



# Lékařská genetika

Iveta Valášková



Pan Mendel by měl jistě radost  
aneb co dokáže moderní genetika  
v medicíně při péči o pacienta



# Pronásledovaná genetika

V zemích komunistického bloku byla genetika nejprve považována za pavědu, až v 60. letech se to změnilo a genetika se začala vyučovat na vysokých školách.

V roce 1965 se konalo v Brně přelomové Mendel Memorial Symposium, které za účasti snad pěti stovek odborníků z celého světa v nově otevřené Janáčkově opeře. Tenkrát jsme se i my za Československo znovu přihlásili k Mendelovi.

Prvé začátky rozvoje **lékařské genetiky** po letech zavržení datujeme do roku 1963.

Tehdy byla ustavena Komise pro lékařskou genetiku.

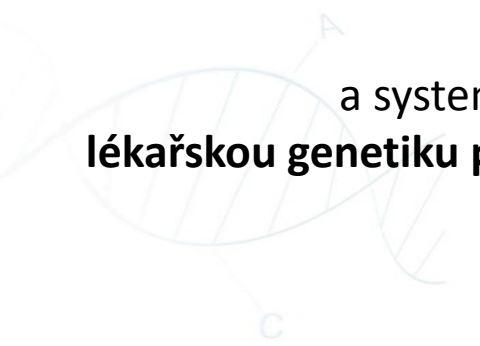
Samostatná Společnost lékařské genetiky ČLS byla založena v r. 1967.




# Lékařská genetika

Mnoho lékařů si z dob svých studií pamatuje, že lékařská genetika se zabývá relativně vzácnými monogenními onemocněními či chromozomálními poruchami.

S výjimkou pediatriů a gynekologů-porodníků se většina lékařů v primární péči s těmito chorobami setkávalo velmi vzácně, **a lékařskou genetiku proto považovali za okrajový obor medicíny.**



Současný rychlý vývoj molekulárně genetických metod, překotné odkrývání lidského genomu a systematický popis polymorfismů jednotlivých nukleotidů (SNPs) **lékařskou genetiku posouvají z periferie akademické medicíny do centra každodenní praxe.**







156 let po Mendelovi



Genetika

hraje důležitou roli v medicíně!



"My doctors estimated that I had an 87% risk of breast cancer and a 50% risk of ovarian cancer."

CTV




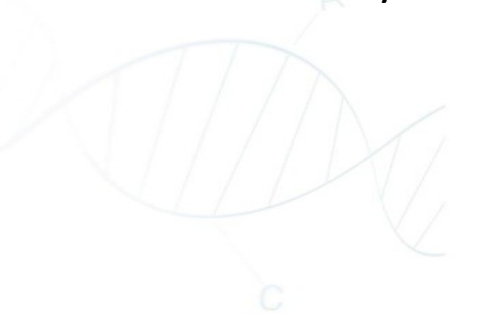


# Lékařská genetika

je samostatným vědním oborem v systému lékařských věd.

Specifickými metodami analyzuje podíl dědičnosti, genetických změn a faktorů prostředí v etiologii a patogenezi chorob a vrozených vad.

Její význam velmi rychle vzrůstá,  
neboť po zvládnutí hlavních problémů předchozích generací - podvýživy a infekcí –  
v současné klinické praxi převažují genetické choroby a vady,  
včetně chorob vyvolaných zhoršováním životního prostředí u osob s genetickými dispozicemi.



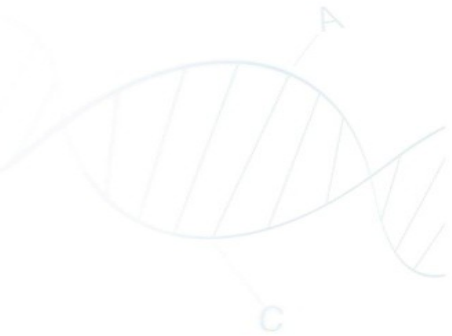


# Lékařská genetika

Moderní genomické metody, mezi něž celá plejáda vysoce citlivých a přesných metod, umožňují identifikaci specifických genetických změn způsobujících onemocnění.

Velké změny genomu lze studovat **cytogenetickými metodami**.

Analýzou změn rozsahem příliš malých pro cytogenetické vyšetření a studiem vlivu těchto změn na zdravotní stav člověka se zabývá **molekulární genetika**. Moderní technologie molekulární genetiky dokáží identifikovat i velké přestavby genomu a postupně nahrazují klasické cytogenetické postupy.





# Genetická onemocnění

onemocnění, která jsou přenášena (děděna) v rámci rodiny z rodičů na potomky.

Genomové (polyploidie, aneuploidie)

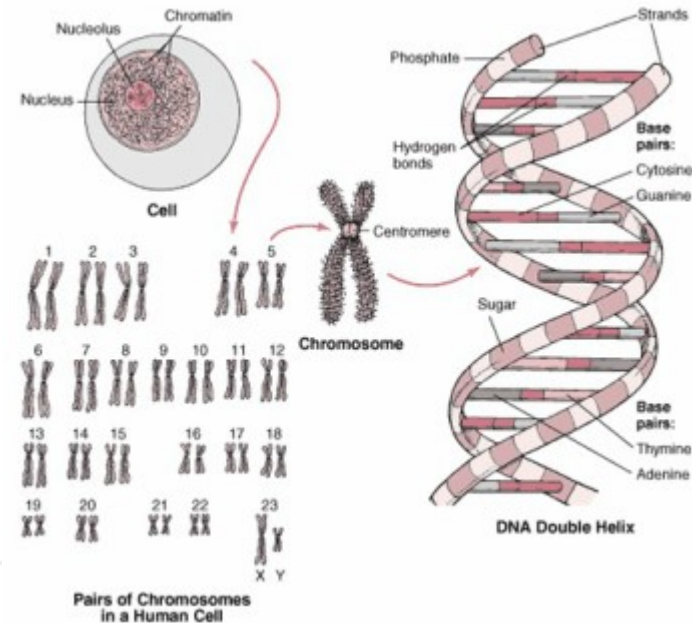
- dojde ke změně celého genomu (početní aberace)

Chromozomové

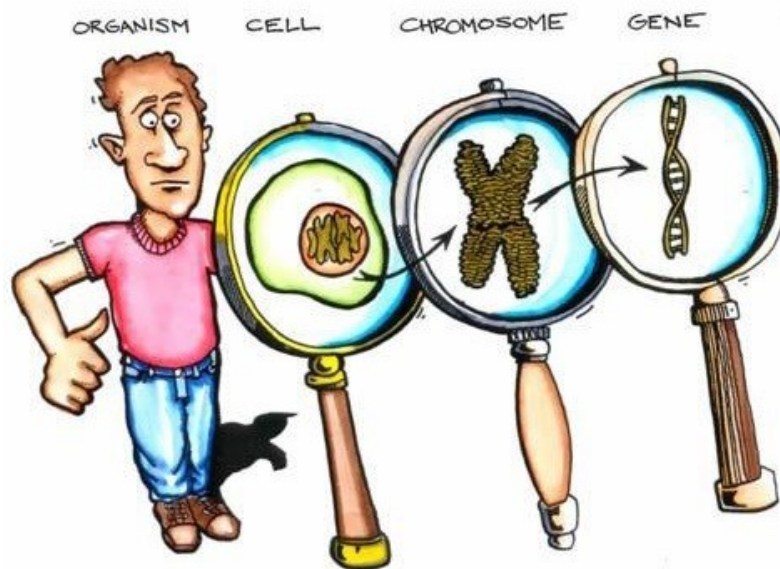
- mutační změna postihla strukturu chromosomu (strukturní aberace)

Genové

- mutační změna v genu (změny sekvence DNA)



# Diagnostika genetických onemocnění



početní  
aberrace chromosomů

strukturní

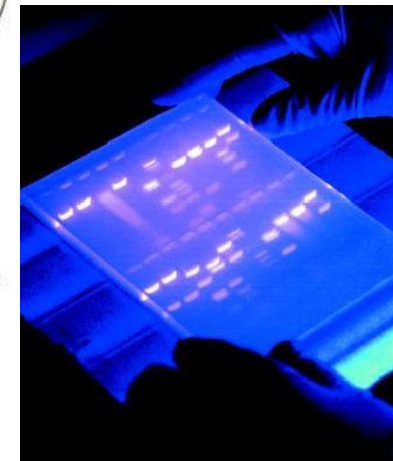
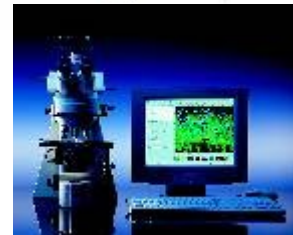
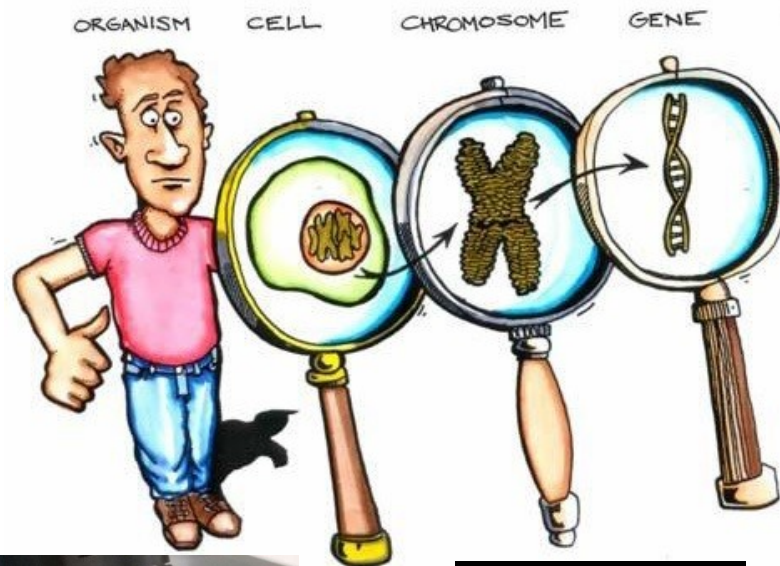
sekvenční změny DNA

Cytogenetika

Molekulární diagnostika

Molekulární cytogenetika

# Diagnostika genetických onemocnění



Cytogenetika  
Molekulární cytogenetika

Molekulární diagnostika

# Cytogenetika

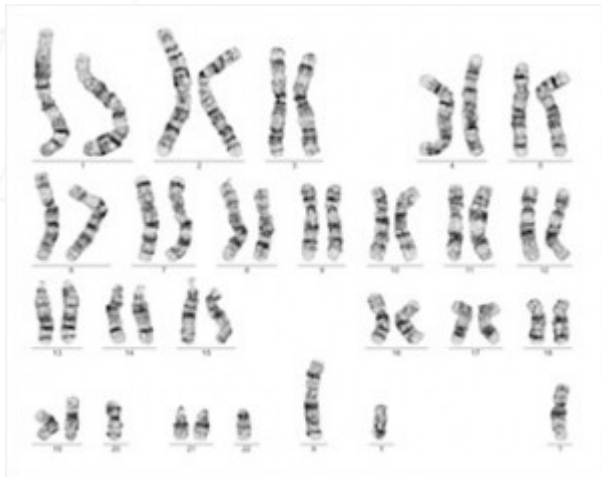
Vyšetření **karyotypu** (hodnocení barvených metafázických chromosomů v optickém mikroskopu)

## Karyotyp

je soubor všech chromosomů v jádře buňky.

V buněčných jádrech určitého druhu je konstantní do počtu, velikosti i tvaru chromosomů a jako takový se používá jako druhový znak

- vyžaduje kultivaci získaných buněk ve speciálním médiu



# Molekulární cytogenetika

Nezbytnou metodou zjišťování chromosomových aberací je **fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)**.

- umožňuje pomocí fluorescenčně značených sond vizualizaci konkrétních chromosomů nebo jejich oblastí nejen na mitózách, ale i v interfázních jádrech
- prokáže i malé změny, které klasickou cytogenetickou analýzou není možno stanovit.

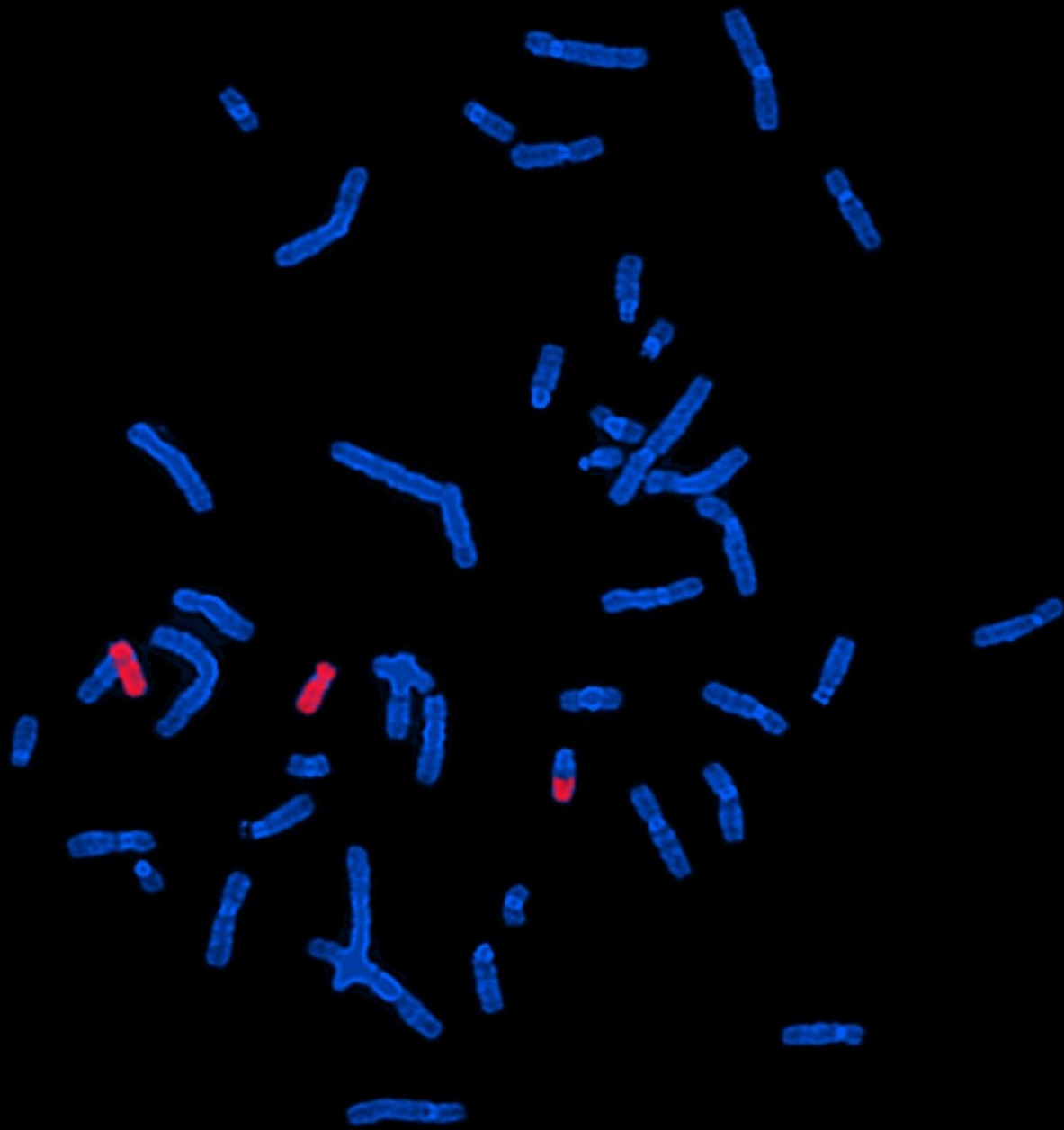
Další využívané metody vyšetření patří

- komparativní genomová hybridizace (CGH)
- multicolour FISH (m-FISH),

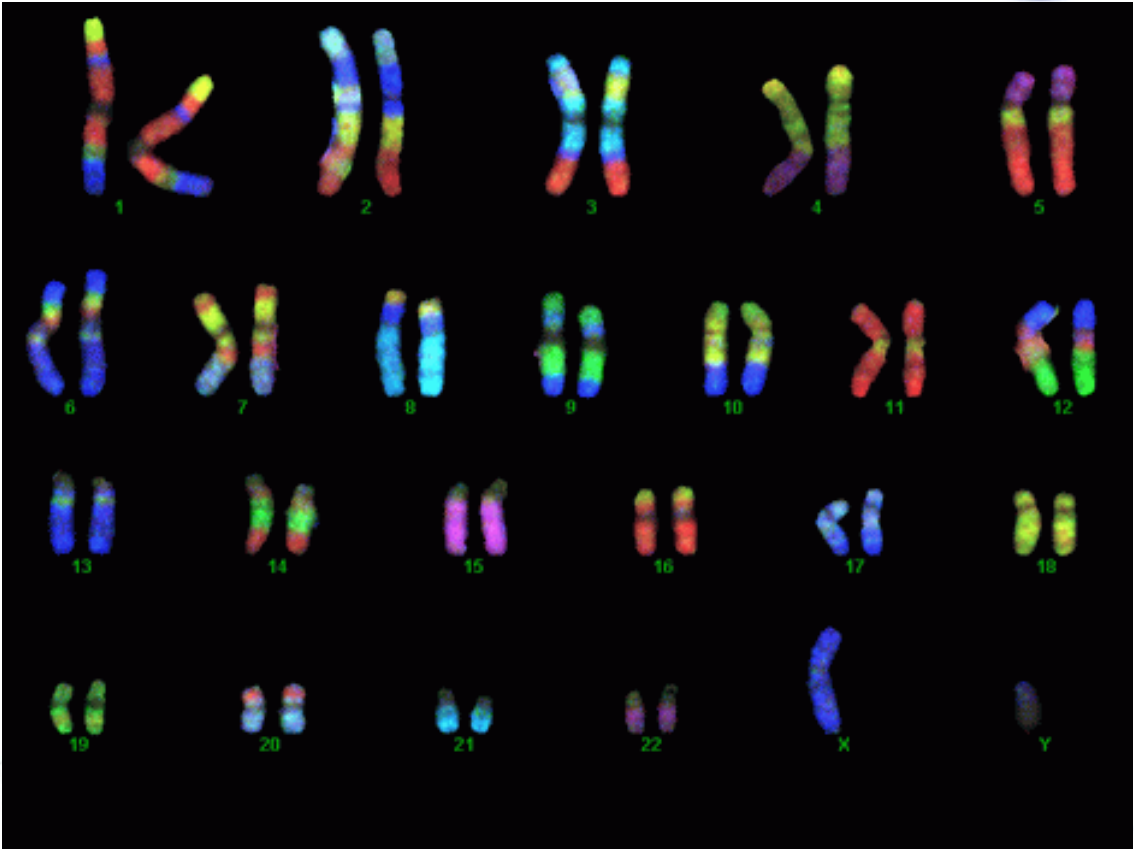
které jsou používány pro upřesnění a dořešení výsledků vyšetření.

K hodnocení preparátů jsou používány mikroskopy s fluorescenčními filtry, digitální kamerou a připojeného softwaru Lucia Laboratory Imaging pro snímání a archivaci obrázků.





# Multicolour FISH



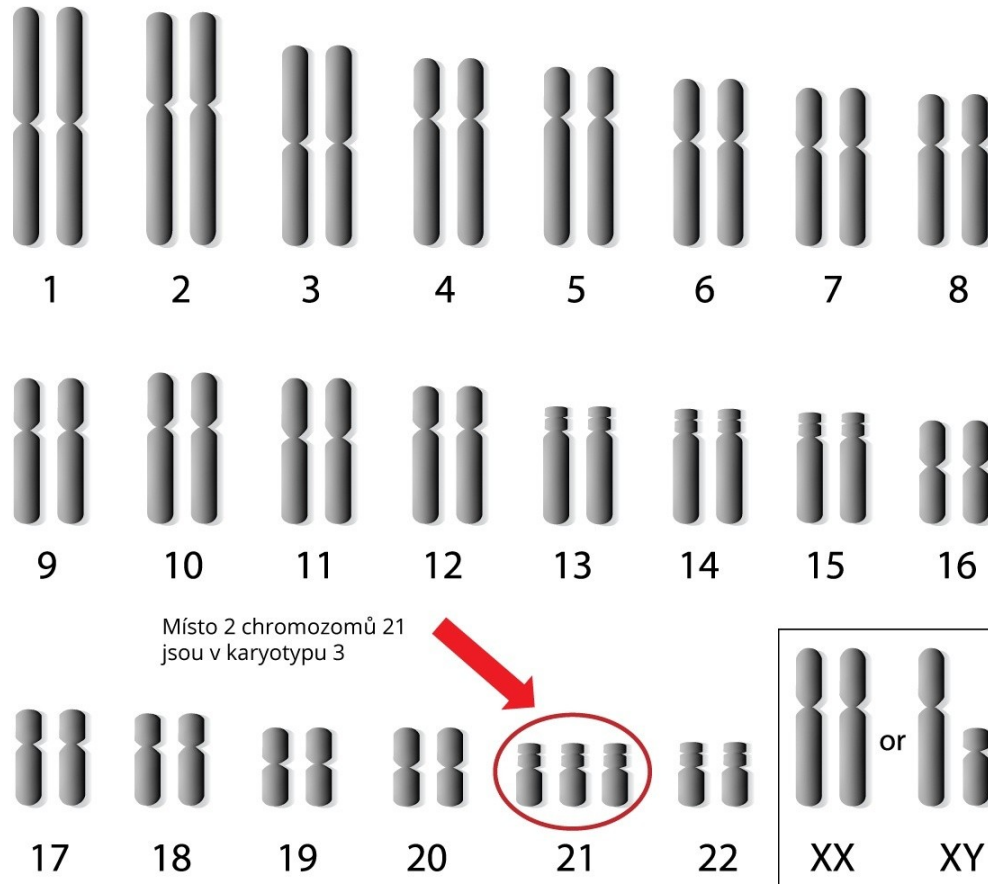
# Početní chromosomové aberace

Downův syndrom



# Početní chromosomové aberace

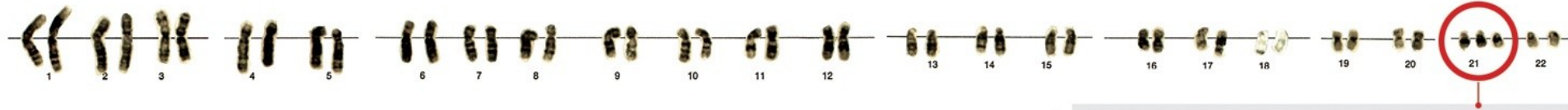
Downův syndrom – Trizomie chromozomu 21



# Početní chromosomové aberace

## Downův syndrom

### **i** S CHROMOZOMEM NAVÍC



Jedná se o genetickou poruchu, která postihuje průměrně jedno z 800 dětí narozených u všech etnických skupin. Ročně se na světě narodí 100 tisíc postižených dětí, v ČR je to v současnosti přibližně 50 za rok.

### Věk matky = rizikový faktor

Pokud je matka starší než **35 let**, je riziko narození dítěte s Downovým syndromem **1:400**, pokud je matce **nad 40**, stoupá riziko na **1:100**. Další rizikovou skupinou jsou rodiče, kteří mají tzv. Robertsonskou translokaci chromozomů (pohlavní buňky matky či otce mají dva chromozomy spojené).

### Jak lze nemoc odhalit

**Matky starší 35 let** by měly podstoupit **prenatální diagnostiku**, kdy se odebere plodová voda nebo nově krev. Porucha se často odhalí i při ultrazvuku či prenatálním screeningu.

VZP v loňském roce uhradila zdravotní péči za **1136 klientů s Downovým syndromem**.

Celkové náklady na kompletní péči o ně činily **60 848 993 korun**.

**Průměrné náklady na kompletní péči o jednoho klienta** s uvedenou chorobou tedy loni byly **53 564 korun**.

Lidé s Downovým syndromem mají na 21. páru chromozomů jeden chromozom navíc (místo běžných 46 chromozomů 47).

### Typické příznaky

- šikmo posazené oči s kožní řasou, která se táhne od vnitřního koutku oka ke kořeni nosu
- kulatý obličej, krátký krk
- ochablý jazyk a malá ústní dutina, postižení mají občas otevřenou pusu a vyplazují ho
- nižší postava
- snížené napětí svalů
- široké ruce s krátkými prsty, napříč dlaněmi se někdy táhne jedna či dvě rýhy
- mentální retardace, pomalejší vývoj
- náchylnost ke srdečním vadám, špatné funkci štítné žlázy, poruchám dýchání, horší imunitě a vadám zraku a sluchu
- mentální opoždění





# Strukturní chromosomové aberace

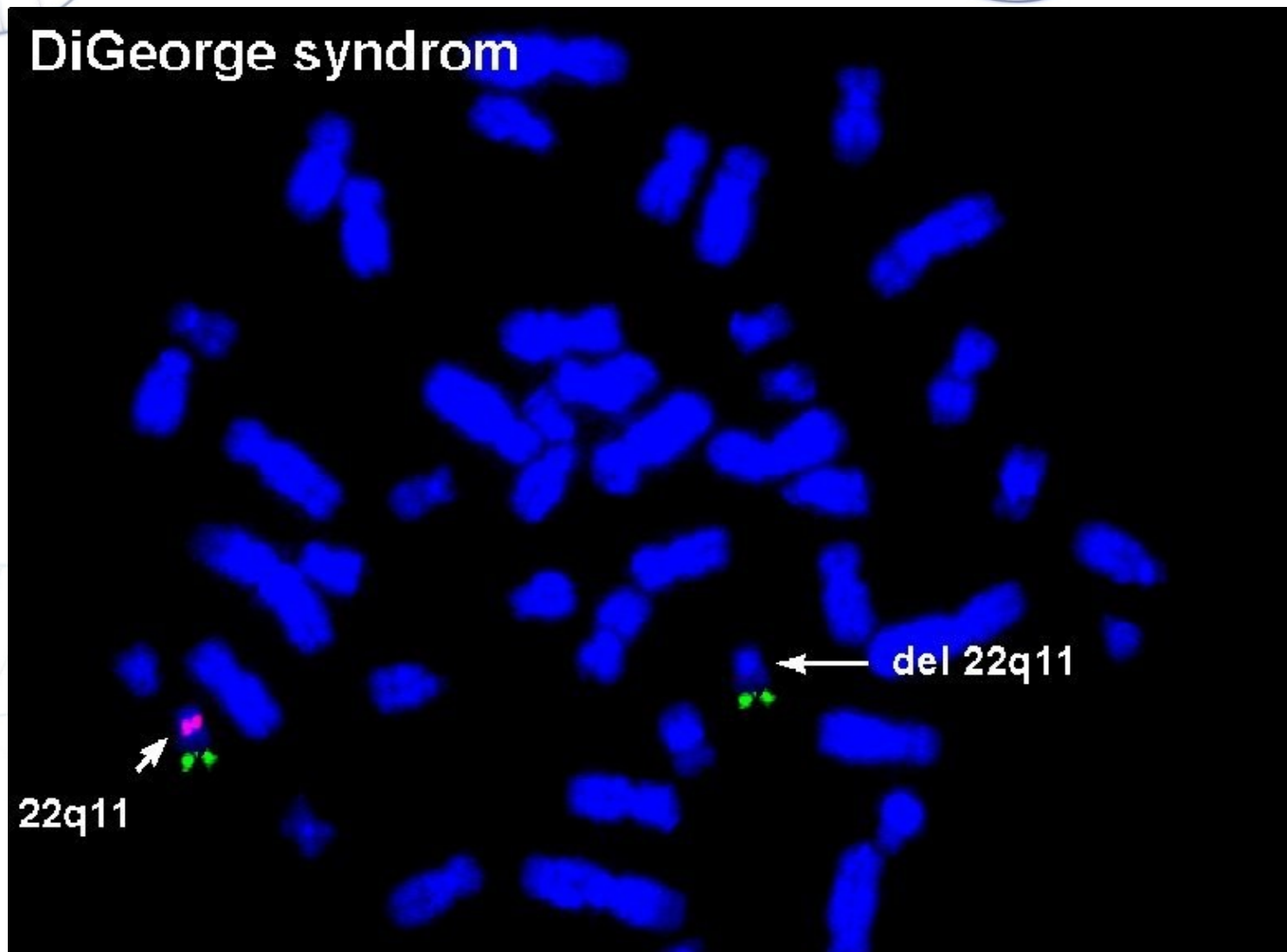
## Syndrom Di George



- vrožené srdeční vady
- typické konotrunkální vady
- faciální dysmorfie
- hypoplasie
  - aplasie thymu
  - event. příštítných tělísek
- munodefekty
- hypoparathyreoidismus

# Strukturní chromosomové aberace

## DiGeorge syndrom



# Molekulárně genetické metody

V poslední době došlo díky významným objevům v oblasti molekulární biologie k prudkému rozvoji celé řady nových moderních technik, které podstatně zvýšily citlivost a přesnost molekulárně genetických testů.





# Molekulární diagnostika

Analýza začíná **izolací DNA** ze vzorku.

Biologický materiál pro izolaci DNA



Teoreticky z jakéhokoliv dostupného biologického materiálu (s jádrem)

# Molekulární diagnostika

Analýza začíná **izolací DNA** ze vzorku.

Obvykle se k tomu používá směs chloroformu a fenolu nebo solný roztok, který oddělí DNA od ostatní hmoty buněčného jádra.

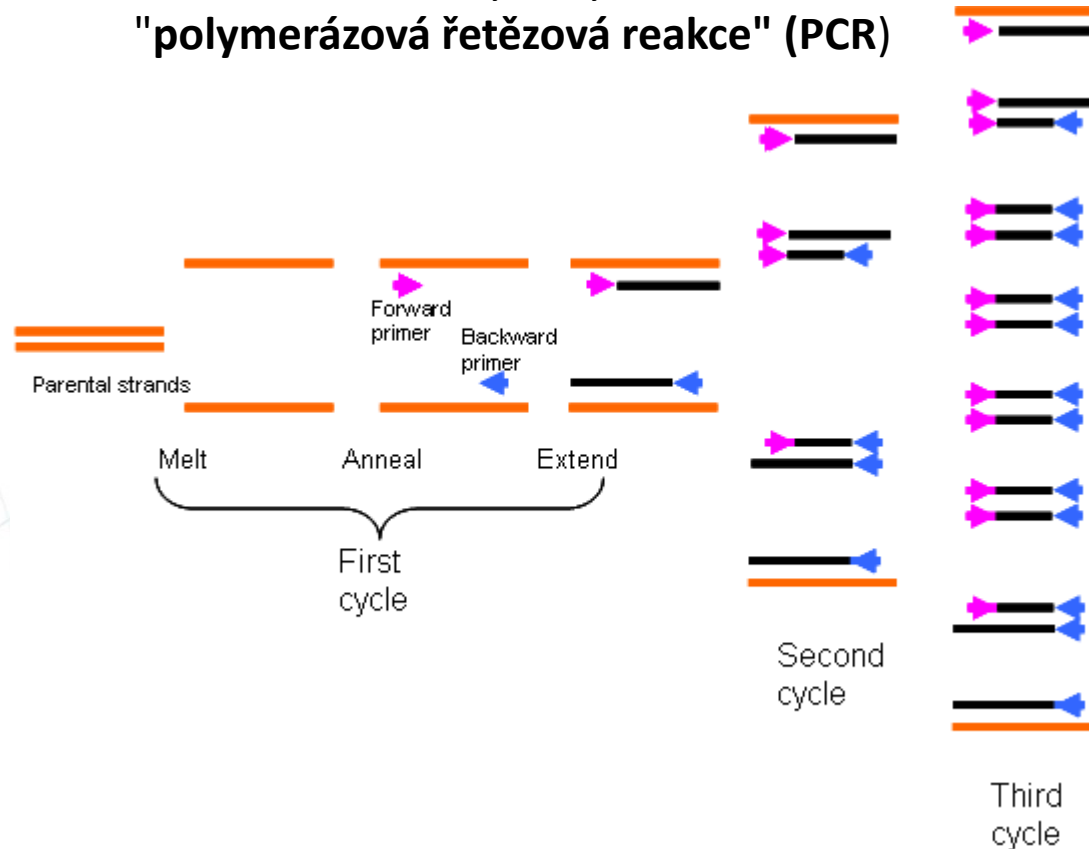


Automatická izolace  
vychytání DNA pomocí magnetických kuliček

# Molekulární diagnostika

Izolační postup většinou nedodá dostatek DNA pro analýzu, takže dalším postupem je umělé zvýšení množství DNA ve vzorku za použití technicky nazývané

**"polymerázová řetězová reakce" (PCR)**





# Metody molekulární diagnostiky

- Restrikční analýza PCR produktu
- Hybridizace PCR produktu s alelově specifickými oligonukleotidy
- PCR s alelově specifickými primery (ARMS)
- PCR s primery ohraničujícími předpokládané delece v DNA
- Analýza teploty tání PCR produktu pomocí real-time PCR
- Triplet primed PCR (TP PCR)
- Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA)
- jednořetězcový konformační polymorfismus (SSCP)
- denaturační gradientová elektroforéza (DGGE)
- heteroduplexní analýza (HD)
- detekce zkráceného proteinu (PTT)
- denaturační vysokotlaká kapalinová chromatografie (DHPLC)
- analýza teploty tání na real-time PCR, analýza teploty tání s vysokým rozlišením (HRM)
- sekvenování
- masivně paralelní sekvenování





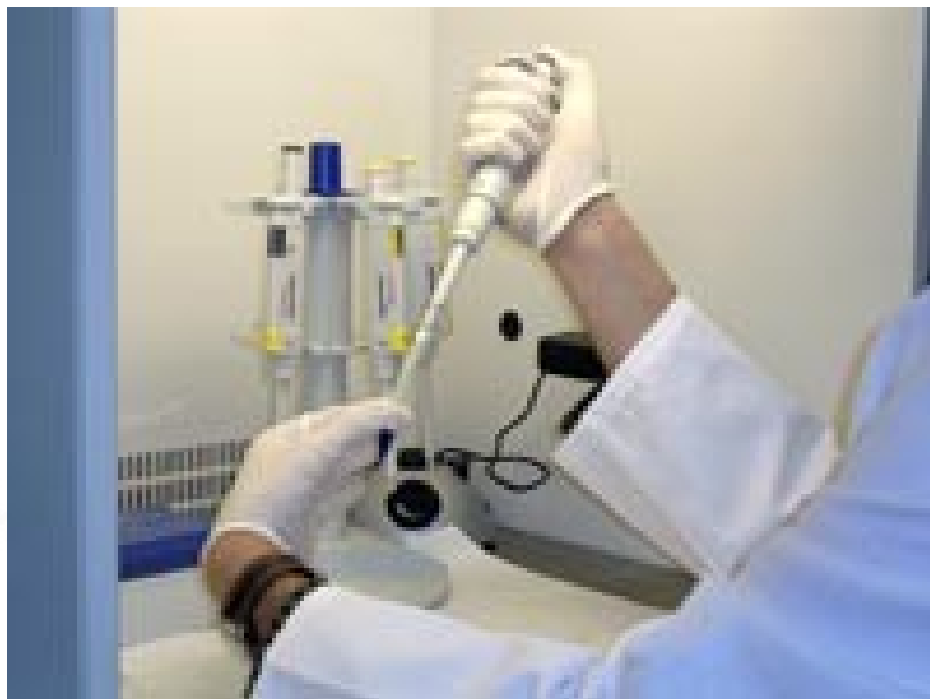
Kary Banks Mullis

PCR (polymerázová řetězová reakce)

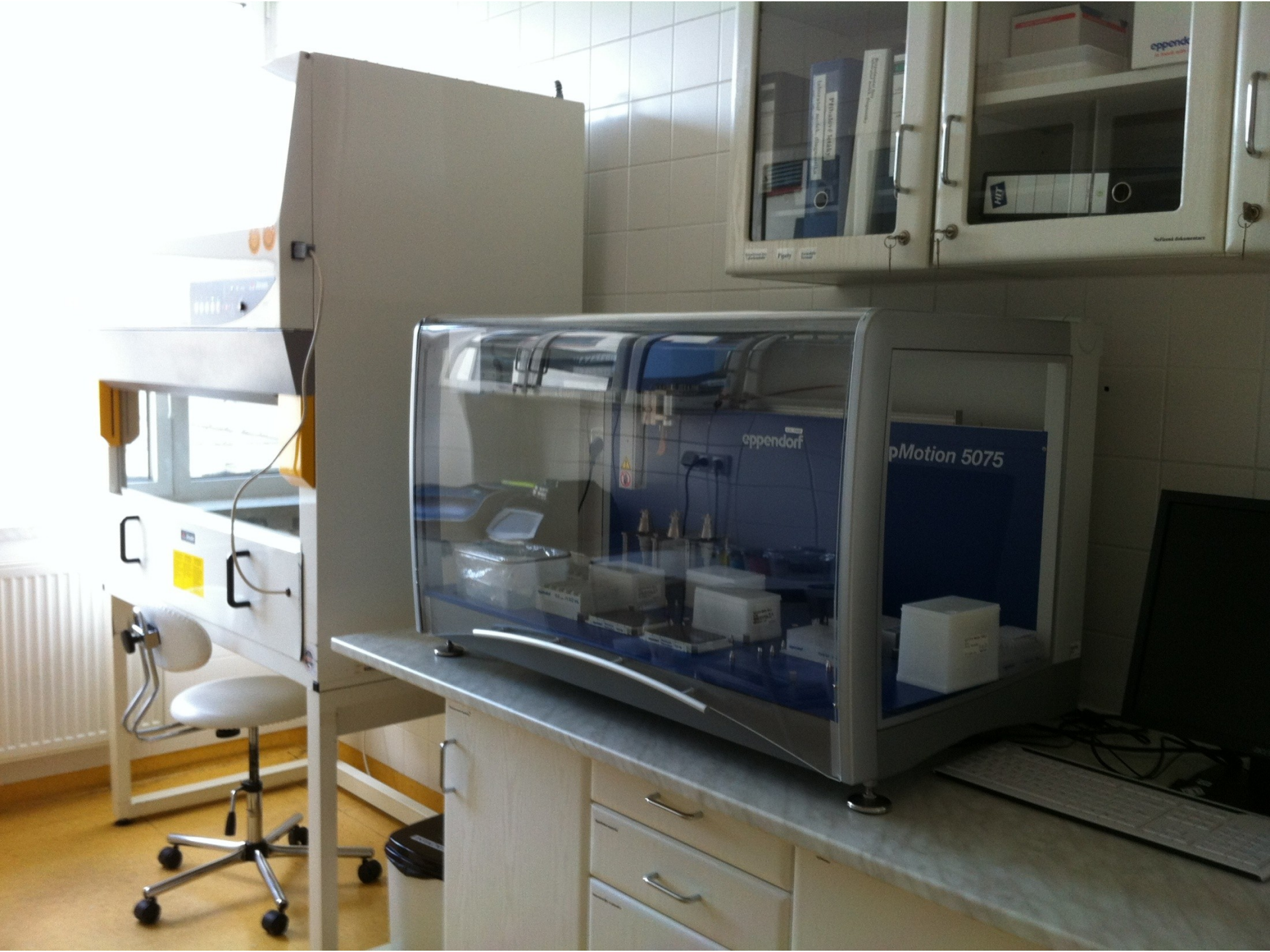


Tato metoda byla ve své době doslova převratná a nejen že měla obrovský dopad na vědeckou komunitu, ale ovlivnila i mnoho aspektů našeho každodenního života.

# Pipetování







appendorf

pMotion 5075

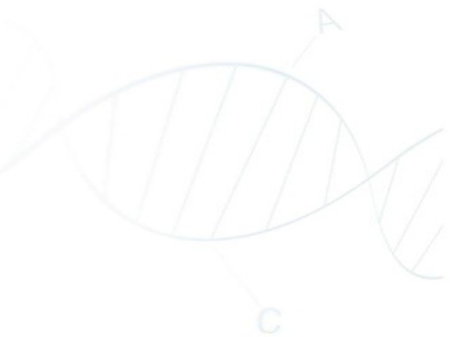
appendorf  
in GERMANY

Hygiene Dokumentation



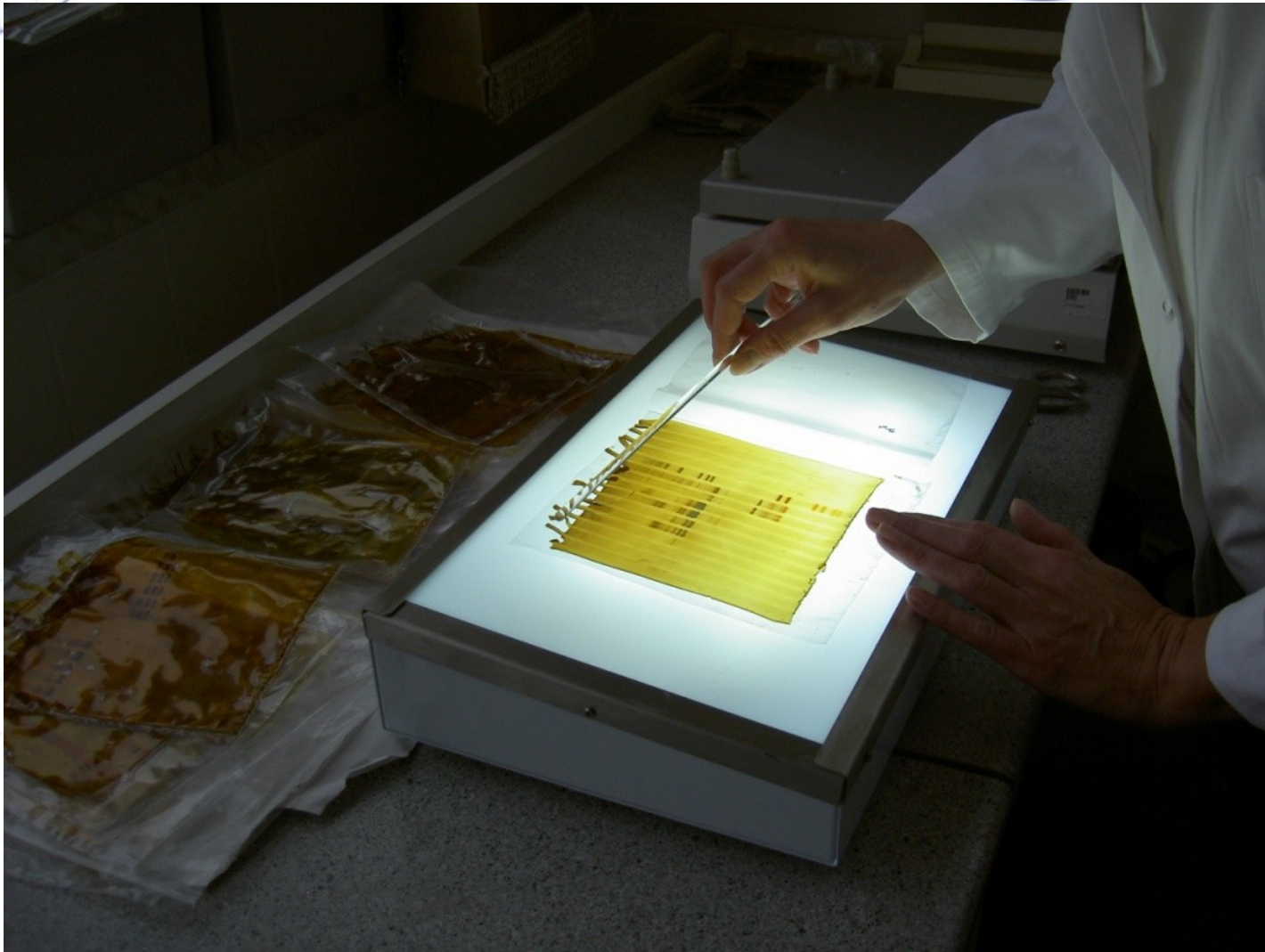
# Elektroforéza

K analýze jsou fragmenty vytríděny elektroforézou druhem elektrického "závodu". DNA má negativní elektrický náboj a je přitahována ke kladné elektrodě, tak jako se vzájemně přitahují jižní a severní pól na magnetu.





# Elektroforéza









# Real-time PCR



# Real-time PCR - HRM



# Sekvenace



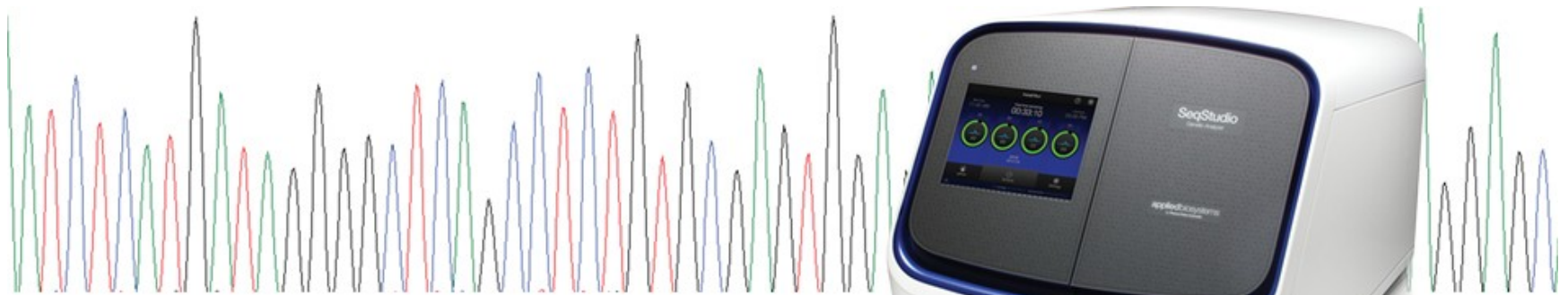
Celý obor ženou v posledních letech neskutečně rychle dopředu technologie.





Celý obor ženou v posledních letech neskutečně rychle dopředu technologie.

## New Applied Biosystems SeqStudio Genetic Analyzer



Nothing has changed,  
**except everything**



# Sekvenování nové generace („next-generation sequencing“, NGS)

Revoluční technologie.

Poskytuje levné, správné a přesné informace  
o genomické sekvenci.

Tato technologie od svého uvedení postupně téměř ovládla oblast základního či aplikovaného výzkumu zabývajícího se analýzou DNA.

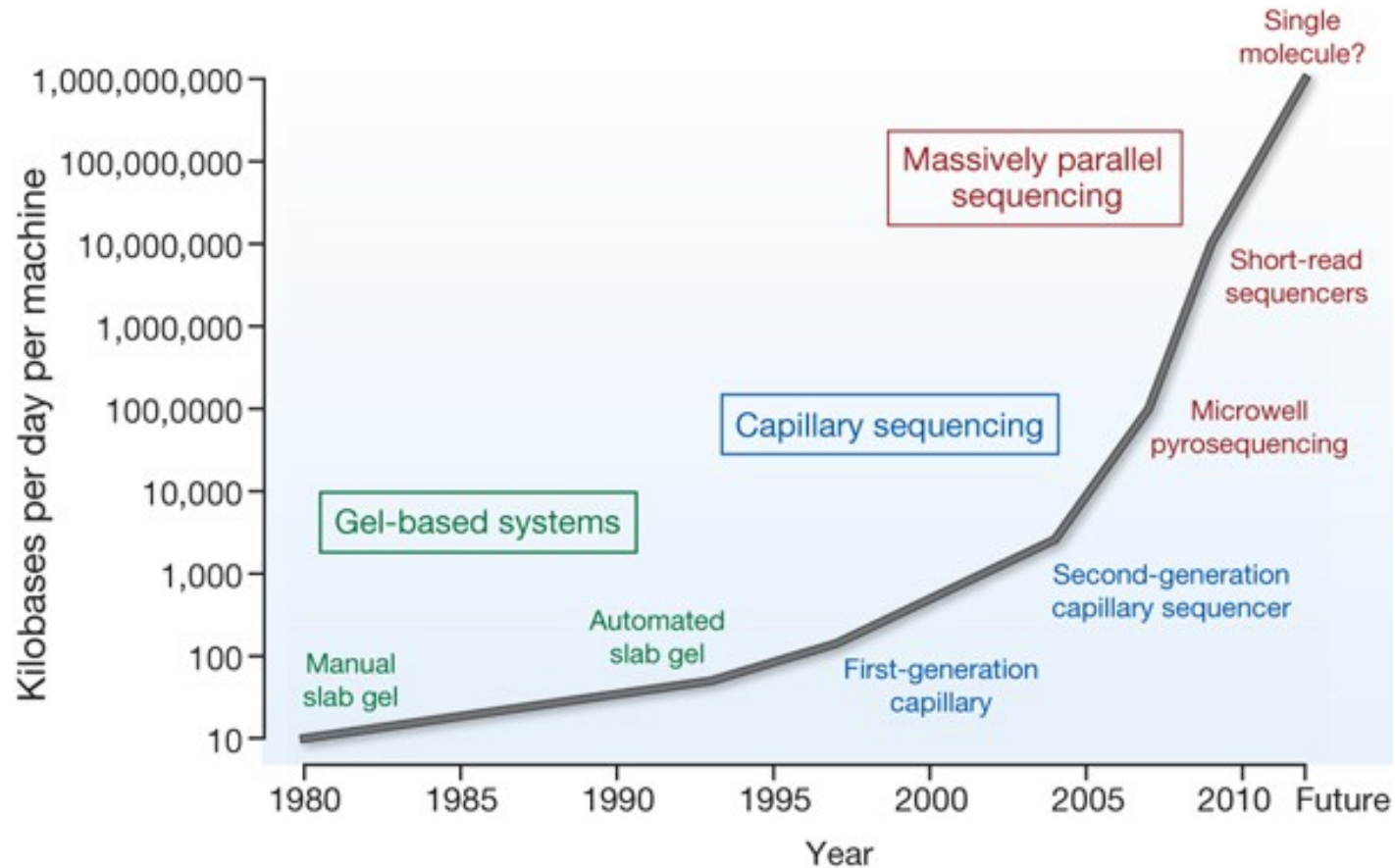


©2011, Illumina Inc. All rights reserved.





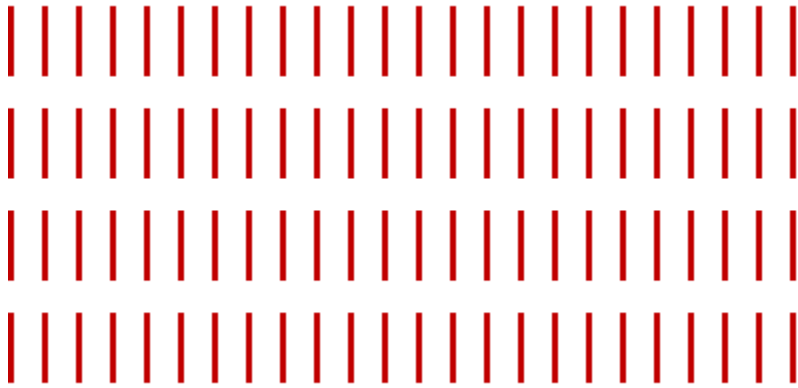
# Vývoj sekvenačních metod za posledních 30 let



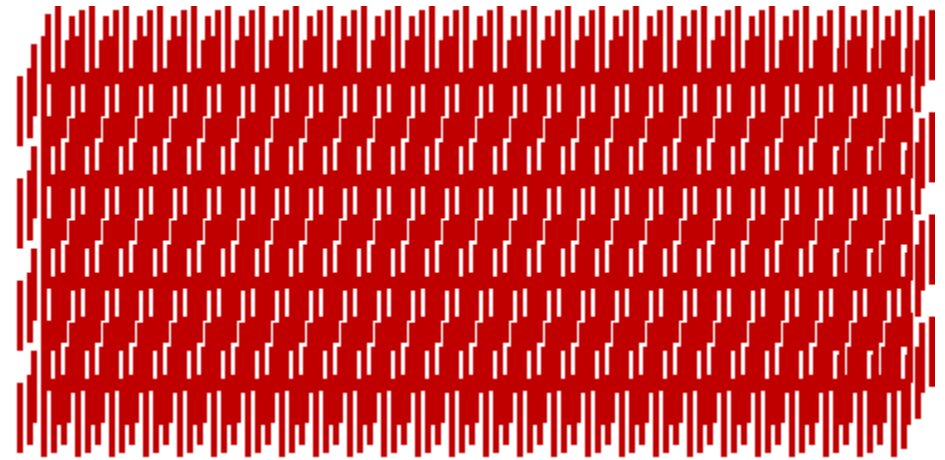
Stratton et al. 2009 Nature 458:719-724

# Kapilární vs. Masivně paralelní sekvenování

Miniaturizace a paralelizace



96 DNA fragmentů  
sekvenováno zároveň



Miliony DNA fragmentů  
sekvenováno zároveň



# MPS

V současné době se MPS v klinické diagnostice přesunuje od sekvenování malého rozsahu zaměřeného na analýzu jednotlivých genů nebo vybraných skupin genů asociovaných s konkrétním onemocněním k panelovému sekvenování až stovek genů asociovaných s diagnózou až k exomovému sekvenování se zaměřením na klinicky významné geny.  
„Bohaté“ laboratoře už nyní sekvenují celogenomově.

Rozlišují se postupy:

**amplikonové sekvenování** - využití zejména k ultrahlubokému sekvenování  
**(hybridization-based capture sequencing, Hyb-Seq** - panelové sekvenování – sekvenační knihovna je připravena hybridizací sond komplementárních k cílové sekvenci zájmu) – využití k ultraširokému sekvenování

# Panelové sekvenátory firmy Illumina

- využití v diagnostice



MiniSeq



MiSeq\*



MiSeq Dx†



MiSeq FGx‡



NextSeq\*

	MiniSeq	MiSeq*	MiSeq Dx†	MiSeq FGx‡	NextSeq*
Output Range	1.8-7.5 Gb	0.3-15 Gb	0.3-15 Gb	0.3-15 Gb	20-120 Gb
Run Time	4-24 hr	5-55 hr	4-55 hr	4-55 hr	11-29 hr
Reads per Run	8-25 million	1-25 million	1-25 million	1-25 million (for research)	130-400 million
Maximum Read Length	2 x 150 bp	2 x 300 bp	2 x 300 bp	2 x 300 bp	2 x 150 bp
Samples per Run§	1-96	1-96	N/A	N/A	12-36
Relative Price per Sample§	Higher Cost	Mid Cost	Mid Cost	Mid Cost	Highest Cost
Relative Instrument Price§	Lower Cost	Mid Cost	Mid Cost	Mid Cost	Lowest Cost



# Celogenomové sekvenátory firmy Illumina

- využití ve výzkumu



NextSeq\*



HiSeq 4000\*



NovaSeq 6000\*\*

	NextSeq*	HiSeq 4000*	NovaSeq 6000**
Output Range	20-120 Gb	125-1500 Gb	134-6000 Gb
Run Time	11-29 hr	<1-3.5 days	13-44 hr
Reads per Run	130-400 million	2.5-5 billion	Up to 20 billion
Maximum Read Length	2 x 150 bp	2 x 150 bp	2 x 150 bp
Samples per Run†	1	6-12	4-48
Relative Price per Sample†	Highest Cost	Lower Cost	Lowest Cost
Relative Instrument Price†	Lowest Cost	High Cost	Higher Cost

# Technologie single-molecule sekvenování třetí generace sekvenování

- Představuje výraznou změnu ve vývoji nových sekvenačních metod
- Nevyužívá žádný amplifikační krok před vlastním sekvenováním, což zkracuje dobu přípravy DNA a snižuje chybovost pramenící z amplifikace DNA
- Redukuje cenu
- Umožňuje vyšší flexibilitu v délce čtení
- Umožňuje přesnou kvantifikaci DNA molekul, protože signál je zaznamenáván v reálném čase

# Celogenomové sekvenování: všechny varianty v jednom experimentu

DNA z krve/slin



Genom se 'všemi' variantami

```
TTAACCCCTTCGATGCTCATCAAATCGTATCTCCGAAAATCTCTTTATG
TATCTTACITCCACCACATAATCTACGAAGCTATCAATGTTTARGATGGTCAG
GTTTGTTAACAACTGATTTGAATCTGATAAGCGGAAGAGTTGCTAATAATGA
GCAAAAATACAAAAAATCTTGGATCTATCGATAACAGCCGAGGTGCCAATC
TACAAATAAAAAGCTTACTTTGGATACTTTGACAGTTGGACACTCAAAAGAA
TGCGAAGTTATATTAATGGCAAACGTATTCCTGAGACTGCCAGAGCTGTAAT
TCTATGAATAAAACTGGCTTATTGAAGTACCATCTTACATTTAAACAAGT
TGTGTCTTTTATAATCACGTTACGAAAGATAACATACTCAAAAAGTCTTCAA
AAGCTTTTCTAACATATATCAAAAAGTGATCATAATTCTGAAAATCCTTATAT
GATTTAGCACAGAGAAGATGGATATTTAACCTTGGCTCCTAATTTGGTGTATA
AAAAAGGAAAGAGGAAGGTGGTTTTGTAACATATTTGCAGACATCCATCTATC
CTAATATCCAATCTGGTATAATAAAAAGATCAGAAGGGTTTACTATTAAAT
ACAATTTGCACATCTTTTAAATGCTGATTTTGATGGAGATGAGATGACAATAT
CAATCCCCATGTGCCAATCTCGAACAAGCTTTGATTATGAACCTCACGAAAT
AAAAATCTATAACAAGCAATCCAATGTTGGGTTGGTCCAAGATCAAATACC
AATAAGTTATATAGACGACAAAATATACATATAACGATGCGTTGGTGATT
ATCCCAATTCCTTATACACGCAATATACATATAACGATGCGTTGGTGATT
```

Přesnost  
Rychlost  
Cena



# Masivně paralelní sekvenování

## Přesnost

Krátké čtení sekvence spolehlivé pro většinu aplikací

Průměrné sekvenční pokrytí spolehlivé pro detekci bodových mutací

Dlouhé čtení sekvence lepší pro strukturální variace, opakované expanze, ale vysoká míra chyb pro detekci variace jednotek nukleotidů

## Rychlost

Technologie krátkého čtení umožňuje sekvenaci exomu a genomu ve dnech

Lze sekvenovat tisíce genomů na jednotlivých platformách ročně

Dlouhá čtení genomů stále trvají delší dobu



# Masivně paralelní sekvenování

Cena za přečtení jedné báze DNA klesla během minulých deseti let více než milionkrát.  
Takto prudké snížení nemá precedens v dějinách ekonomie zboží na světě

1980 byla schopna jedna laboratoř sekvenovat 1 000 pb za den,  
2000 1 000 pb za vteřinu.

2003 byl přečten genom člověka za 3 miliardy dolarů.

2005 byl přečten genom šimpanze za 50 milionů dolarů.

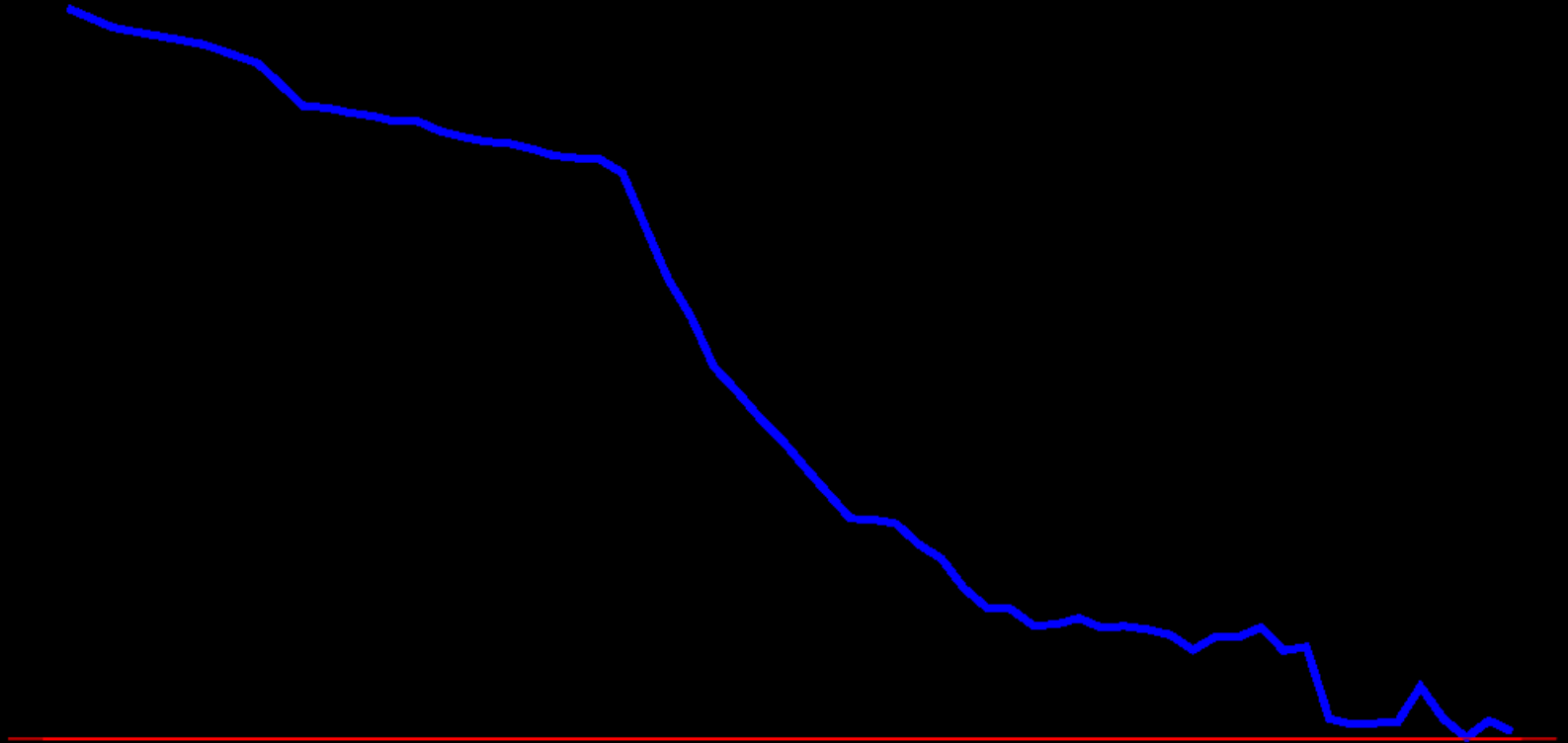
2007 byl publikován první genom konkrétního člověka, C. Ventera za 100 milionů dolarů.

2008 publikován genom J. Watsona - sekvenován za čtyři měsíce, za jeden milion dolarů

V r. 2011 sekvenování genomu trvá jeden den, stojí 1 000 dolarů a je sekvenováno 1 000 lidí.

V r. 2016 je cena pod 1 000 dolarů a sekvenování genomu kohokoli z nás trvá několik hodin.

# Náklady na sekvenování lidského genomu (s rozumnou kvalitou pro identifikaci variant)



# The UK 100,000 Genomes Project



**100,000** genomes



**70,000** patients and family members

```
110001010101001010100101010000101  
110110111010101010001011101000101  
110101010001001101010001010100010  
001001001110010001000010101010100  
1001111011001010101110101111001101
```

**21** Petabytes of data.  
1 Petabyte of music would take 2,000 years to play on an MP3 player.



**13** Genomic Medicine Centres, and  
**85** NHS Trusts within them are involved in recruiting participants



**1,500** NHS staff  
(doctors, nurses, pathologists, laboratory staff, genetic counsellors)



**2,500** researchers and trainees from around the world





# Declaration for delivering cross-border access to **genomic database**



1 million **genomes accessible** in the EU by 2022



**Linking access** to existing and future genomic database across the EU



Providing a sufficient scale for **new clinically impactful** associations in research

# Declaration for delivering cross-border access to genomic database

19 evropských zemí (do 12. 11. 2018) podepsalo prohlášení o poskytnutí přístupu napříč hranic k jejich genomové informaci.

Jedná se o významnou událost pro evropský zdravotní výzkum a klinickou praxi: sdílení více genomických dat zlepší porozumění a prevenci nemocí, což umožní lépe individuální léčbu (a cílené léky), zejména u vzácných onemocnění, rakoviny a nemocí souvisejících s mozkem.



# Declaration for delivering cross-border access to genomic database

Toto prohlášení předpokládá zejména:

- Sloučit fragmentovanou infrastrukturu a odborné znalosti podporující společný a hmatatelný cíl: **Jeden milion genomů dostupných v EU do roku 2022**;
- Využít a maximalizovat investice, které již provedly členské státy na vnitrostátní úrovni a na úrovni EU, zejména v oblasti sekvencování, biobankovnictví a datové infrastruktury;
- Dosažení větší kohorty, která poskytne dostatečnou míru pro nový klinicky účinný výzkum.

Česká republika patří k zakládajícím zemím - 10. 40. 2018,

- určení haploskupin, mt skupin
- sekvenace 1000 genomů/90 mil. Kč



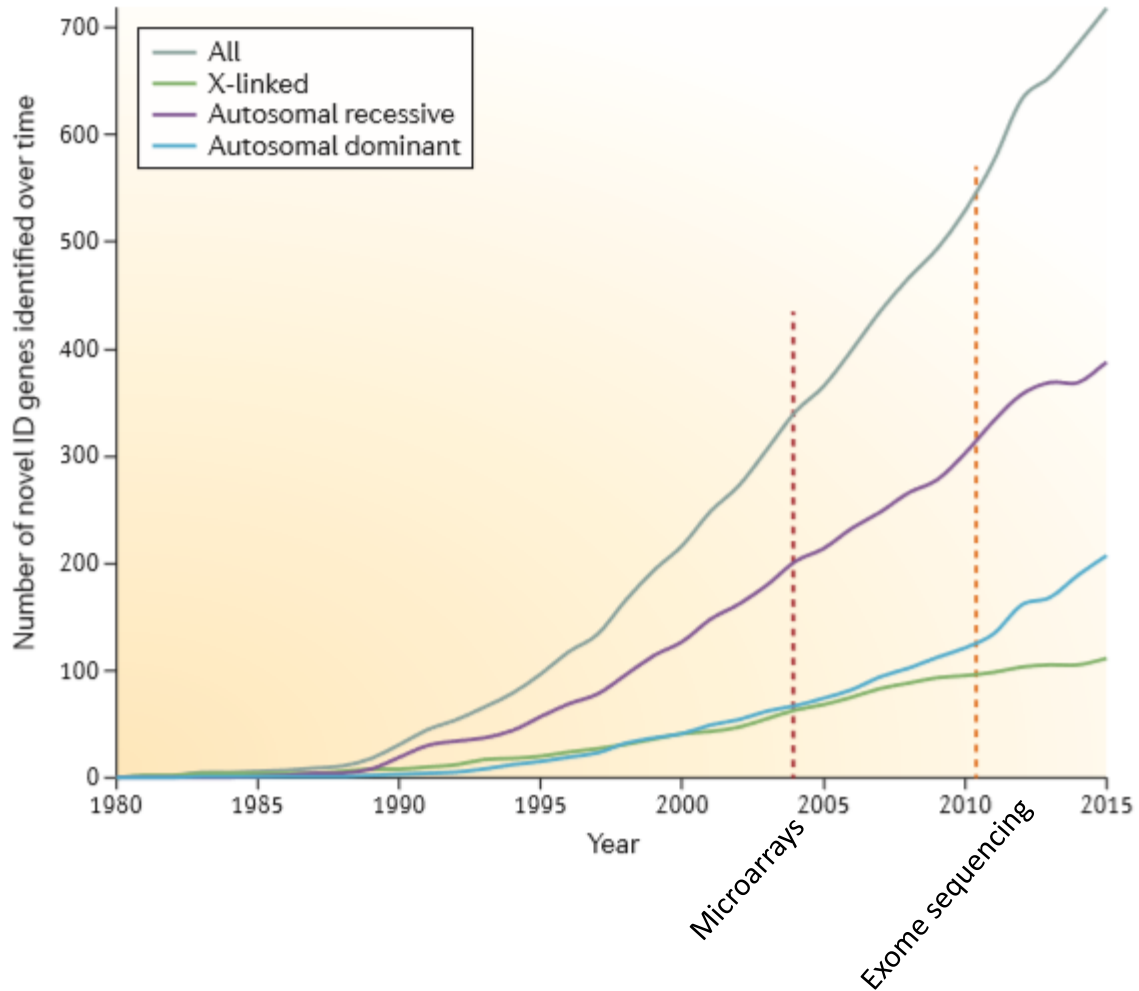
Vyspělé technologie umožňují molekulárním genetikům získat stále více informací o genetické výbavě analyzovaného člověka.

Otázka je:

Víme, jak s nimi naložit?

Víme, jak je použít ve prospěch člověka?

# Identifikace genů



Vissers, Gilissen & Veltman. Nat Rev Genet 2016

## GUINNESS WORLD RECORDS

**Stephen Kingsmore, M.D., D.Sc., president and CEO of Rady Children's Institute for Genomic Medicine at Rady Children's Hospital-San Diego**  
rekord pro nejrychlejší diagnózu sekvenováním genomu.



*Dr. Kingsmore receives the GUINNESS WORLD RECORDS™ certificate for the fastest genetic diagnosis.*

**2016 – 26 hodin**  
**2018 - 19.5 hodin!**



Sekvence naší DNA,  
vhodně zašifrovaná,  
se zanedlouho stane  
standardní součástí naší  
elektronické zdravotní  
dokumentace.

Collins, F., (2010) *The Language of Life*. Profile  
Books LTD. London, GB.

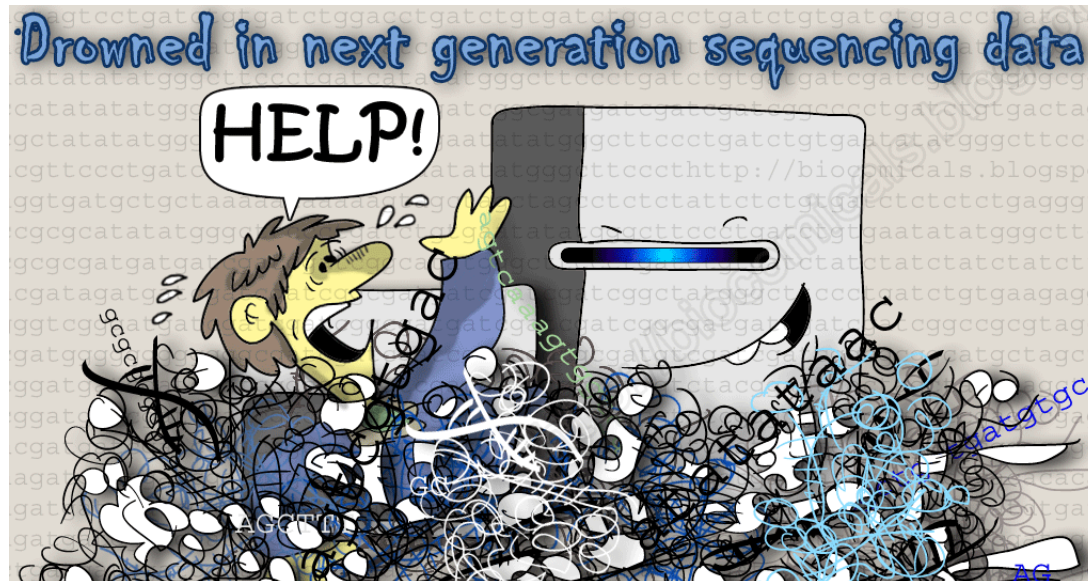


# Interpretace genetických analýz

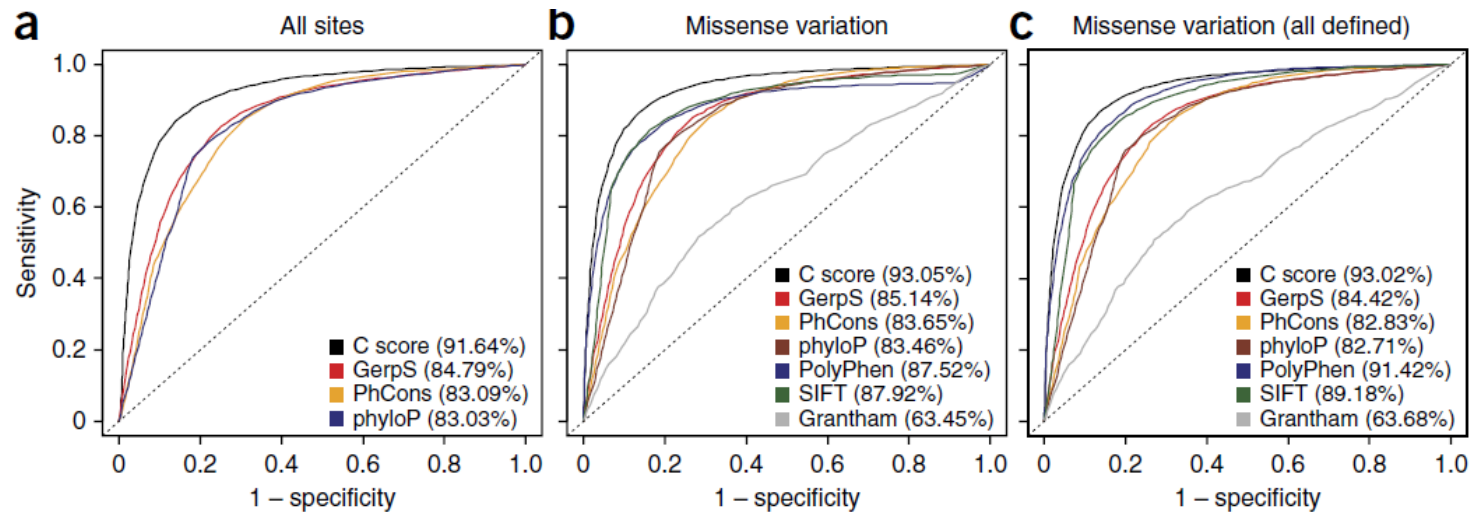
Problematickou část genetické analýzy představuje interpretace výsledků, již by měl se vši obezřetností provádět pouze odborník.

Výpovědní hodnota některých genetických variant je vysoká, zatímco u jiných je nejasná.

Jen asi sedm tisíc nemocí je monogenních (cystická fibróza, hemofilie), zatímco většina znaků i nemocí je důsledkem složité souhry mnoha genů, často v kombinaci s působením vlivů prostředí.



# Predikční programy patogenicity



CADD	Combined 63 annotations into one meta-score (C score) for the entire genome based on a SVM	<a href="http://cadd.gs.washington.edu/">http://cadd.gs.washington.edu/</a>
Eigen	Spectral approach to the functional annotation of genetic variants in coding and non-coding regions.	<a href="http://www.columbia.edu/~ii2135/eigen.html">http://www.columbia.edu/~ii2135/eigen.html</a>
DANN	DANN used the same feature set and training data as CADD to train a deep neural network (DNN).	<a href="https://cbcl.ics.uci.edu/public_data/DANN/">https://cbcl.ics.uci.edu/public_data/DANN/</a>
FitCons	Predictions of pathogenicity for the entire genome based on evolutionary conservation and functional data	<a href="http://compgen.cshl.edu/fitCons/">http://compgen.cshl.edu/fitCons/</a>
SPANR/SPIDEX	Trained a model optimized for the prioritization of splice site variants with a deep learning approach	<a href="http://www.deepgenomics.com/spidex">http://www.deepgenomics.com/spidex</a>
HAL	Prioritization of splice site variants based on their effect of (alternative) RNA splicing	<a href="http://splicing.cs.washington.edu">http://splicing.cs.washington.edu</a>
PHIVE	Analysis of exome variants by computing phenotype similarity between human disease phenotypes and phenotype information from knockout experiments in model organisms	<a href="http://www.sanger.ac.uk/resources/databases/exomiser">http://www.sanger.ac.uk/resources/databases/exomiser</a>
RVIS	The Residual Variation Intolerance Score or RVIS is a gene based score to prioritize disease genes based on intolerant to genetic variation	<a href="http://genic-intolerance.org/">http://genic-intolerance.org/</a>

# Klasifikace variant: ACMG-AMP doporučení

American College of Medical Genetics and Genomics  
Association for Molecular Pathology  
2015

# ACMG-AMP GUIDELINES

---

(publikováno 2015)

© American College of Medical Genetics and Genomics

**ACMG STANDARDS AND GUIDELINES**

**Genetics  
inMedicine**

## **Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the **American College of Medical Genetics and Genomics** and the **Association for Molecular Pathology****

Sue Richards, PhD<sup>1</sup>, Nazneen Aziz, PhD<sup>2,16</sup>, Sherri Bale, PhD<sup>3</sup>, David Bick, MD<sup>4</sup>, Soma Das, PhD<sup>5</sup>, Julie Gastier-Foster, PhD<sup>6,7,8</sup>, Wayne W. Grody, MD, PhD<sup>9,10,11</sup>, Madhuri Hegde, PhD<sup>12</sup>, Elaine Lyon, PhD<sup>13</sup>, Elaine Spector, PhD<sup>14</sup>, Karl Voelkerding, MD<sup>13</sup> and Heidi L. Rehm, PhD<sup>15</sup>;  
on behalf of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee

- týká se pouze sekvenčních variant

K čemu?

- nutný vznik jasného klasifikačního systému po nástupu NGS technologií a celoexomových a celogenomových sekvenačních platforem – vysoká frekvence genetických variant
- vyloučení subjektivního hodnocení variant a sjednocení klasifikace detekovaných variant napříč různými laboratořemi

=> 5 tříd

- pro každou třídu existují specifická klinická doporučení



# Klasifikační systém



NIH Public Access

Author Manuscript

*Hum Mutat*. Author manuscript; available in PMC 2011 April 13.

Published in final edited form as:

*Hum Mutat* 2008 November; 29(11): 1282–1291. doi:10.1002/humu.20880.

**Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results**

Sharon E. Plon<sup>1,\*,#</sup>, Diana M. Eccles<sup>2,\*</sup>, Douglas Easton<sup>3</sup>, William D. Foulkes<sup>4</sup>, Maurizio Genuardi<sup>5</sup>, Marc S. Greenblatt<sup>6</sup>, Frans B.L. Hogervorst<sup>7</sup>, Noline Hoogerbrugge<sup>8</sup>, Amanda B. Spurdle<sup>9</sup>, and Sean Tavtigian<sup>10</sup> for the IARC Unclassified Genetic Variants Working Group<sup>†</sup>

Proposed Classification System for Sequence Variants Identified by Genetic Testing

Class	Description	Probability of being Pathogenic
5	Definitely Pathogenic	>0.99
4	Likely Pathogenic	0.95–0.99
3	Uncertain	0.05–0.949
2	Likely Not Pathogenic or of Little Clinical Significance	0.001–0.049
1	Not Pathogenic or of No Clinical Significance	<0.001

5 classes linked to validated quantitative measures of causality/ pathogenicity

Class	Clinical Testing	Surveillance Recommendations if At-Risk Relative is Positive	Research Testing of Family Members
5	Test at-risk relatives for variant	Full high-risk surveillance guidelines	Not indicated
4	Test at-risk relatives for variant*	Full high-risk surveillance guidelines	May be helpful to further classify variant
3	Do not use for predictive testing in at-risk relatives*	Based on family history (and other risk factors)	May be helpful to further classify variant
2	Do not use for predictive testing in at-risk relatives*	Treat as “no mutation detected” for this disorder	May be helpful to further classify variant
1	Do not use for predictive testing in at-risk relatives*	Treat as “no mutation detected” for this disorder	Not indicated

All 5 classes are linked to clinical recommendations

# ACMG-AMP doporučení

- kvalitativní zhodnocení dostupných informací o variantě
  - => 28 definovaných kritérií = důkazů s přiřazeným kódem a hodnotou (stand-alone, very strong, strong, moderate, supporting) a směřováním (benign/pathogenic)
- dle navazujících pravidel pak zařazení varianty do jedné z kategorií
  - 5) patogenní
  - 4) pravděpodobně patogenní
  - 3) varianta nejasného významu
  - 2) pravděpodobně benigní
  - 1) benigní

*De novo* mutace neexistují!?



# Whole genome sequencing (WGS)

## Celogenomové analýzy prokázaly

De novo mutace – jsou to mozaiky u rodičů, které jsme neviděli

Zárodečný genom - nutno analyzovat všechny zárodečné listy

### Zárodečný list

tři hlavní skupiny buněk, které vznikají během embryogeneze

#### ektoderm

vyvíjí se ve stadiu gastruly společně s entodermem.

Vzniká z něj většina epitelů, pokožka a její deriváty (vlasy, nehty), výstelka začátku a konce zažívací trubice, dále například čichové buňky, mozeček, tyčinky, čípky, dřeň nadledvin.

Specifickým typem ektodermu je neuroektoderm, z něhož vzniká nervová soustava a neurální lišta.

#### entoderm

Z entodermu se vyvíjí epitel trávicí soustavy (vyjma části úst, hltanu a řiti).

Také z něj vznikají buňky lemující obě žlázy, které jsou otevřeny do trávicí soustavy (játra, slinivka břišní), epitel Eustachovy trubice, část středního ucha, epitel průdušnice, průdušky a plicních alveol, povrch močového měchýře a části močové trubice

#### mezoderm

Mezi lidské orgány mezodermálního původu patří například svaly, kostra, oběhová soustava,

Vylučovací soustava, pohlavní soustava, v podstatě však také orgány vzniklé ze stěn coelomu (např. část cévní soustavy) a dále struna hřbetní



# *Detekce mozaicismu*

Vyšetření třech zárodečných listů

- Ektoderm – izolace DNA z bukalního stěru
- Mezoderm - izolace DNA z periferní krve
- Entoderm - izolace DNA z moči

# Molekulárně genetická diagnostika

- ❖ motor personalizované medicíny
- ❖ liquid biopsy
- ❖ neinvazivní prenatální screening
- ❖ prekoncepční testování

## Molekulární diagnostika má dnes tyto hlavní praktické přínosy:

### 1) genetický

- ❖ genetické příčiny jsou dnes odhalovány u stále většího počtu onemocnění

### 2) diagnostický

- ❖ v okamžiku, kdy jsou genetické faktory podílející se na vzniku onemocnění jsou zavedeny diagnostické testy do běžné klinické praxe
- ❖ musí však být potvrzena jejich klinická validita a ověřen jejich užitek
- ❖ dokážou určit nebo upřesnit diagnózu

### 3) prediktivní

- ❖ slouží k určení nositele patologické varianty genu asociovaného s nemocí odhalení genetické predispozice nebo náchylnosti k nemoci
- ❖ vyšetření, která předpovídají geneticky podmíněné nemoci před její manifestací

### 4) prognostický

- ❖ stanovení rizika dědičného přenosu

### 5) preventivní kroky s minimalizovanými vedlejšími účinky

### 6) terapeuticko-indikační

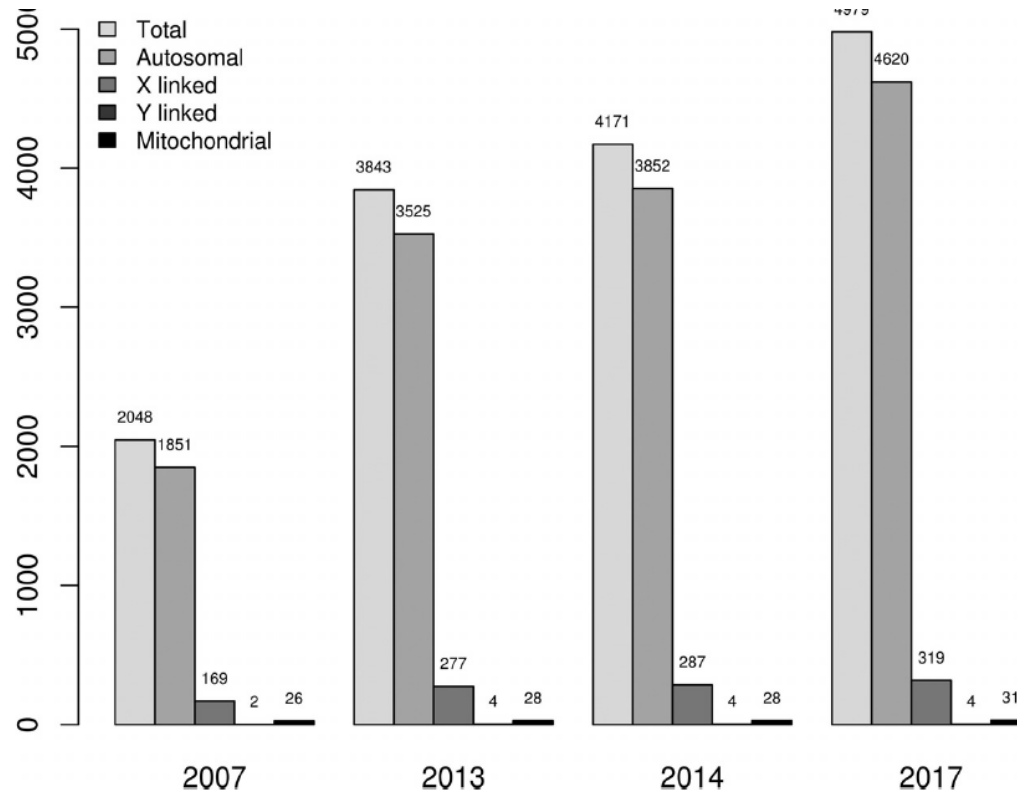
- ❖ pomocí genetických testů je možné dopředu určit, kteří jedinci budou mít největší prospěch z užívání konkrétního léku a u kterých pacientů bude naopak podávání léku spojeno se špatnou odpovědí a častými a závažnými nežádoucími účinky
- ❖ motor personalizované medicíny a cílené biologické léčby

**Molekulární diagnostika** má dnes tyto hlavní praktické přínosy:

**1) genetický**

❖ genetické příčiny jsou dnes odhalovány u stále většího počtu onemocnění

**Identifikace genů asociovaných s chorobami**



Fernandez-Marmiesse et al. Current Medicinal Chemistry 2018

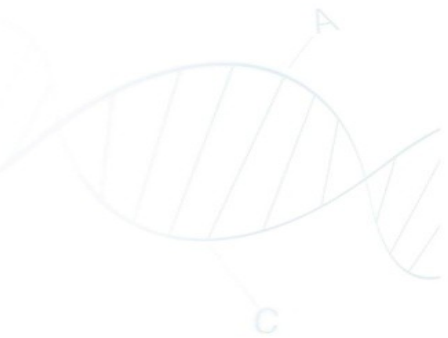


**Molekulární diagnostika** má dnes tyto hlavní praktické přínosy:

## 2) diagnostický

- ❖ v okamžiku, kdy jsou genetické faktory podílející se na vzniku onemocnění jsou zavedeny diagnostické testy do běžné klinické praxe
- ❖ musí však být potvrzena jejich klinická validita a ověřen jejich užitek
- ❖ dokážou určit nebo upřesnit diagnózu

stanoví nebo upřesní diagnózu

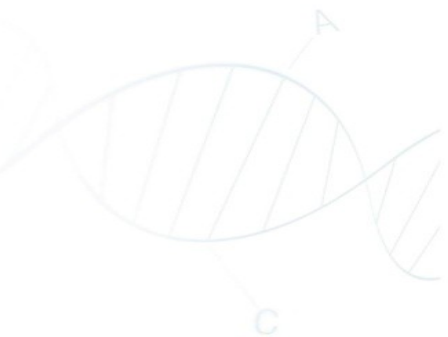


**Molekulární diagnostika** má dnes tyto hlavní praktické přínosy:

### **3) prediktivní**

- ❖ slouží k určení nositele patologické varianty genu asociovaného s nemocí  
odhalení genetické predispozice nebo náchylnosti k nemoci
- ❖ vyšetření, která předpovídají geneticky podmíněné nemoci před její manifestací

umožňují prediktivní diagnózu, tzn. identifikaci genetických onemocnění před jejich manifestací



**Molekulární diagnostika** má dnes tyto hlavní praktické přínosy:

### 3) **prediktivní**

## Huntingtonova choroba též Huntingtonova chorea (HD – Huntington's Disease)

- Je porucha poprvé popsána v roce 1872 americkým lékařem *Georgem Huntingtonem*.
- Jedná se o neurodegenerativní autosomálně dominantně dědičné onemocnění
- Patří mezi polyglutaminové poruchy
- Má incidenci 4–10 na 100 000.
- Manifestuje se nejčastěji ve středním věku.
- Mezi příznaky dominuje porucha motoriky, změny osobnosti, progredující demence a nakonec smrt.

Asociována s genem HTT (objeven v roce 1993).

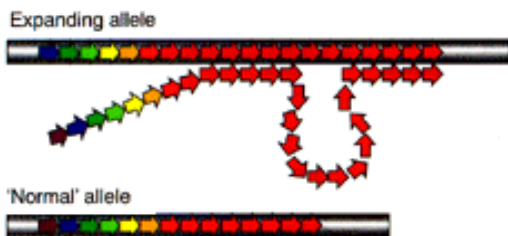
Gen kóduje protein huntingtin.

- Přesná funkce proteinu stále není známa
- Predominantně je exprimován v CNS.
- Interaguje s řadou transkripčních faktorů, je tedy pravděpodobná jeho významná role při normálním vývoji CNS,
- Rovněž byla demonstrována jeho důležitost pro normální průběh mitózy v CNS



<http://sk.tdmed.ru/diagnoz/24849-hvoroba-gentngtona-simptomi-lkuvannya.html>

# Huntingtonova choroba též Huntingtonova chorea



## Příčina onemocnění

zmnožené opakování tripletů CAG, což je kodon pro glutamin

- normální jedinci nesou ve svém genu 9–35 repetit CAG,
- postižení jedinci jich mají více než 40.

Čím je počet repetit větší, tím je nástup onemocnění časnější.

**Expandovaná repetice** se dědí od postiženého rodiče.

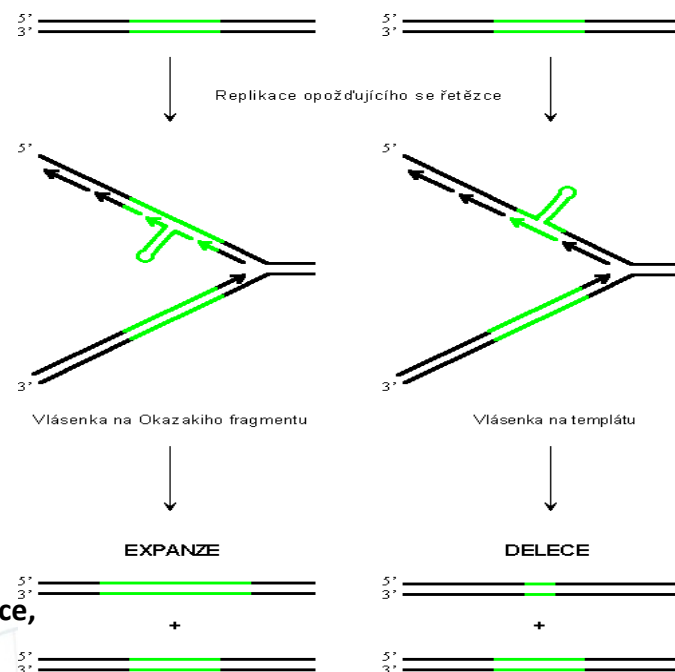
Při přenosu ovšem někdy dochází během replikace před tvorbou gamety k další expanzi této repetice.

Může proto nastat situace, kdy má rodič počet repetit při **horní hranici normy - premutace**, tj. je zdravý, potomek však získává alelu expandovanou, takže u něj nemoc propukne.

Expanze se u HD objevuje častěji během mužské gametogeneze

což je důvod, proč jsou těžké, časně se objevující formy s počtem repetit 70–120 děděny od otce.

Mohou se objevit i **nové mutace** – asi 25 % pacientů má negativní rodinnou anamnézu.



# Huntingtonova choroba též Huntingtonova chorea

K dispozici je přímé **genetické testování** na přítomnost expanze v genu **HTT**

- zjištění statutu pacienta v genetickém riziku
- prenatalní
- preimplantační diagnostice

Vzhledem k neexistenci léčby je testování spojeno s *psychickými a etickými problémy*

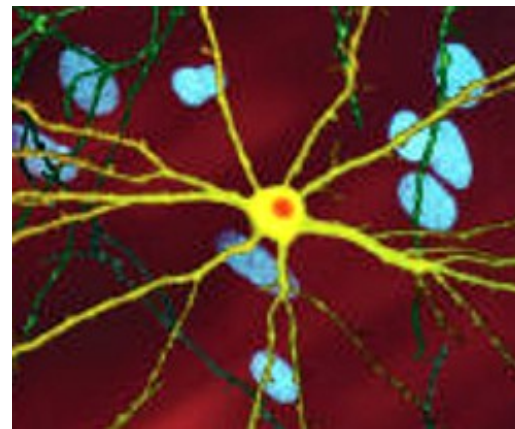
- hrozí psychická traumatizace pacienta,
- deprese
- v krajním případě i sebevražda.

Proto je k testování třeba přistupovat s rozvahou a pečlivě informovat pacienta o veškerých aspektech testování.

Před prediktivním (presymptomatickým) molekulárně genetickým vyšetřením na HD se postupuje podle speciálního protokolu, který kromě opakovaných konzultací s klinickým genetikem zahrnuje také vyšetření neurologické, psychiatrické a psychologické.

Vyšetření dětí a nezletilých osob v riziku na základě zájmu/žádosti jejich rodičů je nepřípustné (zachování **práva nevědět**).

HD je charakterizovaná **selektivní ztrátou neuronů** v bazálních gangliích, která se podílejí na koordinaci pohybů.



Oranžové inkluzní tělísko v jádře postiženého neuronu v popředí, modrá jádra zdravých neuronů v pozadí



Molekulární diagnostika má dnes tyto hlavní praktické přínosy:

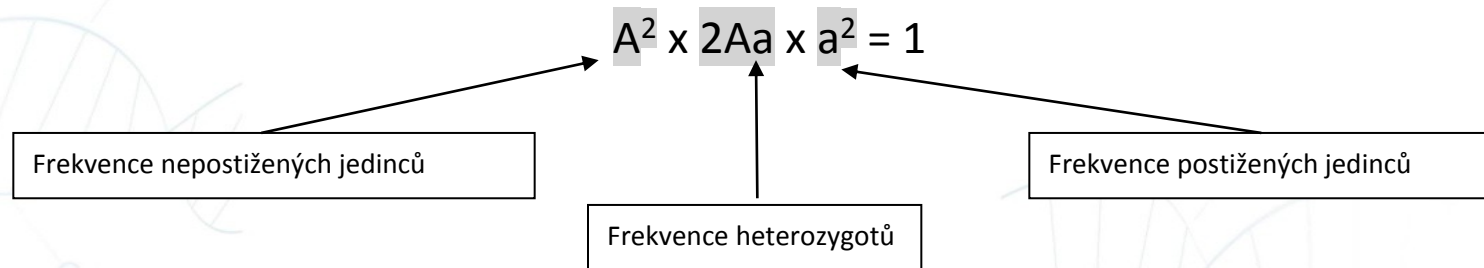
#### 4) prognostický

❖ stanovení rizika dědičného přenosu

Příklad

#### DÁRCOVSKÝ PROGRAM IVF

Riziko vybraných recesivních chorob pro potomky patientek využívajících dárcovské spermie/vajíčka/embrya počítané dle Hardy-Weinbergova zákona



# Molekulární diagnostika má dnes tyto hlavní praktické přínosy:

## 4) prognostický

❖ stanovení rizika dědičného přenosu

### Příklad

Dárce genotyp	Pacient genotyp	Onemocnění	Metoda detekce	Pravděpodobnost stanovení	Frekvence heterozygotů v populaci	Výpočet frekvence postižených potomků (genotyp: aa)	Riziko pro potomka
Nevyšetřený	Nevyšetřený	CF	Devyser	90,84 %	1/30*	$1/30 * 1/30 * 1/4^a$	1/3600; 0,028 %
		SMA	MLPA	95,00 %	1/40**	$1/40 * 1/40 * 1/4^a$	1/6400; 0,016 %
		Prelinguální hluchota (connexin 26)	Sekvenace exonu 2	99,00 %	1/30***	$1/30 * 1/30 * 1/4^a$	1/3600; 0,028 %
Dárce genotyp	Pacient genotyp	Onemocnění	Metoda detekce	Pravděpodobnost stanovení	Frekvence heterozygotů v populaci	Výpočet frekvence postižených potomků (genotyp: aa)	Riziko pro potomka
Homozygot <sup>b</sup> (AA)	Nevyšetřený	CF	Devyser	90,84 %	1/30	$[1/30 * (1 - 0,9084)] * 1/30 * 1/4^a$	1/39 301
		SMA	MLPA	95,00 %	1/40	$[1/40 * (1 - 0,9500)] * 1/40 * 1/4^a$	1/128 000
		Prelinguální hluchota (connexin 26)	Sekvenace exonu 2	99,00 %	1/30	$[1/30 * (1 - 0,9900)] * 1/30 * 1/4^a$	1/360 000

# Molekulární diagnostika má dnes tyto hlavní praktické přínosy:

## 4) prognostický

❖ stanovení rizika dědičného přenosu

### Příklad

Dárce genotyp	Pacient genotyp	Onemocnění	Metoda detekce	Pravděpodobnost stanovení	Frekvence heterozygotů v populaci	Výpočet frekvence postižených potomků (genotyp: aa)	Riziko pro potomka
Homozygot <sub>b</sub> (AA)	Homozygot <sup>b</sup> (AA)	CF	Devyser	90,84 %	1/30	$[1/30 * (1 - 0,9084)]^2 * 1/4_a$	1/429 053
		SMA	MLPA	95,00 %	1/40	$[1/40 * (1 - 0,9500)]^2 * 1/4_a$	1/2 560 000
		Prelinguální hluchota (connexin 26)	Sekvenace exonu 2	99,00 %	1/30	$[1/30 * (1 - 0,9900)]^2 * 1/4_a$	1/36 000 000

Dárce genotyp	Pacient genotyp						
Heterozygot (Aa)	Nevyšetřený	CF	Devyser	90,84 %	1/30	$1/1 * 1/30 * 1/4_a$	1/120; 0,833 %
		SMA	MLPA	95,00 %	1/40	$1/1 * 1/40 * 1/4_a$	1/160; 0,625 %
		Prelinguální hluchota (connexin 26)	Sekvenace exonu 2	99,00 %	1/30	$1/1 * 1/30 * 1/4_a$	1/120; 0,833 %

**Molekulární diagnostika** má dnes tyto hlavní praktické přínosy:

**5) preventivní kroky s minimalizovanými vedlejšími účinky**

umožňují identifikaci přenašečů genetických onemocnění

(např. Prekoncepční testování autozomálně recesivních a X-vázaných recesivních chorob

umožňují prenatální a preimplantační diagnostiku

odhalují závažné genetické onemocnění před narozením dítěte

# Prekoncepční testování autozomálně recesivních a X-vázaných recesivních chorob

- ❖ Za nejvhodnější dobu k provedení screeningu je považováno období před početím.
- ❖ Většinou se jedná o období rané dospělosti.
- ❖ V tomto období je k dispozici nejvíce reprodukčních možností, pokud se zjistí, že jsou oba partneři přenašeči autozomálně recesivní choroby

K reprodukčním možnostem dostupným před početím patří

- upuštění od (dalšího) těhotenství
- přijetí rizika, že se narodí dítě ovlivněné chorobou
- adopce
- prenatální diagnostika s možností ukončit nebo neukončit ovlivněné těhotenství
- preimplantační genetická diagnostika při technikách in vitro fertilizace (IVF)
- náhradní mateřství
- použití darovaných spermií/vajíčka od jedince, který není přenašeč.



# Prekoncepční testování autozomálně recesivních a X-vázaných recesivních chorob

## Kritéria volby nemocí

- (1) Screeningový program by měl odpovídat na potřeby společnosti.
- (2) Věcný cíl screeningu by měl být jasně definován na počátku programu.
- (3) Měla by být definovaná cílová populace.
- (4) Efektivita screeningového programu by měla být vědecky podložena.
- (5) Screeningový program by měl zahrnovat vzdělávání, testování a klinické služby a management.
- (6) Měly by existovat záruky kvality a mechanismy k minimalizaci možných rizik screeningu.
- (7) Program by měl zaručovat důvěrnost, respekt k autonomii jedince, a účast v něm by měla být podmíněna informovaným souhlasem.
- (8) Program by měl podporovat rovnost a přístup ke screeningu pro celou cílovou populaci.
- (9) Závěrečné zhodnocení screeningového programu by mělo být naplánováno na jeho začátku.
- (10) Celkový přínos screeningu by měl převažovat nad negativy.

# Prekoncepční testování autozomálně recesivních a X-vázaných recesivních chorob

## Etické otázky

V souvislosti se screeningem se objevuje několik etických otázek, které byly formulovány zdravotnickými odborníky i laickou veřejností:

- Možná diskriminace, soukromí pacientů a ochranu dat nebo podávání informací třetím stranám.
- Domněnka, že by jedinci určení jako přenašeči mohli cítit tlak ze strany širší společnosti, aby učinili specifická rozhodnutí o reprodukci, patří k nejzávažnějším etickým tématům.
- Screening a následná selekce nezasažených potomků v rámci preimplantační diagnostiky nebo prenatalního testování může být vnímána jako eugenický nebo diskriminační přístup.
- Na osoby s nemocemi, na které bývá prováděn screening,

však nesmí být nahlíženo jako na zátěž pro společnost a je proto nutné zaručit nadále podporu a zdravotní péči pro děti, které se narodily se specifickým onemocněním, ač jejich rodiče věděli o jejich stavu ještě před jejich narozením.

**Součástí nastavení screeningového programu měl být i systém řádné ochrany takovýchto osob, který zaručuje reprodukční svobodu, nedirektivní genetické poradenství a interpretaci testů a**

**nutnost informovaného souhlasu.** V rámci Evropské unie, Evropského hospodářského společenství a Švýcarské federace je toto zakotveno v **Úmluvě na ochranu lidských práv a důstojnosti lidské bytosti**

**v souvislosti s aplikací biologie a medicíny.** V kapitole IV, článku 11 s uvádí: ‚Jakákoliv forma diskriminace osoby z důvodu jejího genetického dědictví je zakázána.‘ To je upřesněno v **zákoně č 373/2011 Sb.,**

kde se uvádí, že výsledky genetických vyšetření nesmějí být využity k diskriminaci testovaného ani geneticky příbuzných osob.

# Cystická fibróza

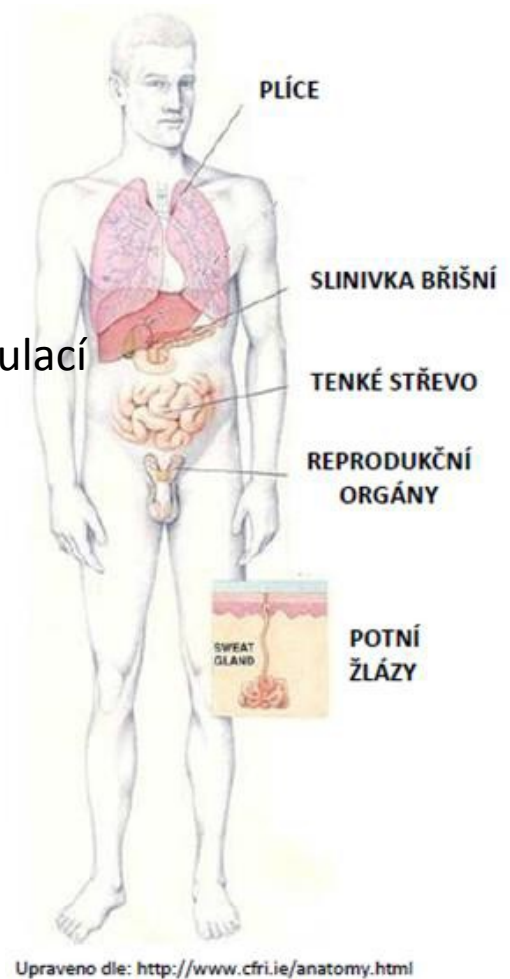
**nejčastější autozomálně recesivní onemocnění u evropských populací**  
**multiorgánové onemocnění**

- nadměrné množství **solí v potu**
  - plíce** a dýchací cesty
  - slinivka** břišní
  - mužská **sterilita**
- 
- primární příčina – mutace v genu kódujícím CFTR protein → iontový kanál**

hlavní funkce CFTR proteinu – **chloridový kanál** →

přenos chloridových aniontů přes membránu

- chybějící/nefunkční protein → nerovnováha iontového prostředí → porucha transportu vody → abnormálně viskózní hlenovitý sekret na epitelech → klinické projevy



# Cystická fibróza

především u evropských populací, v neevropských populacích je výskyt CF výrazně nižší

- frekvence přenašečů – přibližně 1 z 26-30
  - výskyt u 1 dítěte na 2500-4500 novorozenců
  - v ČR udáván 1 ze 4023 (dle výsledků NS nižší – 1 z 6946)
- ? vliv prenatální/preimplantační diagnostiky a možných důsledků z pozitivního nálezu?

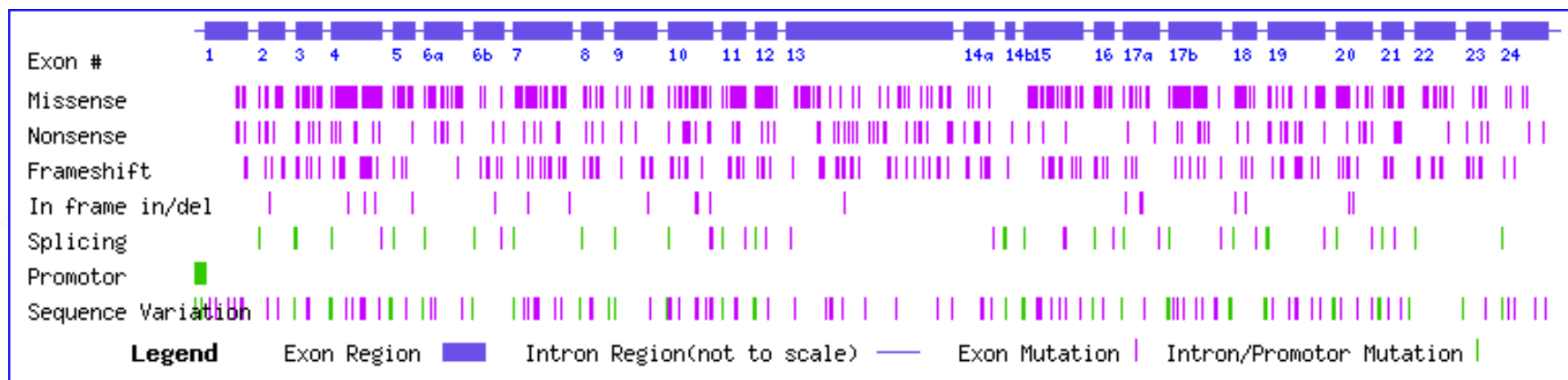
## Riziko u dítěte

Oba rodiče nemocného dítěte jsou zdravými nosiči patologie způsobujícího CF. Riziko narození dítěte s CF je u každého těhotenství takového páru 25%.

# Prekoncepční testování autozomálně recesivních a X-vázaných recesivních chorob

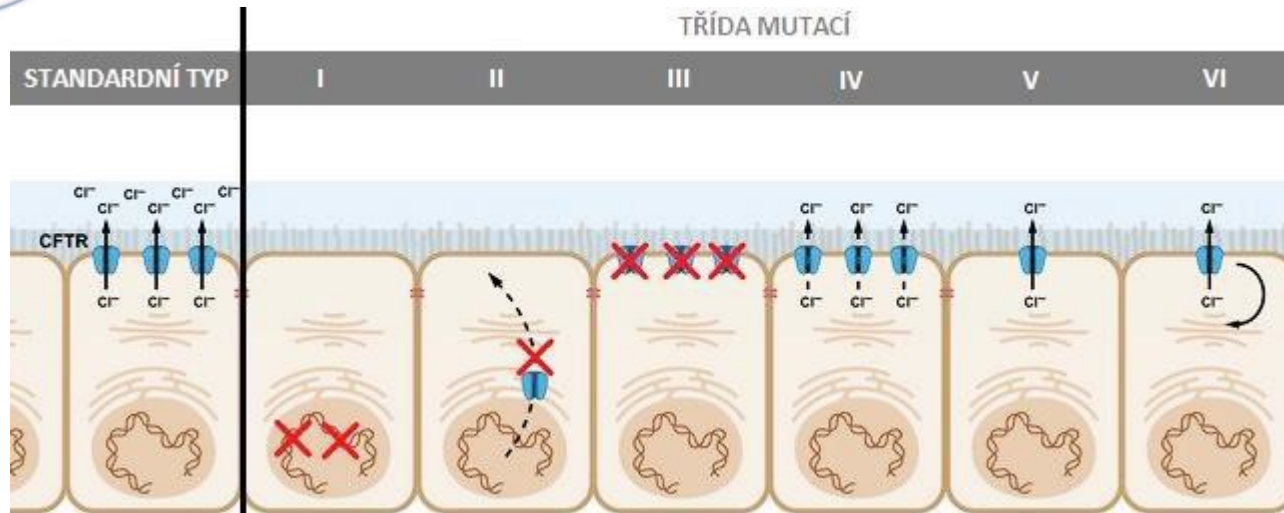
## Cystická fibróza

CFTR gen **2000** patologických variant  
Cystic Fibrosis Mutation Database





# Cystická fibróza



Amaral, M.D., 2015. Novel personalized therapies for cystic fibrosis: treating the basic defect in all patients. J. Intern. Med. 277, 155–166. upraveno

Třída I – Narušená syntéza proteinu

Třída II – Abnormální zpracování a intracelulární transport proteinu

Třída III – Porucha regulace proteinu

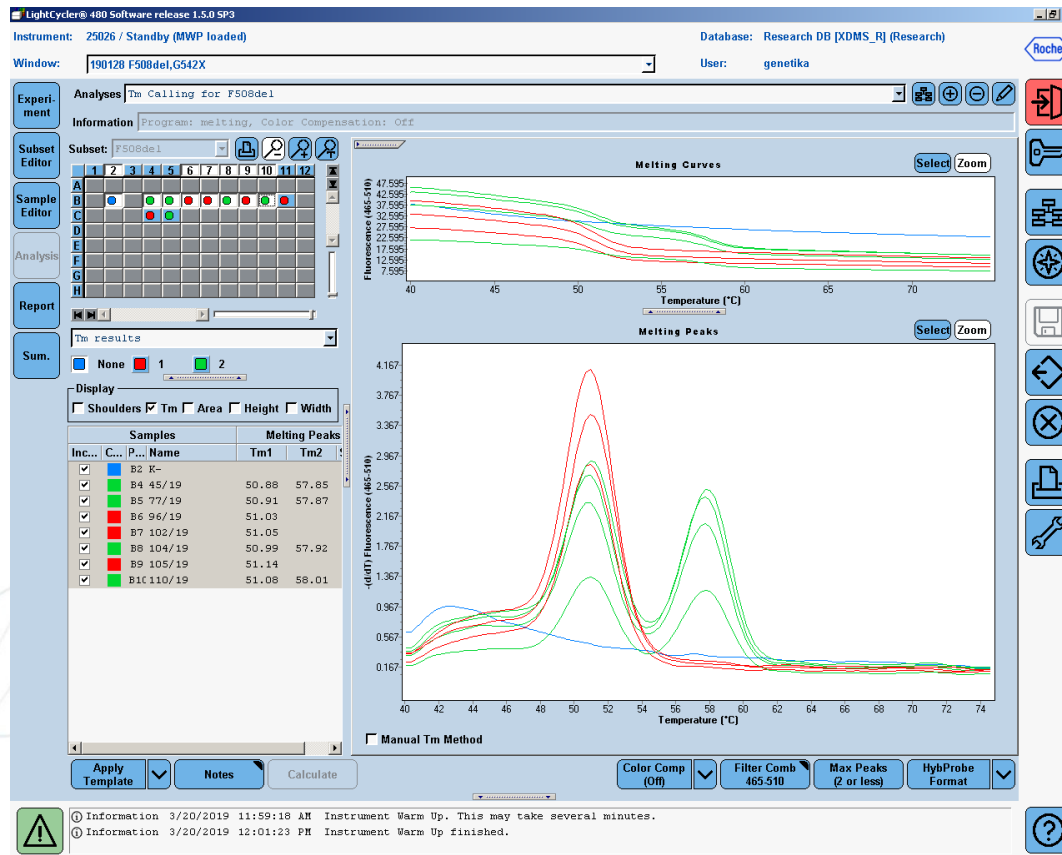
Třída IV – Narušení vodivosti chloridového kanálu

Třída V – Redukovaná syntéza a zhoršený intracelulární transport proteinu

Třída VI – Snížená stabilita proteinu

# Cystická fibróza

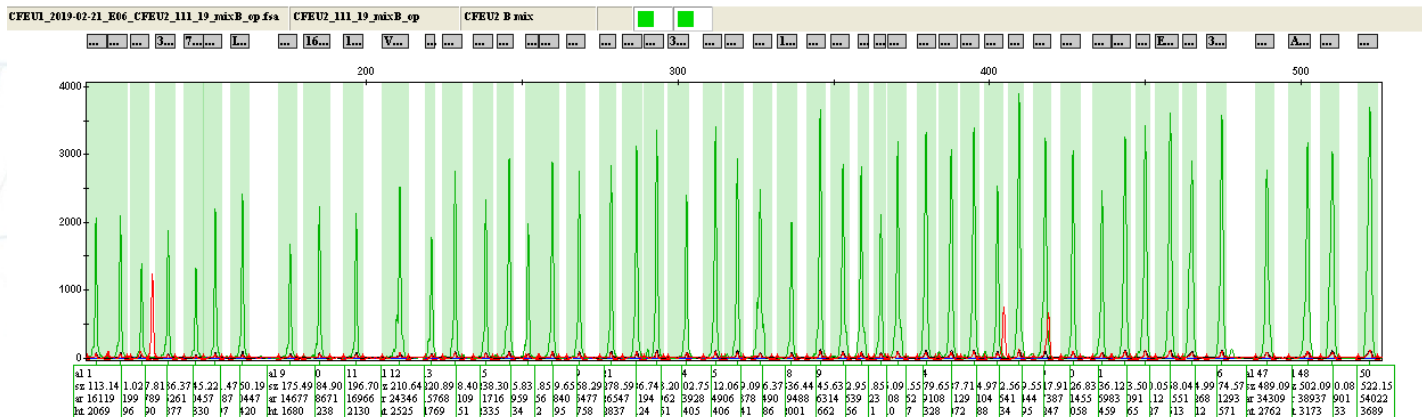
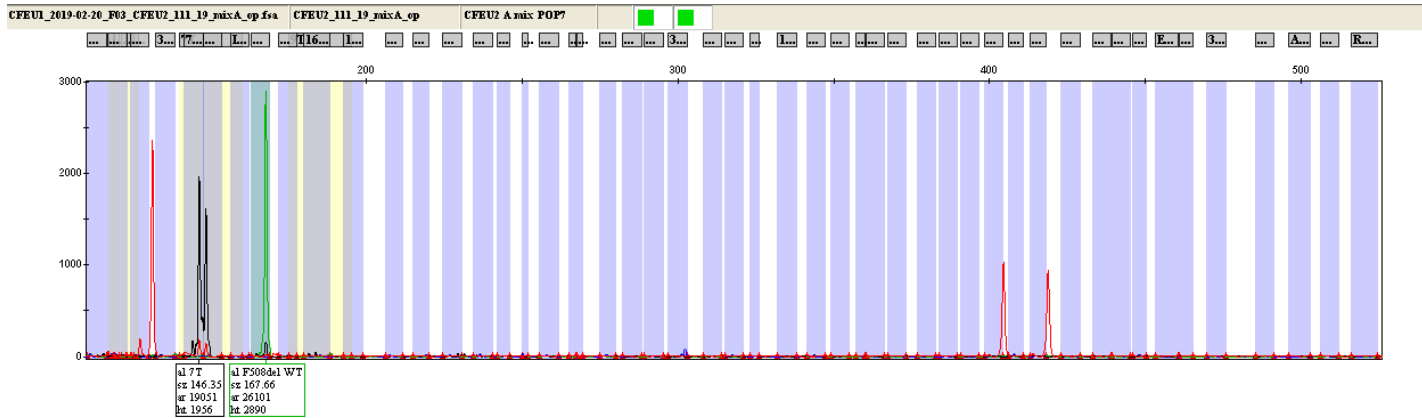
## Molekulární diagnostika



Metoda analýza teploty tání pomocí real-time PCR

# Cystická fibróza

## Molekulární diagnostika



Metoda fluorescenční multiplex ARMS (amplification refractory mutation system)  
Elucigene CF-EU

# Cystická fibróza

## Molekulární diagnostika ovlivňuje léčbu

### Ivacaftor

Pro pacienty s cystickou fibrózou (CF), kteří mají mutaci třídy III G551D, je od roku 2012 k dispozici kauzální léčba. Mechanismus účinku léku spočívá v opravě funkce chloridového kanálu CFTR, poškozeného touto mutací.

Aktivuje nefunkční CFTR na povrchu buněk a otevírá jej pro chloridové ionty.

Potvrzená účinnost nového léčebného postupu, reprezentovaného právě lékem ivacaftor, přináší reálnou naději, že bude časem možné řešit základní příčinu onemocnění i u pacientů s dalšími typy mutací v genu CFTR.

Pokud chloridový kanál na povrchu buněk zcela chybí, což odpovídá stavu u vůbec nejčastější mutace způsobující CF, tj. F508del, samotný ivacaftor zůstává neúčinný.

Pro takový typ molekulárního poškození je zapotřebí využít jiné skupiny léků, které dovedou ovlivnit vlastní tvorbu bílkoviny ve vnitru buňky a jimž se souhrnně říká korektory proteinu CFTR. Mezi nejlépe prozkoumané korektory CFTR patří léčebný přípravek

### Iumacaftor

(někdy označovaný jako látka VX-809; Vertex Pharmaceuticals).

Iumacaftor usnadňuje transport proteinu CFTR na buněčnou membránu a interferuje s potranslačním procesem jeho seskládání

III



II



# Molekulárně genetické testy činí preventivní kroky

**What is**

## **Long QT Syndrome?**

It is a pathological cardiac condition which involves fast irregular rhythms.





# Srdeční kanálopatie

Dědičná arytmogenní onemocnění

⇒ defektní iontové kanály, jejich podjednotky nebo asociované proteiny

=> chyba v akčním srdečním potenciálu

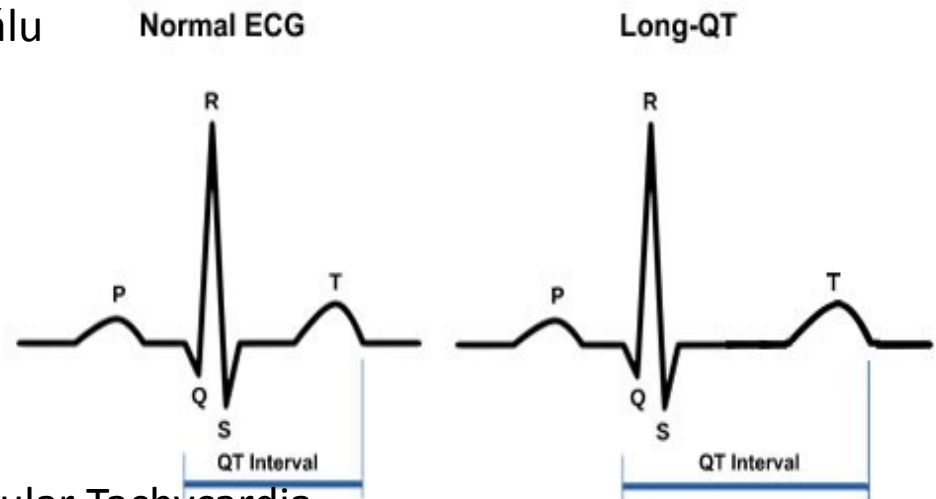
=> arrhythmie

## Syndromy

- Long QT Syndromes

- Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia

- Brugada Syndrome



## Manifestace

krátká pauza v srdečním tepu, chvění srdce, závratě a blackout => synkopa, náhlá smrt

# Long QT syndromy

Prevalence 1:2000

13 genů – 3 major genů => 3 major syndromy

LQT 1 (physical exercise and emotional stress; KCNQ1)

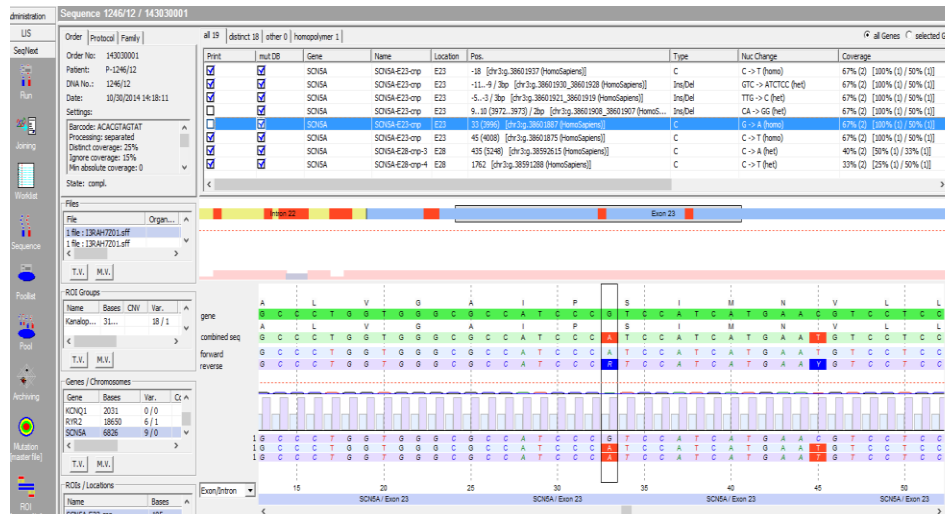
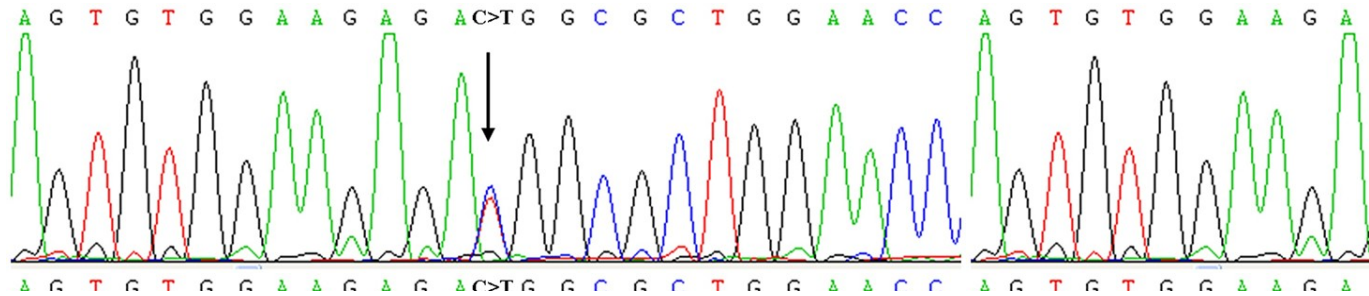
LQT 2 (sudden noises; KCNH2)

LQT 3 (sleep and rest; SCN5A)

40 a více asociovaných genů

# Diagnostika

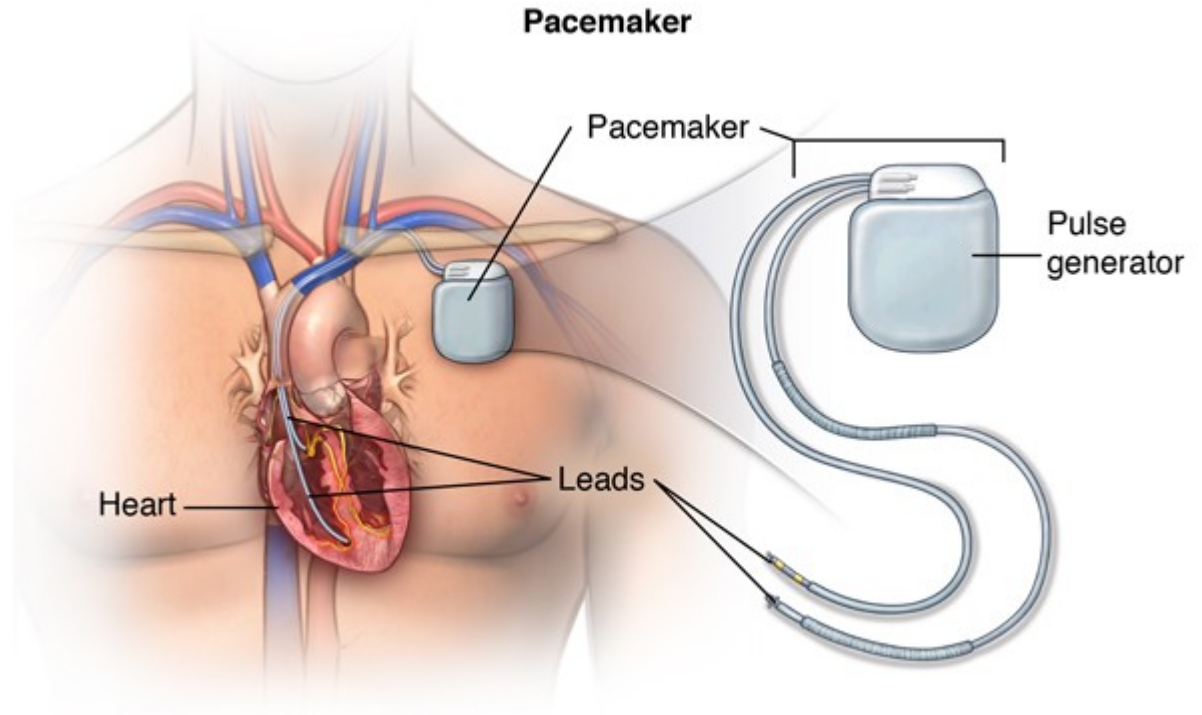
Kardiologická vyšetření – ECG, testing after physical exercise, Holter  
Genetické testování – Sanger sequencing, Next generation sequencing



SeqNext (JSI Medical Systems)

# Therapie

- Beta blockers
- Pacemaker
- Implantable cardioverter defibrillator (ICD)



# Molekulárně genetické testy činí preventivní kroky





# Prenatální vyšetření

## Zdroje fetální DNA - invazivní výkony

- amniové fibroblasty – při amniocentéze  
0,5-1% riziko spontánních potratů,
- choriové klky  
0,5-1% riziko spontánních potratů
- fetální krevní buňky – při kordocentéze  
vyšší riziko spontánního potratu než u  
amniocentézy  
vysoké riziko aloimunizace matky



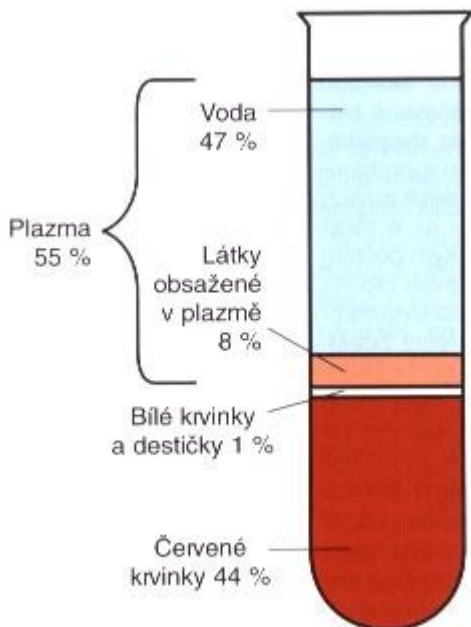
# Prenatální vyšetření

## Zdroje fetální DNA - neinvazivní výkony

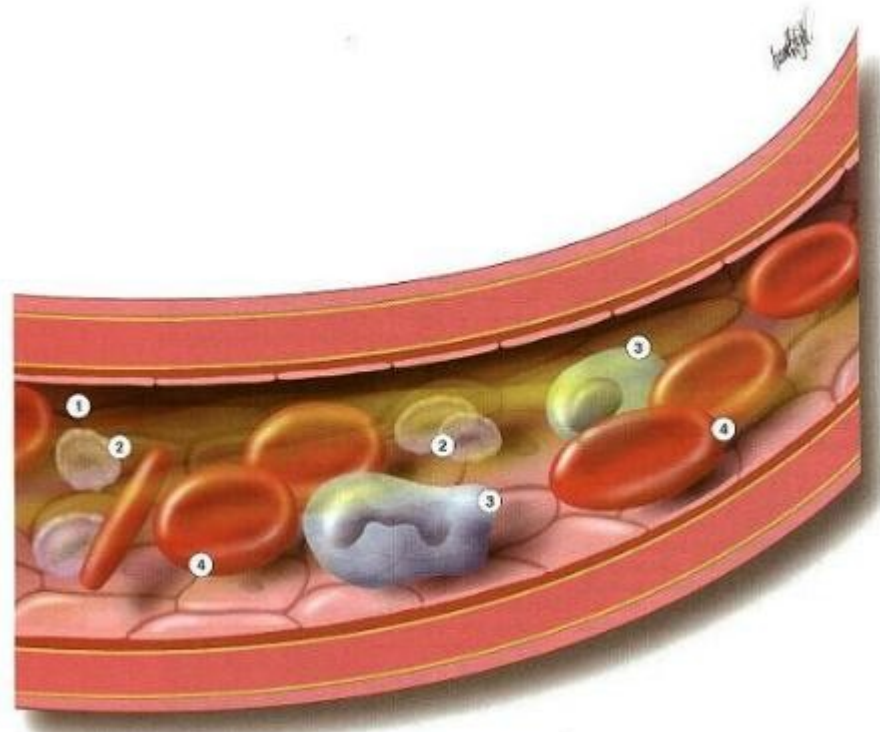
### Volná DNA cfDNA

Krev je složena z buněk a plazmy.

V plazmě každému z nás kolují krevní úlomky jeho vlastní dědičné informace, jeho DNA. Pocházejí z rozpadlých jader uhynulých a zničených buněk nejrůznějších orgánů.



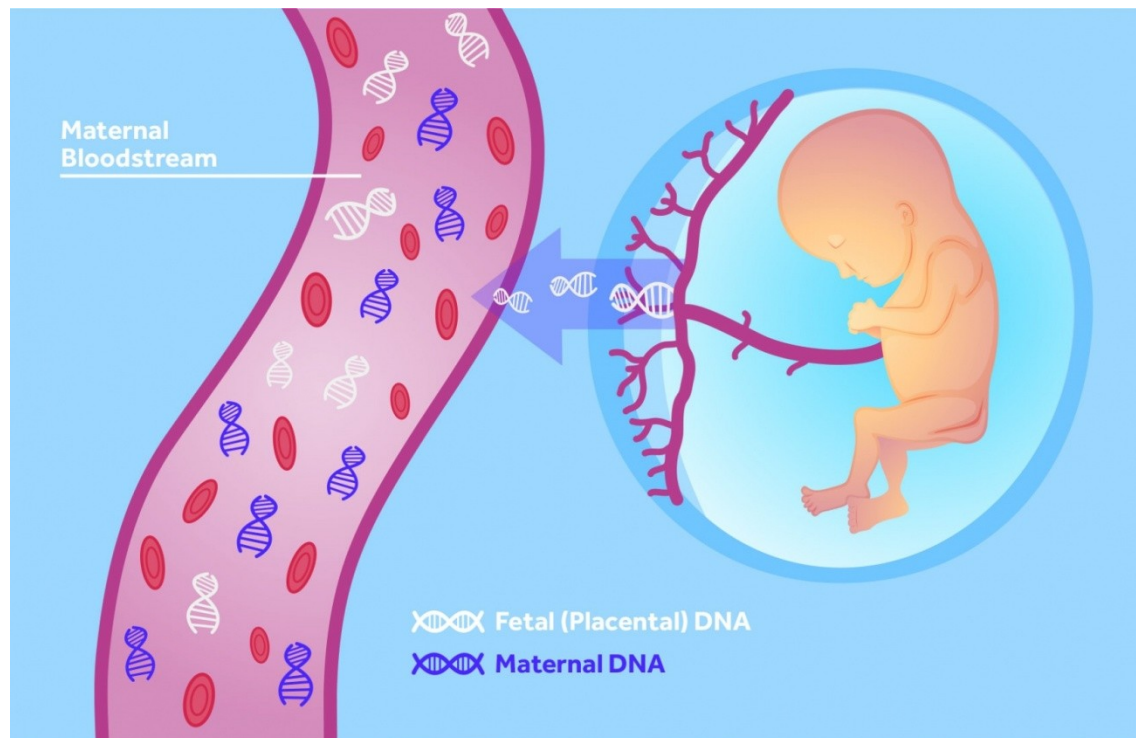
- 1 Plazma
- 2 Destičky
- 3 Bílé krvinky
- 4 Červené krvinky



# Volná fetální DNA cffDNA

Ženám se poměrně záhy po otěhotnění objeví v krvi také zlomky dědičné informace vyvíjejícího se embrya. V plazmě těhotné ženy se nachází směs úlomků DNA matky a plodu.

„Dětské“ fragmenty tvoří asi desetinu všech zlomků DNA, jež lze v krvi matky najít.



# Neinvazivní prenatalní screening NIPS

Detekce fetálních aneuploidií

Metodou masivně paralelní sekvenace (MPS)



# Masivně paralelní sekvenování (MPS)



Ion Torrent PGM

Kapacita 2GB/běh



Ion Proton

Kapacita 10+GB/běh



Ion S5

Kapacita 10+GB/běh

HiSeq X Ten – kapacita 18.000 genomů ročně, cena za genom \$1.000, cena \$10M



HiSeq 4000

Kapacita 12 genomů/běh  
(24/týden), 1,5TB/běh



NextSeq 500

Kapacita 1 genom/běh  
(3/týden), 120GB/běh



MiSeq

Kapacita 0,15  
genomu/běh,  
15GB/běh



# Detekce fetálních aneuploidií

## Metodou masivní paralelní sekvenace (MPS)

NIPS – srovnání										
	Chromozomy	Aneuploidie, pohl.chr.	Mikrodeleční syndromy	Vícečetná těhotenství	IVF	Stanovení fetální frakce	Výsledek	Týden těhotenství	Nepro- kazatelny výsledek	Cena
MaterniT21 PLUS Sequenom, US	21, 18, 13, X Y, 16, 22	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	do 7 dnů	10	< 1,5 %	25.500,- Kč
VisibiliT Sequenom, US	21, 18, Y	ne	ne	ANO	ANO	ANO	do 7 dnů	10	< 1,5 %	13.850,- Kč
Harmony Ariosa, US	21, 18, 13, X, Y	ANO	ne	ANO (dvojčata)	ANO	ANO	do 11 dnů	10	< 4 %	16.500,- Kč
Prenascan BGI, Honkong	21, 18, 13, X, Y	ANO	ANO	ANO	ANO	ne	Do 2-3 týdnů	10	v řádu procent	13.950,- Kč
Verifi Verinata, US	21, 18, 13, X, Y	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	7-11 dnů	10	?	cca 1000 USD
Panorama Natera	21, 18, 13, X, Y	ANO	ANO	ne	ne	ANO	9-12 dnů	9	?	Cca 800 USD
LifeCodexx Germany	21, 18, 13	ne	ne	ne	?	ne	6 / 10	10	?	1.150/825 EUR
Gendia Belgium	21, 18, 13	ne	ne	ANO (dvojčata)	?	?	Do 2 týdnů	10	?	690 EUR
BambniTest, Berry Genomics Co.,Ltd, Shanghai	21, 18, 13, X, Y	ANO	ne	?	?	?	?	?	?	cca 500 USD
Clarigo Multiplicon Belgium	21, 18, 13, X, Y	ANO	ne	ne	ANO	ANO	Do 2 týdnů	12( 8)	v řádu procent	12.500,- Kč

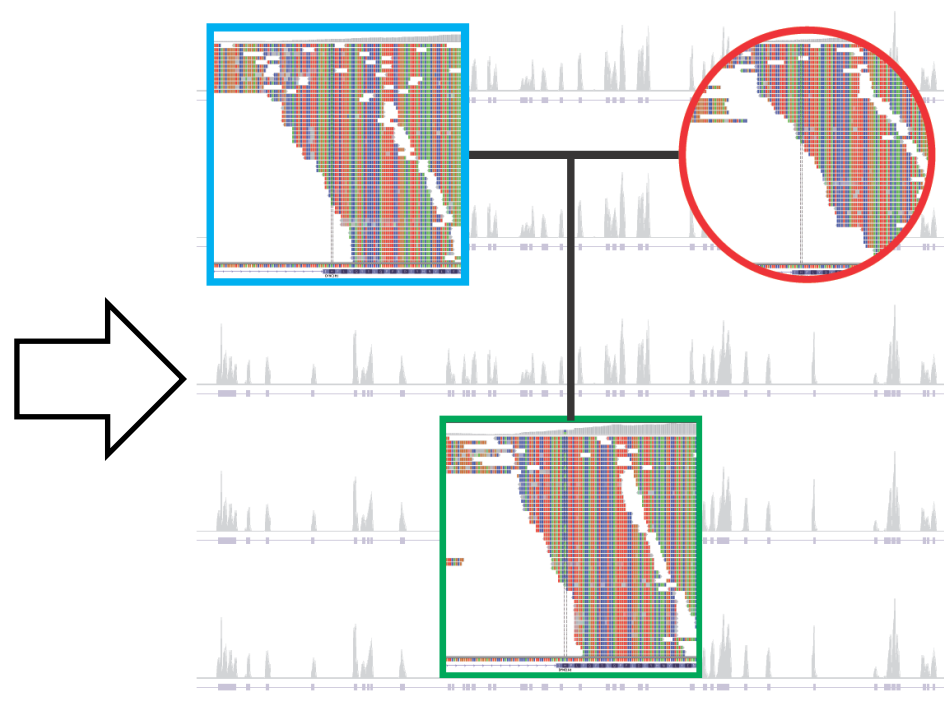
\* Informace uvedené v tabulce jsou doplněny na základě dostupných publikací a firemních materiálů

# Neinvazivní prenatalní screening NIPS

- RH faktor
- Pohlaví plodu
- **monogenní choroby** získané od rodičů  
možnost detekce de novo mutace

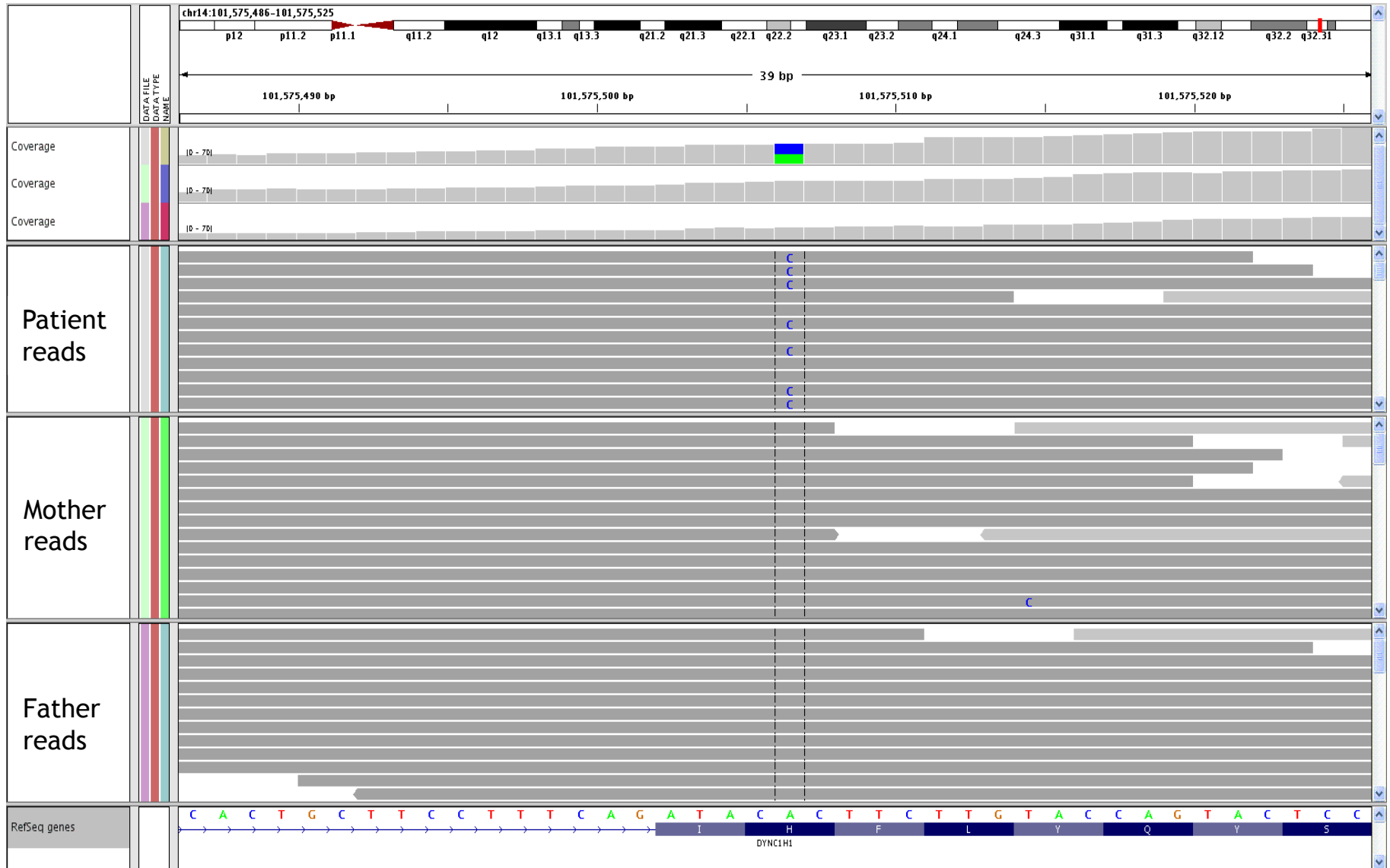


# Objektivní detekce of *de novo* variant! Genom/exom sekvenování „patient-parent trios“



Pro filtrování *de novo* mutace  
trio přístup

# Genetická analýza „Patient-parent trio“



4 miliony zděděných variant, 100 *de novo* variant na osobu

# *De novo* mutace

Vysoce kvalitní sekvencování genů na bázi tria spolehlivě detekuje a mapuje de novo bodové mutace a CNV

- **De novo mutace jsou většinou otcovského původu a jejich počet se zvyšuje s pokročilým věkem otců**
- De novo mutace mohou hrát důležitou roli v genetice mužské neplodnosti



# Genetické choroby

- 1) Genomové – početní chromozomové aberace
  - dojde ke změně celého genomu
  - (polyploidie, aneuploidie)
- 2) Chromozomové -
  - mutační změna postihla strukturu chromozomu
- 3) Genové - mutační změna v genu

Eva 35 let  
Jan 51 let

očekávají potomka

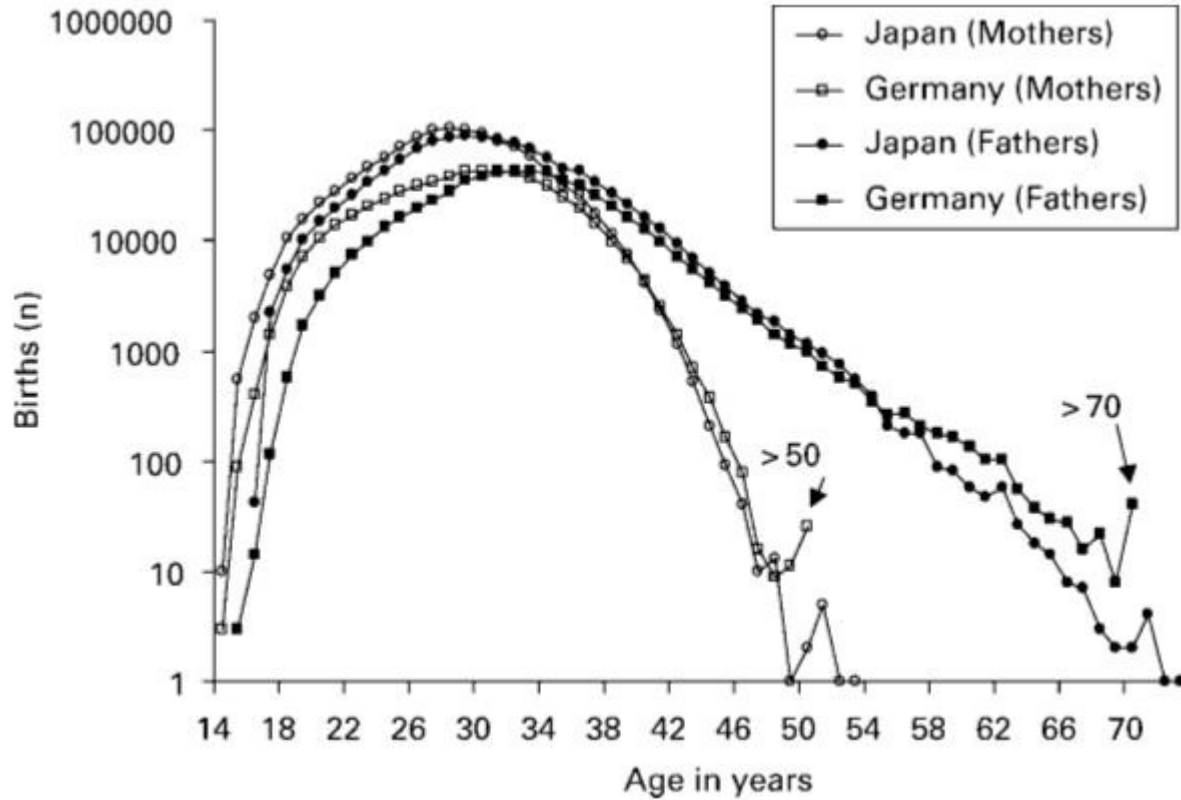


# Počítejme s věkem

Dosud se všechny studie zaměřovaly na zvýšené riziko poškození u starších matek. Je například známo, že **čím je žena starší, tím více vzrůstá riziko, že se jí narodí dítě postižené Downovým syndromem.**

Vyšší věk otce představuje riziko pro vývoj takových neuropsychiatrických poruch, jako je schizofrenie a autismus, achondroplázie, dětské rakoviny a vrozené srdeční vady.

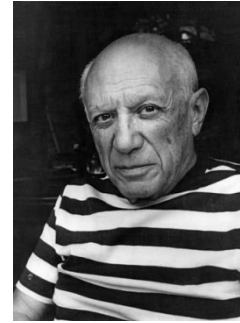
# Parental ages at childbirth



66



68



68



73



# Žena



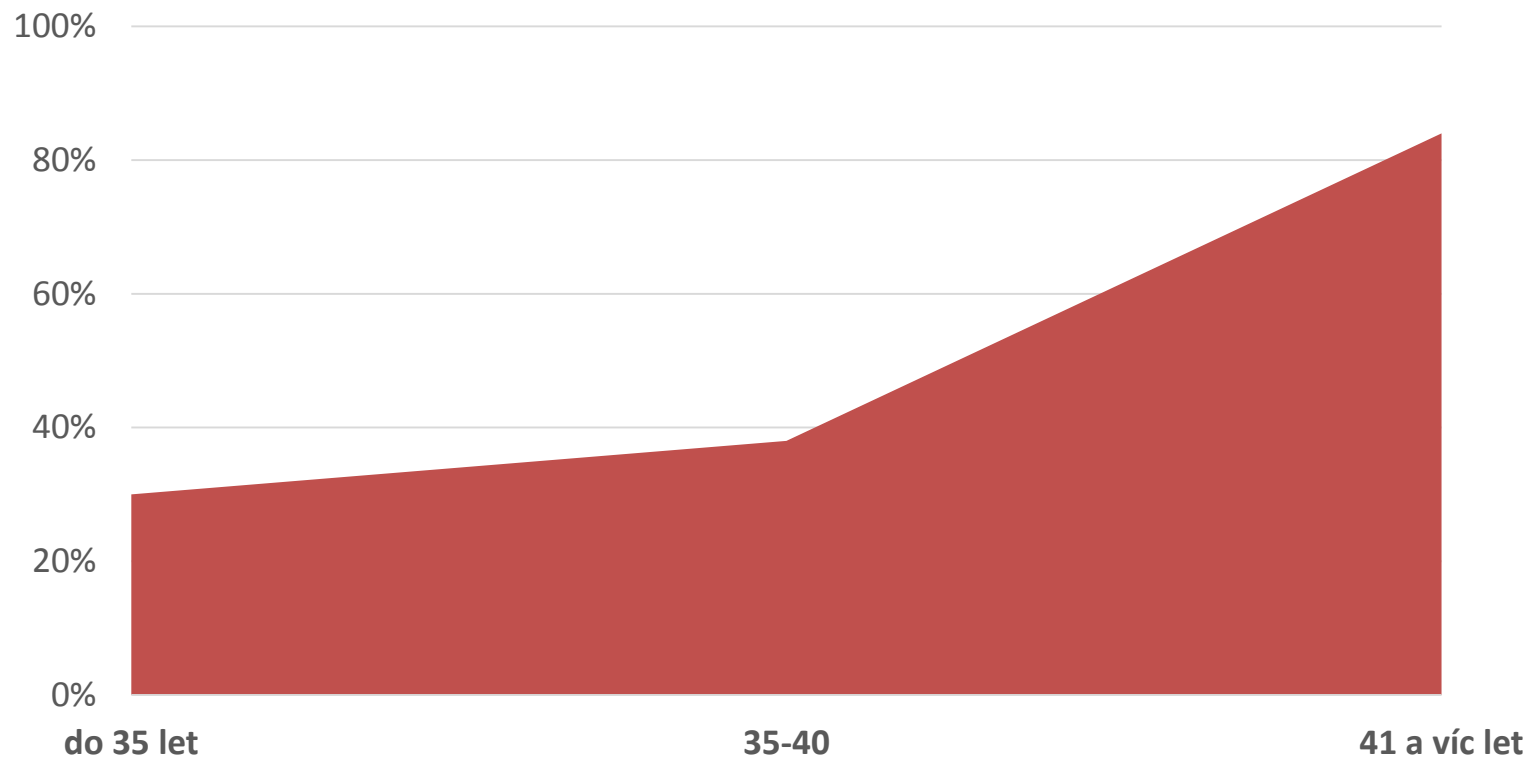
V době narození ženy vaječníky obsahují asi 1 mil. folikulů s vajíčky, v pubertě toto číslo klesne na zhruba 300 000.

V reprodukčním věku dojde k ovulaci max. 450 vajíček.

Všechna již předtím, než se narodí prožijí 24 dělení. Meióza, tzn. tvorba zralého oocytu je započata 3 týdny před narozením ženy, zastaví se v profázi 1. meiotického dělení a pokračuje v ovulaci v aktuálním věku ženy.

S postupujícím věkem ženy klesá kvalita achromatického aparátu a zvyšuje se hormonální nestabilita, která může způsobit nondisjunkci chromozomů.

# Výskyt geneticky abnormálních embryí v závislosti na věku ženy





Riziko vzniku trizomie stoupá s věkem matky (viz obrázek).  
V současnosti neexistuje ani účinná prevence,  
ani cílená léčba těchto chromozomálních vad  
a životní prognóza postižených je často nepříznivá.

## RIZIKO VZNIKU DOWNOVA SYNDROMU K VĚKU MATKY



# MUŽ

Spermatické buňky se však od okamžiku, kdy chlapec vstoupí do puberty, dělí každých 16 dní.

V pubertě odhadován počet mitóz od zygoty po zralou spermatogonii v pubertě na 30 - 31.

Ve věku 20let tak mužské zárodečné buňky mají za sebou již přibližně 150 cyklů dělení.

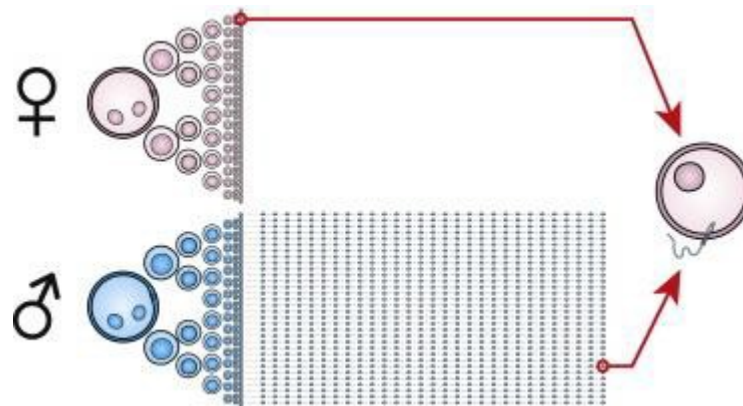
Ve věku 50 let je to již 840 dělení.

**Čím více takových cyklů podstoupí, tím víckrát dojde k nežádoucím mutacím** a tím je rovněž pravděpodobnější, že dítě bude mít vrozenou některou fyzickou nebo neurologickou abnormalitu.

(Strachan, T., Read, A.P., (2004) *Human Molecular Genetics 3rd ed.*, Garland Science, London and New York, p. 326)

# Studium generace de novo mutací: Fyziologie zárodečných linií se liší u mužů a žen

## Gametogeneze: základní rozdíly mezi pohlavími



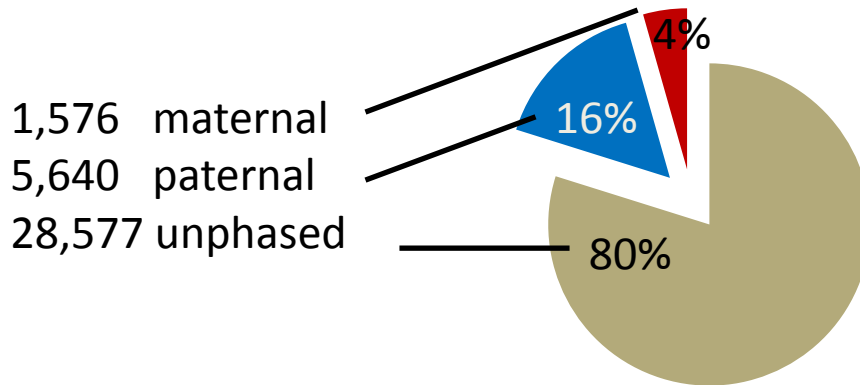
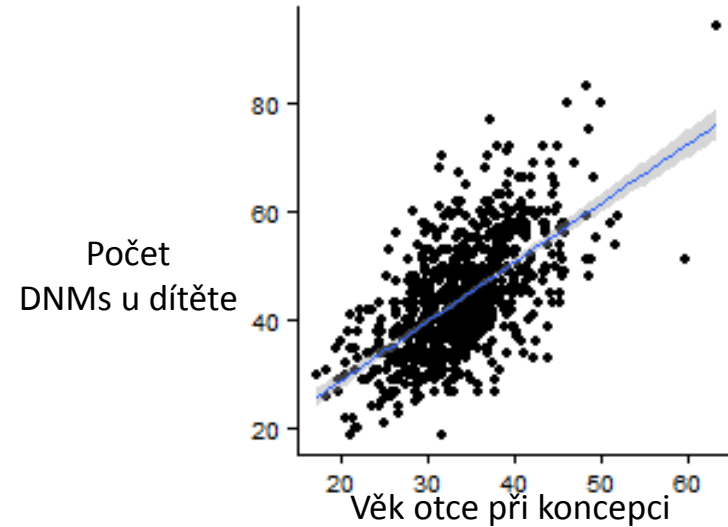
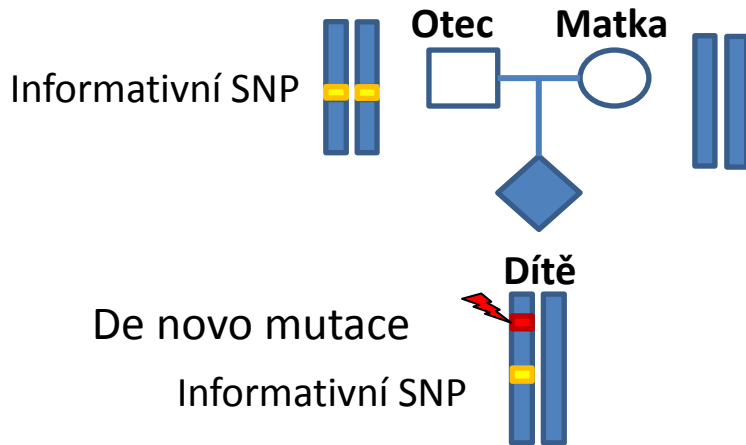
matky: ~22 replikací genomu

Mladý otec : ~100 replikací genomu

Starší otec: ~1000 replikací genomu

Figure adapted from Campbell et al. 2014

# De novo mutace: „Parent-of-origin“



**Efekt věku otce**  
~0.93 DNMs/rok

**Efekt věku matky**  
~0.25 DNMs/rok

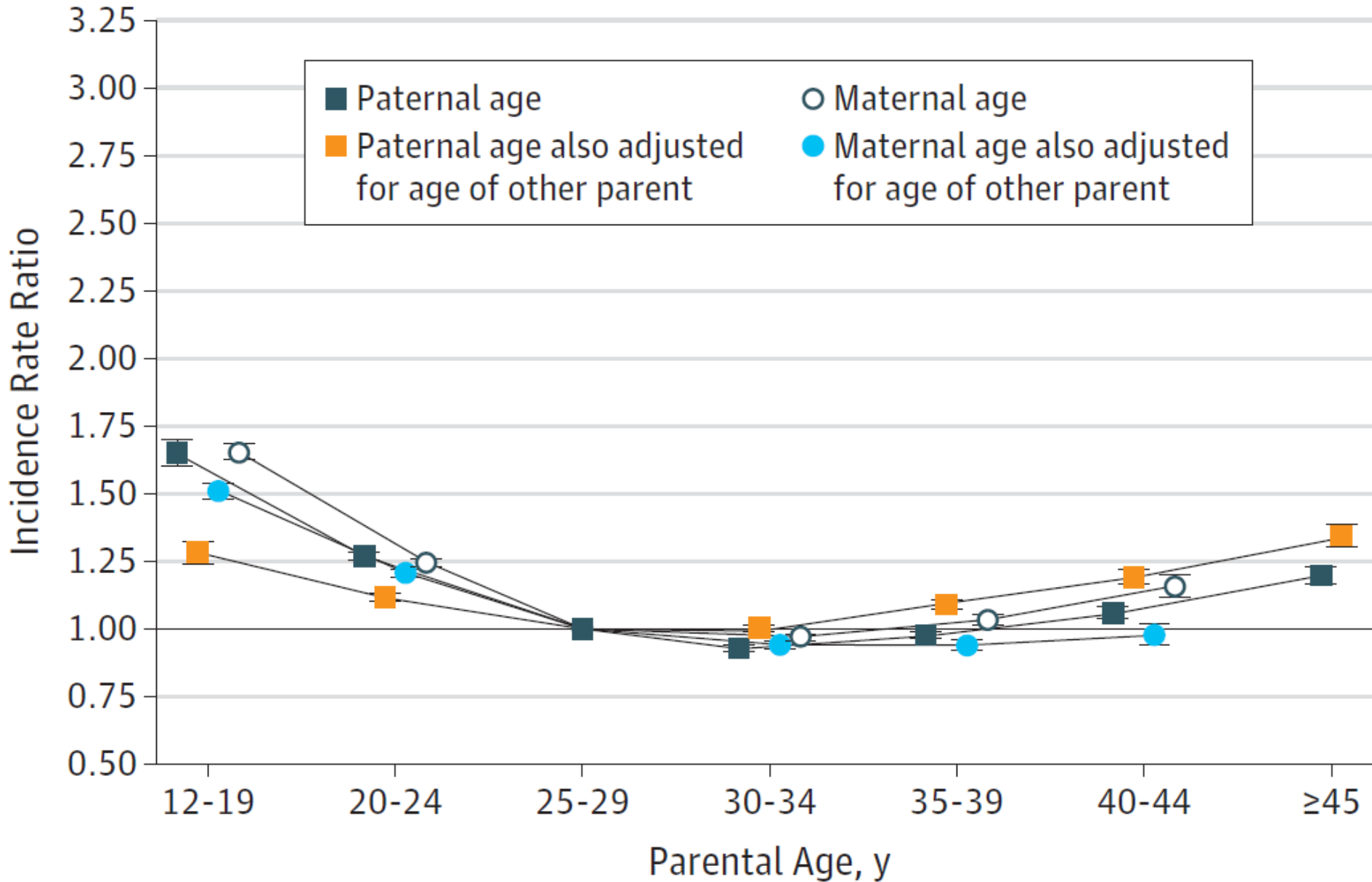
**80% de novo mutací je otcovského původu!**

## *De novo* mutace v mužské infertilitě?

Frekvence neplodnosti: postihuje téměř 7% všech párů

- Popsáno mnoho genů, o nichž je známo, že hrají roli v reprodukci
- *De novo* mutace jsou známou příčinou mužské neplodnosti:
  - De novo* chromozomální abnormalita: Klinefelterův syndrom XXY
  - De novo* delece AZF oblasti na chromozomu Y
- Velmi málo známých autozomálních genů mužské infertility.
  - Většina identifikovaných genů způsobuje recesivní onemocnění

# Incidence rate ratio for psychiatric disorders



McGrath et al. JAMA Psychiatry 2014



## Paternal Age at Childbearing and Offspring Psychiatric and Academic Morbidity ONLINE FIRST

Brian M. D'Onofrio, PhD<sup>1</sup>; Martin E. Rickert, PhD<sup>1</sup>; Emma Frans, MSc<sup>2</sup>; Ralf Kuja-Halkola, MSc<sup>2</sup>; Catarina Almqvist, MD<sup>2,3</sup>; Arvid Sjölander, PhD<sup>2</sup>; Henrik Larsson, PhD<sup>2</sup>; Paul Lichtenstein, PhD<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Psychological and Brain Sciences, Indiana University, Bloomington

<sup>2</sup>Department of Medical Epidemiology and Biostatistics, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

<sup>3</sup>Lung and Allergy Unit, Astrid Lindgren Children's Hospital, Stockholm, Sweden

*JAMA Psychiatry*. Published online February 26, 2014.

**Importance** Advancing paternal age is associated with increased genetic mutations during spermatogenesis, which research suggests may cause psychiatric morbidity in the offspring. The effects of advancing paternal age at childbearing on offspring morbidity remain unclear, however, because of inconsistent epidemiologic findings and the inability of previous studies to rigorously rule out confounding factors.

**Objective** To examine the associations between advancing paternal age at childbearing and numerous indexes of offspring morbidity.

**Design, Setting, and Participants** We performed a population-based cohort study of all individuals born in Sweden in 1973-2001 (N = 2 615 081), with subsets of the data used to predict childhood or adolescent morbidity. We estimated the risk of psychiatric and academic morbidity associated with advancing paternal age using several quasi-experimental designs, including the comparison of differentially exposed siblings, cousins, and first-born cousins.

**Exposure** Paternal age at childbearing.

**Main Outcomes and Measures** Psychiatric (autism, attention-deficit/hyperactivity disorder, psychosis, bipolar disorder, suicide attempt, and substance use problem) and academic (failing grades and low educational attainment) morbidity.

**Results** In the study population, advancing paternal age was associated with increased risk of some psychiatric disorders (eg, autism, psychosis, and bipolar disorders) but decreased risk of the other indexes of morbidity. In contrast, the sibling-comparison analyses indicated that advancing paternal age had a dose-response relationship with every index of morbidity, with the magnitude of the associations being as large or larger than the estimates in the entire population. Compared with offspring born to fathers 20 to 24 years old, offspring of fathers 45 years and older were at heightened risk of autism (hazard ratio [HR] = 3.45; 95% CI, 1.62-7.33), attention-deficit/hyperactivity disorder (HR = 13.13; 95% CI, 6.85-25.16), psychosis (HR = 2.07; 95% CI, 1.35-3.20), bipolar disorder (HR = 24.70; 95% CI, 12.12-50.31), suicide attempts (HR = 2.72; 95% CI, 2.08-3.56), substance use problems (HR = 2.44; 95% CI, 1.98-2.99), failing a grade (odds ratio [OR] = 1.59; 95% CI, 1.37-1.85), and low educational attainment (OR = 1.70; 95% CI, 1.50-1.93) in within-sibling comparisons. Additional analyses using several quasi-experimental designs obtained commensurate results, further strengthening the internal and external validity of the findings.

**Conclusions and Relevance** Advancing paternal age is associated with increased risk of psychiatric and academic morbidity, with the magnitude of the risks being as large or larger than previous estimates. These findings are consistent with the hypothesis that new genetic mutations that occur during spermatogenesis are causally related to offspring morbidity.

Šetření, které provedla univerzita v Indianě a švédský Institut Karolinski na vzorku 2,6 milionu lidí

Bylo dokázáno, že otcové ve věku nad 45 let mají mnohem vyšší pravděpodobnost, že zplodí nemocné dítě než muži ve věku 24 let.

U spermatu starších otců je totiž vyšší riziko, že vzniknou genové mutace.

Například

13x pravděpodobnější je vznik hyperaktivity u dětí

2x vyšší je pravděpodobnost duševních poruch

25x vyšší je riziko maniodepresivní psychózy

2,5x vyšší pravděpodobnost, že potomek spáchá sebevraždu

2,5x vyšší pravděpodobnost, že dítě podlehne drogám nebo jiné závislosti.

Tyto děti narozené starším otcům nad pětáctyřicet let navíc mají horší školní výsledky

# Achondroplázie

Nejčastější příčina lidského trpaslictví, je geneticky podmíněnou chorobou pohybového aparátu, především receptorů FGFR3 v kostech a v tkáních fibroblastů. Autozomálně dominantně.

Incidence achondroplázie postihuje obě pohlaví a je rovnoměrně rozšířena.

Jedná se o autozomálně recesivní onemocnění způsobené specifickými bodovými mutacemi v genu FGFR3 (fibroblast growth factor receptor 3) na chromozómu 4p16.3. FGFR3 mutace spojené s achondroplázií, které podmiňují na ligandem závislou aktivitu. Tato konstitutivní aktivita vede k zisku funkce, která podporuje proliferaci chondrocytů v růstové ploténce a dále k



hých novorozenců,

ě genu FGFR3  
chromozómu (4p16.3).  
k zisku funkce,

oliferaci chondrocytů

# Achondroplázie

Krátké končetiny jezevčků či baseta jsou způsobeny achondroplázií, poruchou osifikace



# Achondroplázie

**Velká většina dětí s achondroplázií se narodí v rodinách, kde se malý vzrůst dosud nikdy nevyskytoval.**

80–90 % případů achondroplazie je způsobeno mutacemi de novo, které se objevují v otcovské zárodečné linii, jejich frekvence se zvyšuje s věkem otců (>35 let).

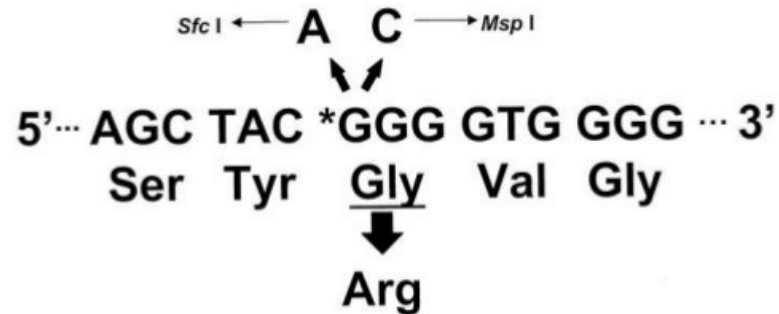
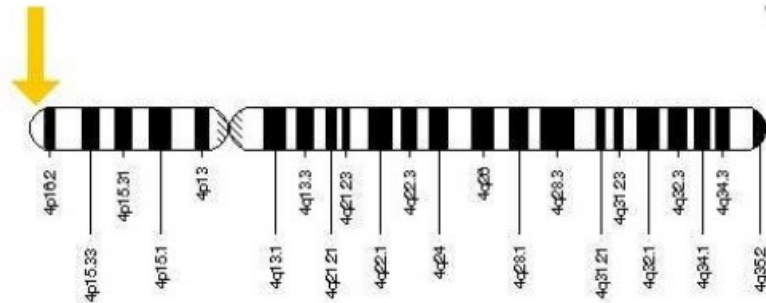
**Rizikovým faktorem je vyšší věk otce dítěte**



# Achondroplázie

Více než 99% případů achondroplazie způsobují mutace G1138A (cca 98 %) a G1138C (1–2 %).

Obě bodové mutace způsobují záměnu aminokyseliny glycinu za arginin v pozici 380 (G380R).



Tyto mutace buď vzniknou při gametogenezi nebo jsou na plod přeneseny od postiženého rodiče.



# Achondroplázie

**Velká většina dětí s achondroplázií se narodí v rodinách, kde se malý vzrůst dosud nikdy nevyskytoval.**

80–90 % případů achondroplazie je způsobeno mutacemi de novo, které se objevují v otcovské zárodečné linii, jejich frekvence se zvyšuje s věkem otců (>35 let).

**Rizikovým faktorem je vyšší věk otce dítěte**



# Achondroplázie

neinvazivní prenatální vyšetření analýzou  
fetální DNA izolované z krve matky

scoring mutace G380R v genu FGFR3 metodou

analýza teploty tání na High Resolution Melting (HRM)

na platformě LightCycler® 480 System pomocí LightSNiP assay.



# Achondroplázie

## LightCycler® 480 Instrument LightSNiP Analysis

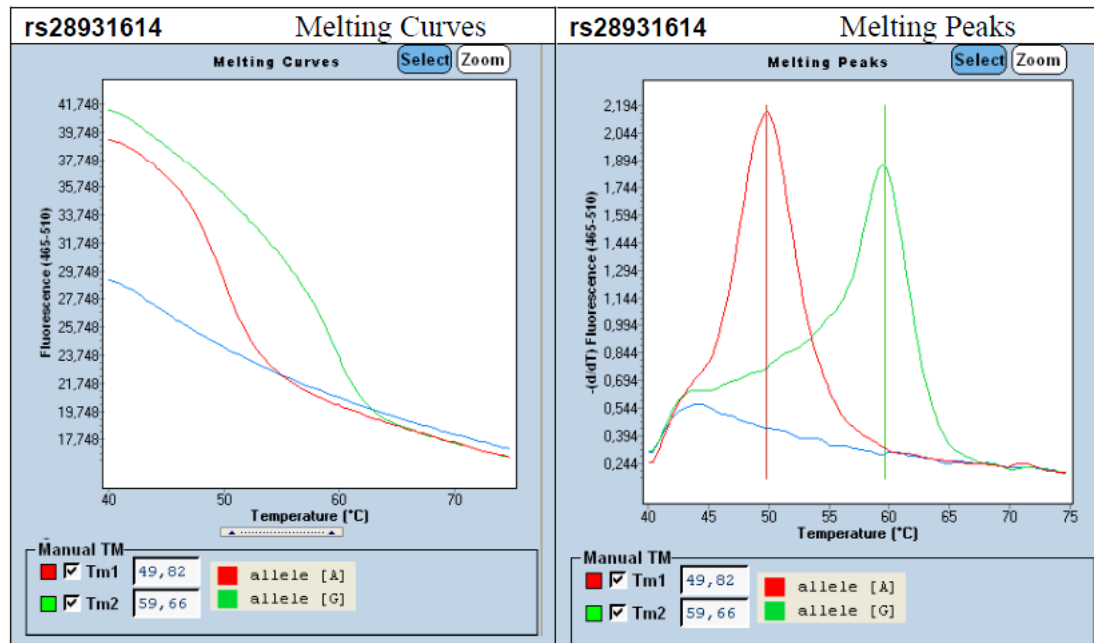
metoda genotypování pomocí analýzy teploty tání  
na High Resolution Melting (HRM) na platformě LightCycler® 480 System  
pomocí LightSNiP assay.



# Achondroplázie

rs28931614

FGFR3 (Exon 10) [G380R]



**ACH: G380R Probe sequence (5'-3')**

TGTGTATTGCGGATCCTCAGCTAC[A/C/G]GGGTGGGCTTCTTCTGTTTCATCCT

Křivky tání a teploty tání homozygotních jedinců bez mutace G380R (zelené);

A homozygotní jedinec s mutací na obou alelách (červené)

Analyzováno pomocí LightSNiP assay Tm

# Neinvazivní prenatální screening (NIPS) WGS

Arthur Beaudet, pediatr a vedoucí genetiky člověka na Lékařské fakultě Baylor v Houstonu

„Myslím si, že budeme analyzovat genom každého člověka - každého plodu - v prvním trimestru, přinejmenším částečně. Dnes někteří pacienti mají své genomové sekvence, aby osvětlily genetická onemocnění, ale jednoho dne lidé nebudou čekat, dokud nebudou nemocní. Už budeme znát údaje při narození.

To se nestane hned.

Za prvé, třídění volné DNA plodu a matky vyžaduje analýzu obrovského množství opakujících se sekvencí, což je pro rutinní využití příliš nákladné.

(Illumina v současné době účtuje 9 500 dolarů za účelem sekvenování genomu dospělé osoby a doposud pokusy o sekvenci fetální DNA stojí mnohem víc.)

A stále existují technické problémy:

výsledky fetálního genomu nejsou dosud přesné pro diagnózu.

Eticky je technologie minové pole.

Pokud zjistíme genetický osud našich dětí, když jsou ještě v děloze, jaký druh rozhodnutí budeme udělat?

# Neinvazivní prenatální screening (NIPS) WGS

Dennis Lo se domnívá, že pokud postupuje sekvence fetálních DNA, testovací pracovníci by se měli omezit na hlášení pouze 20 nejčastějších závažných onemocnění.

„Budeme čelit výzvě toho, co hledat a jak radit těhotným ženám. Myslím, že musíme tuto technologii používat eticky a neměli bychom analyzovat věci, které nejsou život ohrožující. Jako predispozice k cukrovce ve 40 letech. Dokonce ani nevíme, jaký lék bude za 40 let, tak proč se stresovat matku? „







**DNA TEST OTCOVSTVÍ BĚHEM TĚHOTENSTVÍ Z MATEŘSKÉ KRVE  
JIŽ V 9. TÝDNU JIŽ OD 29900,- Kč**



**Molekulární diagnostika** má dnes tyto hlavní praktické přínosy:

## **6) terapeuticko-indikační**

- ❖ pomocí genetických testů je možné dopředu určit, kteří jedinci budou mít největší prospěch z užívání konkrétního léku a u kterých pacientů bude naopak podávání léku spojeno se špatnou odpovědí a častými a závažnými nežádoucími účinky
- ❖ motor personalizované medicíny a cílené biologické léčby

Jedinci s různými variantami genů různě reagují na léčbu, metabolizují léky různou rychlostí, proto lze očekávat, že léky budou šity na míru právě podle pacientova genomu.

Dnes lékař často dlouho hledá, který z podobných léků pacientovi nejlépe vyhovuje, což prodlužuje i prodražuje léčbu, snižuje účinek léků nebo hrozí nežádoucí vedlejší účinky

**Lékař před vyplněním receptu požaduje genetické vyšetření, aby zjistil, který lék je pro pacienta nejvhodnější.**

# Farmakogenetika

## Cytochrom P450 (CYP)

Nejvíce případů, kdy je v důsledku variant genů pro jeho různé formy alterován metabolismus léčiva

## Cytochrom P450 2C9 (CYP2C9), VKORC1 ➡ Warfarin

- ❖ podílí se na metabolismu a mechanismu antikoagulancia warfarinu; přeměňuje warfarin na hlavní metabolit
- ❖ v důsledku variantních alel pro formu cytochromu snížena účinnost tohoto enzymu participujícího v aktivaci prothrombinu
- ❖ Spojeno s rizikem tromboembolických příhod

Důležitými faktory pro využití genotypizace v klinické praxi jsou především

- ❖ rychlost a cena vyšetření ve srovnání s cenou léčiva (prasugrel vs. klopidogrel aktivovaný geneticky polymorfním CYP2C19 apod.)
- ❖ podíl metabolického genotypu na výsledné farmakokinetice, jež je ovlivněna i dalšími faktory (věk, jaterní a ledvinné funkce, lékové interakce apod.)
- ❖ Vyšetření variant ovlivňujících metabolismus warfarinu se tak z již celkem běžné praxe stává spíše záležitostí pro pacienty, u nichž je obtížná optimalizace dávkování léčiva podle běžných klinických schémat a je vhodné hledat příčinu jejich neadekvátní odpovědi na léčbu.
- ❖ Volba antiagregační léčby by mohla profitovat ze znalosti pacientova genotypu více a optimálně vyvážit použití nákladnějšího prasugrelu, jehož metabolismus a účinnost sice nejsou alterovány defektem cytochromu P450 formy CYP2C19, avšak má vyšší výskyt závažných (i fatálních) krvácivých příhod oproti klopidogrelu

# Farmakogenetika

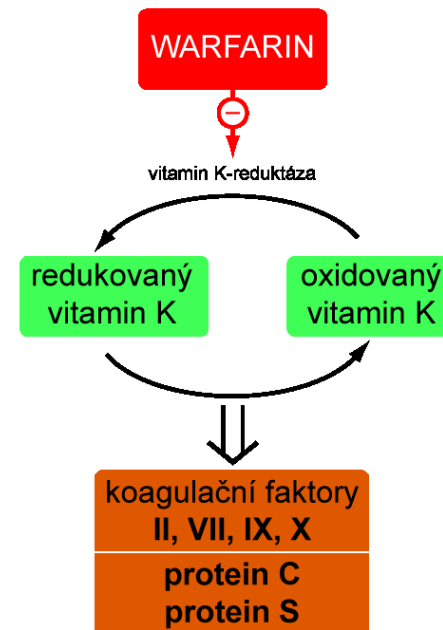
## Warfarin

- ❖ nepřímé perorální antikoagulans
- ❖ dlouhou dobu byl víceméně jediným použitelným perorálním působením
- ❖ patří mezi tzv. **kumariny**
- ❖ blokuje **vitamin K**, jaterní buňka nemůže syntetizovat koagulační faktory **II, VII, IX a X** (= vitamin K-dependentní koagulační faktory)

tzv. v játrech **blokuje syntézu vitamin K-dependentních koagulačních faktorů**

**Vitamin K** je kofaktorem karboxylace kyseliny glutamové na  $\gamma$ -karboxyglutamovou;  $\gamma$ -karboxyglutamát je zásadní pro vazbu  $\text{Ca}^{2+}$  na koagulační faktory, které využívají  $\text{Ca}^{2+}$  jako kofaktor.

Podílí se ale i na funkci dalších bílkovin interagujících s kalcium, např. osteokalcinem, funkce těchto bílkovin bude rovněž warfarinem ovlivněna.



# Personalizovaná medicína farmakogenetika

## Cytochrom P450 (CYP)

- ❖ nejvíce případů, kdy je v důsledku variant genů pro jeho různé formy alterován metabolismus léčiva
- ❖ je znám jakometabolisátor 20% běžně posaných léků
- ❖ je primárně lokalizován v játrech

## Cytochrom P450 2C9 (CYP2C9)

### Summary of drugs metabolized through cytochrome P450 2C19

#### 1. Substrates metabolized through cytochrome P450 2C19:

*Antiplatelet agents:* clopidogrel

*Anticonvulsants:* mephenytoin, phenytoin, primidone, mephenytoin,

*Antidepressants:* amitriptyline, citalopram, S-citalopram, clomipramine, imipramine, fluoxetine, escitalopram, moclobemide, trimipramine, sertraline

*Antineoplastic drugs:* cyclophosphamide

*Antiretroviral/antifungal drugs:* nelfinavir, voriconazole, vfenid

*Proton pump inhibitors:* lansoprazole, omeprazole, pantoprazole

*Miscellaneous drugs:* diazepam, progesterone, propranolol, R-warfarin, proguanil, malarone, carisoprodol, flunitrazepam, soma

#### 2. Inhibitors of cytochrome P450 2C19: Co-administration of the following drugs will decrease the rate of metabolism of drugs and increase the possibility of toxicity.

Chloramphenicol, cimetidine, delavirdine, efavirenz, felbamate, fluconazole, fluoxetine fluvoxamine, indomethacin, isoniazid, ketoconazole, lansoprazole, modafinil, omeprazole, oral contraceptives, oxacarbazepine, probenecid, ticlopidine, topiramate, voriconazole

#### 3. Inducers of cytochrome P450 2C19: Co-administration of the following drugs will increase the rate of excretion of drugs and reduce the drug's effectiveness.

Carbamazepine, ginko biloba, prednisone, rifampin, secobarbital, St. John's wort



# Farmakogenetika

## Cytochrom P450 (CYP)

Nejvíce případů, kdy je v důsledku variant genů pro jeho různé formy alterován metabolismus léčiva

## Cytochrom P450 2D6 (CYP2D6)

❖ doposud popsáno 80 různých alel

Allele	Genotype	Frequency in the U.S. Caucasian population <sup>4</sup>	Frequency in the African American population <sup>4</sup>	Predicted Enzyme Activity
*1	None	37 to 40%	29 to 35%	Normal
*2	-1584C>G, 1661G>C, 2850C>T, 4180G>C	26 to 33%	18 to 27%	Normal
*3	2549A>del	1%	0.2 to 0.6%	None
*4	100C>T, 1661G>C, 1846G>A, 4180G>C, 2850C>T	18 to 20%	6 to 9%	None
*5	deletion	2 to 4%	6 to 7%	None
*6	1707T>del, 4180G>C	1%	0.5%	None
*7	2935A>C	Not known	Not known	None
*8	1661G>C, 1758G>T, 2850C>T, 4180G>C	Not known	Not known	None
*9	2613delAGA	2 to 3%	0.3%	Reduced
*10	100C>T, 1661G>C, 4180G>C	2 to 8%	0.3 to 0.4%	Reduced
*11	883G>C, 1661G>C, 2850C>T, 4180G>C	Not known	Not known	None
*15	138insT	Not known	Not known	None
*17	1023C>T, 1661G>C, 2850C>T, 4180G>C	0.2 to 0.3%	15 to 26%	Reduced
*29	1659G>A, 1661G>C, 2850C>T, 3183G>A, 4180G>C	Not known <sup>5</sup>	Not known <sup>5</sup>	Reduced
*35	-1584C>G, 31G>A, 1661G>C, 2850C>T, 4180G>C	7.4% <sup>6</sup>	1% <sup>6</sup>	Normal
*41	1661G>C, 2850C>T, 2988G>A, 4180G>C	9% <sup>6</sup>	11% <sup>6</sup>	Reduced
DUP	duplication			





# Farmakogenetika

## Cytochrom P450 (CYP)

Nejvíce případů, kdy je v důsledku variant genů pro jeho různé formy alterován metabolismus léčiva

## Cytochrom P450 2D6 (CYP2D6)

Přibližně 5-10% z zakavkazské populace je postiženo nefunkčními alelami, které mají za následek fenotypy pomalý nebo intermediární metabolizer.

Alely *CYP2D6\*3*, *CYP2D6\*4* and *CYP2D6\*5* representují více než 90% inaktivujících alel

Alela *CYP2D6\*3* - frameshift mutace 1-bp delece (2637delA) v exonu 5

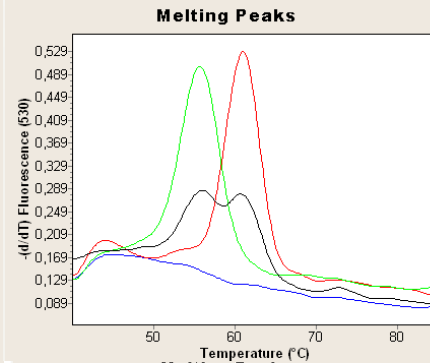
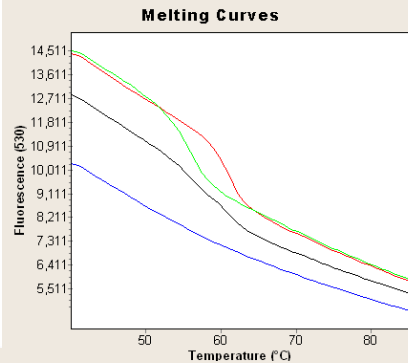
Alela *CYP2D6\*4* - incorrect splicing - transition 1934G-A na hranici intron 3 / exon 4.

Alela *CYP2D6\*5* - delece genu *CYP2D6* gene.

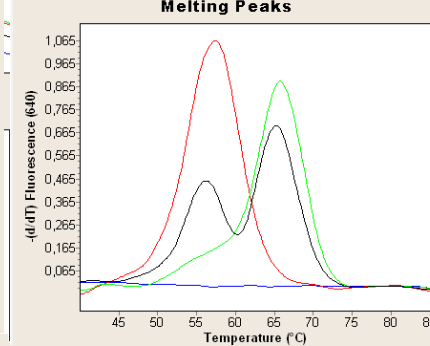
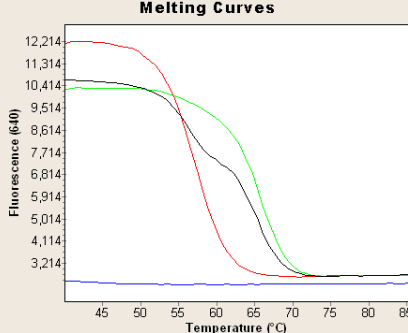


# Farmakogenetika

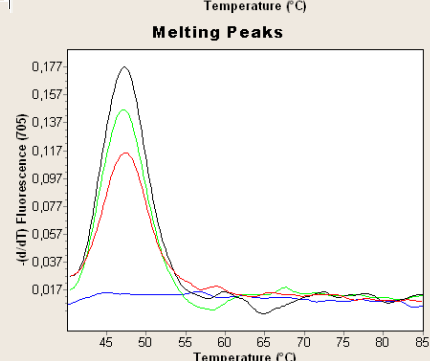
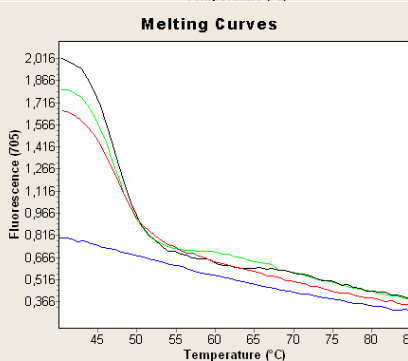
Alely *CYP2D6*\*3, *CYP2D6*\*4 and *CYP2D6*\*5 reprezentují více než 90% inaktivujících alel



LightCycler®  
2.0 Instrument  
Roche Master:  
Fast Start  
Sample data  
for  
*CYP 2D6* \*3  
Channel 530  
wt: 61.3°C  
mt: 55.8°C  
het: 55.8/61.3°C



LightCycler®  
2.0 Instrument  
Roche Master:  
Fast Start  
Sample data  
for  
*CYP 2D6* \*4  
Channel 640  
wt: 56.5°C  
mt: 65.5°C  
het: 56.5/65.5°C



2.0 Instrument  
Roche Master:  
Fast Start  
Sample data  
for hCR5  
Channel 705  
Control : 47.4°C  
Missing peak  
(baseline)  
indicates  
PCR failure or  
missing DNA.

# Epigenom

V první dekádě tisíciletí došlo k bouřlivému rozvoji studia epigenetiky a epigenetické dědičnosti, kdy se prokazuje, že rozhodující je, kdy, kde a jak moc se daný gen bude přepisovat. Dnes se odhaduje, že během života buňky se každý nukleotid někdy přepíše do ně jaké RNA, máme popsáno na tisíce dlouhých nekódujících RNA, o nichž přesně nevíme, co v jádře dělají, mohou např. fungovat jako lešení a prostorové uspořádání DNA.

## Mikrobiom (třetí genom)

Projekt lidského mikrobiomu byl zahájen v r. 2008.

Zkoumá populace mikroorganismů na pěti vytipovaných místech těla – na kůži, v ústní dutině, nosní dutině, gastrointestinálním a urogenitálním traktu.

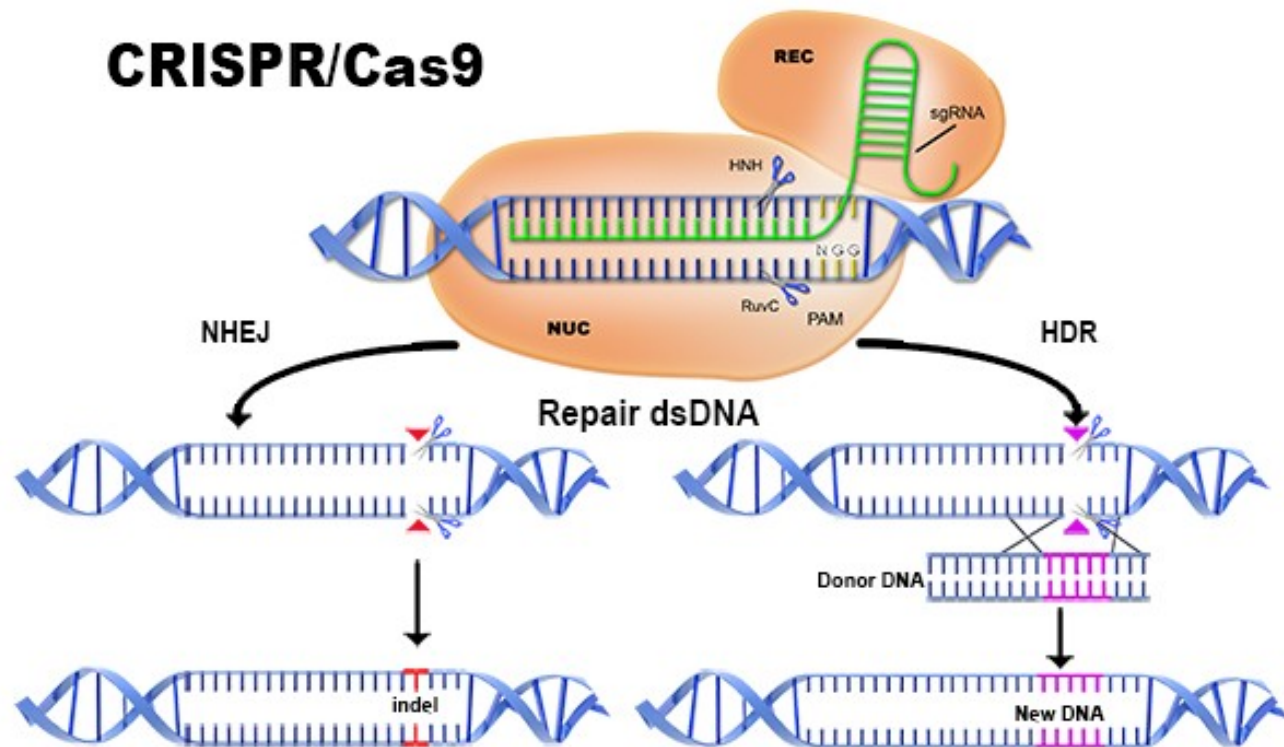
Počet různých genů mikrobiomu se odhaduje mezi 2–20 miliony, jde o geny všech eubakterií, archeí, mikroskopických eukaryot, kterých je 1 000x více než našich genů. Z genetického pohledu jsem člověkem jen z 1–0,1 %, statní geny na a v mém těle patří do mikrobiomu.

Mikrobiota a její geny mají zřejmě klíčový vliv na rozvoj imunitního systému u dětí, vyrábějí vitamíny, které sami vyrobit ne umíme, drží v šachu „škodlivé“ bakterie, pomáhají s trávením, ovlivňují expresi našich genů

Mikrobiota je nyní chápána jako nový orgán lidského těla.

V budoucnosti se tak úsilí výzkumníků nepochybně zaměří na získání znalostí proteomu (atlasu všech proteinů, které v životě lidské tělo vyprodukuje), metabolomu (všech metabolitů), viromu (genů všech virů žijících na a uvnitř našeho těla) mikrobiomu jako celku.

Vyšší stupeň genetické medicíny představuje oprava vadné části genomu



CRISPR/Cas9 půjčuje přírodní imunitní mechanismy k přesnému navedení ke kýžené části DNA (pomocí krátkého řetězce ribonukleové kyseliny), kde genové nůžky Cas (skrže stejnojmenný enzym nukleázy) dovedou do šroubovnice "stříhnout" a vložit gen nový, popřípadě ustříhnout gen nežádoucí. Ačkoliv CRISPR není vždy tak přesný jako jiné, konkurenční systémy vyvinuté až o něco později, jeho výhodou je zejména cena a rychlost.

## Vyšší stupeň genetické medicíny představuje oprava vadné části genomu

Časem může genová terapie a zvláště imunoterapie nahradit dokonce i chemoterapii u nemocných lidí s rakovinou.

Dnes je základní léčebnou strategií u onkologických pacientů

- chirurgické vyjmutí nádorů,
- zničení nádorové tkáně ionizujícím zářením
- zabití nádorových buněk chemoterapií.

Tyto klasické postupy ale mohou vyléčit rakovinu většinou jen v časných stadiích.

Chemoterapie navíc organismus pacientů oslabí – toxické léky lidem utlumí krvetvorbu nebo poškodí vnitřní orgány.

V budoucnosti se proto budou využívat jiné postupy.

Už nyní existují výzkumy zaměřené na umělé povzbuzení imunitního systému pacienta tak, aby obranné mechanismy nádoru sám překonal.

CRISPR se používá k přeprogramování imunitních buněk tak, aby rozeznaly rakovinové buňky a zaútočily na ně. Tělo se tak dovede zbavit nádorů daleko efektivněji a samo.

Některé metody už dokonce úspěšně prošly i klinickými zkouškami a získaly všechna povolení.

Začínají se široce využívat k léčbě pacientů onkologických a se závažnými genetickými onemocněními.

Ve Spojených státech probíhá několik úspěšných studií genové terapie akutní leukemie.

Vědci z West China Hospital nasadili CRISPR u pacientů s rakovinou plic a později došlo na rozšíření programu i na další formy nádorových onemocnění.

V současné době se genetika nachází ve velmi dynamické fázi, kdy se z diagnostiky přesouvá do léčby.

Nejen ve smyslu vyléčení dítěte a eventuálně i vyléčení zárodečné linie v rodině tak, že se „zarazí“ přenos onemocnění do dalších generací.

To ale bohužel otevírá i velkou spoustu etických otázek.

Totíž kde je příležitost, tak je i možnost komerčního využití, ale i zneužití. Bohužel tyhle genově editovací metody se mohou využít nejen pro pomoc těžce postiženým rodinám, ale i tam, kde chtějí „vytvářet děti“, které mají třeba modré oči, dlouhé nohy a blond vlasy... Prostě se do genetiky začínají vkládat lidské tužby a naděje a začíná se tak tento obor povážlivě komercializovat mimo jeho primární zdravotnický „mandát“, kde jde především o pomoc rodinám se závažnými vzácnými onemocněními

Prof. MUDr. Milan Macek jr., DrSc., MHA





Sydney Brenner :  
„vědou nejvíce hýbou nové technologie, nové objevy a nové myšlenky, a to právě v tomto pořadí“

# System CRISPR/Cas9

Technika umožňující změny genetického kódu vznikla v roce 2012 na Kalifornské univerzitě v Berkeley.

člověcí místo v dědičné informaci buňky

novým nukleotida Cas9

DNA buňky

naváděcí řetězec RNA - pořadí jeho písmen genetického kódu přesně odpovídá pořadí písmen genetického kódu v cílovém místě dědičné informace buňky

přerušení dvojité šroubovice DNA ve vybraném místě

buňka začne zitom v DNA opravovat

vložení úseku cizí DNA na přesně určené místo v genomu buňky

vložení DNA se stává nedílnou součástí dědičné informace

Dědičského embrya je vidět, že buňka s genom s pozici novou dědičnou informací za pomoci techniky CRISPR/Cas9 - toto embryo přenesl chlap vědec Jian-Kui He (na snímku) do dělohy matky, aby zde dokončila svůj vývoj

Jiankui He

CCR5 delta 32

# Princip molekulárně genetické diagnostiky

Rozpoznání a identifikace mutací v genech,  
které jsou v asociaci s danou chorobou.

Jakmile je identifikována genetická příčina  
onemocnění na úrovni DNA,  
může se vyvinout specifický test  
k analýze relevantních genetických charakteristik pacienta

Není zatím možné vyšetřit,  
zda proband bude trpět jakoukoliv dědičnou chorobou,  
vždy se vyšetřuje možnost poškození určitého konkrétního genu.

Existují i vyšetření, které nezapadají do této definice,  
z těch běžných např. molekulárně genetická detekce aneuploidií

# Princip molekulárně genetické diagnostiky

Rozpoznání a identifikace mutací v genech,  
které jsou v asociaci s danou chorobou.

Jakmile je identifikována genetická příčina  
onemocnění na úrovni DNA,  
může se vyvinout specifický test  
k analýze relevantních genetických charakteristik pacienta

SEKVENOVÁNÍ EXOMŮ, GENOMŮ

Existují i vyšetření, které nezapadají do této definice,  
z těch běžných např. molekulárně genetická detekce aneuploidií

# Molekulárně genetická diagnostika

V molekulárně genetické diagnostice jsou dva základní a navzájem zcela odlišné metodické přístupy vyšetření:

- nepřímé (*gene tracing*)
- přímé (*direct testing*).

## Přímá molekulárně genetická diagnostika

Detekce kauzálních mutací v odpovědném genu  
vždy potvrdí klinickou diagnózu

musíme znát:

- gen , který má být analyzován
- standartní (wild type) sekvenci tohoto genu



## **Přímá molekulárně genetická diagnostika**

### **Metody detekce známých mutací (scoring)**

v genu asociovaném s danou chorobou

### **Metody přímého vyhledávání neznámých mutací (scanning)**

v genu asociovaném s danou chorobou

# Přímá molekulárně genetická diagnostika

## Metody detekce známých mutací (scoring)

detekce určité kauzální mutace pro danou chorobu specifickou metodou

### Detekce známé sekvenční změny je možná u:

- 1) chorob s předpokládanou alelickou homogenitou, tzn. že patologická alela příslušného genu je reprezentovaná
  - \* jedinou mutací (srpkovitá anemie)
  - \* omezeným počtem mutací ( $\alpha$ 1-antitrypsinový deficit)
  - \* rozsáhlou řadou mutací rozmístěných přes celý gen, kdy jedna nebo vícemutací se vyskytují s prevalující četností (CFTR, DMD)
  - \* expanzí trinukleotidových opakujících se sekvencí (HD, MD)
  
- 2) v rodinách s již charakterizovanou mutací v příslušném genu
  
- 3) ve výzkumu (k potvrzení kandidátního genu a k odlišení nepatogenního polymorfismu)

## Příklady chorob s vymezeným počtem mutací

Srpkovitá anemie	mutace E6V v HBB genu
Cystická fibróza	mutace F508del v CFTR genu
Huntingtonova chorea, Myotonická dystrofie, Fragilní X	nestabilní expanze trinukletidových repeticí
Hemofilie A	velká inverze v genu pro faktor 8
Duchennova muskulární dystrofie	60-70% mutací tvoří velké delece
Tay-Sachsova choroba	inzerce 4pb v exonu 11 genu HEXA
Lebrova optická atrofie	mitochondriální mutace nukleotidu v pozici 3460, 11778, 14484

# Přímá molekulárně genetická diagnostika

## Metody detekce známých mutací (scoring)

detekce určité kauzální mutace pro danou chorobu specifickou metodou

Amplifikace úseku s předpokládanou delecí	detekce delecí
Restrikční analýza PCR produktu	mutací vzniká nebo zaniká specifické místo v DNA, rozlišované restrikčním enzymem
Hybridizace PCR produktu s alelově specifickými oligonukleotidy	detekce bodových mutací
PCR s alelově specifickými primery (ARMS test)	detekce bodových mutací
PCR s primery ohraničujícími předpokládané delece v DNA	úspěšná amplifikace odhalí přítomnost specifické přestavby v DNA
Analýza teploty tání PCR produktu pomocí real-time PCR	změna teploty tání v porovnání s pozitivní a standardní kontrolou odhalí specifickou sekvenční změnu
Triplet Primed PCR	detekce expanze trinukleotidových repeticí v DNA
Multiplex Ligation Probe Amplification MLPA	detekce rozsáhlých delecí a duplikací, vhodná pro stanovení SNP genotypů a testování metylací v promotorové oblasti genů

# Přímá molekulárně genetická diagnostika

- **Metody přímého vyhledávání neznámých mutací (scanning)**

postupné nebo multiplexní screenování úseků genu asociovaného s danou chorobou pomocí vyhledávacích metod

odhalí jakékoliv odchylky v analyzované sekvenci DNA pacienta  
ve srovnání se standardní sekvencí

neodliší patogenní a nepatogenní změny v sekvenci DNA

jsou náročnější časově i finančně

# Přímá molekulárně genetická diagnostika

## Metody přímého vyhledávání neznámých mutací (scanning)

Jednořetězcový konformační polymorfismus (SSCP)	jednoduchá metoda	doporučuje se pro krátké sekvence DNA neodhaluje pozici změny
Denaturační gradientová elektroforéza (DGGE)	vysoká citlivost	nutné primery s GC-clampy neodhaluje pozici změny
Heteroduplexní analýza (HD)	jednoduchá metoda	doporučuje se pro krátké sekvence DNA omezená citlivost neodhaluje pozici změny
Detekce zkráceného proteinu (PTT)	vysoká citlivost pro terminační mutace	pouze pro terminační mutace odhaluje pozici změny
Analýza teploty tání na real-time PCR, HRM	vysoká citlivost	doporučuje se pro sekvence cca 250 bp neodhalí pozici změny
Sekvenování	detekce veškerých změn v DNA	nadbytek informací plně charakterizuje mutace



# DIAGNOSTIKA

## RNA

EXPRESE

SESTŘIH „SEKV. EXONŮ“

## DNA

### PŘÍMÁ

#### SCORING

- Restrikční analýza PCR produktu
- Hybridizace PCR produktu s alelově specifickými oligonukleotidy
- detekce variant pomocí sond
- ARMS
- MLPA
- Triplet Primed PCR

#### SCANNING

- analýza teploty tání (SYBR Green)
- sekvenování

### NEPŘÍMÁ

analýza mikrosatelitů