



SBORNÍK

1. ČESKOSLOVENSKÝ KONGRES LÉKAŘSKÉ GENETIKY

Luhačovice

2. – 4. 4. 2025



SBORNÍK

1. ČESKOSLOVENSKÝ KONGRES LÉKAŘSKÉ GENETIKY

Luhačovice

2. – 4. 4. 2025

Pořadatelé: Společnost lékařské genetiky a genomiky ČLS JEP
Laboratoř molekulární biologie a genetiky Nemocnice České Budějovice, a.s.
Slovenská spoločnosť lekárskej genetiky o.z., SLS

Autor: Scheinost Ondřej, Dušková Petra, Prušáková Daniela, Reichensdörferová Dominika

Titul: Sborník 1.Československý kongres lékařské genetiky, Luhačovice 2. – 4. 4. 2025

Nakladatelství: Laboratoř molekulární biologie a genetiky
Nemocnice České Budějovice, a.s., B. Němcové 585/54, České Budějovice 37001

Rok vydání: 2025-03-24

ISSN 2571-1997

Využitie prirodzenej ľudskej DNA variácie na studium vývinových postihnutí ako aj funkcie mozgu

Gecz J.

Faculty of Health and Medical Sciences, Adelaide Medical School, The University of Adelaide

Vývinové poruchy mozgu sú ako skupina ochorení veľmi časté, ovplyvňujúce až 1 z 8 detí. Genetická architektúra týchto ochorení je taktiež komplikovaná, geneticky ako aj molekulárne, a ako nás veda za posledných 30 rokov naučila. Momentálne je známe, že až 1 zo 6 (15%) známych proteín-kódujúcich génov zodpovedá, cez zmenu DNA, za vznik týchto typov ochorení. Výskum môjho laboratória ako aj spolupracovníkov v Austrálii a po svete identifikoval asi 350 takýchto génov. Medzi nimi sú gény zodpovedné za nesyndrómové mentálne postihnutie (AFF2), epilepsie (ARX, IQSEC2, PCDH19, TBC1D24, GOSR2), autizmus (ZMYND11), či za detskú mozgovú obrnu (DMO či CP, cerebral palsy; CTNNB1, atď.), identifikované v posledných 10 rokoch. DMO je klinický termín používaný na opis spektra porúch pohybu a držania tela, ktoré sú definované ako výsledok neprogresívnych porúch ('úrazov') vývinu mozgu plodu ci novorodenca. Približne 1 z 500 jedincov alebo viac ako 17 miliónov jedincov na celom svete žije s DMO.

V tejto prednáške sa sústredím na náš priekopnícky výskum genetického pôvodu DMO, a to na pozadí našich úspechov v identifikácii génov zodpovedných za mentálne postihnutie, epilepsie, ci autizmus. Náš výskum ukazuje, že až 1 z 3-4 neselektovaných prípadov DMO má genetický pôvod. Historicky bola DMO spojená s rôznymi rizikovými faktormi, ako je predčasný pôrod, viacnásobné tehotenstvo, poruchy vnútromaternicového rastu (IUGR), infekcia matky alebo perinatálna asfyxia. Ako sme zistili, tieto 'rizikové faktory', nie sú vždy pôvodom DMO, ale viac menej dôsledkom vývinovej genetickej poruchy. Prediskutujem zopár príkladov génov a DNA variantov (THOC2, PCDH19, KDM5C), v ktorých sme študovali molekulárne a celulárne mechanizmy do väčšej hĺbky a pomocou rôznych modelov.

Pochopenie špecifickej a hlavne genetickej etiológie a mechanizmov DMO ako aj iných vývinových ochorení mozgu je nevyhnutné na cielené zlepšenie zdravia a koniec koncov aj liečbu týchto jedincov. Včasnú genetickú testovú a precíznu terapiu na základe genetiky a genomiky jedincov s týmito ochoreniami je príležitosť, ktorú si nesmieme nechať ujsť.

Studium vzácných nemocí; historický odkaz pro súčasnosť a budúcnosť

Kmoch S.

Laboratoř pro studium vzácných nemocí, Klinika pediatrie a dědičných metabolických poruch, 1. LF UK, Praha

Úvod:

Studium vzácných nemocí je nezastupiteľným zdrojom nových poznatkov v biologii, fyziologii a patofyziologii ľovčeka a biomedicíně.

Metody:

V uplynulých 35 letech jsme vybudovali komplexní diagnosticko-výzkumnou platformu pro studium neobjasněných případů vzácných nemocí v širokém spektru klinických oborů. Pro potřeby genetické analýzy studovaných případů a následné funkční charakterizace genetických variant, genů a genových produktů našeho zájmu využíváme kombinace multi-omics technologií a cíleného studia tělních tekutin, tkání a vhodných modelů nemocí. Případy s negativními výsledky podrobujeme opakovaným analýzám dostupných

dat a novým metodologiím molekulárně-genetických vyšetření. Získané poznatky korelujeme s klinickým projevem s cílem objasnit principy a mechanismy vzniku, průběhu a možného ovlivnění nemoci.

Výsledky:

Doposud jsme zkoumali >1000 případů dětí s neurovývojovými poruchami, poruchami růstu, metabolickými poruchami a kardiomyopatiemi s diagnostickou výtěžností 35 %, včetně identifikace >20 nových kauzálních genů a kandidátních variant v dalších 15 % případů. V případech hereditárních nefropatií jsme určili genetickou příčinu u >800 rodin s diagnostickou výtěžností 35 %, včetně identifikace >10 nových kauzálních genů a kandidátních variant v dalších 27 % případů. Ve >750 případech familiárních kardiomyopatií byla diagnostická výtěžnost 40 % s identifikací kandidátních variant v dalších 21% případů. S podobnými výsledky jsou studovány případy hereditárních onemocnění oka a neurologických onemocnění s pozdním nástupem. Genetické varianty zdravých nepříbuzných osob analyzovaných v těchto případech jsou reportovány v databázi NCMG (<https://ncmg.cz/>), případně v databázi ACGT (<https://www.acgt.cz/database/>). Získané poznatky umožnily zavedení nových cílených diagnostických postupů, objasnění patofyziologie těchto nemocí, definici terapeutických cílů a v několika případech i zavedení nového způsobu léčby (AA amyloidóza). Výzkum zlepšil pochopení některých buněčných procesů, jako jsou například biogeneze a funkce mitochondrií, existence detoxikační smyčky jater a krve, funkce purinozomu v de novo syntéze purinů a kontrola vezikulárního transportu proteinů.

Závěr:

Případy neobjasněných vzácných nemocí jsou příležitostí a motivací k dalšímu výzkumu. Předpokladem a zárukou úspěšného výzkumu je systematická spolupráce lékařů a diagnostických laboratoří s výzkumnou laboratoří našeho typu.

Český národní omický repozitář: Brána ke sdílení genomických dat v Evropě

Bystrý V.

CEITEC Masarykova univerzita, Brno

Sdílení lidských genomických dat na celoevropské úrovni představuje zásadní krok k preciznější diagnostice, rozvoji nových léčebných metod a personalizaci zdravotní péče. Přestože je tento přístup vědecky velmi atraktivní, jeho praktické zavedení stále komplikuje legislativní fragmentace, obavy o bezpečnost citlivých údajů a technické limity současných systémů.

V rámci přednášky představíme aktuální snahy evropských iniciativ, jako jsou Federated European Genome-phenome Archive (FEGA), Genomic Data Infrastructure (GDI) a ELIXIR, které aktivně budují federovanou infrastrukturu umožňující bezpečné sdílení a analýzu genomických dat napříč Evropou. Budeme diskutovat o inovativním přístupu „data visiting“, tedy analýze genomických dat přímo v místě jejich uložení, čímž se minimalizují bezpečnostní rizika a respektuje soukromí pacientů.

Hlavním bodem přednášky bude představení Českého národního omického repozitáře, který vzniká ve spolupráci s ELIXIR CZ a v rámci projektu Open Science II. Tato infrastruktura se stane klíčovým českým uzlem v rámci evropské sítě federovaných genomických dat. Poskytne výzkumníkům jednoduché a bezpečné prostředí pro ukládání, sdílení a primární analýzu genomických dat na evropské úrovni, včetně integrace do evropské Beacon sítě, která umožní efektivní vyhledávání. Budeme diskutovat, jak plánovaná infrastruktura usnadní práci producentům dat, umožní klinickým genetikům přímé propojení genomických dat s klinickými repozitáři, a jaké přínosy přinese výzkumníkům možnost realizovat analýzy na reprezentativních evropských datech a představíme harmonogram vzniku Českého národního omického repozitáře.

Věříme, že krok k vytvoření Českého národního omického repozitáře je klíčem k bezpečnému otevření dveří do evropského datového prostoru a významnému posílení potenciálu české lékařské genetiky v rámci mezinárodní spolupráce a je nezbytným prvním krokem pro budoucnost zdravotnictví založeného na datech (data-driven healthcare). Proto považujeme za mimořádně důležité tuto plánovanou datovou infrastrukturu představit a aktivně diskutovat se zástupci odborné komunity.

Problematika informovaného souhlasu u genomických dat nejen v onkologii – etické hledisko

Staňo Kozubík K.^(1,2), Franková V.^(2,3)

1 Ústav lékařské genetiky a genomiky, LF MU a FN Brno

2 Ústav humanitních studií v lékařství, 1.LF UK v Praze

3 Klinika pediatrie a dědičných metabolických poruch, 1. LF UK a VFN v Praze

Díky cenové dostupnosti se stanovení sekvence exomu a genomu pomocí masivního paralelního sekvenování (MPS) stalo součástí nejen výzkumu, ale i diagnostiky. MPS bývá nejčastěji indikováno za účelem určení diagnózy při podezření na genetickou příčinu klinických obtíží, nebo pro zjištění spektra genetických variant u onkologického onemocnění pro optimální volbu léčby. Záradečná genetická informace se během života nemění a tato data tak lze využít pro další analýzy v případě nových zdravotních

komplikací s možnou dědičnou příčinou. Data od onkologických pacientů v sobě také skrývají informace o zárodečném genomu, zejména ve spojení s informací o frekvenci variant, protože i nádorová DNA může obsahovat dědičné genetické varianty. Genomická data spolu s asociovanými daty o zdravotním stavu jedince by proto měla být bezpečně uchováována k další analýze a možné interpretaci v souladu se stavem vědeckého poznání. Zároveň představují ve spojení s klinickými údaji obrovský potenciál pro medicínský pokrok. Genomická data díky své povaze spadají do zvláštní kategorie osobních údajů: citlivých údajů – jsou unikátní pro konkrétního jedince, navíc se týkají nejbližších příbuzných a představují tak potenciál zneužití. Je tedy obzvláště třeba respektovat princip autonomie každého jedince, tedy umožnit dotyčnému svobodné rozhodování za sebe sama a své zdraví učiněné na základě plné informovanosti.

Klíčovou roli proto ve sběru, uložení a následném možném využití genomických dat hraje informovaný souhlas, prostřednictvím kterého je i autonomie jedince vyjádřena. Stále ovšem existují otázky, na které nejsou odpovědi zcela jasné. Mezi ně patří: Je třeba mít nový informovaný souhlas pro každé další využití těchto dat? Jak lze využívat data dle dosud existujících souhlasů s ohledem na jejich možný přínos a zachování práva na soukromí jednotlivců? Jak by měl vypadat informovaný souhlas, který by tuto problematiku komplexně vystihl? Náš příspěvek bude reflektovat tyto otázky z etického hlediska a pokusí se nastínit odpovědi, které by měly být využitelné nejen v onkologii ale i v jiných oblastech medicíny, ve kterých genomická data vznikají.

Tato práce byla podpořena projektem Národní ústav pro výzkum rakoviny (Program EXCELES, ID: LX22NPO5102) – Financováno Evropskou unií, projektem Využití komplexního genomického testování – na cestě k lepší diagnostice, reg. č. CZ.02.01.01/00/23_020/0008555, Operační program Jan Amos Komenský (EFRR) a projektem BBMRI_CZ LM2023033.

Genetika vzácného onemocnění ledvin fokální segmentální glomeruloskleróza (FSGS) u dospělé střeoevropské populace

Thomasová D.⁽¹⁾, Zelinová M.⁽¹⁾, Libík M.⁽¹⁾, Geryk J.⁽¹⁾, Votýpka P.⁽¹⁾, Kollár M.⁽²⁾, Macek M.⁽¹⁾

1 Ústav biologie a lékařské genetiky, FN Motol a 2. LF UK, Praha

2 Pracoviště klinické a transplantační patologie, IKEM, Praha

Úvod: Fokální segmentální glomerulární skleróza (FSGS) je klinicky a geneticky heterogenní jednotka, která ovlivňuje glomerulární funkci ledvin a manifestuje se proteinurií. Často dochází k progresivnímu zhoršování funkce ledvin a přibližně u 15% pacientů dochází k selhání ledvin. Část případů FSGS je monogenní etiologie. Prevalence genetické FSGS s nástupem v dospělosti je v odborné literatuře považována za značně podhodnocenou a její klinické, genetické a histologické rysy nebyly jasně popsány.

Metodika: Multicentrická studie, kohorta: dospělí pacienti s FSGS potvrzenou biopsií ledviny, rodinnou anamnézou FSGS nebo sporadickým primárním FSGS rezistentním na steroidy.

Metody: celoexomové a celogenomové sekvenování, bioinformatika, analýza klinických dat, reanalýza biopsií podle Columbijské klasifikace.

Výsledky: Současný soubor tvoří 225 indexových pacientů průměrného věku 48 let. Analýza DNA odhalila patogenní varianty v genech spojených s FSGS u 16 % (n=35) nepříbuzných pacientů, z toho bylo detekováno 37 % (n=13) nových variant. Nejčastějšími mutacemi byly varianty v Alportovských genech COL4A (50 %), v rodinách s FSGS varianty v genu INF2 (8 %) a PAX2 (8 %). U sporadických FSGS pacientů byly nejčastější varianty v AR genu NPHS2 (17 %) a identifikovali jsme nejrozšířenější patogenní variantu V290M

v NPHS2 jako „founder“ mutaci pocházející ze střeoevropského geografického regionu. Analýzou a korelací klinických a histologických dat s genotypem jsme zjistili statisticky signifikantní rozdíly ve věku, symptomaticke manifestace, četnosti selhání ledvin a některými histologickými rysy biopsií ledvin u pacientů rozdělených dle genotypu do 3 skupin: s Alportovskými variantami, s variantami v podocytoových genech a bez genetického nálezu.

Závěr: Jedná se o první rozsáhlou studii genetické FSGS s nástupem v dospělosti v české populaci. Přináší nové poznatky o genetických a klinických rysech FSGS u dospělých a výsledky zlepšují personalizovanou lékařskou péči.

Podpořeno z grantu č. NV19-06-00443 (AZV ČR), IPE č. 6980364 (2. LF UK, Praha)

Exomové sekvenování jako standard molekulární diagnostiky vzácných onemocnění: přehled vyšetření a vybrané kazuistiky

Markéta Wayhelová, Lenka Dvořáková, Petra Peldová, Malgorzata Libik, Zuzana Mušová, Petra Hedvičáková, Pavel Votýpka, Pavel Tesner, Emílie Vyhnálková, Marcela Malíková, Dana Thomasová, Milan Macek Jr.¹

Ústav biologie a lékařské genetiky, 2.LF UK a FN Motol

ÚBLG 2.LF UK a FN Motol je klíčovým tuzemským pracovištěm s četnou mezinárodní spoluprací na poli výzkumu a diagnostiky vzácných onemocnění s nástupem v raném dětském věku. Vzhledem ke svojí celosvětové prevalenci představují vzácná onemocnění významnou indikaci k vyšetření molekulárně diagnostickými přístupy na základě odhadu, že zhruba 80 % z nich má genetickou podstatu. Metody analýzy genomu zaměřené zejména na jeho kódující oblasti přispívají k objasnění molekulární podstaty vzácných onemocnění ve 30–50 %. Prezentujeme naše dlouhodobé zkušenosti s molekulárně genetickou diagnostikou využívající exomové sekvenování a vybrané kazuistiky vzácných onemocnění, které jsme díky tomuto přístupu a našim zkušenostem dokázali objasnit. Důležitou činností našeho pracoviště je rovněž sdílení vyřešených případů a nálezů vzácných variant skrze veřejné databáze genomických variant. Pro mnoho pacientů vyšetřením exomu skončila dlouholetá diagnostická odysea a otevřely se nové možnosti specifické multidisciplinární péče. Nevyřešené případy představují významný prostor pro systematické periodické reanalýzy dat a využití širokého potenciálu nových technologií sekvenování dlouhých čtení.

Podpořeno projekty NCMG (The National Center for Medical Genomic) LM2018132 a Institucionální podpory FNM 00064203.

Lengyelská kultura – Celoxomová analýza genetických onemocnění kostních pozůstatků z období 1850-1930

Michalovská R.⁽¹⁾, Hrušková L.⁽¹⁾, Paszeková H.⁽¹⁾, Krulišová V.⁽¹⁾, Mazura I.⁽²⁾, Smrčka V.⁽³⁾

1 GHC GENETICS s.r.o., Praha

2 Ústav soudního lékařství a toxikologie 1. LF UK a VFN v Praze

3 Ústav dějin lékařství a cizích jazyků 1. LF UK, Praha

Lengyelská kultura je archeologická kultura přelomu neolitu a eneolitu rozšířená na starém sídelním území středních a severovýchodních Čech. Tato kultura byla jednou z nejmenších z Evropy. Průměrná výška

mužů dosahovala 164 cm a u žen byla pouze 151 cm. Z oblasti Zengővárkony (Maďarsko) bylo studováno několik kosterních pozůstatků z období 1850 – 1930, kdy některé z nich mají předpoklady vrozeného genetického onemocnění pohybového aparátu. Například malý vzrůst, brachydaktylii s ulnární nebo radiální deviací prstů, krátké nohy s výraznou dysplazií kyčelního kloubu. U vybraných kosterních pozůstatků byla provedena izolace DNA a analýza pomocí exomového sekvenování (Whole exome sequencing). Cílem projektu je cílená analýza a popis možných genetických onemocnění v Lengyelské kultuře.

Implementace rychlého celogenomového sekvenování u novorozenců a dětí hospitalizovaných na JIP v České republice: první výsledky z celonárodní studie „Baby Fox“

Slabá K.^(3,4), Pokorná P.^(1,2), Balasčáková M.⁽⁵⁾, Svatoňová T.^(3,4), Honzík T.⁽⁶⁾, Malý J.⁽⁷⁾, Skálová S.⁽⁷⁾, Macek M.⁽⁵⁾, Slabý O.^(1,2)

1 Ústav biologie, LF MU, Brno, CEITEC, Masarykova univerzita, Brno

2 Centrum precizní medicíny, FN Brno

3 Pediatrická klinika, LF MU a FN Brno

4 Ústav lékařské genetiky a genomiky, LF MU a FN Brno

5 Ústav biologie a lékařské genetiky, 2. LF UK a FN v Motole, Praha

6 Klinika pediatrie a dědičných metabolických poruch, 1. LF UK a VFN v Praze

7 Dětská klinika, LF UK v Hradci Králové a FN Hradec Králové

Úvod

Genetická onemocnění jsou jednou z hlavních příčin úmrtnosti novorozenců a dětských pacientů na jednotkách intenzivní péče (JIP). Rychlé celogenomové sekvenování (rWGS) má potenciál revolučně změnit diagnostiku a léčbu vzácných onemocnění, čímž podporuje rozvoj precizní medicíny v prostředí JIP. Projekt Baby Fox je prospektivní multicentrická studie, realizovaná na neonatálních a pediatrických JIP ve čtyřech fakultních nemocnicích v České republice. Studie hodnotí proveditelnost, diagnostickou výtěžnost a klinickou využitelnost rWGS. Zde prezentujeme první výsledky získané během 6 měsíců po zahájení studie.

Metodologie

Pacienti s podezřením na monogenní onemocnění byli zařazeni do studie na základě multidisciplinární diskuse. Bylo provedeno trio rWGS s fenotypově řízenou analýzou. Byla hodnocena demografická data, termíny podle Human Phenotype Ontology (HPO), doba zpracování rWGS, výsledky sekvenování a jejich klinická využitelnost (C-GUIDETM).

Výsledky

V období mezi říjnem 2024 a březnem 2025 podstoupilo trio rWGS 8 novorozenců (medián věku 22 dní [rozmezí 1–90 dní]) a 12 dětských pacientů (medián věku 8 let [rozmezí 6 měsíců –17 let]). Medián doby zpracování a vydání výsledkového protokolu byl 6 dní (rozmezí 3–7 dní), přičemž na jednoho pacienta připadalo mediánově 11 HPO termínů (rozmezí 4–23). Varianty vedoucí ke stanovení diagnózy byly identifikovány u 14 pacientů, včetně jedné nekódující a jedné strukturní varianty, což aktuálně odpovídá diagnostické výtěžnosti 70 %. U 7 pacientů (47 %) mělo stanovení diagnózy dopad do následné, což zahrnovalo úpravu medikace, referování do příslušných ERN center, případně přechod na plnou paliativní péči.

Závěr

I přes multicentrický charakter projektu a komplikace s logistikou biologického materiálu naše předběžná data potvrzují proveditelnost 7denního časového rámce a odpovídající diagnostickou výtěžnost. To podtrhuje klinickou využitelnost rWGS u kriticky nemocných dětí.

Studie je podporována společností Illumina Inc., která poskytla reagenty a bioinformatická řešení.

Podpořeno MZ ČR - RVO (FNBr, 65269705) a grantem LF MU MUNI/A/1591/2023.

Výsledky exomového sekvenování u pacientů s poruchami autistického spektra

Sedláčková L.⁽¹⁾, Laššuthová P.⁽¹⁾, Šafka Brožková D.⁽¹⁾, Havlovicová M.⁽²⁾

1 Neurogenetická laboratoř, Klinika dětské neurologie, 2. LF UK a FN v Motole, Praha

2 Ústav biologie a lékařské genetiky, 2. LF UK a FN v Motole, Praha

Úvod

Poruchy autistického spektra (PAS) tvoří heterogenní skupinu neurovývojových onemocnění (NVO), které jsou charakterizovány narušením sociálních interakcí, komunikace a stereotypními, opakujícími se vzorci chování, zájmů a aktivit. Příčiny vzniku PAS jsou komplexní se zastoupením jak genetických faktorů, tak faktorů vnějšího prostředí a mezi časté komorbidity patří intelektová nedostatečnost a epilepsie. PAS jsou také součástí řady chorob se známou genetickou etiologií s monogenní dědičností.

Metodika a soubor pacientů

Exomové sekvenování (ES) bylo provedeno u celkem 37 pacientů s PAS, kteří již byli sekvenčně vyšetřeni jinými molekulárně genetickými metodami. Soubor těchto pacientů byl tvořen pacienty s PAS (n = 15), dětským autismem (n = 17) a atypickým autismem (n = 5) s projevy opožděného vývoje řeči (n = 13), intelektové nedostatečnosti (n = 19) a epilepsie (n = 10). Vyhledávání suspektních variant bylo zaměřeno na varianty s nízkou populační frekvencí (méně než 1 %) v genech asociovaných s PAS, intelektovou nedostatečností, epilepsií nebo neurologickým onemocněním podle databází OMIM a HGMD Professional.

Výsledky

Kauzální varianty, které pravděpodobně objasňují příčinu obtíží u pacientů, byly nalezeny u 6 pacientů (16,2 %) v 5 genech. U dvou pacientů byly nalezeny heterozygotní de novo varianty vedoucí k zařazení předčasného STOP kodónu v genu KMT2C, který byl nedávno popsán u pacientů s Kleefstra syndromem typu 2. Dále byla nalezena heterozygotní de novo varianta v genu MECP2 u pacientky s dětským autismem, stereotypními pohyby rukou, mírnou faciální stigmatizací a epilepsií od 2,5 let věku. U dalšího pacienta byla nalezena v homozygotním stavu varianta v genu NHLRC2, která již byla opakovaně popsána jako příčina FINCA syndromu s AR dědičností. U pacienta s dětským autismem a epilepsií od 8 let věku byla nalezena heterozygotní de novo varianta v genu SETD2, který je spojován s vývojovými poruchami intelektu.

Závěr

Tento příspěvek představuje výsledky ES pouze na malém souboru pacientů z naší NGL laboratoře. ÚBLG má dlouhodobou zkušenost s vyšetřováním pacientů s PAS, kdy výtěžnost provedených vyšetření nebyla dosud velká, zejména díky tehdy dostupným metodám. Ale i přesto se u části pacientů podařilo

odhalit zajímavé varianty, většinou de novo vzniklé, prostřednictvím panelového testování. V současné době, se zavedením ES do vyšetřovacího panelu pro pacienty s PAS, se naskýtá možnost objasnit etiologii postižení u další části z nich. Ve většině případů PAS se velmi pravděpodobně jedná o multifaktoriálně podmíněnou poruchu, na jejíž etiologii se často podílí kumulativní efekt variant s malým fenotypovým účinkem, které mohou být také zděděné od jednoho z rodičů, a proto šance na genetické objasnění variantami s velkým významem / velkým fenotypovým účinkem je poměrně malá. I přesto se domníváme, že genetické testování pomocí ES zaujímá u pacientů s PAS významné místo a má své opodstatnění, zejména v rodinách s jedním postiženým a bez prokazatelné zátěže směrem k NVO.

Práce byla podpořena granty: NU22-07-00165 a LX22NPO5107 (MEYS): Financed by EU – Next Generation EU

Od kandidátní varianty k popisu nového onemocnění: varianty v genu EHMT2 způsobují neurovývojové onemocnění podobné Kleefstra syndromu

Nosková L.⁽¹⁾, Hnízda A.⁽¹⁾, Gřegořová A.⁽²⁾, Stránecký V.⁽¹⁾, Steiner Mrázová L.⁽¹⁾, Trešlová H.⁽¹⁾, Melenovská P.⁽¹⁾, Hodaňová K.⁽¹⁾, Hartmannová H.⁽¹⁾, Brinsa V.⁽¹⁾, Musilová K.⁽¹⁾, Kádek A.⁽³⁾, Man P.⁽³⁾, Nikl P.⁽⁴⁾, Procházka J.⁽⁴⁾, Sikora J.⁽¹⁾, Kmoch S.⁽¹⁾

1 Laboratoř pro studium vzácných onemocnění, Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu,

1. LF UK a VFN v Praze,

2 Ústav klinické a molekulární patologie a lékařské genetiky, FN Ostrava

3 Mikrobiologický ústav, AV ČR, v. v. i., Praha

4 České centrum pro fenogenomiku, Ústav molekulární genetiky, AV ČR, v. v. i., Praha

V rámci analýz genomických dat jsou častým nálezem varianty nejasného významu, jejichž kauzalitu je třeba studovat vhodnými přístupy. V přednášce chceme prezentovat cestu od nálezu kandidátní varianty v genu dosud neasociovaném s fenotypem k potvrzení patogenity a popisu nového onemocnění. U pacientky s neurovývojovým onemocněním byla pomocí exomového sekvenování nalezena de-novo varianta v genu EHMT2 kódující lysin methyltransferázu G9a. V rámci mezinárodní spolupráce bylo shromážděno klinické a genetické informace dalších pacientů se shodnými fenotypovými charakteristikami. Funkční analýzy prokázaly biologickou relevanci nalezených variant a dysfunkci stejné methylační dráhy jako u Kleefstra syndromu asociovaného s genem EHMT1. U myšího modelu onemocnění byly nalezeny některé klíčové fenotypové charakteristiky přítomné u pacientů.

Grantová podpora: NU23-07-00281, NW24-04-00067, LM2023067, UNCE/MED/007, LX22NPO5107

Kardiogenetika

Genetické aspekty aneurizmy a disekcie hrudnej aorty

Grünnerová L.⁽¹⁾, Mlková I.⁽¹⁾, Petrovič R.⁽²⁾, Melišová K.⁽¹⁾

1 Oddelenie klinickej genetiky, Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UNB, Bratislava

2 Oddelenie molekulovej a biochemickej genetiky, Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, LF UK a UNB, Bratislava

Aneurizma hrudnej aorty predstavuje geneticky široko heterogénne ochorenie asociované s rizikom vzniku život ohrozujúcich komplikácií v zmysle disekcie a ruptúry aorty. Asymptomatický priebeh rastu aortálnej aneurizmy v mnohých prípadoch zabraňuje adekvátnej diagnostike a liečbe. So súčasnými pokrokmi molekulárno-genetickej diagnostiky a s dostupnosťou genetického vyšetrenia sa do popredia záujmu dostáva snaha identifikovať pacientov vo zvýšenom riziku vzniku aneurizmy a disekcie hrudnej aorty. V súčasnosti je možné molekulárno-genetickými metódami objasniť približne 20% prípadov hrudných aortopatií. Táto forma sa označuje ako hereditárna, resp. familiárna a v jej etiológii sa uplatňuje postihnutie jedného vysoko-rizikového, vysoko-penetrantného génu. 80% prípadov tvoria pacienti so sporadickým výskytom aneurizmy a disekcie hrudnej aorty, genetická etiológia tejto skupiny však nie je jednoznačne objasnená.

Na hereditárnu formu je potrebné myslieť najmä v prípadoch identifikácie aneurizmy/ disekcie hrudnej aorty do veku 60 rokov, bez prítomnosti pridružených kardiovaskulárnych rizikových faktorov, v prípade pozitívnej rodinnej anamnézy aortopatie alebo náhleho kardiálneho úmrtia. Vysoké podozrenie môže vzbudiť aj prítomnosť aneurizmy či disekcie stredne veľkých tepien, prítomnosť systémových klinických príznakov či špecifických príznakov, ako napríklad arteriálna tortuozita pri Loyes-Dietzovom syndróme, alebo iris flocculi pri ACTA2 asociovej familiárnej aneurizme aorty typu 6. Vznik hereditárnych aortopatií môže byť podmienený viacerými molekulárnymi mechanizmami: dysfunkciou extracelulárneho priestoru v aortálnej médii, dysreguláciou TGF β signalizačnej kaskády a dysfunkciou kontraktilného aparátu hladkej svalovej bunky.

Poznanie genetickej etiológie aneurizmy a disekcie hrudnej aorty je kľúčové z hľadiska stratifikácie rizika, nastavenia liečebného manažmentu ako aj plánovania elektívneho chirurgického výkonu. Inovatívny spôsob identifikácie osôb vo zvýšenom riziku vzniku hereditárnej aneurizmy a disekcie aorty, ako aj iných závažných geneticky podmienených kardiovaskulárnych ochorení predstavuje post-mortem genetické testovanie. V súlade s odporúčaniami Európskej asociácie pre kardiovaskulárne patológie je po vzore našich českých kolegov veľkou víziou nášho pracoviska iniciovať pilotný projekt post-mortem testovania ľudí s náhlým kardiálnym úmrtím (tzv. molecular autopsy) na území Slovenskej republiky.

Geny pevně asociované s fenotypem dědičných KVO, co pacientům referovat?

Krebsová A.

IKEM, Praha

Rozvoj genetickej diagnostiky priniesl uplatnení celoexomových panelů (CES a WES) v diagnostických, molekulárně genetických laboratořích v ČR. Množí se vedlejší nálezy v genech, jejichž role v rozvoji onemocnění byla možná experimentálně popsána, ale jistě není dle současných kardiogenetických doporučení vhodná pro rutinní diagnostiku či dokonce referování pacientům. Tito s takovou informací,

obdobně jako, na kardiogenetiku ne specializovaný, klinický genetik, často neumí zacházet. Díky dostupným médiím může vyšetřený pacient získat dojem neodkladné časné smrti, která je s těmito onemocněními jednoznačně spojena, a dostat se tak do tzv. genetického skřípce.

Prezentace uvede přehled genů, které jsou nyní jednoznačně doporučeny evropskou kardiologickou společností (ESC) pro diagnostiku a prediktivní testování v rodinách s kardiovaskulárním dědičným onemocněním. Bude diskutována otázka Variant Nejasného Významu (VUS) a jejich referování pacientům a ošetřujícím lékařům. Důraz je kladen na možné budoucí mechanismy reanalýzy nalezených variant dle ClinVar pro diagnostické genetické laboratoře a jejich referování. Cílem příspěvku je určitá racionalizace klinicko genetické, včetně kardiogenetické, služby pacientům vyšetřovaných z nejrůznějších indikací širokými panely NGS.

Fabryho choroba jako příčina hypertrofické kardiomyopatie

Dvořáková L.⁽¹⁾, Svačinová R.⁽¹⁾, Vlášková H.⁽¹⁾, Slavíková P.⁽¹⁾, Bakalář R.⁽¹⁾, Řeboun M.⁽¹⁾, Poupětová H.⁽¹⁾, Kuchař L.⁽²⁾, Pešková K.⁽¹⁾, Linhart A.⁽³⁾

1 Diagnostické laboratoře dědičných poruch metabolismu, Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu, 1. LF UK a VFN v Praze

2 Laboratoř pro studium vzácných nemocí, Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu, 1. LF UK a VFN v Praze

3 II. interní klinika – klinika kardiologie a angiologie 1. LF UK a VFN v Praze

Fabryho choroba je multisystémové onemocnění postihující zejména endotel a buňky hladké svaloviny cév, různé typy buněk ledvin, srdečního svalu a CNS. Je způsobena deficitem lysozomálního enzymu alfa-galaktosidázy, jehož gen GLA je lokalizován na X-chromozomu (Xq22.1). V genu GLA bylo identifikováno více než 1000 patogenních variant, většina z nich je privátních. Tíže fenotypových projevů se odvíjí od typu mutace. Závažné mutace jsou obvykle spojeny s multisystémovým onemocněním, hypomorfnní mutace způsobují primárně postižení srdce a/nebo ledvin. Kardiální forma onemocnění je obvykle spojena s variantami typu missense nebo s hlubokými intronovými variantami, řada z nich je rekurentních a populačně specifických. V České republice nacházíme nejčastěji c.644A>G p.(Asn215Ser) a c.801+48T>G (chybný sestřih mRNA).

Laboratorní diagnostika je založena na kombinaci tří metodických přístupů, biochemického, enzymologického a molekulárně genetického. Součástí molekulárně genetického vyšetření u heterozygotek může být ve specifických případech analýza X-inaktivace, jejíž význam pro predikci závažnosti fenotypových projevů je sporný, nicméně může přispět ke zpřesnění interpretace biochemických a enzymologických výsledků.

Podpora: AZV NU21-08-00324, MZ ČR – RVO-VFN 64165.

Rychlá diagnóza Danonovy choroby u pacientky s hypertrofickou kardiomyopatií

Piherová L.⁽¹⁾, Pavlovičová L.⁽¹⁾, Hartmannová H.⁽¹⁾, Hodaňová K.⁽¹⁾, Trešlová H.⁽¹⁾, Majer F.⁽¹⁾, Kalina T.⁽²⁾, Dvořáková L.⁽¹⁾, Řeboun M.⁽¹⁾, Vlášková H.⁽¹⁾, Jakša R.⁽³⁾, Kousal B.⁽⁴⁾, Kmoch S.⁽¹⁾, Paleček T.⁽⁵⁾, Sikora J.^(1,3)

1 Laboratoř pro studium vzácných nemocí, Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu 1. LF a VFN v Praze

2 Klinika dětské hematologie a onkologie, 2. LF UK a FN v Motole, Praha

3 Ústav patologie 1. LF UK a VFN v Praze

4 Oční klinika 1. LF UK a VFN v Praze

5 II. interní klinika – klinika kardiologie a angiologie, 1. LF UK a VFN v Praze

Úvod: Danonova nemoc (DD) je vzácné X-vázané onemocnění způsobené mutacemi v genu LAMP2 (OMIM 300257). U mužů se DD klinicky projevuje hypertrofickou kardiomyopatií s pre-excitací, myopatií a mírným kognitivním deficitem. Fenotyp u X-heterozygotních žen je variabilní. Z důvodu pozdní identifikace jsou zejména DD pacientky v riziku náhlé srdeční smrti.

Kazuistika: 21 letá pacientka s minimální historií v tuzemském zdravotnickém systému byla přijata (den 1) na kardiologické oddělení pro progredující srdeční selhání, slabost a opakované synkopy včetně nutnosti krátké resuscitace. Systolická dysfunkce levé komory byla hraniční. MRI nález v myokardu budil podezření ze sarkoidózy.

Provedeny byly odběry pro molekulárně genetická vyšetření (den 4) a endomyokardiální biopsie (EMB, den 8). Iničiální histologické vyšetření EMB (den 13) nepotvrdilo sarkoidozu a pacientce byl implantován kardioverter-defibrilátor (den 19). Doplnující specializované ultrastrukturální zhodnocení EMB (den 22) odpovídalo DD. WES-NGS odhalilo (den 25) přítomnost patogenní varianty NM_002294.3(LAMP2):c.470_471insTA. Mosaikovitý deficit LAMP2 proteinu odpovídající náhodné inaktivaci chromosomu X byl souběžně potvrzen (den 33) v leukocytech periferní krve průtokovou cytometrií a imunohistochemicky v endomyokardiální biopsii.

Závěr: Tento případ dokumentuje robustní a integrativní diagnostický a terapeutický algoritmus Danonovy nemoci v České republice. Nejenže byla u pacientky diagnóza stanovena na klinické, proteinové a molekulárně-genetické úrovni ve velmi krátké době od prvního kontaktu, ale zároveň současně došlo i ke kardio-intervenčnímu zajištění a tím minimalizaci rizika náhlé smrti.

Analýza kvantity proteinových produktů genu pro titin u pacientů s dilatační kardiomyopatií

Adamová M.⁽¹⁾, Koser F.⁽²⁾, Kutílková E.⁽¹⁾, Kubánek M.⁽¹⁾, Krebsová A.⁽¹⁾, Melenovský V.⁽¹⁾, Linke W.⁽²⁾

1 Klinika kardiologie, IKEM, Praha

2 Institute of Physiology II, University of Münster, Münster, Germany

Cíl: Molekulární mechanismy srdečního selhání (HF) u pacientů s heterozygotními protein ukončujícími (trunkujícími, tv) mutacemi v genu pro titin (TTN) nejsou dosud zcela jasné. Analýza proteinové exprese TTN je obtížná díky extrémní velikosti. Cílem bylo kvantifikovat proteinové produkty wildtype alely TTN v myokardu levé komory (LK) pacientů s pokročilým HF a kontrol.

Soubor a metodika: V IKEM jsme odebrali 41 vzorků explantovaných LK při Tx (26/41 dilatační kardiomyopatie-DCM, 15/41 kontrol, 35 mužů, průměrný věk 44±14 let) a provedli DNA sekvenaci z krve.

Jednalo se o 16/26 DCM-TTNtv+ a 10/26 DCM-TTNtv- s mutací v LMNA (3x), TNNT2 (2x), FLNC, BAG3, SGCD, MYH7, PLN. Kontrolní myokard byl získán od orgánových dárců s normální funkcí LK. Pomocí westernblotu ve dvofázovém polyakrylamidovém gelu jsme zjišťovali relativní množství izoform titinu-N2BA, N2B, Cronos normalizací na celkový anebo sarkomerický protein (MHC).

Výsledky: Celkové množství všech izoform titinu byl nejvyšší u kontrol, naopak nejnižší u DCM-TTNtv-. Expres N2BA a N2B byla identická ve všech skupinách vzorků, naopak exprese T2 a Cronos byla vyšší u kontrol a nižší u DCM, bez rozdílu genotypu. Poměr N2BA/N2B, zodpovědný za diastolickou tuhost byl mezi DCM skupinami stejný.

Závěry: Expres wt proteinových produktů TTN genu je u HF pacientů nižší než u non-HF kontrol. To naznačuje, že absence produktu protein-trunkující alely je částečně kompenzována zvýšenou expresí wt genu.

Překvapivě se ale neliší množství wt forem titinu u DCM-TTNtv+ a DCM-TTNtv-, což naznačuje, že kromě haploinsuficience se může v patogenezi uplatňovat toxický efekt trunkovaných proteinů.

Financováno: Program EXCELES, Projekt No. LX22NPO5104

Onkogenetika

NGS technologie Genexus: Rychlá a přesná detekce somatických mutací v onkologii

Dolinová I., Poláková D., Tvrzníková E.

Oddělení genetiky a molekulární diagnostiky, Krajská nemocnice Liberec, a.s.

Využití technologie sekvenování nové generace (NGS) se stalo klíčovým nástrojem v oblasti molekulární diagnostiky, zejména při detekci somatických mutací, které mají zásadní význam pro personalizovanou medicínu a cílenou terapii. Prezentace se zaměří na využití platformy Genexus od Thermo Fisher Scientific, která představuje revoluci v oblasti NGS díky své automatizaci. Genexus nabízí řešení pro rychlou, komplexní analýzu genomu s minimálními nároky na manuální práci, což umožňuje efektivní identifikaci somatických mutací u pacientů s různými onkologickými onemocněními.

Tento přístup nejenže zkracuje čas potřebný pro diagnostiku, ale také poskytuje kvalitní data s důrazem na citlivost a přesnost detekce. V rámci příspěvku budou prezentovány výsledky využití technologie Genexus pro detekci somatických mutací za využití různých panelů, včetně custom designu. Dále bude diskutována integrace této technologie do rutinní diagnostiky.

Klíčová slova: NGS, Genexus, somatické mutace, molekulární diagnostika, personalizovaná medicína.

FastGEN pro klinickou diagnostiku

Novotný A., BioVendor

Laboratorní medicína a.s., Brno

Komplexná genetická analýza pacientok s karcinómem vaječníků: Zárodočné a somatické mutácie v kontexte personalizovanej liečby

Dolešová L., Lichvariková N., Krascšenitsová E., Svoboda M.,

Oddelenie lekárskej genetiky, Onkologický ústav sv. Alžbety, Bratislava

Masívne paralelné sekvenovanie (MPS) poskytuje komplexný pohľad na genetický profil pacientky, čím prináša nové možnosti v diagnostike genetických ochorení a personalizovanej medicíne, predovšetkým u pacientok s HGSOV (high-grade serous ovarian cancer). Tento prístup umožňuje presnejšie nastavenie liečby a lepšie pochopenie genetických príčin ochorení, čo je kľúčové pre optimalizáciu liečby, vrátane použitia PARP inhibítorov, ktoré sa stávajú dôležitou súčasťou terapeutického režimu pre tieto pacientky.

MPS sa čoraz častejšie stáva kľúčovým nástrojom v oblasti personalizovanej onkologickej terapie. Umožňuje nielen identifikovať molekulárne biomarkery a mechanizmy rezistencie na liečbu, ale aj presnejšie klasifikovať podtypy nádorov a zlepšiť prognózu ochorenia. Na germinatívnej aj somatickej úrovni sa testuje prítomnosť patogénnych alebo pravdepodobne patogénnych variantov v génoch BRCA1 a BRCA2, čo je dôležité pre rozhodovanie o vhodnosti liečby, ako je liečba PARP inhibítormi.

Na somatickej úrovni je možné testovať nádorovú DNA na prítomnosť komplexných genomických jaziev, výsledkom čoho je HRD skóre. Tento biomarker sa stáva čoraz viac relevantným, najmä pre pacientky s HGSOE. Ak HRD skóre prekračuje určitú hodnotu, pacientka je považovaná za HRD pozitívnu, čo otvára možnosť liečby PARP inhibítormi, ktoré výrazne zlepšujú výsledky liečby tým, že inhibujú opravu DNA v nádorových bunkách.

Preto je testovanie na HRD skóre a prítomnosť variantov v BRCA génoch nevyhnutné pre výber najefektívnejšej liečby. Tento biomarker má nielen prediktívny, ale aj prognostický význam. Zabezpečuje, že pacientky môžu byť správne stratifikované a dostanú liečbu, ktorá je najviac prispôsobená ich genetickému profilu. Význam testovania na tieto biomarkery nie je len v optimalizácii liečby, ale aj v zabezpečení lepšej prognózy a predĺžení života pacientiek s HGSOE.

Využití konceptu tekuté biopsie pro neinvazivní hodnocení multimodální léčby metastatického kolorektálního karcinomu: sledování mutantních klonů pomocí plazmatické NGS

Kroupová P.⁽¹⁾, Mináriková B.⁽¹⁾, Chmelařová A.⁽¹⁾, Pudil J.⁽²⁾, Pohnán R.⁽²⁾, Minárik M.^(1,3)

1 Elphogene, s.r.o., Praha

2 Chirurgická klinika 2. LF UK a ÚVN, Praha

3 Chirurgická klinika 2. LF UK a FN v Motole, Praha

Detekce minimální reziduální choroby pomocí opakované tekuté biopsie, představuje minimálně invazivní metodu pro sledování účinnosti léčby nádorového onemocnění. Analýzou cirkulující nádorové DNA (ctDNA), která se uvolňuje z nádorového ložiska do periferního oběhu, lze včas odhalit rekurenci či progresi onemocnění a následně přizpůsobit další průběh léčby.

Tohoto přístupu bylo využito u pacientky diagnostikované ve věku 53 let s KRAS-pozitivním karcinomem konečníku, kde byl po dobu více než dvou let sledován mutační profil ctDNA. V průběhu onemocnění došlo k rozvoji vícečetných metastatických ložisek, a proto byla pacientka intenzivně sledována s cílem analyzovat frekvenci a typ mutací v panelu genů dříve popsaných v asociaci s nádorovým onemocněním. Po období remise došlo u pacientky k recidivě onemocnění, která se projevila vznikem jaterních metastáz. Genetická analýza kromě tkáňové mutace KRAS (A146T) odhalila v plazmě pacientky i další mutace v genech spojených s nádorovým růstem a odpovědí na léčbu, a to APC (E1306) a TP53 (R282W). Po zahájení kombinované chemoterapie a cílené biologické léčby došlo k výraznému poklesu mutovaných frakcí těchto genů, což odpovídalo klinickému obrazu účinnosti terapie a dosažení remise. Dále byla detekována intronová delece genu RASA1, jejíž hladiny se v čase měnily, což mohlo naznačovat stav dormance onemocnění. Po provedení metastazektomie jater se na kontrolních vyšetřeních objevily reziduální léze, které korelovaly s nově detekovanými mutacemi TP53 (I255F, R249M), jež nebyly během předchozího sledování přítomny. Tyto metastázy vznikly pravděpodobně jako důsledek klonální selekce, kdy přežívající nádorové buňky s rezistentními genetickými změnami získaly převahu. Po znovunasazení léčby došlo k jejich dočasnému ústupu, což svědčilo o reakci nádoru na terapii. S pokračujícím sledováním však opět narostly mutace TP53 (R249M), spolu s dalšími genetickými změnami typickými pro agresivnější průběh onemocnění. Tento vývoj vedl k dalším léčebným intervencím, přičemž pacientka nadále zůstává monitorována.

Celkově se ukázalo, že detekce specifických mutací v ctDNA silně korelovala s vývojem onemocnění a vynikala svou vyšší specificitou a přesností ve sledování průběhu choroby oproti konvenčním metodám,

jako je monitorování hladin CEA. Z těchto výsledků vyvozujeme, že analýza cfDNA pomocí přístupu NGS může sloužit jako účinný nástroj pro monitorování progresu onemocnění, detekci jeho recidivy a hodnocení účinnosti terapie.

Podpořeno grantem TAČR FW02020209.

Genetika na mieru: Ako molekulárne testy menia liečbu onkologických pacientov

Svoboda M.

Oddelenie lekárskej genetiky, Onkologický ústav sv. Alžbety, Bratislava

Identifikácia molekulárnych biomarkerov predstavuje jeden z kľúčových krokov v manažmente onkologických pacientov a umožňuje navrhnúť viac personalizovanú a efektívnejšiu liečbu s minimalizáciou vedľajších účinkov. Prediktívne testovanie somatických biomarkerov sa tradične vykonáva z FFPE tkaniva, ktoré poskytuje spoľahlivé a uchovateľné vzorky pre molekulárnu analýzu. Hoci v súčasnej klinickej praxi ešte stále prevládajú jednogénové testy, ktoré sú účinné pri analýze obmedzeného počtu biomarkerov a pacientov, postupne sú nahrádzané masívnym paralelným sekvenovaním (MPS). Táto moderná technológia využíva komplexné génové panely na identifikáciu všetkých relevantných genomických alterácií v rámci jedného analyzačného behu, čo značne znižuje spotrebu bioptického materiálu, maximalizuje detekciu klinicky významných variantov a efektívne skracaje čas diagnostického procesu. Analýza nádorovej DNA pomocou MPS nám umožňuje vytvoriť komplexný genomický profil nádoru (CGP z angl. Comprehensive Genomic Profile) pomocou simultánneho vyšetrenia desiatok až stoviek génov naraz. Výber najvhodnejšieho diagnostického testu závisí primárne od požiadaviek indikujúceho lekára, diagnózy pacienta a taktiež aktuálnych medzinárodných usmernení, akými sú napríklad ESMO a NCCN odporúčania. Na Oddelení lekárskej genetiky Onkologického ústavu sv. Alžbety máme v súčasnosti k dispozícii široké spektrum diagnostických panelov génov – od menších, zahŕňajúcich iba gény BRCA1 a BRCA2, cez stredné panely s desiatkami klinicky relevantných génov, až po tie najkomplexnejšie pokrývajúce stovky génov s možnosťou analýzy aj robustnejších celogenómových biomarkerov, akými sú TMB alebo HRD. Tento pokrok v diagnostickom procese umožňuje presnejšie a rýchlejšie nastavenie personalizovanej terapie, čo významne prispieva k modernejšiemu manažmentu onkologických pacientov a otvára nové možnosti v personalizovanej medicíne.

Naše první zkušenosti s panelem MSK-Access® pro analýzu tekutých biopsií

Putzová Martina, Pulz Karel, Martínek Petr, Vaněček Tomáš, Hájková Veronika, Ptáková Nikola, Dolejšová Kateřina, Michal Michal

Bioptická laboratoř s.r.o., Plzeň

Cirkulující volná DNA z plazmy onkologických pacientů je využívána k detekci somatických nádorových změn. Spolehlivá detekce rakovinných faktorů ve volné cirkulující DNA (cfDNA) může překonat všechna omezení nádorového profilování přímo z tkáně nádoru. Profilování na základě cfDNA má přímý dopad na péči o onkologické pacienty: umožňuje monitorovat odpověď onemocnění na terapii, odhaluje mechanismy lékové rezistence, minimální reziduální nemoci a relaps u pacientů. Použití cfDNA jako analytu má ale svá omezení, protože velké množství volné DNA pochází z hematopoetických buněk. Somatické mutace v krve tvorných buňkách pak vedou k detekci těchto mutací v cfDNA v nízké koncentraci. Panel MSK-Access® je první z komerčně dostupných kitů pro tekuté biopsie, který využívá paralelní sekvenování

cfDNA a srovnávacího materiálu - DNA z bílých krvinek. Tento přístup umožňuje detekci somatických nenádorových změn a následné odstranění zárodečných a klonálních hematopoetických variant. Test MSK-ACCESS (vyvinutý v Memorial Sloan Kettering) umožňuje detekci všech tříd somatických genetických změn včetně SNV, indelů, CNVs a strukturálních variant v cfDNA ve vybraných genech. Vyhodnocení výsledků testu je nyní zjednodušeno využitím platformy Sophia DDM firmy Sophia Genetics (CH), využívá cílené hluboké sekvenování ve 147 klíčových genech spojených s rakovinou. Do prvních 4 runů jsme zařadili kromě kontrolních arteficiálních vzorků s několika kontrolními variantami na úrovni 1% a 5% rovněž naše NSCLC pacienty s bodovými mutacemi, fúzemi a CNVs a kohortu zdravých kontrol. Většina dříve detekovaných mutací v onkogenech a tumor-supresorových genech u těchto pacientů byla potvrzena, ale některé varianty (většina mutací a AF do 7 %) dříve detekovaných pomocí panelů pro LB bylo zhodnoceno jako mutace derivované z hematopoetických buněk, a tudíž z pohledu analýzy ctDNA jako falešně pozitivní nálezy. Paralelní sekvenace DNA z bílých krvinek využitých jako referenční sekvence k porovnání s cfDNA umožňuje lepší vhled do aktuální nádorové situace u onkologických pacientů a umožňuje kvalitnější monitoring v průběhu jejich léčby.

Unlocking Precision Medicine: How SeqOne's Integrated Platform for Somatic Analysis Simplify Genomic Workflows

Bourgard C.

Altium International s.r.o.

In the dynamic field of precision medicine, effective genomic analysis is crucial for personalized cancer care. SeqOne's integrated platform is transforming somatic analysis by streamlining complex genomic workflows. Our solution combines advanced variant detection with automated classification systems, adhering to recognized guidelines like ComPerMed and AMP/ASCO/CAP to ensure accurate variant interpretation.

The platform efficiently identifies key genomic alterations—such as SNVs, indels, CNVs, and gene fusions—while also incorporating signatures like MSI and TMB. By integrating premium annotation databases and interpretation tools, we significantly cut analysis turnaround times without sacrificing accuracy, accommodating various sample types and sequencing technologies.

By automating complex processes and utilizing standardized classification systems, SeqOne's platform addresses core challenges in precision oncology, enabling laboratories to deliver swift and precise results. This comprehensive approach enhances diagnostic efficiency and empowers clinicians to make informed treatment decisions, driving the adoption of precision medicine in clinical practice.

Hlavně se neztratit UMAPách – využití metylačních dat

Martínek P., Kinkor Z., Grendár M., Vaněček T., Ptáková N., Putzová M.

Bioptická Laboratoř s.r.o., Plzeň

Kromě rutinního hodnocení dat z metylačních čipů patologové ojediněle žádají i o zatřídění vzácných typů nádorů. Představíme naše přístupy k těmto projektům a probereme související problémy jako je normalizace různorodých setů, výběr kontrolních skupin a validace těchto mimořádných analýz.

Hereditární nádorové syndromy

Výsledky vyšetření genů hereditárních nádorových syndromů na Ústavu lékařské genetiky FNOL roce 2013 a 2021

Curtisová V.^(1,2), Janíková M.^(1,2), Kratochvílová R.⁽¹⁾, Kolaříková K.^(1,2), Langerová H.⁽¹⁾, Bojková B.⁽²⁾, Galiová I.⁽²⁾, Vrtěl R.^(1,2)

1 Ústav lékařské genetiky FN Olomouc

2 Univerzita Palackého, Olomouc

Diagnóza dědičného nádorového syndromu umožňuje cílenou léčbu a prevenci a má transgenerační dopad. U pacientů s vysokým rizikem monogenního nádorového onemocnění je indikována genetická konzultace a při splnění indikačních kritérií molekulárně-genetické vyšetření predispozičních genů. Indikační kritéria, metodika vyšetření a počet vyšetřených genů se v čase mění.

Prezentujeme výsledky vyšetření genů hereditárních nádorových syndromů u kohorty pacientů vyšetřených na Ústavu lékařské genetiky FNOL roce 2013 a 2021.

Počet vyšetření se mezi rokem 2013 a 2021 zvýšil u diagnosticky testovaných pacientů 3,2 x (ze 106 na 348) se záchytem 15,1 %, resp. 14, 4 % a u prediktivně testovaných pacientů 2,6 x (ze 40 na 105) s konstantním záchytem 30 %. O prediktivní vyšetření mají větší zájem ženy (65 % resp. 70 %)

Změna indikačních kritérií spolu se zvýšením počtu vyšetřených genů vede ke zvětšení objemu vyšetření při zachování záchytu.

Česká data z germinálního testování karcinomu prsu

Kleiblová P.^(1,2), Nehasil P.⁽¹⁾, Janatová M.⁽¹⁾, Soukupová J.⁽¹⁾, Vočka M.⁽³⁾, Kleibl Z.⁽¹⁾, Konzorcium CZECANCA

1 Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, 1. LF UK a VFN v Praze

2 Ústav biologie a lékařské genetiky, 1. LF UK a VFN v Praze

3 Onkologická klinika, 1. LF UK a VFN v Praze

Karcinom prsu u žen patří mezi nejčastější zhoubné nádory (ZN) nejen v České republice, ale celosvětově. Většina ZN prsu vznikne sporadicky, u > 60 % je onemocnění diagnostikováno po 60. roce věku. Pouze v ~ 10 % se jedná o tumory vzniklé na podkladě dědičné predispozice (dominantně BRCA1, BRCA2, PALB2, ATM, CHEK2), často s výskytem více primárních ZN a typicky v mladším věku než u běžné populace. Genetické vyšetření se neprovádí u všech žen se ZN prsu, ale pouze u podskupiny definované pomocí indikačních kritérií tak, aby byla pravděpodobnost záchytu germinálních patogenních variant (gPV) > 10 %. V rámci výzkumného projektu byla v letech 2019-2023 vyšetřena nádorová predispozice pomocí NGS přístupu CZECANCA skupina 3452 pacientek se ZN prsu nesplňujících platná indikační kritéria pro genetické testování. Výsledky vyšetření byly porovnány s výstupy identického diagnostického postupu provedeného u 6752 žen indikovaných ke genetickému vyšetření nádorové predispozice a 6876 populačně specifických kontrol. Byla posouzena výtěžnost jednotlivých indikačních kritérií platných do roku 2023 v České republice a na základě výsledků navržena jejich úprava.

Podpořeno granty MŠMT ČR: Program EXCELES, ID Projektu č. LX22NPO5102 – podpořeno Evropskou unií – Next Generation EU; MZ ČR: RVO-VFN-00064165 a UK: COOPERATIO, SVV260631, UNCE/24/MED/022 a NCMG (LM2023067).

Testování nádorové predispozice a “secondary findings”: tvorba konsenzu

Soukupová J.⁽¹⁾, Janatová M.⁽¹⁾, Kleiblová P.^(1,2), Nehasil P.^(1,3,4), Kleibl Z.^(1,3), CZEKANCA konzorcium & Pracovní skupina pro onkogenetiku SLGG ČLS JEP

1 Laboratoř onkogenetiky, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, 1. LF UK a VFN v Praze

2 Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN v Praze

3 Ústav patologické fyziologie, 1. LF UK a VFN v Praze

4 Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu, 1. LF UK a VFN v Praze

Standardem genetického testování nádorové predispozice je v současnosti panelové NGS zahrnující stovky genů až celý exom. Bioinformatickou analýzou a následnou prioritizací variant, tj. vyloučení častých, klinicky a funkčně nevýznamných variant, získáme soubor obvykle jednotek až nižších desítek vzácných kandidátních variant.

Proces hodnocení těchto prioritizovaných variant probíhá ve třech úrovních. První úroveň zahrnuje hodnocení variant pomocí pětitřídní klasifikace. V druhé úrovni hodnocení variant je zvažován vztah nalezených variant k fenotypu pacienta a jejich penetrance či typ dědičnosti. Ve třetí úrovni, kterou provádí klinický genetik, jsou zpřesňována individuální rizika spojená s identifikovaným genotypem s ohledem na osobní a rodinnou anamnézu pacienta.

S rostoucím rozsahem testovaných genů se zvyšuje počet neočekávaných nálezů, tzv. „secondary findings“, tedy variant zachycených náhodně a nesouvisejících s primárním účelem testování. Přístup evropské a americké odborné společnosti se liší. Zatímco evropská společnost doporučuje hodnotit pouze virtuální panely genů se vztahem k fenotypu pacienta, americká společnost pravidelně aktualizuje seznam genů, u kterých by neočekávané nálezy patogenních/pravděpodobně patogenních variant měly být reportovány v závislosti na informovaném souhlasu (ACMG SF_v3.2, aktuálně 81 genů). Na národní úrovni konsenzus rozsahu reportování variant diskordantních vzhledem k fenotypu pacienta v současné chvíli není.

Účelem sdělení je představit aktuálně probíhající tvorbu konsenzu týkající se reportování „secondary findings“ při testování nádorové predispozice, jehož cílem je minimalizovat „overreportování“ a nežádoucí variabilitu mezilaboratorních výstupů při vyšetřování nádorové predispozice.

Podpořeno grantem MŠMT ČR: Projekt Národní ústav pro výzkum rakoviny (Program EXCELES, ID: LX22NPO5102) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU; MZ ČR: RVO-VFN-00064165; UK: COOPERATIO, SVV260631, UNCE/24/MED/022.

Aktuální informace z pracovní skupiny Onkogenetiky SLGG JEP

Kleibl Z.⁽¹⁾, Foretová L.⁽²⁾, Koudová M.⁽³⁾

1 Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, 1. LF UK a VFN v Praze

2 Oddělení epidemiologie a genetiky nádorů, MOÚ, Brno

3 GENNET, Praha, Pracovní skupina Onkogenetiky – SLGG, CZEKANCA konsorcium

Pracovní skupina onkogenetiky sdružuje na 70 členů SLGG se zájmem v této oblasti v širokém záběru od klinických genetiků a dalších lékařských specialistů (onkologů, gynekologů, patologů), přes laboratorní diagnostiky, molekulární biology, bioinformatiky až po teoretiky z akademických pracovišť. Cílem stručného sdělení je aktualizace informací z Pracovní skupiny onkogenetiky, jejímž smyslem je vytvořit platformu pro otevřenou diskusi zúčastněných odborníků za účelem harmonizace postupu genetických vyšetření a jejich interpretací napříč pracovišti v ČR. Široká báze lékařských specialistů v Pracovní skupině Onkogenetiky a spolupráce s dalšími odbornými společnostmi ČLS JEP a zahraničními konsorcií je dobým východištěm pro aktualizaci konsensuálních klinických doporučení na základě nových poznatků klinického výzkumu, která se dotýkají nejen onkogenetické diagnostiky, ale rovněž následné péče o nosiče patogenních variant v klinicky relevantních nádorových predispozičních genech v kontextu reality Českého zdravotního systému. Úzká spolupráce s konsorciem CZEANCA umožňuje čerpat robustní informace o genetickém profilu rizikových pacientů v ČR, které jsou důležitou podmínkou pro projekci potřeb a kapacit preventivní péče o rizikové osoby v horizontu budoucích let.

Podpořeno granty MŠMT ČR: Program EXCELES, ID Projektu č. LX22NPO5102 – podpořeno Evropskou unií – Next Generation EU; MZ ČR: RVO-VFN-00064165 a UK: COOPERATIO, SVV260631, UNCE/24/MED/022 a NCMG (LM2023067).

10 let s NGS v MOÚ – dědičná predispozice k nádorům dospělého věku

Macháčková E., Házová J., Vašíčková P., Mišové A., Foretová L.

Oddělení epidemiologie a genetiky nádorů, MOÚ, Brno

Úvod: Všeobecně se předpokládá, že 3-20% nádorů (dle typu onemocnění) může být způsobeno dědičnou predispozicí. Vysoce rizikové jedince s podezřením na dědičnou predispozici k onkologickému onemocnění, lze definovat na základě rodinného výskytu určitých typů nádorů a osobní anamnézy, jako je věk v době diagnózy a fenotyp nádoru. Mezi nejčastěji diagnostikované nádorové syndromy dospělého věku patří dědičná predispozice k nádoru prsu a ovaria (HBOC) a nepolypózní kolorektální karcinom (Lynchův syndrom, HNPCC), ale škála hereditárních nádorových syndromů je daleko rozsáhlejší. Bylo popsáno více než 200 různých nádorových syndromů.

Vyšetřovaná skupina: 5849 vzorků DNA izolovaných z periferní krve od jedinců, kteří pocházeli z 5461 rodin s pravděpodobnou dědičnou predispozicí k nádorovému onemocnění. U všech vyšetřovaných bylo provedeno genetické poradenství a tito byli indikováni ke genetickému vyšetření na základě pravděpodobné dědičné predispozice splněním indikačních kritérií.

Postup vyšetření: V letech 2014-2018 jsme v naší laboratoři vyšetřili NGS metodou (enrichment/hybridizačním postupem) s využitím komerčního TruSight Hereditary Cancer panelu (96 genů; Illumina) nebo zákaznicky navoleným panelem MMCI (54 genů dominantních nádorových syndromů) 482 vzorků DNA od jedinců z 480 rodin. V letech 2016-2024 jsme vyšetřili 5367 vzorků DNA (z 4981 rodin) zákaznicky navoleným panelem CZEANCA (>200 genů; Soukupova et al., PLoS One. 2018, PMID: 29649263).

Výsledky: Nálezy dominantních patogenních mutací napříč onkologickými diagnózami byly detekovány u 18% vyšetřených rizikových rodin. Nejčetnější byly nálezy v genech BRCA1 (241) a BRCA2 (193) což odpovídá vysoké četnosti nosičů v populaci (1:195) a zároveň vysokým zastoupením HBOC diagnóz ve vyšetřované skupině v MOÚ. Množstvím záchytů (297) následují ostatní geny dle NCCN doporučení pro HBOC syndrom (CHEK2 – bez missense variant, PALB2, ATM, NBN, BRIP1, RAD51C, RAD51D,

TP53) s četností dle výše uvedeného pořadí. V případě dědičné predispozice k nádorům trávicího traktu byl nejčastěji potvrzen Lynchův syndrom (99 rodin, MSH2, MSH6, MLH1, PMS2 s četností dle pořadí), následuje Familiární adenomatózní polypóza a GAPPs (APC mutace u 31 rodin, bi-alelické mutace v MUTYH – 3 rodiny nebo MSH3 – 1 rodina). V případě jiných CRC predispozičních genů (jako je PTEN, SMAD4, STK11, BMPR1A atd.) bylo zachyceno dalších 27 rodin s predispoziční mutací. U dalších 90 rodin byla zachycena mutace v některém z jiných dominantních syndromů ve shodě s diagnózou (nejčastěji detekovanou skupinou byly mutace v SDH genech, NF1 a FH genu).

Nepřekvapivě, k poměrně častým nálezům (cca dalších 9%) patří heterozygotní nosiči patogenních mutací pro recesivní syndromy (484), jako je Fanconiova anemie (148), Xeroderma pigmentosum (101), recesivní polypózní syndromy (94, tj. MUTYH, MSH3), AR syndromy s defektem helikáz (81), a jiné AR syndromy (60).

Závěr: Multigenové panelové testování metodou NGS umožňuje rychlé potvrzení a případně upřesnění diagnózy s možností cílené prevence u osob v riziku z postižených rodin. Dochází k navýšení zachytu nejen u genů vysokého nebo středního rizika s definovaným doporučením pro léčebná a preventivní opatření, ale i u jiných potenciálně rizikových genů s raritním výskytem patogenních mutací a variant nebo genů pro závažné recesivní syndromy, kde je potřeba sledovat vývoj poznatků v budoucnu v rámci výzkumu.

Dedikace: grant MZ ČR – AZV NU23-03-00150; ERN GENTURIS.

Genetické příčiny adenokarcinomu pankreatu (PAC)

Koudová M., Chvojka Š., Černá L., Bittová M., Urbanová M., Hodúlová M., Honysová B., Dvořáčková H., Kovář M., Puchmajerová A., Pokorná M., Horáková L., Stejskal D.

GENNET a GNTlabs by GENNET, Praha

Úvod: Pankreatický adenokarcinom (PAC) je devastující malignita se špatnou prognózou, pozdní diagnózou a s narůstající incidencí. PAC je součástí řady dědičných onemocnění a nádorových syndromů – hereditární pankreatitida, PJS, FAMMM, HBOC a HNPCC. Také heterozygotní nosiči mutací v genech pro AR dědičné nádorové syndromy, jako jsou geny ATM, FANCC a FANCG, mají zvýšené riziko PAC. Prezентujeme výsledky testování hereditárních predispozic k nádorovým onemocněním (HC) u českých pacientů s diagnózou PAC a jejich rodin.

Metodika: V letech 2016-2024 jsme provedli genetické testování 11 186 českých jedinců splňujících klinická kritéria pro HC, z toho 125 pacientů s PAC a 1084 zdravých příbuzných případů PAC. Prezентované výsledky byly vyhodnoceny ze standardních short-read NGS dat (NextSeq 550, NovaSeq Xplus, Illumina) získaných ze dvou panelů – cíleného hereditárního panelu 226 genů CZEKANCA (Roche, PMID: 29649263) a customizovaného WES (Twist). Data NGS z obou panelů byla vedle platformy Franklin (Genoox) analyzována pomocí naší vlastní bioinformatické pipeline s využitím lokální instalace genomické databáze Ensembl pro anotaci a vlastní databáze variant CheckBase pro zpracování dat a reportování nálezů. Klinická interpretace byla prioritizována podle primární indikace, přezkoumání na základě standardů IACR*, doporučení ACMG (PMID: 25741868) a genetické nomenklatury HGVS. Exonové delece/duplikace a velké genové přestavby byly detekovány s využitím naší CNV analýzy spolu s pipeline Rainbow v rámci Franklinu (Genoox). Pozitivní výsledky byly ověřeny pomocí Sangerova sekvenování, zatímco nálezy CNV byly potvrzeny pomocí MLPA (MRC Holland).

Výsledky: Klinicky relevantní varianty (class 4 a 5) byly zjištěny u 23 % pacientů s PAC a u 17 % jejich zdravých příbuzných. Nejčastěji mutovanými geny byly BRCA2, ATM, BRCA1, CHEK2, FANCI, FANCA, MUTYH a PALB2. V genu BRCA1 převažovala patogenní varianta c.1687C>T(p.Gln563Ter) a v genu BRCA2 c.3847_3848del (p.Val1283LysfsTer2).

Závěr: SLG ČLS JEP doporučuje genetické testování vrozených dispozic u všech pacientů s diagnostikovaným PAC a jejich rodin. Výsledky jsou důležité pro nastavení klinického sledování za účelem prevence PAC (projekt HEPACAS) a dalších nádorových onemocnění v rodině a pro možnost cílené biologické léčby u pacientů s genovými mutacemi. (např. PARPi u BRCA pozitivních pacientů).

Reklasifikace klinicky nejasných variant nalezených u jedinců testovaných pro hereditární nádorové syndromy: současné poznatky a praxe

Spurná Z., Panchártek D., Hniličková I., Schwarz M., Fišer M.

PRENET – prenatální diagnostika a genetika, Pardubice

Úvod a cíl:

Reklasifikace variant je jedním z kritických aspektů klinické genetiky. Vzhledem ke zvyšujícím se počtům nalezených variant je však stále náročnější. Cílem této práce bylo shromáždění aktuálních poznatků a následná reanalýza klinicky nejasných variant (VUS) u jedinců splňujících indikační kritéria pro testování hereditárních nádorových syndromů.

Metoda:

Reanalýza variant byla provedena v souladu s platnými doporučeními a na základě nových důkazů. Celkem bylo analyzováno 164 variant, které byly interně stratifikovány do kategorií VUS s benigním potenciálem (N=23), VUS (N=114), VUS s patogenním potenciálem (N=27), v kohortě 1373 jedinců testovaných v letech 2023-2024.

Výsledky:

Celkem bylo nalezeno 21 variant (12,80 %) vhodných k reklasifikaci u 48 jedinců (3,50 %). Většina vedla k pravděpodobně benigní klasifikaci, jedna varianta byla přehodnocena na pravděpodobně patogenní. Nejvíce těchto variant bylo nalezeno v genech ATM a BRCA1 (N=3,3). Dále nebyl pozorován významný rozdíl v počtu reklasifikovaných variant mezi jednotlivými lety ($p=0.48$). V rámci interní stratifikace variant došlo ke snížení počtu variant VUS a VUS s patogenním potenciálem (-7,32 % a -11,59 %) a ke zvýšení počtu variant VUS s benigním potenciálem (6,10 %).

Diskuze a závěr:

Většina zdrojů doporučuje reklasifikaci variant do 2 let od počáteční klasifikace. V rámci onkogenetiky se však uvádí i méně než rok. Tato práce potvrzuje zvyšující se rychlost přírůstků nových důkazů a zdůrazňuje potřebu reklasifikace variant v kratším časovém horizontu, tj. jeden rok a méně. Dále uvádí rozdílnou rychlost změn mezi jednotlivými geny. Reklasifikace může vést k významným změnám v diagnóze, léčebných strategiích i odlehčení zátěže lékařů a testovaných jedinců.

Funkčná charakterizácia zárodočných variantov u dedičnej trombocytopénie asociovanej so zvýšeným rizikom rozvoja hematologických malignít

Likavcová P.⁽¹⁾, Staňo Kozubík K.^(1,2,3), Vrzalová Z.^(2,3), Trizuljak J.^(1,2,3), Štika J.^(1,2), Radová L.⁽²⁾, Blaháková I.^(2,3), Marečková A.⁽³⁾, Hynšt J.⁽²⁾, Pospíšilová Š.^(1,2,3), Doubek M.^(1,2,3)

1 Ústav lékařské genetiky a genomiky, FN Brno a LF MU, Brno

2 Centrum molekulární medicíny, Středoevropský technologický institut (CEITEC), Masarykova univerzita, Brno

3 Interní hematologická a onkologická klinika, FN Brno a LF MU, Brno

Dedičné trombocytopénie (DT) tvoria heterogénnu skupinu vzácných ochorení charakterizovaných zníženým počtom trombocytov. Niektoré DT, ako tie spôsobené patogénnymi zárodočnými variantmi v génoch ANKRD26, ETV6 a RUNX1, sú asociované so zvýšeným rizikom rozvoja hematologických malignít (HM). U pacientov s týmito ochoreniami sú krvácavé prejavy zvyčajne mierne alebo absentujú, pričom hlavné riziko predstavuje práve vznik malignity. Diagnostika DT je komplikovaná absenciou špecifických klinických príznakov a miernou trombocytopéniou, ktorá môže ostať neodhalená počas rutinných vyšetrení. Presná diagnóza pacientov je často stanovená až pri výskyte HM u viacerých rodinných príslušníkov. Masívne paralelné sekvenovanie zásadne zlepšilo genetickú diagnostiku týchto ochorení, ale zároveň prinieslo výzvy spojené s interpretáciou a klasifikáciou génových variantov. V niektorých prípadoch môže v rodine segregovať s fenotypom ochorenia len variant nejasného klinického významu (VUS). Správna interpretácia VUS je kľúčová pre diagnostiku a klinický manažment pacientov. Jednu z možností pre určenie možnej patogenity identifikovaných VUS predstavujú funkčné analýzy, ktorých metodické postupy sa líšia v závislosti na úlohe génu, v ktorom sa variant nachádza. Patogénne varianty v 5' neprekladanej oblasti génu ANKRD26 sú kauzálne pre vznik dedičnej trombocytopénie 2 (THC2), pričom približne 8 % pacientov s THC2 rozvinie v priebehu života myeloidnú malignitu. Prítomnosť patogénnych variantov v ANKRD26 géne vedie k zvýšenej expresii tohto génu v megakaryocytoch, čo narúša proces tvorby trombocytov a spôsobuje trombocytopéniu. V našej štúdii sme pomocou funkčnej analýzy zahŕňajúcej stanovenie ANKRD26 expresie v trombocytoch, metódami digitálne a real-time PCR, stanovili význam ANKRD26 variantov c. 140C>G a c.-118C>T. Naše výsledky ukazujú, že prítomnosť variantu c.-140C>G nevedie k zvýšenej expresii ANKRD26 v trombocytoch. V kombinácii s klinickou charakterizáciou nositeľov tohto variantu a jeho vysokou alelovou frekvenciou (6.6 % v ACGT kohorte zdravých jedincov) tieto výsledky poukazujú na benígny charakter variantu c. 140C>G v súvislosti s THC2. Naopak, pomocou funkčnej analýzy sme potvrdili patogenitu variantu c.-118C>T, ktorý segreguje s fenotypom THC2 v troch generáciách jednej rodiny.

Projekt bol podporený MZ ČR grantom DRO (FNBr, 65269705); Masarykovou Univerzitou grantom MUNI/A/1685/2024; Projektom Národný ústav pro výskum rakoviny (Program EXCELES, ID: LX22NPO5102) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU a grantovým projektom A-C-G-T z EFRR (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_026/0008448).

IDT = váš nový partner pre budúcnosť

Horák P., Kutlíková L.

Pentagen s.r.o., Kladno

Prezentácia predstaví portfólio spoločnosti Integrated DNA Technologies (IDT) v oblasti NGS riešení, ktoré zahŕňa flexibilné custom panely, rýchlo dostupné predpripravené panely a spoľahlivé komponenty

pre ciele NGS sekvenovanie. Tieto produkty umožňujú presnú a efektívnu prípravu knižníc pre široké spektrum aplikácií nielen v klinickej genetike.

Na vyhodnotenie dát bude predstavená platforma SeqOne, ktorá ponúka moderné a klinicky validované bioinformatické nástroje na analýzu, interpretáciu a reportovanie genetických variantov. Kombinácia IDT a SeqOne predstavuje robustný pracovný postup pre diagnostickú aj výskumnú prax v oblasti genetických ochorení.

Klinická genetika a diagnostika

Síla amplikonů v době NGS technologií

Urbanová, M., Hrabíková, M., Kovář, M., Krutílková, V., Bittóová, M., Koudová, M.

GENNET, s.r.o., Praha

V posledních letech se dostává do popředí diagnostika DNA založená na masivním paralelním sekvenování ve smyslu panelového, celoexomového až celogenomového sekvenování a samotné sekvenování podle Sangera již bývá upozaděno. V několika ukázkách tak chceme představit velký význam a přínos této technologie, která dokládá, že tato „stará“ technologie má stále své opodstatnění.

Jako samozřejmé bereme, že po nálezů patogenní varianty typu SNP/indel zachycené NGS, zpravidla následuje confirmace pomocí klasické PCR. Tento postup zaručí, že pacienta informujeme o reálné variantě, a nikoliv o technickém artefaktu.

Amplikony však mohou sloužit i jako primární zdroj informace i v době NGS technologií, ačkoliv samotné amplikonové knihovny jsou využívány čím dál tím méně a přednost mají knihovny obohacené pomocí hybridizačních sond.

Konkrétně bychom rádi prezentovali amplikon vysoce homologní oblasti genu PRSS1 spojeného s dědičnou chronickou pankreatitidou či genu CYP21A2 spojeného s kongenitální adrenální hyperplázií. Zároveň bychom chtěli vyzdvihnout sílu amplikonů v detekci mozaik de novo mutací, a to u případu WES analýzy tria u vzácné formy osteogenesis imperfecta spojeného s genem KIF5B, kdy tyto amplikony analyzujeme nezastupitelnou NGS metodou pomocí tzv. HybrAmp postupu.

Kompletní řešení pro krátká i dlouhá čtení

Véle D.

3GENES

Metoda NGS obsahuje široký rozsah aplikací s různorodými postupy. Integrace jednotlivých postupů do koherentního celku zjednodušuje rutinní práci a šetří čas i reagentie. Cílem přednášky je představit proces integrace postupů, sdílet praktické příklady a představit možnosti dalšího rozvoje. V přednášce se zaměříme na klíčové aspekty implementace laboratorních postupů, a to pro short-read i long-read sekvenování – od izolace vzorků, automatizace až po analýzu dat. V prezentaci také zazní naše zkušenosti a příklady z praxe při zavádění kompletních NGS řešení v laboratořích.

Po stopách příčin hereditárních tubulointersticiálních nefropatií

Živná M.^(1,2), Hodaňová K.⁽¹⁾, Vyleťal P.⁽¹⁾, Barešová V.⁽¹⁾, Svojšová K.⁽¹⁾, Kmochová T.⁽¹⁾, Hartmannová H.⁽¹⁾, Mušálková D.⁽¹⁾, Stránecký V.⁽¹⁾, Vrbacká A.⁽¹⁾, Trešlová H.⁽¹⁾, Sovová J.⁽¹⁾, Votruba M.⁽¹⁾, Kidd K.^(1,2), Bleyer A. J.^(1,2), Kmocho S.^(1,2)

1 Laboratoř pro studium vzácných nemocí, Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu, 1.LF UK a VFN v Praze

2 Section on Nephrology, Wake Forest School of Medicine, Winston-Salem, NC, USA

Hereditární tubulointersticiální onemocnění ledvin (TKD) jsou charakterizované tubulární atrofií, intersticiální fibrózou a postupným selháním ledvin vyžadujícím dialýzu a transplantaci. Dosud charakterizované TKD reprezentuje zejména skupina onemocnění souhrnně nazvaná autosomálně dominantní TKD (ADTKD).

Nejčastější genetické příčiny ADTKD jsou mutace v genu UMOD kódujícím uromodulin, MUC1 kódujícím mucin-1 a REN kódujícím renin. Asi 35 % rodin s klinickými a biochemickými příznaky ADTKD nemá známou genetickou příčinu onemocnění. V rámci našeho výzkumu jsme shromáždili soubor > 1000 rodin s různými formami hereditárních TKD.

V posledních dvou letech jsme v našem souboru TKD rodin pomocí celoexomového nebo celogenomového sekvenování a klinických a funkčních studií identifikovali a charakterizovali patogenní varianty ve 4 genech nově asociovaných s TKD s různým typem dědičnosti. Identifikovali jsme kauzální varianty genu APOA4 kódujícím apolipoprotein A-IV; ALG5 kódujícím dolichylfosfát β -glucosyltransferasu; GLA genu na X-chromosomu kódujícím α -galaktosidasu A a MT-TF kódujícím mitochondriální transferovou RNA pro fenylalanin.

V rodinách (n=5) s variantou v APOA4 (p.D33N nebo p.L66V) jsme odhalily zvýšenou amyloidogenicitu mutovaného ApoA4. V důsledku toho dochází k tvorbě amyloidních depozit ApoA4 v medule ledvin pacientů, to vede k postupné ztrátě jejich funkce a ledvinnému selhání.

U rodin (n=2) s variantou ALG5 (p.R79W) dochází k poškození procesu maturace některých glykoproteinů např. polycystinu-1 a uromodulinu. To vysvětluje tvorbu cyst a rozvoj TKD v postižených rodinách. Paralelně u pacientů dochází k patologické lokalizaci ALG5 do Golgi aparátu, což může aktivovat buněčnou stresovou reakci Golgi aparátu ledvinných buněk.

Varianta GLA genu (p.L394P-AGAL) vede k zadržení mutované α -galaktosidázy A v endoplasmatickém retikulu-Golgi intermediárním kompartmentu ledvinných tubulárních buněk pacientů (n rodin= 6). Špatně sbalená mutovaná α -galaktosidáza A indukuje stres endoplasmatického retikula a apoptózu postižených ledvinných buněk.

Díky našemu dlouholetému výzkumu jsme rozšířili spektrum genetických příčin různých forem TKD o čtyři nové geny. Tato znalost zvyšuje možnost určení správné diagnózy, klinickou charakterizaci, kvalifikované genetické poradenství a výběr zdravých dárců ledvin v postižených rodinách. To vše je základem pro úspěšný vývoj specifické terapie.

Monoalelická varianta LAMA5 podmiňuje v jedné rodině autosomálně dominantní tubulointersticiální nefropatii

Svojšová K.⁽¹⁾, Barešová V.⁽¹⁾, Vyleťal P.⁽¹⁾, Hodaňová K.⁽¹⁾, Hartmannová H.⁽¹⁾, Stránecký V.⁽¹⁾, Kidd K.^(1,2), Bleyer A.J.^(1,2), Kmoch S.^(1,2), Živná M.^(1,2)

1 Laboratoř pro výzkum vzácných nemocí, Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu, 1. LF UK, Praha

2 Wake Forest School of Medicine, Section on Nephrology, Winston-Salem, NC, USA

Autosomálně dominantní tubulointersticiální nefropatie (ADTKD) je heterogenní skupina onemocnění ledvin, které vedou k jejich selhání a nutnosti dialýzy a transplantace ve věku 30–70 let.

Nejčastějšími genetickými příčinami ADTKD jsou varianty v genech UMOD, MUC1 a REN. Asi 30 % případů stále zůstává bez známé genetické diagnózy.

Cílem této práce bylo objasnit genetickou příčinu a patogenetický mechanismus selhání ledvin v rodině s fenotypem ADTKD a vyloučenými mutacemi ve známých kauzálních genech. Celoxomové sekvenování odhalilo heterozygotní variantu LAMA5 chr20:62324530C>T (NM_005560.6:c.5621G>A; p.D1852N) u 3 klinicky postižených jedinců, zatímco genotyp 1 zdravého člena byl WT. Následným cíleným sekvenováním jsme potvrdili přítomnost varianty u dalších 3 postižených jedinců a vyloučili u 2 zdravých členů rodiny.

LAMA5 kóduje laminin $\alpha 5$ (LAMA5), který spolu s podjednotkami β - a γ - tvoří skupinu heterotrimerních glykoproteinů, tzv. lamininů. Heterotrimery se glykosylují a skládají v lumen endoplasmatického retikula, poté jsou transportovány do Golgiho aparátu a sekretovány do extracelulárního prostoru. Lamininy jsou jednou z hlavních složek bazálních membrán. Zprostředkovávají propojení cytoskeletu buněk s extracelulárním prostředím, čímž se podílejí na buněčných adhezích, buněčné migraci a diferenciaci. Laminin $\alpha 5$ je jediným α řetězcem v bazálních membránách glomerulů a distálních tubulů v diferencované ledvinné tkáni.

V rámci charakterizace patogenetického mechanismu rozvoje ADTKD u pacientů s variantou p.D1852N-LAMA5 jsme technologií CRISPR-Cas9 připravili buněčný model epiteliálních SiHa buněk stabilně exprimující studovanou variantu LAMA5 nebo WT. Pomocí konfokální mikroskopie jsme lokalizovali p.D1852N-LAMA5 v endoplasmatickém retikulu, zatímco WT-LAMA5 kolokalizovala s markerem fokálních adhezí vinkulinem. Dále jsme pozorovali změny na úrovni cytoskeletu, které jsou předmětem dalšího výzkumu. Výsledky lokalizační studie z buněčného modelu jsme potvrdili na úrovni biopsie tlustého střeva od pacienta s p.D1852N, zatímco v kontrolní střevní tkáni jsme LAMA5 lokalizovali v oblasti bazálních membrán.

Identifikovaná monoalelická varianta LAMA5 obdobně jako patogenní varianty MUC1, UMOD a REN vede ke kumulaci mutovaného proteinu v kompartmentech rané sekreční dráhy, poruše proteinové homeostázy, aktivaci buněčné stresové odpovědi a v důsledku toho k selhání ledvin u pacientů s ADTKD.

Polycystická choroba ledvin s prenatálním nástupem v důsledku trialelické změny v PKD1 a PKD2

Godava M.^(1,2), Dhaifalah I.⁽¹⁾, Čivrný J.⁽³⁾, Indráková J.⁽⁴⁾, Michálková K.⁽³⁾, Flögelová H.⁽⁵⁾, Švarcová J.⁽⁶⁾, Srovnal J.⁽⁷⁾

1 *Fetmed s.r.o. - Centrum fetální medicíny, genetiky a gynekologie, Olomouc*

2 *Laboratoř lékařské genetiky, SPADIA LAB a.s., Nový Jičín*

3 *Radiologická klinika, FN Olomouc*

4 *Laboratoř DNA diagnostiky, Oddělení lékařské genetiky, FN Ostrava*

5 *Nefrologická ambulance, Dětská klinika, FN Olomouc*

6 *Gynes s.r.o., Hranice*

7 *Ústav lékařské genetiky, FN Olomouc*

Polycystické onemocnění ledvin se obvykle projevuje až v dospělosti (AD forma) nebo v časném dětství / prenatálně (AR forma). Prenatální nástup onemocnění je v případě AD formy poměrně vzácný. Kazuistika prezentuje případ plodu (II. gravidita pacientky), u kterého byly dle UZ v 32 g.h. zachycené bilaterálně hyperechogenní ledviny hraniční velikosti při normálním objemu plodové vody. Pacientka

(ukrajinský pôvod) měla již jednoho syna ve věku 10 let, u kterého uváděla v graviditě větší ledviny a následně i oligohydramnion, postnatálně přiměřený vývoj a údajně přiměřený UZ vzhled ledvin. U syna byla provedena komplexní DNA diagnostika se zaměřením na polycystózu ledvin (NGS, MLPA, long-range PCR se Sangerovou sekvenací), tato odhalila patogenní variantu v PKHD1, ale pouze v heterozygotní formě. Překvapivě byly nalezeny 2 varianty v PKD1 - jedna je pravděpodobně patogenní hypomorfní varianta, druhá (extrémně vzácná) byla zatím formálně hodnocena jako varianta nejasného významu, dle komplexních prediktorů spíše s možnou patogenitou. UZ ledvin u syna ve věku 10 let popsal hyperechogenní parenchym, drobné cysty kortexu, vpravo ledvinu s hraniční velikostí; bez patologie jater. UZ ledvin narozené dcery ve 2 týdnech byl s nálezem hyperechogenních jasně zvětšených ledvin s četnými drobnými korovými cystami, bez patologie jater. U dcery jsou přítomné pouze 2 varianty v PKD1. Literatura uvádí několik případů s výskytem bíaleické mutace v PKD1 (hypomorfní / inkompletně penetrantní alely), kdy došlo k manifestaci polycystózy ledvin již prenatálně, přičemž nález simuloval spíše AR PKD - postnatální průběh a celková prognóza pak závisí od charakteru samotných nalezených mutací. Je možné, že i varianta v PKHD1 ovlivňuje celkový fenotyp onemocnění.

Výzvy a limity DNA testovania otcovstva a iných príbuzenských vzťahov, „aneb i porouchané hodiny dvakrát za den ukazujú správny čas“

Baldovič M.^(1,2), Blandová G.^(1,3), Ďurišová K.⁽¹⁾, Eliaš V.⁽¹⁾, Krasňanská G.^(1,4), Červenák Z.⁽⁵⁾, Ferák V.⁽¹⁾, Konečný M.^(1,4)

1 Laboratórium genomickej medicíny, GHC GENETICS SK s.r.o., Bratislava

2 Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta UK, Bratislava

3 Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UNB, Bratislava

4 Katedra Biológie FPV UCM, Bratislava 5V. interná klinika LF UK, Bratislava

DNA testy otcovstva sa v posledných rokoch, najmä vďaka nižším nákladom, stali dostupnejšími pre širokú verejnosť. Aj keď z odborného pohľadu ide o dnes už pomerne triviálnu záležitosť, s narastajúcim počtom prípadov sa aj tu objavujú fenomény, ktoré vyžadujú bližšiu pozornosť odborníkov. Dochádza aj k posunom v zmysle riešených príbuzenských vzťahov, rozširujúceho sa počtu využívaných markerov a s tým súvisiacej štatistickej sily, ktorá umožňuje spoľahlivé vyhodnotenie testov aj pri štruktúrovanej variabilite v populácii. Stanovenie iných príbuzenských vzťahov či už za účelom identifikácie pozostatkov pri hromadných nešťastiach alebo kriminálnych prípadoch, ale aj ako nepriame testovanie otcovstva v občianskych sporoch predstavuje stále náročné výzvy pre forenznú genetiku. S cieľom zlepšiť silu diskriminácie a informatívnosti DNA testov rôznych stupňov príbuznosti sa tak venuje čoraz väčšia pozornosť jednak rozširovaniu súboru používaných genetických markerov, ale aj potenciálu finančne a procesne nákladnejších technológií MPS alebo DNA čipy, zatiaľ používaných prevažne len pri prenatálnom testovaní otcovstva analýzou fetálnej DNA.

V našom sledovanom súbore vyše 8000 prípadov sme retrospektívne zhodnotili vývoj týchto genetických testov v našom laboratóriu v posledných rokoch. Zamerali sme sa predovšetkým na odsledovanie problematiky mutácii ako aj komplexného stanovovania iných príbuzenských vzťahov, v neposlednom rade aj medicínsky zaujímavé prípady a „sociologický“ kontext DNA testovania otcovstva.

Cieľom nášho príspevku je aj načrtnúť vývoj v tejto oblasti na najbližšie roky v našich podmienkach so zameraním sa na udržanie nákladovo efektívneho testovania otcovstva s dostatočnou výpovednou silou pri reflektovaní najnovších prístupov publikovaných v odbornej literatúre.

Významnosť tejto oblasti genetiky podčiarkuje fakt, že spoľahlivosť a presnosť testovania DNA z neho robí cenný nástroj na stanovenie alebo vyvrátenie biologických vzťahov a je tak široko používané v právnom a forenznom kontexte. Zohráva kľúčovú úlohu v čoraz častejších prípadoch týkajúcich sa starostlivosti o deti, prisťahovalectva, dedičských sporov a vyšetrovania trestných činov.

Parodontitída ako nevhodné rodinné dedičstvo

Konečný M.

Laboratórium genomickej medicíny, GHC GENETICS SK

Parodontitída (PD) je chronické multifaktoriálne zápalové ochorenie lokalizované v ústnej dutine, ktoré zahŕňa vplyv medzi gingiválnou mikrobiálnou dysbiózou, zápalom tkaniva parodontu, deštrukciou tkaniva a modifikujúcimi faktormi, ako sú životný štýl, fajčenie, systémové ochorenia a genetika. Závažná parodontitída predstavuje jedno z najrozšírenejších chronických zápalových ochorení na svete, ktoré môže ovplyvniť aj riziko iných systémových ochorení ako ateroskleróza, komplikácie tehotenstva, reumatoidná artritída, aspiračná pneumónia či rakovina. Ľudský orálny mikrobióm je druhou najčastejšie skúmanou mikrofórou, pričom za posledné desaťročia sa poznatky o jeho štruktúre a zložení v spojení so zdravím parodontu rozšírili. Zavedenie sekvenovania 16S rRNA do analýzy orálneho mikrobiómu odhalilo „neviditeľné“ faktory, ktoré hrajú dôležitú úlohu pri indukcii PD. Rôzne celogenómové asociačné štúdie (GWASs) hľadajú v genóme bežné SNP, ktoré prispievajú k zvýšenej náchylnosti na ochorenia, a identifikujú niekoľko lokusov spojených s PD. V rámci prednášky poskytneme komplexný pohľad na jednotlivé biologické rizikové faktory ochorenia a pokúsime sa odpovedať na otázku, či parodontitída môže alebo nemôže predstavovať genetické ochorenie.

Neurometabolické a neurovývinové ochorenia v rómskej populácii

Giřtlová M.^(1,2,3,4), Drenčáková P.⁽⁴⁾, Šaligová J.⁽⁵⁾, Potočňáková Ľ.⁽⁵⁾, Mistrík M.⁽⁶⁾, Okáľová K.⁽⁷⁾, Honzík T.⁽⁸⁾, Nosková L.⁽⁹⁾, Zikánová M.⁽⁹⁾, Kmoch S.⁽⁹⁾

1 Centrum klinického a predklinického výskumu, MediPark, LF UPJŠ v Košiciach

2 Neurologická klinika, LF UPJŠ v Košiciach

3 Ambulancia lekárskej genetiky, DFNSP Banská Bystrica

3 Ambulancia lekárskej genetiky, Unilabs Slovensko s.r.o., Košice

5 Ambulancia pre DPM, DFN v Košiciach

6 Ambulancia lekárskej genetiky, Unilabs Slovensko s.r.o., Spišská Nová Ves

7 II. DK SZU, DFNSP Banská Bystrica

8 KPDPM, 1. LF UK a VFN v Praze

9 Laboratoř pro studium vzácných nemocí, KPDPM, 1. LF UK a VFN v Praze

V rómskej populácii sú známe viaceré ochorenia s efektom zakladateľa. V práci sa zameriavame na neurovývinové a neurometabolické ochorenia. Okrem známych už popísaných ochorení ako je PDHX deficit, deficit proteínu TMEM70 alebo beta-mannozidóza, sme v posledných rokoch v našej praxi identifikovali nové varianty s efektom zakladateľa (SLC13A5, EARS2, RCQL4) ale aj nové kandidátne gény (TBRG1). Niektoré ochorenia sa v rómskej populácii vyskytujú s iným typom dedičnosti a iným fenotypom (NUS1, ADAM22). Keďže významná časť rómskej populácie žije vo vylúčených komunitách v extrémnych životných podmienkach a je prítomná segregácia na úrovni vzdelávania, je niekedy náročné primerane hodnotiť intelektový vývoj u pacientov. Naša práca potvrdzuje potrebu genomickej inklúzie etnických

podskupín, přínos komplexních genomických analýz u etnických podskupín a špecificky přístup na klinické úrovni.

Pontocerebelární hypoplazie typ 1B jako příčina hypotonie, poruch polykání a mikrocefalie u novorozenců romského etnika – vzácná genetická diagnóza?

Ptáčnicková N.⁽¹⁾, Balaščaková M.⁽¹⁾, Wayhelová M.⁽¹⁾, Šafka Brožková D.^(1,2), Uhrová Mészárosová A.⁽²⁾, Kopčilová J.⁽³⁾, Zídková J.⁽³⁾

1 Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN v Motole, Praha

2 Neurogenetická laboratoř Kliniky dětské neurologie, 2. LF UK a FN v Motole, Praha

3 Centrum molekulární biologie a genetiky, IHOK, FN Brno

Pontocerebelární hypoplazie typu 1B (PCH1B) je neurologické onemocnění s autozomálně recesivní dědičností vznikající na podkladě patogenních variant v genu EXOSC3. Onemocnění je vzácné, nemá stanovenou prevalenci v běžné populaci. V české romské populaci byl však prokázán výskyt founder varianty NM_016042.4(EXOSC3):c.92G>C, p.(Gly31Ala) a frekvence přenašečů této varianty se udává cca 4% (Schwabova et al 2013).

Pro onemocnění jsou typické mnohočetné strukturní abnormality mozku a míchy (hypoplázie mozečku, vermisu, mozkového kmene), dále hypotonie, progredující mikrocefalie a závažné vývojové opoždění. Úmrtí často nastává před dosažením jednoho roku věku v důsledku respiračního selhání.

V rámci přednášky budou prezentovány tři kazuistiky novorozenců romského etnika vyšetřovaných pro těžkou hypotonii, poruchy polykání, mikrocefalii a respirační insuficienci s následně potvrzenou diagnózou PCH1B na podkladě nálezu founder varianty NM_016042.4(EXOSC3):c.92G>C, p.(Gly31Ala) v genu EXOSC3 v homozygotním stavu.

Podpořeno Islandem, Lichtenštejnskem a Norskem prostřednictvím Fondů EHP reg. č. ZD-ZDOVA2-001

Význam celoexomového sekvenování pro další management pacientů se zrakovým postižením

Turnovec M.⁽¹⁾, Vyhnálková E.⁽¹⁾, Dvořáková L.⁽¹⁾, Mušová Z.⁽¹⁾, Beneš V. III.⁽²⁾, Havlovicová M.⁽¹⁾

1 Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN v Motole, Praha

2 Neurochirurgická klinika dětí a dospělých 2. LF UK a FN v Motole, Praha

Prezentujeme dvě kazuistiky pacientů s hypoplazií optického nervu a výhody přechodu od diagnostiky pomocí cílených panelů k celoexomovému sekvenování.

První pacient byl doporučen ke genetickému vyšetření již ve třech měsících věku pro bloudivé pohyby očí, nystagmus a centrální poruchu zraku, měl též opožděn celkový psychomotorický vývoj. V diferenciální diagnostice byla zvažována Leberova hereditární optickou neuropatie, která se však cíleným vyšetřením nepotvrdila, vysvětlení nepřineslo ani vyšetření cíleného panelu genů asociovaných s očními vadami. Příčinu pacientových potíží objasnilo až celoexomové sekvenování probanda v triu s rodiči nálezem patogenní varianty c.139C>T p.(Gln47*) maternálního původu a pravděpodobně patogenní varianty c.811C>T p.(Arg271*) paternálního původu v genu CLCN7 (NM_001287.6).

Ve druhém případě šlo o pacientku doporučenou ke genetickému vyšetření ve věku čtyř let pro suspektní hypoplázii či atrofii optických nervů. Asi o rok dříve rodiče u ní pozorovali strabismus. Celoexomové vyšetření zjistilo patogenní variantu c.856C>T p.(Arg286Trp) v genu CLCN7, která je maternálního původu.

Tento gen kóduje napěťově řízený chloridový kanál typu 7, jehož poruchy jsou asociovány s autozomálně recesivní osteopetrózou typu 4, známou také jako infantilní maligní osteopetróza a dále autozomálně dominantní osteopetrózou typu 2, označovanou také jako Albersova-Schönbergova nemoc či nemoc mramorových kostí, u které je popisována variabilní penetrance.

Ve druhém případě se podařilo díky včasnému stanovení diagnózy a následné neurochirurgické dekompresi optických nervů zachovat u pacientky zrak. Časně stanovení diagnózy, ke kterému přispívá celoexomové sekvenování tak může pro pacienty představovat významný prospěch s dopadem na další management a jejich prognózu.

Leberova hereditární optická neuropatie – aktualizace diagnostického algoritmu

Tesařová M.⁽¹⁾, Ptáčková H.⁽¹⁾, Kousal B.⁽²⁾, Kelifová S.⁽¹⁾, Krejčová H.⁽¹⁾, Zahradníková J.⁽¹⁾, Zajícová Dočekalová D.⁽¹⁾, Trefilová E.⁽¹⁾, Záhoráková D.⁽¹⁾, Zeman J.⁽¹⁾, Lišková P.⁽²⁾, Honzík T.⁽¹⁾

1 Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu, 1. LF UK a VFN v Praze

2 Oční klinika 1. LF UK a VFN v Praze

Mitochondriální onemocnění představují heterogenní skupinu vzácných geneticky podmíněných chorob, které postihují jeden orgán nebo se manifestují multisystémovou poruchou. Postižení oka je jeden z nejčastějších klinických projevů mitochondriálních onemocnění a zahrnuje celou řadu neurooftalmologických příznaků. Leberova hereditární neuropatie optiku (LHON) spolu s dominantní optickou atrofií (DOA) typu 1 patří mezi nejčastější nesyndromické dědičné neuropatie optiku, které vedou k závažné poruše zraku a následné slepotě. Minimální odhadovaná prevalence LHON v Evropě je 3,2 na 100 tisíc obyvatel a jedná se tak o nejčastější a jasně klinicky odlišitelné mitochondriální onemocnění. Jako první patogenní varianta v mitochondriální DNA (mtDNA) byla popsána varianta MT-ND4: m.11778G>A (p.Arg340His) jako příčina LHON (Wallace et al, 1988; gen MT-ND4 kóduje podjednotku komplexu I dýchacího řetězce). Geneticky je více než 95% případů LHON způsobeno patogenními variantami v mtDNA, z toho u 90% z nich se vyskytuje jedna ze 3 prevalentních variant. V roce 2021 byly identifikovány bi-alelické varianty v genu DNAJC30 (Stenton et al, 2021) jako další z častých příčin LHON (navíc s prevalentní variantou ve středo- a východoevropských populacích). Na našem pracovišti jsme LHON geneticky potvrdili již u 176 pacientů (24x DNAJC30, 152x mtDNA). LHON je také jediné z mitochondriálních onemocnění, pro které existuje terapie (idebenon, v ČR schváleno v 2018) a u 50% pacientů vede k výraznému zlepšení zraku. V roce 2024 byly podrobně charakterizovány varianty v genu NQO1 (Aleo et al., 2024), které jsou u pacientů s LHON zodpovědné za minimální účinnost terapie idebenonem a jeho podávání může naopak více inhibovat zbytkovou aktivitu komplexu I. Genotypování variant NQO1 v souboru 24 českých a slovenských pacientů na terapii identifikovalo zatím pouze jednoho pacienta, u kterého bylo podávání idebenonu ukončeno. Od roku 2025 jsme zařadili NQO1 genotypování do diagnostického algoritmu pro rychlou a efektivní diagnostiku pacientů s LHON.

Podpořeno projekty AZV NU22-07-00614, RVO VFN 64165 a programem Univerzity Karlovy Cooperatio_Pediatrics.

Využití single cell multiomiky v klinickém výzkumu / Single cell multiomics in clinical research

Omelchenko D.

DYNEX Technologies s.r.o, Buštěhrad

The emergence of single-cell multiomics technologies has revolutionized the modern view of cellular complexity, enabling impactful insights into tissue heterogeneity, disease mechanisms, and therapeutic responses at the individual cell level. This transformative approach, combining genomics, transcriptomics, proteomics, and epigenomics, allows for the simultaneous profiling of multiple molecular layers within single cells, providing a comprehensive view of cellular states and dynamics. In clinical research, single-cell multiomics offers a powerful platform for exploring disease heterogeneity, identifying novel biomarkers, and uncovering the molecular underpinnings of complex diseases such as cancer, neurodegeneration, and autoimmune disorders. Moreover, single-cell transcriptomics can reveal the molecular background behind transplant rejection and help identify it at early stages. Currently, in the Czech Republic and Slovakia, clinical single-cell applications are limited but becoming more frequent in clinical research.

Here, we discuss the applications and challenges of integrating single-cell multiomics in clinical research. We highlight recent advancements in experimental techniques and present an overview of the current diversity of technologies. Specifically, we highlight the capabilities of avidity-based chemistry that allows to combine traditional NGS sequencing, RNA and protein cytoprofilng, and untargeted in-situ transcriptome sequencing in single cells on one instrument. This approach is enabling the dissection of tumor microenvironments, immune responses, and tissue-specific alterations in chronic diseases. Furthermore, the integration of multiomics data with clinical outcomes promises to accelerate personalized medicine, facilitating the identification of patient-specific therapeutic targets and improving treatment strategies.

Neinvazívne prenatálne testovanie - skríning alebo diagnostika?

Minárik G.⁽¹⁾, Hýblová M.⁽¹⁾, Landlová D.⁽¹⁾, Róžová I.⁽²⁾, Križan P.

1 Trisomy test s.r.o., Nitra, Slovensko

2 Gyncare s.r.o., Bratislava, Slovensko

Úvod

Rozšírenie dostupnosti neinvazívneho prenatálneho testovania (NIPT) ako bezpečnej a rýchlej alternatívy pri detekcii častých a závažných chromozómových porúch plodu viedlo k revolúcii v oblasti prenatálneho skríningu. Zároveň však prinieslo množstvo otázok a kontroverzií, špecificky v prípadoch spojených so získaním neštandardných - hraničných, nejednoznačných, necielených alebo náhodných zistení.

Cieľ

Cieľom prednášky je predstaviť na konkrétnych príkladoch z literatúry a praxe špecifiká hodnotenia a interpretácie výsledkov NIPT testov s ohľadom na ich limitácie na jednej a možností na druhej strane, stierajúc tak rozhranie medzi ich skríningovým a diagnostickým využitím.

Metódy

Prostredníctvom detailnej analýzy manažmentu prípadov s neštandardnými výsledkami NIPT prezentovanými v odbornej literatúre a zistenými v našej praxi chceme predstaviť komplexnosť ich hodnotenia. Zahrnuté budú aj výsledky spojené s detekciou špecifických typov maternálnych nálezov, ktoré môžu mať významný dopad na ich výslednú interpretáciu a diagnostický dosah.

Výsledky

Kým využitie NIPT pre detekciu vybraných chromozómových aneuploidií v štandardnom nastavení preukázalo svoj klinický benefit, možnosť detekcie necielených alebo náhodných zistení, nielen fetálneho ale aj maternálneho pôvodu, stále predstavuje výzvu pre následný laboratórny a klinický manažment. Rôznorodosť a unikátnosť špecifických nálezov často vedie k dilemám, ktoré je v praxi potrebné zohľadniť aj v kontexte voľby a dostupnosti nadväzujúceho testovania, spôsobených obav u budúcich rodičov a etických otázok, ktoré by mali byť zohľadnené pri ich interpretácii a konzultácii.

Záver

V nadväznosti na stále väčšiu mieru využívania NIPT a jeho presahom zo skríningu do diagnostiky je potrebné sledovať a aktualizovať odborné štandardy a klinické odporúčania a to regionálne ako aj medzinárodne. Zároveň je potrebné mať možnosť ich používať tak, aby s nimi bolo možné poskytovať aj špecificky personalizované interpretácie pre optimálnu podporu klinického manažmentu a rozhodovania v raritných prípadoch.

Generika pro Genetika

Zástěra J.

Carolina Biosystems, s.r.o.

Společnost Carolina Biosystems se od počátku své existence zaměřuje na vyhledávání cenově dostupných, ale zároveň vysoce kvalitních produktů pro rutinní diagnostické i výzkumné laboratoře v oblasti molekulární genetiky. V průběhu více než 16 let jsme našim zákazníkům vždy přinášeli možnosti pro snižování nákladů, aniž by došlo ke kompromisu v kvalitě a přesnosti výsledků. Kromě dodávek originálních výrobků, spotřebního materiálu či náhradních dílů za ceny nižší ve srovnání s oficiální místní distribucí jsme našli i celou řadu alternativních řešení. Produkty, které lze označit za „generika“ široce používaných reagentů a spotřebního materiálu, tak dnes představují významnou část naší nabídky. Obdobně jako je tomu u generických léčivých přípravků, i tyto alternativy jsou zcela ekvivalentní svým originálům. Finančně jsou však výrazně dostupnější, což umožňuje efektivnější využití rozpočtů laboratoří. Do roku 2025 vstupujeme s posílenou nabídkou v této oblasti. Otevíráme tak nové možnosti pro spolehlivá a ekonomicky výhodná řešení provádění moderních molekulárně genetických analýz.

DPYD a haplotyp B3: Hluboká intronová varianta c.1129-5923C>G a její role v klinické praxi

Janíková M.^(1,2), Kolaříková K.^(1,2), Kratochvílová R.^(1,2), Brisudová A.^(1,2), Langerová H.^(1,2), Curtisová V.^(1,2), Rožánková Z.⁽³⁾, Slavkovský R.⁽³⁾, Vrtěl R.^(1,2)

1 Ústav lékařské genetiky, FN Olomouc

2 Ústav lékařské genetiky, LF UP v Olomouci

3 Ústav molekulární a translační medicíny, LF UP v Olomouci a FN Olomouc

Dihydropyrimidin dehydrogenáza (DPD), kódovaná genem DPYD, hraje klíčovou roli v metabolismu chemoterapeutik na bázi fluoropyrimidinů, jako jsou 5-fluorouracil (5-FU) a capecitabine. Tyto léky se používají k léčbě širokého spektra nádorů, včetně nádorů kolorekta, prsu, žaludku a nádorů hlavy a krku.

Bylo identifikováno několik variant v genu DPYD, které snižují nebo zcela ruší aktivitu DPD. Pacienti s těmito variantami mají zvýšené riziko intoxikace při podání fluoropyrimidinů, což může vážně ohrozit jejich zdraví nebo vést až k úmrtí. Klinické farmakogenetické konsorcium (CPIC) proto doporučuje testovat přítomnost klinicky nejrelevantnějších variant v genu DPYD, aby se na základě výsledků genotypizace a stanoveného skóre aktivity nastavila optimální terapeutická dávka pro každého pacienta.

Mezi nejčastější příčiny snížené funkce DPD patří haplotyp B3 (HapB3), který je často detekován na základě přítomnosti benigní synonymní varianty c.1236G>A (p.Glu412=) (rs56038477) v exonu 11. Nicméně, za poškození funkce DPD je zodpovědná varianta c.1129-5923C>G (rs75017182) v intronu 10, protože vytváří nové kryptické sestřihové místo. Tyto varianty jsou obvykle ve vazbě a varianta p.Glu412= se proto označuje jako „SNP značící haplotyp B3“. Nedávné studie ukázaly, že vazební nerovnováha (LD) mezi nimi není perfektní. To znamená, že někteří jedinci mohou nést variantu c.1236G>A, avšak nejsou nositeli varianty c.1129-5923C>G. Testování pouze varianty c.1236G>A tak může vést k falešně pozitivním výsledkům testů a suboptimálnímu dávkování, což by mohlo negativně ovlivnit léčbu a vyhlídky pacientů na přežití. Aby se tomuto problému zabránilo, bude v rámci prezentace nabídnuto možné řešení.

Tato práce byla podpořena MZ ČR –RVO (FNOI, 00098892).

Význam přenašečství patogenních variant v genech pro syndromy chromosomální instability z hlediska rizika hematologických malignit a toxicity protinádorové léčby

Trizuljak J.^(1,2,3), Blaháková I.^(2,3), Helma R.^(2,3), Vrzalová Z.^(1,2,3), Radová L.^(1,2,3), Štika J.^(1,2), Staňo Kozubík K.^(1,2,3), Likavcová P.⁽¹⁾, Pospíšilová Š.^(1,2,3), Doubek M.^(1,2,3)

1 Ústav lékařské genetiky a genomiky, LF MU a FN Brno

2 Středoevropský technologický institut, Masarykova univerzita, Brno

3 Interní hematologická a onkologická klinika, LF MU a FN Brno

Syndromy chromosomální instability (SCHI) jsou skupinou vzácných autosomálně recesivních onemocnění, charakterizovaných náchylností chromozomů ke spontánním či indukovaným zlomům. Tato heterogenní skupina onemocnění zahrnuje mimo jiné Fanconioho anémii, Ataxia teleangiectasia, Nijmegen breakage syndrom, Bloomův syndrom, Wernerův syndrom a Xeroderma pigmentosum. Mezi časté rysy patří nízký vzrůst, kožní projevy, dysmorfické rysy, chemosenzitivita, radiosenzitivita a dramaticky zvýšené riziko malignit včetně hematologických. Incidence bývá častější v rodinách s konsanguinitou. Heterozygotní přenašeči patogenních variant v těchto genech mají zvýšené riziko solidních nádorů, zejména některé komplementační skupiny pro Fanconioho anémii. Na souboru 1144 pacientů se solidními nádory léčenými na

Interní, hematologické a onkologické klinice FN Brno jsme retrospektivně sledovali výskyt hematologických malignit v rodinách pacientů nesoucích patogenní varianty v genech pro SCHI ve srovnání s pacienty, kteří žádnou variantu nenesli. Dále jsme tyto skupiny srovnávali z hlediska toxicity chemoterapie a radioterapie. Ačkoliv rozdíl incidence hematologických malignit v rodinách mezi skupinami nebyl statisticky významný, ve skupině přenašečů patogenních variant pros SCHI jsme pozorovali významnější četnost nežádoucích účinků léčby.

Projekt byl podpořený grantem DRO (FNBr, 65269705); projektem Národní ústav pro výzkum rakoviny (Program EXCELES, ID: LX22NPO5102) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU; grantem MUNI/A/1685/2024 – Financováno Masarykovou Univerzitou.

Genetické vyšetření v personalizované léčbě – od paliativní péče k úspěšné léčbě

Tajtlová J.⁽¹⁾, Kejkulová R.⁽¹⁾, Friedlová N.⁽¹⁾, Brožová K.⁽²⁾, Langová M.⁽¹⁾

1 Oddělení lékařské genetiky, FTN, Praha

2 Oddělení dětské neurologie, FTN, Praha

Pyridoxin-dependentní epilepsie je vzácné neurometabolické onemocnění charakterizované epileptickými záchvaty začínajícími v prvních týdnech až měsících života # 266100. Na oddělení dětské neurologie byl přijat 4měsíční chlapec s epileptickými záchvaty od pátého dne po narození, byl léčen vysokými dávkami fenobarbitalu 30 mg/kg. Při probíhajícím bakteriálním infektu došlo k rozvoji rezistentního status epilepticus, dítě bylo převedeno do thiopentalového kómatu a rodina do paliativní péče.

Provedená vyšetření neodhalila příčinu záchvatů (elektroencefalografie, ultrazvuk CNS, oftalmologické vyšetření a odběr mozkomíšního moku). Bylo provedeno masivní paralelní sekvenování epileptickým panelem (Custom Tier kit Sure Agilent ID 3368871, 223 genů) na NextSeq 500/550 DX (Illumina, GeneTiCA), pipeline v softwaru GENOVESA (Bioxys), které detekovalo dvě patogenní varianty v genu:

HGVS/HGVp: ALDH7A1 (NM_001182.5): c.1489+5G>A p.-; dbSNP: rs368820286; mat
HGVS/HGVp: ALDH7A1(NM_001182.5): c.1279G>C p.Glu427Gln; dbSNP: rs121912707; pat (trans pozice).
Obě varianty byly ověřeny Sangerovým sekvenováním.

Varianty v genu ALDH7A1 jsou asociovány s pyridoxin dependentní epilepsií. Na substituci pyridoxinem, nízkolysinové dietě, suplementaci argininu a monoterapii fenobarbitalem je plně kompenzován po stránce epileptických záchvatů. Psychomotorický vývoj pokračuje velmi příznivě, vývojový progres je patrný během krátkého období 6 týdnů. Aktuálně odpovídá polovině II. trimenonu v 7 měsících. V neurologickém nálezu přetrvává hypertonický syndrom s opistotonickou tendencí (která ale v čase ustupující) a persistencí některých novorozeneckých reflexů.

Guidelines SLG pro referování sekundárních a incidentálních nálezů z NGS/WES/WGS

Koudová M.

Výbor SLG ČLS JEP

Prezentace se bude věnovat seznámení a diskusi s návrhem guidelines SLG ČLS JEP pro referování sekundárních a incidentálních nálezů z NGS analýz, především z (klinického) exomu a sekvenování genomu.

Sekundární nález je definován nález klinicky významné varianty (pravděpodobně patogenní (class 4) a patogenní (class 5) v předem definovaných genech nesouvisejících s primárním účelem testování (mimo oblast indikace – fenotyp HPO terms, indikované geny...) a měl by být laboratoří reportován. American College of Medical Genetics and Genomics publikovala doporučení pro referování těchto sekundárních nálezů. Seznam genů je pravidelně revidován a aktualizován na základě nového výzkumu. Nejnovější doporučení je nyní verze ACMG SF v3.2. Incidentální nález je náhodný nález klinicky významné varianty (pravděpodobně patogenní (class 4) a patogenní (class 5) nesouvisejících s primárním účelem testování (mimo oblast indikace – fenotyp HPO terms, indikované geny...) a mimo předem definované geny k reportování pro sekundární nálezy –možná souvislost s fenotypem nebo rodinou anamnézou, reportování konzultovat s indikujícím genetikem. Bude diskutováno také referování těchto nálezů v prenatalní diagnostice a u dětí. Guidelines bude poté publikováno na webu SLG ČLS JEP.

Polygenní rizikové skóre: Význam a implementace v DNA diagnostice

Kovář M., Stejskal D., Hovhannisyan M.

GENNET s.r.o., Praha

Polygenní rizikové skóre (PRS) představuje kvantitativní odhad souhrnného vlivu alel malého účinku na genetickou predispozici jedince k určitému znaku nebo onemocnění. PRS se vypočítává na základě přítomnosti alel, které byly identifikovány jako významné pro daný fenotyp v celogenomových asociačních studiích (GWAS). Tyto alely jsou váženy podle síly svého individuálního vlivu na fenotyp a následně agregovány do celkového skóre.

Jedním z klinických využití PRS je jeho začlenění do multifaktoriálních predikčních algoritmů pro odhad rizika rakoviny prsu a vaječníků, například do Breast and Ovarian Analysis of Disease Incidence and Carrier Estimation Algorithm (BOADICEA).

V této přednášce se zaměříme na metodologii výpočtu polygenních rizikových skóre pro rakovinu prsu (BCAC_313) a vaječníků (OCAC_36) a jejich integraci do modelu BOADICEA v rámci webové aplikace CanRisk.

Vzácné syndromy diagnostikované v raném věku na jednotkách intenzivní péče FN Motol a jejich dopady na péči o pacienty

Balaščaková M., Dvořáková L., Libík M., Peldová P., Votýpka P. Ptáčnicková N.

Ústav biologie a lékařské genetiky, FN v Motole a 2. LF UK, Praha

Genetická onemocnění a malformační syndromy patří mezi hlavní příčiny úmrtí u dětí mladších deseti let. Současným trendem ve vyspělých zemích je časně odhalení genetické diagnózy u dětí s vrozenými vadami a/nebo vícečetnými anomáliemi s cílem nastavení personalizované péče a zlepšení kvality života. Se vzrůstající frekvencí prokázaných vzácných genetických poruch je nezbytné porozumění specifickým potřebám těchto pacientů a jejich rodin. Na našem pracovišti jsme provedli retrospektivní analýzu případů dětí hospitalizovaných od roku 2020–2025 a na příkladech kazuistik chceme přispět k diskusi o diagnostických postupech a terapeutickém přístupu.

Využitelnost' celoexómového sekvenovania v genetickej diagnostike rôznych skupín zriedkavých ochorení,

Tomková E.^(1,3), Hýblová M.⁽²⁾, Purgatová A.⁽¹⁾, Majerová L.⁽¹⁾, Lukačková R.⁽¹⁾, Križan P.⁽¹⁾, Repiská V.⁽³⁾

1 Oddelenie lekárskej genetiky, Medirex, a.s., Bratislava

2 Genetika Rozvoj, Medirex, a.s., Bratislava

3 Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, LF UK, Bratislava

V súčasnosti je známych viac ako 6000 zriedkavých ochorení spôsobených prítomnosťou mutácie v jednom alebo viacerých génoch. Klinické manifestácie a výsledky rutinných testov sú často nešpecifické, čo sťažuje stanovenie presnej diagnózy. Zriedkavé ochorenia nielen znižujú kvalitu života postihnutého jedinca, ale majú významný dopad na etický, psychologický, sociálny a ekonomický status celej rodiny. Presné a včasné stanovenie diagnózy je kritické pre správnu liečbu, manažment a kvalitné genetické poradenstvo a prevenciu v rodine. V súčasnosti na Slovensku postihujú zriedkavé ochorenia 6-8 % populácie (viac ako 300 000 pacientov) a 75 % týchto pacientov sú deti.

Na identifikáciu kauzálnych variantov u pacientov sú v závislosti od indikácie okrem iných metód využívané aj rôzne prístupy DNA sekvenovania, či už sekvenovanie konkrétnych génov, klinického exómu (CES) alebo celého exómu (WES). V závislosti od jednotlivých diagnóz poskytuje WES vyšší celkový diagnostický výťažok v porovnaní s panelovým sekvenovaním, čo je markantné najmä u pacientov s komplexným fenotypom, diskretným fenotypom, prípadne s nepresne určenou diagnózou. Takto môže WES technológia prispieť k zvýšeniu podielu pacientov so správne stanovenou diagnózou. Metóda našla široké uplatnenie v klinickej praxi a môže byť aplikovaná v prenatálnej aj postnatálnej diagnostike s osobitými výhodami a tiež obmedzeniami.

V rámci prezentácie sa zameriame na využitie prístupu WES v diagnostike zriedkavých ochorení v súbore slovenských pacientov a stanovenie diagnostického výťažku v jednotlivých skupinách zriedkavých ochorení a tiež u pacientov s komplexným fenotypom.

Genetická diagnostika genů s dominantní i recesivní dědičností

Zídková J., Kramářová T., Kopčilová J., Réblová K., Fajkusová L.

Centrum molekulární biologie a genetiky, LF MU a FN Brno

Centrum molekulární biologie a genetiky, Fakultní nemocnice Brno a Lékařská fakulta MU

Neuromuskulární onemocnění (NMD) jsou klinicky a geneticky heterogenní skupinou onemocnění postihujících periferní nervový systém, svaly a nervosvalová spojení. Molekulární diagnostika NMD metodou sekvenování nové generace představuje klíčový nástroj pro identifikaci genetických příčin těchto poruch. Zvláštní výzvu pro interpretaci nálezu představují geny, u nichž se může vyskytovat jak dominantní, tak recesivní typ dědičnosti.

Vybrané kazuistiky pacientů z našeho souboru pacientů s NMD poskytují příklady genů s oběma typy dědičnosti. Patogenní varianty v RYR1 genu mohou způsobovat dominantní myopatie s lehčím průběhem a vnímavost k maligní hypertermii, vedou ke zvýšené citlivosti ryanodinového receptoru na aktivaci (gain-of-function varianty). Zatímco varianty spojené se sníženou funkcí či sníženou expresí receptoru (loss-of-function varianty) způsobují recesivní vrozené myopatie s těžkou svalovou slabostí. Gen SCN4A kóduje alfa podjednotku sodíkového kanálu a je zásadní pro excitabilitu kosterního svalstva. Historicky byl gen SCN4A spojen s dominantními nemocemi jako non-dystrofická myotonie,

hyperkalemická/hypokalemická periodická paralýza, jež jsou podmíněny zvýšenou nebo abnormální aktivitou sodíkového kanálu. V posledních letech jsou popisovány případy spojené s recesivními loss-of-function variantami a fenotypově se svalovou slabostí, jako kongenitální myastenický syndrom a kongenitální myopatie. Dalším příkladem genů s dominantní i recesivní dědičností jsou geny CAPN3, NEB nebo LMNA.

Pochopení molekulárních mechanismů vedoucích k tomuto duálnímu typu dědičnosti je nezbytné pro interpretaci detekovaných variant. Přesná genetická diagnostika je klíčová pro další klinický management pacienta a genetické poradenství.

Nové formy hereditárních ataxií SCA27B a CANVAS

Vyhnálková E.^(1,3), Vyhánek M.^(2,3), Kuzmiak M.^(2,3), Blichová Z.^(2,3), Paulasová Schwabová J.^(2,3), Havlovicová M.⁽¹⁾, Mušová Z.^(1,3)

1 Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN v Motole, Praha

2 Neurologická klinika 2. LF UK a FN v Motole, Praha

3 Centrum hereditárních ataxií FN v Motole, Praha

Recentní objev dvou nových podtypů hereditárních ataxií: autozomálně dominantní ataxie SCA27B způsobené expanzí GAA repetice v intronu genu FGF14 a autozomálně recesivní ataxie CANVAS (cerebellar ataxia, neuropathy, vestibular areflexia syndrome) způsobené bialelickou expanzí sekvence AAGGG v intronu 2 genu RFC1, zásadním způsobem zvýšil diagnostický záchyt u pacientů s dědičnými ataxiemi s pozdním nástupem v ČR a u velké části pacientů umožnil i cílenou léčbu. Obě velmi časté ataxie jsou rutinně vyšetřovány v Centru hereditárních ataxií, ÚBLG FN Motol. V příspěvku představuji formou videokazuistik hlavní klinické příznaky SCA27B a CANVAS a uvádím nová evropská doporučení pro diagnostiku ataxií v dospělosti, kde je vyšetření obou podtypů integrováno.

A novel splicing variant of FGFR3 gene detected in patients with hypochondroplasia and achondroplasia

Krulišová V.⁽¹⁾, Zemková D.⁽²⁾, Mařík I.^(3,4), Paszeková H.⁽¹⁾, Michalovská R.⁽¹⁾, Vlčková Z.⁽¹⁾

1 GHC Genetics, Prague

2 Dept. of Paediatrics, Charles University, University Hospital Motol; Prague

3 Centre for Defects of Locomotor Apparatus I.I.c.; Prague

4 Faculty of Health Care Studies, West Bohemia University; Pilsen

Background:

Achondroplasia (ACH) and hypochondroplasia (HCH) are the most common skeletal dysplasias. Both ACH and HCH are related to pathogenic variants in the fibroblast growth factor receptor-3 (FGFR3) gene. The vast majority of cases can be attributed to the hotspot missense variants in heterozygous state in the FGFR3 gene: 99 % patients with ACH are carrying pathogenic variant c.1138G>A or c.1138G>C located in exon 10. Approx. 70 % of individuals with HCH are carrying pathogenic variant c.1620C>A or c.1620C>G located in exon 13.

Here we present 2 patients with a novel splicing variant c.1075+95C>G of FGFR3 that represents probably recurrent causal variant in patients manifesting with ACH and HCH.

Case presentation:

Here we report a 15-year-old boy of Vietnamese origin with HCH. X-ray findings were corresponding to HCH. However, some clinical features were corresponding rather to ACH. His family history was negative. DNA testing for typical hotspot mutations in FGFR3 gene was performed with negative result, therefore DNA analysis focused on the whole FGFR3 gene using clinical exome sequencing (CES) followed.

A deep intronic alteration c.1075+95C>G was detected in a heterozygous state in the FGFR3 gene. Since the variant was originally evaluated as a variant of unknown significance, targeted testing of this particular variant in both healthy parents was performed to elucidate the causality. Both parents were tested negative for c.1075+95C>G FGFR3 variant and thus the causality was suspected. In the meantime, the c.1075+95C>G variant in the FGFR3 gene was described in the literature as likely pathogenic, causing HCH and ACH.

The same likely pathogenic splicing variant was detected in one additional patient among genetically unresolved patients with skeletal dysplasias in our affiliation:

A 10-year-old girl with phenotype showing both HCH and ACH features came for genetic counseling. Her family history was negative. DNA testing for typical hotspot mutations in FGFR3 gene was performed with negative result, therefore DNA analysis focused on the whole FGFR3 gene by CES followed. No causal variant was described first.

After reanalysis, that was performed 3 years apart, the c.1075+95C>G variant in the FGFR3 gene in heterozygous state was noticed. As this variant correspond to HCH, ACH and overlapping forms, we consider this variant to be causal.

Conclusions:

Our results are in concordance with previous results in literature that c.1075+95C>G alteration in FGFR3 represents recurrent variant causing HCH, ACH and overlapping forms of HCH/ACH. Recognition of molecular genetic background enables appropriate surveillance for the patient. Furthermore, intronic variant c.1075+95C>G represents a candidate for clinical trial strategies and subsequent treatment.

We recommend to include this variant in routinely used diagnostic tests for HCH and ACH. We also recommend to reanalyse data of patients clinically diagnosed with HCH or ACH, who were tested negative using methods based on New Generation Sequencing (NGS) technologies.

Nález a interpretace genetických variant u onemocnění Amyotrofická laterální skleróza

Lenka Šlachťová^(1,2), Antonín Šípek Jr.^(1,2)

1 Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK

2 Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

Amyotrofická laterální skleróza je vzácné neurodegenerativní onemocnění, které se projevuje progresivní ztrátou funkce motorických neuronů a jejich odumíráním. Klinicky může docházet ke slábnutí až ztrátou motorických schopností končetin, potíži s polykáním, s občasným zasažením kognitivních funkcí. ALS je multifaktoriální onemocnění a většina pacientů má sporadický výskyt nemoci (sALS). Etiopatogeneze

onemocnění má jasnou genetickou příčinu přibližně u 15 % pacientů (fALS). Existuje více než 40 genů asociovaných s onemocněním ALS, mezi nejčastější z nich patří c9orf72, SOD1, TARDBP a FUS.

Co znamená potvrdit příčinu ALS na úrovni DNA? Jak klinicky relevantně interpretovat nálezy molekulárně genetických vyšetření v kauzálních genech a jak v genech, které se spolupodílejí na vzniku onemocnění? Co má obsahovat genetická konzultace pacienta s ALS ve vztahu k němu a k riziku v jeho rodinné anamnéze?

Následující sdělení provede nejčastějšími otázkami z klinické praxe a nabídne možnosti řešení interpretací výsledků a jejich konzultací tak, aby byly účinnou součástí multioborové péče o pacienta.

Molekulární genetik a cytogenetika

Costellation - komplexní celogenomová analýza

Snítily F.

GeneTiCA

Od CGP po lymfomy - ako rychlé NGS pomáha zlepšiť prácu laboratórii a výsledky liečby

Držík F.

Clinical Sequencing Division, ThermoFisher Scientific

Moderná onkologická diagnostika založená na molekulárnej detekcii pomocou technológie NGS priniesla nesporné výhody pre zdravotníckych pracovníkov aj pre pacientov. S výhodami idú ruka v ruku aj mnohé výzvy a technológia je často skúšaná až na limit možností. Je možné zjednodušiť komplexné genomické profilovanie solídnych nádorov (CGP) na jednu krátku analýzu a mať po ruke všetky dôležité hodnotiace kritériá ako napríklad MSI status, HRD skóre či stav mutačnej nálože TMB v jednej správe a to bez zdlhavej analýzy dát? Je možné zoptimalizovať a zrýchliť vyšetrenia hematologických a lymfoidných malignít na 24 hodín a umožniť tak včasnú liečbu týchto prípadov? V spoločnosti Thermo Fisher Scientific veríme, že áno!

Z kapsy do klinickej praxe, skrz Nanopore k diagnóze

Stiblík P., Brzoň O.

I.T.A.-Intertact

Pro vývoj v oblasti genomiky je nanopórové sekvenování klíčovou technologií zefektivňující klinickou diagnostiku díky své schopnosti provádět rychlou a přenosnou analýzu DNA a RNA v reálném čase. Nanopórové sekvenování nabízí nový vhled do genetiky i epigenetiky a přináší posun pro diagnostiku, sledování a léčbu řady onemocnění, což značně urychluje a zpřesňuje klinické procesy a zasahuje do širokého spektra medicínských disciplín, včetně infekčních nemocí, onkologie a genetického poradenství.

Napříč studiemi a klinickými zkouškami bylo prokázáno, že nanoporové sekvenování zásadně zlepšuje rychlost a přesnost diagnostiky, což je kritické pro správné rozhodnutí. Implementace nanopórového sekvenování do každodenní praxe umožňuje klinickým laboratořím provádět komplexní testy bez potřeby zdlouhavého zpracování vzorků a vysoce specializovaného vybavení.

Innovative Transcriptomic Approaches: Unlocking New Potential in Biological Research

Mášová A., Kulinich V., Abaffy P., Valihrach L.

Biotechnologický ústav AV ČR v.v.i., Vestec

Advanced transcriptomic technologies have become an indispensable tool for uncovering the complexity of gene expression in health and disease. We present practical applications of these

technologies and their impact on research and therapy development in projects recently supported by the GeneCore Facility.

Bulk transcriptomics is a robust and cost-effective method for studying gene expression at the level of cell populations. This technology has been successfully used to monitor response to novel treatments in a preclinical stroke model, providing key insights into the cellular mechanisms of investigational therapeutics. Single-cell transcriptomics pushes the boundaries of analysis by revealing cellular heterogeneity and allowing the identification of rare cell populations that often play a key role in disease development or pathology. This approach has proved invaluable in an organoid model of the ultra-rare Alexander disease, where it helped to uncover a potential new mechanism of disease. Spatial transcriptomics complements these methods by preserving the spatial organisation of gene expression, allowing the molecular and cellular architecture of tissues to be mapped at high resolution. With our support, this technology has been applied to a mouse model of acute cerebral ischaemia, where it has contributed to the generation of a spatio-temporal map of glial cell responses to injury. In addition, we represent our ongoing efforts to develop and standardise methods for the analysis of small RNAs, which are key to understanding their regulatory role in gene expression and pathology. Taken together, these applications demonstrate the versatility and potential of advanced transcriptomic technologies to provide valuable insights into complex biological processes and to open up new avenues for the development of therapeutic strategies.

Single-Cell Analysis of Endometrial Tissue in Fertility-Limiting Pelvic Disorder

Abaffy P.⁽¹⁾, Hlinecká K.⁽²⁾, Lisa Z.⁽²⁾, Richtarová A.⁽²⁾, Lukavec V.⁽²⁾, Kužel D.⁽²⁾, Mára M.⁽²⁾

1 GeneCore Facility, Institute Of Biotechnology, Czech Academy Of Sciences, Biocev, Vestec, Czech Republic

2 Department of Obstetrics and Gynecology, General Faculty Hospital and 1st Medical Faculty of Charles University, Prague, Czech Republic

Infertility is a significant medical, psychological, and social challenge that has become more pressing as women increasingly postpone pregnancy into their forties and fifties. In response, fertility-preserving treatments are in growing demand. This study examines the endometrium at the single-cell level in women diagnosed with uterine fibroids (UF), deep endometriosis (DE), or adenomyosis (AD). Although the exact incidence of these conditions is unknown, their prevalence is known to increase with age and is particularly high among women of reproductive age and those experiencing infertility.

Endometrial samples were collected around day 20 of the menstrual cycle—coinciding with the optimal window for embryo transfer in IVF—during fertility-preserving surgery and again two months post-surgery. Controls included patients with minimal or mild endometriosis or those with infertility solely due to male factors. Patients opting for conservative treatment were also included. Initially, 96 samples from 58 patients were analyzed using bulk RNA sequencing, leading to the identification of a new panel of genes that are specific to the peak receptive phase of the cycle. Ten of these genes were subsequently used in qPCR to verify the receptive phase status of the samples prior to single-cell analysis. Overall, 183 samples from 124 patients were tested for receptivity, and we observed that surgery altered the proportion of cell types in the endometrium.

In the next phase, 104 samples underwent single-cell RNA sequencing, yielding approximately 300,000 cells (an average of 3,000 cells per sample) that were grouped into seven major clusters. Preliminary results indicate that gene expression profiles differ between pre- and post-surgical states.

These findings offer detailed insights into the cellular composition of diseased endometrium and may help improve the precision of surgical outcome monitoring.

This work was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic (NU23-06-00327, REAdME), the Institute of Biotechnology of the Czech Academy of Sciences (RVO 86652036).

Nová patogenní nonsense varianta v genu ADSL vedoucí k fatálnímu fenotypu deficitu adenylosukcinátlyázy

Zikánová M.⁽¹⁾, Klapperich A.⁽²⁾, Karakaya M.⁽³⁾, Mrázová L.⁽¹⁾, Trešlová H.⁽¹⁾, Škopová V.⁽¹⁾

1 *Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu 1. LF UK a VFN v Praze*

2 *MVZ Humangenetik Köln, Germany*

3 *Institute of Human Genetics, University of Cologne, Germany*

Deficit adenylosukcinátlyázy (ADSL) je vzácná vrozená porucha metabolismu purinů, která se projevuje neurovývojovým postižením. Patogenní varianty v genu ADSL narušují funkci enzymu, vedou k hromadění sukcylnypurinů, porušení formování purinosomu a způsobují různé stupně závažnosti fenotypu. Dosud však nebyla popsána žádná patogenní nonsense varianta v ADSL.

Exomové sekvenování bylo provedeno u plodu s četnými vrozenými anomáliemi, včetně intrauterinního růstového opoždění (IUGR), podezření na svalovou atrofii, artrogrypózy, hypoplazie mozečku, polyhydramnie a suspektní kardiomegalie. Kvůli závažnosti fenotypu rodiče rozhodli o ukončení těhotenství ve 24. týdnu.

Analýza fetální DNA odhalila nejčastější patogenní missense variantu ADSL (NM_000026.4): c.1277G> A p. (Arg426His) na otcovské alele a variantu c.597G> A p. (Lys199=) na mateřské alele, která se na základě genetického kódu jevila jako synonymní. Predikční software SpliceAI naznačil, že varianta c.597G> A by mohla vést k aberantnímu sestříhu. Vzhledem k absenci fetální RNA byla analyzována RNA rodičů. RNA sekvenování u matky potvrdilo přítomnost alternativního sestříhového produktu ADSL c.597_654delinsA p. (Gly200_Lys218del) v množství menším než 20%, přičemž na zbývající mutované alele pravděpodobně dochází k NMD. Aktivita ADSL v periferních mononukleárních buňkách (PBMC) rodičů byla snížena (matka: 13 % se substrátem SAMP, 39 % se substrátem SAICAR; otec: 25 % se SAMP, 35 % se SAICAR oproti kontrolám).

Potvrdili jsme, že varianta c.597G> A, která se podle genetického kódu jeví jako synonymní, ve skutečnosti způsobuje funkčně významnou poruchu sestříhu částečně vedoucí k NMD. Snížená aktivita ADSL u rodičů podporuje patogenní roli této varianty. Výsledky naznačují, že i zdánlivě synonymní varianty by měly být pečlivě analyzovány při hledání genetických příčin poruch s nespécifickými klinickými projevy, jako je například deficit ADSL.

Tato práce byla financována grantem Ministerstva zdravotnictví ČR AZV NU23-01-00500.

Překvapivý nález maternální tetrazomie 9p v NIPT

Kleinová S.

Laboratoř a centrum lék. genetiky, SPADIA LAB, a.s.

Laboratoř lék. genetiky, GENvia, s.r.o.

Tetrazomie 9p je velmi vzácná aberace s prevalencí nižší než 1:1 000 000. Je provázána přítomností nadbytečného derivovaného chromozomu, skládajícího se obvykle z krátkých ramen chromozomu 9. Nález této aberace je často spojen s mnohočetnými vývojovými anomáliemi, přičemž fenotypový projev může být velmi variabilní. Plná tetrazomie 9p obvykle vede k úmrtí již v prenatálním období nebo krátce po narození, zatímco mozaikové formy tetrazomie 9p vykazují různou míru postižení v závislosti na rozsahu a distribuci změn. Existují také případy, kdy pacienti vykazují minimální nebo žádné viditelné klinické příznaky, což činí diagnostiku obtížnější.

V kazuistice popisujeme vzácný případ záchytu částečné tetrazomie 9p u samotné těhotné ženy během neinvazivního prenatálního testování (NIPT). K potvrzení výsledku NIPT byla použita kombinace několika diagnostických metod - jednalo se o stanovení karyotypu z periferní krve a molekulárně cytogenetické metody FISH, mFISH, mBAND a aCGH. Stanovením karyotypu byl nalezen nadbytečný derivovaný chromozom, technikou mFISH byl odhalen jeho původ, díky technice mBAND upřesněny body zlomu a pomocí techniky FISH byla prokázána mozaika, která potvrdila nález částečné tetrazomie odhalené i technikou aCGH. Uvedené metody pomohly zpřesnit neobvyklý nález u pacientky bez zjevného fenotypu. Pokud by se pacientka nerozhodla pro NIPT, tak tento nález by při standardní prenatální diagnostice (UZ sledování) nebyl odhalen. U vlastního plodu nebyla tato chromozomální aberace nalezena.

Cílem přednášky je ukázat komplexní pohled na detekci a confirmaci vzácných genetických abnormalit (primárně zachycených pomocí NIPT), což umožňuje následně zpřesňovat korelaci genotypu s fenotypem.

Optické mapování genomu (OGM) jako pokročilý nástroj pro analýzu prostorové a klonální heterogenity glioblastomů

Lizcová L.⁽¹⁾, Lhotská H.⁽¹⁾, Hodaňová L.⁽¹⁾, Pavlišťová L.⁽¹⁾, Konečná D.⁽²⁾, Soukup J.⁽³⁾, Netuka D.⁽²⁾, Zemanová Z.⁽¹⁾

1 Centrum nádorové cytogenomiky ÚLBD, 1. LF UK a VFN v Praze

2 Neurochirurgická a neuroonkologická klinika 1. LF UK a ÚVN Praha

3 Oddělení patologie 1. LF UK a ÚVN Praha

Glioblastomy (GBM) jsou nejčastější primární nádory mozku, které se vyznačují rozsáhlou genetickou komplexitou a extrémně nepříznivou prognózou. Klíčovým znakem GBM je výrazná inter- a intra-tumorová heterogenita, která podporuje evoluci geneticky odlišných subklonů, přispívajících k rezistenci na léčbu a recidivě onemocnění. V rámci studia nádorové heterogenity jsme použili optické mapování genomu (OGM) k analýze prostorově odlišných vzorků nádorové tkáně (centrální oblast, okraj 1, okraj 2) odebraných od tří různých pacientů s GBM (dvě ženy, jeden muž).

Standardní diagnostické testy, včetně I-FISH, MLPA a MS-MLPA, potvrdily přítomnost typických GBM aberací (+7/-10, mutace v genu TERT, metylaci promotoru MGMT) ve všech diagnostických vzorcích. Následná pokročilá cegenomová analýza kryptických aberací metodou OGM odhalila ve třech různých vzorcích z každého nádoru další komplexní intra- a interchromozomální přestavby. U dvou pacientů jsme pozorovali významnou genetickou diverzitu mezi centrální částí nádoru a okrajovými oblastmi. V prvním případě byly rozdíly primárně spojeny se změnami počtu kopií (CNV), včetně kryptických delecí a duplikací. Ve druhém případě byl nádor charakterizován rozsáhlými CNV a různými interchromozomálními strukturními přestavbami ve všech třech analyzovaných oblastech. Naproti tomu u třetího pacienta nebyly aberace přítomné v centrální oblasti nádoru detekovány v okrajových vzorcích, což naznačuje možný odběr

nenádorové tkáně. Všechny nově identifikované aberace detekované metodou OGM byly unikátní pro jednotlivé nádory.

Naše výsledky ukazují, že navzdory sdíleným diagnostickým markerům vykazují GBM značnou genomovou variabilitu jak mezi jednotlivými nádory, tak v rámci jednoho nádoru. OGM umožňuje detailní charakterizaci této komplexity a identifikaci regionálně specifických genetických změn, které mohou ovlivňovat klonální evoluci a rezistenci na léčbu. Důkladné pochopení inter- a intra-tumorové heterogenity je zásadní pro vývoj cílených a adaptivních terapeutických strategií s potenciálem zlepšit prognózu pacientů s GBM.

Podpořeno granty MZ ČR RVO-VFN64165 a AZV-NU21-04-00100.

Přínos detekce jednonukleotidových polymorfizmů v PGT-A

Blahútová D., Kubíček D., Navrátil R., Horňák M., Veselá K.

REPROMEDA s.r.o., Brno

Úvod:

Preimplantační genetické testování aneuploidií (PGT-A) má za cíl vybrat k transferu embryo s největším implantačním potenciálem a vyřadit ta embrya, která nesou aneuploidii. Přestože zlatým standardem v PGT-A již řadu let zůstává masivní paralelní sekvenování v kombinaci se CNV analýzou, má tato metoda určité limitace, jako je například neschopnost rozlišení meiotických a mitotických chyb. To může výrazně ovlivnit klinická data po transferu aneuploidních embryí chybně reportovaných jako vysokoprocentuální mozaiky. Implementace detekce jednonukleotidových polymorfizmů (SNP) do PGT-A nám umožňuje některé tyto limitace vyřešit. S využitím vzorku rodiče nám také poskytuje informaci o parentálním původu aneuploidií, což může mít význam pro přesnější klasifikaci detekovaných aneuploidií.

Metody a výsledky:

Pro vyšetření biopsií trofektodermu a rodičovských vzorků byla použita metoda PGT-A+, založená na detekci SNP markerů pomocí Infinium™ Global Screening Array. Po detekci a vyhodnocení 913 aneuploidií bylo zjištěno, že počet maternálních meiotických trizomií (398) je téměř totožný s počtem nalezených maternálních monozomií (426). U aneuploidií paternálního původu bylo detekováno 5,3x více monozomií než meiotických trizomií (75 vs 14).

Závěr:

Pomocí detekce jednonukleotidových polymorfizmů (SNP) v rámci PGT-A jsme schopni zvýšit míru spolehlivosti vyšetření, zachytit haploidní a triploidní nálezy, rozlišit meiotický a mitotický původ aneuploidií a s využitím referenčního vzorku jednoho z rodičů také určit parentální původ aneuploidií (jak monozomií tak trizomií). Analýzou těchto dat jsme zjistili, že počet maternálních meiotických trizomií a monozomií je téměř totožný, avšak u aneuploidií paternálního původu vidíme výrazný nárůst počtu monozomií ku meiotickým trizomiím. Tento rozdíl je velmi pravděpodobně způsoben skutečností, že v případě paternálních aneuploidií je na rozdíl od maternálních výrazně vyšší podíl chyb mitotického původu. Lze tedy usuzovat, že u monozomií paternálního původu se z velké části jedná o mitotické chyby a tato embrya tak mohou být do budoucna klasifikována jako potenciálně transferovatelná po genetické konzultaci.

Spektrum patogenních variant v genu OPA1 v souboru 56 pacientů s dominantní optickou atrofií

Bačíková D.⁽¹⁾, Lokvencová K.⁽¹⁾, Kousal B.⁽²⁾, Záhoráková D.⁽¹⁾, Ptáčková H.⁽¹⁾, Zajícová Dočekalová D.⁽¹⁾, Trefilová E.⁽¹⁾, Honzík T.⁽¹⁾, Lišková P.⁽²⁾, Tesařová M.⁽¹⁾

1 Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu 1. LF UK a VFN v Praze

2 Oční klinika 1. LF UK a VFN v Praze

Dominantní optická atrofie (DOA) představuje nejčastější vrozenou neuropatii zrakového nervu zapříčiněnou mutacemi v genech jaderné DNA kódující mitochondriální proteiny, jejichž patogenní varianty způsobují neurodegenerativní postižení gangliových buněk sítnice. Nástup onemocnění se vyznačuje pomalu progredující nebolestivou ztrátou zrakové ostrosti se začátkem v první dekádě života. U přibližně 65 % pacientů je DOA způsobená patogenními variantami v genu OPA1, kódující dynaminu podobnou GTPázu OPA1. Protein OPA1 je nezbytný pro dynamiku mitochondriální sítě, tvorbu krist a stabilitu mtDNA. Kritickou částí proteinu v případě přítomnosti patogenních variant je vysoce konzervovaná GTPázová doména, jejíž dysfunkce může vést k rozvoji dalších extraokulárních příznaků a klinicky závažnějším fenotypovým projevům. Cílem studie je charakterizovat spektrum patogenních variant v genu OPA1 v souboru pacientů vyšetřených na našem pracovišti v letech 2010–2025 s podezřením na optickou atrofií. V rodinách pacientů s prokázanou patogenní variantou v genu OPA1 provést korelaci genotypu s fenotypem. Mutační analýza genu OPA1 (NM_015560.2) byla provedena Sangerovým sekvenováním jednotlivých exonů z genomové DNA, následně byla doplněná MLPA analýzou (Salsa MLPA Probemix P229 OPA1) nebo masivně paralelním sekvenováním (diagnostický panel nebo exomové sekvenování). Doposud nepopsané varianty, zejména rozsáhlé delece byly následně podrobně charakterizovány pomocí long-range PCR s následným sekvenováním. Od roku 2010 jsme gen OPA1 analyzovali u >280 pacientů, bodová patogenní varianta byla nalezena u 56 pacientů. U 11 z nich se jednalo o unikátní, doposud nepopsanou variantu. Rozšíření mutační analýzy o MLPA potvrdilo diagnózu u dalších šesti pacientů, tři z nich nesli unikátní rozsáhlé delece v genu OPA1. Patogenní varianty byly následně potvrzeny také u 78 rodinných příslušníků. Sledování fenotypu u jednotlivých patogenních variant v genu OPA1 potvrzuje variabilitu onemocnění u pacientů s DOA, tak i variabilitu exprese onemocnění v jednotlivých rodinách. Včasná diagnostika je zásadní pro možné terapeutické ovlivnění.

Práce byla podpořena projekty AZV NU22-07-00614, RVO-VFN64165 a programem Univerzity Karlovy Cooperatio_Pediatrics.

Využití konfokální mikroskopie k potvrzení kauzality genetických variant

Barešová V.⁽¹⁾, Živná M.^(1,2), Zikánová M.⁽¹⁾, Trešlová H.⁽¹⁾, Škopová V.⁽¹⁾, Nosková L.⁽¹⁾, Stránecký V.⁽¹⁾, Bleyer A. J.^(1,2), Kmoč S.^(1,2)

1 Laboratoř pro výzkum vzácných nemocí, Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu, 1. LF UK a VFN v Praze

2 Section on Nephrology, Wake Forest School of Medicine, Winston-Salem, NC, USA

Konfokální mikroskopie je vhodným nástrojem charakterizace funkčního dopadu variant neznámé significance (VUS) nebo variant genu(ů) nově asociovaných s konkrétním fenotypem. Pomocí konfokální mikroskopie může být odhalena aberantní lokalizace mutovaných proteinů v buňce, což je molekulárním mechanismem celé řady onemocnění tzv. proteinopatií. Změna lokalizace mutovaného proteinu v buňkách aktivuje buněčné stresové odpovědi, které při dlouhodobém trvání vedou k poškození buněk, tkání, cílových orgánů a rozvoji proteinopatií, např. určitých typů selhání ledvin, neurodegenerativních onemocnění, kardiomyopatií nebo diabetu mellitu.

Technické parametry konfokálního mikroskopu umožňují specificky zaostřit na požadované roviny preparátů, získání obrazů s vysokým rozlišením a kontrastem a možnost jejich 3D rekonstrukce. Konfokální mikroskopie a následná softwarová analýza obrazu umožňují studovat buněčné struktury a proteinové interakce, a to jak ve vitálním, tak fixovaném materiálu buněk nebo tkání.

Vizualizace změny subcelulární lokalizace, ať už do endoplasmatického retikula, ER-Golgi intermediárního kompartmentu nebo Golgiho aparátu metodou konfokální mikroskopie napomohla interpretaci patogenetického mechanismu variant genů MUC1, SEC61A1, ALG5 nebo GLA asociovaných s chronickým selháním ledvin.

Dále se studie subcelulární lokalizace uplatnila při studiu fyziologického mechanismu de novo syntézy purinů (DNPS) a interpretaci variant v genech kódujících proteiny DNPS. V neposlední řadě napomohla charakterizaci variant podmiňujících vzácná onemocnění jako neuronální ceroidní lipofuscinóza, GAPO syndrom nebo Fanconi syndrom.

Konfokální mikroskopie je zároveň vhodnou metodou pro sledování účinku potenciálně terapeutických látek ovlivňujících intracelulární transport mutovaných proteinů pro různé typy proteinopatií.

KCND1: Kandidátní gen neurovývojové poruchy s variabilní expresí – Případ pětiletého chlapce a analýza missense varianty v X-vázaném genu

Bendová, Š., Vyhnálková, E., Peldová, P., Dvořáková, L., Hančárová, M., Prchalová, D., Křepelová, A., Sedláček, Z.

Ústav biologie a lékařské genetiky, 2. LF UK a FN v Motole, Praha

Celoexomové sekvenování je účinným nástrojem pro hledání genetických příčin neurovývojových poruch (NDD). Sekvenovali jsme trio s postiženým pětiletým chlapcem s regresem ve vývoji ve věku 2,5 roku, vykazujícím poruchu autistického spektra, poruchu řeči, hyperaktivitu a stereotypní pohyby, bez výrazných dysmorfii a s rodinnou anamnézou NDD u zemřelého maternálníhoho strýce matky. U chlapce jsme nenalezli žádné významné varianty v genech jasně asociovaných s NDD, ale nesl maternálně zděděnou missense variantu v X-vázaném genu KCND1 kódujícím podjednotku alfa napětově řízených draslíkových kanálů Kv4.1 (NM_004979.6(KCND1):c.781C>T, p.(Arg261Trp)). KCND1 byl zajímavým kandidátním genem a jeho role v NDD byla potvrzena v červnu 2024 publikací 17 mutací v kohortě postižených chlapců s různorodými NDD variabilní závažnosti, někdy doprovázenými epilepsií (Kalm et al., Am J Hum Genet 2024). Ze 17 mutací považovali autoři za jasně patogenní tři zděděné varianty vedoucí ke vzniku předčasného terminačního kodonu a dvě de novo missense varianty. Interpretace zbývajících 12 zděděných missense variant byla problematická: některé z nich byly nalezeny v hemizygotním stavu v gnomAD v4 (jedna až 79x), současně ale, bez ohledu na výskyt v gnomAD, se většina testovaných variant ukázala jako škodlivá ve funkčních studiích. Závěrečné posouzení podle ACMG kritérií bylo likely pathogenic u tří variant a VUS u

devíti (což je nadpoloviční většina celé kohorty). Do kategorie VUS spadá i varianta našeho pacienta, která se také vyskytuje v gnomAD v hemizygotním stavu 3x. Autoři publikace výše uvedené paradoxy vysvětlují „pozoruhodnou variabilitou fenotypové exprese a tíže choroby“. Z obecnějšího pohledu může tedy případ genu KCND1 ilustrovat skutečnost, že kauzální geny způsobující častější, závažné, vysoce penetrantní a fenotypově málo variabilní NDD byly již z větší části objeveny, a přichází čas identifikace genů odpovědných za vzácnější a mírnější NDD, které vykazují neúplnou, někdy spíše nízkou penetranci, a velmi variabilní expresivitu.

Podpořeno grantem AZV NU22-07-00165.

Sledování interní tandemové duplikace v genu FLT3 jako markeru měřitelné zbytkové nemoci u pacientů s akutní myeloidní leukemií

Beránková M.⁽¹⁾, Řehouňková M.⁽¹⁾, Baudyšová K.⁽¹⁾, Gančarčíková M.⁽¹⁾, Zavřelová A.⁽²⁾, Žák P.⁽²⁾, Pavlíková L.⁽¹⁾, Hyšpler R.⁽¹⁾

1 Ústav klinické biochemie a diagnostiky, LF UK a FN Hradec Králové

2 IV. Interní hematologická klinika, LF UK a FN Hradec Králové

Akutní myeloidní leukemie (AML) se vzhledem ke své četnosti v populaci řadí k nejčastější akutní leukemii u dospělých. Při stanovení diagnózy, prognózy a volbě léčby jsou s výhodou využívány molekulárně genetické techniky zahrnující mimo jiné také sledování měřitelné zbytkové nemoci (MRD) pomocí Next Generation Sequencing (NGS). Technika NGS je vhodná i ke sledování interní tandemové duplikace v genu FLT3 (FLT3-ITD). Tento prognostický marker je nalézán až u 25 % pacientů s AML, přičemž se jedná o nestabilní marker měnící se v průběhu léčby onemocnění.

Retrospektivní analýzou provedenou u deseti vybraných pacientů s diagnózou C920 (AML) v období od záchytu onemocnění do současnosti jsme získali celkem 62 analýz. Získaná data byla zhodnocena vlastní bioinformatickou pipeline (Tomáš Hron, Altium) umožňující sledování větších strukturních aberací – inserce, delece a duplikace.

Prezentovaná kazuistika pacienta dokazuje, že sledování MRD pomocí techniky NGS umožňuje zachytit počínající relaps onemocnění s několika měsíčním předstihem ve srovnání s klasickou fragmentační analýzou potrasplantačního chimerismu nebo FLT3-ITD pomocí kapilární elektroforézy.

Z našich prozatímních výsledků je patrné, že díky citlivým technikám je možná časná detekce relapsu onemocnění již na molekulární úrovni.

Mnohočetný myelom jako ideální onemocnění pro testování možností metody optického mapování genomu

Bezděková Fillerová R.⁽¹⁾, Kotašková J.^(2,3,4), Jarošová M.^(2,3,4), Plevová K.^(2,3,4), Marečková A.⁽²⁾, Ondroušková E.⁽²⁾, Bohunňová M.⁽²⁾, Stránská K.^(2,3), Adamová S.^(2,4), Dihel M.⁽¹⁾, Kvapil P.⁽¹⁾

1 Institute of Applied Biotechnologies, Olomouc

2 Laboratoře Interní hematologické a onkologické kliniky LF MU a FN Brno

3 Centrum molekulární medicíny, CEITEC-Central European Institute of Technology, Masarykova univerzita,

Brno

4 Ústav lékařské genetiky a genomiky, LF MU a FN Brno

Chromozomální aberace mají klíčový význam ve stratifikaci rizika hematologických malignit. Přesná identifikace těchto aberací umožňuje přesnější hodnocení rizik, což usnadňuje lepší prognostické předpovědi a plánování léčby. Mnohočetný myelom je druhý nejčastější typ hematologických malignit, který vzniká transformací a klonální expanzí plazmatických buněk charakterizovaných abnormálním zvýšením monoklonálních imunoglobulinů.

Technologie optického mapování genomu (OGM) představuje pokročilý nástroj pro detekci strukturních variant (SV) a variací počtu kopií (CNV) v celém genomu. OGM překonává omezení tradičních cytogenetických metod tím, že nabízí vyšší rozlišení než karyotypizace a je schopna zkoumat celé genomové spektrum ve srovnání s FISH, a také odhalovat vyvážené chromozomální abnormality, které nejsou detekovatelné pomocí chromozomálních mikročipů (CMA).

Laboratoře IAB se ve spolupráci s klinickými institucemi zaměřili na porovnání účinnosti konvenčních cytogenomických metod s analýzou OGM. Náš studijní soubor tvořilo 10 pacientů s mnohočetným myelomem, u kterých byla k dispozici všechna tradiční cytogenetické vyšetření a optická mapa genomu.

OGM účinně identifikoval většinu cytogenetických abnormalit pozorovaných v rutinní cytogenetice, včetně aneuploidií, hyperdiploidií a strukturálních variant. OGM také detekovalo vyvážené translokace identifikující partnery fusu genů, které nejsou běžně hledány jinými technikami. Navíc OGM prokázala svou schopnost odhalovat další cytogenetické abnormality, zejména komplexní přestavby.

OGM představuje slibný nástroj doplňující limitace konvenčních metod s potenciálem významně zjednodušit laboratorní postupy a zároveň snížit náklady na rutinní diagnostiku. Tato pokročilá technologie může zásadně přispět k lepšímu porozumění biologii onemocnění a k přizpůsobení léčby individuálním potřebám pacientů, čímž se maximalizují terapeutické účinky.

Poděkování: Tento výzkum byl finančně podpořen: MEYS-CZ MUNI/A/1558/2023; MH-CZ RVO_65269705, AZV_NU21-08-00237.

Molekulárně-patologická diagnostika karcinomu GIT asociovaného s Lynchovým syndromem

Brisudová A.^(1,2), Janíková M.^(1,2), Kořínková G.⁽¹⁾, Knillová J.⁽¹⁾, Kučerová L.⁽¹⁾, Kolaříková K.⁽²⁾, Kratochvílová R.⁽²⁾, Šišperová R.⁽²⁾, Punová L.⁽²⁾, Mracká E.⁽²⁾, Slavkovský R.⁽³⁾, Lemstrová R.⁽⁴⁾, Vrtěl R.⁽²⁾, Steigerová, J.⁽¹⁾, Bouchal J.⁽¹⁾

1 Ústav klinické a molekulární patologie

2 Ústav lékařské genetiky

3 Ústav molekulární a translační medicíny

4 Onkologická klinika, FN Olomouc a LF UP Olomouc

Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC), také známý jako Lynchův syndrom, je onemocnění charakterizované zvýšeným rizikem vzniku zhoubných nádorů. Jedná se o autozomálně dominantní onemocnění s vysokou penetrancí. Obvykle je způsoben mutací v tzv. „mismatch repair“ genech, hlavně MLH1, MSH2, MSH6 nebo PMS2 a vzácně také patogenní variantou v genu EPCAM,

bezprostředně sousedící a ovlivňující expresi genu MSH2. Inaktivace těchto proteinů vede k nestabilitě mikrosatelitů (MSI) a ke vzniku a progresi nádorů. U pacientů s Lynchovým syndromem se nádory objevují v mladším věku (40–45 let), nejčastěji kolorektální karcinom. Ženy s Lynchovým syndromem mají také zvýšené riziko karcinomu endometria a vaječníků.

KAZUISTIKA

Tato kazuistika se zabývá rodinnou anamnézou karcinomů gastrointestinálního traktu (GIT) napříč generacemi. Proband byl diagnostikován s ca tlustého střeva (T3, N2, M0) ve věku 38 let a ca střeva s metastázami v játrech ve 43. Jeho sestra a maternální teta byly diagnostikovány s karcinomem GIT a sestřenice s karcinomem ovaria a později s uroteliárním karcinomem. Při opakovaných případech karcinomu GIT v rodině se doporučuje genetické vyšetření, zejména při podezření na Lynchův syndrom.

U pacienta byl histologicky diagnostikován metastazující adenokarcinom tlustého střeva. Fragmentační analýza odhalila mikrosatelitní instabilitu (MSI) a následně bylo zahájeno vyšetření hereditárních nádorových syndromů. Mutační analýza více než 200 genů (panel CZEKANCA, Roche) byla provedena metodou sekvenování nové generace (NGS), přičemž větší přestavby genů EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6 a PMS2 byly analyzovány metodou MLPA.

ZÁVĚR

U probanda byl diagnostikován adenokarcinom střeva s vysokou mikrosatelitní nestabilitou (MSI-H). U probanda a členů rodiny s pozitivní onkologickou anamnézou byla identifikována pravděpodobně patogenní varianta v genu MSH2 (NM_000251.2:c.1815_1817delTGT, p.Val606del, rs267607978). Tato varianta nebyla nalezena u zdravého syna a dcery probanda a zdravé maternální neteře, což naznačuje její roli v rodinné predispozici k nádorům GIT. Segregační analýza tedy naznačuje, že nalezení této pravděpodobně patogenní varianty objasňuje příčinu výskytu nádorů GIT v rodině. V rámci prevence CRC je u pacientů s Lynchovým syndromem doporučený pravidelný screening.

Tato práce byla podpořena grantem LF_2025

Předoperační detekce patogenních variant u dětí a adolescentů

Čillíková O.⁽¹⁾, Kuklíková V.⁽¹⁾, Čarková J.⁽¹⁾, Vyhnalová K.⁽¹⁾, Václavíková E.⁽¹⁾, Bulanová B.⁽¹⁾, Mastníková K.⁽¹⁾, Rodová M.⁽¹⁾, Novák Z.⁽²⁾, Pačesová P.⁽²⁾, Jiskra J.⁽³⁾, Včelák J.⁽¹⁾, Bendlová B.⁽¹⁾

1 Oddělení molekulární endokrinologie, Endokrinologický ústav, Praha

2 Oddělení klinické endokrinologie, Endokrinologický ústav, Praha

3 III. interní klinika – klinika endokrinologie a metabolismu, VFN v Praze a 1. LF UK, Praha

ÚVOD:

V posledních letech stoupá incidence nádorů štítné žlázy u dětí a adolescentů. Tyto nádory vykazují v porovnání s dospělými pacienty agresivnější projev, vyšší invazivitu a tendenci metastazovat. Molekulárně genetická analýza aspiračních biopsií tenkou jehlou (FNAB) je efektivním nástrojem pro přesnější diagnostiku uzlů štítné žlázy. Cílem studie bylo detekovat patogenní varianty v souboru dětí a adolescentů.

SOUBOR A METODIKA:

Analyzováno bylo 145 vzorků FNAB od pacientů ve věku 6–20 let klasifikovaných beth I-VI, u kterých byla nejprve pomocí alelicky specifické sondy vyšetřena varianta V600E v 15.exonu BRAF genu – nejčastější genetická změna papilárního karcinomu (PTC). U pacientů s detekovanou variantou V600E v BRAF genu byly následně vyšetřeny varianty C228T a C250T v promotoru genu TERT pomocí Real-Time PCR a u negativních pacientů bylo po cytologickém vyšetření a domluvě s ošetřujícím lékařem provedeno vyšetření dalších genů prostřednictvím masivně paralelního sekvenování nebo kapilární sekvenace. Pacienti bez detekované varianty ve vyšetřovaných genech byly dále analyzováni na přítomnost fúzních genů (ALK, BRAF, GLIS3, NTRK1, NTRK3, PPARG, RET) pomocí Real-Time PCR.

VÝSLEDKY:

Celkem byly zachyceny patogenní varianty u 38 pacientů - 9 v genu BRAF, 7 v genech RAS (1 HRAS, 1 KRAS a 5 NRAS), 11 fúzních genů (1 TPM3/NTRK1, 3 ETV6/NTRK3, 1 RET/PTC3, 5 RET/PTC1, 1 EML4/ALK), 4 v genu TSHR a u 7 pacientů v genu DICER1, přičemž u 3 pacientů byla detekována zárodečná i somatická varianta v genu DICER1. Informace o pooperačním histologickém vyšetření byly k dispozici u 26 % pacientů (37/145).

ZÁVĚR:

Předoperační molekulárně genetická analýza je důležitá nejen u dospělých, ale také u pediatrických pacientů. Zatímco mutace BRAF V600E a fúzní geny jsou spojeny s vysokým rizikem malignity a je u nich doporučována totální tyreidektomie, mutace v RAS genech mají riziko malignity nižší a je u nich doporučována spíše lobektomie. Zárodečné mutace v genu DICER1 jsou spojeny s DICER1 syndromem, který predisponuje k rozvoji různých nádorů již od dětského věku.

Podpořeno z AZV NU21-01-00448 a MZ ČR RVO 00023761.

Klinický exom v prenatalní diagnostice

Durcová L.⁽¹⁾, Vránová T.⁽¹⁾, Nikulenkov Grochová D.⁽¹⁾, Hiemerová M.⁽¹⁾, Dobšáková Z.⁽¹⁾, Michenková A.⁽²⁾, Vlašín P.⁽²⁾, Kadlecová J.⁽¹⁾

1 Cytogenetická laboratoř Brno, Brno

2 Centrum prenatalní diagnostiky, Brno

Úvod:

Sekvenování klinického exomu (CES) je NGS metoda zaměřující se na analýzu klinicky významných genů asociovaných s různými dědičnými onemocněními. V roce 2023 naše laboratoř zařadila do standardních prenatalních vyšetření exomové sekvenování (CES), zaměřené na TRIO mutační analýzu genů souvisejících s konkrétním ultrazvukovým nálezem u plodu.

Metody:

Pro přípravu knihoven používáme KAPA HyperCap Heredity Panel (Roche). Sekvenace následně probíhá na sekvenátoru NextSeq 1000 (Illumina) a k analýze NGS dat využíváme nástroj Varsome Clinical, kde za pomoci terminologie HPO selektujeme geny asociované s fenotypem plodu.

Výsledky:

Od roku 2023 bylo vyšetřeno CES analýzou 90 probandů, s 20% záchytem patogenní či pot. patogenní varianty asociované s fenotypem probanda. Presentujeme zde kazuistiku rodiny s familiárním výskytem VVV CNS popsáným u plodů ze 3 gravidit. TRIO analýzou byla detekována kauzální mutace v genu COL4A1.

Závěr:

Pro vyhodnocování dat získaných exomovým sekvenováním se jako klíčový faktor ukazuje detailní popis fenotypu probanda, stejně jako rodinných příslušníků. A z toho vyplývá důležitost spolupráce pacienta při sdělování přesných informací týkajících se zdravotního stavu a zároveň nezastupitelná role klinického genetika a dalších specialistů z lékařských oborů.

V dnešní době celoexomového a celogenomového sekvenování má klinický exom stále své místo.

Moderní přístupy v klinické cytogenomice: úloha optického mapování genomu a sekvenování s dlouhým čtením při detekci strukturní variability u pacientů s neurovývojovým onemocněním

Dynková H., Filková H.^(1,3), Režný D.^(1,2), Štolfa M.⁽¹⁾, Hladílková E.^(1,2,3), Réblová K.⁽¹⁾, Gailliová R.⁽³⁾, Šoukalová J.⁽³⁾, Kuglík P.^(1,2), Vallová V.^(1,2)

1 Centrum molekulární biologie a genetiky, FN Brno

2 Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno

3 Ústav lékařské genetiky a genomiky, FN Brno

Strukturní variabilita (SV) genomu je jednou z hlavních příčin lidských genetických onemocnění. Její detekce v klinické praxi je stále založena na tradičních metodách klasické a molekulární cytogenetiky, které ale často nedokážou přesně určit zlomová místa u translokací, inverzí nebo detekovat komplexní cytogenetické přestavby. V posledních letech se však objevily nové technologie založené na analýze dlouhých molekul DNA, které by mohly tato omezení překonat.

Zaměřili jsme se na porovnání optického mapování genomu (OGM) a sekvenování genomu s dlouhým čtením (LR-WGS, Oxford Nanopore Technologies) pro detekci SV u pacientů s neurovývojovými poruchami (NDD). Hlavním cílem bylo posoudit účinnost, přesnost a praktickou použitelnost obou metod v klinické praxi a porovnat jejich výsledky s předchozími cytogenetickými analýzami.

Diagnostický potenciál těchto metod byl testován u pěti pacientů s komplexní nebo nedořešenou chromozomovou přestavbou. Obě metody byly schopny detekovat všechny předtím reportované genetické změny. OGM se ukázalo jako účinnější pro počáteční screening díky nižšímu počtu detekovaných variant a jasnější vizualizaci výsledků. LR-WGS byla přesnější při určování přesných míst zlomů a detailnější v charakterizaci genů zapojených do přestaveb. Generovala však rozsáhlé množství dat, což ztěžovalo analýzu a interpretaci.

Naše výsledky naznačují, že kombinace OGM pro rychlý screening a LR-WGS pro podrobnou analýzu SV může být optimálním diagnostickým přístupem. Pro efektivnější zpracování a interpretaci dat LR-WGS je však zapotřebí další vývoj analytických nástrojů.

Podpořeno Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, grant OP JAK ACGT2 CZ.02.01.01/00/23_020/0008555 a Masarykovou univerzitou, Česká republika. Všechna práva vyhrazena.

Geny s výskytem patogenních variant v souboru pacientů s epilepsií, epileptickými syndromy a neurovývojovými onemocněními

Jeřábková B.⁽¹⁾, Soukup Vodičková M.^(1,2), Zídková J.⁽¹⁾, Réblová K.⁽¹⁾, Pouchlá S.⁽¹⁾, Fajkusová L.^(1,2)

1 Centrum molekulární biologie a genetiky, FN Brno

2 Národní centrum pro výzkum biomolekul, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno

Epilepsie je neurologické onemocnění charakterizované opakujícími se neprovokovanými záchvaty způsobenými nadměrnou elektrickou aktivitou mozku. Záchvaty často představují jeden z projevů závažnějších onemocnění, včetně epileptických syndromů a neurovývojových onemocnění.

Molekulárně genetická diagnostika je v Centru molekulární biologie a genetiky prováděna metodou masivní paralelní sekvenace panelu 623 genů nebo metodou celoexomové sekvenace (WES). Bioinformatická analýza je zaměřena na detekci variant malého rozsahu i rozsáhlých delecí/duplikací.

Analýza souboru 320 nepříbuzných pacientů s pozitivní genetickou diagnózou odhalila patogenní/pravděpodobně patogenní varianty v 96 různých genech. Největší zastoupení variant jsme očekávaně zaznamenali v genech kódujících napěťově řízené iontové kanály (SCN1A, KCNQ2, CACNA1A a další) a ligandem řízené iontové kanály (GABRRG2, GRIN2A, KCNT1 a další). Kromě toho jsme detekovali varianty v řadě dalších funkčních skupin genů, včetně těch zapojených do mTOR signalizační dráhy nebo synaptické regulace.

Genetická diagnostika je zásadní pro odhalení příčin epilepsií, epileptických syndromů a neurovývojových onemocnění. Naše výsledky ukazují genetickou heterogenitu uvedených onemocnění a zdůrazňují význam genetického testování pro přesnější diagnostiku, predikci vývoje onemocnění a potenciální cílenou terapii.

Využití celoexomového sekvenování při analýze genetických příčin abortu

Grošup Friedová N.^(1,2), Tajtlová J.⁽¹⁾, Kejkulová R.⁽¹⁾, Bradová M.⁽¹⁾, Langová M.⁽¹⁾

1 Oddělení lékařské genetiky, FTN Praha

2 Ústav biologie a lékařské genetiky, 1. LF UK a VFN v Praze

Rekurentní těhotenská ztráta (RPL, recurrent pregnancy loss) je definována nejméně dvěma těhotenskými ztrátami před 20. týdnem těhotenství. Dle mezinárodních studií přibližně 5 % těhotných párů prodělá idiopatickou RPL. Rekurentní těhotenská ztráta je heterogenní onemocnění s různými příčinami, včetně hormonálních či genetických.

Celoexomové sekvenování (WES) může být zásadním přínosem v diagnostice genetické příčiny opakovaných reprodukčních ztrát, u nichž nebyla běžně užívanými metodami (QF PCR, array CGH, příp. stanovení karyotypu) nalezena genetická příčina abortu a současně přetrvává klinické podezření, že příčina měla genetický podklad. Z tohoto důvodu byla tato analýza zahrnuta do našeho workflow u vyšetření produktů koncepce. K vyšetření je využívána tkáň plodu, pacientky s vyšetřením sepisují informovaný souhlas.

Mezi lety 2022–2024 bylo na Oddělení lékařské genetiky FTN vyšetřeno celkem 52 produktů koncepce. Metodou QF-PCR byla nalezena příčina abortu u 11 vyšetřovaných případů. Vyšetření array CGH bylo následně provedeno u 35 produktů koncepce s možnou souvislostí s abortem u 10 vyšetřovaných vzorků. Metodou WES bylo analyzováno 11 vzorků. Šest vzorků muselo být z analýzy vyřazeno z důvodu maternální kontaminace. V budoucnu plánujeme reanalýzu dat získaných metodou WES s ohledem na aktuální klasifikaci variant a nově zjištěné skutečnosti.

V posteru uvádíme zkušenosti našeho pracoviště se využívání metody WES při detekci příčin RPL. Výsledky vyšetření nám přináší nejen cenné informace ohledně příčiny abortu, ale mají rovněž i důležitý přínos pro plánování další reprodukce páru.

Pokročilé cytogenomické techniky v diagnostice CNVs u pacienta s neurovývojovým onemocněním: význam optického mapování a sekvenování s dlouhým čtením.

Kazuistika.

Hladílková E.^(1,2,3), Štolfa M.⁽¹⁾, Dynková Filková H.^(1,3), Režný D.⁽²⁾, Réblová K.⁽¹⁾, Beharka R.⁽³⁾, Šoukalová J.⁽³⁾, Kuglík P.^(1,2), Vallová V.^(1,2)

1 Centrum molekulární biologie a genetiky, FN Brno

2 Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno

3 Ústav lékařské genetiky a genomiky, FN Brno

Význam variant počtu kopií (CNVs) v patogenezi různých onemocnění je nesporný. Zlatým standardem pro detekci CNVs v celém genomu je chromozomální microarray (CMA). Nově se však objevují cytogenomické techniky, jakým je optické mapování genomu (OGM) nebo celogenomové sekvenování s dlouhým čtením (LR-WGS), které mají značný potenciál nejen pro detekci strukturních variant, ale i pro jejich detailnější analýzu.

V této kazuistice jsme porovnali detekci CNVs u pacienta s neurovývojovým onemocněním pomocí tří různých metod: CMA (Agilent Technologies), OGM (Bionano Genomics) a LR-WGS (Oxford Nanopore Technologies). Naším cílem bylo posoudit přesnost a spolehlivost těchto metod při identifikaci CNVs v porovnání se zavedeným standardem CMA.

Analýza pomocí CMA identifikovala rozsáhlou delecí a duplikaci na chromozomu 12. Jedná se o duplikaci oblasti 12p13.31p12.1 o velikosti cca 16,7 Mb doprovázenou delecí oblasti 12p12.1p11.23 o velikosti cca 2,4 Mb. Detekované CNVs byly následně potvrzeny metodami OGM i LR-WGS. OGM, díky své schopnosti vytvářet optické mapy genomu, umožnila identifikaci struktury chromozomální přestavby s vysokým rozlišením. LR-WGS pak poskytlo velmi podrobný pohled na identifikovanou přestavbu, s preciznějším určením koordinát CNVs a hlubší analýzu dopadů na geny v oblasti změn.

OGM a LR-WGS představují pokročilé metody s velkým potenciálem pro detekci CNVs v klinické praxi. Je však nutné zohlednit omezení těchto metod, jakými jsou vyšší náklady, technická a časová náročnost analýz a pečlivě zvážit jejich zařazení do diagnostických algoritmů pro dosažení optimálního klinického využití.

Podpořeno Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, grant OP JAK ACGT2 CZ.02.01.01/00/23_020/0008555 a Masarykovou univerzitou, Česká republika. Všechna práva vyhrazena.

Rok s WESem

Chvojka Š., Dohnalová L., Hrabíková M., Král J., Zembol F., Šuhajová S., Koudová M., Bittóová M.

GNTlabs by Gennet, Praha

Exomové sekvenování (Whole Exome Sequencing, WES) je pokročilá metoda genetické analýzy zaměřená na kódující oblasti genomu. Tato technologie se široce využívá v klinické genetice, onkologii a reprodukční medicíně, kde umožňuje identifikaci patogenních variant spojených s dědičnými a vrozenými onemocněními. Pomáhá k lepšímu pochopení genetických příčin nemocí, přesnější diagnostice a personalizované léčbě. Díky WES lze odhalit vzácné mutace, což je klíčové pro cílenou terapii a genetické poradenství.

V laboratoři GNTLabs jsme v roce 2024 implementovali WES s využitím automatizovaného systému CyBio Felix (Analytik Jena) pro přípravu knihoven, což nám umožňuje zpracovat 192 vzorků týdně. Sekvenování probíhá na platformě NovaSeq X Plus na flowcelle 10B (Illumina). Bioinformatická analýza je prováděna kombinací aplikace Franklin (Genoox) a našimi in-house bioinformatickými skripty. Dle indikace pacienta se můžeme díky virtuálním panelům zaměřit na konkrétní výčet genů, příkladem může být onkologický panel CZEKANCA, Carrier Test pro rodiče zakládající rodinu nebo samotné hodnocení exomu při specifické diagnóze, a mnoho dalšího.

Během jednoho roku jsme zpracovali 11 329 vzorků, z toho 2447 v rámci panelu CZEKANCA, 8079 v Carrier testu a 803 pacientů indikovaných na exomové vyšetření. Díky WES jsme kromě cílené diagnostiky mohli pacientům vyhodnotit i sekundární a incidentální nálezy, což rozšiřuje klinickou využitelnost této technologie ve srovnání s panelovým sekvenováním.

Zavedení WES do rutinní diagnostiky nám umožnilo efektivně analyzovat genetické predispozice pacientů. Klíčovou výhodou této metody je možnost jednorázového sekvenování s dodatečnou analýzou dalších panelů dle aktuálních diagnostických potřeb, což poskytuje flexibilitu v diagnostice a umožňuje zpřesnění klinických závěrů v průběhu času. Tato strategie zvyšuje efektivitu genetického testování a zároveň snižuje nutnost opakovaného sekvenování, čímž šetří čas i náklady.

Dědičná predispozice ke vzniku karcinomu tlustého střeva u pacientů v české populaci

Janatová M.⁽¹⁾, Soukupová J.⁽¹⁾, Kleiblová P.^(1,2), Nehasil P.^(1,3,4), Kleibl Z.^(1,3), CZEKANCA konsorcium

1 Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, 1. LF UK a VFN v Praze

2 Ústav biologie a lékařské genetiky, 1. LF UK a VFN v Praze

3 Ústav patologické fyziologie, 1. LF UK, Praha

4 Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu, 1. LF UK, Praha

Kolorektální karcinom (CRC) je celosvětově druhým nejčastějším nádorovým onemocněním a zůstává významným celosvětovým zdravotním problémem. Přibližně 5–15 % případů CRC je způsobeno zárodečnými patogenními variantami (gPV) v nádorových predispozičních genech. Analýza gPV je nezbytná pro identifikaci jedinců ve vysokém riziku CRC ev. dalších asociovaných tumorů. Provedli jsme genetické testování zárodečné DNA pomocí panelového sekvenování nové generace (NGS) u 2040 českých pacientů s CRC, vyšetřili jsme přítomnost gPV ve 40 nádorových predispozičních genech a porovnali osobní a rodinnou onkologickou anamnézu u nosičů a nenosičů. Studie odhalila významně vyšší frekvenci nosičů gPV mezi pacienty s CRC ve srovnání s populačními kontrolami (331/2040; 16,2 % vs. 520/6876; 7,6 %; $p=2,3 \times 10^{-31}$). Zejména varianty v genech pro Lynchův syndrom (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) a familiární adenomatózní

polypózu (APC) byly spojeny s výrazně zvýšeným rizikem vzniku CRC. gPV v těchto genech se významně častěji vyskytovaly u indikovaných než u neindikovaných pacientů (92/839; 10,9 % vs. 35/1201; 2,9 %; $p=2,6 \times 10^{-13}$). Kromě toho byli identifikováni nosiči gPV v dalších nádorových predispozičních genech, spojených především s dědičným syndromem karcinomu prsu a ovaria (BRCA1, BRCA2, CHEK2, ATM, PALB2, RAD51C). Jejich frekvence se nelišila mezi indikovanými a neindikovanými pacienty (92/839; 4,6 % vs. 42/1201; 3,5 %; $p=0,2$), ale lišila se od kontrol (161/6875; 2,3 %; $p=0,0001$, resp. $p=0,024$). Studie zdůrazňuje význam komplexního genetického testování pro identifikaci jedinců se zvýšeným rizikem vzniku CRC, u nichž usnadňuje personalizovaný dohled a preventivní opatření.

Podpořeno granty: MZ ČR: RVO-VFN-00064165; Karlova Univerzita: COOPERATIO, SVV260631, UNCE/24/MED/022; MŠMT ČR: Projekt Národní ústav pro výzkum rakoviny (Program EXCELES, ID: LX22NPO5102) – podpořeno Evropskou unií – Next Generation EU.

Joubertovej syndróm: Význam masívneho paralelného sekvenovania (WES) v diagnostike zriedkavých genetických ochorení – kazuistika

Janečková L.⁽¹⁾, Mátyášová K.⁽¹⁾, Brennerová K.⁽²⁾, Hřčková G.⁽²⁾, Skalická K.⁽¹⁾

1 Laboratórium klinickej a molekulovej genetiky Detskej kliniky LFUK a NÚDCH, Bratislava

2 Detská klinika LFUK a NÚDCH, Bratislava

Joubertovej syndróm je zriedkavé geneticky podmienené ochorenie, charakterizované tromi základnými znakmi: (1) obrazom „molar tooth sign“ na MRI mozgu, (2) hypotóniou v dojčenskom veku a následným rozvojom ataxie v neskoršom detstve, a (3) oneskorením psychomotorického vývoja s poruchou intelektu. Okrem týchto príznakov sa v špecifických podtypoch syndrómu môžu vyskytovať aj ochorenia obličiek (napr. nefronoftíza) a fibróza pečene.

Prezentujeme kazuistiku probanda (nar. 2019) s oneskoreným psychomotorickým vývojom a hypotóniou. V čase diagnózy (2020) mal negatívne EMG/MRI vyšetrenie a nevykazoval numerické ani štrukturálne imbalancie genómu (karyotyp, array CGH). V roku 2023 sa pri ultrazvuku brucha objavil nefrologický nález mikrocýst. Na základe týchto nálezov bola indikovaná genetická diagnostika s podozrením na ciliopatiu alebo kongenitálnu poruchu glykozylácie typu Ia.

Pomocou masívneho paralelného sekvenovania (WES) sme identifikovali dva varianty génu TMEM67: patogénny variant NM_153704.6:c.1843T>C(p.Cys615Arg) a variant nejasného významu NM_153704.6:c.2239C>G(p.Gln747Glu). Segregačná analýza (Sangerovo sekvenovanie) potvrdila, že tieto varianty segregujú od rodičov probanda v trans-konfigurácii. Gén TMEM67 je kľúčovým génom asociovaným s Joubertovej syndrómom (JBTS6, MIM:610688), ktorý je často spojený s postihnutím pečene a obličiek. Genetický nález je v súlade s obrazom MRI mozgu, ktorý v roku 2024 ukázal „molar tooth sign“, čo nasmerovalo diagnostiku na autozomálne recesívnu formu Joubertovej syndrómu.

Nález variantov TMEM67 v trans-konfigurácii prispel k objasneniu genetickej príčiny symptómov probanda. Naša kazuistika potvrdzuje, že diagnostika zriedkavých genetických ochorení môže trvať niekoľko rokov, najmä v prípadoch bez jednoznačnej syndromologickej asociácie. WES predstavuje účinný nástroj na skrátenie diagnostickej odysey a významne prispieva k multidisciplinárnemu prístupu k diagnostike zriedkavých genetických ochorení na našom pracovisku.

Evaluation of quality of WGS and WES results using the validated protocols

Kvapilová K.^(1,2), Mišenko P.⁽³⁾, Radvanszký J.⁽³⁾, Budiš J.⁽³⁾, Gazdarica J.⁽³⁾, Pos O.⁽³⁾, Korabečná M.⁽⁴⁾, Kašný M.⁽¹⁾, Szemeš T.⁽³⁾, Kvapil P.⁽¹⁾, Paces J.⁽⁵⁾, Kozmik Z.⁽⁶⁾

1 Institute of Applied Biotechnologies a.s., Prague

2 Charles University, Faculty of Science, Prague

3 Geneton s.r.o., Bratislava

4 Institute of Biology and Medical Genetics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague

5 Institute of Molecular Genetics of the Czech Academy of Sciences, Laboratory of Genomics and Bioinformatics, Prague

6 Institute of Molecular Genetics of the Czech Academy of Sciences, Laboratory of Transcriptional Regulation, Prague

Whole exome sequencing (WES) and whole genome sequencing (WGS) are standards in human clinical diagnostics and population genomics. We evaluated the quality and genotype concordance of single nucleotide variants (SNVs) and small insertions/deletions (indels) in paired blood and saliva genomic DNA (gDNA) isolates for WES and WGS protocols using reference-validated protocols.

The NIST standard Coriell NA12878 was repeatedly sequenced to validate WGS and WES protocols. NA12878 data calls were compared to the truth dataset published by the Genome in a Bottle Consortium. A paired comparison of blood-derived gDNA and saliva-derived gDNA was performed for SNVs and indels for both, WES and WGS. The level of genotype concordance was studied using ACMG SF v 3.2. gene set in two settings: exonic regions only/complete genes.

The F1 score of ten paired blood-saliva samples range between 0.8030-0.9998 for SNVs and between 0.8883-0.9991 for indels in the WGS, and between 0.8643-0.999 for SNVs and between 0.7781-1.000 for indels in WES. The quality pattern of called variants obtained from genomic-reference-based technical replicates correlates with data calls of paired blood-saliva-derived samples in all levels of tested examinations.

The resulting data shows a clear advantage of the WGS approach over WES; especially for indels analysis while confirming no significant differences between blood and saliva samples.

Funding: This research was supported by Operational Programme Integrated Infrastructure for the project ITMS: 313021BUZ3 (USCCCORD) co-financed by the European Regional Development Fund. Grant IMPAKT no. VJ01010123 provided by the Ministry of Interior of the Czech Republic.

Krátký prolog pro dlouhá čtení (v rutinní diagnostice)

Hirschfeldová K.^(1,2), Doubková K.^(1,2), Šenkyřík P.^(1,2), Hrachovský O.⁽²⁾, Obeidová L.^(1,2)

1 Ústav biologie a lékařské genetiky, Laboratoř molekulární diagnostiky, VFN v Praze

2 Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK, Praha

Přestože za poslední dekádu došlo k bouřlivému rozvoji nových metod sekvenace DNA, které výrazně posunuly možnosti diagnostiky dědičných onemocnění, stále zůstávají oblasti, kde samotná povaha aberace genetické informace činí její rutinní diagnostiku obtížnou, nebo nemožnou. Jedním ze způsobů, jak překlenout problémy při analýze takových aberací, je využití sekvenace založené na technologii dlouhého

čtení. Naším cílem bylo otestovat vhodnost technologie dlouhého čtení od firmy Oxford Nanopore Technologies (ONT) a stanovit optimální laboratorní postupy pro sekvenování v rutinních podmínkách klinické laboratoře.

S ohledem na kompaktnost a cenovou dostupnost jsme si pro testování nanopórového sekvenování vybrali přenosný sekvenátor MinION™ Mk1B. Jako pilotní oblasti testování jsme zvolili genomické lokusy c9orf72, GBA, PKD1, SMN1, TPSAB1. Rutinní diagnostika právě těchto oblastí může být komplikována vysokou homologií pseudogenů nebo genových duplikátů, tvorbou fúzních genů nebo rozsáhlou expanzí krátkých repetit.

Navzdory doporučení jsme si vytvořili knihovny ze směsi ampliconů s výrazným délkovým rozpětím (1–28 kb) a porovnali rovnoměrnost pokrytí všech zahrnutých ampliconů. Vzhledem k přítomnosti velkého množství oligonukleotidových primérů v ampliconových směsích jsme vyzkoušeli postupy s a bez jejich enzymatického odstranění a výstupní data porovnali. Otestovali jsme rovněž „adaptive sampling“ pro rovnoměrnější pokrytí indexů jednoho běhu, životnost flowcell, možnosti jejich opakovaného použití i požadavky na bioinformatické zpracování dat. Zvážili jsme rovněž časovou a technickou náročnost přípravy knihovny a vlastní sekvenace.

Nanopórové sekvenování lze, dle našich zkušeností, zavést s relativně nízkými náklady do provozu rutinní laboratoře. Software Epi2Me určený pro analýzu dat dodávaný výrobcem je dostačující a uživatelsky přívětivý i pro pracoviště bez vlastního bioinformatického zázemí. ONT přístup je velmi flexibilní a robustní, nicméně z hlediska provozních nákladů, rentability vyšetření a relativně krátké životnosti flowcell, je potřeba provádět vyšetření v dostatečně velkém počtu účtovatelných vzorků, což může být překážkou v případě statimových vyšetření.

Studie hrazena z interního grantu VFN GIP-24-NL-06-880.

Vyhodnocení genomických TRIO dat u endemického parkinsonismu

Kolaříková K.^(1,2), Vodička R.^(1,2), Radek Vrtěl, R.^(1,2), Menšíková K.⁽³⁾, Procházka M.^(1,2), Kaňovský P.⁽³⁾

1 Ústav lékařské genetiky, FN Olomouc

2 Ústav lékařské genetiky LF UP v Olomouci

3 Neurologická klinika FN Olomouc a LF UP v Olomouci

Úvod

Parkinsonismus patří mezi častá neurodegenerativní onemocnění. Na základě naší předchozí epidemiologické studie jsme popsali vyšší prevalenci tohoto onemocnění na Horňácku (oblast jihovýchodní Moravy).

Cíle studie

- 1) vybrat vhodné a dostupné vzorky pro WGS
- 2) provést WGS u vybraných jednotlivců
- 3) vyhodnotit nalezené genetické varianty pomocí Varsome Clinical

Metody

Celogenomové sekvenování (platforma Illumina) bylo provedeno u 5 trií. Nalezené varianty byly filtrovány s ohledem na jejich frekvenci v populaci <0,1% (MAF-frekvence minoritní alely), klasifikace varianty dle databáze ClinVar a dále s ohledem na fenotyp (geny asociované s parkinsonismem).

Výsledky

V rámci každého tria jsme našli kolem 7 milionů variant, z toho 300 000 z nich je v exonových a sestřihových oblastech. V této studii nebyla nalezena žádná kauzální varianta. Nicméně bylo nalezeno několik zajímavých (vzácných a souvisejících s fenotypem) variant.

Závěr: Výsledky studie genetického pozadí parkinsonismu u izolované populace naznačují, že rizikovým faktorem by mohla být kumulace více rizikových genetických faktorů. Pro ověření vlivu variant by bylo vhodné provést rozsáhlejší populační studii a funkční analýzu.

Tato práce byla podpořena grantem MZ ČR – RVO (FNOL, 00098892)

CODAS syndróm

Krajčovičová V.⁽¹⁾, Požgayová S.⁽¹⁾, Hamidová O.⁽²⁾, Skalická K.⁽¹⁾, Ilčík M.⁽³⁾, Kunová N.⁽⁴⁾, Kutejová E.⁽⁴⁾

1 Laboratórium klinickej a molekulovej genetiky, Detská klinika LF UK a NÚDCH, Bratislava

2 Ambulancia lekárskej genetiky, Detská klinika LF UK a NÚDCH, Bratislava

3 Rádiodiagnostické oddelenie NÚDCH, Bratislava

4 Ústav molekulárnej biológie SAV, Oddelenie biochémie a štruktúry proteínov, Bratislava

CODAS syndróm je vzácne multisystémové genetické ochorenie spôsobujúce vývojové anomálie na úrovni mozgu, očí, zubov, uší a skeletu (MIM:600373). V roku 2015 bol objasnený genetický pôvod fenotypu tohto syndrómu identifikáciou bialelických patogénnych variantov v géne LONP1. LONP1 kóduje Lon proteázu, mitochondriálny homoexamérny enzým, ktorého hlavnou úlohou je selektívna degradácia mitochondriálnych proteínov, čím udržiava celkovú homeostázu mitochondrií. Incidencia CODAS syndrómu je celosvetovo menšia ako 1: 100 000 000 postihnutých jedincov. Klinické prejavy nastupujú už v ranom detstve, pričom ich prítomnosť a závažnosť sa u jednotlivých pacientov môže odlišovať. Spoločným fenotypovým znakom všetkých doteraz popísaných prípadov je však prítomnosť katarakty a epifýzálnej hypoplázie.

Celoexómovým sekvenovaním (WES) sme identifikovali dva DNA varianty v géne LONP1 u dnes 10-ročného chlapca s ptózou ľavého viečka, užšou očnou štrbinou a hypermetropiou, dyspláziou ľavej ušnice, výraznými epikantami, naznačenou syndaktýliou 2-3 prsta na nohe, ľahkým axiálnym hypotonusom, miernou poruchou reči a slabým koreňom jazyka. Rast je na spodnej hranici normy. Zo skeletálnych abnormalít bola sledovaná pomalšia osifikácia jadierok a v 6. roku života výrazná extrarotácia pravej nohy a patologické zmeny v oblastiach oboch epifýz femurov, výraznejšie vľavo so známkami nekrózy hlavy femuru so znížením výšky a bez známky sekundárnej dysplázie.

V práci prezentujeme kazuistiku pacienta s CODAS syndrómom ako extrémne zriedkavú skeletálnu dyspláziu vyplývajúcu z poruchy na úrovni mitochondrií a poukazujeme na variabilitu klinických prejavov tohto ochorenia. V spolupráci so Slovenskou akadémiou vied tiež prezentujeme funkčnú analýzu mutácií Lon proteázy potvrdených u pacienta.

Práce je podpořená Štipendiem pre excelentných výskumníkov a výskumničky R2 – hLON CODASS – 09I03-03-V04-005580. Financované Európskou úniou z prostriedkov Plánu obnovy a odolnosti SR.

Případové studie diagnostického hodnocení celoexomových dat za použití aplikace Franklin Genoox

Král J., Honysová B., Hrabíková M., Chvojka Š., Soldatová I., Svatoň J., Zembol F., Bittóová M., Koudová M.

GNTlabs by Gennet, Praha

Úvod: V naší laboratoři provádíme hodnocení celoexomového sekvenování za použití platformy Franklin Genoox. Franklin představuje vhodný nástroj pro hodnocení exomových dat, jelikož prioritizuje relevantní varianty na základě fenotypu, který mu je zadán ve standardizované formě jako HPO termíny.

Materiál a metody: Sekvenujeme celý exom za použití panelu Exome 2.0 VCGS (Twist Bioscience) a sekvenátoru NovaSeq X Plus (Illumina). Primární analýza je prováděna softwarem DRAGEN (FPGatechnology) a sekundární a terciální analýza pomocí platformy Franklin (Genoox). Vyhodnocovací proces se zaměřuje na geny spojené s fenotypem zadaným pomocí HPO termínů. Franklin integruje data z populačních a klinických databází a z publikované literatury. Franklin zároveň využívá umělou inteligenci pro selekci relevantních genetických variant, stejně jako automaticky navrhuje klasifikaci na základě ACMG kritérií. Vyhodnocujeme jak SNP, tak CNV varianty. Reportujeme sekundární nálezy dle doporučení ACMG, včetně patogenních variant pro deset recesivních onemocnění, která jsou běžná v naší populaci.

Výsledky: Pomocí celoexomového sekvenování jsme vyhodnotili 276 případů, které zahrnovaly 72 prenatalních a 204 postnatalních případů. Většina prenatalních případů byly trio analýzy indikované na základě zvýšené nuchální translucence nebo vrozené vývojové vady. Genetickou příčinu jsme identifikovali ve 14 % prenatalních a 24 % postnatalních případů.

Závěr: Úspěšné nalezení kauzální varianty je nižší u prenatalních exomových případů než u postnatalních, což je pravděpodobně způsobeno tím, že postnatalní fenotyp je možné popsat s vyšší mírou specifiity. Rádi bychom vám představili některé zajímavé kazuistiky z našeho diagnostického exomového sekvenování.

Detekce CNV u pacientů s dědičným srdečním onemocněním pomocí sekvenování nové generace

Kramářová T.⁽¹⁾, Zídková J.⁽¹⁾, Beharka R.⁽²⁾, Novotný T.⁽³⁾, Fajkusová L.⁽¹⁾

1 Centrum molekulární biologie a genetiky, FN Brno

2 Ústav lékařské genetiky a genomiky, FN Brno

3 Interní kardiologická klinika, FN Brno

Varianty v počtu kopií (copy number variant – CNV), včetně delecí a duplikací exonů, se významně podílejí na patogenezi různých genetických onemocnění. Tyto strukturální změny mohou narušit regulaci, funkci nebo množství genů a následně proteinů, což vede k širokému spektru onemocnění, zahrnujících rovněž kardiomyopatie a arytmogenní syndromy. Pokrok v technologiích genetického testování, zejména sekvenování nové generace, vedl ke zdokonalení detekce CNV, a tím k určení genetické diagnózy u většího množství pacientů a zhodnocení rizik.

Naše studie vychází z dat cíleného sekvenování genů spojených s dědičným srdečním onemocněním a bioinformatické analýzy pro detekci malých genových variant a CNV.

Prezentujeme genetické nálezy u našeho souboru českých pacientů s kardiomyopatiemi a arytmogenními syndromy. Patogenní nebo pravděpodobně patogenní varianty byly identifikovány u 104 nepříbuzných pacientů (26,3 %). CNV - konkrétně delece celých exonů v rámci genů - byly zjištěny u 4 pacientů v genech JUP, NEXN, RYR2 a SNTA1. V literatuře byly doposud popsány pouze delece zahrnující celý gen NEXN, my jsme však u pacienta se srdečním selháním v kojeneckém věku zjistili novou deleci zahrnující 2. - 5. exon v homozygotním stavu. Tento nálezy rozšiřuje spektrum pacientů s autozomálně recesivní dědičností v genu NEXN. Současně delece exonů v genech JUP a SNTA1 nebyly prozatím vůbec popsány.

Identifikace nových CNV v genech JUP, NEXN a SNTA1 rozšiřuje naše znalosti o genetických příčinách dědičných srdečních onemocnění. Tyto výsledky zdůrazňují význam komplexního genetického testování, včetně analýzy CNV, pro zvýšení přesnosti diagnostiky a zlepšení péče o pacienty.

Studie byla podpořena grantovým projektem Ministerstva zdravotnictví České republiky – NU22-02-00348.

Vyšetření klonální přestavby u lymfoproliferativních onemocnění

Kryštofová H.^(1,2), Bovová N.⁽¹⁾, Kudrejová M.⁽¹⁾, Židlík V.⁽¹⁾, Škarda J.^(1,2)

1 Ústav molekulární a klinické patologie a klinické genetiky, FN Ostrava

2 Ústav klinické a molekulární patologie, LF UP v Olomouci

Úvod:

Lymfoproliferativní onemocnění představují heterogenní skupinu malignit vycházejících z B a T lymfocytů, případně NK buněk. Klonální přestavby imunoglobulinových (IgH, IgK, IgL) a T – buněčných receptorových genů hrají klíčovou roli v patogenezi nemoci, ale také v diagnostice a monitorování těchto onemocnění. Molekulární analýza klonálních přestaveb umožňuje přesnou identifikaci maligní populace, hodnocení minimální zbytkové nemoci, případně sledování klonální evoluce v průběhu léčby. Zásadní význam má při nejednoznačných nálezech nebo atypických případech, kdy běžné histologické a imunohistochemické metody nestačí.

V rámci naší práce, prezentujeme metody detekce klonálních přestaveb, používané na našem pracovišti.

Materiál a metodika:

V roce 2023 a 2024 bylo na našem pracovišti provedeno vyšetření klonální přestavby celkem u 140 pacientů. Analýza je založena na polymerázové řetězové reakci (PCR), kterou se za použití specifických primerů amplifikují určité oblasti genů. Následně po PCR jsou produkty amplifikace tepelně denaturovány (5 min, 95 °C) a následným prudkým ochlazením (4 °C) dochází k indukci homo – nebo heteroduplexní formace. PCR produkty jsou analyzovány pomocí horizontální elektroforézy na polyakrylamidovém gelu (PAA) a fragmentační analýzou na genetickém analyzátoru ABI 3130xl.

Amplifikované produkty elektroforeticky rozdělené na PAA gelu vytvoří u klonální populace ostrý proužek (band), kdežto u polyklonální populace se projeví jako smear složený z fragmentů různých velikostí.

Datové soubory z fragmentační analýzy se vyhodnotí pomocí softwaru GeneMapper 4.0, kdy se určuje velikost fragmentů ve specifickém rozmezí.

Výsledky:

Klonální přestavba imunoglobulinových genů byla zjištěna ve 44 případech, přestavba TCR receptorů byla stanovena u 6 pacientů. Ve dvou případech byla diagnostikována přestavba jak imunoglobulinových, tak TCR receptorů.

Závěr:

Stanovení klonální přestavby je důležité pro diagnostiku lymfoproliferativních onemocnění. Umožňuje upřesnit diagnózu, monitorovat minimální reziduální nemoc nebo sledovat klonální evoluci buněk. Výsledek vyšetření klonální přestavby je vždy nutné korelovat s klinickými a histopatologickými nálezy.

Prenatální záchyt syndromu Rabin-Pappas na podkladě ultrazvukového nálezu

Laštůvková J.⁽¹⁾, Kacerovská I.⁽²⁾, Uhrová Meszárosová A.⁽³⁾, Pecková A.⁽¹⁾, Lišková L.⁽¹⁾, Čejnová V.⁽¹⁾

1 Oddělení lékařské genetiky, Krajská zdravotní, a.s., Masarykova nemocnice v Ústí nad Labem, o.z.

2 Ženské oddělení, Krajská zdravotní, a.s., Nemocnice Most, o.z.

3 Neurogenetická laboratoř, Klinika dětské neurologie, 2. LF UK a FN v Motole, Praha

Úvod:

Syndrom Rabin-Pappas (RAPAS) je velmi vzácné multisystémové onemocnění, které bylo poprvé popsáno v roce 2020. Příčinou onemocnění je specifická heterozygotní missense varianta (R1740W) SETD2 genu. Fenotyp pacientů s patogenní variantou c.5218C>T (p.Arg1740Trp, R1740W) je částečně odlišný od ostatních SETD2 neurovývojových onemocnění (SETD2-NDD). Varianta c.5218C>T je spojena s vyšším výskytem mnohočetných kongenitálních anomálií oproti ostatním SETD2-NDD. Fenotyp RAPAS zahrnuje mikrocefalii, malformace mozku, těžkou intelektovou nedostatečnost s chyběním řeči, neprospívání a široké spektrum orgánových malformací.

Popis případu:

Prezentujeme případ syndromu Rabin-Pappas zachyceného na základě prenatálního ultrazvukového vyšetření. Ke genetickému vyšetření byla odeslána pacientka ve 21. týdnu gravidity pro UZ nález Dandy-Walker malformace u plodu. Kombinovaný screening

1. trimestru i integrovaný screening byl negativní. UZ vyšetření ve 21. týdnu grav. u plodu prokázalo dilataci IV. mozkové komory, parciální agenesi vermis mozečku s jeho abnormální rotací a abnormální držení prstů horních končetin. Rodiče se rozhodli pro ukončení gravidity.

U plodu byl zjištěn normální profil aCGH - arr(X,1-22)x2. Vyšetření klinického exomu u plodu detekovalo heterozygotní patogenní variantu NM_014159.6(SETD2):c.5218C>T (p.Arg1740Trp) de novo.

Závěr:

Náš případ dokumentuje možnost prenatálního záchytu RAPAS a dokládá důležitost spolupráce precizní ultrazvukové diagnostiky s moderními laboratorními metodami (NGS) při objasňování příčin

vzácných závažných poruch vývoje plodu. Jedná se zřejmě o první případ prenatalního záchyty syndromu Rabin – Pappas.

Výsledky externího hodnocení kvality pro kvantitativní vyšetření buněčného chimerizmu za rok 2024

Leontovyčová M., Laštovková H., Přerovská R., Zvolská A., Hvalčáková T., Hrabáková P., Žižková R., Staňková M., Březinová D., Stefflová L.

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

Oddělení buněčného chimerizmu Ústavu hematologie a krevní transfuze organizuje externí hodnocení kvality (EHK) pro kvantitativní vyšetření buněčného chimerizmu již od roku 2005. V roce 2024 se EHK účastnilo 14 laboratoří – 5 českých a 9 ze zahraničí – 4 laboratoře v základní variantě, 10 laboratoří v rozšířené variantě. Nepovinnou část – vyšetření informativity (genotypizace) – zaslalo 7 účastníků. Každý účastník zpracoval vzorky metodami běžně používanými ve své laboratoři. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí mediánu získaných hodnot a směrodatné odchylky. Ta byla poté přepočtena na hodnotu Z-skóre a výsledek rozřazen do jedné z 5 hodnotících kategorií. Celkově bylo 86 % výsledků v kategorii Výborné, 11 % v kategorii Dobré, 0 % v kategorii Akceptovatelné, 0 % v kategorii Kritické a 3 % v kategorii Pod detekční limit laboratoře. Všichni účastníci splnili podmínky úspěšné účasti (dosažení 80% úspěšnosti). Doplnkové kolo nebylo v roce 2024 organizováno. Příští řádné kolo EHK pro oblast kvantitativního vyšetření buněčného chimerizmu po alo-HSCT bude probíhat v první polovině roku 2025 podle obvyklého harmonogramu.

Podpořeno projektem (Ministerstva zdravotnictví ČR) koncepčního rozvoje výzkumné organizace (00023736, ÚHKT).

Diagnosticky opomíjené defekty v nádorových supresorech TP53 a CDKN2A/B negativně ovlivňují prognózu a přežití pacientů s difúzním velkobuněčným B-lymfomem

Marečková A.⁽¹⁾, Navrkalová V.^(1,2), Reigl T.⁽²⁾, Porc J. P.⁽²⁾, Činátlová K.⁽¹⁾, Janíková A.⁽¹⁾, Kotašková J.^(1,2)

1 Interní hematologická a onkologická klinika, FN Brno a LF MU, Brno

2 Centrum molekulární medicíny, Středoevropský technologický institut (CEITEC), Masarykova Univerzita, Brno

Úvod

Difúzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL) je nejčastější ne-Hodgkinův lymfom s heterogenním klinickým průběhem. Zatímco přibližně 60 % pacientů s diagnostikovaným DLBCL dosáhne dlouhodobé remise hned po první linii imunochemoterapie, zbylých cca 40 % pacientů opakovaně relabuje či je refrakterních na léčbu. V posledních letech se s rozmachem sekvenčních metod stále více pozornosti věnuje genetickým změnám, které mohou ovlivnit prognózu a odpověď na léčbu u těchto pacientů. Diagnostickým standardem je imunohistochemické vyšetření zahrnující detekci vybraných proteinů a významných translokací jako je např. BCL2::IGH. Analýza dalších genomických aberací pomocí sekvenování je spíše výjimkou. V naší práci jsme se zaměřili na detekci genetických změn u DLBCL pacientů s velmi krátkou dobou do progresu (PFS<1 rok) s cílem identifikovat defekt, který stojí za agresivitou onemocnění.

Materiál a metody

Vyšetřili jsme DNA izolovanou z uzlin 29 DLBCL pacientů. Tito pacienti byli vyšetřeni pomocí zavedeného NGS panelu LYNX (1), cíleného na analýzu bodových mutací (SNV), chromozomových změn (CNV) a vybraných translokací.

Výsledky

U 12/29 pacientů (41,4 %) jsme detekovali bialelický defekt (mutace/delece) nádorového supresoru TP53 a u dalších 6 pacientů (20,7 %) jsme detekovali pouze del17p. 8/29 pacientů (27,6 %) mělo bialelický defekt dalších nádorových supresorů CDKN2A/CDKN2B. V sedmi případech se jednalo o bialelickou delecii, v jednom případě šlo o kombinaci delecii na jedné a mutace na druhé alele. U 10/29 pacientů (34,5 %) jsme dále identifikovali mutace v genech MYD88 a/nebo CD79B, které jsou charakteristické pro skupinu pacientů s horší prognózou, tzv. MCD genetický subtyp DLBCL. Kromě výše uvedených aberací měla většina pacientů (82,8 %) komplexní karyotyp, který je u nádorových onemocnění vždy spojen s agresivním průběhem onemocnění a u DLBCL se nevyšetřuje.

Závěr

Gen TP53 kóduje tumor supresorový protein p53, který hraje klíčovou roli v regulaci buněčného cyklu a prevenci vzniku nádorů. Přítomnost bialelického defektu je prokazatelně spojena s agresivním průběhem onemocnění a rezistencí na terapii napříč hematologickými malignitami, DLBCL nevyjímaje. Podobně závažnou aberací je defekt v genech CDKN2A/CDKN2B, které kódují inhibitory cyklin-dependentních kináz (CDK), čímž kontrolují buněčný cyklus a zabraňují neomezené proliferaci buněk. Přestože všechny tyto aberace jsou opakovaně spojovány s rezistencí na terapii, progresí onemocnění a horší prognózou pacientů, není jejich stanovení u DLBCL součástí aktuálních doporučení. Naše výsledky podtrhují potřebu revize klinických doporučení a zavedení testování minimálně mutačního stavu genů TP53 a CDKN2A/B do rutinní praxe pro optimalizaci terapeutických strategií u pacientů s DLBCL.

Podpořeno granty MZ ČR AZV NU22-08-00227 a MZ-CR RVO 65269705.

1. Navrkalova V, Plevova K, Hynst J, Pal K, Mareckova A, Reigl T, et al. Lymphoid NeXt-Generation sequencing (LYNX) panel: a Comprehensive capture-based sequencing Tool for the analysis of prognostic and predictive markers in lymphoid malignancies. *J Mol Diagn.* 2021;23:959–74.

Genetické faktory ovlivňující bolest při revmatoidní artritidě

Nekvindová J.⁽¹⁾, Barvík I.⁽²⁾, Akantisová L.⁽³⁾, Gančarčíková M.⁽¹⁾, Tomš J.⁽⁴⁾, Libra A.⁽¹⁾, Hyšpler R.⁽¹⁾, Soukup T.⁽⁴⁾, Vlachová V.⁽³⁾

1 Ústav klinické biochemie a diagnostiky, FN Hradec Králové

2 Fyzikální ústav, Matematicko-fyzikální fakulta, UK, Praha

3 Oddělení buněčné neurofyziologie, Fyziologický ústav AV ČR, Praha

4 II. interní gastroenterologická klinika, FN Hradec Králové

Úvod: Revmatoidní artritida (RA) je chronické autoimunitní onemocnění postihující synoviální klouby, přičemž bolest je pravděpodobně nejvýznamnější symptom omezující kvalitu života pacientů. Pokrok v léčbě zůstává limitován nedostatečným pochopením molekulárních mechanismů bolesti a genetických faktorů, které ovlivňují individuální odpověď na léčbu. V této studii jsme se zaměřili na identifikaci genetických predispozic k bolesti u pacientů s RA prostřednictvím analýzy polymorfismů v

genech souvisejících s vlastním onemocněním, dále s metabolismem klíčových léčiv a zejména TRP (transient receptor potential channels) iontovými kanály, což je skupina receptorů, které hrají klíčovou roli v sensorických procesech, jako je vnímání teploty, bolesti a mechanických podnětů.

Metodika: Do studie bylo zařazeno 233 pacientů s RA splňujících klasifikační kritéria ACR/EULAR 2010. Pacienti byli vyšetřeni revmatologem včetně hodnocení pomocí vizuální analogové škály bolesti (VAS) a dalších validovaných dotazníků (RAID, HAQ, SF-36). Z klinických dat byla zaznamenána aktivita nemoci (DAS28), terapie, přítomnost autoprotilátek (RF, ACPA) a další faktory (věk, BMI, kouření, deprese aj.). Genetická analýza zahrnovala sekvenování nové generace (NGS) panelu 27 genů ze tří hlavních skupin: (1) geny asociované s RA (např. CD244, IL10, PTPN22), (2) geny metabolizující adenosin a metotrexát (např. MTHFR, ATIC, ADORA2A), a (3) geny kódující TRP kanály a jejich interaktom (např. TRPA1, TRPC1, TRPC4, AKAP5). NGS data byla analyzována generalizovaným lineárním modelem (PLINK 2.0) a statisticky pomocí vhodných testů dle charakteru posuzovaných hodnot, např. Kolmogorov-Smirnovovým testem. U vybraných SNP byla provedena genotypizace pomocí qPCR. Strukturální dopad mutací v proteinech byl analyzován pomocí nástroje AlphaFold3 a funkční testování vybraných variant TRPA1 proběhlo v heterologním expresním systému pomocí elektrofyziologických měření.

Výsledky: Celkem bylo detekováno 393 SNP, z nichž 123 bylo statisticky hodnotitelných. Nejvýznamnější nalezené varianty zahrnovaly TYK2 (rs280523, rs12720352) – vysoce signifikantní asociace s intenzitou bolesti, TRPA1 (rs959976, rs920829, rs28546865) – pravděpodobný vliv na vnímání bolesti změnou interakce receptoru s Ca²⁺ senzorem kalmodulinem a hraničně významný polymorfismus MTHFD1 (rs1950902). Dále byly nalezeny významné SNP v genech CIITA, SLC22A4, AKAP5, TRPC1, TRPC4, jejichž distribuce u pacientů naznačuje možný vliv na vnímání bolesti. Statistické analýzy ukázaly, že heterozygoti u TRPA1 rs920829 vykazují závislost intenzity bolesti na délce trvání onemocnění. Strukturální modelování pomocí nástroje AlphaFold3 odhalilo, že některé SNP v TRPC1/TRPA1 se nacházejí v oblastech proteinu vážících Ca²⁺ sensor kalmodulin, což může ovlivnit signální dráhy bolesti. Rekombinantní TRPA1 proteiny nesoucí mutace H1018R a E179K byly následně testovány elektrofyziologicky, přičemž obě mutace vedly ke zvýšené citlivosti kanálu na oxidační stres.

Závěr: Naše výsledky naznačují, že genetické varianty postihující TRP kanály mohou hrát klíčovou roli v ovlivnění vnímání bolesti u RA pacientů a nastiňují možnost budoucí personalizace léčby na základě genetického profilu pacienta. Zároveň podtrhují význam kombinace NGS, in silico analýz a funkčních testů a pro identifikaci nových biomarkerů bolesti.

Neinvazivní diagnostika karcinomu močového měchýře pomocí testu Bladder EpiCheck – první zkušenosti

Pazourková E.⁽¹⁾, Maštálková P.⁽¹⁾, Šantorová Š.⁽¹⁾, Šlemendová M.⁽²⁾, Soukup V.⁽²⁾, Hořínek A.⁽¹⁾

1 Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN v Praze,

2 Klinika urologie 1. LF UK a VFN v Praze

V letech 2020–2022 proběhla na Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN v Praze ve spolupráci s Klinikou urologie 1. LF UK a VFN v Praze pilotní studie neinvazivního testování přítomnosti karcinomu močového měchýře ze vzorků moči. Pro testování byl použit komerční kit Bladder EpiCheck (Nucleix, Izrael) detekující metodou qPCR změny metylačního profilu vybraných 15 DNA biomarkerů v moči pacientů. Výsledek je vyhodnocen v podobě hodnoty EpiScore, tedy čísla od 0 do 100. EpiScore vyšší než 60 je hodnoceno jako pozitivní, značící vysokou pravděpodobnost přítomnosti karcinomu močového měchýře

nebo uroteliálního karcinomu horních močových cest. Celkem bylo zpracováno 179 vzorků, pro statistické vyhodnocení bylo použito 129 vzorků, z toho 68 pacientů a 61 kontrol. Do vyhodnocení nebyly zahrnuty vzorky z první fáze (optimalizace metodiky) a problematické vzorky (vzorky s jiným typem nádoru, s nízkým výtěžkem DNA izolace apod). Celková senzitivita testu byla 75,00 % (výrobce udává 68,18 %). Senzitivita pro stadia pT1 a více byla 88,89 % (výrobce udává 91,67 %), pro stadia pTa byla 66,67 % (výrobce udává 51,85 %). Celková specifita byla 96,83 % (výrobce udává 88,03 %). Po vyhodnocení studie byla v roce 2024 tato neinvazivní metoda zavedena do rutinního provozu jako doplňující vyšetření ke stávajícím diagnostickým metodám. Tento krok umožní prodloužit interval mezi cystoskopickými vyšetřeními zvláště u pacientů v remisi, kdy je indikováno trvalé sledování.

Podpora projektu: MZ ČR – RVO VFN64165

Kazuistika: hypomyelinizační leukodystrofie asociovaná s homozygotní mutací c.-273_-271delTCA genu UFM1 u romské pacientky

Piskáčková T.⁽¹⁾, Paszeková H.⁽²⁾, Hojsáková M.⁽¹⁾, Michalovská R.⁽²⁾, Dolinová I.⁽¹⁾

1 OGMD, Krajská nemocnice Liberec, a.s.

2 GHC Genetics

Hypomyelinizační leukodystrofie (HLD14) spojená s mutací genu UFM1 je vzácné neurologické onemocnění s raným nástupem, vysokou mortalitou a autozomálně recesivním typem dědičnosti. Doposud bylo popsáno pouze u několika pacientů, převážně z romské populace v Evropě, včetně Slovenska.

Naše kazuistika prezentuje pacientku z romské rodiny, která byla od třetího měsíce života vyšetřována pro těžké psychomotorické opoždění, poruchu zraku a sluchu, centrální kvadruparézu, axiální hypotonii, mikrocefalii a faciální stigmatizaci. Zemřela ve věku 20 měsíců. Celoxomové sekvenování (WES) u ní odhalilo homozygotní patogenní variantu c.-273_-271delTCA v promotorové oblasti genu UFM1. Tato varianta byla popsána v homozygotní formě i u dalších pacientů s HLD14, velmi pravděpodobně se zde uplatňuje tzv. efekt zakladatele. Podle dosud publikovaných dat je podíl přenašečů této varianty v evropské romské populaci odhadován na 3 %–25 %.

U obou zdravých rodičů pacientky byla potvrzena heterozygotní přítomnost varianty c.-273_-271delTCA genu UFM1, konsanguinitu neudávají. V rodině matky i otce pacientky se vyskytly další případy dětí s mentální retardací, avšak podrobnější informace nejsou k dispozici.

Rodičům pacientky lze nyní nabídnout prenatální nebo preimplantační diagnostiku tohoto onemocnění a v širší rodině pak prediktivní testování uvedené varianty. Cílem tohoto sdělení je upozornit na HLD14 jako klinickou jednotku. U pacientů s rizikovou osobní či rodinnou anamnézou, zejména v romské populaci, je vhodné zařadit analýzu genu UFM1 do spektra molekulárně-genetického vyšetření.

Kazuistika: Melnick-Needles syndrom a genetická varianta neznámého významu v genu FLNA

Petra Porubová⁽¹⁾, Petra Tvrda^(1,2), Martina Paprskářová⁽¹⁾, Andrea Hladíková^(1,3), Lenka Vožická⁽¹⁾

1 Oddělení lékařské genetiky, Ústav klinické a molekulární patologie a lékařské genetiky, Fakultní nemocnice Ostrava, Ostrava, Česká republika

2 Ústav lékařské genetiky, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc, Česká republika

3 Ústav laboratorní medicíny, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita, Ostrava, Česká republika

Úvod:

Melnick-Needles syndrom (MNS) je vzácné X-vázané dominantní onemocnění způsobené patogenními variantami v genu FLNA. Gen FLNA kóduje filamin A, což je klíčový protein cytoskeletu. MNS se vyznačuje skeletálními dyspláziemi, kraniofaciálními abnormalitami a dalšími multisystémovými projevy.

Cíl:

Představujeme případ dívky se symptomy odpovídající Melnick-Needles syndromu, u které byla identifikována dosud nepopsaná varianta c.3485A>C, p.(Lys1162Thr), která byla klasifikována jako varianta neznámého významu s možnou patogenitou v genu FLNA. Stejnou variantu nese i její matka s podobnými symptomy, což podporuje možnou patogenitu této varianty.

Metodika:

Bylo provedeno sekvenování nové generace (NGS) s využitím panelu „Vrozené kostní anomálie“. Vyhodnocení dat probíhalo pomocí programů FinalistDx (IAB, a.s.) a Varsome Clinical (Saphetor S.A.). Nalezené varianty byly ověřeny metodou Sangerova sekvenování. Prediktivní testování matky bylo provedeno metodou Sangerova sekvenování.

Výsledky:

Byla identifikována dosud nepopsaná varianta v genu FLNA u pacientky i její matky. Fenotyp matky a dcery odpovídá spektru klinických projevů MNS.

Závěr:

Rodinný výskyt této varianty v kombinaci s klinickými projevy podporuje její možnou patogenitu. Tento případ podtrhuje význam genetické analýzy a rodinného screeningu u pacientů s podezřením na MNS a přispívá k lepšímu pochopení genotyp-fenotypových korelací u tohoto vzácného syndromu.

Trizómia chromozómu 9 v prenatalnej genetickej diagnostike

Róžová I., Verchovodková V., Landlová D., Lukačková R., Majerová L., Tomková E., Tóthová K., Žákovičová A., Križan P.

Oddelenie lekárskej genetiky, MEDIREX, a.s., Bratislava

Kompletná trizómia chromozómu 9 je zriedkavá a letálna chromozómová anomália charakterizovaná dysmorfiou viacerých orgánových systémov, často s malformáciami centrálného nervového systému. V prenatalnej genetickej diagnostike sa častejšie ako kompletná forma môže zistiť mozaiková forma trizómie 9. Fenotypové prejavy mozaikovej formy sú variabilné a zahŕňajú spektrum

vrozených vývinových chýb, rastovú a vývojovú retardáciu, faciálnu dysmorfiiu. Pri nízkom percentuálnom zastúpení trizomickej bunkovej línie v plodovej vode môže byť prognóza priaznivá (Chen et al., 2023). Vzhľadom k tomu, že závažnosť postihnutia nekoreluje lineárne s úrovňou mozaicizmu, je genetická konzultácia v prenatalnom období u plodov s fyziologickým morfológickým ultrazvukovým obrazom obzvlášť náročná.

Trizómiu 9 možno identifikovať u plodu prenatalným (cyto)genetickým vyšetrením z indikácie patologického biochemického alebo ultrazvukového skriningového vyšetrenia. V súčasnosti sa záchyt zvyšuje s používaním neinvazívneho prenatalného genetického testovania (NIPT), kedy je však nevyhnutné odlíšiť fetoplacentárny mozaicizmus. Pri priamej genetickej diagnostike sa okrem karyotypizácie kultivovaných buniek plodu používajú podrobnejšie genetické laboratórne metódy s cieľom spresniť nález.

Prenatálnym (cyto)genetickým laboratórnym vyšetrením tehotných genetickej ambulancie MEDIREXGROUP sme v rokoch 2010–2025 potvrdili mozaikovú formu trizómie 9 u piatich plodov. V práci ponúkame bližší pohľad na tieto prípady zistené v prenatalnom období. Analyzujeme dôvod genetickej konzultácie, indikáciu genetického laboratórneho testovania, výsledky prenatalných vyšetrení, fenotypové prejavy a odporúčanie ďalšieho postupu.

RBFOX1 pod lupou: Varianta VUS, HFLP alebo niečo víc?

Řezáčová H., Vosecká T., Slámová Z., Kutilová T., Novotná D., Drábová J., Havlovicová M., Vlčková M.

Oddělení Lékařské cytogenetiky, ÚBLG 2. LF UK a FN v Motole, Praha

Gen RBFOX1 patří mezi geny kódující sestřihové faktory. Je exprimován v řadě tkání, nejvíce pak v nervové, svalové a srdeční. Jeho význam pro správný vývoj a funkci centrálního nervového systému byl potvrzen řadou studií, které poukazují na souvislost mezi jeho strukturálními i sekvenčními variantami a zvýšeným rizikem neurovývojových onemocnění (NVO) [Gehman et al., 2012; Martin et al., 2007]. Delece, duplikace a SNV genu RBFOX1, postihující kódující i nekódující sekvence, byly opakovaně detekovány u pacientů s autismem, epilepsií, ADHD a intelektovými poruchami. Přestože je asociace mezi RBFOX1 a NVO stále předmětem výzkumu, současné poznatky podporují jeho roli jako rizikového faktoru, který by v kombinaci s dalšími aberacemi mohl způsobovat rozvoj NVO, a zdůrazňují potřebu dalších funkčních studií k objasnění jeho patogenetických mechanismů [Lalet et al., 2013; Hamdan et al., 2011].

Na základě těchto poznatků publikujeme soubor jedinců s intragenovými delecemi a duplikacemi genu RBFOX1. Celkem byly změny CNV v genu RBFOX1 detekovány u 51 jedinců (36 probandů, 15 rodičů/příbuzných bez manifestace NVO či jiných odchylek). V rámci kohorty probandů byli pacienti rozděleni do dvou skupin, a to na ty, kteří manifestují NVO (25 jedinců, 69 %), a ty, u nichž byly prokázány jiné odchylky mimo NVO (11 jedinců, 31 %). Ve skupině jedinců s NVO byl záchyt CNV genu RBFOX1 2x vyšší (25/36) oproti skupině nonNVO (11/36). Vzhledem k tomu, že aberace genu jsou považovány za rizikový faktor a předpokládá se spoluúčast dalších genetických i negenetických faktorů, byla pozornost zaměřena také na detekci dalších změn. Ve skupině všech probandů byly u 16/36 (44%) jedinců detekovány další CNV/SNV, což podporuje hypotézu, že RBFOX1 sám o sobě nemusí být dostatečující k vyvolání NVO.

Ačkoli naše studie naráží na jisté limity (neznalost dědičnosti, nekonzistentnost provedených vyšetření), ukazuje se, že záchyt CNV v rámci genu RBFOX1 je častější u jedinců s NVO (25/36), stejně tak jako záchyt dalších CNV/SNV (12 NVO skupina vs. 4 nonNVO skupina). Nicméně nemůžeme s jistotou potvrdit ani vyloučit, že kombinace intragenové CNV genu RBFOX1 a další CNV/SNV vede k rozvoji NVO fenotypu, ačkoli by se to u některých našich probandů zdálo být pravděpodobným.

Otevírá se tak klíčová otázka: Neměly by být tyto CNV namísto označení VUS klasifikovány jako tzv. varianta typu HFLP, tedy varianta s vysokou frekvencí v populaci, avšak nízkou penetrancí fenotypových projevů?

Podpořeno projektem koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00064203/6004 a AZV NU22-07-00165.

Variant Calling in practice: Comparisons of Open-Source tools

Schwarzerová J.^(1,2,3), Neuwirthová J.^(1,2), Indraková J.⁽¹⁾, Faldýnová L.⁽¹⁾, Cibulková P.^(1,4), Provazník V.^(2,5), Weckwerth W.^(3,6), Novotný J.⁽¹⁾

1 Department of Molecular and Clinical Pathology and Medical Genetics, University Hospital Ostrava, Ostrava

2 Department of Biomedical Engineering, Faculty of Electrical Engineering and Communication, Brno University of Technology

3 Molecular Systems Biology (MOSYS), University of Vienna, Vienna, Austria

4 Department of Biology and Medical Genetics, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague

5 Czech Institute of Informatics, Robotics and Cybernetics, Czech Technical University in Prague

6 Vienna Metabolomics Center (VIME), University of Vienna, Vienna, Austria

Accurate variant calling is a fundamental step in genomic analysis, enabling the identification of single nucleotide variants (SNVs) and small insertions/deletions (indels) across diverse clinical and research applications. Multiple open-source tools exist for this purpose, each utilizing different algorithmic approaches that influence variant detection, annotation, and interpretation. In this study, we systematically evaluate three widely used variant callers—DeepVariant, Strelka2, and Haplotyper—integrated within the Sarek pipeline (v3.4.2). Our benchmarking is performed on a cohort of 19 patients with varying diagnoses, using panel sequencing data aligned to the human reference genome GRCh38 (hg38), allowing for a comparative assessment of these tools across different clinical contexts.

We focus on key performance metrics, including variant detection rates, read depth, variant frequency, and annotation consistency, alongside computational efficiency. The analysis reveals notable differences in how each tool identifies and classifies genomic variants. While some tools demonstrate higher sensitivity, others prioritize precision in clinically relevant loci, particularly those annotated in ClinVar. Additionally, discrepancies in genotype calling and functional annotation metrics (e.g., HGVSc and HGVSp) highlight the impact of variant caller selection on downstream interpretation and pathogenicity assessment.

These findings underscore the importance of selecting the appropriate variant caller depending on study design and clinical application. By providing a comparative analysis of DeepVariant, Strelka2, and Haplotyper in the Sarek pipeline using hg38 on panel sequencing data, our study offers valuable insights for researchers and clinicians aiming to optimize variant calling pipelines for improved accuracy in precision medicine.

Acknowledgments

Supported by Ministry of Health, Czech Republic - conceptual development of research organization (FNOs/2024)

Molekulárně-genetická diagnostika familiární hypercholesterolémie u pediatrických pacientů

Slavíková P.⁽¹⁾, Svačinová R.⁽¹⁾, Todorovová V.⁽¹⁾, Bakalář R.⁽¹⁾, Řeboun M.⁽¹⁾, Pešková K.⁽¹⁾, Stanovský S.⁽²⁾, Ješina P.⁽²⁾, Dvořáková L.⁽¹⁾

1 Diagnostické laboratoře dědičných poruch metabolismu, Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu, 1.LF UK a VFN v Praze

2 Metabolické centrum, Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu, 1.LF UK a VFN v Praze

Molekulárně-genetické vyšetření familiární hypercholesterolémie (FH) u pediatrických pacientů (≤ 18 let) je zásadní pro včasný záchyt a management tohoto dědičného onemocnění. V letech 2022–2024 bylo na našem pracovišti metodou panelového sekvenování 11 genů vyšetřeno 284 pediatrických pacientů s hypercholesterolémií (medián věku při vyšetření 12 let). Diagnóza FH byla potvrzena u 103 pacientů (36 %). V genu LDLR bylo detekováno 38 různých patogenních variant u 80 pacientů. Nejčastější varianta c.798T>A p.(Asp266Glu) byla přítomna u 16 pacientů. U 8 pacientů bylo nalezeno 5 různých copy number variant (CNV), jejichž přítomnost byla ověřena metodou SYBR Green qPCR. Nejčastější identifikovaná kauzální varianta APOB:c.10580G>A p.(Arg3527Gln) byla nalezena u 22 pacientů. U jednoho pacienta byla nalezena patogenní varianta v PCSK9. Všechny varianty byly přítomny v heterozygotním stavu. Molekulárně-genetické testování u pediatrických pacientů se suspektní FH umožňuje identifikovat osoby s významně vyšším kardiovaskulárním rizikem, zahájit u nich včasnou léčbu a provést cílené vyšetření v rodině.

Podpora: MZ ČR – RVO-VFN 64165

Amyotrofická laterálna skleróza (ALS), výsledky molekulárno-genetických vyšetrení a kognitívneho screeningu u slovenských pacientov

Stretavská P.^(1,3,9,11), Turčanová Koprušáková M.⁽²⁾, Giertlová M.^(9,11), Drenčáková P.^(1,9), Jungová P.⁽⁴⁾, Martinka I.⁽⁵⁾, Mihalov J.⁽⁶⁾, Latka S.⁽⁷⁾, Zemjarová Mezenská R.⁽⁷⁾, Petrovič R.⁽¹²⁾, Pribišová K.⁽¹³⁾, Náročná Kocúrová M.⁽¹⁴⁾, Šlachtová L.⁽³⁾

1 Neurologická klinika 1. LF UK a VFN v Praze

2 Neurologická klinika, JLF UK a UNM v Martine

3 Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN v Praze

4 Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, ÚNB Bratislava

5 Centrum pre neuromuskulárne ochorenia, ÚNB, Bratislava

6 FNsP J. A. Reimana Prešov

7 Laboratórium lekárskej genetiky, Unilabs Slovensko s.r.o., Bratislava

9 Centrum klinického a predklinického výskumu MEDIPARK & Neurologická klinika, LF UPJŠ Košice

11 Ambulancia lekárskej genetiky, Unilabs Slovensko s.r.o.

12 Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UNB

13 Neurologická klinika SZU, UNB

14 II. Neurologická klinika FNsP Banská Bystrica

Amyotrofická laterálna skleróza (ALS) je neurodegeneratívne ochorenie s výraznou genetickou heterogenitou. Patogénne varianty v génoch C9orf72, SOD1, TARDBP, FUS a iných nielenže prispievajú k patogenéze ALS, ale tiež k fenotypovému prekryvu s frontotemporálnou demenciou (FTD) a ďalšími neurodegeneratívnymi ochoreniami. Pochopenie genetických súvislostí je kľúčové pre diagnostiku aj vývoj

cielených terapií. Prezентujeme výsledky molekulárneho genetického vyšetrenia panelu génov asociovaných s ALS a FTD, vrátane analýzy génu C9orf72, a kognitívneho skríningu u 50 pacientov pomocou dotazníka ECAS.

INTRONOVÉ VARIANTY GENU PRO F8 JAKO PŘÍČINA LEHKÉ HEMOFILIE A

Šimoníková M., Radovská A., Provazníková D., Salaj P., Drbohlavová E., Smejkal P., Zápotocká E., Hrachovinová I.

Laboratoř pro poruchy hemostázy, Ústav hematologie a krevní tansfuze, Praha

Úvod:

Hemofilie A (HA) je způsobena různými typy variant podél celého genu F8. I přes obecně vysokou záchytnost patogenních variant u hemofilie A (HA) stále zůstávala na našem pracovišti asi čtvrtina lehkých hemofiliků, u kterých nebyla kauzální varianta nalezena v exonech. V těchto případech jsme hledali patogenní varianty v nekódujících částech genu F8.

Metody:

Celkem jsme vyšetřili 278 pacientů ze 182 rodin s LHA. Byla vyloučena von Willebrandova choroba. Koagulační aktivita FVIII byla měřena chromogenní a koagulační metodou (FVIII:C). Byla izolována DNA, v případě dostupnosti i cDNA. Pro detekci kauzální varianty bylo použito Sangerovo sekvenování. Pokud nebyla nalezena žádná patogenní varianta, použili jsme NGS pro skrínink celého genu F8 se zaměřením na introny. Pro vyloučení delece/duplikace celých exonů byla provedena metoda MLPA. Patogenní dopad identifikovaných kandidátních variant byl hodnocen pomocí in silico analýzy a funkční analýzy cDNA. Pokud byli k dispozici příbuzní pacientů, byly provedeny segregáčnÍ analýzy.

Výsledky:

Kauzální varianty byly nalezeny u 208 lehkých hemofiliků v exonech a velmi blízké intronové oblasti (do 10 bp od exonů). U zbývajících pacientů byla provedena analýza celé intronové oblasti F8. Našli jsme šest různých intronových variant. Tyto varianty zahrnovaly tři jednonukleotidové substituce v intronech 6, 10 a 16, dvě delece v intronu 13 a delecí celého exonu 19. Čtyři z nich byly popsány v souvislosti se vznikem LHA již dříve. Naši nejčastější detekovanou kauzální variantou byla c.778-14T>G v intronu 6, kterou popsal Reitter ve spojení s těžkou formou HA jako způsobující přeskočení celého exonu 7. Naše výsledky se však od jeho lišily. Tuto variantu jsme detekovali pouze u lehkých hemofiliků s velmi variabilním fenotypem; jejich FVIII:C se pohyboval v rozmezí 6–30 %. Analýza cDNA odhalila, že tato varianta pravděpodobně vytváří nové sestřihové místo v exonu, což vede k částečné in-frame deleci exonu 7 z 5' konce. Našli jsme dvě nové varianty: 1. dvě krátké delece blízko sebe v intronu 13, 2. přeskočení exonu 19 detekovaného na úrovni cDNA, která je predikována jako delinsová varianta (příčina na úrovni DNA dosud nebyla zjištěna). Fenotyp všech pacientů v našich nejběžnějších intronických variantách je velmi různorodý, dokonce i v rámci jedné rodiny; hladina FVIII se pohybuje od 6 do 44 %. Příčinou může být rozdílná exprese normální a aberantní cDNA.

Závěr: Intronové varianty jsou spojeny s 26 % netěžkých českých hemofiliků. Fenotyp těchto pacientů je velmi variabilní v závislosti na expresi nehemofilní alely.

Funkční charakterizace nové varianty genu SBDS asociované se Shwachmanovým-Diamondovým syndromem

Štika J.^(1,2), Vrzalová Z.^(1,2,3), Radová L.^(1,2,3), Staňo Kozubík K.^(1,2,3), Likavcová P.⁽¹⁾, Blaháková I.^(2,3), Trizuljak J.^(1,2,3), Pospíšilová Š.^(1,2,3), Doubek M.^(1,2,3)

1 Ústav lékařské genetiky a genomiky, LF MU a FN Brno

2 Středoevropský technologický institut, Masarykova univerzita, Brno

3 Interní hematologická a onkologická klinika, LF MU a FN Brno

Shwachmanův-Diamondův syndrom (SDS) je vzácné autozomálně recesivní onemocnění charakterizované především dysfunkcí kostní dřene, exokrinní pankreatickou insuficiencí a abnormalitami skeletu. Přibližně 90 % pacientů s SDS je nositelem patogenních bílelických variant v genu SBDS, který kóduje protein podílející se na sestavování ribozomů. Patogenní varianty SBDS jsou spojeny se sníženou expresí proteinu SBDS a zvýšenou expresí nádorového supresorového proteinu p53. Zde uvádíme funkční charakterizaci dosud nepopsané varianty c.536C>T; p.(Pro179Leu), která byla spolu se známou patogenní variantou c.355T>C; p.(Cys119Arg) přítomna v genu SBDS (NM_016038.4) u 2 pacientů (sourozenců) s SDS. Funkční význam byl hodnocen in vitro pomocí overexprese SBDS s každou výše uvedenou variantou a SBDS divokého typu v buňkách HeLa. Životaschopnost buněk, proliferace a buněčný cyklus byly hodnoceny pomocí průtokové cytometrie, exprese proteinů SBDS a p53 byla sledována pomocí western blotu. Žádná z variant neovlivnila životaschopnost buněk, proliferaci ani buněčný cyklus ve srovnání s divokým typem SBDS. Obě varianty však vedly ke snížení exprese proteinu SBDS. Varianta c.355T>C navíc překvapivě snižovala expresi proteinu p53. Naše zjištění potvrzují patogenitu nové varianty c.536C>T. Tato studie zavádí protokol funkčního testování použitelný pro hodnocení klinického významu dalších variant genu SBDS. Tyto poznatky přispívají k hlubšímu pochopení patogeneze SDS.

Projekt byl podpořený grantem DRO (FNBr, 65269705); projektem Národní ústav pro výzkum rakoviny (Program EXCELES, ID: LX22NPO5102) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU; grantem MUNI/A/1685/2024 – Financováno Masarykovou Univerzitou.

Gen RPGR, ORF15: kde NGS nemůže, zlatý Sanger pomůže!

Štorkánová G.⁽¹⁾, Vlášková H.⁽¹⁾, Hnízdová Boučková M.⁽¹⁾, Ďudáková L.⁽²⁾, Lišková P.⁽²⁾

1 Laboratoř DNA diagnostiky, DL KPDPM, 1. LF UK a VFN v Praze

2 Laboratoř oční genetiky, KPDPM, 1. LF UK a VFN v Praze

Ve spolupráci s Centrem klinické oční genetiky Oční kliniky 1. LF UK a VFN jsme v roce 2024 zavedli diagnostiku variant v genu RPGR a také v jeho obtížně sekvenovatelné části ORF15. Mutace v tomto genu jsou nejčastější příčinou X-vázané retinitis pigmentosa (XLRP, MIM *603937), která je jednou z nejagresivnějších forem RP. Po časném nástupu dochází k rychlé progresi ztráty zraku, která vede až ke slepotě již na konci 3. dekády života. Variabilita fenotypových projevů u přenašeček souvisí s náhodnou inaktivací X chromozomu během vývoje sítnice.

Většina mutací genu RPGR se nachází v oblasti ORF15, tj. alternativně sestřiženém exonu 15, který je prodloužen i o část intronu 15. V těchto místech je sekvence nejen A-G bohatá (99 %), ale i vysoce repetitivní, což prakticky znemožňuje NGS analýzu. Analýzu mutací ORF15 začínáme přípravou long-PCR (2039 bp), následuje Sangerovo sekvenování za použití 2 různých sekvenčních kitů, specifických vnitřních primerů a různých podmínek vlastní sekvenační reakce.

Tímto způsobem jsme verifikovali přítomnost mutace u 4 probandů. Ve všech případech se jednalo o malé delece (c.2476_2477del, c.2522del, c.2845del, c.2905_2909del). U žen komplikuje analýzu častý výskyt polymorfismů, a to nejen bodových ale i posunových. Familiární mutace byly Sangerovým sekvenováním detekovány i u symptomatických rodinných příslušnic, byly nalezeny 3 přenašečky.

Podpora: MZ ČR – RVO-VFN 64165/2012

Varianty c.434A>C a c.3887_389del v géne KIF7 svedčia pre Joubertov syndrom 12?

Vasil M.⁽¹⁾, Zemjarová Mezenská R., Zemanová J.⁽¹⁾, Čokašová K.⁽¹⁾, Zboňáková Z., Čižmár J.⁽²⁾, Sedláková E.⁽²⁾, Zavadilíková E.⁽²⁾, Fedorčáková M.⁽³⁾

1 Ambulancia lekárskej genetiky, Unilabs Slovensko s.r.o.

2 Detská fakultná nemocnica, Košice

3 Detská nerologická ambulancia, Humenné

Autori popisujú nález u osem mesačného chlapčeka, u ktorého sa podľa kritérií publikovaných Coutersom a kol (1997) a OMIM (# 20990) môže uvažovať o Joubertovom syndróme 12 (JBTS12). Svedčí pre to symptomatológia a skutočnosť, že v géne KIF7 detegovali dva varianty v heterozygotnomstave, tie by mohli byť v prípade ich vzájomnej trans pozície dôvodom symptomatológie probanda. Prvý variant c.434A>C, heterozygot v géne KIF a druhý variant c.3887_389del, heterozygot v géne KIF7.

Vyšetření polymorfismu rs3750920 v genu TOLLIP u pacientů s idiopatickou plicní fibrózou (2019 -2025)

Vítková M.⁽¹⁾, Tajtlová J.⁽¹⁾, Kejkulová R.⁽¹⁾, Mašková Š.⁽¹⁾, Bradová M.⁽¹⁾, Lacina L.^(2,3), Cimrová M.⁽³⁾, Gřegořová A.⁽⁴⁾, Vašáková M.⁽²⁾, Langová M.⁽¹⁾

1 Oddělení lékařské genetiky, Fakultní Thomayerova nemocnice, Praha

2 Pneumologická klinika 1. LF UK a FTN, Fakultní Thomayerova nemocnice, Praha

3 Pneumologická klinika, Fakultní nemocnice Bulovka, Praha

4 Ústav klinické a molekulární patologie a lékařské genetiky, Fakultní nemocnice Ostrava, Ostrava

Idiopatická plicní fibróza (IPF) patří mezi nejobtížněji léčitelné a zároveň prognosticky nejzávažnější plicní choroby, se střední dobou přežití 2-3 roky, pokud není léčena. Incidence onemocnění stoupá. Vyvolávajícími faktory jsou: virové infekce, kouření, expozice s různými organickými či anorganickými prachy nebo ezofageální reflux. Detekce genotypu v polymorfismu rs3750920 genu TOLLIP lokalizovaného na chromozomu 11 (NC_000011.10 1274368...1309662) je významná pro pacienty s IPF (idiopatická plicní fibróza), z hlediska zvážení účinnosti léčby N-acetylcysteinem (NAC). Nositelé jednoho z polymorfismů (TT) z léčby NAC profitují. Naopak u nositelů ostatních polymorfismů léčba NAC průběh onemocnění spíše zhoršuje. Stanovení genotypu polymorfismu rs3750920 genu TOLLIP vede u pacientů s IPF k možnosti personalizované terapie a zvýšení efektivity léčby.

Pro detekci dalších SNP u pacientů s idiopatickou plicní fibrózou byl ve spolupráci s lékaři z pneumologické kliniky vytvořen panel 15 genů asociovaných s IPF metodou MPS.

A novel approach to confirm genetic variants with potential phenotypic impact by amplicon massive parallel sequencing from data obtained by whole genome sequencing in patients with parkinsonism

Vodička R.⁽¹⁾, Kolarikova K.⁽¹⁾, Vrtel R.⁽²⁾, Mensikova K.⁽³⁾, Kanovsky P.⁽⁴⁾, Ismail H.⁽⁵⁾

1 Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc

2 Department of Medical Genetics, University Hospital Olomouc

3 Department of Neurology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc

4 Department of Neurology, University Hospital Olomouc

5 Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc

Introduction: High-throughput molecular genetic sequencing analyses can be divided in terms of human genome coverage into targeted ones, which reveal the genetic background of the disease most often based on analyses from several to hundreds of genes that are associated with the given disease. These analyses provide hundreds to thousands of variants and at most a few clinically relevant ones. Another approach is whole exome analyses. In this case, up to hundreds of thousands of variants can be assessed and dozens may have clinical significance. The final sequencing approach in terms of genome coverage is whole genome analyses. Based on whole genome analyses (WGS), we managed to obtain data from 86 unique samples from an isolated population of the Hornacko region (South Eastern Moravia, Czech Republic) where there is a higher and familial burden of Parkinsonism. These are often, from the geneticist's point of view, very valuable DNA samples whose quantity and availability are very limited. Each sample contains about 5 million of single-nucleotide variants and small insertions/deletions and thousands of larger insertions/deletions, dozens of which may have a potential clinical impact. All of these variants need to be verified and confirmed by another independent diagnostic method. The current approach of verifying NGS data using Sanger sequencing is appropriate when only a few variants are verified within a given sample and when only single nucleotide variants and small insertions/deletions are involved. If we were to choose this method to test WGS variants in all 86 samples, it would be very time-consuming, and would consume a large amount of DNA and sequencing chemistry.

The aim of this study: To design and apply a strategy for verification of WGS variants that is not demanding on the initial amount of DNA and at the same time can reliably, independently and in the available time verify WGS findings. This strategy is based on multi-amplicon massively parallel sequencing of mixed samples. The amplicon sequencing strategy is effective for detecting point mutations, minor deletions, insertions, and duplications (around 20 bp) and copy number variation (CNV) analysis if target coverage is adequate.

Method: It has been used Varsome Clinical phenotype filter focused on Parkinsonism and also the ACMG criteria filter focused on pathogenic and likely pathogenic impact. After filtering, it has been chosen together 392 variants, from which 290 were able to design via Ampliseq designer as Ion AmpliSeq™ Custom panels. Eighty six DNA samples were diluted to the same concentration and mixed into 16 DNA mixtures. (Qubite - Qiagene). Each DNA mixture was diluted in water to a final concentration 0.7 ng/μL Automated library preparation requires an initial DNA concentration of about 10 ng in a 15 μL volume. Amplicon library was prepared automatically on the Ion Chef™ Instrument using AmpliSeq™ Kit for Chef DL8 according to the manual (Ion AmpliSeq Library Preparation on the Ion Chef System (MAN0013432)). Sixteen libraries were then subjected to the templating using the Ion 510™/520™/530™ Kit-Chef on the Ion Chef™ Instrument according manual (Ion 510, Ion 520, and Ion 530 Kit-Chef Instructions (MAN0016854)). Massive parallel sequencing was done using the Ion 510™/520™/530™ Kit-Chef, with analysis performed on the instrument Ion S5™ system. This high-throughput sequencing platform was provided by Thermo Fisher

Scientific (www.thermofisher.com accessed on 12 February 2022). Data Analysis: amplicon coverage and overall sequencing data quality were evaluated using Torrent Suite software. The presence of variants was qualified and quantified using the IGV viewer.

Results: A total of 702 variants were assessed (the number of variants differs from the number designed by AmpliSeq designer (290) as some of the same variants were part of different mixtures). Of this number, 365 variants were confirmed, which is 52% of all variants evaluated.

Conclusion: The described approach is fast and efficient and confirmed more than 50% of the suspected variants found by WGS.

Study was supported by a grant from the Palacky University Medical School Internal Grant Agency IGA_LF_2024_017 and by MH CZ-DRO (FNOL, 00098892).

Testování genetických markerů u chrupavčitých nádorů

Vrbský J.⁽¹⁾, Zettlová K.⁽²⁾, Kašný M.⁽³⁾, Tomko N.⁽³⁾, Tomáš T.⁽⁴⁾, Vasileios A.⁽⁴⁾, Dvořáčková M.⁽²⁾

1 Laboratoř genetické diagnostiky MiU a Mezinárodní centrum klinických studií – ICRC, FN u sv. Anny v Brně

2 Laboratoř genetické diagnostiky MiU, FN u sv. Anny v Brně

3 Institute of Applied Biotechnologies, Praha, 4I. ortopedická klinika, FN u sv. Anny v Brně

Předpovědět chování chondrosarkomů pouze na základě histologie může být obtížné, proto genetické markery představují zajímavou oblast výzkumu, která by mohla pomoci zpřesnit diagnostické a prognostické přístupy. V období 2009–2024 jsme na našem pracovišti léčili 251 pacientů s chondrosarkomem - 121 pacientů mělo nádor v dlouhých kostech (stupeň diferenciaci nádoru G2 a G3), 67 v pánvi a lopatce (G2 a G3) a 63 pacientů mělo G1 chondrosarkom. Jako kandidátní markery se ukazují mutace izocitrátdehydrogenázy (IDH) a odlišnosti v expresi určitých mikroRNA. Mutace v IDH1/2 se podílejí na patogenezi různých nádorů. Naše dosavadní výsledky a výsledky studií dalších pracovišť koordinovaných mezinárodní Muskulo-skeletární Onkologickou Společností (EMSOS) naznačují, že mutace IDH1 R132, které se vyskytují až v 50 % případů, jsou spojeny s negativní prognózou pacientů s kostními chondrosarkomy. Dalšími diagnostickými a terapeutickými markery u chrupavčitých nádorů by mohly být MicroRNA (miRNA). Tyto molekuly patří do třídy krátkých nekódujících RNA o délce 18–25 nukleotidů, které posttranskripčně regulují genovou expresi a hrají tak klíčovou roli v buněčné biologii. Není překvapivé, že deregulovaná exprese vybraných miRNA byla pozorována u mnoha nádorů, včetně chondrosarkomů. Příkladem je snížená exprese miR-30a v chondrosarkomových buněčných liniích a tkáních ve srovnání s nenádorovými tkáněmi. Ektopická exprese miR-30a vedla k inhibici proliferace buněk chondrosarkomu, což naznačuje její potenciální roli jako tumor supresorové miRNA (Jiang 2017). Naopak nadměrná exprese miR-100 a miR-23b zvyšuje citlivost buněk chondrosarkomu k cisplatině, zatímco nízké hladiny miR-125b jsou spojeny s rezistencí na doxorubicin. Tyto nálezy naznačují, že modulace specifických miRNA by mohla být strategickým přístupem ke zlepšení účinnosti chemoterapie u pacientů s chondrosarkomem (Skipar 2024). MiR-129-5p inhibuje signální dráhu Wnt/ β -katenin cílením na SOX4, čímž dále potlačuje proliferaci buněk, jejich migraci a podporuje apoptózu v chondrosarkomech. Avšak jiné studie tyto závěry nepotvrzují. Nadměrná exprese miR-181 byla zase prokázána ve vysoce maligních chondrosarkomech, což může podpořit růst nádoru, angiogenezi a metastazování. Reguluje expresi VEGF, MMP1 a zároveň ovlivňuje signalizaci G-proteinu prostřednictvím RGS16, což je negativní regulátor signalizace chemokinového receptoru CXCR4 (Sun 2015 a 2019). Přes mnohé studie této problematiky, doposud neexistují souhrnné informace o výskytu charakteristických miRNA u chondrosarkomů a parametry přežití příslušných pacientů.

Naše předběžná sekvenační data ze vzorků G2 chondrosarkomů a ACT (atypických chrupavčitých nádorů), spolu s in silico analýzou databází miRNA (miRNATissue Atlas 2 a The small RNA Expression Atlas) vedlo k identifikaci 17 signifikantně upregulovaných a 10 downregulovaných miRNA oproti kontrolní zdravé tkáni. To naznačuje existenci unikátních mikroRNA v chondrosarkomech, z nichž některé nebyly v literatuře doposud popsány. Tento náález zdůrazňuje potřebu dalšího výzkumu zaměřeného na pochopení vlastností dobře diferencovaných a dediferencovaných chondrosarkomů a jejich metastatického potenciálu.

Reference:

-Skipar P, Dey M, Piątkowski J, Sulejczak D, Rutkowski P, Czarnecka AM. MicroRNAs as Prognostic Biomarkers and Therapeutic Targets in Chondrosarcoma. *Int J Mol Sci.* 2024;25(6):3176. Published 2024 Mar 9. doi:10.3390/ijms25063176

-Jiang D, Zheng X, Shan W, Shan Y. The overexpression of miR-30a affects cell proliferation of chondrosarcoma via targeting Runx2. *Tumour Biol.* 2016 May;37(5):5933-40. doi: 10.1007/s13277-015-4454-3.

-Polychronidou, Genovefa et al. "Novel therapeutic approaches in chondrosarcoma." *Future oncology (London, England)* vol. 13,7 (2017): 637-648. doi:10.2217/fon-2016-0226

-Grignani, Giovanni et al. "A phase 2 trial of imatinib mesylate in patients with recurrent nonresectable chondrosarcomas expressing platelet-derived growth factor receptor- α or - β : An - Italian Sarcoma Group study." *Cancer* vol. 117,4 (2011): 826-31. doi:10.1002/cncr.25632

-Zhang P, Li J, Song Y, Wang X. MiR-129-5p Inhibits Proliferation and Invasion of Chondrosarcoma Cells by Regulating SOX4/Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway [retracted in: *Cell Physiol Biochem.* 2023 Feb 28;57(1):50. doi: 10.33594/000000608.]. *Cell Physiol Biochem.* 2017;42(1):242-253. doi:10.1159/000477323

-Sun X, Charbonneau C, Wei L, Chen Q, Terek RM. miR-181a Targets RGS16 to Promote Chondrosarcoma Growth, Angiogenesis, and Metastasis. *Mol Cancer Res.* 2015 Sep;13(9):1347-57. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0697. Epub 2015 May 26. PMID: 26013170; PMCID: PMC4573256.

-Sun X, Chen Y, Yu H, Machan JT, Alladin A, Ramirez J, Taliano R, Hart J, Chen Q, Terek RM. Anti-miRNA Oligonucleotide Therapy for Chondrosarcoma. *Mol Cancer Ther.* 2019 Nov;18(11):2021-2029. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-18-1020. Epub 2019 Jul 24. PMID: 31341031; PMCID: PMC6825546.

Interpretace nálezu CNV aneb není vše, jak se na první pohled zdá – kazuistika

Vrtěl P.^(1,2), Šantavá A.⁽¹⁾, Vrtěl R.^(1,2), Vodička R.^(1,2), Štellmachová J.^(1,2)

1 Ústav lékařské genetiky, FN Olomouc

2 Ústav lékařské genetiky, Lékařská fakulta UP Olomouc

Úvod

Ústav lékařské genetiky v Olomouci nabízí lékařům možnost indikovat vybrané pacienty pro masivní paralelní sekvenaci (MPS) na rozličné diagnózy bez nutnosti využívání velkých genových panelů. Byla zavedena metodika, která využívá design multiplexů pro konkrétní soubor pacientů s rozličnými diagnózami (deficit proteinů C, S a antitrombinu III, cystinurie, aj.).

Prezentovaný případ popisuje pacienta s diagnózou cystinurie – dědičnost převážně autosomálně recesivní. MPS odhalila patogenní variantu v heterozygotním stavu.

Materiál a metodika

MPS byla provedena na sekvenační platformě Ion S5™. Design On-Demand panelu pomocí AmpliSeq Designeru. Design je navržen pro 100% pokrytí exon/intron oblastí a kódujících oblastí genu. Data jsou zpracována pomocí software Torrent Suite a hodnocena v programu Ion Reporter. Použitý design umožňuje provedení CNV analýzy. Pro vizuální kontrolu pokrytí jsme využili Integrative Genomic Viewer (IGV). Pro analýzu MLPA jsme použili probemix P426.

Výsledky

MPS analýza – patogenní varianta v heterozygotním stavu SLC3A1(NM_000341.4):c.762C>A (p.Asn254Lys)

IGV – významný pokles readů ve 2. exonu genu SLC3A1

MLPA – heterozygotní delece 2. a 3. exonu genu SLC3A1

Závěr

Nález z metody MLPA revidován na základě fyziologického nálezu počtu čtení dle IGV ve 3. exonu genu SLC3A1. Pozice patogenní varianty SLC3A1 c.762C>A, leží v místě nasedání MLPA sondy negativně ovlivní hybridizaci a způsobí falešně pozitivní nález. Pacient je tedy složený heterozygot SNV a delece 2. exonu.

Případ poukazuje na nutnost obezřetné interpretace nálezů MPS a vhodnou aplikaci doplňkových metod pro potřeby rutinní diagnostiky.

Podpořeno MZ ČR – RVO (FNOI, 00098892)

Srovnání VCF generovaných z různých SW při hodnocení variant v genech odpovědných za vzácné trombofilní stavy

Vrtěl R.^(1,2), Vrtěl P.^(1,2), Vodička R.^(1,2)

1 Ústav lékařské genetiky, FN Olomouc

2 Ústav lékařské genetiky, LF UP Olomouc

V rámci zavádění a ověřování optimálního diagnostického postupu, založeného na vysokokapacitním sekvenování pomocí platformy Ion Torrent S5, v rámci diagnostiky vzácných trombofilních stavů - proteinu S (PS), proteinu C (PC) a deficitu antitrombinu (AT) jsme porovnávali data ze tří různých softwarů Torrent Suite, Ion Reporter a NextGene, abychom porovnali jejich účinnost a přesnost při analýze každé zjištěné sekvenční varianty.

Kohorta 31 pacientů s deficitem PS (7), PC (13) a AT (11) byla vybrána na základě definovaných parametrů indikačních kritérií. V rámci těchto skupin pacientů byla zjištěna míra detekce mutací 67,7 %.

V kohortě 10 pacientů, kteří byli sekvenováni v rámci jednoho sekvenování, tři hodnocené softwary v jejich základním nastavení detekovaly 16, 19 a 27 variant v genu PROS1; 17, 17 a 19 variant v genu PROC;

a 15, 15 a 16 variant pro gen SERPINC1. Pro data generovaná z platformy Ion Torrent se použití software z platformy poskytovatele zdá být vhodnější, zejména kvůli kvalitě filtrování falešně pozitivních výsledků. Pro další vyhodnocení validity použitého softwaru bude nutné rozšířit soubor zkoumaných pacientů.

Podpořeno MZ ČR – RVO (FNOI, 00098892)

Srovnání fenotypu a genotypu u syndromu Heřmanský - Pudlák ve třech českých rodinách

Vrzalová Z.^(1,2,3), Trizuljak J.^(1,2,3), Radová L.^(1,2,3), Blaháková I.^(2,3), Likavcová P.⁽¹⁾, Staňo Kozubík K.^(1,2,3), Štika J.^(1,2), Doubková M.⁽⁴⁾, Pospíšilová Š.^(1,2,3), Doubek M.^(1,2,3)

1 Ústav lékařské genetiky a genomiky, FN Brno a Masarykova univerzita, Brno

2 Středoevropský technologický institut, Masarykova univerzita, Brno

3 Interní hematologická a onkologická klinika, FN Brno a Masarykova univerzita, Brno

4 Klinika nemocí plicních a tuberkulózy, FN Brno a Masarykova univerzita, Brno

Syndrom Heřmanský-Pudlák (HPS) je vzácné autozomálně recesivní onemocnění spojené s okulokutánním albinismem, krvácivou diatézou, granulomatózní kolitidou a u některých podtypů s vysoce penetrantní plicní fibrózou. Pacienti s HPS nesou patogenní varianty v genech AP3B1, AP3D1, BLOC1S3, BLOC1S5, BLOC1S6, DTNBP1, HPS1, HPS3, HPS4, HPS5 a HPS6. V příspěvku představujeme fenotypovou sérii čtyř pacientů ze tří různých rodin z České republiky. Kauzální patogenní varianty u postižených pacientů jsme detekovali pomocí celoexomového sekvenování (WES) a následně je potvrdili Sangerovým sekvenováním. Proband z první rodiny byl složený heterozygot pro varianty c.1507C> T a c.1189delC v genu HPS1; dvě sestry z druhé rodiny byly homozygoti pro variantu c.1189delC v genu HPS1, zatímco proband ze třetí rodiny byl homozygot pro variantu c.649C> T v genu HPS4. Všichni čtyři pacienti byli postiženi okulokutánním albinismem a funkčním defektem krevních destiček. V době WES analýzy se u 3 ze 4 pacientů (75 %) vyvinula plicní fibróza, přičemž medián počátku onemocnění byl 50 let. U žádného z pacientů se nevyvinula cytopenie, granulomatózní kolitida, chronické selhání ledvin ani kardiomyopatie. Na našem pracovišti je genetická diagnostika standardní součástí vyšetření pacientů, u nichž existuje podezření na dědičná hematologická onemocnění. Potvrzení diagnózy HPS má pozitivní vliv na individualizovanou péči o pacienta, zejména klíčové je včasné naplánování transplantace plic. Včasný záchyt nemoci má také význam pro jejich nemocné příbuzné.

Projekt byl podpořený grantem DRO (FNBr, 65269705); projektem Národní ústav pro výzkum rakoviny (Program EXCELES, ID: LX22NPO5102) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU.

Neočekávaná příčina neonatální formy polycystózy ledvin

MUDr. Lucie Osičková⁽¹⁾, MUDr. Václava Curtisová, MSc.⁽¹⁾, Mgr. Jana Indráková⁽²⁾, doc. RNDr. Radek Vrtěl, Ph.D.⁽¹⁾

1 Ústav lékařské genetiky, Fakultní nemocnice Olomouc

2 Ústav klinické a molekulární patologie a lékařské genetiky, Oddělení lékařské genetiky, Fakultní nemocnice Ostrava

Úvod: Polycystická choroba ledvin (PKD) je nejčastějším dědičným onemocněním ledvin. Polycystóza je dědičná autozomálně dominantně (AD) a autozomálně recesivně (AR). Formy se kromě dědičnosti liší zvykle i ultrazvukovým nálezem na ledvinách a věkem nástupu – u ARPKD vídáme cysty ledvin již v dětském či prenatálním období, u ADPKD dochází k vývoji cyst ledvin spíše až ve věku dospělém. Prezентujeme rodinu se známou ADPKD v rodě s neočekávaným nálezem těžké prenatální polycystózy ledvin u dvou plodů týchž rodičů.

Metody: Na naše pracoviště byla odeslána 31letá primigravida pro pozitivní screening I. trimestru. Vzhledem ke známé ale dosud geneticky nevyšetřené ADPKD u partnera pacientky jsme u něj zahájili vyšetření genů zodpovědných za ADPKD. Stejně genetické vyšetření bylo poté indikováno i u plodu pro záchyt polycystózy ledvin ve II. trimestru. Následně byly geneticky vyšetřeny i všechny plody v dalších graviditách žadatelů.

Výsledky: U žadatele byla metodou MLPA odhalena heterozygotní delece upstream oblasti genu PKD1, čímž u něj byla potvrzena diagnóza ADPKD. První i třetí gravidita žadatelů byla ukončena z genetické indikace pro nález těžké polycystózy ledvin plodu s oligohydramniem. U obou plodů byla potvrzena familiární delece v genu PKD1. Vzhledem k překvapivě těžkému nálezu polycystózy u dvou plodů jsme r.2025 požádali o přehodnocení molekulárních dat příslušníků této rodiny. Tímto postupem byla u žadatelky a obou zemřelých plodů nalezena hypomorfní alela v PKD1 genu:c.9499A>T v heterozygotním stavu. Ač je tato hypomorfní alela pro svého nositele bez klinického dopadu i ve stavu homozygotním, u složených heterozygotů s patogenní variantou v PKD1 genu na druhé alele je naopak často popisován již v prenatálním období fenotyp ARPKD.

Závěr: Na příkladu naší rodiny demonstrujeme důležitost přehodnocování dat a postupů u dříve ne zcela jednoznačných či typických nálezů. Průkaz variant v genu PKD1 definitivně objasnil potíže u potomků žadatelů a umožnil žadatelům využít metody cíleného vyšetření v dalších graviditách.

Podpořeno MZ ČR – RVO (FNOI, 00098892)

Národní centrum lékařské genomiky

Hana Hartmannová⁽¹⁾, Kateřina Hodaňová⁽¹⁾, Helena Trešlová⁽¹⁾, Lenka Nosková⁽¹⁾, Viktor Stránecký⁽¹⁾, Stanislav Kmoč⁽¹⁾

1 Laboratoř pro studium vzácných nemocí, Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu, 1.lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha

Lékařská genomika je dynamicky se rozvíjející vědní disciplínou, která spočívá v získávání a analýze genetické informace jedinců, rodin a populací s cílem porozumět genetickým, genomickým a molekulárním základům lidského zdraví a nemoci.

NCMG je koncipováno jako distribuovaná výzkumná infrastruktura genomických laboratoří 1. a 2. Lékařské fakulty a Lékařské fakulty v Plzni Univerzity Karlovy, Všeobecné fakultní nemocnice v Praze, Fakultní nemocnici v Motole; BIOCEVu - Biotechnologického a biomedicínského centra Akademie věd a Univerzity Karlovy ve Vestci, Interní hematologické kliniky, Centra molekulární biologie a genové terapie Lékařské fakulty Masarykovy Univerzity, Fakultní nemocnice Brno; CEITECu - Středoevropského technologického institutu, Masarykovy univerzity v Brně a Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Plzeň.

Účelem NCMG je zabezpečit provoz nejmodernějších sekvenačních platforem a návazných technologických zařízení pro analýzu lidského genomu a umožnit kvalifikované využívání těchto technologií v biomedicínském výzkumu a translační medicíně v ČR.

V rámci NCMG nabízíme analýzu genomů, včetně bioinformatického zpracování dat, NGS sekvenování - genomové, exomové, cílené, sekvenování RNA.

Dále také nabízíme ke stažení veřejně dostupnou databázi genomických variant <https://ncmg.cz/>

Analýza profilu miRNA ve sklivci pacientů s DM

Mašťálková P.⁽¹⁾, Pazourková E.⁽¹⁾, Kováčková M.⁽²⁾, Horová E.⁽³⁾, Svozílková P.⁽²⁾, Prázný M.⁽³⁾, Hořínek A.⁽¹⁾

1 Ústav biologie a lékařské genetiky, 1. LF UK a VFN v Praze

2 Oční klinika, 1. LF UK a VFN v Praze

3 III. interní klinika 1. LF UK a VFN v Praze

V letech 2020–2024 proběhla na Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN v Praze ve spolupráci s Oční klinikou 1. LF UK a VFN v Praze a III. interní klinikou 1. LF UK a VFN v Praze pilotní fáze studie miRNA profilování ze vzorků sklivce pacientů s DM a kontrolních osob bez DM anamnézy, kteří podstoupili oční operaci z jiné indikace. Celkem bylo zpracováno 60 vzorků (z toho 39 pacientů a 21 kontrol) vybraných dle indikačních kritérií a zařazených do studie. Ve skupině pacientů byli osoby s DM 1 typu (12x) i DM 2 typu (27x). Z hlediska očního postižení diabetickou retinopatií (DR) bylo možné vyčlenit skupinu s neproliferativní DR (15x) a proliferativní DR (16x).

Kitem miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen) byla vyzolována miRNA, ta byla následně pomocí kitu TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) přepsána do cDNA a preamplifikována. Vlastní analýza byla realizována metodou real-time PCR na kartě TaqMan™ Advanced miRNA Human A Card (Thermo Fisher Scientific) na stroji QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). Každý vzorek byl analyzován samostatně, přičemž každá karta obsahovala 379 miRNA. Výsledky byly vyhodnoceny programy ExpressionSuite Software (Thermo Fisher Scientific), qbase+ (Biogazelle) a Statistica 12 (Statsoft).

Po statistickém zpracování byl pomocí programu GeNorm vyhodnocen soubor 23 miRNA se statisticky nejvýznamnějšími rozdíly mezi jednotlivými skupinami pro ověření v následné validační fázi studie a 3 miRNA vhodných jako endokontroly pro tuto navazující fázi. Porovnání skupin ukázalo zřetelné rozdíly v miRNA profilech mezi kontrolními subjekty a pacienty s různě závažným očním postižením, ať už ve smyslu snižující nebo zvyšující se exprese jednotlivých miRNA. Tyto rozdíly budou předmětem dalšího zkoumání v rámci validační fáze projektu.

Tato práce byla realizována v rámci programového projektu MZ ČR “Dynamické parametry kompenzace diabetes mellitus ve vztahu k biomarkerům v séru a v nitrooční tekutině u pacientů s očními komplikacemi”, reg. č. NU22-01-00077].

Karyotypizace v pediatrické genetické diagnostice v 21. století. Mikroarray vs. Karyotypizace jako první testovací pilíř

Čapková P., Vrbická D., Adamová K., Balcárková A., Řoutilová M., Štefeková A., Křepská J., Pazderová J., Srovnal J.

Ústav lékařské genetiky, FN Olomouc

Chromosomální mikroarray (CMA) je standardní součástí portfolia cytogenomických metod v současné prenatalní i postnatalní genetické diagnostice. V posledních letech je doporučován jako test první volby, a to zejména tam, kde je očekáván nález segmentální změny s klinickým dopadem na pacienta (zejména pediatrická genetická diagnostika) (Shao, 2021 – ACMG Technical Standard).

Cíl. Porovnání senzitivity aCGH/SNP-aCGH a karyotypizace pro záchyt segmentálních variant.

Metoda. Retrospektivní studie. Audit výsledků vyšetření: CMA – Human Genom CGH SurePrint G3 Unrestricted ISCA v2 8x60K, 4x180K (Agilent), Affymetrix Cytoscan HD, HumanCytoSNP-12v2.1 Illumina; MLPA – Subtelomere Probemix P070, P036, Microdeletion 1,2 (MRC, Holland) prováděných v letech 2012–2024. Porovnání s výsledky karyotypizace u pacientů – karyotyp použit jako metoda první volby.

Výsledky: Z celkového počtu 151 patogenních a pravděpodobně patogenních variant (CNV) zachycených metodou CMA bylo 12 (7,95 %) variant větších než 10 Mb (chromosomální aberace – CHA) a dávalo šanci na možný záchyt metodou karyotypizace. Z tohoto počtu bylo karyotypizací zachyceno 7 (4,64 %) CHA, 3 (1,99 %) CHA se nepodařilo karyotypizací zachytit (intersticiální duplikace u chromosomu 2 postnatalně, terminální duplikace 17p postnatalně a nebalancovaná translokace chromosomů 2 a 15 prenatalně) ani při této velikosti a u dvou případů nebyla karyotypizace umožněna (v jednom případě byla karyotypizací intersticiální duplikace chromosomu 7 prokázána u matky syna s původně detekovanou variantou metodou CMA). Byl detekován 1 (0,66 %) případ záchytu CHA menší než 10 Mb (3,9 Mb) – 46,XX,r(22) - Phelan-McDermid sy. Celkem tedy bylo detekováno karyotypizací 8 (5,3 %) variant ze 151 variant zachycených CMA. Zbývajících 94,7 % variant by zachyceno nebylo. Ve dvou případech karyotypizací zachycených nebalancovaných změn – 46,XX,del(X)(p22.1) a 46,XY,der(22) byla metodou CMA a FISH prokázána komplexní povaha těchto změn: nebalancovaná přestavba der(X)t(X;7)(p22.1;7p22.3) a nebalancovaná přestavba der(22)t(8;22)(p21.3;q13.31).

Závěr: Metoda mikroarray je jasnou první volbou zejména ve skupině pediatrických pacientů s podezřením na genetickou příčinu onemocnění. Karyotypizace je však nepostradatelnou zejména v reprodukční medicíně (detekce balancovaných translokací) a společně s metodou FISH umožňuje spolehlivě určit/potvrdit mechanismus vzniku příslušných segmentálních změn. aCGH/MLPA může však také napomoci k objasnění/bližší specifikaci změn detekovaných v karyotypu.

Klíčová slova: mikroarray (CMA), karyotypizace, chromosomální aberace

Patogenní varianta genu CNOT3 jako příčina závažného neurovývojového onemocnění

Pecková A.⁽¹⁾, Laštůvková J.⁽¹⁾, Čejnová V.⁽¹⁾, Kmoč S.⁽²⁾, Nosková L.⁽²⁾

1 Masarykova nemocnice v Ústí nad Labem, o.z., Krajská zdravotní, a.s., Oddělení lékařské genetiky, Ústí nad Labem

2 Laboratoř pro studium vzácných onemocnění, Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu, 1. LF UK a VFN v Praze

Úvod: Patogenní varianty v genu CNOT3 jsou dle OMIM asociovány s AD Intellectual developmental disorder with speech delay, autism, and dysmorphic facies (# 618672). Jedná se o velmi vzácné onemocnění – dosud bylo popsáno pouze několik desítek případů.

Kazuistika: Proband pochází z 1. věkově rizikové gravidity. Screeningová vyšetření v graviditě v normě. Negativní rodinná anamnéza. Porod S.C. ve 38+0 t.g., pro polohu KP a odtok plodové vody, AS 9-10-10, PH 2550g/48cm. Klinicky neprosívající hypotrofický novorozenec s chabým sacím reflexem, hypoglykémie. Parciální trombóza sinus sagittalis. Již od porodu zjevná makroglosie a výrazné plazení jazyka s nadměrnou salivací.

Genetické vyšetření bylo doporučeno pro nápadnou kraniofaciální dysmorfii s makroglosií, hypotonii a hypotrofii. Fenotyp: Prominující čelo, hypertelorismus, abnormální pohyb bulbů, příznak zapadacího slunce. Výrazná makroglosie. Ušní boltce nízko posazené a dysplastické. Atypické rýhování dlaní a plosek nohou. Na pravém stehně hemangiom. Bříško prohmatné, pupek klidný, kýla ne.

Vyšetření: karyotyp 46,XY, Array CGH: normální mužský profil. SMA: 2 kopie SMN1. BWS/RSS negativní, klinický exom SOPHIA CES v2 negativní, Trio exom v rámci projektu „Určení příčin vzácných geneticky podmíněných onemocnění v pediatrické populaci pomocí nových metod analýzy genomu.“: u probanda byla nalezena de-novo heterozygotní sestřihová varianta v genu CNOT3: CNOT3(NM_014516.4):c.1406+1G>A vedoucí podle provedené analýzy transkriptu k retenci intronu 12 a vzniku předčasného stop kodonu p.Lys470Ter.

Závěr: Patogenní varianty v genu CNOT3 způsobují velmi variabilní fenotyp. Společným jmenovatelem může být hypotonie, malý vzrůst, PMR, poruchy chování, opožděný vývoj chůze. Diagnostika je komplikovaná, protože se jedná o velmi vzácné onemocnění s netypickými projevy.

Grantová podpora: NU23-07-00281, LM2023067

ADNP syndrom: Klinické indikační markery pro cílené genetické testování

Miroslav Holec⁽¹⁾

1 ADNP asociace, z.s., Praha, Česká republika

ADNP syndrom (ORPHA: 404448, OMIM: 615873) představuje vzácné neurovývojové onemocnění způsobené heterozygotními mutacemi v genu ADNP na chromozomu 20q13.13. Navzdory tomu, že jde o nejčastější známou monogenní příčinu poruch autistického spektra s odhadovanou prevalencí 0,17 % všech PAS, zůstává v klinické praxi značně poddiagnostikován. Definitivní potvrzení diagnózy ADNP syndromu je založeno na identifikaci patogenních variant v genu ADNP prostřednictvím sekvenačních metod, nejčastěji celoexomového sekvenování nebo cíleného sekvenování genového panelu.

Tato práce syntetizuje současné poznatky o genetickém pozadí ADNP syndromu a zaměřuje se na identifikaci specifických klinických markerů, které by měly vést lékaře k indikaci cíleného genetického testování na přítomnost mutací v genu ADNP. Metodika zahrnuje extrakci klinických příznaků z odborné literatury za období 2014-2024, probíhající mezinárodní kvalitativní dotazníkové šetření v komunitě rodin dětí s ADNP syndromem a kvalitativní analýzu anamnézy diagnostikovaných pacientů s ADNP syndromem v ČR.

Charakteristický klinický fenotyp, který zahrnuje kombinaci globálního vývojového opoždění, opoždění řeči, intelektuálního postižení, atypických rysů PAS, hypotonie a unikátního biomarkeru v podobě předčasné erupce chrupu, představuje základ pro včasnou indikaci cíleného genetického testování.

Kvalitativní analýza prokazuje pozitivní trend ve zkrácení doby diagnózy ADNP syndromu u dětí narozených po roce 2018, což koreluje s širší dostupností metod WES a NGS v klinické praxi. Retrospektivní analýza klinických dat ukázala, že u 4 z 5 pacientů s potvrzeným ADNP syndromem v ČR byla provedena molekulárně genetická diagnostika Angelmanova syndromu s negativním výsledkem před stanovením správné diagnózy.

Na základě poznatků formulujeme indikační kritéria pro cílené genetické testování ADNP genu založená na specifických fenotypových projevech, přičemž důraz klademe na snadno identifikovatelné klinické markery dostupné v primární a specializované pediatrické péči. Vzhledem k vysoké míře klinického překryvu a častým diagnostickým záměnám by měla být suspekce na Angelmanův syndrom považována za indikaci k zahrnutí ADNP syndromu do užší diferenciální diagnostiky a zvážení cíleného molekulárně genetického testování. Implementace těchto indikačních kritérií do klinické praxe může významně zvýšit záchyt pacientů s ADNP syndromem a umožnit jejich včasný přístup k specializované péči a raným intervencím.

FastGEN MPN – rychlá NGS metoda pro detekci mutací u myeloproliferativních neoplázií

Chladová V.⁽¹⁾, Křepelková I.⁽¹⁾, Dvořáková B.⁽¹⁾, Slavkovský R.⁽²⁾

1 BioVendor – Laboratorní medicína a.s., Brno

2 Ústav molekulární a translační medicíny, LF UP v Olomouci

Detekce mutací v genech JAK2, MPL a CALR je standardní součástí diagnostického vyšetření myeloproliferativních neoplázií (MPN) tj. esenciální trombocytémie (ET), pravá polycytémie (PV) a primární myelofibróza (PMF). Za účelem genotypizace těchto genů byl vyvinut vysoce citlivý NGS protokol pro technologii fastGEN. Souprava fastGEN umožňuje detekci mutace JAK2 V617F od 1 % a detekci dalších mutací v genu JAK2, MPL a CALR včetně záchytu delecí >50 bp od 5 %. Princip stanovení metodou fastGEN využívá krátkých amplikonů získaných pomocí jediné fastGEN polymerázové řetězové reakce s tagovanými hybridními primery a následného sekvenování o vysokém pokrytí.

Detekce bodových mutací v genu STAT6 ve volné nádorové DNA u pacientů s klasickým Hodgkinovým lymfomem

Grohmann J., Navrátilová J., Hanáčková V., Kredátusová A., Urbánková H., Procházka V., Papajík T.

Hemato-onkologická klinika, LF UP a FN Olomouc

Úvod:

Detekce mutací ve vybraných kandidátních genech na úrovni volné nádorové DNA (ctDNA) přispívá k diagnostice a umožňuje přesnější sledování léčebné odpovědi u klasického Hodgkinova lymfomu (cHL). Mezi vhodné kandidátní geny patří gen STAT6, kde jsou popisovány mutace u přibližně 30 % případů cHL. K detekci mutací na úrovni ctDNA je zapotřebí vysoce citlivých molekulárně-biologických metod – masivně paralelního sekvenování (MPS). Pro diagnostické a prognostické účely je ovšem využití této technologie časově a finančně náročné. Digitální PCR (dPCR) je naopak rychlejší a levnější metodou, která je zároveň méně náročná na vstupní množství ctDNA. Technologie je vhodná zejména pro detekci bodových mutací.

Cíle práce:

Cílem této práce bylo vytvoření multiplexních dPCR esejí pro detekci základních hotspot mutací v DNA vazebné doméně genu STAT6 – v kodonech p.(N417) a p.(D419) exonu 12. Navržená metodika bude následně použita k vyšetření souboru ctDNA cHL pacientů.

Metody:

Vzorky periferní krve cHL pacientů byly v době diagnózy/relapsu odebrány do zkumavek Cell-Free DNA BCT® CE (Streck, USA). CtDNA byla následně izolována z plazmy pomocí kitu QiaAmp Circulating nucleic acid kit (Qiagen, Germany).

Pro detekci mutací byla použita technologie Naica® Crystal Digital PCR system (Stilla Technologies) se Sapphire čipy. Výsledky byly vyhodnoceny v analytickém programu Crystal Miner software se senzitivitou 0,1 % variantní alelové frekvence (VAF).

Výsledky:

Celkem byla ctDNA analyzována u 38 pacientů (36 v době diagnózy, 2 v době relapsu onemocnění). Vstupní množství ctDNA do reakce bylo v průměru 8,4 ng (3,5 – 14,8 ng). Celkový záchyt multiplexní dPCR byl 13,16 % (5/38). V naší kohortě pacientů byl častěji detekován hotspot p.(D419), který je také popisován u R/R difuzního velkobuněčného B-lymfomu (DLBCL). Navržený multiplex je dostatečně robustní a umožňuje detekci i vzácnějších kompozitních mutací vznikající nejčastěji kombinací p.(N417Y) a záměnou v p.(D419) nebo p.(N421).

Závěr:

Metoda crystal dPCR je dostatečně citlivá, rychlá a cenově dostupná technologie pro screening mutací STAT6N417Y a STAT6D419A/G/H/N/Y u pacientů s cHL. Technologie zároveň umožňuje u pacientů se záchytem mutace sledování odpovědi na léčbu. Současný design je možné v budoucnu doplnit o další hotspoty. To povede k celkovému zvýšení záchytu mutací u pacientů.

Podpora projektu:

Práce je podporována granty: IGA_LF_2024_001, IGA_LF_2025_005 a MZ ČR – RVO (FNOL, 00098892).







3 GENES

ebamed3

GeneProof[®]
Molecular diagnostics for your routine

biotech
innovative

BIOTECHA
Czechia

generi **biotech**

 **KRD**

viagene 

 **IAB**
Institute of Applied
Biotechnologies


EASTPORT
LIFESCIENCE

r e p r o m e d a

CZG
CZECHGENETICS

ALLO 
GENE

BIO  **PORT**