

MUNI
MED

Molekulární diagnostika geneticky podmíněných chorob

Iveta Valášková

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

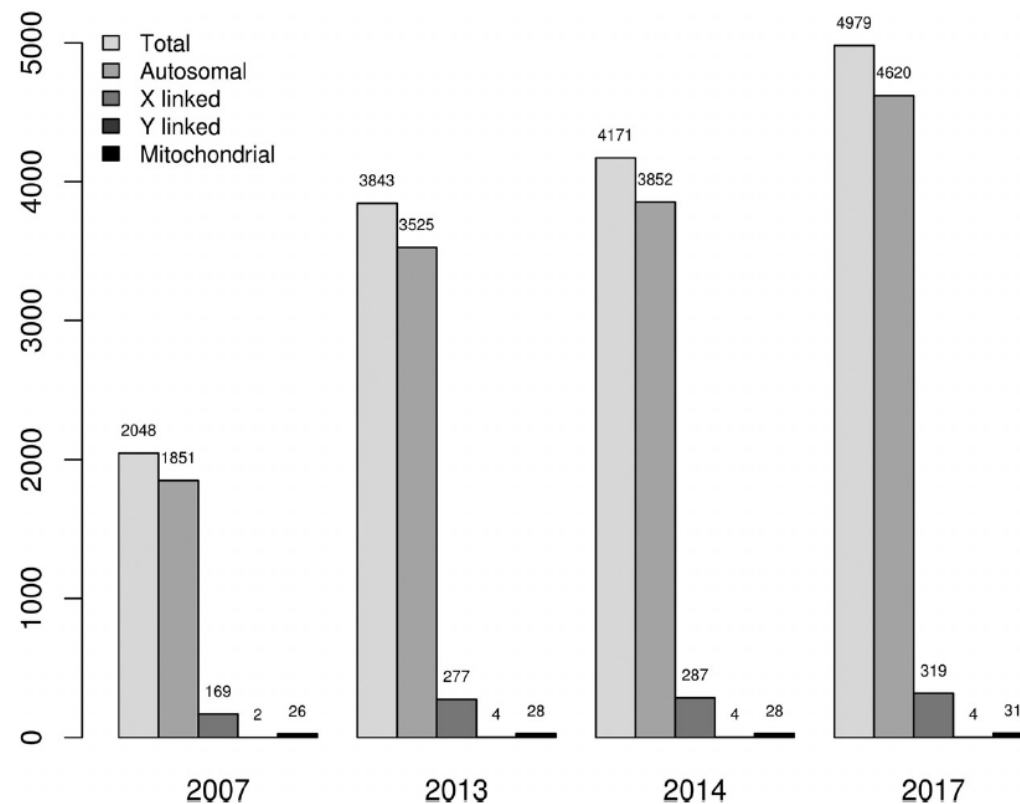
- ❖ pomocí genetických testů je možné dopředu určit, kteří jedinci budou mít největší prospěch z užívání konkrétního léku a u kterých pacientů bude naopak podávání léku spojeno se špatnou odpovědí a častými a závažnými nežádoucími účinky
- ❖ motor personalizované medicíny a cílené biologické léčby

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



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

- 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

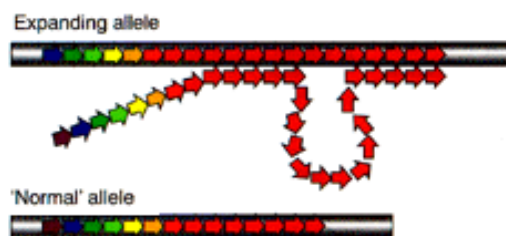


<http://sk.tdmed.ru/diagnoz/24849-hvoroba-gentngtona-simptomi-ikuvanny-a.html>

Molekulární diagnostika má dnes tyto hlavní praktické přínosy

3) prediktivní

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.

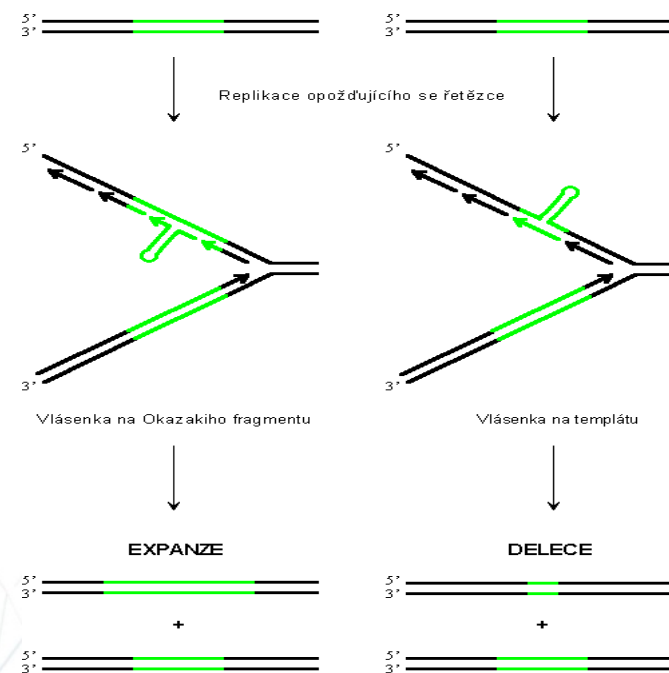
Při přenosu ovšem někdy dochází během replikace před tvorbou gamety k další expanzi této repetice.

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 **nové mutace** – asi 25 % pacientů má negativní rodinnou anamnézu.



Molekulární diagnostika má dnes tyto hlavní praktické přínosy

3) prediktivní

Huntingtonova choroba též Huntingtonova chorea

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

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

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

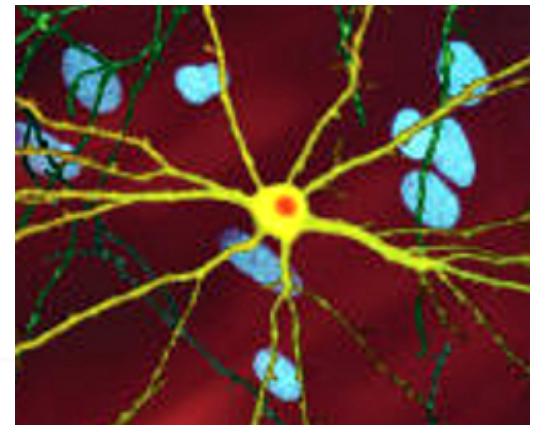
- hrozí psychická traumatizace pacienta,
- deprese
- v krajním případě i sebevražda.

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 nepřipustné (zachování **práva nevědět**).

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



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

Molekulární diagnostika má dnes tyto hlavní praktické přínosy

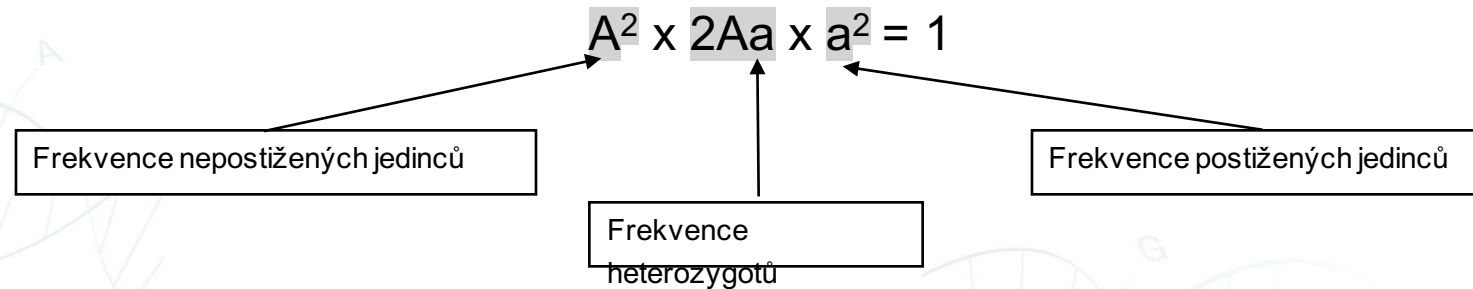
4) prognostický

- ❖ 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 ^b (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 ^b (AA)	Homozygot ^b (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

Molekulární diagnostika má dnes tyto hlavní praktické přínosy

5) preventivní kroky s minimalizovanými vedlejšími účinky

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.

Molekulární diagnostika má dnes tyto hlavní praktické přínosy

5) preventivní kroky s minimalizovanými vedlejšími účinky

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.

Molekulární diagnostika má dnes tyto hlavní praktické přínosy

5) preventivní kroky s minimalizovanými vedlejšími účinky

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

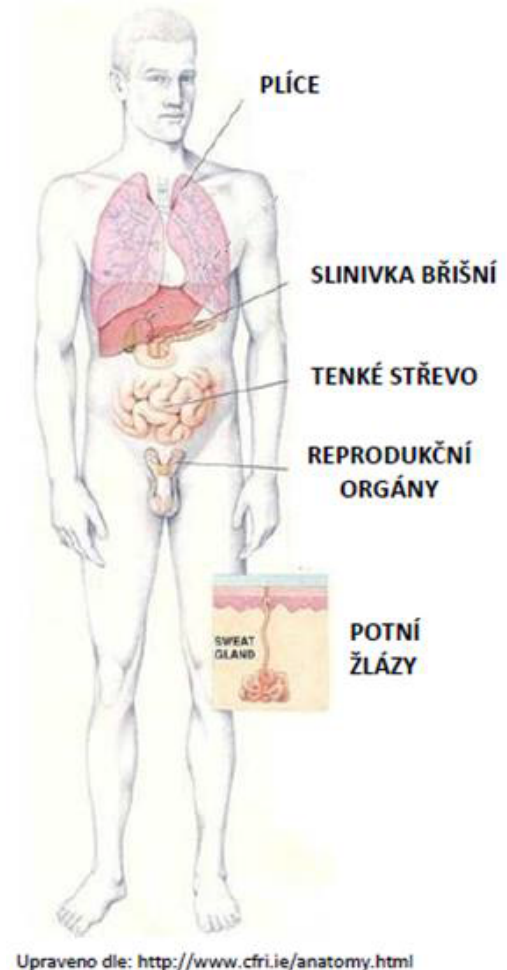
nejčastější autozomálně recesivní onemocnění u evropských populací
multiorgánové onemocnění

- 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

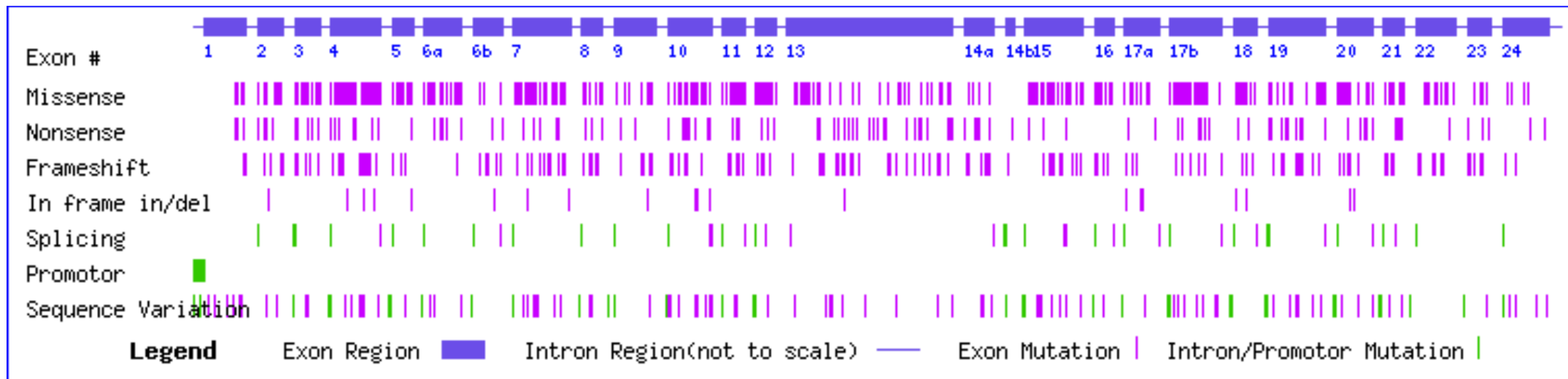
- především u evropských populací, v neevropských populacích je výskyt CF výrazně nižší
- frekvence přenašečů – přibližně 1 z 26-30
- výskyt u 1 dítěte na 2500-4500 novorozenců
- v ČR udáván 1 ze 4023 (dle výsledků NS nižší – 1 z 6946)→? vliv prenatální/preimplantační diagnostiky a možných důsledků z 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%.

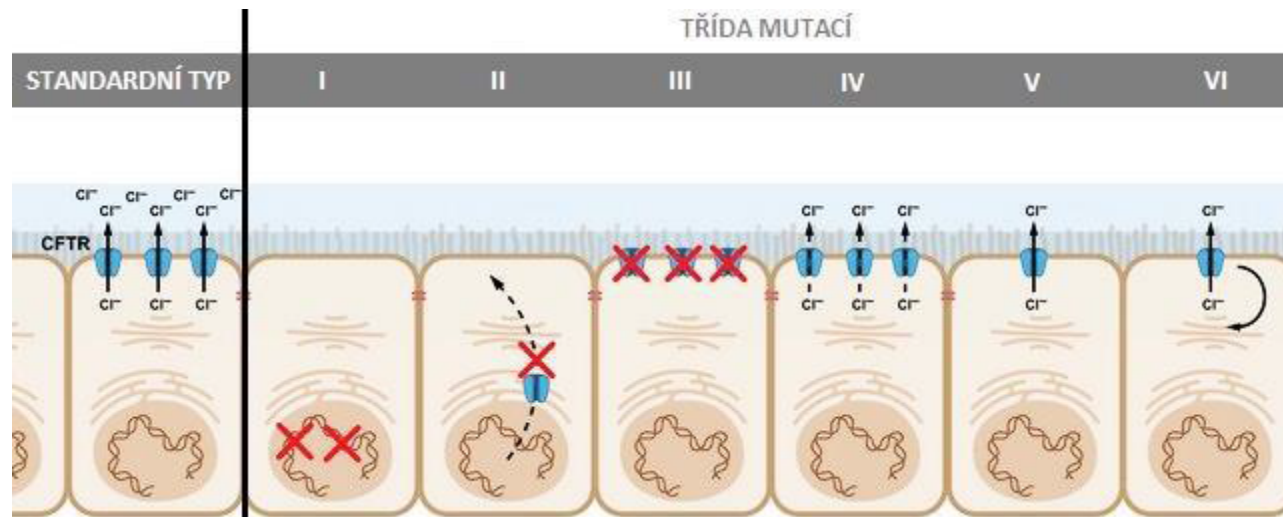
Cystická fibróza

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



<http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html>

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

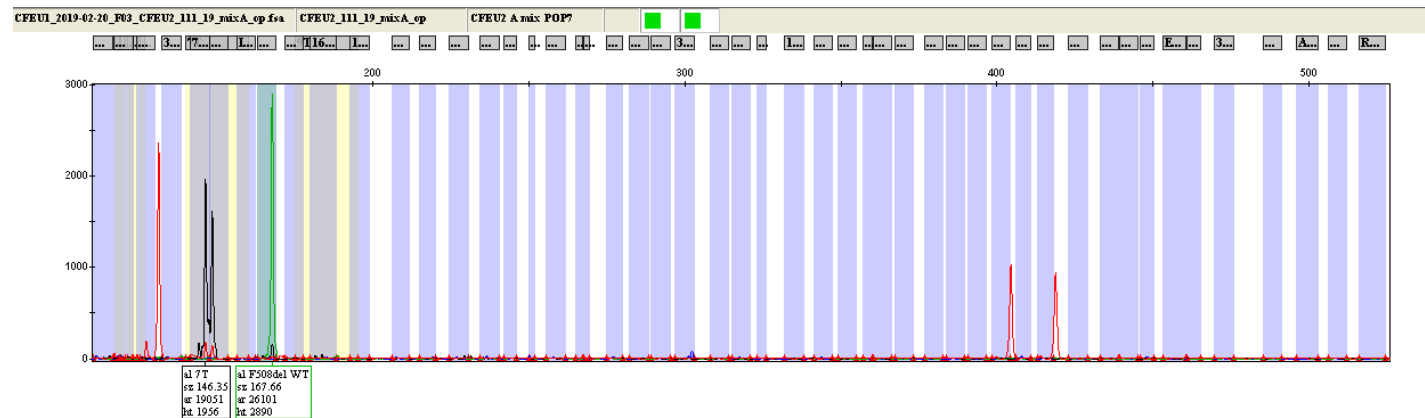
Molekulární diagnostika



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

lumacaftor

(někdy označovaný jako látka VX-809; Vertex Pharmaceuticals). lumacaftor usnadňuje transport proteinu CFTR na buněčnou membránu a interferuje s potranslačním procesem jeho seskládání



Molekulární diagnostika má dnes tyto hlavní praktické přínosy

5) preventivní kroky s minimalizovanými vedlejšími účinky

What is

Long QT Syndrome?

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

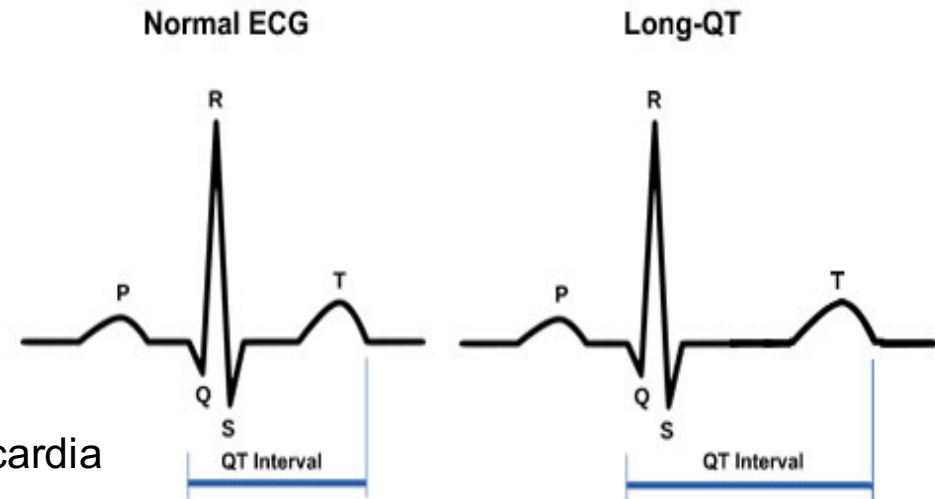
Srdeční kanálopatie

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)

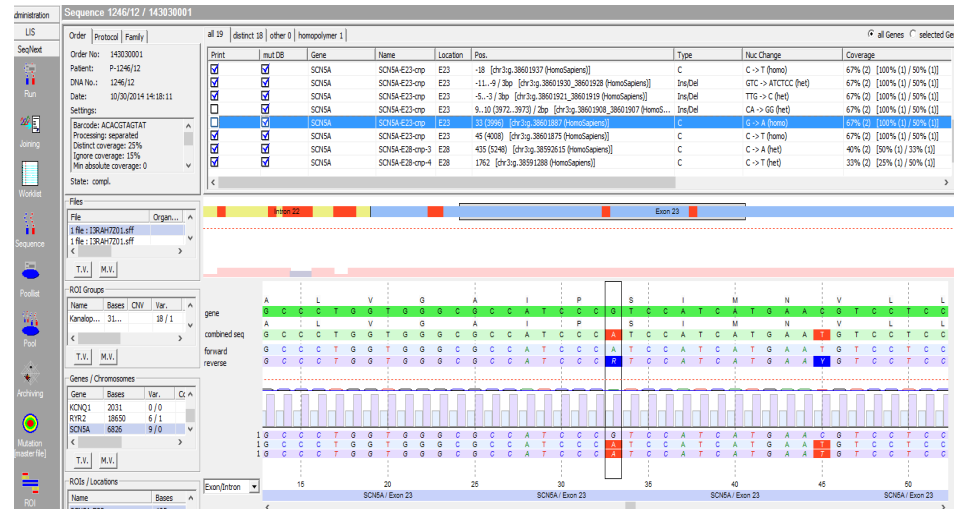
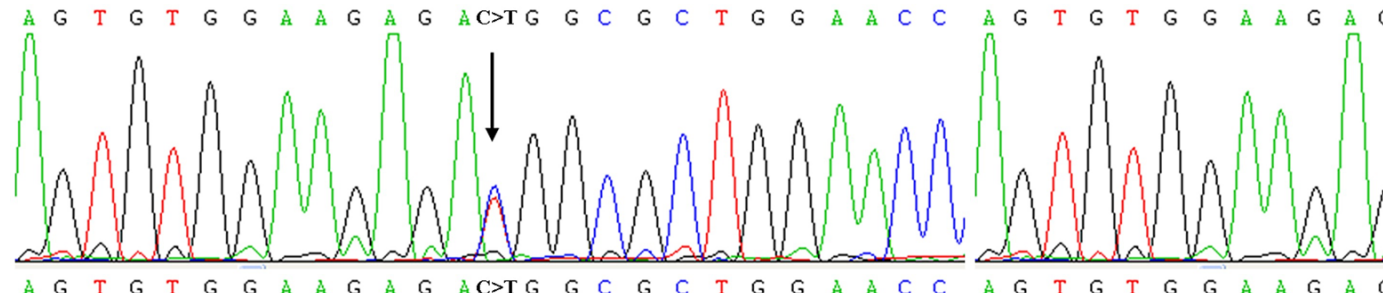
LQT 3 (sleep and rest; SCN5A)

40 a více asociovaných genů

Long QT syndromy

Diagnostika

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



SeqNext (JSI Medical Systems)

Molekulární diagnostika má dnes tyto hlavní praktické přínosy

5) preventivní kroky s minimalizovanými vedlejšími účinky

Prenatální vyšetření



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



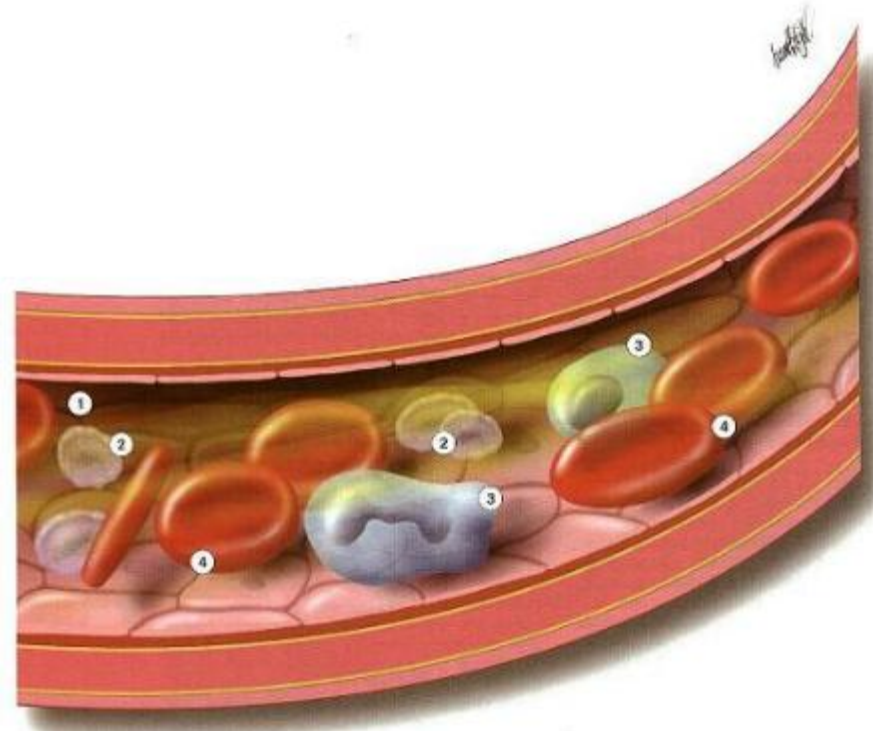
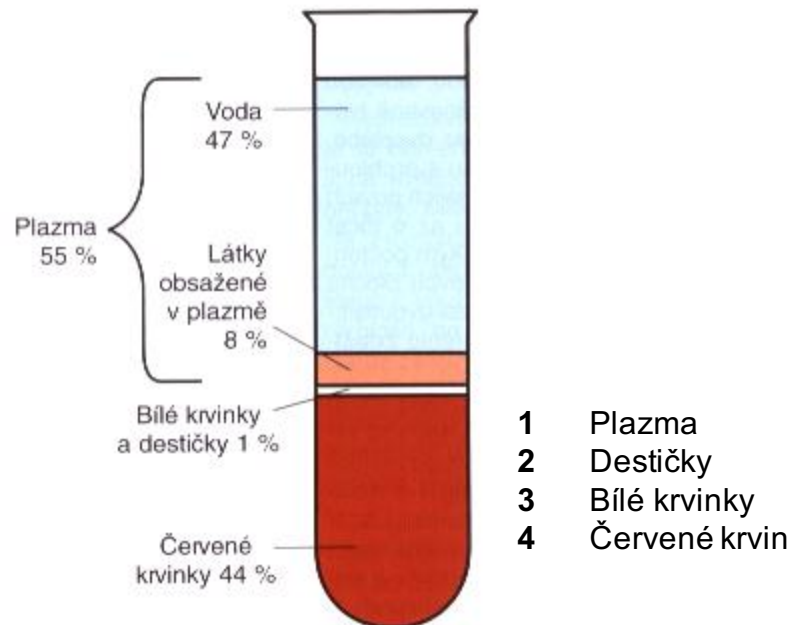
Prenatální vyšetření

Zdroje fetální DNA - neinvazivní výkony

Volná fetální DNA cfDNA

Krev je složena z buněk a plazmy.

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



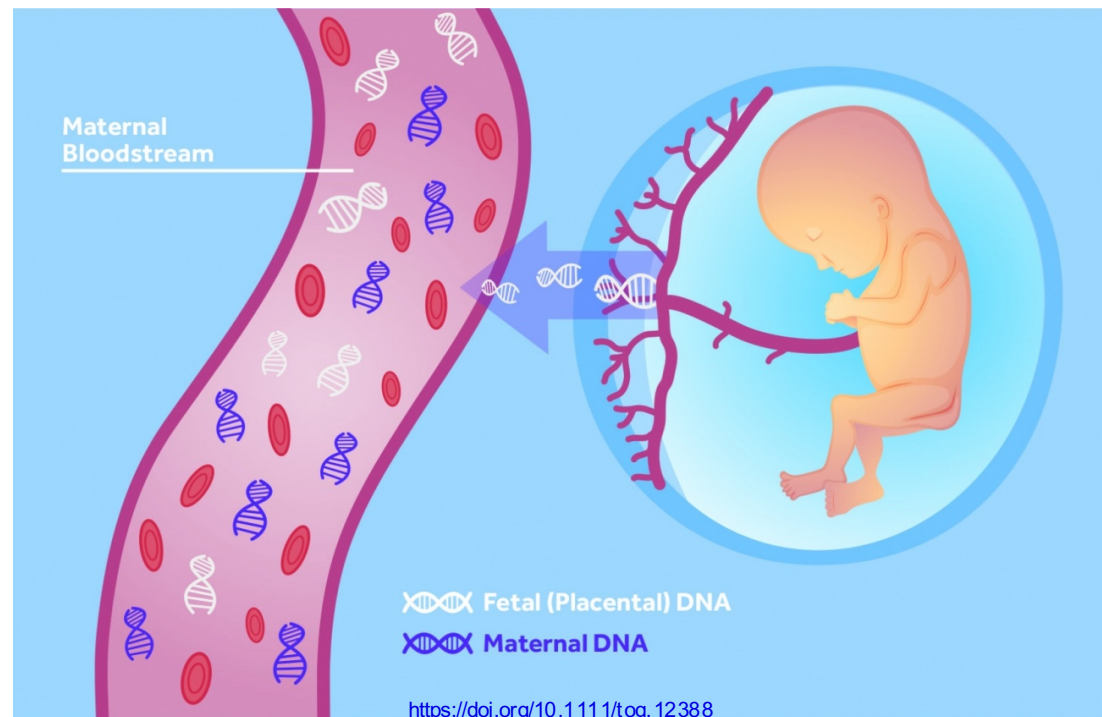
Prenatální vyšetření

Zdroje fetální DNA - neinvazivní výkony

Volná fetální DNA cfDNA

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.



Prenatální vyšetření

Zdroje fetální DNA - neinvazivní výkony

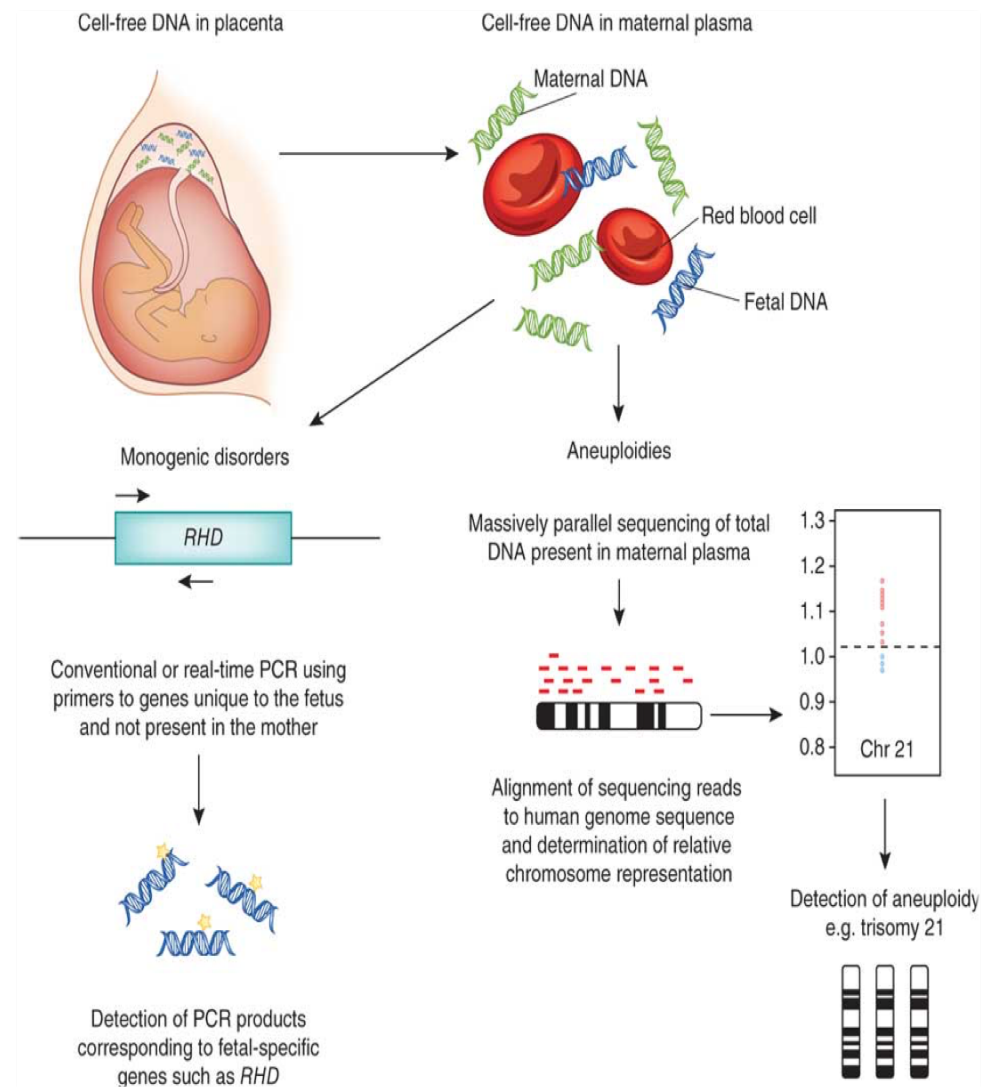
Analýza volné fetální DNA cfDNA

NIPS - A

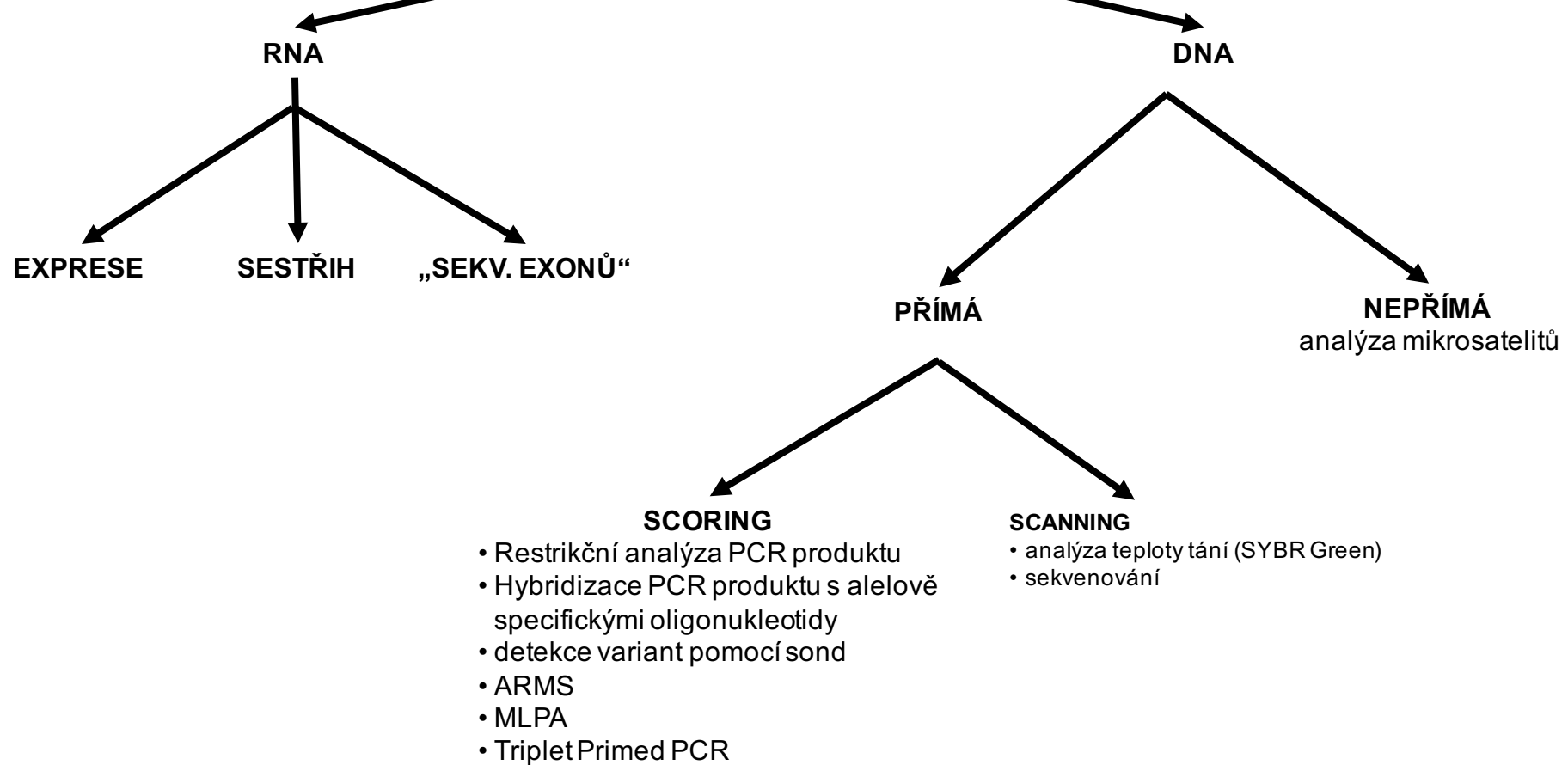
- detekce chromosomálních aneuploidí

NIPS - M

- genotypizace fetální RhD
- determinace fetálního pohlaví pro X,Y-vázané choroby
- diagnostika monogenických chorob



Molekulární diagnostika genetických chorob



MUNI
MED