



# 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:

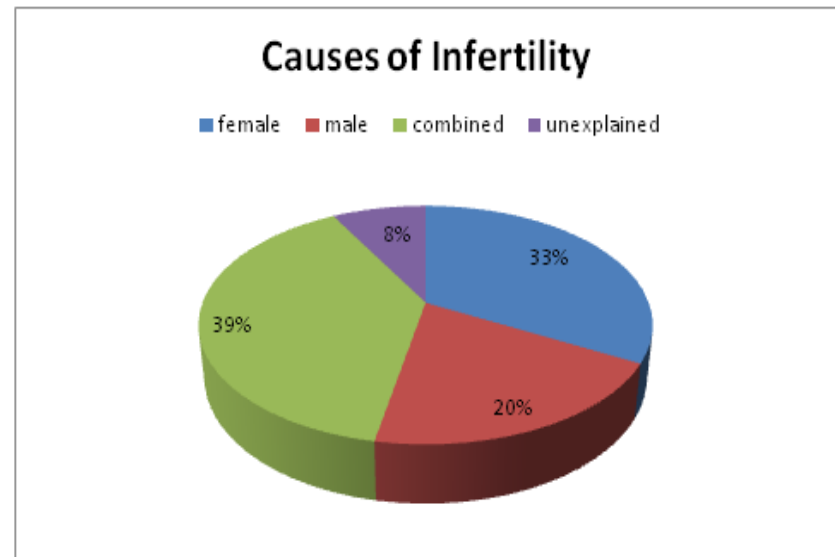
- ❖ nejčastěji věk > 35 let
- ❖ endometrióza
- ❖ neprůchodnost reprodukčních cest
- ❖ hormonální problémy

## ❖ Muž:

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

## ❖ Kombinovaná příčina

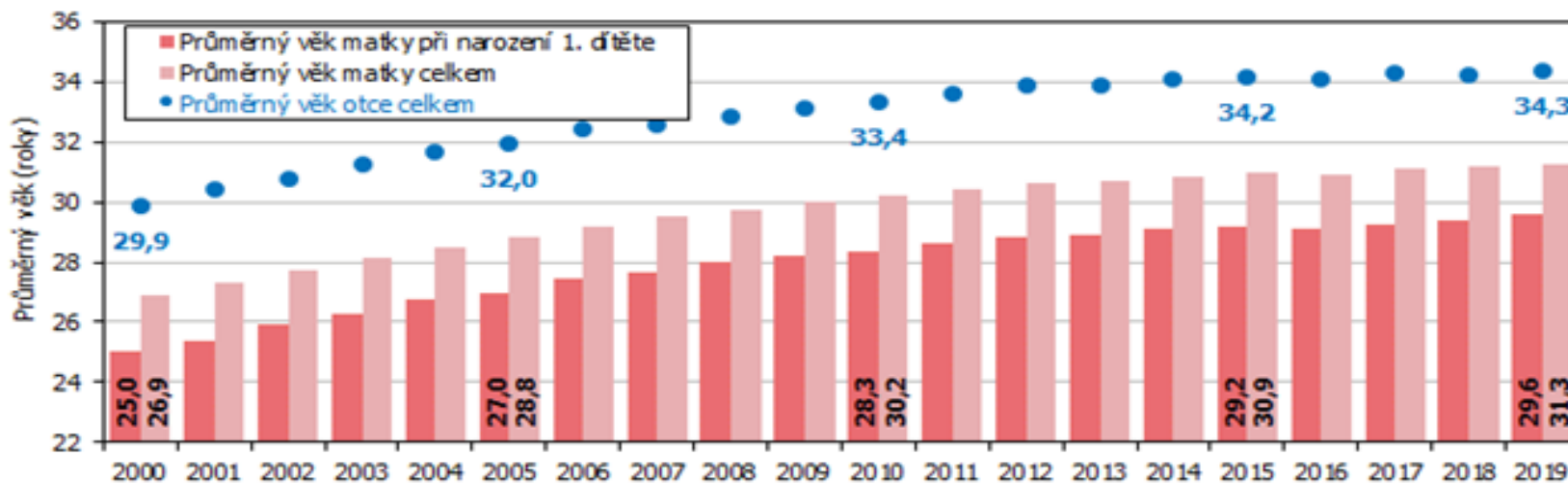
- ❖ výše zmíněné/imunogenetika

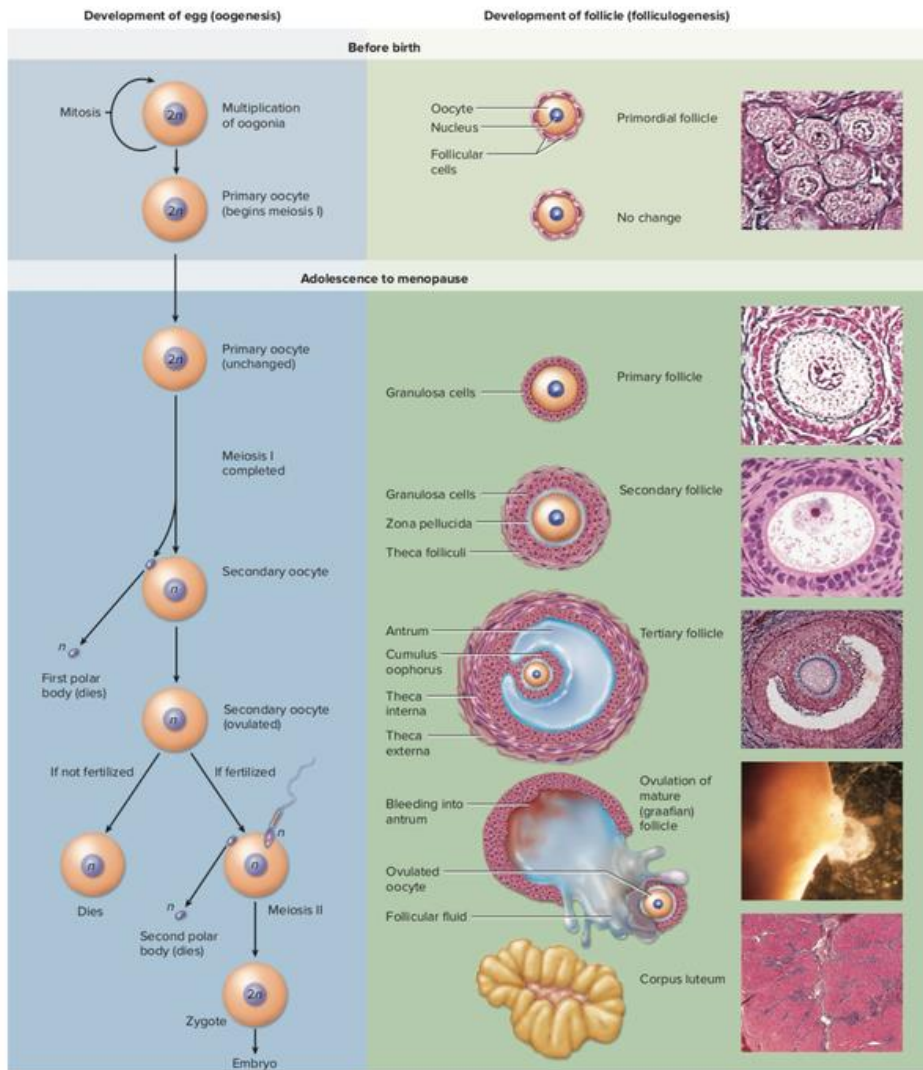


# Trend dnešní doby

## 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



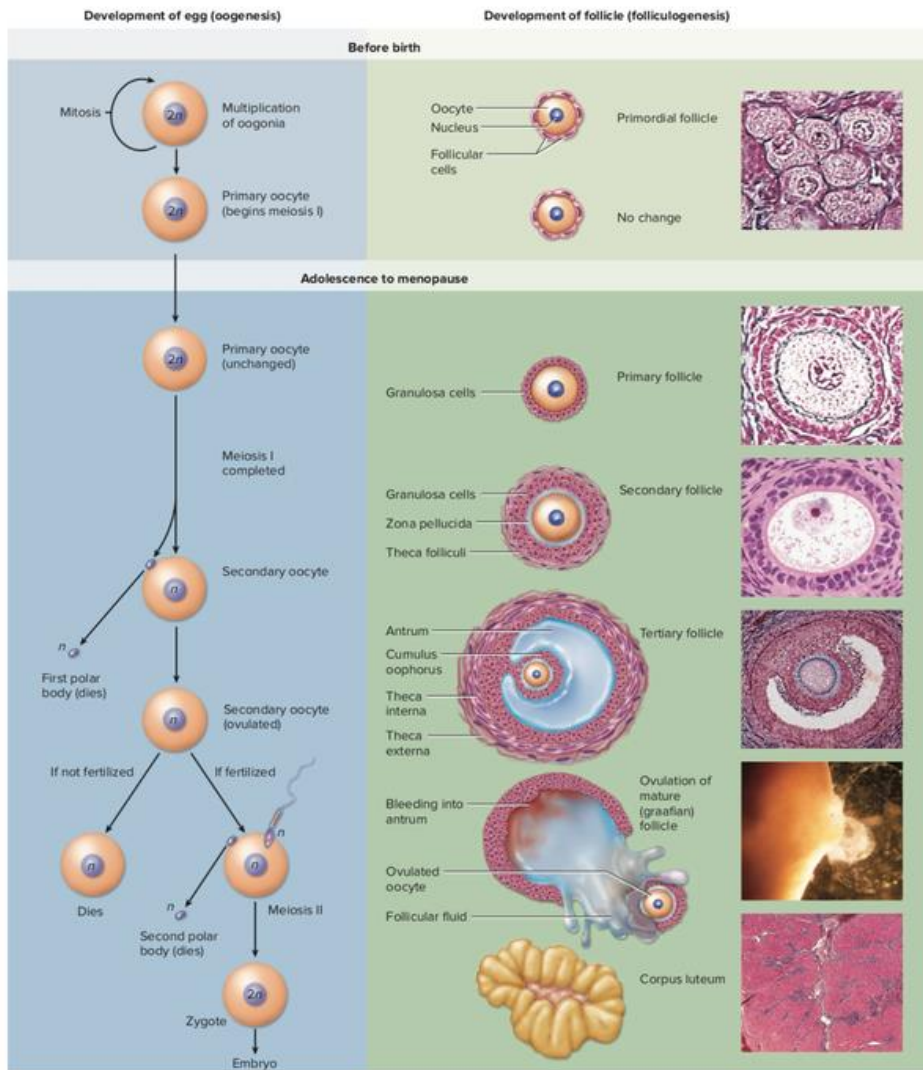


# Na věku matky záleží

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

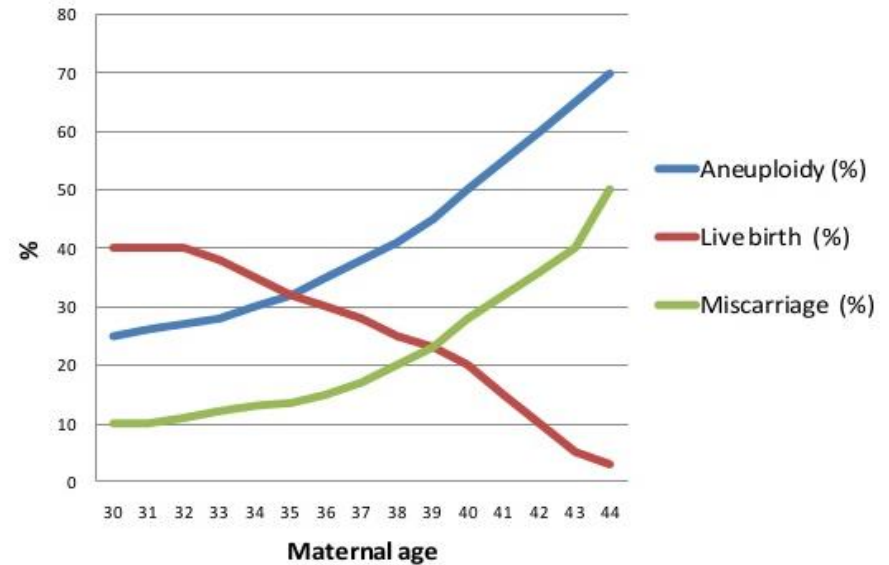


**FIGURE 28.11 Oogenesis (Left) and Corresponding Development of the Follicle (Right).** AP®  
 (1, 2): © Ed Reschke/Getty Images; (3): © McGraw-Hill Education/AI Telsler, photographer; (4): © Ed Reschke/Getty Images; (5): © Petit Format/Science Source



# 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

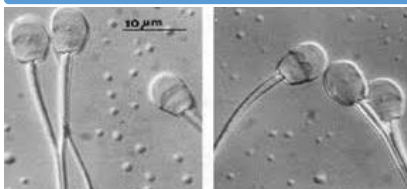
## Embryotransfer

- 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

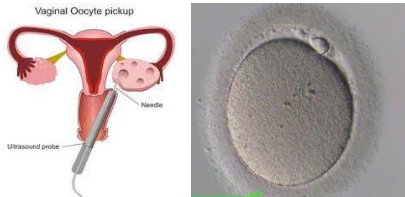
## Metody asistované reprodukce

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

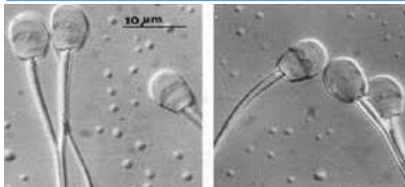
## Embryotransfer

- Čerstvý embryotransfer
- Kryoembryotransfer
- Skladování zbylých embryí pohlavních buněk

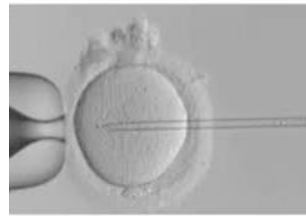
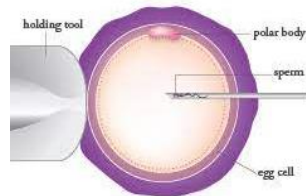
## Odběr oocytů



## Odběr spermií



## Oplození oocytu (ICSI)



# Léčba neplodnosti v na IVF klinice

## Vstupní konzultace

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

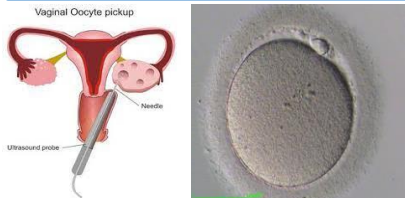
## Metody asistované reprodukce

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

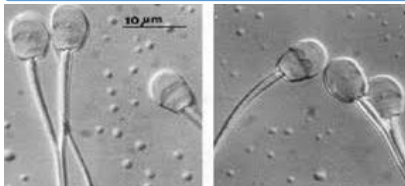
## Embryotransfer

- Čerstvý embryotransfer
- Kryoembryotransfer
- Skladování zbylých embryí pohlavních buněk

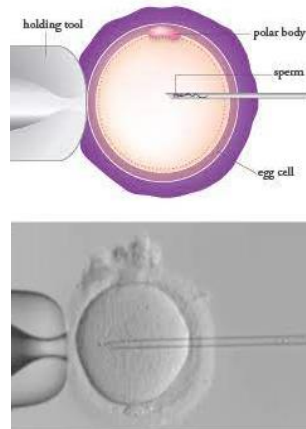
### Odběr oocytů



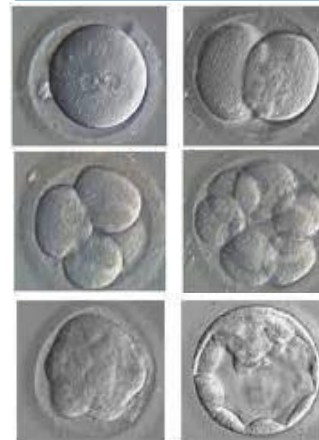
### Odběr spermií



### Oplození oocyty (ICSI)



### Vývoj embrya



# Léčba neplodnosti v na IVF klinice

## Vstupní konzultace

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

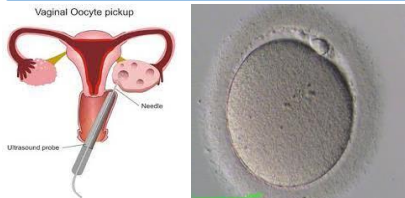
## Metody asistované reprodukce

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

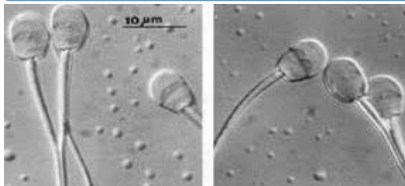
## Embryotransfer

- Čerstvý embryotransfer
- Kryoembryotransfer
- Skladování zbylých embryí pohlavních buněk

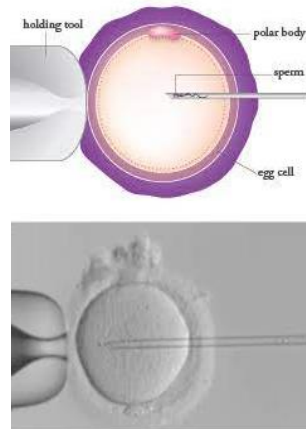
### Odběr oocytů



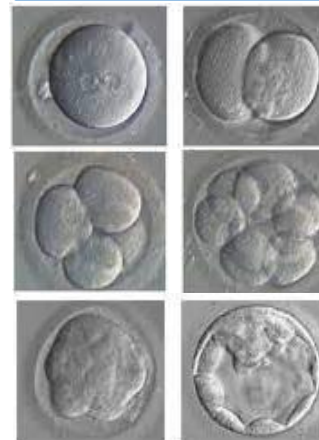
### Odběr spermií



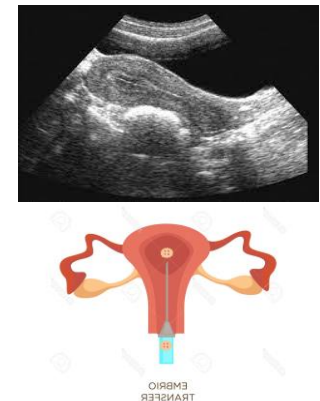
### Oplození oocytu (ICSI)



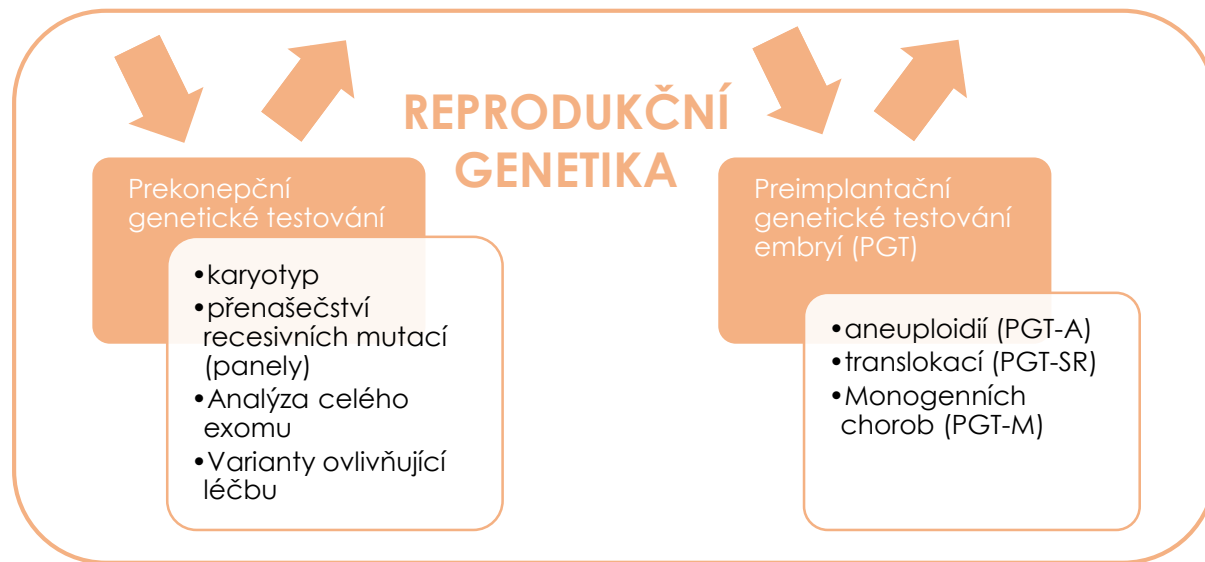
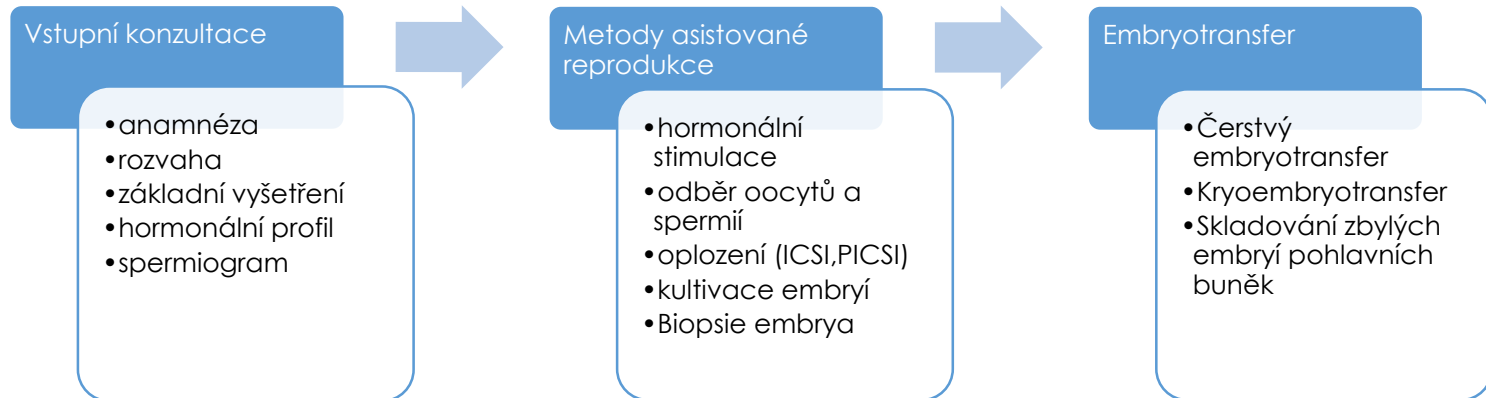
### Vývoj embrya



### embryotransfer

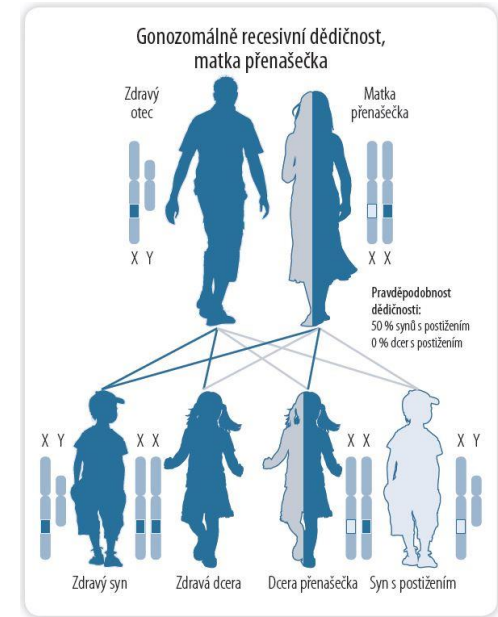
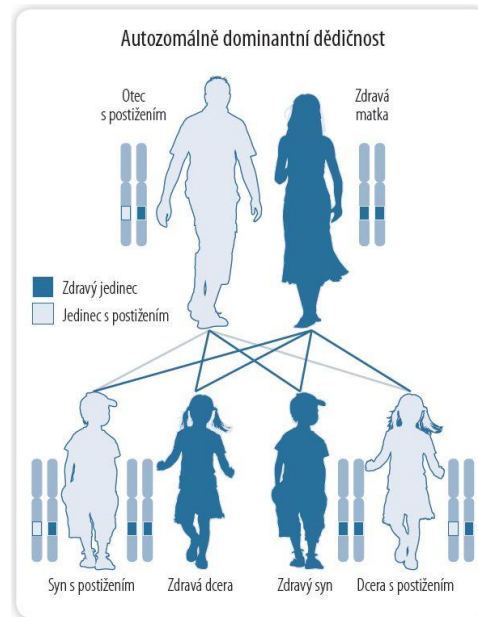
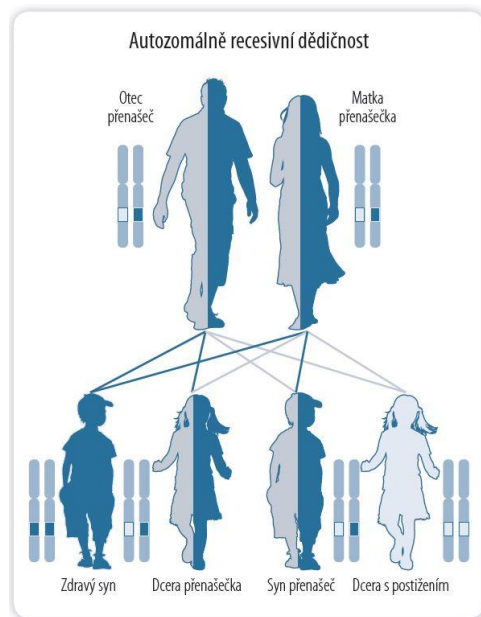


# Léčba neplodnosti v na IVF klinice



# Reprodukční genetik

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



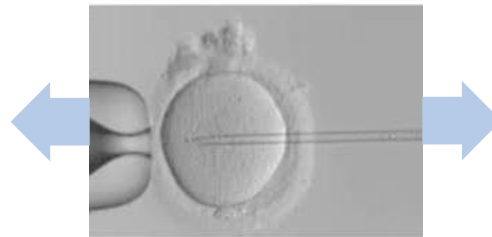
# Reprodukční genetik

## Prekoncepční

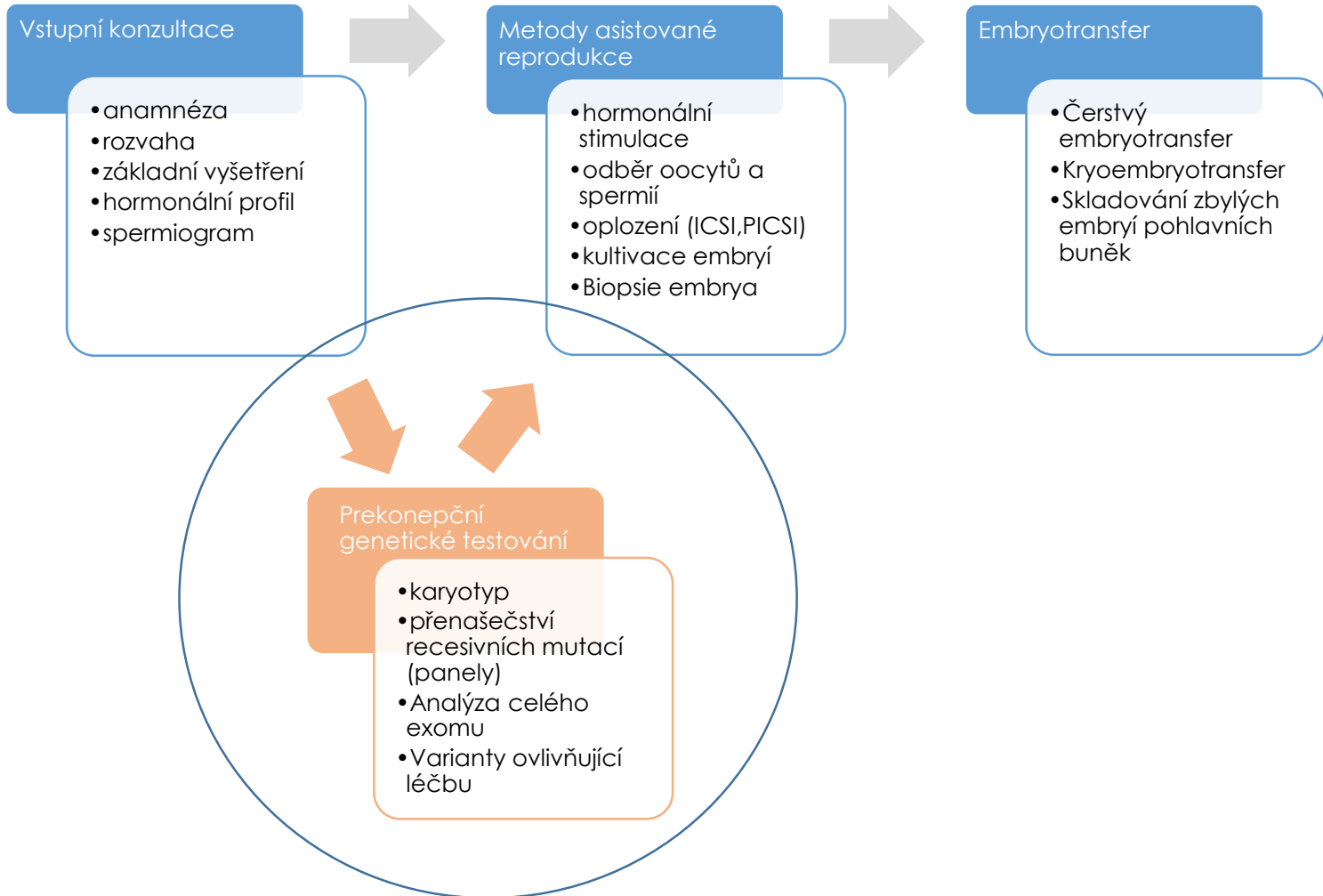
- ❖ Karyotyp
- ❖ Přenašečství  
recesivních mutací  
(panely, exom)

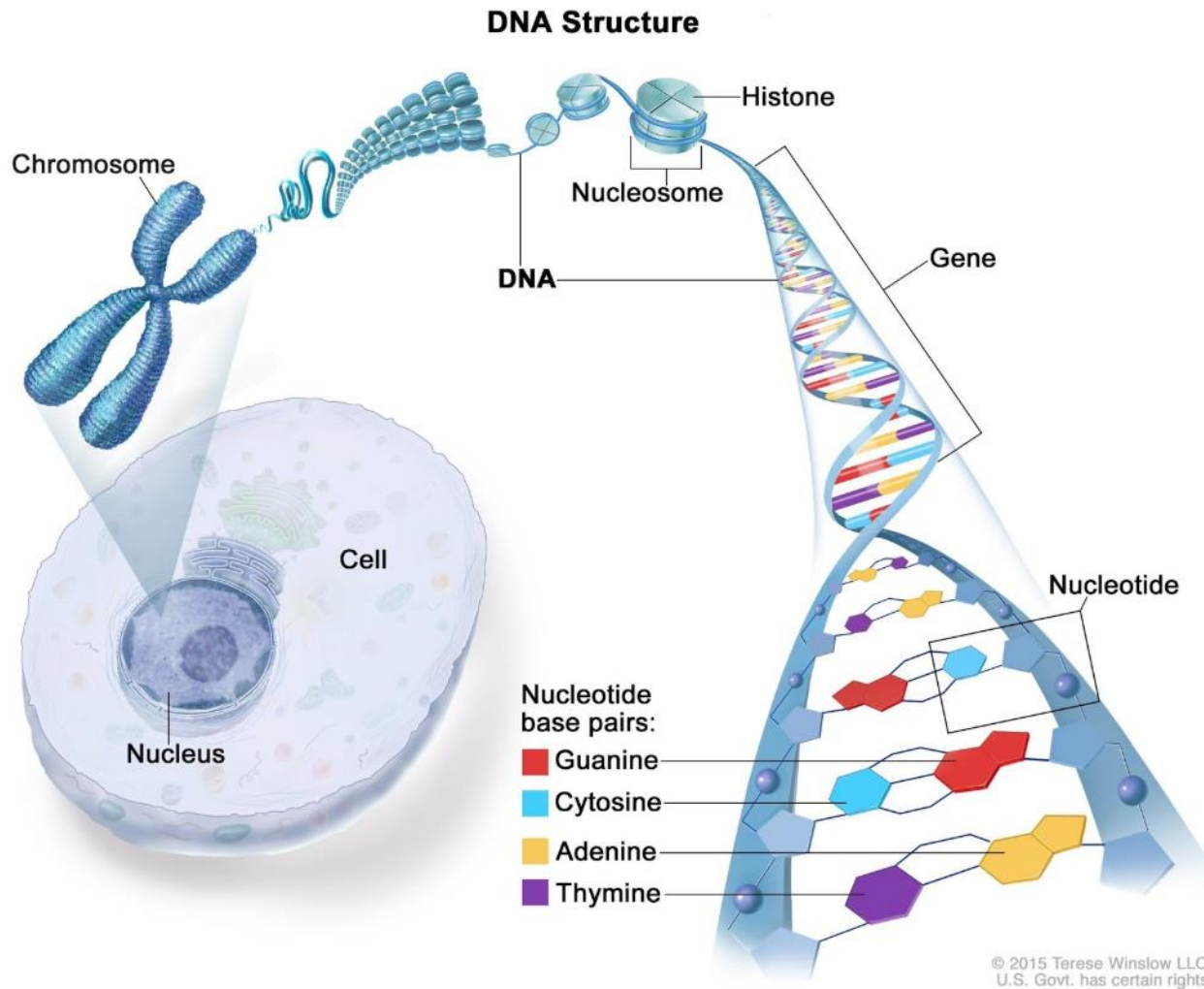
## Preimplantační

- ❖ PGT-A
- ❖ PGT-SR
- ❖ PGT-M



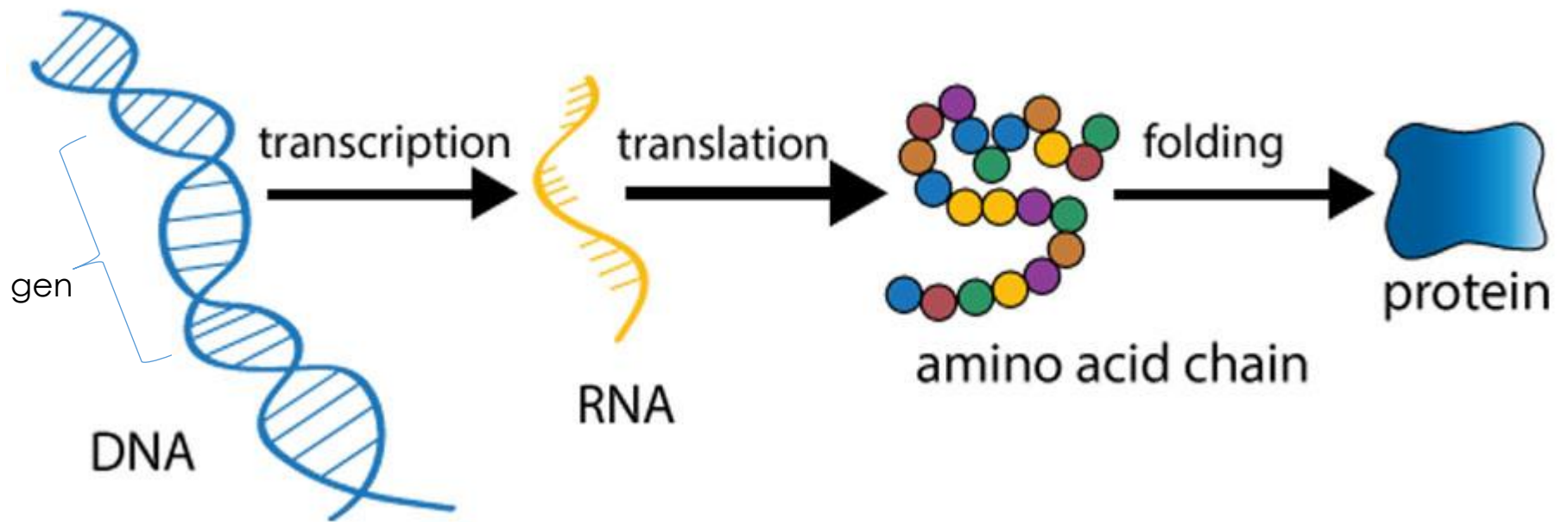
# Prekoncepční testování – Kdy?





- 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

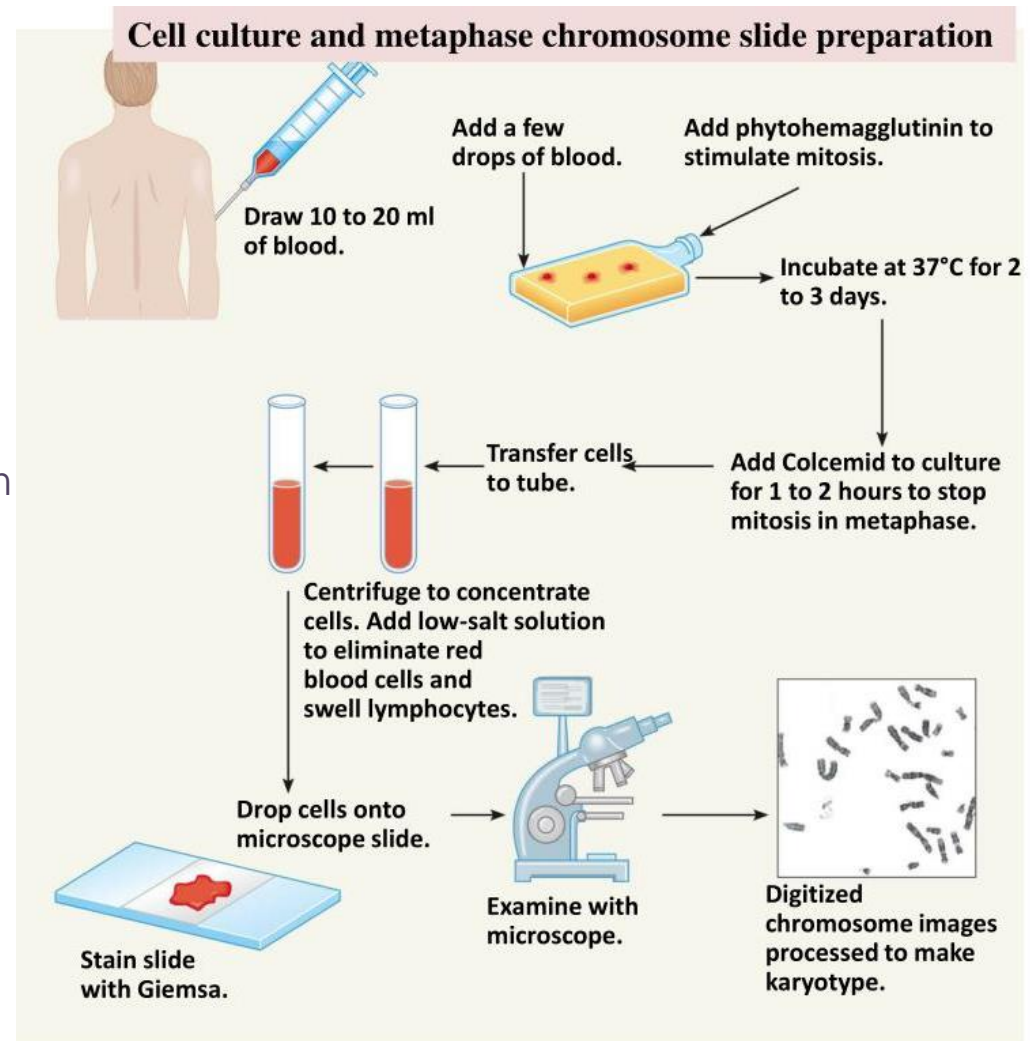
- Na úrovni chromozomů
- Translokace
- Inverze
- Delece/duplikace
- Aneuploidie
- Polyploidie

Genové mutace – molekulární genomika

Genomové mutace – (molekulární) cytogenomika

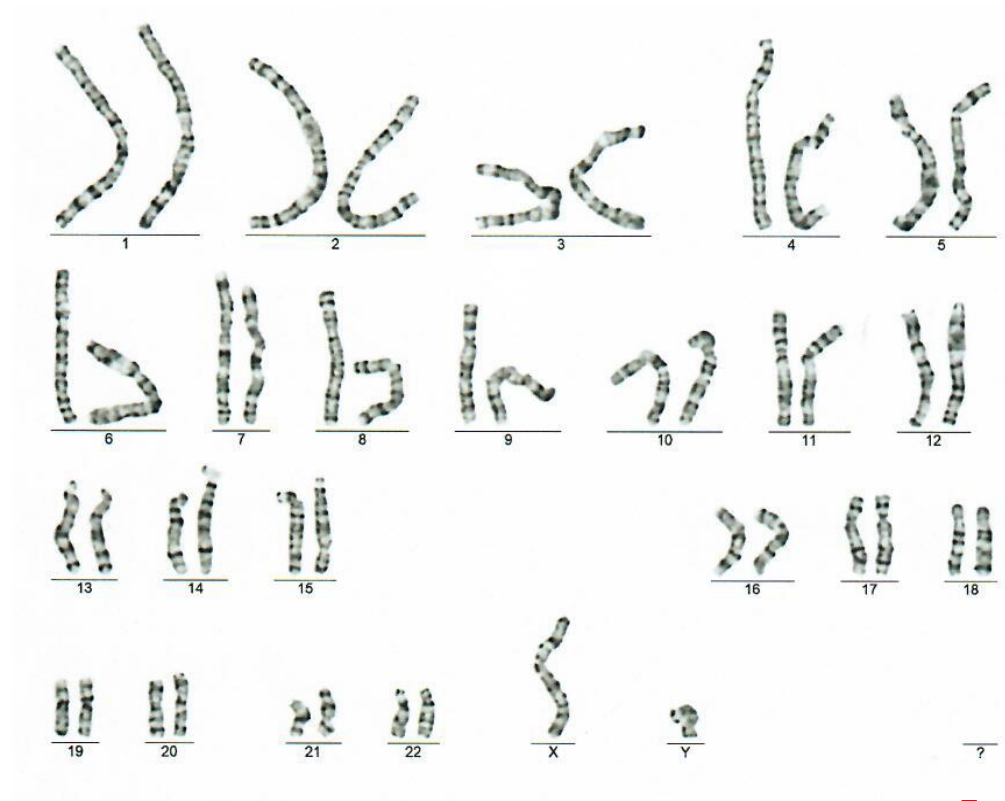
# Prekoncepční testování - karyotyp

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



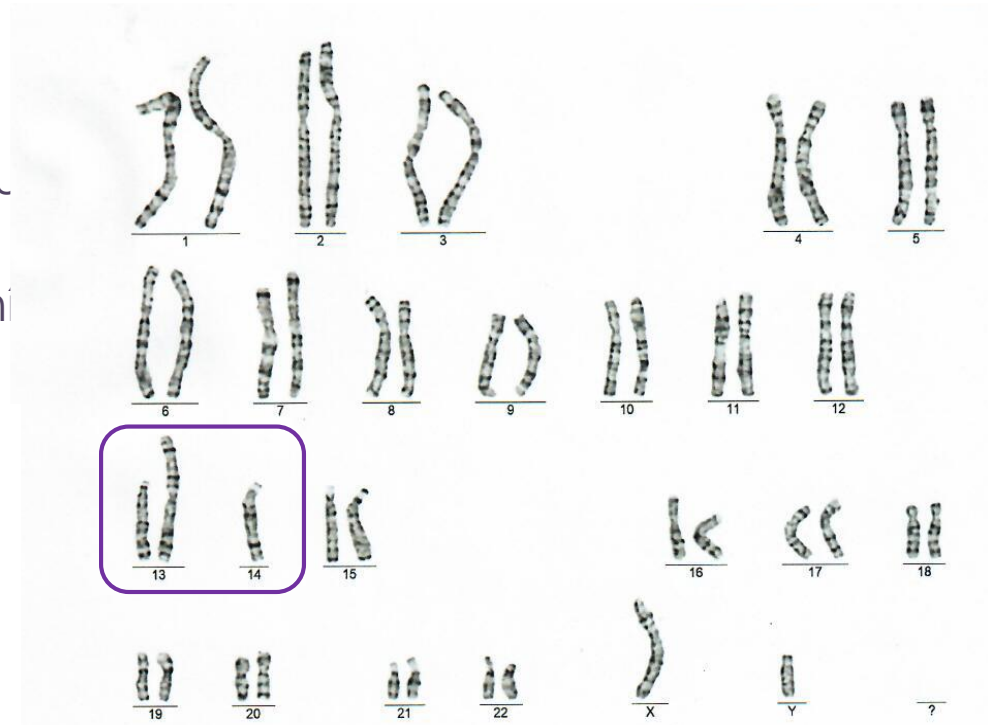
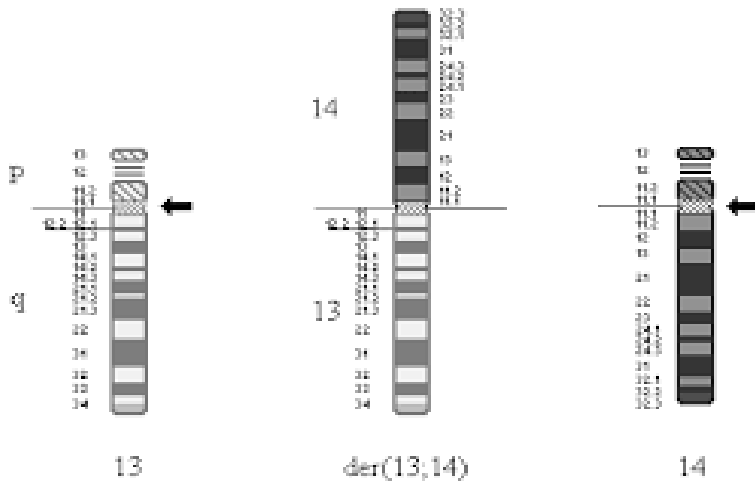
# Prekoncepční testování - karyotyp

- ❖ 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



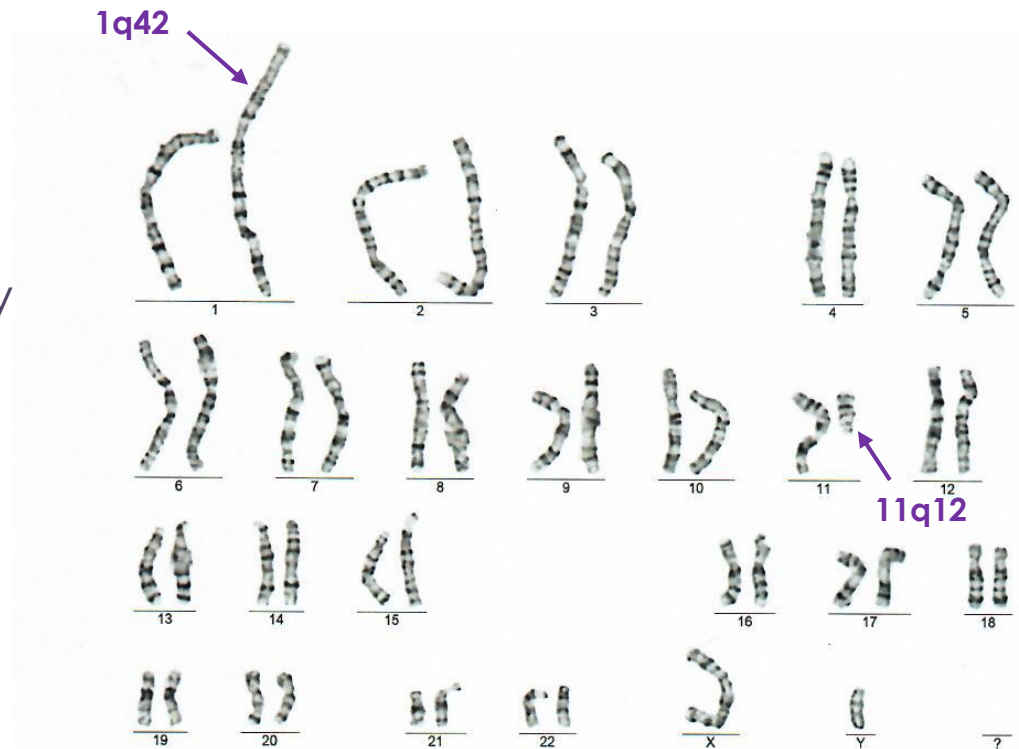
Poloha mitózy: T1-44,3/112,8

**Karyotyp: 45,XY,rob(13;14) (q10;q10) [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)



Poloha mitózy: V1-42,5/100,5

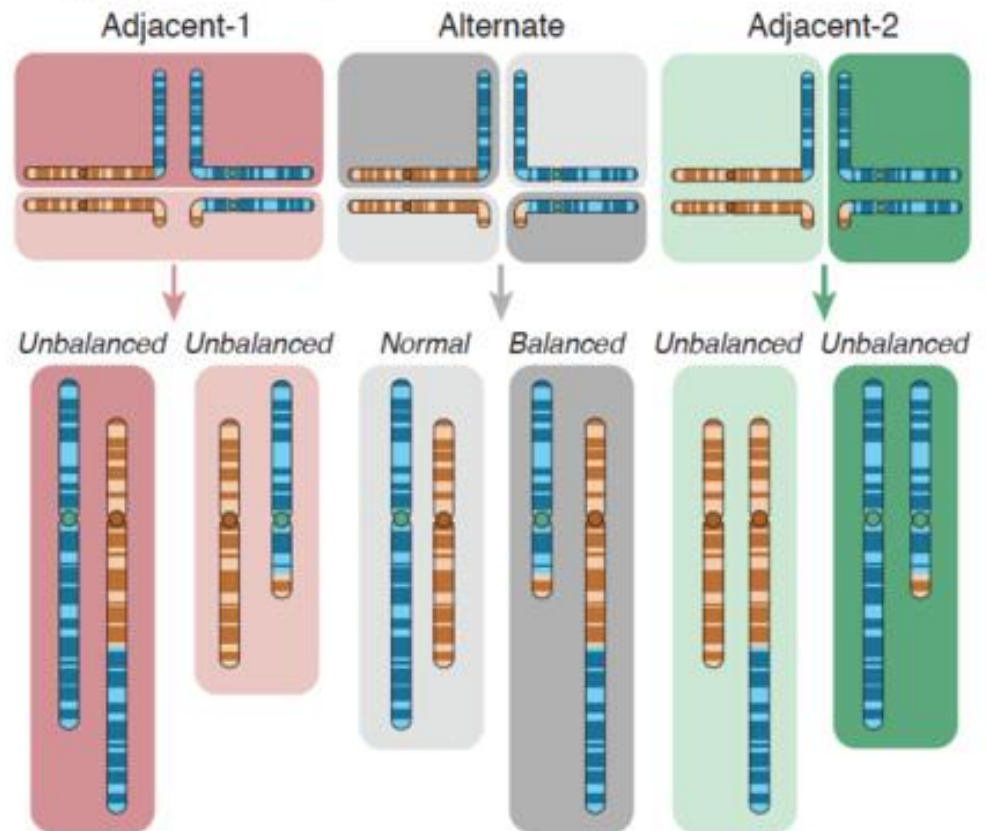
**Karyotyp: 46,XY,t(1;11)(q42;q12) [10]**

Vyšetřeno postupem dle SOP 00453; Hodnoceno dle ISCN 2016

# Karyotyp – reciproká translokace

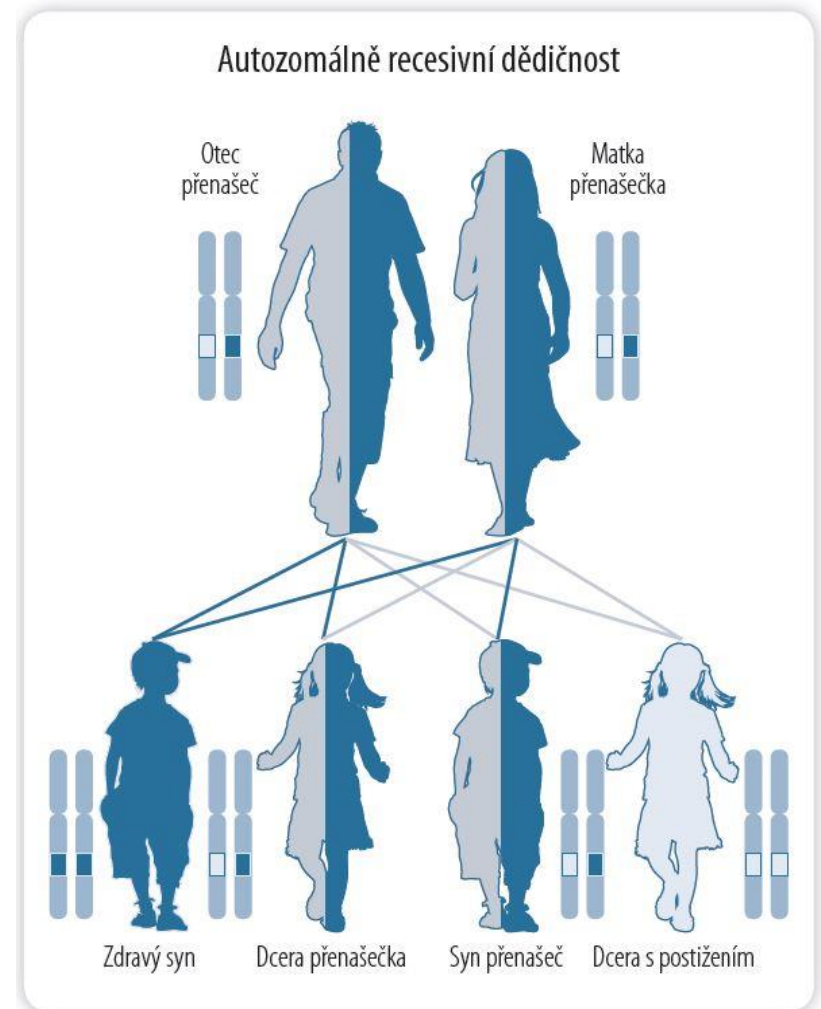
- ❖ Reciproká výměna dvou telomerických částí chromozomů
- ❖ Jedinec většinou beze změny fenotypu (možnost vzniku fúzních genů)
- ❖ Snížená fertilita: nepravidelné rozchody v meiotickém dělení

## C Segregation and gametes



# 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**

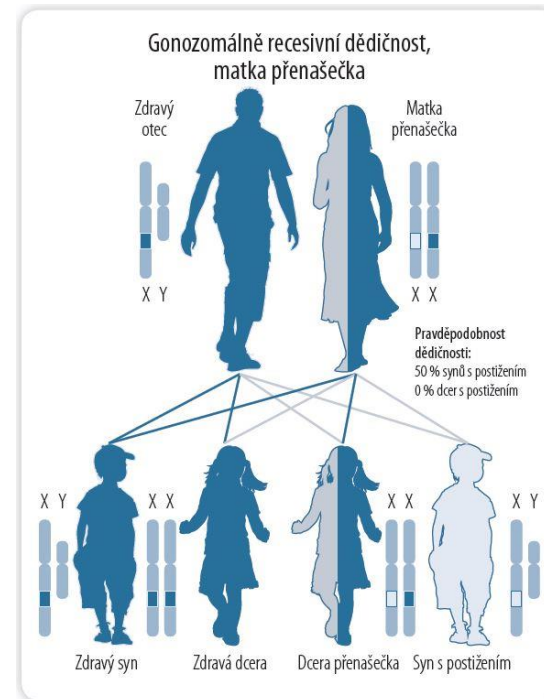
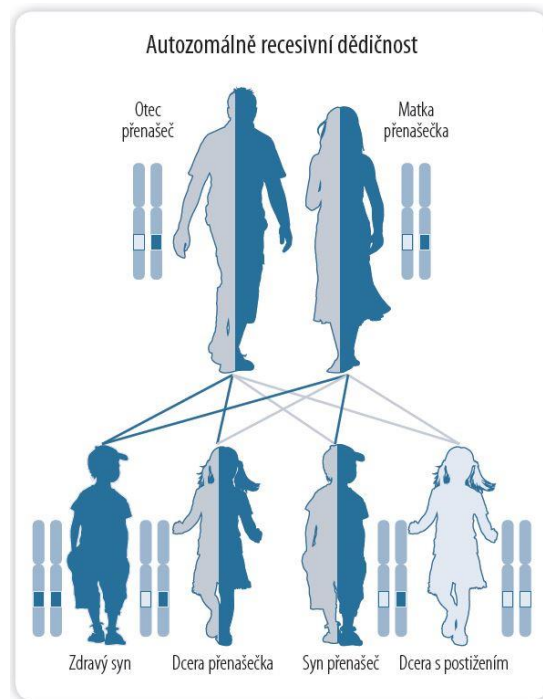


\*Baird, P. A., Anderson, T. W., Newcombe, H. B. & Lowry, R. B. Genetic disorders in children and young adults: a population study. *Am. J. Hum. Genet.* **42**, 677–693 (1988)

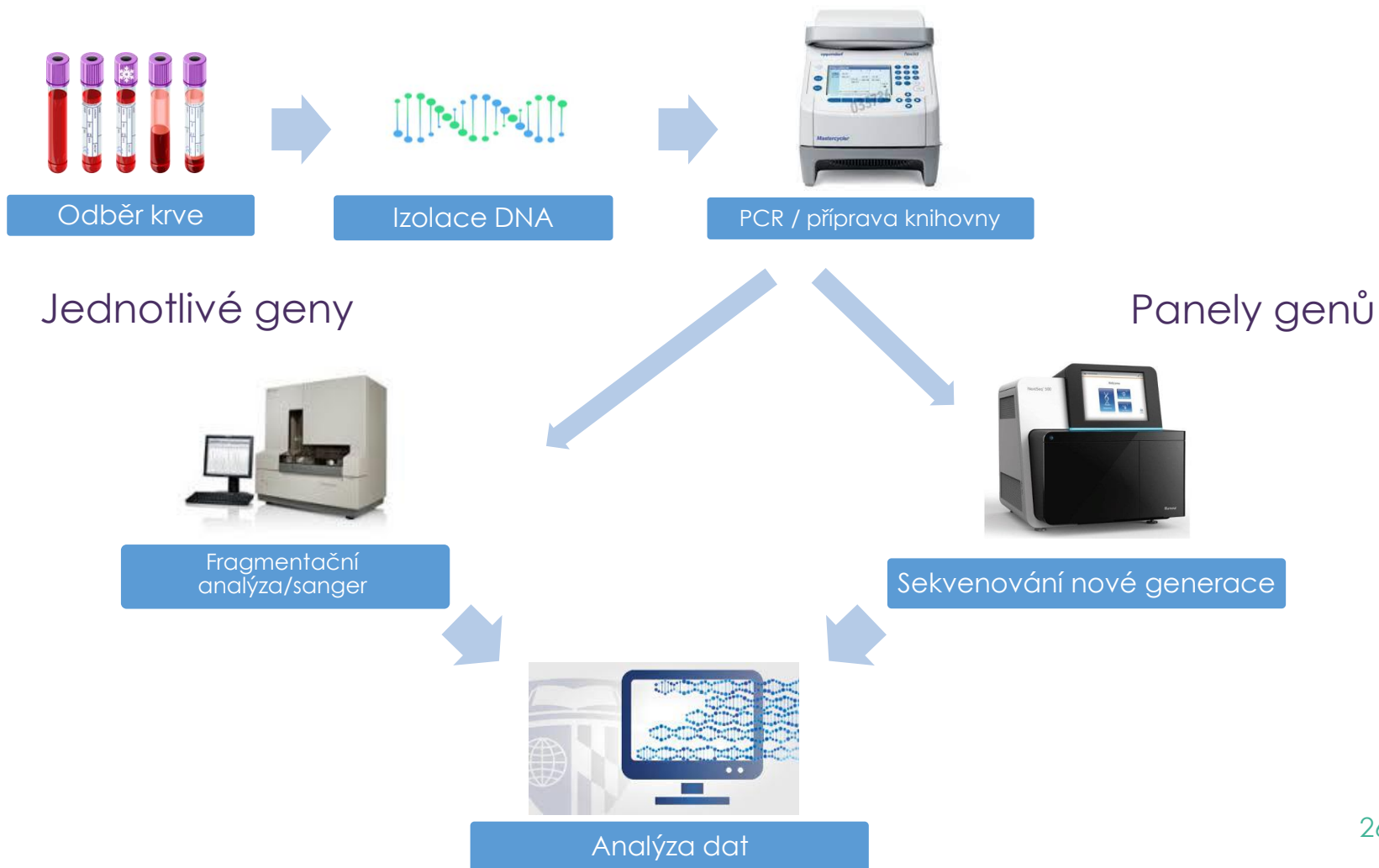


# Rozšířené testování panelu recesivních mutací Carrier panels

- 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

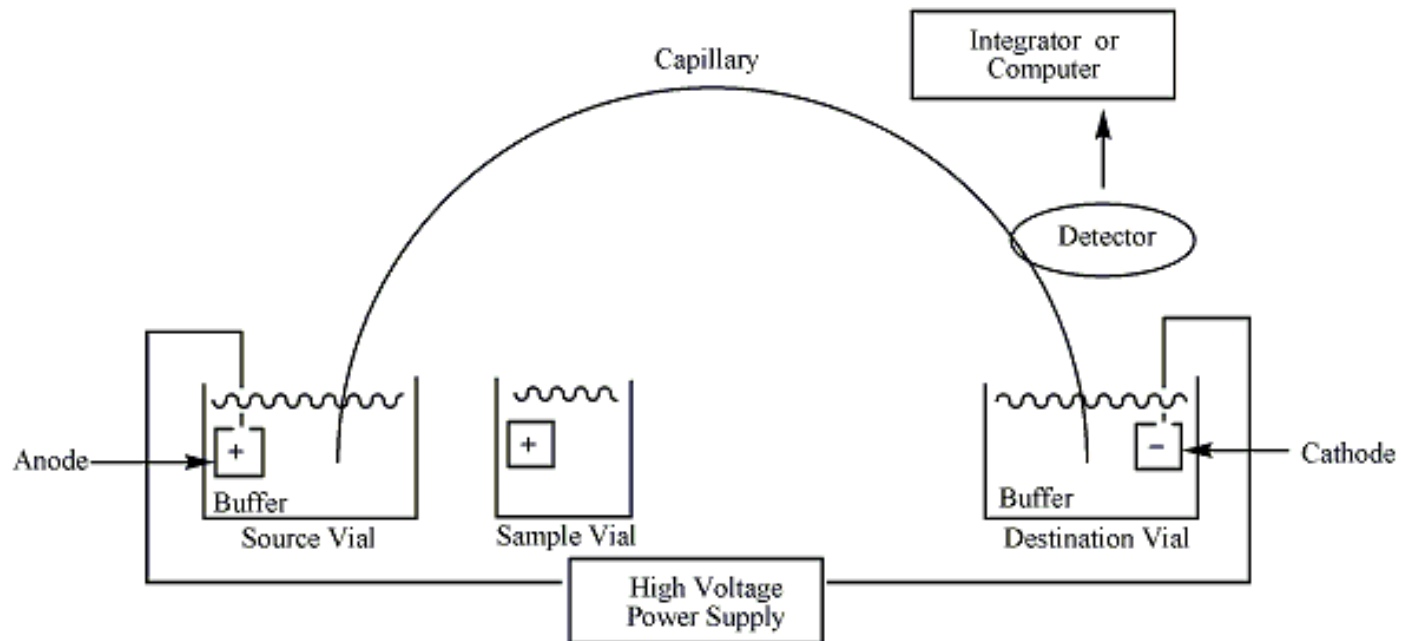


# Molekulární prekoncepční testování - postup



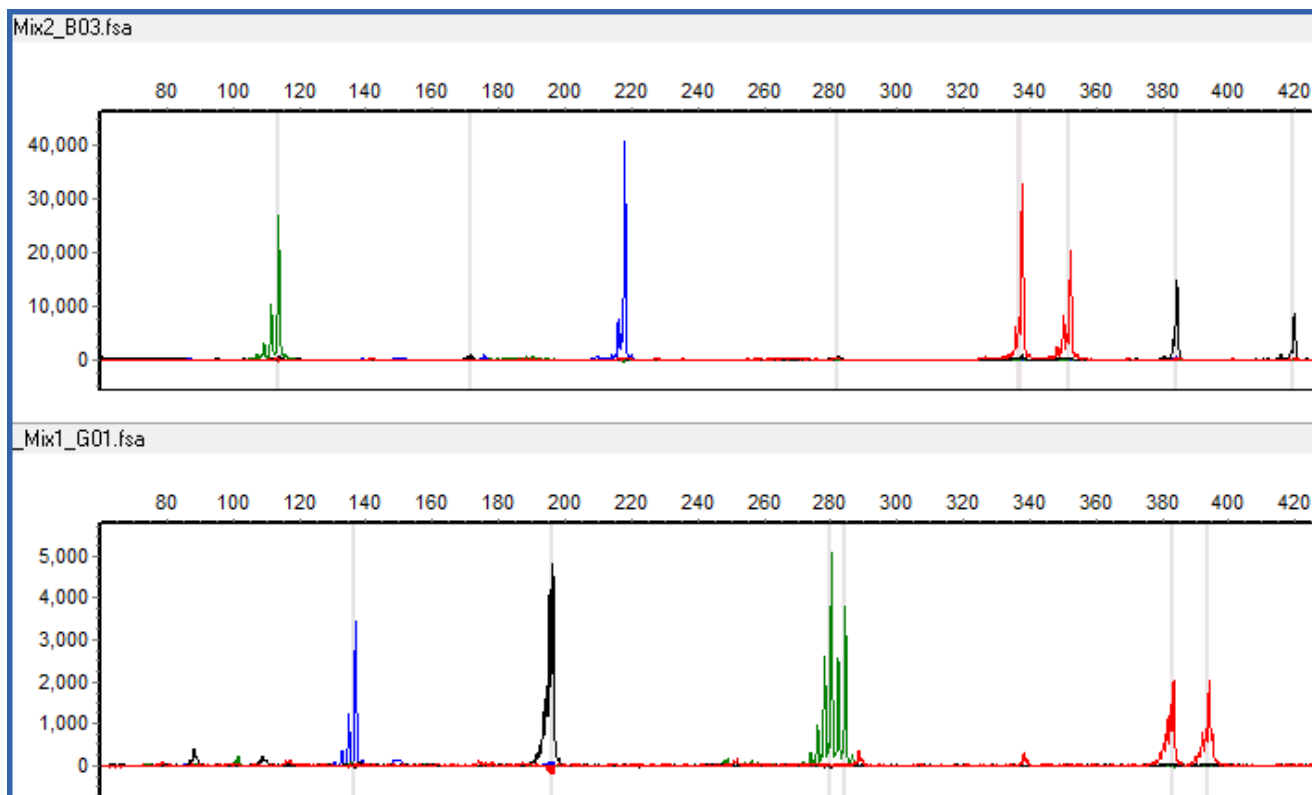
# Vyšetření jednotlivých genů a mutací pomocí kapilárové elektroforézy

- 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



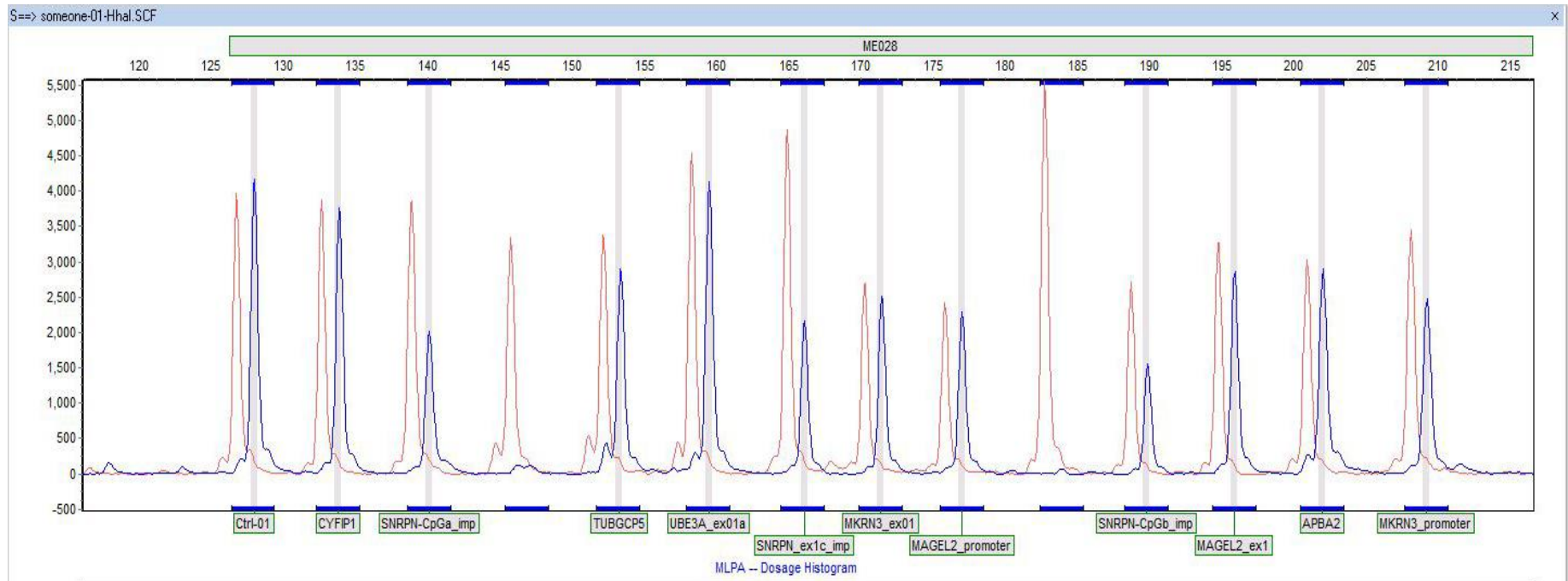
# Vyšetření jednotlivých genů a mutací pomocí kapilárové elektroforézy

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



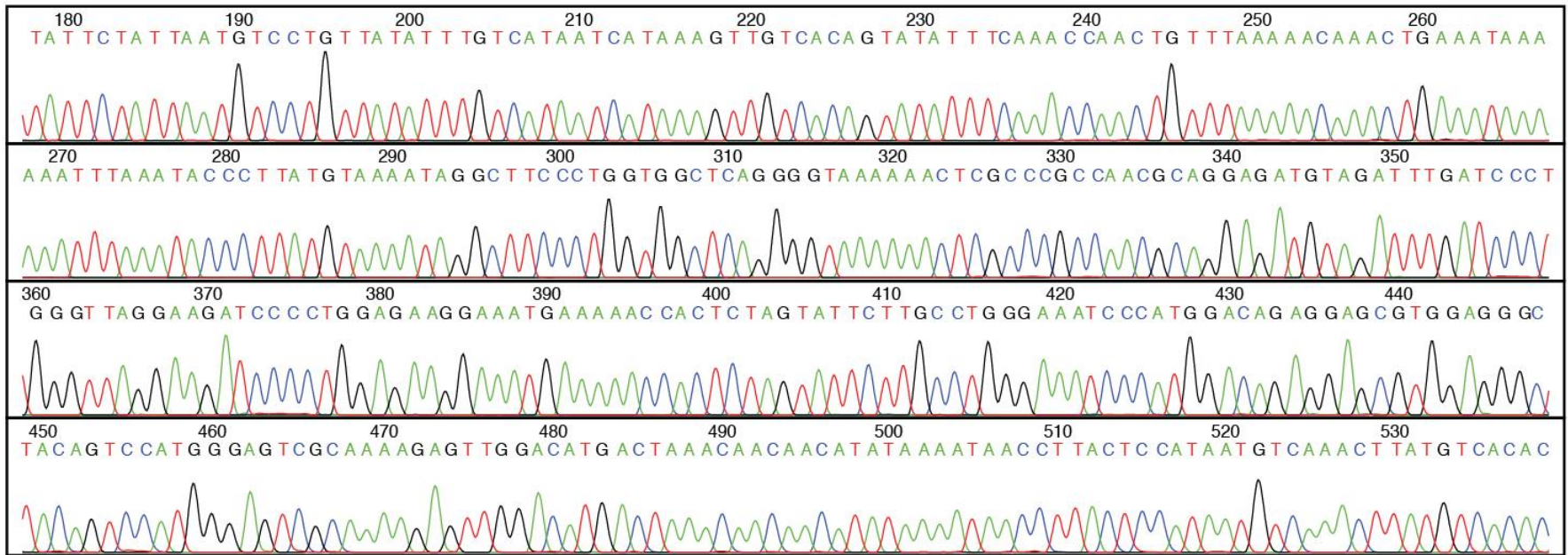
# Vyšetření jednotlivých genů a mutací pomocí kapilárové elektroforózy

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



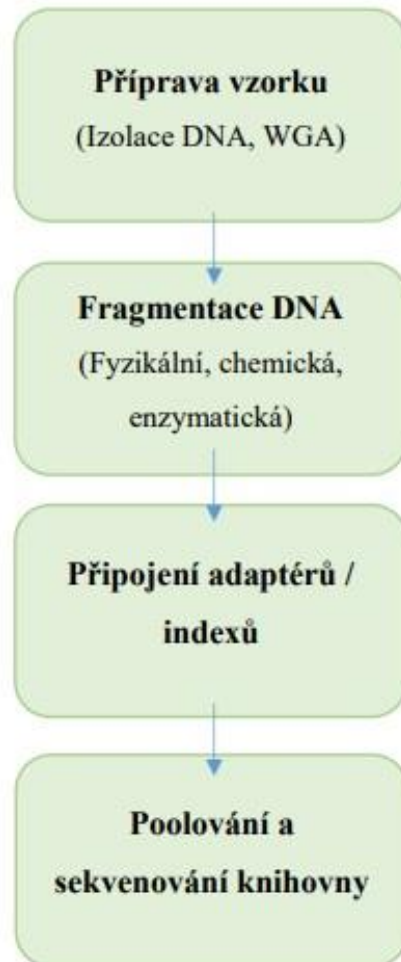
# Vyšetření jednotlivých genů a mutací pomocí kapilárové elektroforézy

- 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.

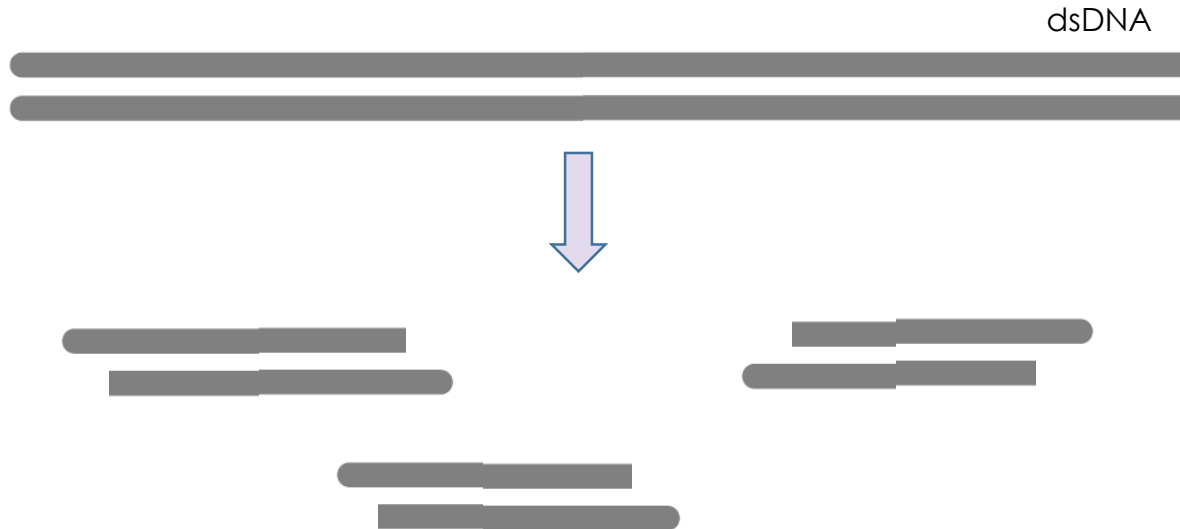
DNA je nejprve fragmentována na požadovanou délku.

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)

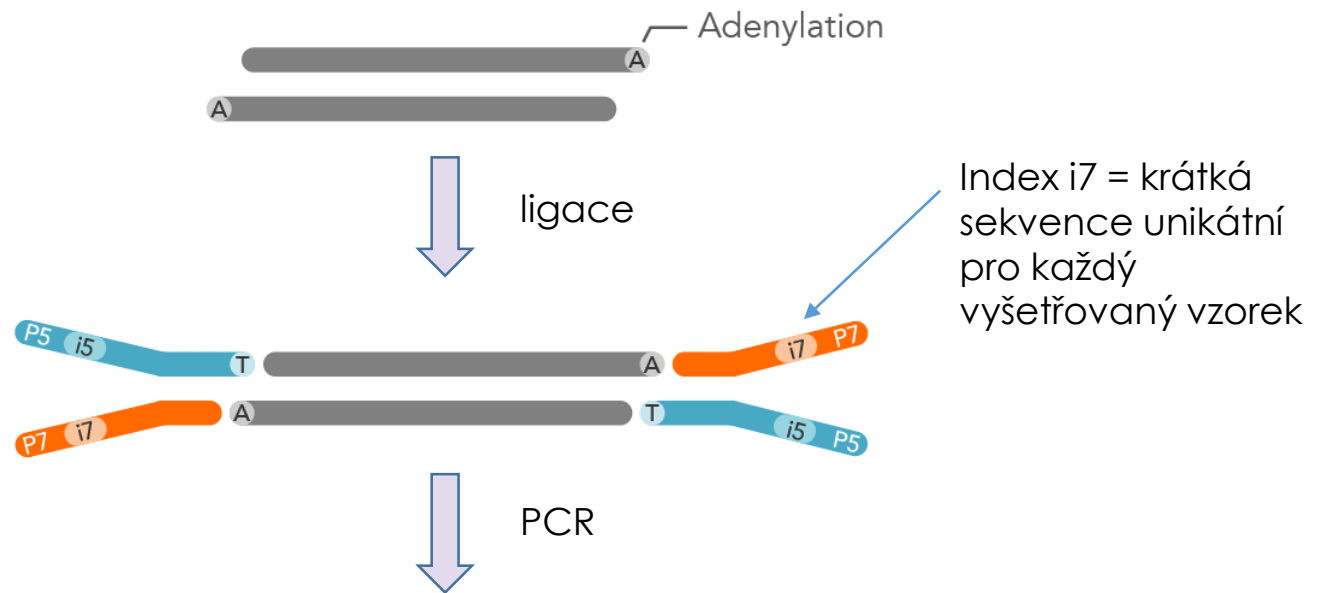
- Fragmentace DNA
  - Enzymatická: transponáza vytváří ds zlomy v DNA
  - Fyzikální: sonikace, nebulizace
  - Chemická: OH\* radikál





# 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)

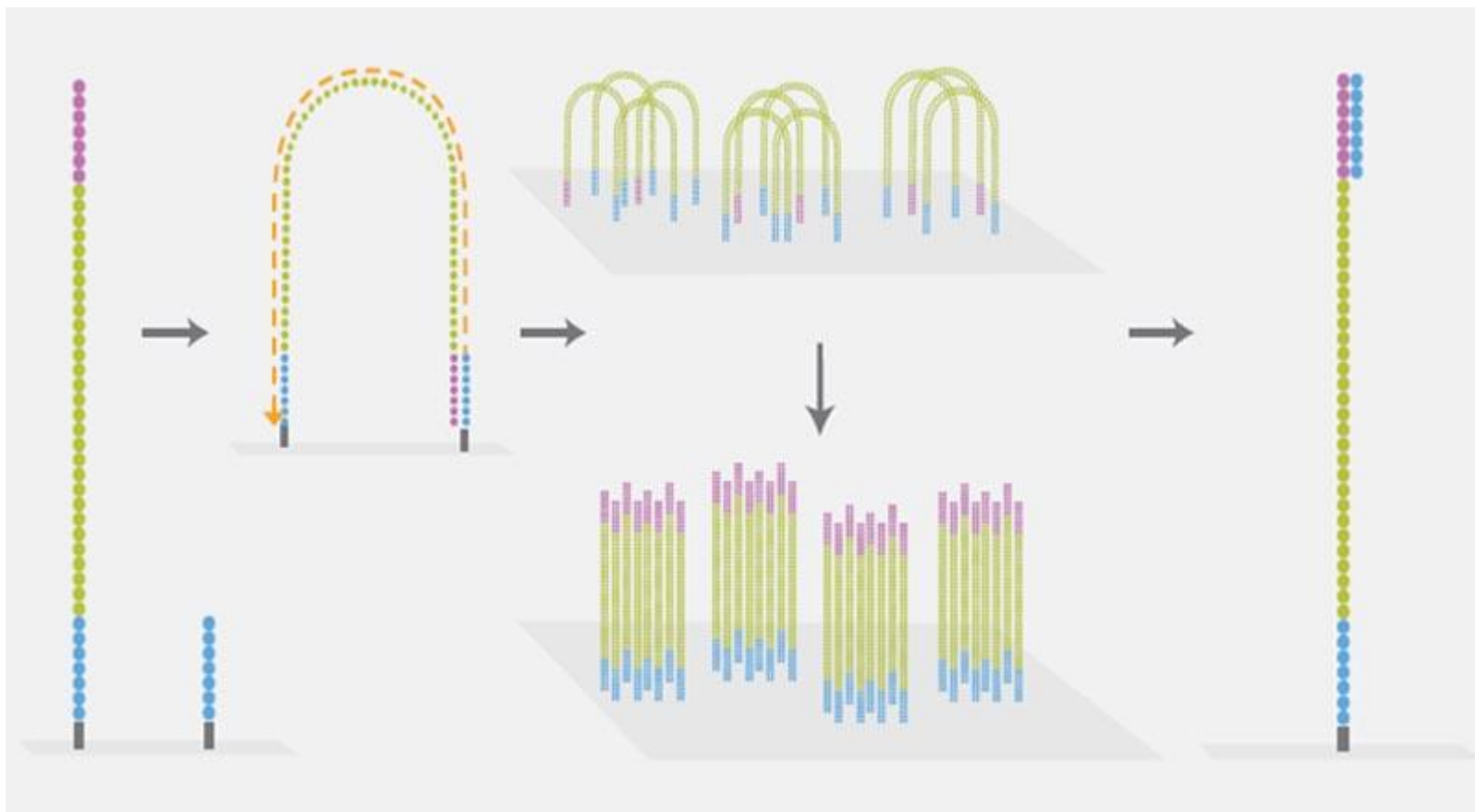
## 1) SBS sekvenování Illumina

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



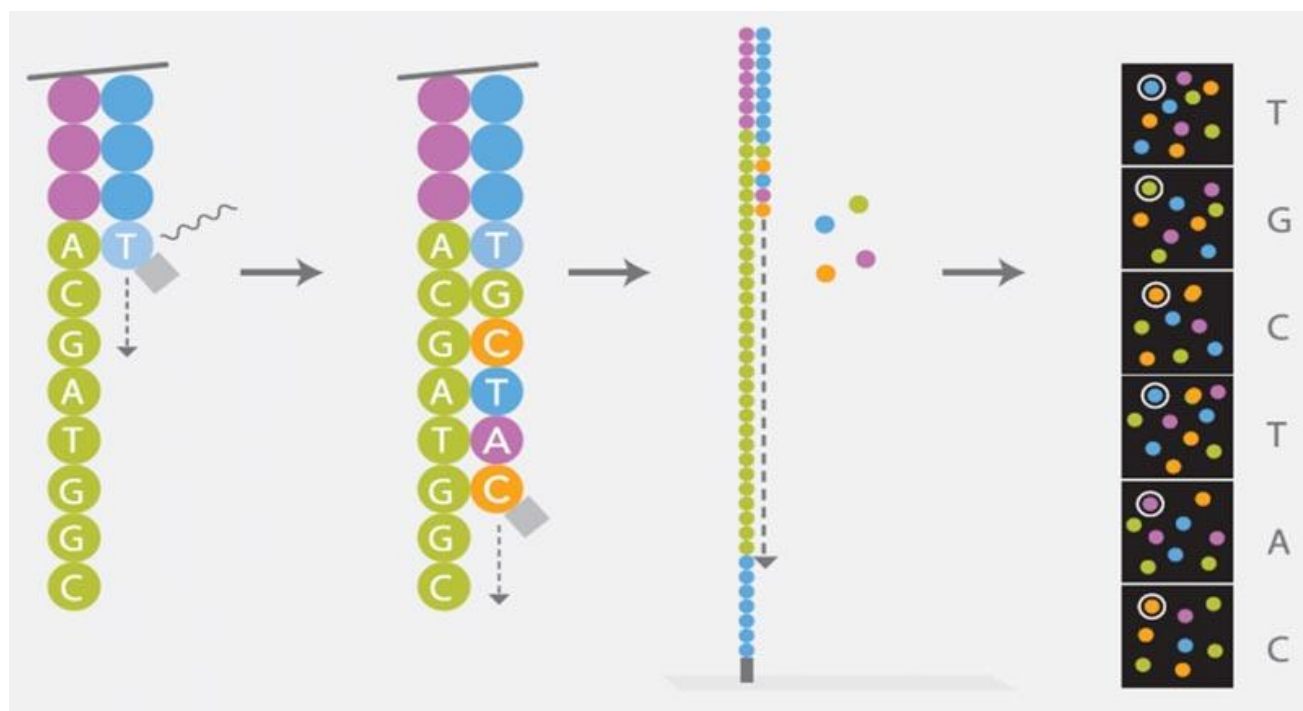
# Next Generation Sequencing (NGS)

- 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:

| <b>Gen:</b>        | <b>Mutace:</b>                     | <b>Referenční sekvence:</b>  | <b>Zygozita:</b>          | <b>Omim:</b> |
|--------------------|------------------------------------|------------------------------|---------------------------|--------------|
| CFTR               | c.1521_1523delCTT<br>(p.Phe508del) | NM_000492.3                  | heterozygot               | *602421      |
| <b>Onemocnění:</b> | <b>Dědičnost:</b>                  | <b>Prevalence přenašečů:</b> | <b>Senzitivita testu:</b> | <b>Omim:</b> |
| Cystická fibróza   | AR                                 | 1:40 (střední Evropa)        | > <a href="#">97%</a>     | #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   |

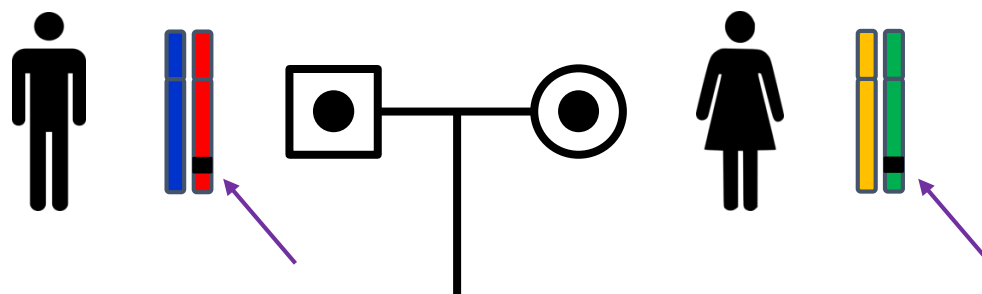


# Prekoncepční testování AR mutací

## 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

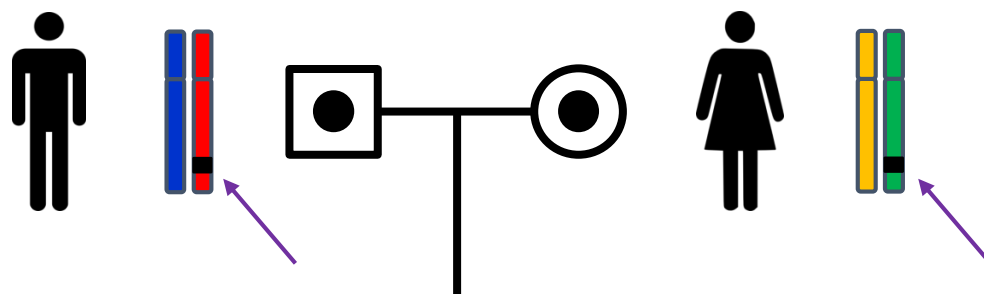
**Závěr: riziko narození potomka s cystickou fibrózou 25 %**

# Prekoncepční testování AR mutací

## Příklad gen CFTR

Partner (přenašeč)

Partnerka (přenašečka)



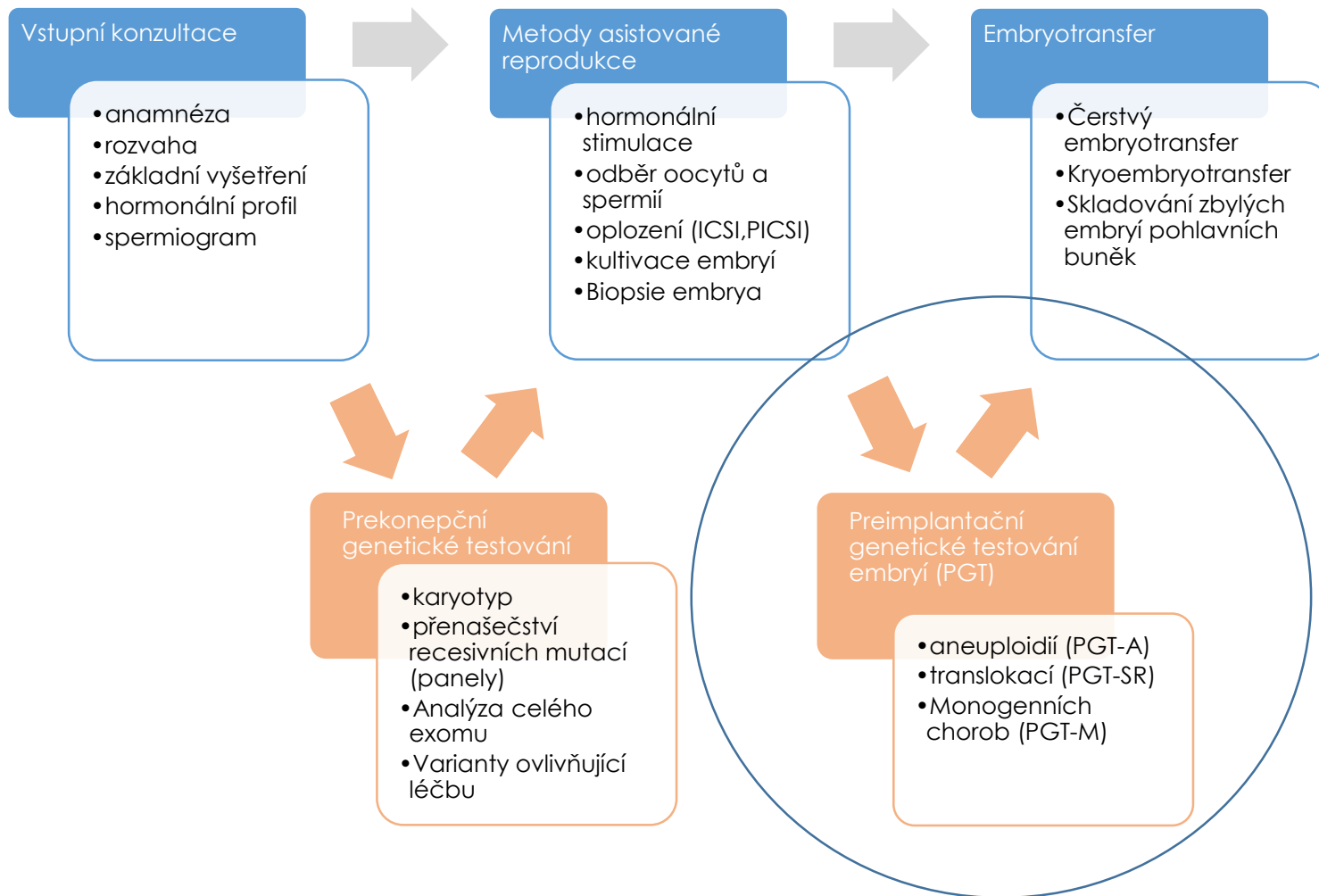
Cíl: prospektivně snížit riziko narození potomka s genetickým onemocněním

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, inzerce
- ❖ **PGT-M** = Preimplantační genetické testování **monogenních chorob**  
genetická zátěž v rodině (dominantní, recesivní X-vázané genetické onemocnění)



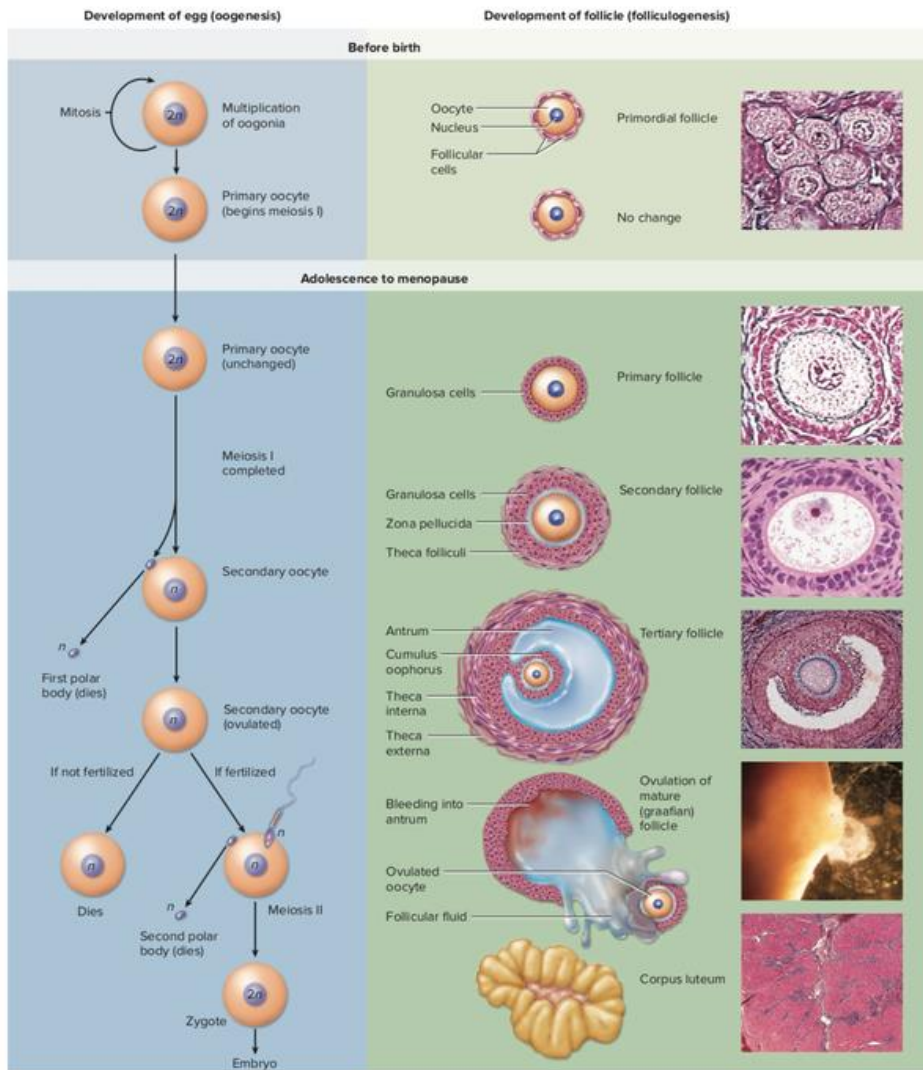
# Preimplantační genetické testování embryí (PGT)

## Indikace

### Dle společnosti lékařské genetiky (SLG):

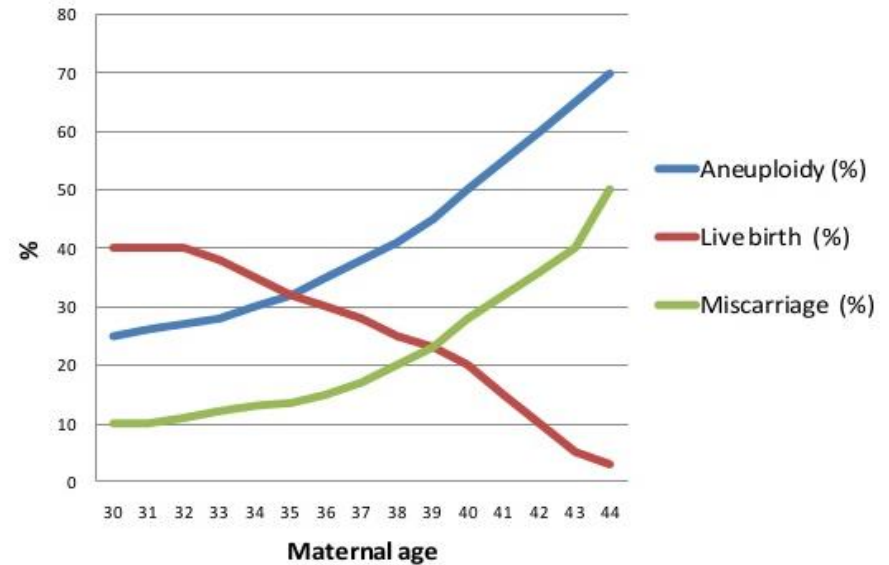
- ❖ 1. Vyšší věk ženy – nad 35 let v době očekávaného porodu
- ❖ 2. Opakované neúspěchy předchozích cyklů asistované reprodukce – min. 2×
- ❖ 3. Opakované potracení po vyloučení ostatních možných příčin – min. 2×
- ❖ 4. Početní gonosomové aberace a malé gonosomové mozaiky detekované z periferní krve – 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

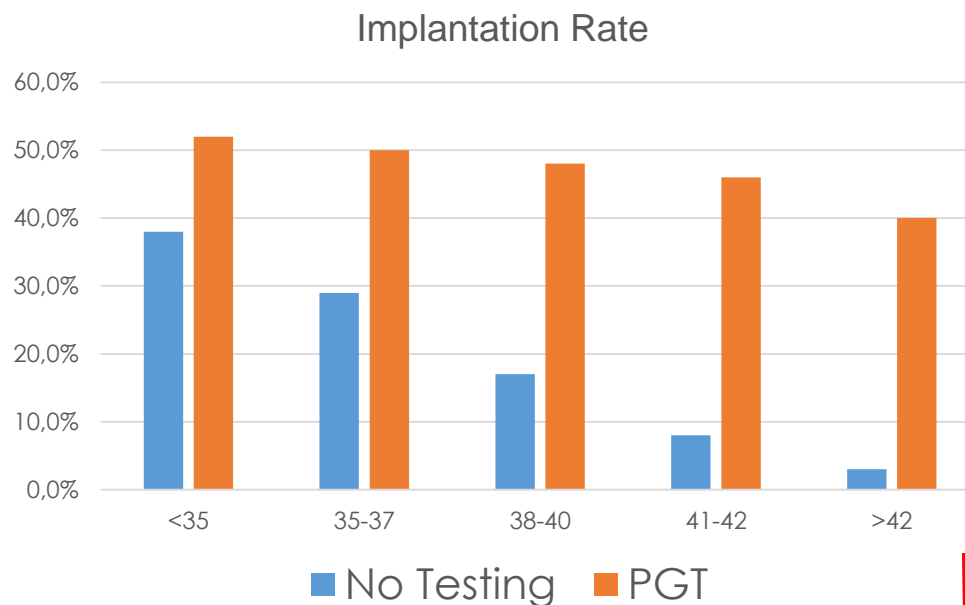
FIGURE 28.11 Oogenesis (Left) and Corresponding Development of the Follicle (Right). AP®  
 (1, 2): © Ed Reschke/Getty Images; (3): McGraw-Hill Education/AI Telsler, photographer; (4): © Ed Reschke/Getty Images; (5): Petit Format/Science Source

# 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

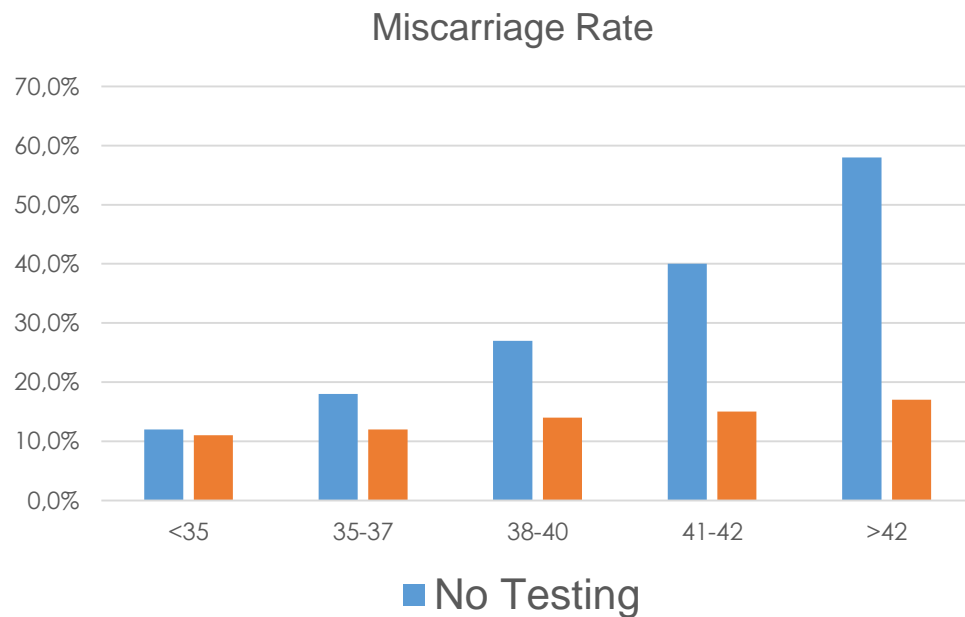


# Preimplantační genetické testování aneuploidií (PGT-A) Proč ?

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

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

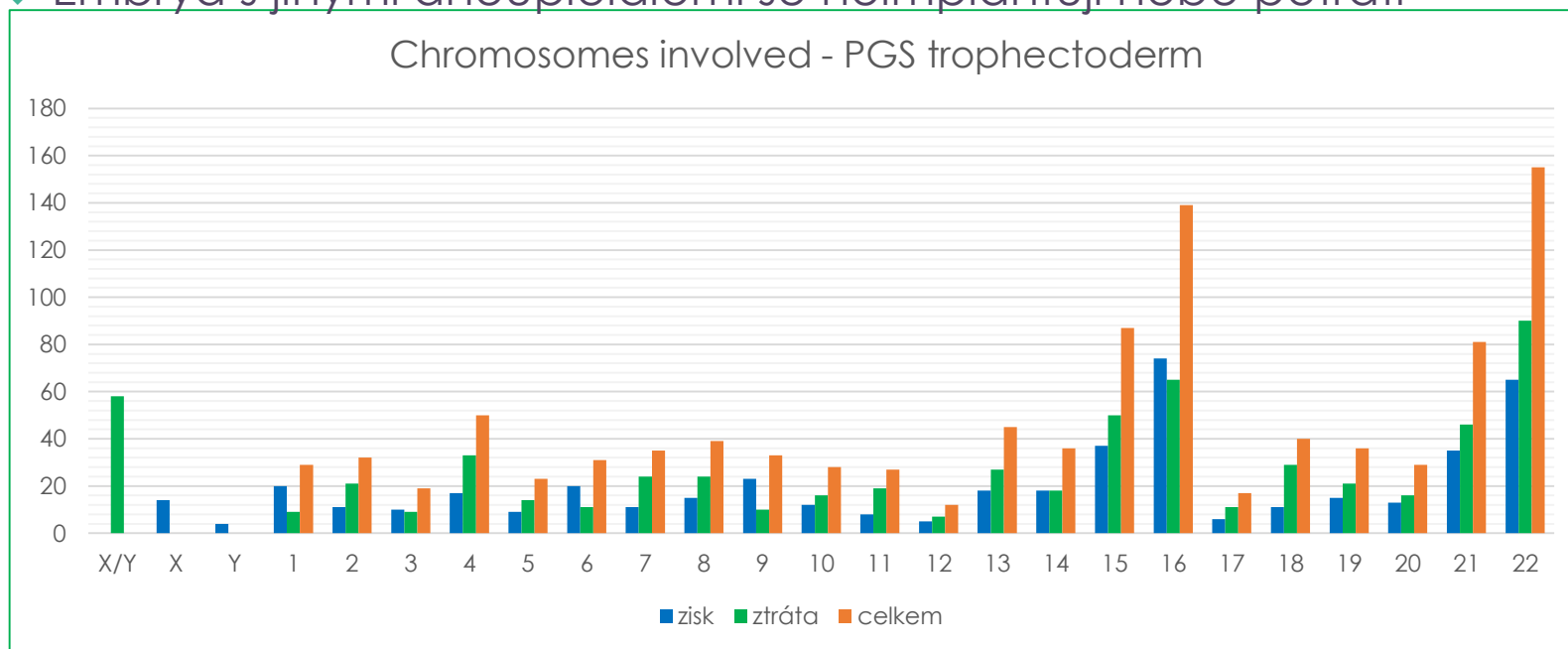
- US CDC/SART Reporting
- Clinical miscarriage rate
- N = 78,357 clinical pregnancies





# 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



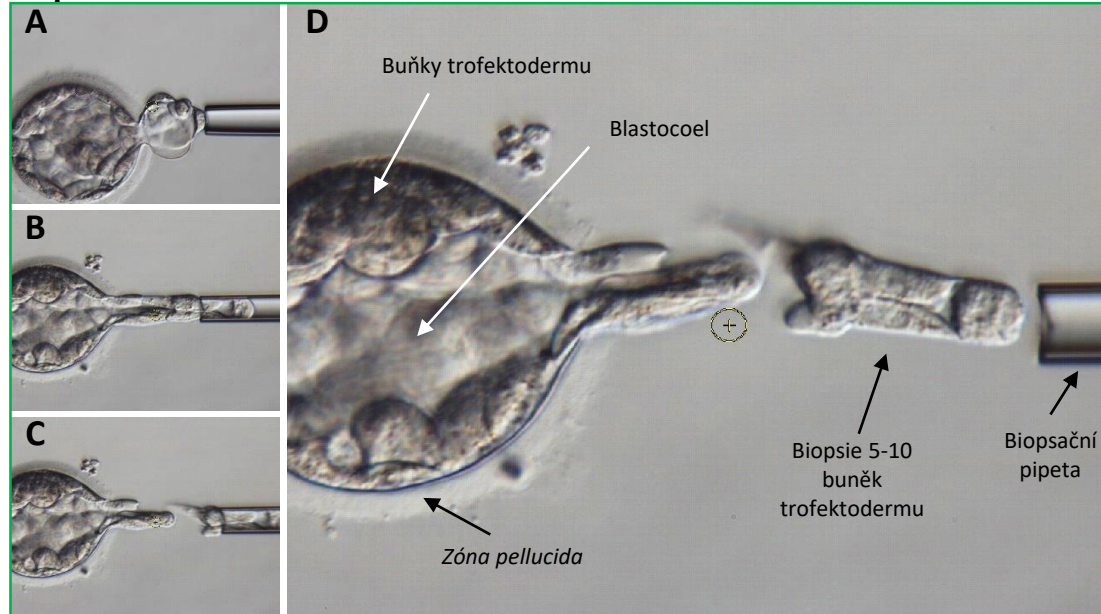
# Preimplantační genetické testování (PGT) Materiál

- ❖ 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

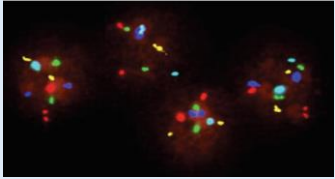


(1) Scott Jr, R.T., Upham, K.M., Forman, E.J., Zhao, T., Treff, N. R., 2013b. Cleavage-stage b

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



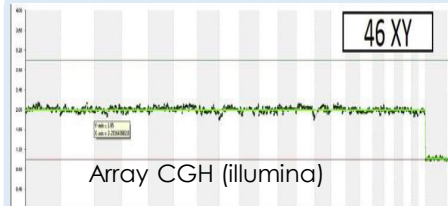
**Fluorescenční In Situ Hybridizace (FISH)**

Biopsie dvou blastomer D3

1995

≤ 12 chromozomů

## PGT-A 2.0

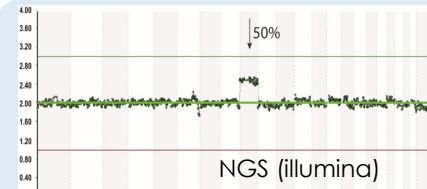


**Array CGH**

Biopsie D5/6 Trofektodermu  
Odložený transfer

2008

## PGT-A 3.0

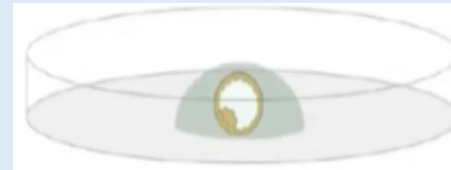


Detekce mozaicismu pomocí NGS

2013

**Sekvenování nové generace (Trofektodermu)**

## Neinvazivní chromozomový screening (NICS)



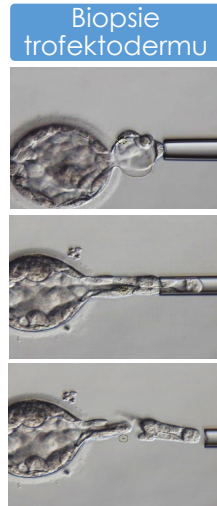
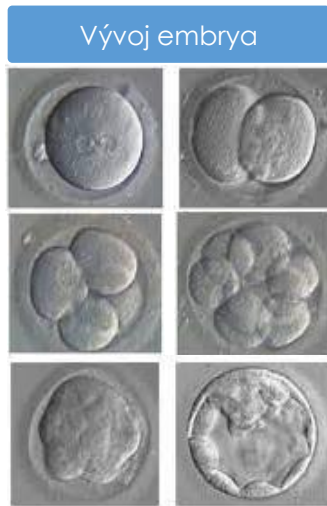
Biopsie kultivačního média

2019

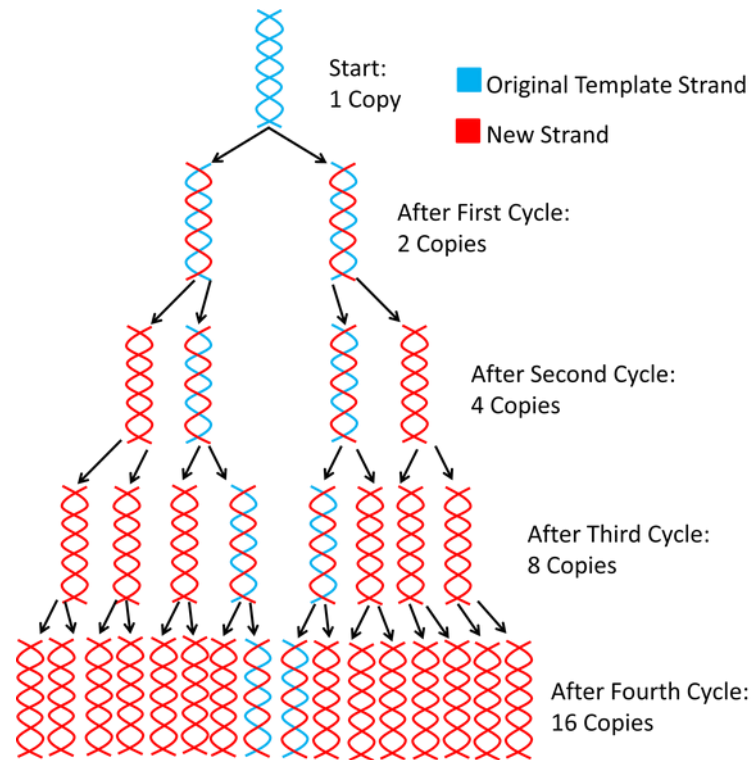
**Sekvenování nové generace (biopsie kultivačního média)**

24 chromozomů

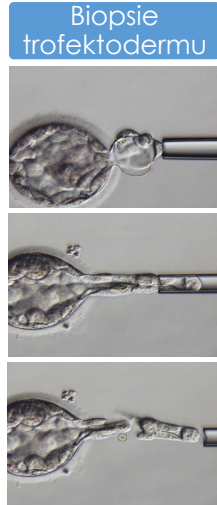
# Preimplantační genetické testování aneuploidií (PGT-A) Jak?



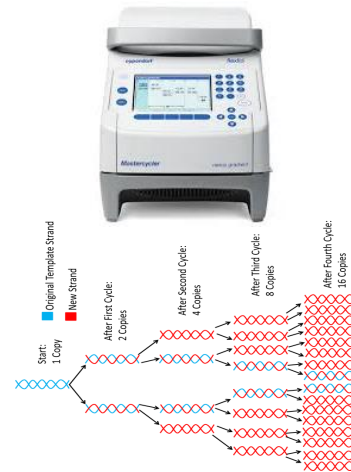
## Celogenomová amplifikace



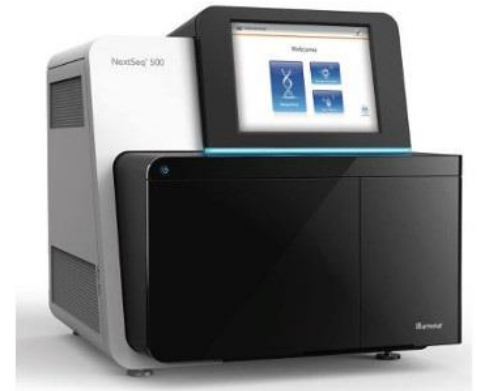
# Preimplantační genetické testování aneuploidií (PGT-A) Jak?



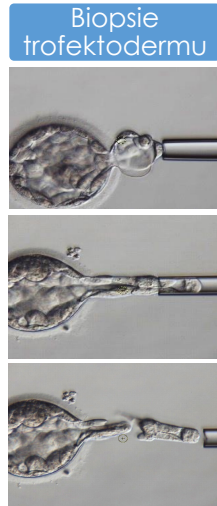
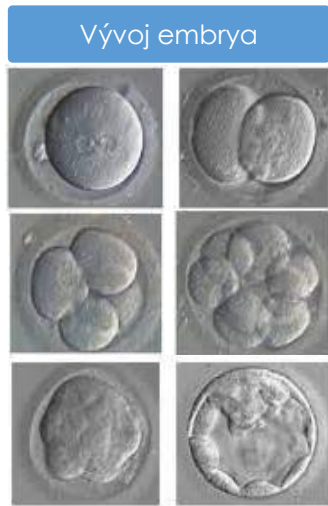
Celogenomová amplifikace



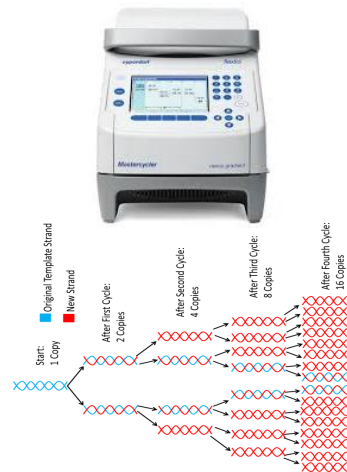
Příprava knihovny / NGS



# Preimplantační genetické testování aneuploidií (PGT-A) Jak?



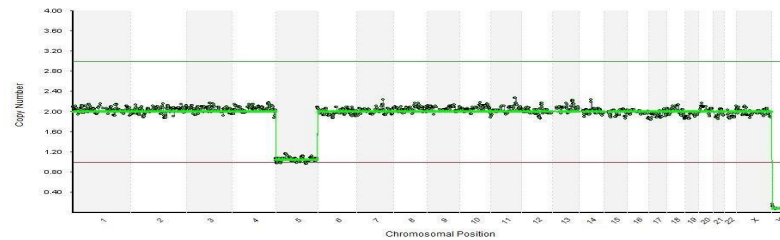
Celogenomová amplifikace



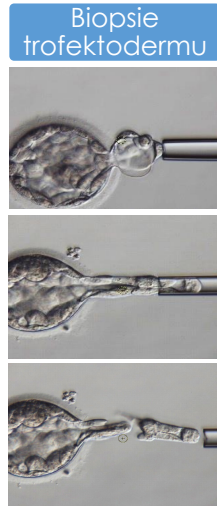
Příprava knihovny/ NGS



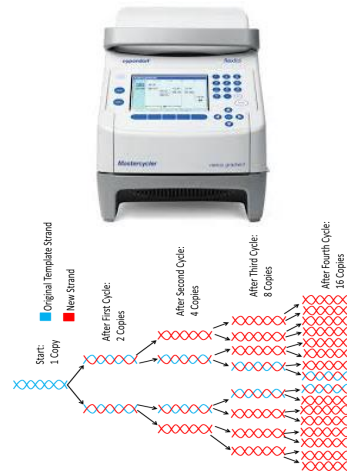
Výběr vhodného embrya / vyhodnocení dat



# Preimplantační genetické testování aneuploidií (PGT-A) Jak?



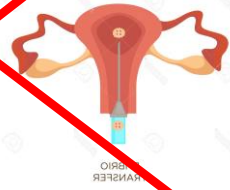
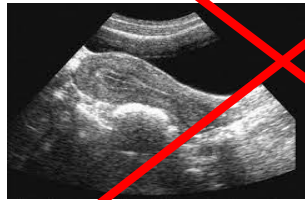
Celogenomová amplifikace



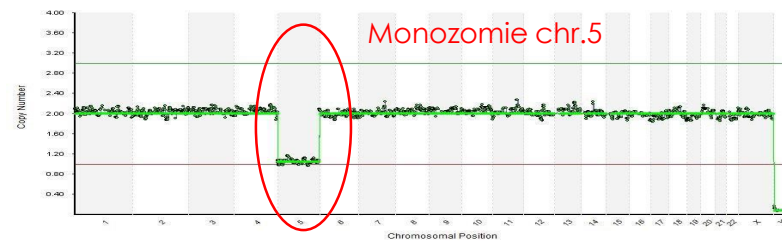
Příprava knihovny/ NGS



~~embryotransfer~~



Výběr vhodného embrya / vyhodnocení dat



# Preimplantační genetické testování aneuploidií (PGT-A) Jak?

## Sekvenace a softwarové hodnocení stručně:

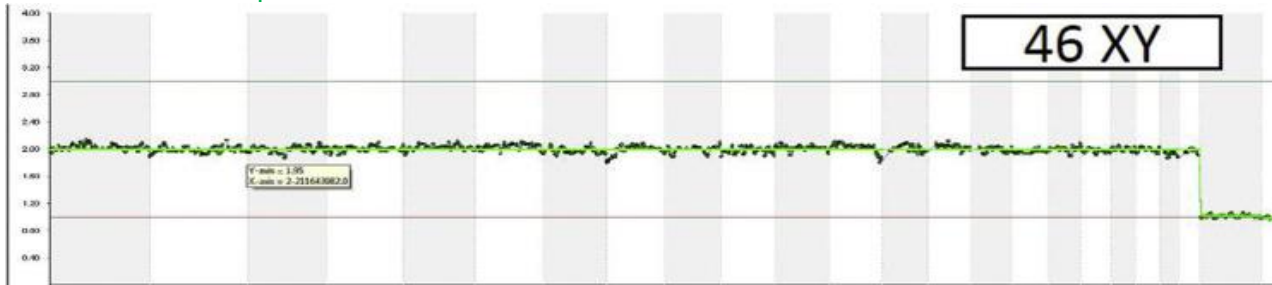
- ❖ Příprava sekvenační knihovny a NGS probíhá obdobně jako u prekoncepčního testování
- ❖ Nezajímají nás sekvence a jednotlivé mutace
- ❖ Zajímají nás pouze pokrytí (kolikrát je osekvenována určitá oblast) na určitou velikostní jednotku genomu (bin)
- ❖ Software zprůměruje pokrytí sekvencí v určité 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)

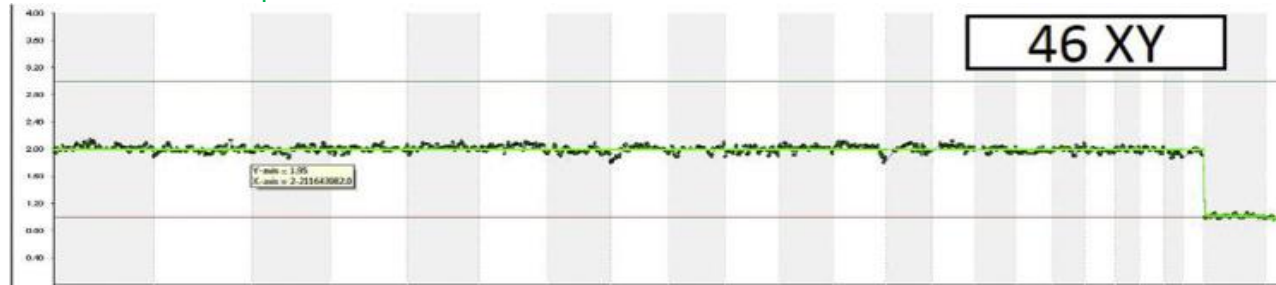
Prioritně doporučeno k transferu

# PGT-A výsledky



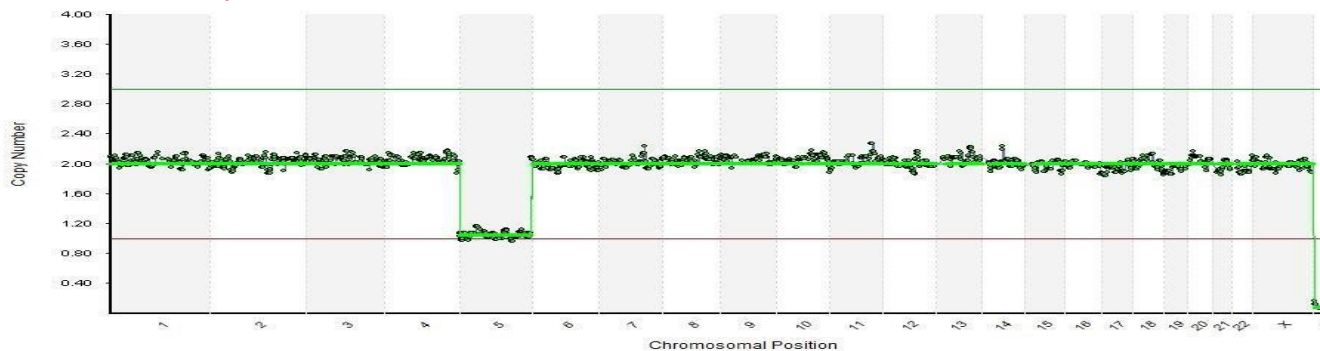
## ❖ Euploidní profil (46, XY)

Prioritně doporučeno k transferu



## ❖ Aneuploidní profil (monozomie chr. 5)

Nedoporučeno k transferu

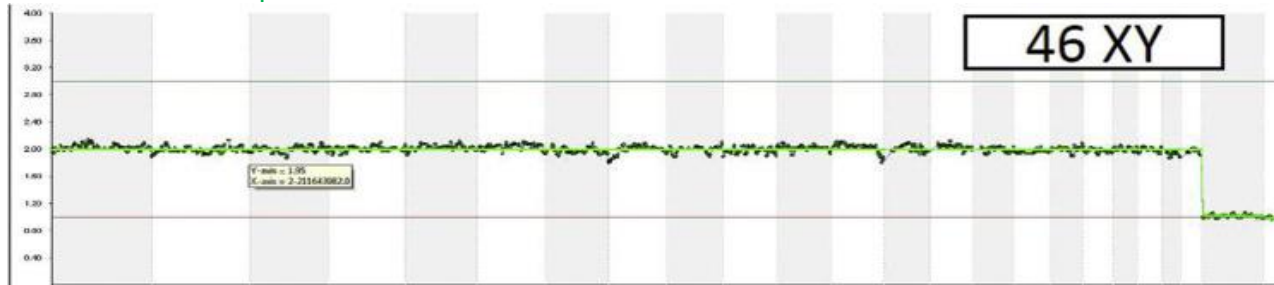


## PGT-A výsledky

## ❖ Euploidní profil (46, XY)

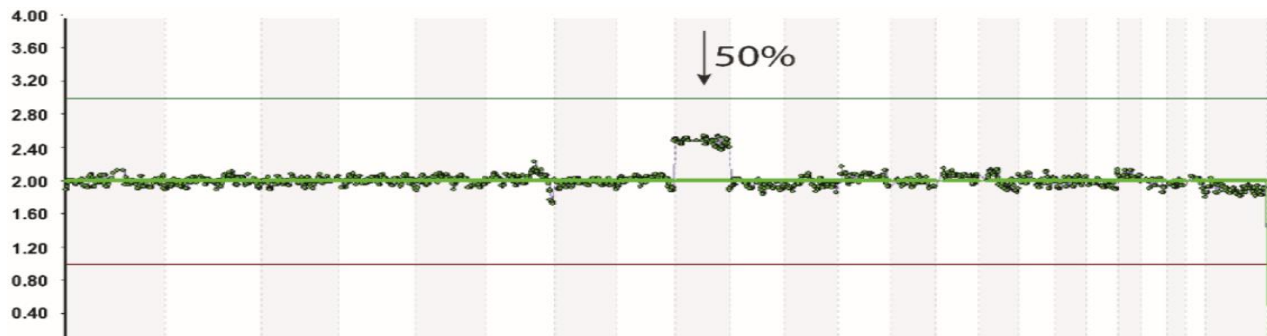
# PGT-A výsledky

Prioritně doporučeno k transferu



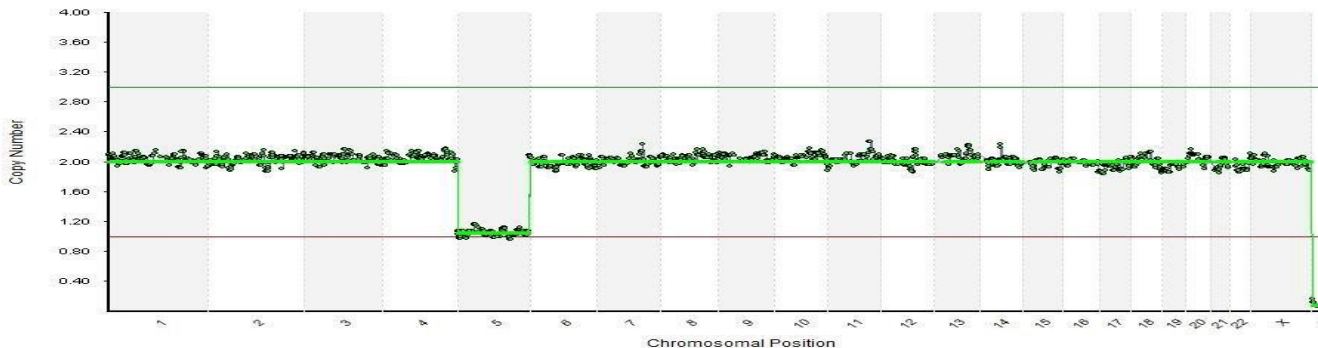
## ❖ Mozacistní profil (50% mozaika trizomie chr. 9)

Doporučeno k transferu po konzultaci s klinickým genetikem

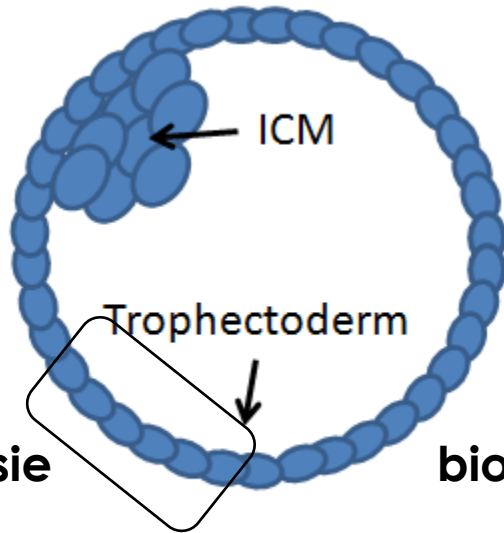


## ❖ Aneuploidní profil (monozomie chr. 5)

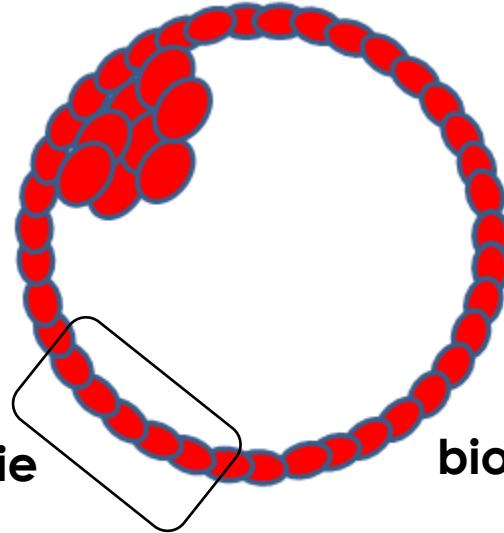
Nedoporučeno k transferu



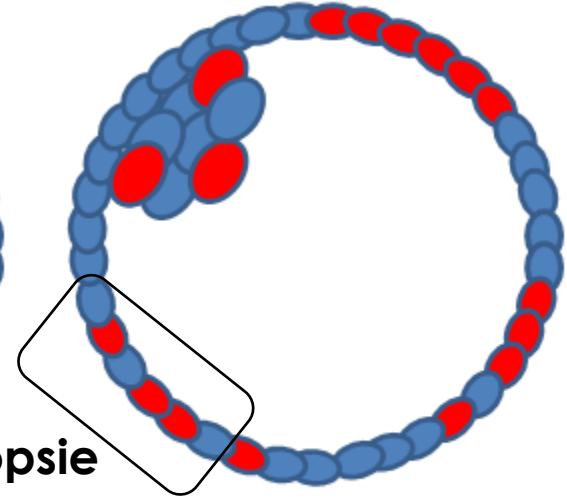
# Euploidní vs Aneuploidní vs Mozacistní



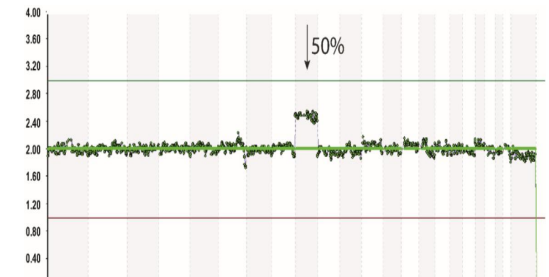
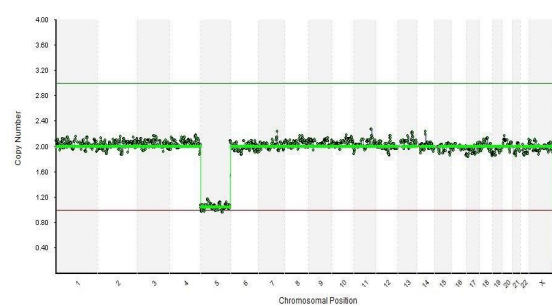
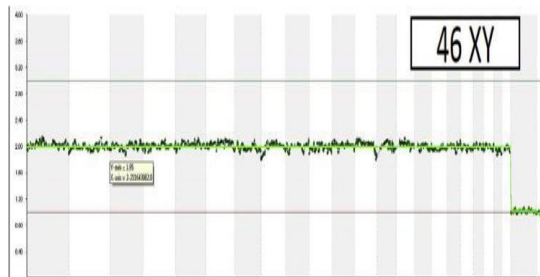
Euploid (all normal cells)



Aneuploid (all abnormal)

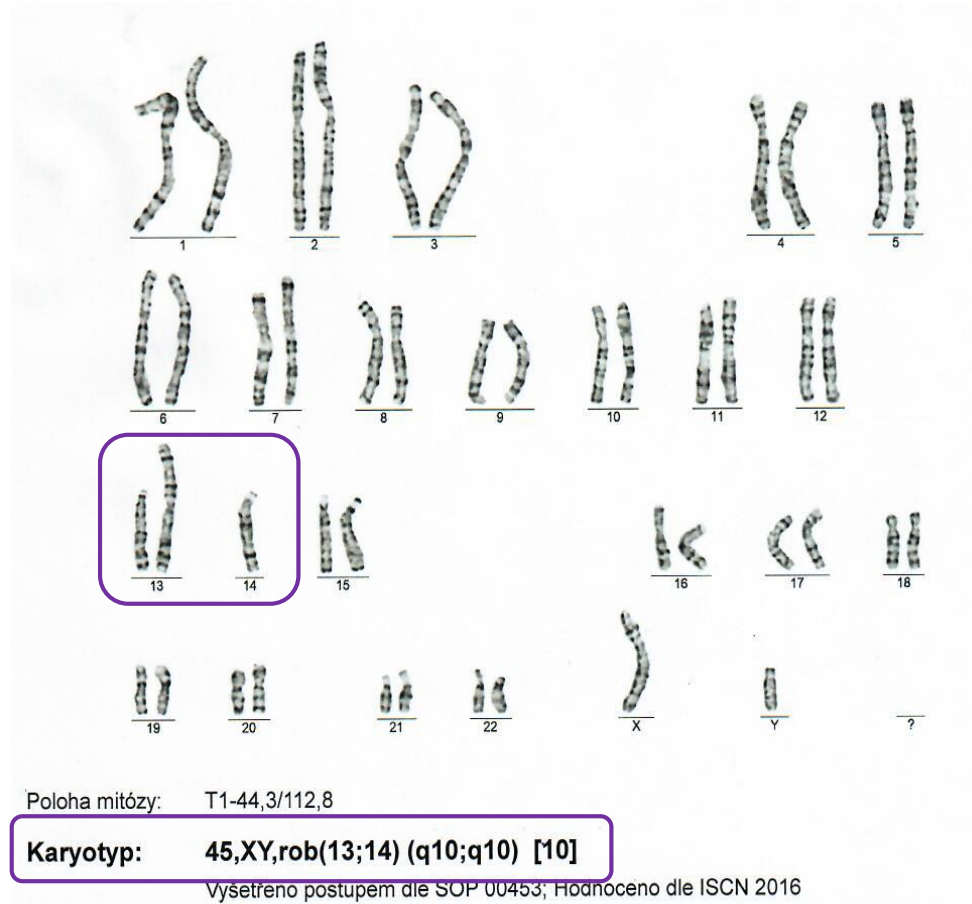
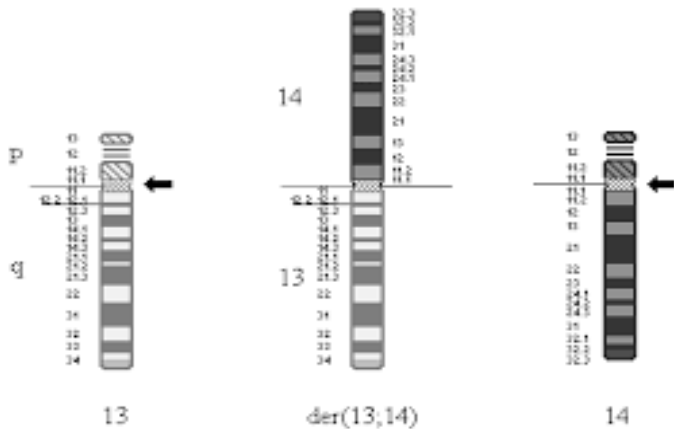


Mosaic (mix of both)



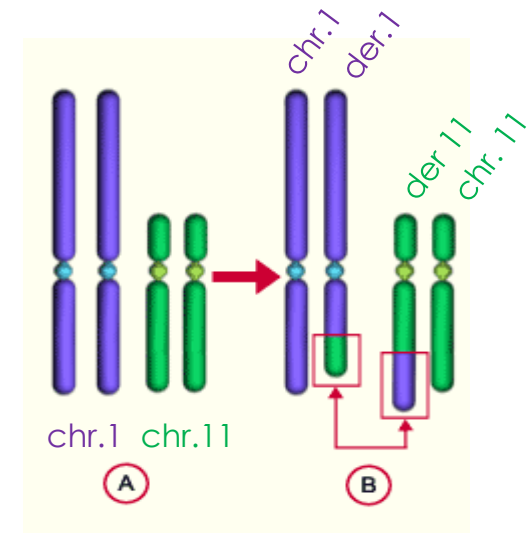
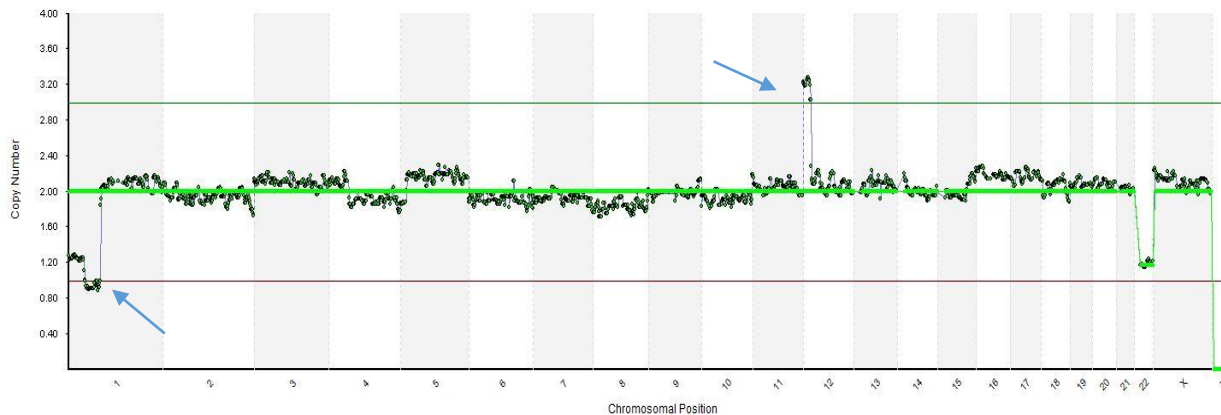
# Preimplantační genetické testování strukturních aberací (PGT-SR)

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

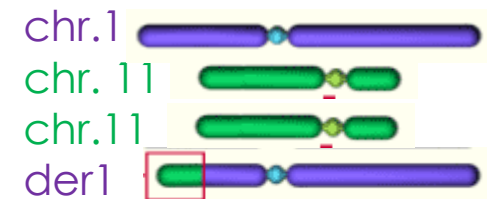


# Preimplantační genetické testování strukturálních aberací (PGT-SR)

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



Chromozomy v embryu:



# Preimplantační genetické testování monogenních chorob (PGT-M)

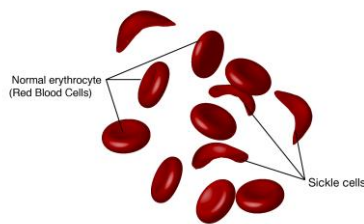
## Dominantní dědičnost

- 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

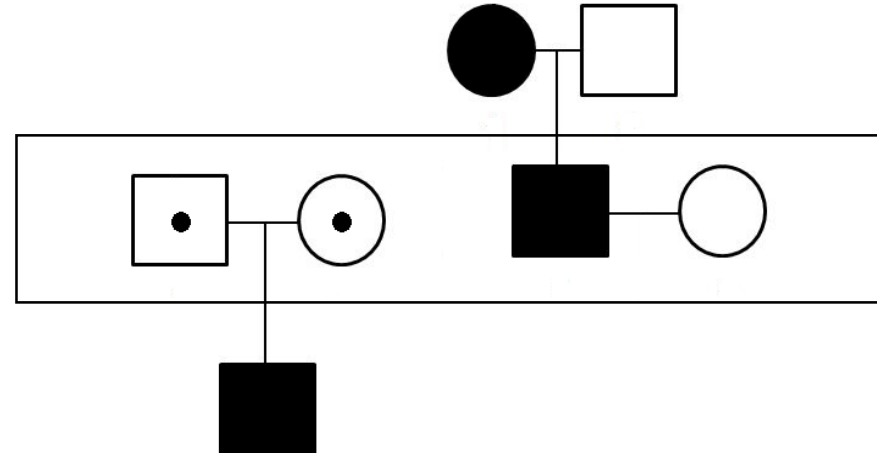


# Preimplantační genetické testování monogenních chorob (PGT-M)

## 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)

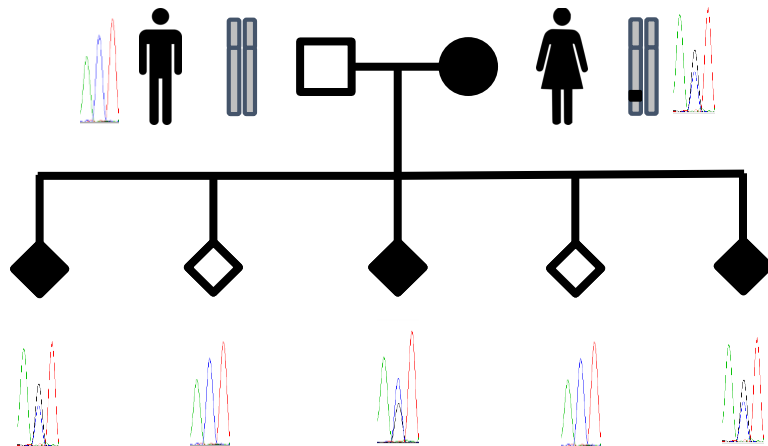
## ❖ Indikace (společnost lékařské genetiky):

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)

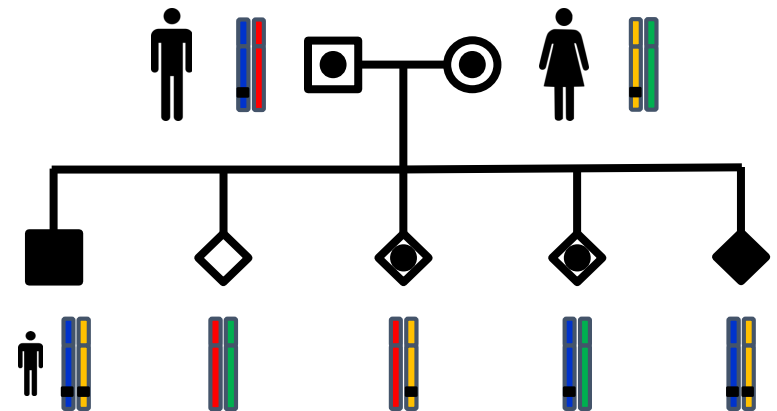
## Přímá diagnostika v embryích

- 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 aneuploidií 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

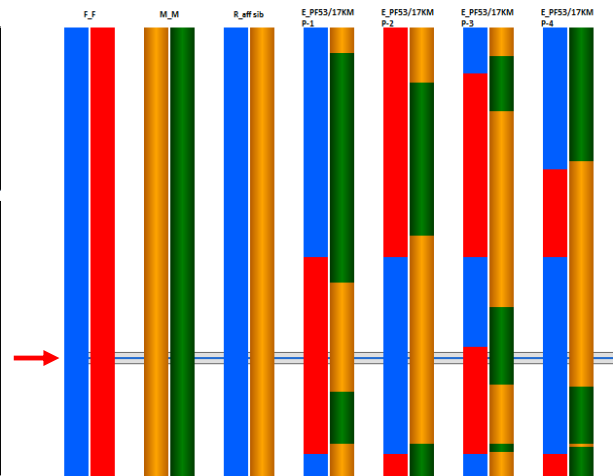
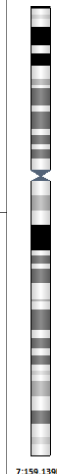
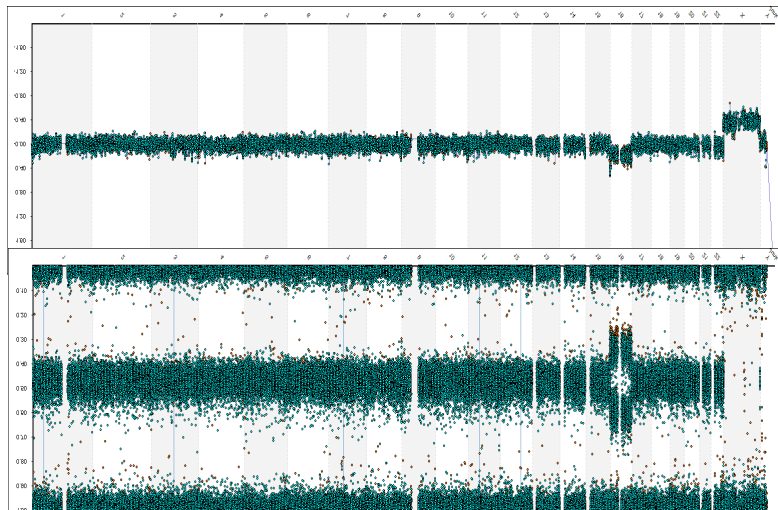
### ❖ Pomocí NGS: detekce SNP markerů je provedena pomocí NGS

stejný princip jako Karyomapping jen jiná technologie

není univerzální pro všechny geny (prozatím)

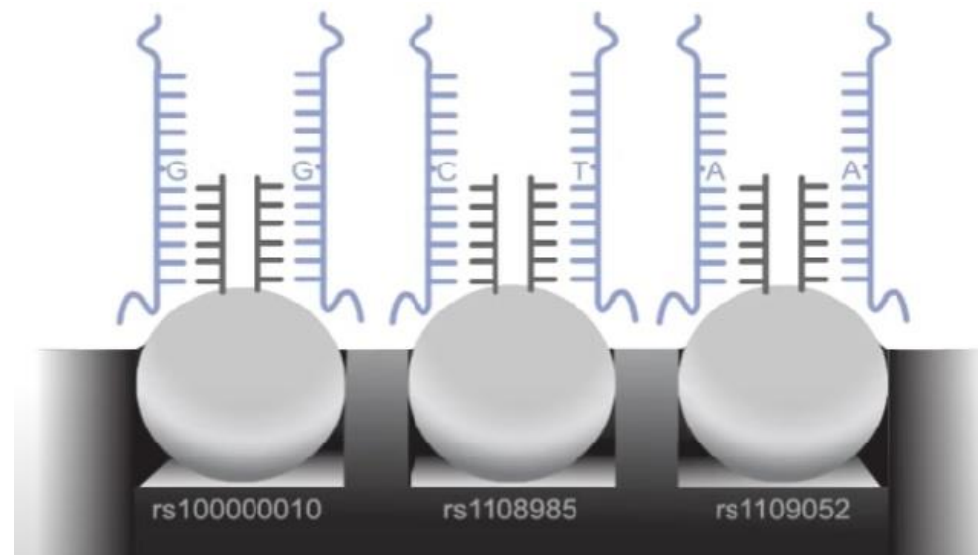
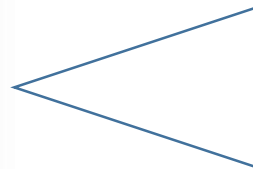
# PGT-M metodou Karyomapping

- ❖ 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



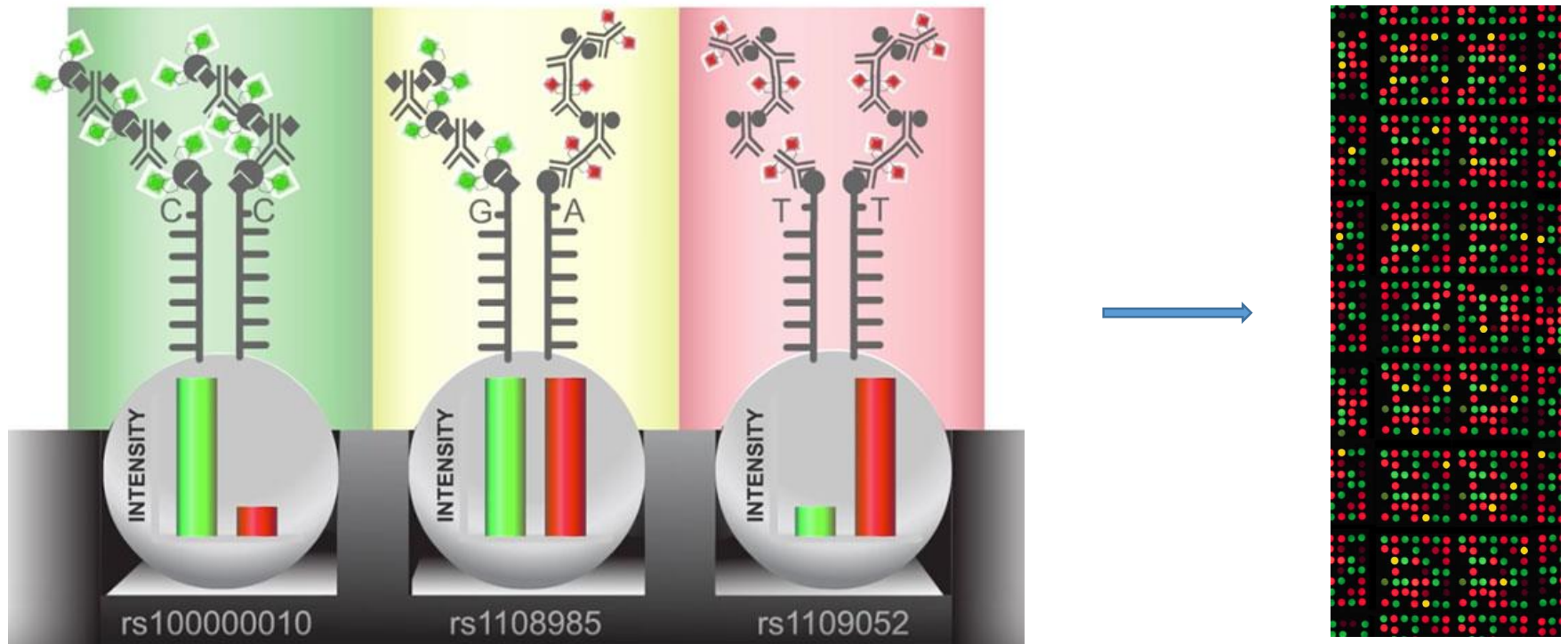
# SNP array

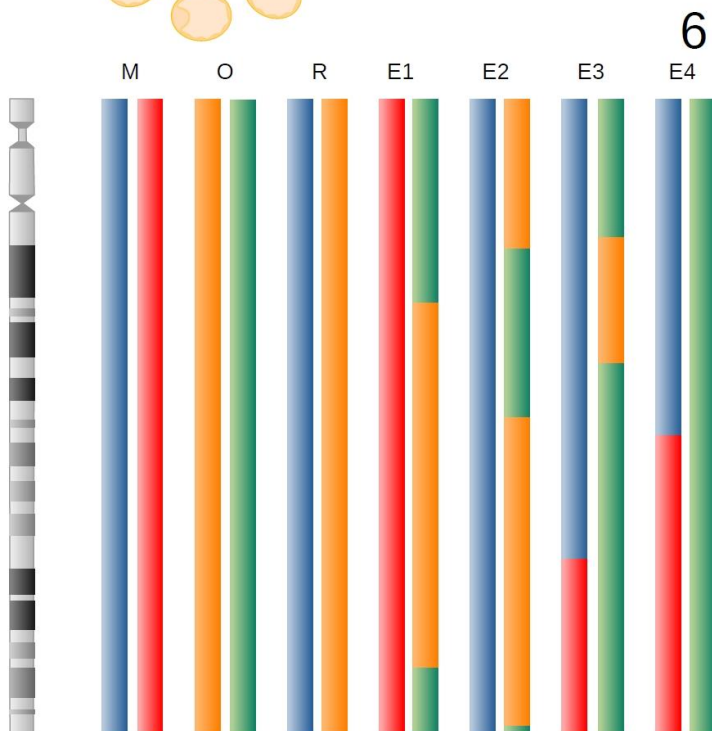
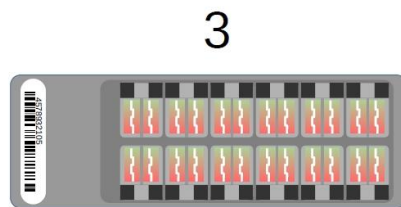
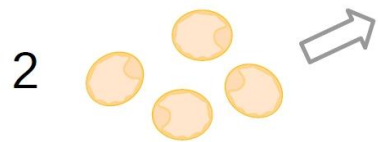
- SNP array – čipová technologie umožňující současnou detekci velkého množství SNP
- Workflow:
  1. Fragmenta a amplifikace DNA
  2. Hybridizace DNA na kuličky se sondami



# 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

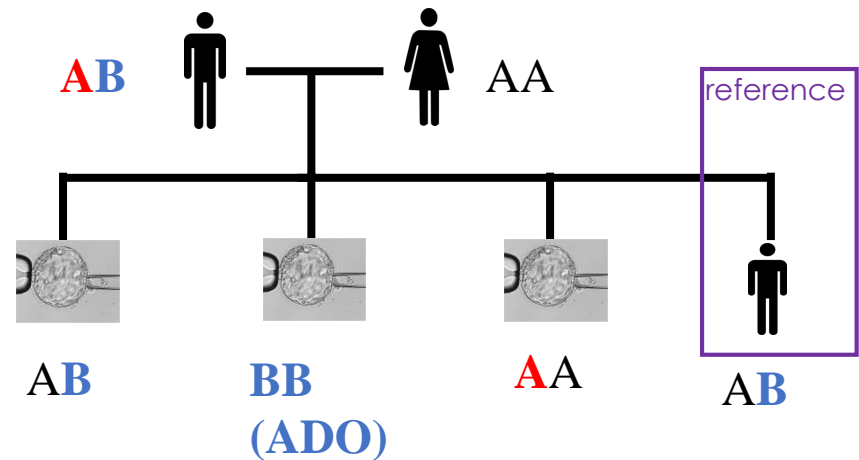
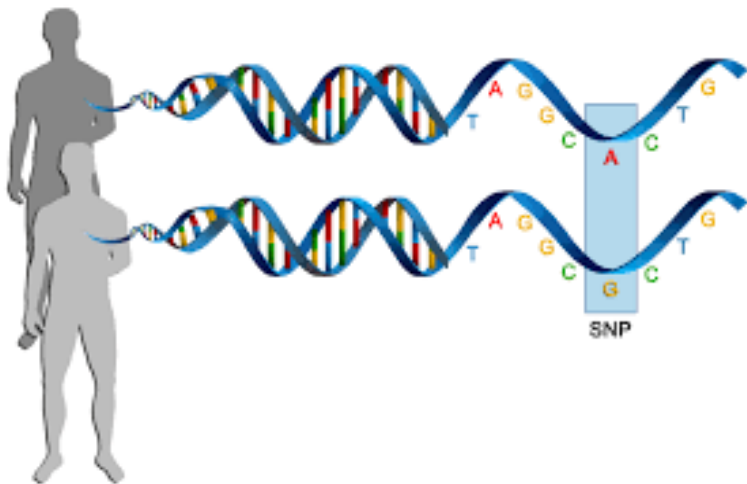
- SNP = jednonukleotidový polymorfismus
  - Záměna jedné báze za jinou (=mutace)
  - Běžná varianta v populaci ( $\neq$ mutace)
  - Frekvence v populaci  $>1\%$  ( $\neq$ mutace)
  - Cca 1 SNP na 1000 bází





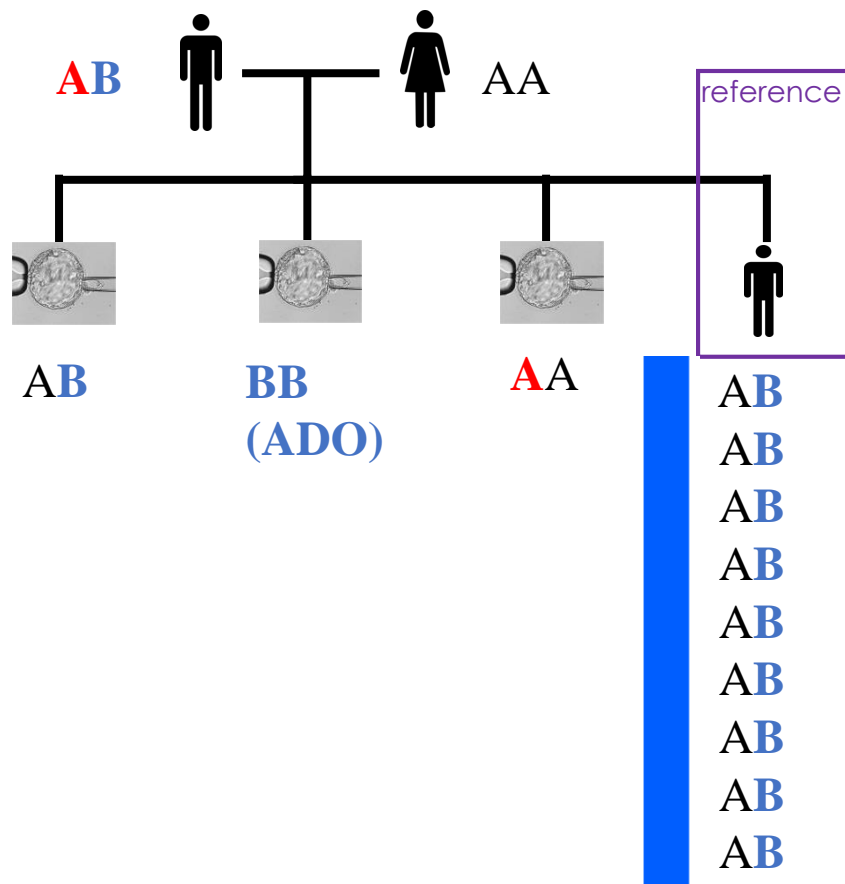
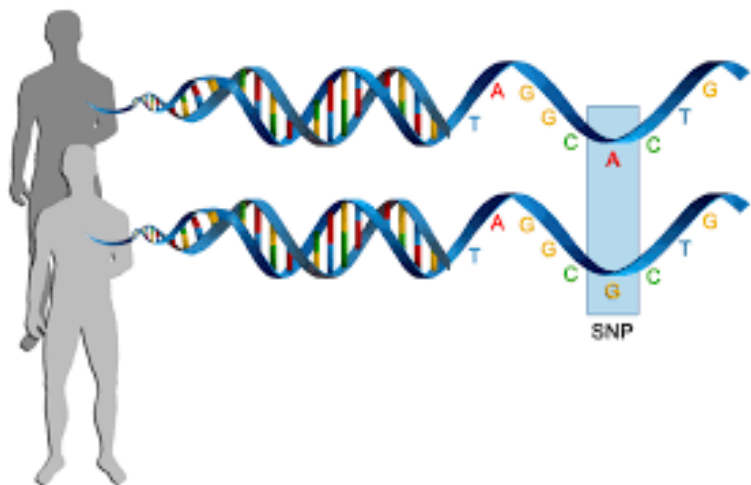
# Karyomapping

## Co je to SNP aneb Mendelistická dědičnost ve velkém



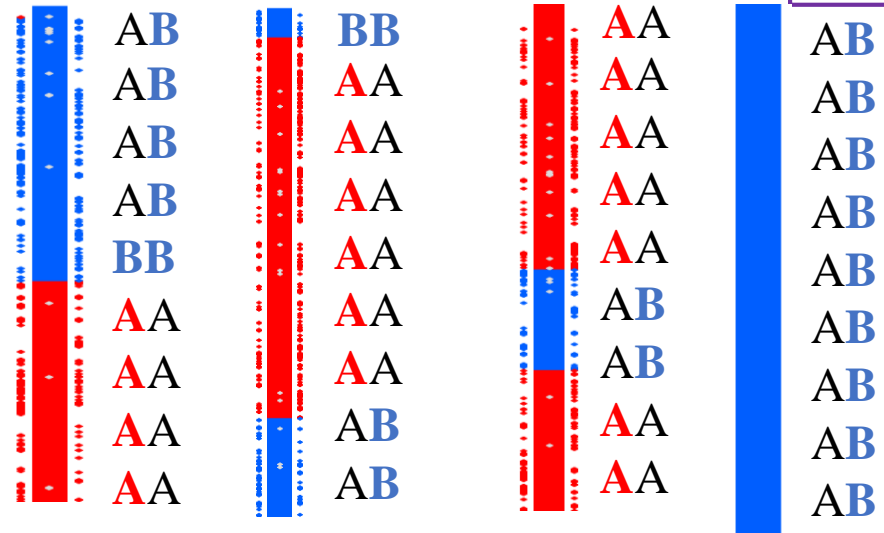
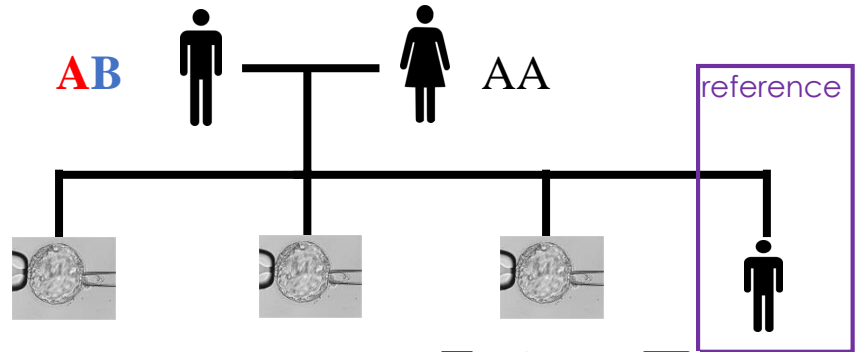
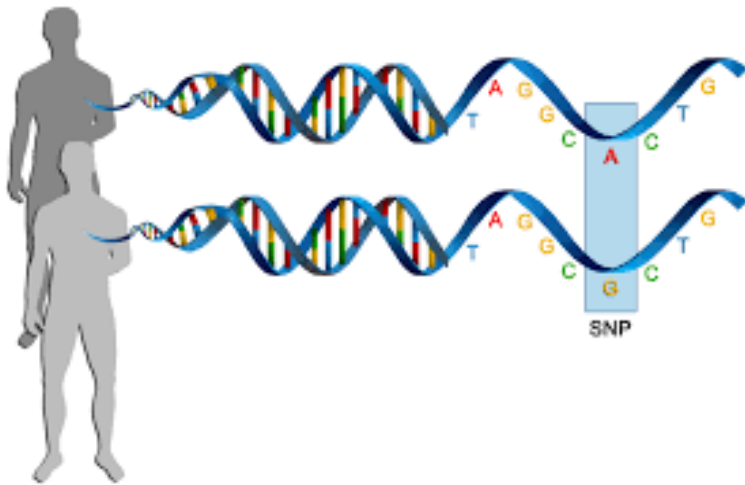
# Karyomapping

## Co je to SNP aneb Mendelistická dědičnost ve velkém



# Karyomapping

## Co je to SNP aneb Mendelistická dědičnost ve velkém

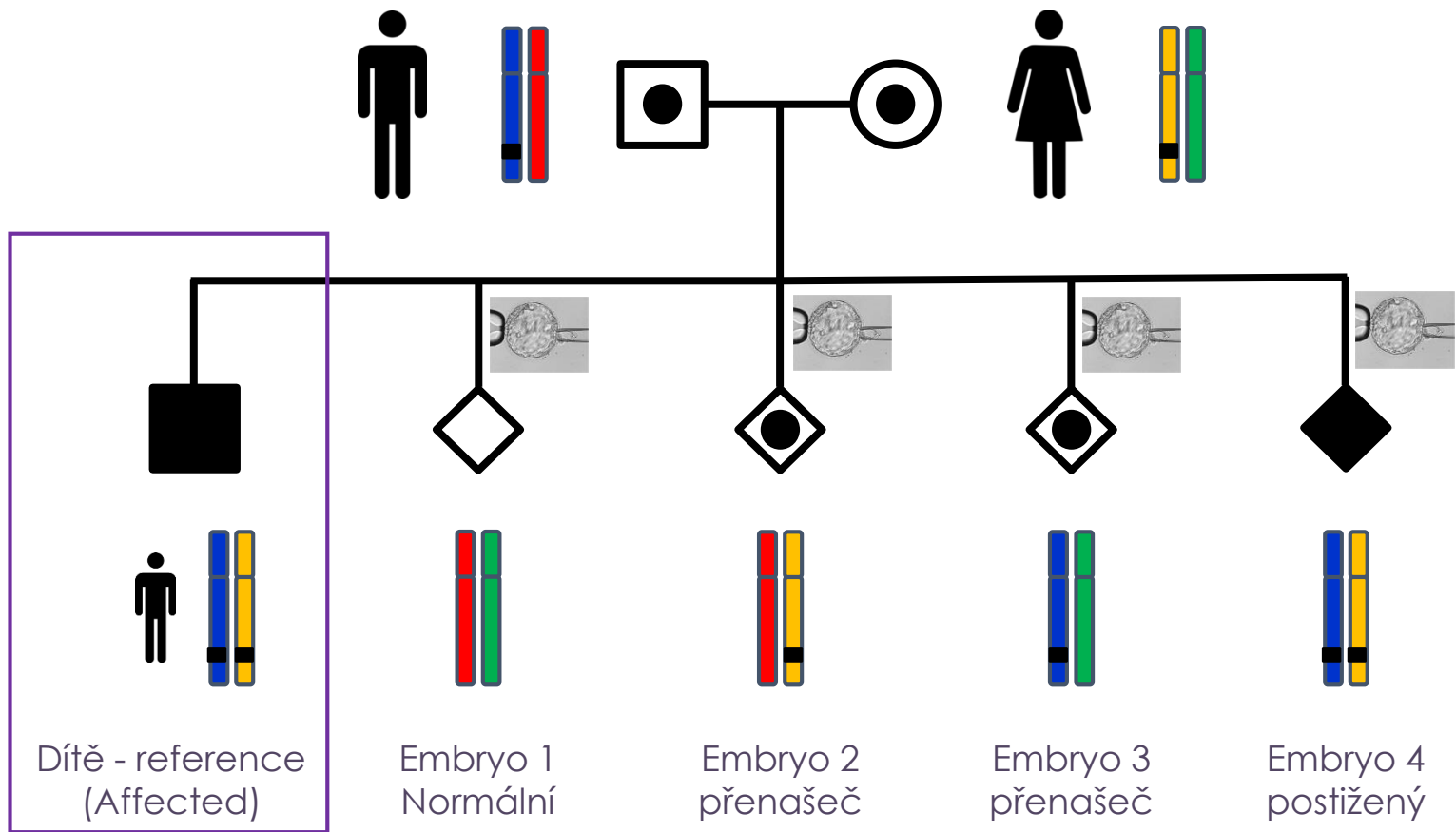


300 000x  
SNP v každém vzorku  
=  
„karyo-mapping“

# Karyomapping- autozomálně recesivní příklad

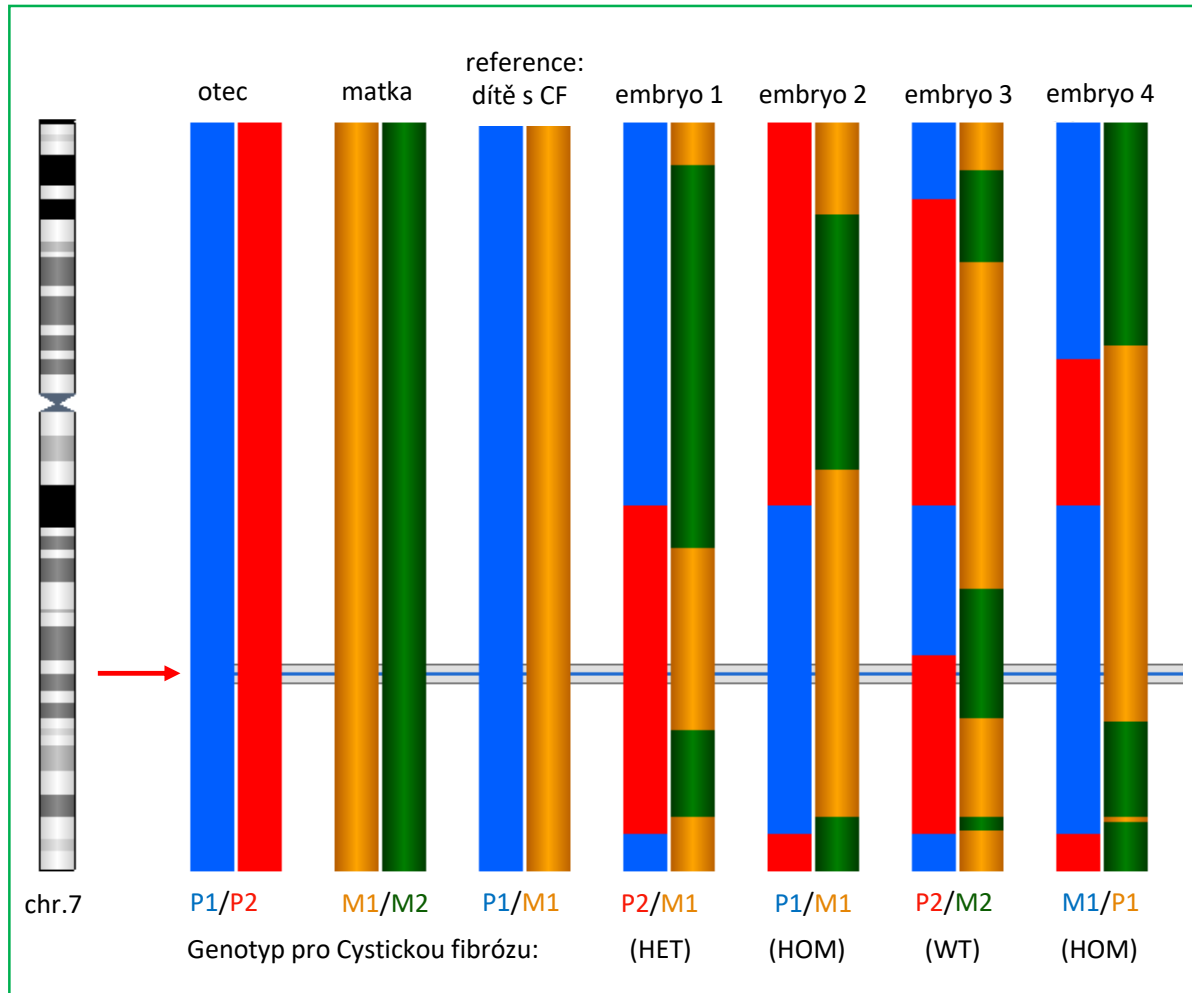
Otec (heterozygot - přenašeč)

Matka (heterozygot - přenašeč)



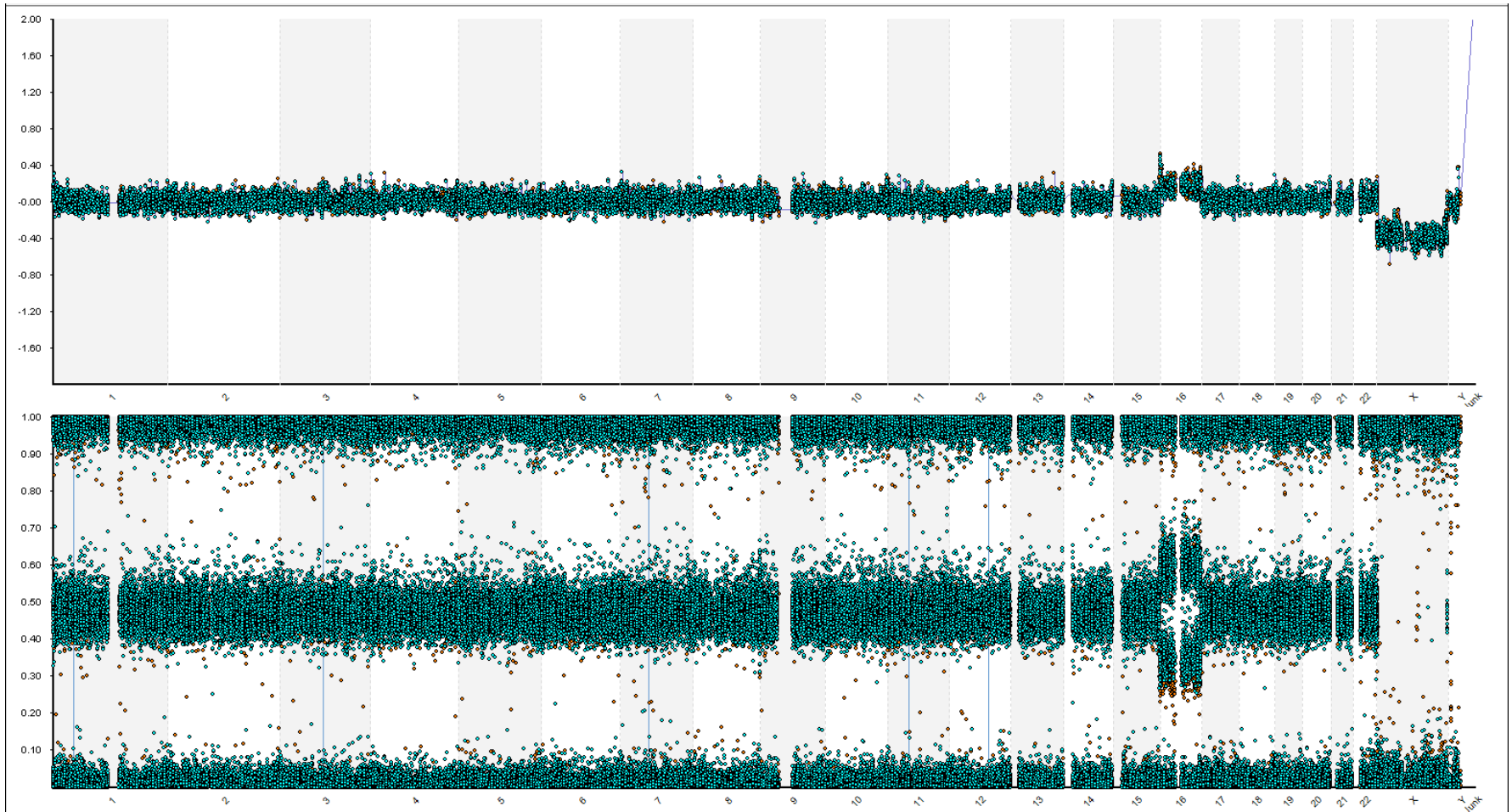
# Karyomapping- ukázka dat ze softwaru

Vizualizace haplotypů vyšetřených embryí metodou Karyomapping



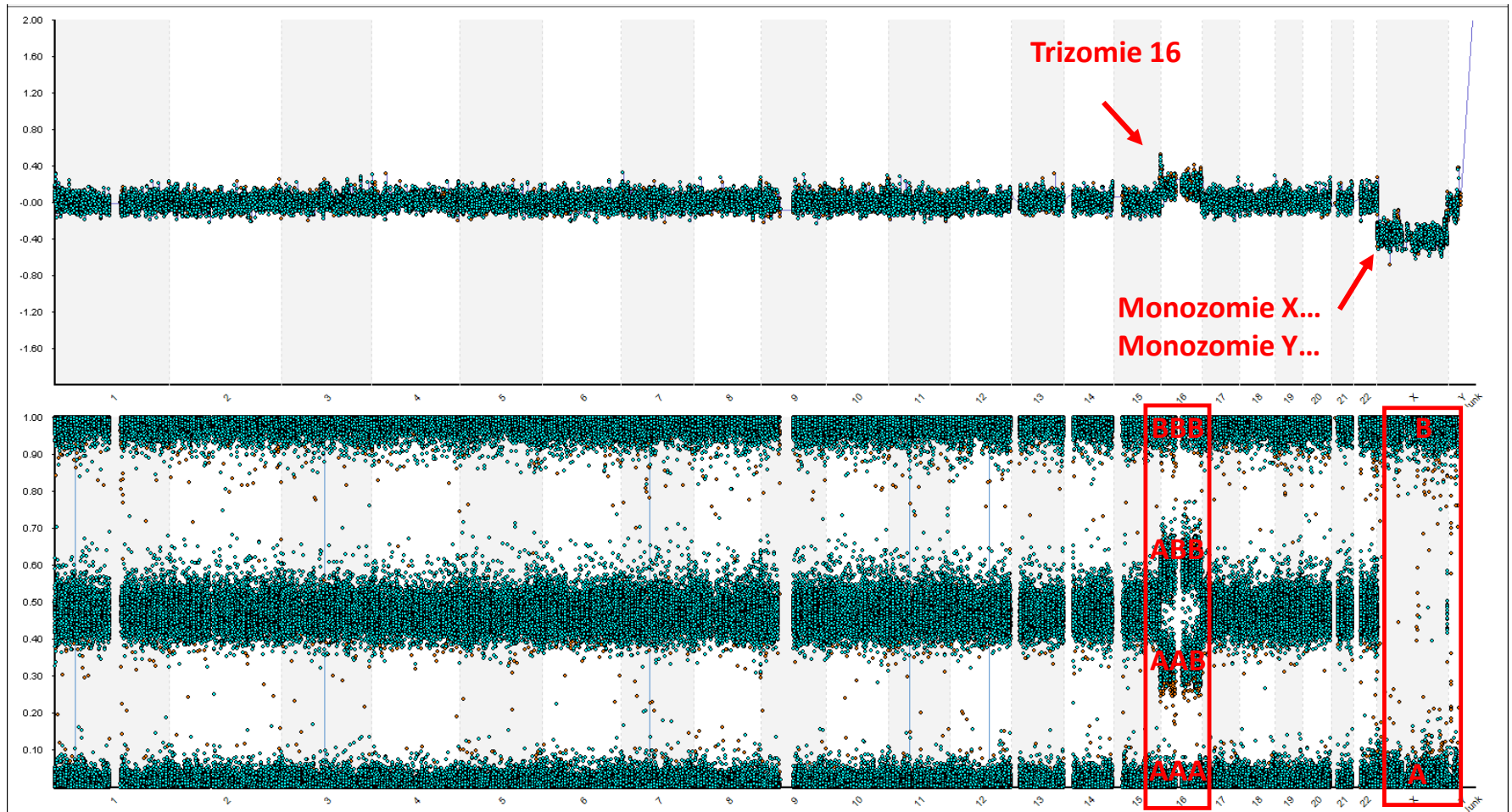
# Karyomapping- detekce aneuploidií

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



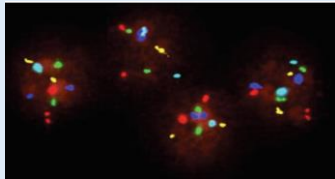
# Karyomapping- detekce aneuploidií

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



# Vývoj PGT

## PGT-A 1.0



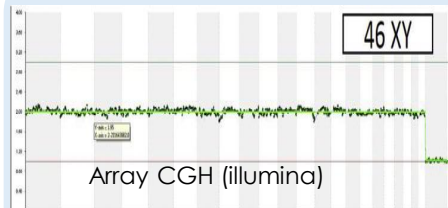
Fluorescenční In Situ Hybridizace (FISH)

Biopsie dvou blastomer D3

1995

≤ 12 chromozomů

## PGT-A 2.0

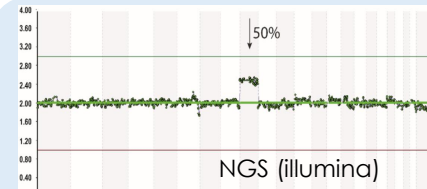


Array CGH

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

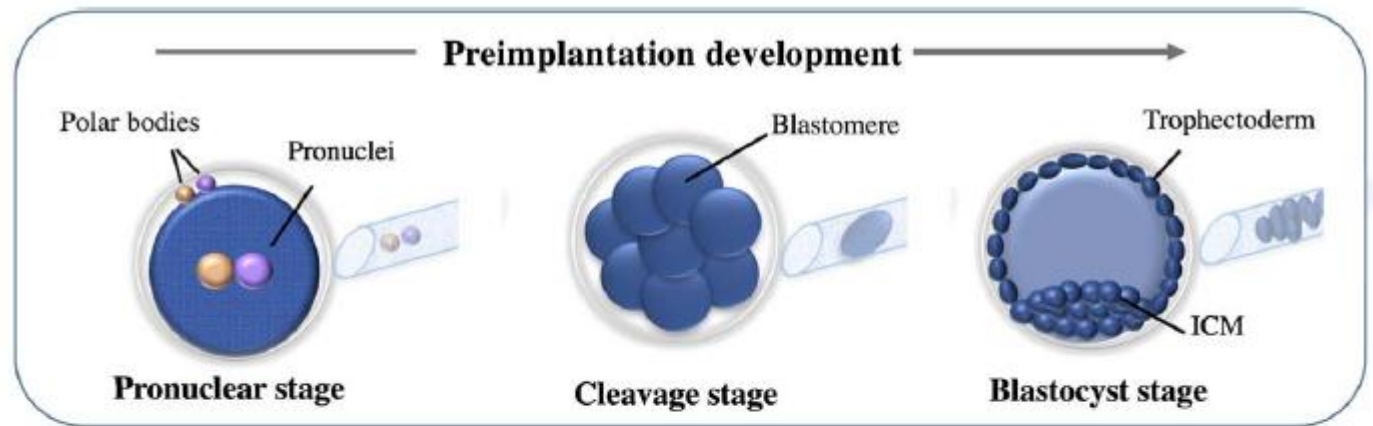
2019

Sekvenování nové generace (biopsie kultivačního média)

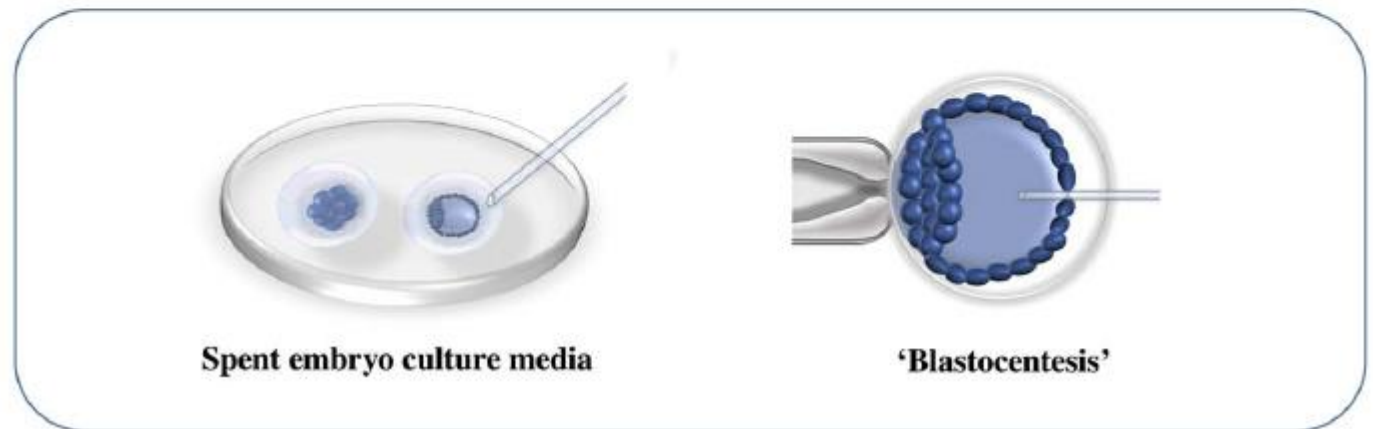
24 chromozomů



# 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

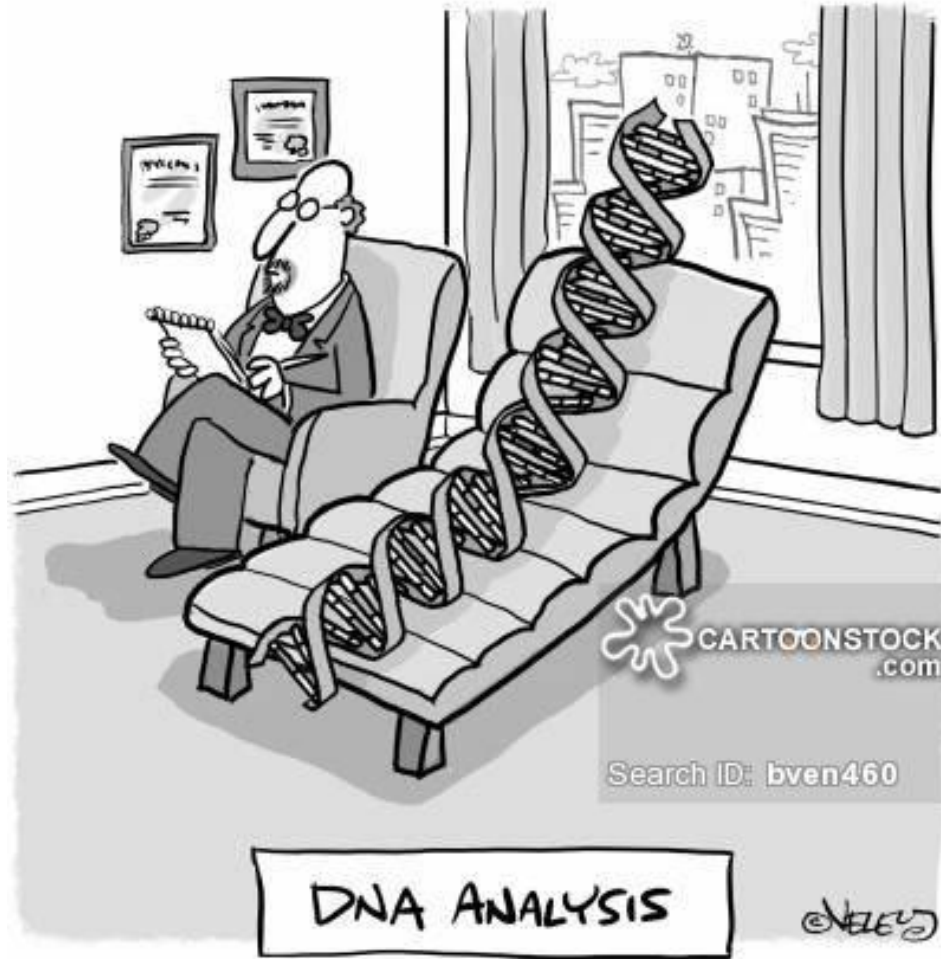
- ✓ Nutné zkušenosti s biopsií
- ✓ Vybavení pro biopsii

## 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](mailto:rnavratil@repromeda.cz)