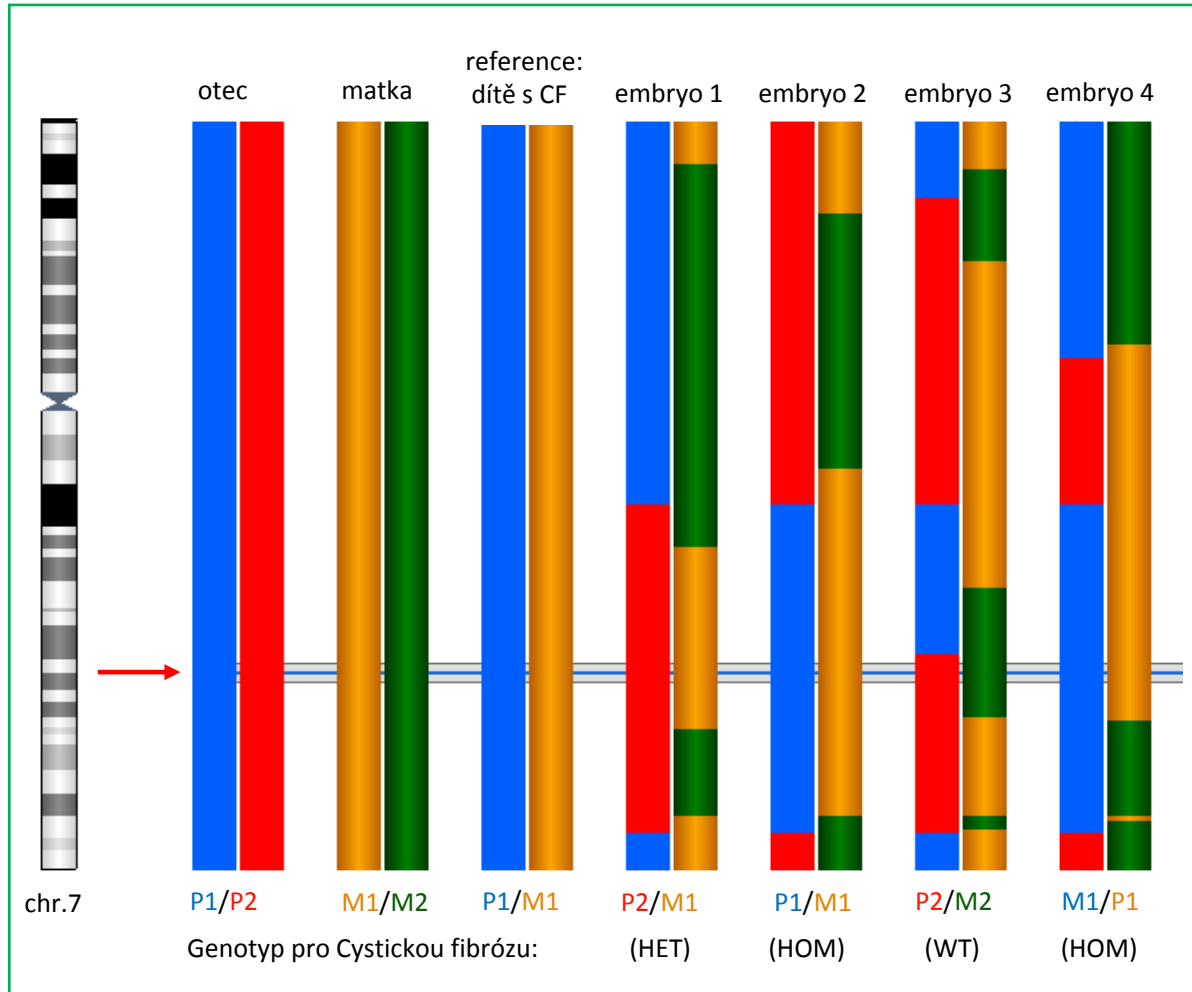
Otec (heterozygot - přenašeč)

Matka (heterozygot - přenašeč)



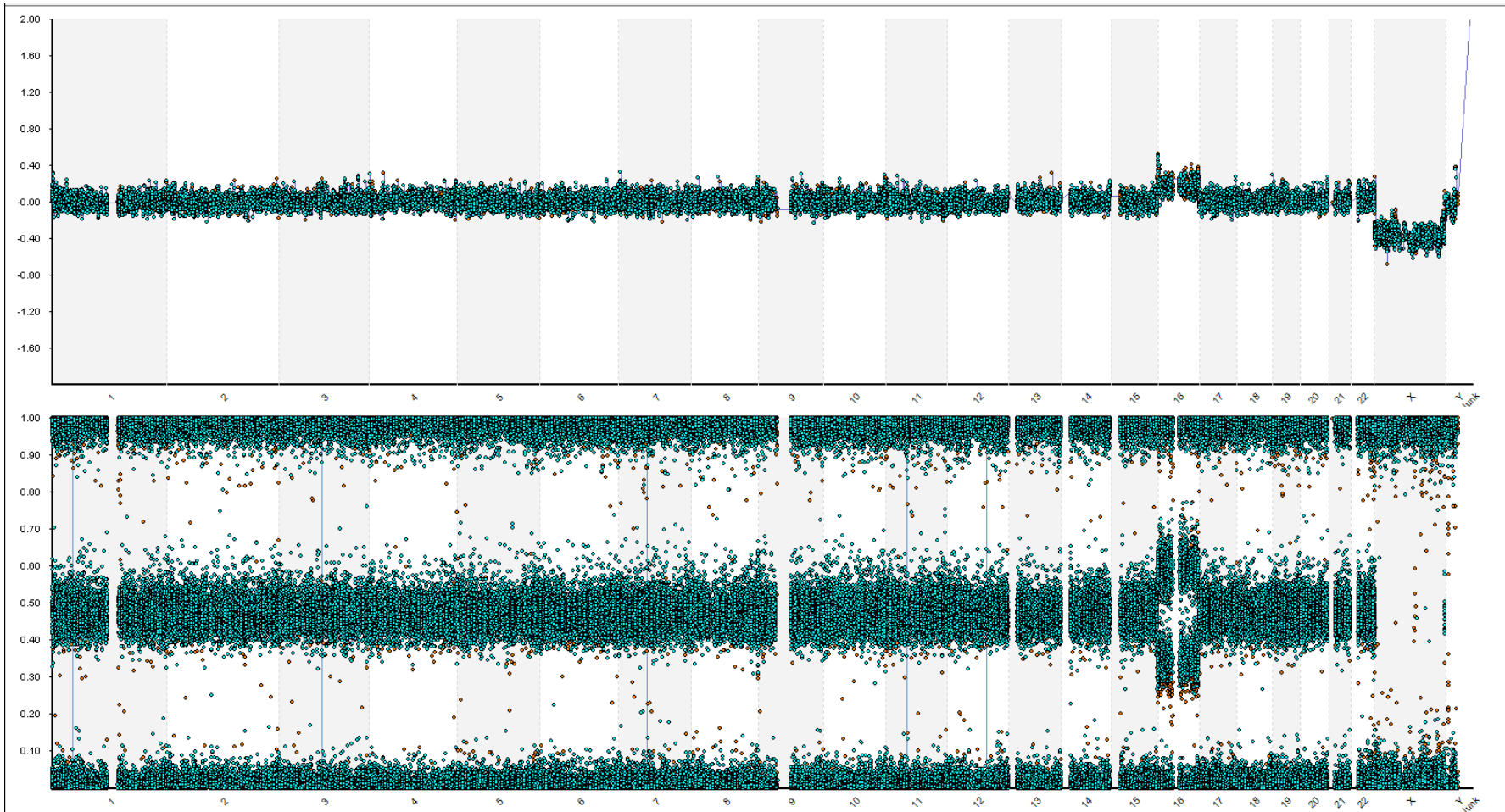
Karyomapping- ukázka dat ze softwaru

Vizualizace haplotypů vyšetřených embryí metodou Karyomapping



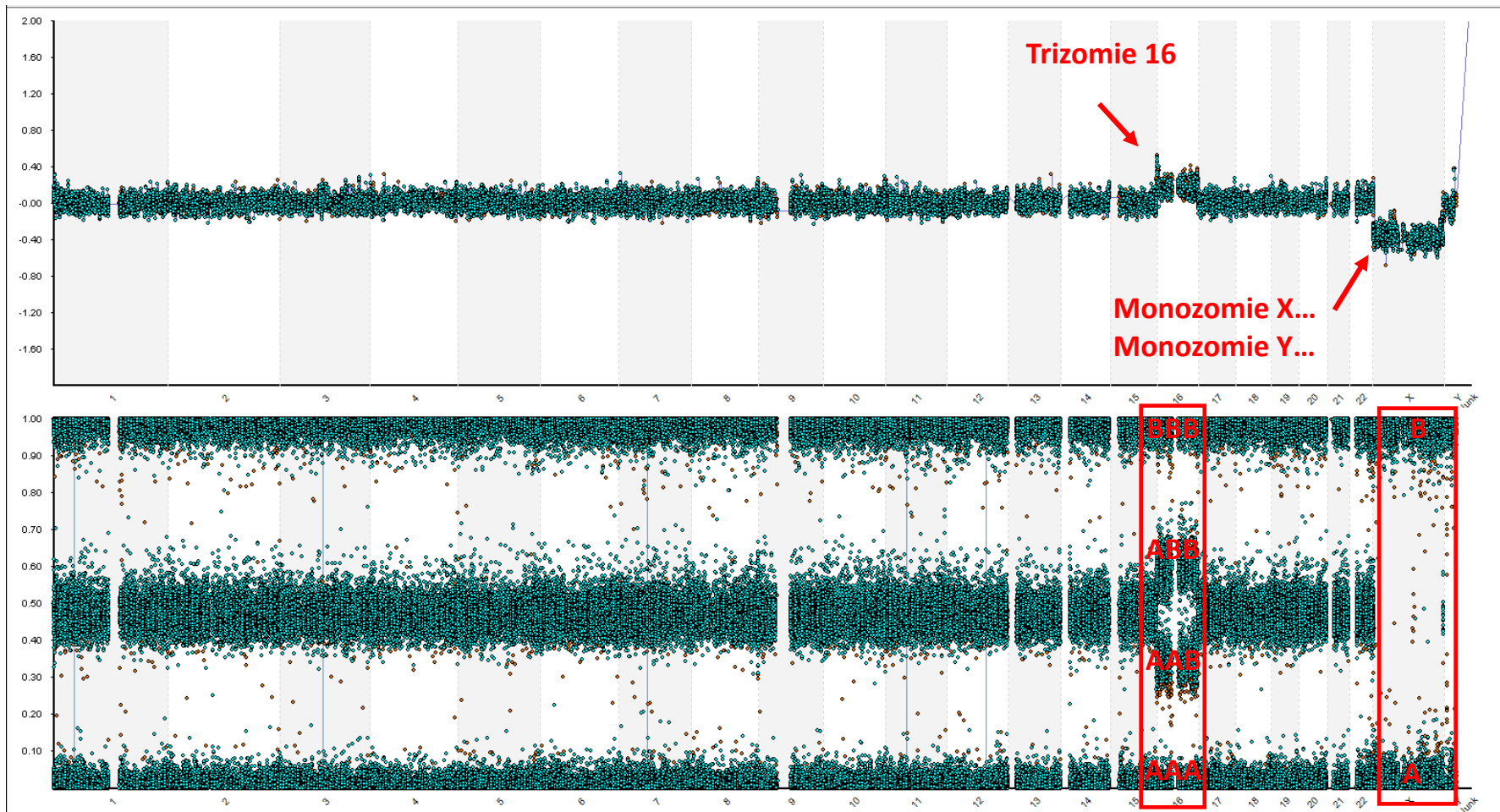
Karyomapping- detekce aneuploidií

- ◆ Aneuploidie jde pomocí karyomappingu hodnotit **kvantitativně** i kvalitativně



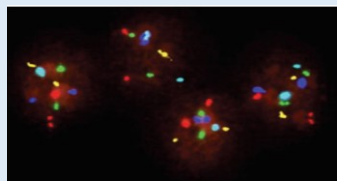
Karyomapping- detekce aneuploidií

- ◆ Aneuploidie jde pomocí karyomappingu hodnotit **kvantitativně** i kvalitativně



Vývoj PGT

PGT-A 1.0



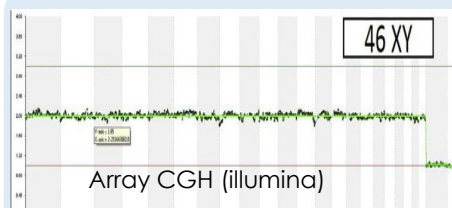
Fluorescenční In Situ Hybridizace (FISH)

Biopsie dvou blastomer D3

1995

≤ 12 chromozomů

PGT-A 2.0

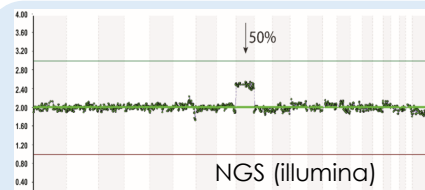


Array CGH

Biopsie D5/6 Trofektodermu
Odložený transfer

2008

PGT-A 3.0

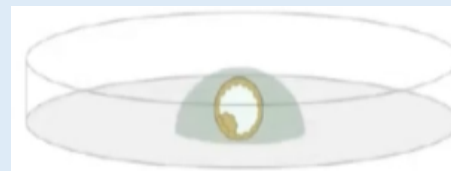


Detekce mozaicismu pomocí NGS

2013

Sekvenování nové generace (Trofektodermu)

Neinvazivní chromozomový screening (NICS)



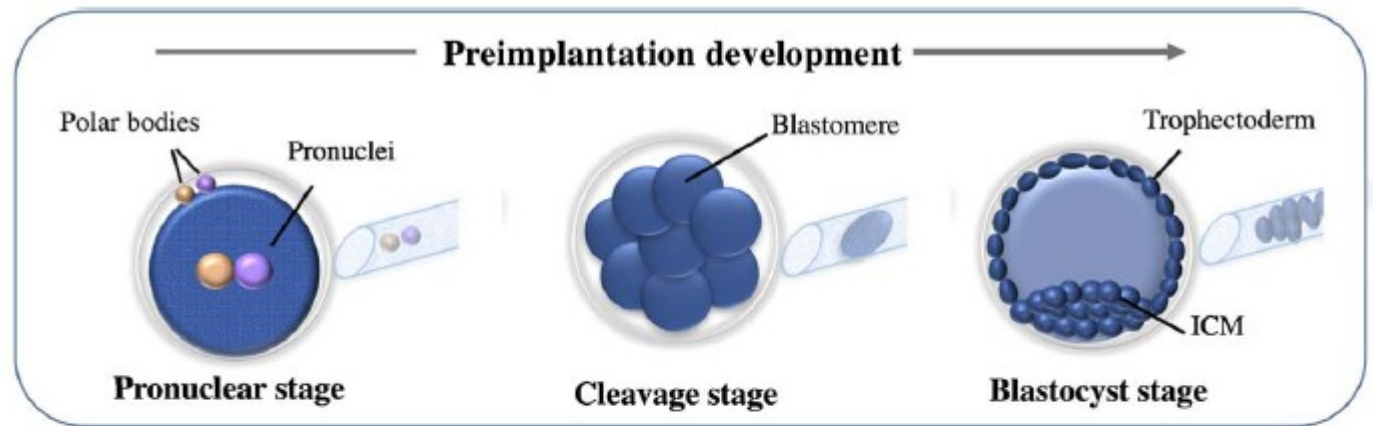
Biopsie kultivačního média

2019

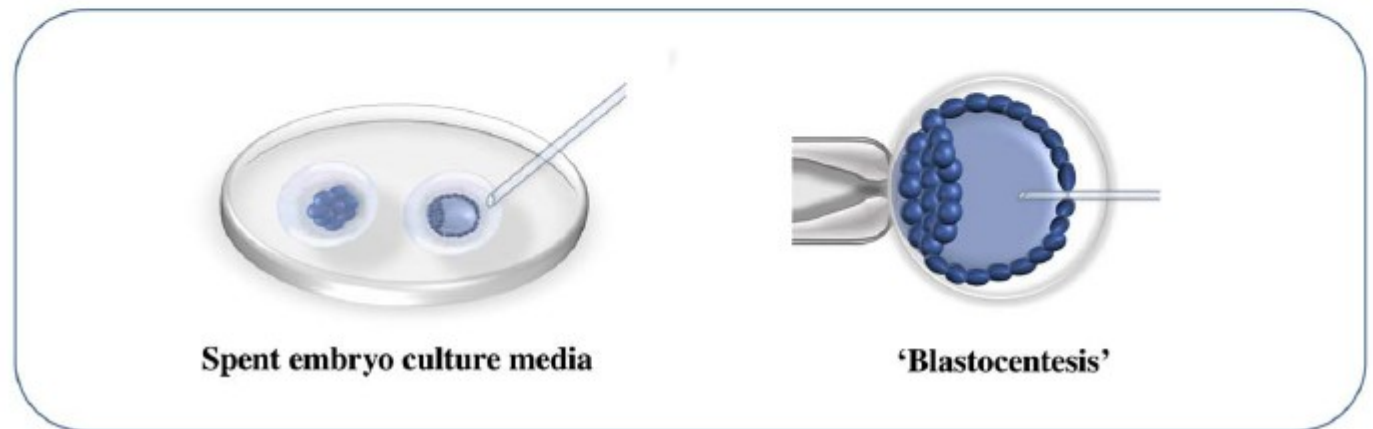
Sekvenování nové generace (biopsie kultivačního média)

24 chromozomů

PGT-A, SR, M



NICS



Leaver and Wells, Hum Reprod Update 2020;26:16–42

Srovnání vzorku TE a kultivačního média

Biopsie trofektodermu

- ✓ Diagnostická spolehlivost
- ✓ Vysoká kvalita DNA ve vzorku

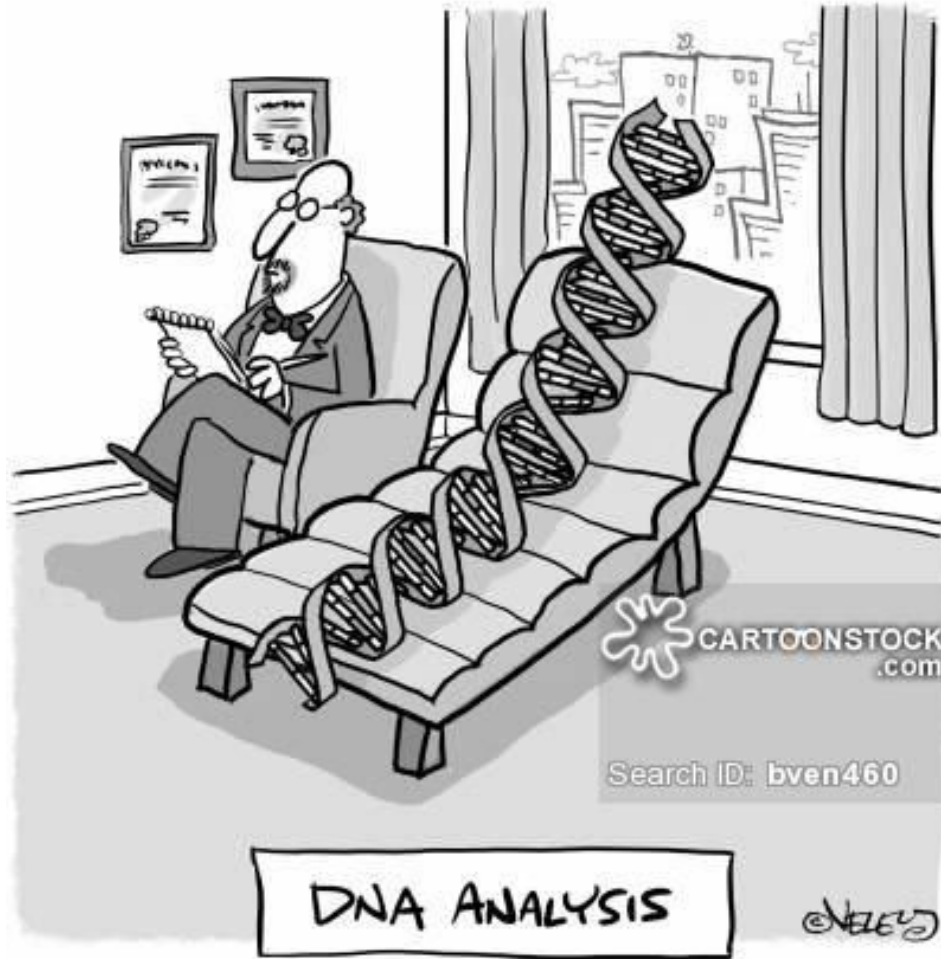
- ✓ Nutné zkušenosti s biopsií
- ✓ Vybavení pro biopsii

Biopsie kultivačního média

- ✓ Bez nutnosti vybavení pro biopsii
- ✓ „Neinvazivní“ přístup

- ✓ Screeningový test
- ✓ Nejasný zdroj genetického materiálu (vysoká míra kontaminace)
- ✓ Nízká kvalita DNA

Děkuji



Dotazy: rnavratil@repromeda.cz